

**Phenolische Inhaltsstoffe in *Cistus incanus* Tee –
Charakterisierung und Stabilität innerhalb der
Teezubereitung**

Dissertation

zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
des Fachbereichs Chemie, Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften der Universität Hamburg

aus dem
Institut für Lebensmittelchemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Peer Riehle

aus Bad Dürkheim

Hamburg

August 2014

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. Sascha Rohn in der Zeit von Mai 2011 bis August 2014 angefertigt.

Tag der Disputation: 14.11.2014

- 1. Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. Sascha Rohn**
- 2. Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. Bernward Bisping**

“All true tea lovers not only like their tea strong, but like it a little
stronger with each year that passes.”

George Orwell

Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Sascha Rohn (Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg) für die Ermöglichung der Durchführung der vorliegenden Arbeit sowie die zahlreichen wissenschaftlich wertvollen Denkanstöße und Ratschläge, die letztendlich mit zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, bedanken.

Ein großes Dankeschön geht weiterhin an Frau Maren Vollmer und Frau Nele Rusche, die ihre Diplomarbeiten zur Thematik der vorliegenden Arbeit angefertigt haben, und somit einen wichtigen Grundstein für die Forschung auf diesem Gebiet gelegt haben.

Ebenfalls gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Bodo Saake (Institut für Chemische Holztechnologie der Universität Hamburg) für die wissenschaftliche Unterstützung und Ermöglichung der Durchführung der Versuche zur Holzanalytik. Innerhalb dieser Versuche hat insbesondere Frau Anna Knöpfler durch ihre tatkräftige praktische sowie fachliche Unterstützung zum Erfolg dieser Versuche beigetragen. Auch hierfür möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. habil. Ralf Pätzold für die Mitwirkung in der Ausarbeitung des Forschungsvorhabens der vorliegenden Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Bernward Bisping (Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg) danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Großer Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg sowie insbesondere dem Arbeitskreis Rohn für die Zusammenarbeit, die Hilfestellungen und das angenehme Arbeitsklima.

Insgesamt möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Publikationen

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits publiziert:

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

RIEHLE P, RUSCHE N, SAAKE B, ROHN S (2014) Influence of the leaf content and the herbal particle size on the presence and the extractability of quantitated phenolic compounds in *Cistus incanus* herbal teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62: 10978–10988.

RIEHLE P, VOLLMER M, ROHN S (2013) Phenolic compounds in *Cistus incanus* herbal infusions – Antioxidant capacity and thermal stability during the brewing process. *Food Research International* 53: 891-899.

Vorträge

RIEHLE P, VOLLMER M, ROHN S (2013) Potentielle pflanzliche Wirkstoffe aus *Cistus incanus* Tee. Phytokongress 2013 (Gesellschaft für Phytotherapie), Leipzig.

In: *Zeitschrift für Phytotherapie* 34 (Suppl. 1): 19.

RIEHLE P, VOLLMER M, ROHN S (2013) Antioxidative Kapazität und thermische Stabilität phenolischer Substanzen in *Cistus incanus* Tee.

Regionalverbandstagung Nord (Lebensmittelchemische Gesellschaft), Food Science Meets Industry, Hamburg.

In: *Lebensmittelchemie* 67: 77-78.

Poster

RIEHLE P, RUSCHE N, SAAKE B, ROHN S (2014) Antioxidative phenolische Inhaltsstoffe in *C. incanus* Tee – Abhängig vom Blatt-zu-Holz-Verhältnis und der Partikelgröße des Teekrautes?. Regionalverbandstagung Nord (Lebensmittelchemische Gesellschaft), Food Science Meets Authority, Hamburg.

RIEHLE P, VOLLMER M, ROHN S (2013) Charakterisierung phenolischer Substanzen in *Cistus incanus* Tee. 50. Wissenschaftlicher Kongress der DGE (Deutsche Gesellschaft für Ernährung), Bonn.

In: *Proceedings of the German Nutrition Society* 18: 88.

RIEHLE P, VOLLMER M, ROHN S (2012) Antioxidativität und Stabilität phenolischer Substanzen in *Cistus incanus* Tee. 41. Deutscher Lebensmittelchemikertag (Lebensmittelchemische Gesellschaft), Münster.

In: *Lebensmittelchemie* 67: 37.

NEUMÜLLER A, RIEHLE P, PÄTZOLD R (2011) Bestimmung phenolischer Verbindungen und des antioxidativen Potentials in *Cistus incanus* mittels HPLC-ESI-MS. 48. Wissenschaftlicher Kongress der DGE (Deutsche Gesellschaft für Ernährung), Potsdam.

In: *Proceedings of the German Nutrition Society* 15: 45.

NEUMÜLLER A, RIEHLE P, PÄTZOLD R (2011) Isolierung antioxidativ wirksamer Verbindungen aus *Cistus incanus* mittels präparativer HPLC. Regionalverbandstagung Nord/Südwest (Lebensmittelchemische Gesellschaft), Kassel.

In: *Lebensmittelchemie* 65: 162-163.

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis	I
II Abbildungsverzeichnis	V
III Tabellenverzeichnis	XII
IV Abkürzungsverzeichnis	XVI
1 Einleitung	1
2 Grundlagen.....	2
2.1 Graubehaarte Zistrose (<i>Cistus incanus</i>)	2
2.1.1 Botanik und Herkunft	2
2.1.2 Traditionelle Verwendung von <i>C. incanus</i>	4
2.1.3 Aktueller Forschungsstand zu <i>C. incanus</i>	4
2.1.4 Übersicht <i>C. incanus</i> Produkte.....	5
2.1.5 Lebensmittelrechtliche Beurteilung und Einstufung von <i>C. incanus</i> als <i>Novel Food</i>	6
2.2 Sekundäre Pflanzenstoffe	7
2.2.1 Phenolische Substanzen.....	7
2.2.1.1 Flavonoide.....	8
2.2.1.2 Phenolsäuren	12
2.2.1.3 Tannine	13
2.2.1.4 Stabilitäten phenolischer Substanzen während der Lebensmittel- verarbeitung und -zubereitung	15
2.2.1.5 Bioverfügbarkeit phenolischer Substanzen.....	18
2.2.1.6 Bioaktivität und postulierte Wirkungen phenolischer Substanzen	20
2.2.1.7 Analytik phenolischer Substanzen	25
2.2.1.7.1 Identifizierung und Quantifizierung	25
2.2.1.7.2 Bestimmung der antioxidativen Kapazität	26
2.2.1.7.3 Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes	31

2.2.1.7.4 Bestimmung des Tanningehaltes	32
2.2.1.7.5 Statistische Versuchsplanung	33
2.3 Holzstoffe und Gerüstsubstanzen.....	34
2.3.1 Analytik von Holzstoffen und Gerüstsubstanzen	36
3 Zielsetzung.....	38
4 Material und Methoden	39
4.1 Probenmaterial	39
4.2 Probenaufarbeitung	42
4.3 Identifizierung phenolischer Substanzen mittels LC-DAD-ESI-MS/MS	42
4.4 Quantifizierung phenolischer Substanzen mittels LC-DAD	44
4.5 Bestimmung antioxidativer Kapazitäten mittels LC-onlineTEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).....	47
4.6 Isolierung phenolischer Substanzen mittels präparativer LC-DAD	49
4.7 Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes mittels Folin-Ciocalteu-Assay.....	50
4.8 Bestimmung des Tanningehaltes mittels Methylcellulose-Präzipitations- Assay.....	51
4.9 Bestimmung der gesamten antioxidativen Kapazität mittels Elektronenspin- resonanz-Spektroskopie	51
4.10 Bestimmung des Lignin-, Holzzucker- und Cellulosegehaltes.....	52
4.11 Versuche zur Untersuchung der Stabilitäten phenolischer Substanzen in C. incanus innerhalb des Prozesses der Teezubereitung.....	54
4.11.1 Versuche zum Einfluss von Kochwasser, Kochtemperatur und Kochzeit auf die Konzentrationen phenolischer Substanzen in C. incanus Tee.....	54
4.11.2 Softwarebasierte statistische Versuchsplanung zur Untersuchung möglicher Effekte der Teezubereitung auf die Konzentrationen phenolischer Inhaltsstoffe in C. incanus Tee.....	55
4.11.3 Modellversuch zur Untersuchung möglicher Einflussfaktoren aus der Teezubereitung auf die Stabilität von Catechin	56

4.12 <i>Tea Cream</i> -Charakterisierung in <i>C. incanus</i> Tee	59
5 Ergebnisse und Diskussion	60
5.1. <i>Profiling</i> bioaktiver phenolischer Substanzen in <i>C. incanus</i> Tee	60
5.1.1 Identifizierung phenolischer Substanzen	60
5.1.2 Quantifizierung phenolischer Substanzen	71
5.2 Charakterisierung phenolischer Substanzen in <i>C. incanus</i> Tee	77
5.2.1 Gesamphenolgehalte, Tanningehalte und gesamte antioxidative Kapazitäten	77
5.2.2 Antioxidative Kapazitäten der einzelnen phenolischen Inhaltsstoffe	83
5.2.3 Isolierung phenolischer Substanzen für weiterführende Bioaktivitäts- tests	92
5.2.4 <i>Tea Cream</i> -Charakterisierung	96
5.3 Einfluss ausgewählter Parameter der Teezubereitung auf die Konzentrationen bioaktiver phenolischer Inhaltsstoffe in <i>C. incanus</i> Tee	99
5.3.1 Einfluss des Kochwassers	99
5.3.2 Einfluss der Kochtemperatur	104
5.3.3 Einfluss der Kochzeit	108
5.3.4 Einfluss möglicher Wechselwirkungen von Faktoren der Tee- zubereitung	113
5.3.5 Einfluss von Epimerisierungs- und Autoxidationsreaktionen	119
5.4 Einfluss der Teekrautbeschaffenheit auf die Konzentrationen bioaktiver phenolischer Inhaltsstoffe in <i>C. incanus</i> Tee	125
5.4.1 Einfluss von Blatt- und Holzanteil des Teekrautes	125
5.4.2 Einfluss der Partikelgröße des Teekrautes	132
5.5 Vergleich der Konzentrationen bioaktiver Inhaltsstoffe in <i>C. incanus</i> Tee mit verschiedenen pflanzlichen Lebensmitteln	136
6 Schlussfolgerung	141
7 Zusammenfassung	144

8 Summary	146
9 Literatur	148
Anhang	165
A1 Geräte.....	165
A2 Gefahrstoffverzeichnis	168
A3 Formeln und Berechnungen.....	171
A3.1 Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Quantifizierung phenolischer Substanzen (LC-DAD)	171
A3.2 Berechnung der Konzentrationen phenolischer Substanzen (LC-DAD)	172
A3.3 Berechnung der relativen <i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i> (LC-onlineTEAC)	173
A3.4 Berechnung der absoluten <i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i> (LC-onlineTEAC)	173
A3.5 Berechnung des Gesamtphenolgehaltes (<i>Folin-Ciocalteu-Assay</i>)	174
A3.6 Berechnung des Tanningehaltes (Methylcellulose-Präzipitations-Assay).....	175
A3.7 Berechnung der gesamten antioxidativen Kapazität (Elektronenspinresonanz-Spektroskopie)	175
A4 Kalibriergeraden.....	176
A4.1 Kalibriergeraden für die Quantifizierung phenolischer Substanzen (LC-DAD).....	176
A4.2 Gallussäurekalibriergerade für die Gesamtphenolbestimmung (<i>Folin-Ciocalteu-Assay</i>)	178
A4.3 Epicatechinkalibriergerade für die Tanninbestimmung (Methylcellulose- Präzipitations-Assay).....	179

II Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1	Blühender <i>C. incanus</i> Strauch (links) und Teekraut (rechts).....	3
Abb. 2.2	Grundstruktur der Flavonoide nach CROZIER <i>et al.</i> (2009).....	8
Abb. 2.3	Unterklassen der Flavonoide nach BELITZ <i>et al.</i> (2008). R: H, OH oder OCH ₃ ; X [○] : Gegenanionen.	9
Abb. 2.4	C-Ring-Konfigurationen der 5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavanole nach BELITZ <i>et al.</i> (2008).....	10
Abb. 2.5	Grundstrukturen der Phenolsäuren nach BELITZ <i>et al.</i> (2008). R: H, OH oder OCH ₃	12
Abb. 2.6	Struktur der Ellagsäure nach BELITZ <i>et al.</i> (2008).....	13
Abb. 2.7	Auswahl dimerer Flavanolautooxidationsprodukte nach SUN und MILLER (2003) und HE <i>et al.</i> (2009).	16
Abb. 2.8	Reaktionsmechanismus des TEAC-Assays (<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>) nach HUANG <i>et al.</i> (2005).....	29
Abb. 2.9	Aufbau eines LC-onlineTEAC-Systems (<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>) zur Bestimmung antioxidativer Kapazitäten einzelner Substanzen modifiziert nach KOLEVA <i>et al.</i> (2001).	30
Abb. 2.10	Grundschemata der <i>Folin-Ciocalteu</i> -Farbreaktion nach PRIOR <i>et al.</i> (2005).	31
Abb. 2.11	Phenylpropanbestandteile in Ligninen nach NULTSCH (2001).....	34
Abb. 2.12	Ausschnitt aus der Struktur von Lignin resultierend aus Polymerisation von Conyferylalkohol nach GOSSAUER (2006).	35
Abb. 2.13	Molekulare Struktur von Cellulose nach NULTSCH (2001).....	36
Abb. 4.1	Auswahl handsortierter (Blatt und Stängel) und gesiebter (Partikelgröße) <i>C. incanus</i> Proben. Blattanteile bzw. Stängelanteile sortierte Proben: A.so1: 0 % w/w Blatt, 100 % w/w Stängel; A.so3: 50 % w/w Blatt, 50 % w/w Stängel; A.so5: 100 % w/w Blatt, 0 % w/w Stängel. Durchschnittliche Partikelgrößen gesiebte Proben: A.gs1: 2,8 mm; A.gs2: 2,3 mm; A.gs3: 1,7 mm; A.gs4: 1,2 mm, A.gs5: 0,8 mm; A.gs6: 0,3 mm. Weitere Beschreibungen der Proben sind Tabelle 4.1 zu entnehmen.	41

Abb. 5.1a-b	LC-DAD-Chromatogramme der SPE-Eluat der Probe E bei 280 nm. a) methanolisches Eluat; b) Methanol/Ammoniak-Eluat. Die Bezeichnungen der 32 identifizierten Substanzen (Nr. 1-32) sind in Tabelle 5.1 und 5.2 aufgeführt. Beschreibungen zur Probe sind in Tabelle 4.1 dargestellt.....	61
Abb. 5.2	ESI-MS/MS-Spektrum des Quasimoleküls $[M-H]^-$ von Gallocatechin-gallocatechin (Nr. 2) mit m/z 609. Analytische Daten zur Substanz vgl. Tabelle 5.1.	64
Abb. 5.3	Postulierte ESI-MS/MS-Fragmentierung des Quasimoleküls $[M-H]^-$ von Gallocatechin-gallocatechin (Nr. 2) mit m/z 609 modifiziert nach FRIEDRICH <i>et al.</i> (2000). Analytische Daten zur Substanz vgl. Tabelle 5.1. RDA: <i>Retro-Diels-Alder</i> -Reaktion	64
Abb. 5.4	ESI-MS/MS-Spektrum des Quasimoleküls $[M-H]^-$ von Vicenin-2 (Nr. 7) mit m/z 593. Analytische Daten zur Substanz vgl. Tabelle 5.1.	65
Abb. 5.5	Postulierte ESI-MS/MS-Fragmentierung des Quasimoleküls $[M-H]^-$ von Vicenin-2 (Nr. 7) mit m/z 593 modifiziert nach SILVA <i>et al.</i> (2014). Analytische Daten zur Substanz vgl. Tabelle 5.1.....	66
Abb. 5.6	ESI-MS/MS-Spektrum des Quasimoleküls $[M-H]^-$ von Hydroxyferulasäure-5-O-rhamnosid (Nr. 24) mit 355 m/z . Analytische Daten zur Substanz vgl. Tabelle 5.2.....	67
Abb. 5.7	Postulierte ESI-MS/MS-Fragmentierung des Quasimoleküls $[M-H]^-$ von Hydroxyferulasäure-5-O-rhamnosid (Nr. 24) mit m/z 355. Analytische Daten zur Substanz vgl. Tabelle 5.2.	67
Abb. 5.8	ESI-MS/MS-Spektrum des Quasimoleküls $[M-H]^-$ von HHDP-Glucose Isomer 2 (Nr. 29) mit m/z 481. Analytische Daten zur Substanz vgl. Tabelle 5.2.....	68
Abb. 5.9	Postulierte ESI-MS/MS-Fragmentierung des Quasimoleküls $[M-H]^-$ von HHDP-Glucose Isomer 2 (Nr. 29) mit m/z 481. Analytische Daten zur Substanz vgl. Tabelle 5.2.....	69
Abb. 5.10	ESI-MS/MS-Spektrum des in Probe B (<i>C. incanus</i> Kräutertee mit 5 % Pfefferminzzusatz) enthaltenen Eriocitrins, Quasimolekülion $[M-H]^-$ mit m/z 595.	70
Abb. 5.11	LC-DAD-Chromatogramm des methanolischen SPE-Eluates der Probe B (<i>C. incanus</i> Tee mit 5 % Pfefferminzzusatz) bei 280 nm. ER: Eriocitrin (phenolische Substanz aus Pfefferminze).....	71

Abb. 5.12a-f	Konzentrationen der 21 quantifizierten phenolischen Inhaltsstoffe in sieben <i>C. incanus</i> Tee Handelsproben. a) Phenolsäuren, b) monomere und dimere Flavanole, c) Myricetinglycoside, d) Quercetinglycoside, e) Tilirosidisomere und f) Ellagitannine. Teezubereitung vgl. Kapitel 4.2. Zugehörige Substanzbezeichnungen sind in Tabelle 5.1 sowie 5.2 und Beschreibungen der Proben in Tabelle 4.1 dargestellt.....	73
Abb. 5.13a-f	a) und b) Gesamtphenolgehalte, c) und d) Tanningehalte sowie e) und f) gesamte antioxidative Kapazitäten der SPE-Eluate aus sieben <i>C. incanus</i> Tee Handelsproben (linke Spalte) sowie der gesiebten Fraktionen aus Probe A (rechte Spalte) mit durchschnittlichen Partikelgrößen von 2,8 mm; 2,3 mm; 1,7 mm; 1,2 mm; 0,8 mm und 0,3 mm. Teezubereitung vgl. Kapitel 4.2. Zugehörige Probenbeschreibungen sind in Tabelle 4.1 dargestellt. GE: Gallussäureäquivalente; EE: Epicatechinäquivalente; SPE: <i>Solid Phase Extraction</i> (Festphasenextraktion).....	78
Abb. 5.14a-b	LC-onlineTEAC-Chromatogramme (<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>) der SPE-Eluate der Probe A bei 280 nm (positive Peaks) und 734 nm (negative Peaks der TEAC-Nachsäulen-derivatisierung) a) methanolisches SPE-Eluat; b) Methanol/Ammoniak-SPE-Eluat. Die Bezeichnungen der Substanzen (Nr. 1- Nr. 31) sind in Tabelle 5.1 und 5.2 aufgeführt. 1 mM Trolox wurde als interner Standard den SPE-Eluaten zugesetzt.....	84
Abb. 5.15	Struktur von <i>trans</i> -Tiliroxid mit einer TEAC (<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>) von 0,0 mmol TE/mmol Substanz. TE: Troloxäquivalente.....	89
Abb. 5.16	Strukturen von Gallussäure mit einer TEAC (<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>) von 2,4 mmol TE/mmol Substanz und Methylgallussäure mit einer TEAC von 0,9 mmol TE/mmol Substanz. TE: Troloxäquivalente.....	90
Abb. 5.17	Strukturen von Gallocatechin mit einer TEAC (<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>) von 5,3 mmol TE/mmol Substanz und von Catechin mit einer TEAC von 1,5 mmol TE/mmol Substanz. TE: Troloxäquivalente.....	90

Abb. 5.18	Präparatives LC-DAD-Chromatogramm einer 1 mL Injektion des aufkonzentrierten methanolischen SPE-Eluates aus Probe A bei 280 nm. F1-F14: Gesammelte Fraktionen; (Nr. 1-Nr. 22): Identifizierte Substanzen. Die Bezeichnungen der identifizierten Substanzen sind in Tabelle 5.1 aufgeführt.	93
Abb. 5.19a-c	Analytische LC-DAD-Chromatogramme der isolierten Fraktionen a) F1, b) F7 und c) F13 des methanolischen SPE-Eluates aus Probe A bei 280 nm. (Nr. 1): Gallussäure; (Nr. 12): Myricetin-O-xylosid; (Nr. 21): <i>trans</i> -Tilirosid. Analytische Daten der identifizierten Substanzen sind in Tabelle 5.1 aufgeführt.....	94
Abb. 5.20	<i>Tea Cream</i> in Form eines dünnen Oberflächenfilmes auf <i>C. incanus</i> Teeprobe C (Zubereitung mit Mineralwasser: pH 7,6; 20°dH; vgl. Kapitel 4.12) nach einer Lagerzeit von einer Woche bei einer Temperatur von 5 °C.....	97
Abb. 5.21	Freymy's Salz Abbaukinetiken innerhalb der Messungen zur Bestimmung der gesamten antioxidativen Kapazität von <i>C. incanus Tea Cream</i> mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie. Dargestellt sind die Kinetiken für Oberflächenfilm, Präzipitat und Teeüberstand aus, unter Verwendung von Mineralwasser (MIN) zubereiteter, Handelsprobe C nach Lagerung für eine Woche bei 5 °C. Als Vergleich ist die Kinetik des Teeüberstandes aus einer Zubereitung mit Millipore®-Wasser (MPW) dargestellt. Teezubereitung vgl. Kapitel 4.12. Verdünnungen der Proben mit jeweiligem Kochwasser sind in Klammern dargestellt.	98
Abb. 5.22a-f	Konzentrationen der 21 quantifizierten phenolischen Inhaltsstoffe in <i>C. incanus</i> Tee Handelsprobe A in Abhängigkeit des innerhalb der Teezubereitung (Zubereitung vgl. Kapitel 4.2; Kochdauer 60 min) eingesetzten Kochwassers. a) Phenolsäuren, b) monomere und dimere Flavanoole, c) Myricetinglycoside, d) Quercetinglycoside, e) Tilirosidisomere und f) Ellagitannine. MIN: Mineralwasser (pH 7,6; 20°dH); LW: Leitungswasser (Trinkwasserqualität, pH 7,2; 6°dH); MPW: Millipore®-Wasser (pH 5,8; 0°dH). Zugehörige Substanzbezeichnungen sind in Tabelle 5.1 sowie 5.2 und Beschreibungen der Probe in Tabelle 4.1 dargestellt.	100

Abb. 5.23a-f	Konzentrationen der 21 quantifizierten phenolischen Inhaltsstoffe in <i>C. incanus</i> Tee Handelsprobe A in Abhängigkeit der Kochtemperatur innerhalb der Teezubereitung (Zubereitung vgl. Kapitel 4.2). a) Phenolsäuren, b) monomere und dimere Flavanole, c) Myricetinglycoside, d) Quercetinglycoside, e) Tilirosidisomere und f) Ellagitannine. Zugehörige Substanzbezeichnungen sind in Tabelle 5.1 sowie 5.2 und Beschreibungen der Probe in Tabelle 4.1 dargestellt.....	105
Abb. 5.24a-f	Konzentrationen der 21 quantifizierten phenolischen Inhaltsstoffe in <i>C. incanus</i> Tee Handelsprobe A in Abhängigkeit der Kochzeit innerhalb der Teezubereitung (Zubereitung vgl. Kapitel 4.2). a) Phenolsäuren, b) monomere und dimere Flavanole, c) Myricetinglycoside, d) Quercetinglycoside, e) Tilirosidisomere und f) Ellagitannine. Zugehörige Substanzbezeichnungen sind in Tabelle 5.1 sowie 5.2 und Beschreibungen der Probe in Tabelle 4.1 dargestellt.....	109
Abb. 5.25	Wechselwirkung der Zubereitungsparameter Kochzeit und Kochtemperatur auf die Konzentration von Gallussäure (Nr. 1) in <i>C. incanus</i> Teeprobe A. Ergebnisse dargestellt für eine Teezubereitung analog zu Kapitel 4.2 unter Verwendung von Millipore®-Wasser pH 7 sowie eines Teekraut-zu-Kochwasser-Verhältnisses von 1,25 g/45 mL. Analytische Daten zur Substanz sind in Tabelle 5.1 und Beschreibungen zur Probe in Tabelle 4.1 dargestellt.	114
Abb. 5.26	Effekte der Zubereitungsparameter Kochzeit und Kochtemperatur auf die Konzentration von Gallocatechin-(4 α -8)-catechin (Nr. 4) in <i>C. incanus</i> Teeprobe A. GC-CAT: Gallocatechin-(4 α -8)-catechin. Ergebnisse dargestellt für eine Teezubereitung analog zu Kapitel 4.2 unter Verwendung von Millipore®-Wasser pH 7 sowie eines Teekraut-zu-Kochwasser-Verhältnisses von 1,25 g/45 mL. Analytische Daten zur Substanz sind in Tabelle 5.1 und Beschreibungen zur Probe in Tabelle 4.1 dargestellt.	115

Abb. 5.27	Effekt des pH-Wertes des Kochwassers während der Teezubereitung auf die Konzentration von Gallocatechin-(4 α -8)-catechin (Nr. 4) in <i>C. incanus</i> Teeprobe A. GC-CAT: Gallocatechin-(4 α -8)-catechin. Ergebnisse dargestellt für eine Teezubereitung analog zu Kapitel 4.2 unter Verwendung eines Teekraut-zu-Kochwasser-Verhältnisses von 1,25 g/45 mL, einer Kochzeit von 32,5 min sowie einer Kochtemperatur von 67,5 °C. Analytische Daten zur Substanz sind in Tabelle 5.1 und Beschreibungen zur Probe in Tabelle 4.1 dargestellt.	116
Abb. 5.28	Effekt der Kochtemperatur während der Teezubereitung auf die Konzentration von Myricitrin (Nr. 14) in <i>C. incanus</i> Teeprobe A. Ergebnisse dargestellt für eine Teezubereitung analog zu Kapitel 4.2 unter Verwendung von Millipore®-Wasser pH 7, eines Teekraut-zu-Kochwasser-Verhältnisses von 1,25 g/45 mL und einer Kochzeit von 32,5 min. Analytische Daten zur Substanz sind in Tabelle 5.1 und Beschreibungen zur Probe in Tabelle 4.1 dargestellt.	117
Abb. 5.29a-b	LC-DAD-Chromatogramme von Catechin (Nr. 6) bei 280 nm (schwarz) und 365 nm (rot). a) Catechinstandard (1 mg/mL) erhitzt bei 95 °C für 60 min in Millipore®-Wasser pH 3; b) Catechinstandard (1 mg/mL) erhitzt bei 95 °C für 60 min in Millipore®-Wasser pH 11. EC: Epicatechin (Epimerisierungsprodukt); DH: Dehydrodicatechin A (Autoxidationsprodukt).....	120
Abb. 5.30	ESI-MS/MS-Spektrum des Quasimoleküls [M-H] ⁻ mit <i>m/z</i> 575 des dimeren Catechinautoxidationsproduktes Dehydrodicatechin A.	121
Abb. 5.31	Postulierte ESI-MS/MS-Fragmentierung des Quasimoleküls [M-H] ⁻ mit <i>m/z</i> 575 von Dehydrodicatechin A.	122
Abb. 5.32	<i>Response-Surface</i> -Modell zur Stabilität von Catechin innerhalb des Prozesses der Teezubereitung in Abhängigkeit von der Substanzkonzentration und des pH-Wertes des Kochwassers (Millipore®-Qualität). Die Ergebnisse sind für eine Kochzeit von 31 min und einer Kochtemperatur von 62,5 °C dargestellt.....	123

- Abb. 5.33a-f** Konzentrationen von 22 phenolischen Substanzen in fünf handsortierten *C. incanus* Teeproben (A.so1 bis A.so5) mit Blattanteilen von 0 % (w/w), 25 % (w/w), 50 % (w/w), 75 % (w/w) und 100 % (w/w) sowie entsprechenden Stängelanteilen von 100 % (w/w), 75 % (w/w), 50 % (w/w) und 0 % (w/w). a) Phenolsäuren, b) monomere und dimere Flavanole, c) Myricetinglycoside, d) Quercetinglycoside, e) Tilirosidisomere und f) Ellagitannine. Teezubereitung vgl. Kapitel 4.2. Zugehörige Substanzbezeichnungen sind in Tabelle 5.1 sowie 5.2 und Beschreibungen der Proben in Tabelle 4.1 dargestellt. 128
- Abb. 5.34a-f** Konzentrationen von 22 phenolischen Substanzen in sechs gesiebten *C. incanus* Teeproben (A.gs1 bis A.gs6) mit durchschnittlichen Partikelgrößen von 2,8 mm; 2,3 mm; 1,7 mm; 1,2 mm; 0,8 mm und 0,3 mm. a) Phenolsäuren, b) monomere und dimere Flavanole, c) Myricetinglycoside, d) Quercetinglycoside, e) Tilirosidisomere und f) Ellagitannine. Teezubereitung vgl. Kapitel 4.2. Zugehörige Substanzbezeichnungen sind in Tabelle 5.1 sowie 5.2 und Beschreibungen der Proben in Tabelle 4.1 dargestellt. 133

III Tabellenverzeichnis

Tab. 4.1	Beschreibungen der untersuchten <i>C. incanus</i> Tees (Handelsproben: A-G) sowie der aus Probe A handsortierten (A.so1-A.so5) und gesiebten (A.gs1-A.gs6) Teeproben. Grobe Partikelgröße: ca. 2-15 mm Pflanzenteile; feine Partikelgröße: ca. 2-5 mm Pflanzenteile. so: per Hand in Stängel, Blätter und definierte Mischungen aus Probe A sortiert; gs: mittels Siebmaschine aus Probe A gesiebte Fraktionen definierter Partikelgröße.	40
Tab. 4.2	LC-DAD-Geräteparameter für die Identifizierung phenolischer Substanzen.	43
Tab. 4.3	LC-DAD-Gradienten zur Analytik phenolischer Substanzen des methanolischen (Gradient 1) und Methanol/Ammoniak-SPE-Eluates (Gradient 2). Eluent A: Wasser/Ameisensäure (99,9:0,1 v/v); Eluent B: Acetonitril/Ameisensäure (99,9:0,1 v/v).	43
Tab. 4.4	ESI-MS/MS-Geräteparameter zur Identifizierung phenolischer Substanzen.	44
Tab. 4.5	Eingesetzte Standardsubstanzen für die Quantifizierung phenolischer Inhaltsstoffe in <i>C. incanus</i> Tee. Korrekturfaktoren (KF) für chemische Reinheit und Molekulargewicht (MW) bei Quantifizierung über strukturell verwandte Verbindungen. HHDP-Glucose: Hexahydroxydiphenoyl-glucose; I1 und I2: Isomer 1 und Isomer 2, CHR: chromatographisch rein.	45
Tab. 4.6	LC-DAD-Geräteparameter für die Quantifizierung phenolischer Substanzen.	46
Tab. 4.7	LC-onlineTEAC-Geräteparameter (<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>) zur Bestimmung der antioxidativen Kapazitäten der einzelnen phenolischen Inhaltsstoffe.	47
Tab. 4.8	LC-onlineTEAC-Gradient (<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>) zur Trennung phenolischer Substanzen aus dem methanolischem SPE-Eluat. Eluent A: Wasser/Ameisensäure (99,9:0,1 v/v); Eluent B: Acetonitril/Ameisensäure (99,9:0,1 v/v).	48
Tab. 4.9	Geräteparameter für die Isolierung phenolischer Substanzen aus <i>C. incanus</i> Tee mittels präparativer LC-DAD.	49

Tab. 4.10	Präparativer LC-DAD-Gradient zur Isolierung phenolischer Substanzen aus dem methanolischem SPE-Eluat. Eluent A: Wasser/Ameisensäure (99,9:0,1 v/v); Eluent B: Acetonitril/Ameisensäure (99,9:0,1 v/v).	50
Tab. 4.11	Geräteparameter zur Messung der gesamten antioxidativen Kapazitäten von <i>C. incanus</i> Tee mittels ESR-Spektroskopie (Elektronenspinresonanz-Spektroskopie).	52
Tab. 4.12	Zweistufiger Vollfaktorenversuchsplan mit randomisierter Messreihenfolge zur Untersuchung des Einflusses der Faktoren Kochtemperatur, Kochzeit, Teekraut-zu-Kochwasser-Verhältnis und pH-Wert des Kochwassers auf die Konzentration phenolischer Inhaltsstoffe in <i>C. incanus</i> Tee. (ma): maximale Faktoreinstellung; (mi): minimale Faktoreinstellung; (ze): mittlere Faktoreinstellung (Zentralpunkt).	56
Tab. 4.13	Versuchsplan <i>Central-Composite-Design (face-centered)</i> mit randomisierter Messreihenfolge zur Untersuchung des Einflusses der Faktoren Kochtemperatur, Kochzeit, Kochwasser pH-Wert und Catechinkonzentration auf die Zielgröße Catechinstabilität im Modellsystem. (ma): maximale Faktoreinstellung; (mi): minimale Faktoreinstellung; (ze): mittlere Faktoreinstellung, bzw. Zentralpunkt, falls Vorliegen dieser Einstellung bei allen vier Faktoren; (ra): randomisierte Faktoreinstellung.	57
Tab. 5.1	Identifizierte Substanzen in <i>C. incanus</i> Tee (methanolisches SPE-Eluat). Nr.: Peaknummer; [M-H] ⁺ : Quasimolekülion; R _t : LC-DAD-Retentionszeit; UV _{max} : UV-Absorptionsmaxima.	62
Tab. 5.2	Identifizierte Substanzen in <i>C. incanus</i> Tee (Methanol/Ammoniak-SPE-Eluat). Nr.: Peaknummer; [M-H] ⁺ : Quasimolekülion; R _t : LC-DAD-Retentionszeit; UV _{max} : UV-Absorptionsmaxima.	63
Tab. 5.3	Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) der Standardsubstanzen innerhalb der LC-DAD-Messungen.	72
Tab. 5.4	Relative TEAC (<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>) der einzelnen phenolischen Inhaltsstoffe in <i>C. incanus</i> Tee (Probe A) sowie deren Anteil an der Gesamt-TEAC. TE: Troloxäquivalente; n.d.: nicht detektiert; HHDP-Glucose: Hexahydroxydiphenylglucose; I1 und I2: Isomer 1 und 2.	85

Tab. 5.5	Absolute TEAC (<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>) der quantifizierten phenolischen Inhaltsstoffe in <i>C. incanus</i> Tee. TE: Troloxäquivalente; n.d.: nicht detektiert; HHDP-Glucose: Hexahydroxydiphenoyl-glucose; I1 und I2: Isomer 1 und 2.....	88
Tab. 5.6	Isolierte Fraktionen (F1 bis F14) aus dem methanolischen SPE-Eluat der <i>C. incanus</i> Teeprobe A. Dargestellt sind die Elutionszeit (präparative LC-DAD), in der Fraktion identifizierte Substanzen (analytische Daten vgl. Tabelle 5.1), die chromatographische Reinheit sowie die Ausbeute (neun Injektionen) der Substanzen.	95
Tab. 5.7	Gesamter ASE-Extraktgehalt (<i>Accelerated Solvent Extraction</i>), Hydrolysenrückstand, Glucosegehalt, Xylosegehalt sowie Summe der beiden Gehalte und Cellulosegehalt der handsortierten <i>C. incanus</i> Teeproben (A.so1 bis A.so5). Glucosekonzentrationen aus dem Stärketest sind für Probe A.so1 und A.so5 dargestellt. Die Beschreibungen der Proben sind Tabelle. 4.1 zu entnehmen.	126
Tab. 5.8	Vergleich der Konzentrationen [mg/100 mL] von Gallussäure, Gallocatechin und Catechin in Zistrosentee, grünem Tee, Schwarzem Tee und Rotwein. Die Konzentrationen für <i>C. incanus</i> Tee stellen den Mittelwert aus sechs Handelsproben (A und C-G) dar. Beschreibungen der Proben sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Die Vergleichswerte der Lebensmittel stammen aus der Datenbank Phenolexplorer 3.0 [4] (NEVEU <i>et al.</i> 2010, ROTHWELL <i>et al.</i> 2012 und ROTHWELL <i>et al.</i> 2013).	137
Tab. 5.9	Vergleich der mittleren Konzentrationen quantifizierter Quercetinglycoside in Zistrosentee und verschiedenen Zwiebeln. Die Konzentrationen für <i>C. incanus</i> Tee stellen den Mittelwert aus sechs Handelsproben (A und C-G) dar. Beschreibungen der Proben sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Die Vergleichswerte der Lebensmittel stammen aus der Datenbank Phenolexplorer 3.0 [4] (NEVEU <i>et al.</i> 2010, ROTHWELL <i>et al.</i> 2012 und ROTHWELL <i>et al.</i> 2013). Angaben in g Frischmasse.	138

Tab. 5.10	Vergleich der Konzentrationen quantifizierter Myricetinglycoside in Zistrosentee und ausgewählten Beeren. Die Konzentrationen für <i>C. incanus</i> Tee stellen den Mittelwert aus sechs Handelsproben (A und C-G) dar. Beschreibungen der Proben sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Die Vergleichswerte der Lebensmittel stammen aus der Datenbank Phenolexplorer 3.0 [4] (NEVEU <i>et al.</i> 2010, ROTHWELL <i>et al.</i> 2012 und ROTHWELL <i>et al.</i> 2013). Angaben in g Frischmasse.....	139
Tab. 5.11	Vergleich der Ellagsäurekonzentrationen in Zistrosentee, Erdbeere, Brombeere und Walnuss. Die Konzentrationen für <i>C. incanus</i> Tee stellen den Mittelwert aus sechs Handelsproben (A und C-G) dar. Beschreibungen der Proben sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Die Vergleichswerte der Lebensmittel stammen aus der Datenbank Phenolexplorer 3.0 [4] (NEVEU <i>et al.</i> 2010, ROTHWELL <i>et al.</i> 2012 und ROTHWELL <i>et al.</i> 2013). Angaben in g Frischmasse.....	139

IV Abkürzungsverzeichnis

ABTS	Diamonium-2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
ASE	<i>Accelerated Solvent Extraction</i>
<i>C. incanus</i>	<i>Cistus incanus</i>
CRF	<i>Charge Remote Fragmentation</i>
DAD	<i>Diode Array Detector</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOE	<i>Design of Experiment</i>
EE	Epicatechinäquivalent (engl. <i>equivalent</i>)
ESI-MS/MS	Elektrosprayionisation-Tandem-Massenspektrometrie
ESR	Elektronenspinresonanz
ET	Elektronentransfer
ETD	<i>Electron Transfer Dissociation</i>
FC	<i>Folin-Ciocalteu</i>
GE	Gallusäureäquivalent (engl. <i>equivalent</i>)
gs	gesiebt
HAT	<i>Hydrogen Atom Transfer</i>
HHDP	Hexahydroxydiphenensäure
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
LC-MS	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography-Tandem-Mass Spectrometry</i>
LC-NMR	<i>Liquid Chromatography-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy</i>
LC-onlineTEAC	<i>Liquid Chromatography-online Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>
LOD	<i>Limit of Detection</i>
LOQ	<i>Limit of Quantification</i>
LW	Leitungswasser

MCP	Methylcellulose-Präzipitations-Assay
MIN	Mineralwasser
MPW	Millipore®-Wasser
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MW	<i>Molecular Weight</i>
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
n.d.	nicht detektiert
NEM	Nahrungsergänzungsmittel
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
p	<i>Probability</i>
Ph. Eur.	<i>Pharmacopoea Europaea</i>
RDA	<i>Retro-Diels-Alder</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RP	<i>Reversed Phase</i>
RSM	<i>Response-Surface-Modell</i>
SET	<i>Single Electron Transfer</i>
Skt	Skalenteile
so	sortiert
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
SPS	Sekundäre Pflanzenstoffe
ssp.	Subspecies
TE	Troloxäquivalent (engl. <i>equivalent</i>)
TEAC	<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>
UV	Ultraviolette Strahlung
vis	<i>visible</i>

1 Einleitung

Aktuell bieten zahlreiche Hersteller Tee oder Nahrungsergänzungsmittel auf der Basis von *Cistus incanus* (Graubehaarte Zistrose) trotz einer bestehenden *Novel Food* Einstufung durch die Europäische Kommission an. Eine Zertifizierung des verwendeten Pflanzenmaterials, auf europäischer Ebene durch das Gemeinschaftliche Sortenamt, liegt für das verarbeitete Pflanzenmaterial nicht immer vor. Für den Verbraucher ist es daher schwierig die Authentizität, beispielsweise verarbeitete Zistrosenunterarten oder Herkunftsländer, dieser Produkte zu beurteilen. Ebenso ist die Qualität und Zusammensetzung des verarbeiteten Pflanzenmaterials sehr inhomogen. Beispielsweise bestehen einige traditionelle *C. incanus* Teemischungen hauptsächlich aus gröberen Stängelteilen, andere Teemischungen vorwiegend aus feinen Blättern. Die Profile und Konzentrationen der im trinkfertigen Tee enthaltenen Inhaltsstoffe variieren hierdurch möglicherweise stark.

Insbesondere hohe Gehalte sowie eine große Vielfalt phenolischer Inhaltsstoffe werden häufig in *C. incanus* Produkten beworben. Diesen Substanzen werden hohe antioxidative Kapazitäten und zahlreiche gesundheitsfördernde Effekte zugeschrieben. So sind für *C. incanus* Extrakte unter anderem antikanzerogene, antibakterielle und antivirale Effekte bekannt. Neben den bereits genannten Aspekten der Lebensmittelsicherheit und rechtlichen Beurteilung von *C. incanus* Erzeugnissen ist es für die Verbraucher ebenso entscheidend, dass hohe Konzentrationen der bioaktiven Inhaltsstoffe im verzehrfertigen Endprodukt enthalten sind. Die Konzentrationen dieser Inhaltsstoffe können von der Art und Qualität der verarbeiteten pflanzlichen Rohstoffe, der Extrahierbarkeit der phenolischen Substanzen aus der pflanzlichen Matrix, aber auch von Faktoren des industriellen Produktionsprozesses oder der Teezubereitung durch den Verbraucher abhängen. Hierbei ist die Stabilität der bioaktiven Inhaltsstoffe, beispielsweise gegenüber thermischen Einflüssen, Autoxidationsprozessen oder Komplexbildungsreaktionen durch Ionen des Kochwassers, innerhalb der Zubereitung ein kritischer Faktor.

Für eine Neubewertung des bestehenden *Novel Food* Status sowie einer erneuten Zulassung von *C. incanus* Produkten innerhalb der Europäischen Union (EU) können eine Klassifizierung des verarbeiteten Pflanzenmaterials sowie insbesondere ein *Profiling*, d.h. eine Identifizierung und Quantifizierung der bioaktiven Inhaltsstoffe, sowie deren Charakterisierung beitragen.

2 Grundlagen

2.1 Graubehaarte Zistrose (*Cistus incanus*)

2.1.1 Botanik und Herkunft

Cistus incanus (Graubehaarte Zistrose) ist ein Halbstrauch aus der Familie der *Cistaceae* (Zistrosengewächse), die wiederum zur Ordnung der *Malvales* (Malvenartige) gehören. Zistrosen wachsen bevorzugt auf kalkreichen Böden in mediterranen Klimazonen (DE WITT 1964, POLUNIN 1971, BARRAJÓN-CATALÁN *et al.* 2011) und bilden dort einen festen Bestandteil innerhalb der Gebüschformationen der Macchien und Gariguen (PETEREIT 1992). Einige *Cistus*-Arten sind endemisch, andere sind auf der Iberischen Halbinsel, den Kanarischen Inseln, Nordwestafrika, Italien, Griechenland oder der Türkei weitverbreitet (BARRAJÓN-CATALÁN *et al.* 2011). Die Familie der *Cistaceae* gliedert sich in insgesamt acht Gattungen: *Cistus*, *Halimium*, *Fumana*, *Tuberia*, *Helianthemum*, *Crocanthemum*, *Hudsonia* und *Lechea*. Diese können wiederum in 175 Arten unterteilt werden (PETEREIT 1992, ATTAGUILE *et al.* 2000). *Cistaceae* sind kleine Sträucher mit ledrigen, immergrünen, einfachen und häufig gegenständigen Blättern, die Nebenblätter enthalten können. Weiterhin sind die Blüten einzeln oder auch zu mehreren angeordnet (DE WITT 1964, POLUNIN 1971). Die meist zwischen 20 mm und 50 mm langen und 8-30 mm breiten Blätter sind mit Drüsenhaaren besetzt, die das für *C. incanus* typische Labdanumharz sekretieren. Die Wuchshöhe von *C. incanus* beträgt bis zu 1 m (PETEREIT 1992). Die Blüten haben einen Durchmesser von etwa 4-6 cm und weisen fünf leicht zerknitterte rosa Kronblätter und goldgelbe Staubblätter auf (CHEERS 2000). Abbildung 2.1 zeigt einen blühenden *C. incanus* Strauch sowie ein *C. incanus* Teekraut. Aufgrund einer morphologischen Anpassung an extrem trockene Standorte innerhalb der mediterranen Herkunftsgebiete sowie einer ausgeprägten Dürresistenz zählt *C. incanus* zu den malakophyllen Xerophyten (weichblättrige an trockene Standorte angepasste Pflanzen). Diese Pflanzen reduzieren während Trockenperioden das Wachstum der relativ langen, behaarten Blätter bis nur noch kurze Blattanlagen vorhanden sind. Gleichzeitig wird die Behaarung der Pflanzenblätter verstärkt. Insgesamt werden durch diese Prozesse die Transpiration deutlich reduziert, was einen effektiven Schutzmechanismus gegen Austrocknung darstellt (POTT und HÜPPE 2007, ARONNE *et al.* 2001).



Abb. 2.1 Blühender *C. incanus* Strauch (links) und Teekraut (rechts).

Nach CHRISTODOULAKIS *et al.* (2014) weisen *C. incanus* Sommerblätter eine verstärkte Akkumulation phenolischer Substanzen auf, die Winterblätter hingegen enthalten deutlich geringere Konzentrationen dieser Verbindungen. Innerhalb der Analytik und Klassifizierung von *Cistus*-Pflanzen sind biochemische Differenzen, die auf einen ausgeprägten Polymorphismus zurückzuführen sind, zu berücksichtigen. Dieser Polymorphismus resultiert aus dem evolutionär bedingten Prozess der adaptiven Radiation, d.h. einer Adaptation der Pflanzen an standortspezifische Umweltverhältnisse, wie z.B. Boden und Klima (BARRAJÓN-CATALÁN *et al.* 2011). Auch treten häufig interspezifische Bastardisierungen auf, die eine präzise Artenbestimmung erschweren. Ebenfalls sind Hybride zwischen den verwandten Gattungen *Cistus* und *Halimium* bekannt. *C. incanus* wird daher ergänzend zur bereits beschriebenen Systematik weiter in drei Unterarten (ssp. *incanus*, ssp. *corsicus*, ssp. *creticus*) eingeteilt (PETEREIT 1992). Ein weiteres charakteristisches Merkmal der *Cistaceae* ist der angenehme Duft des Labdanumharzes. Die enthaltenen ätherischen Öle waren bereits häufig Gegenstand chemischer Untersuchungen, um eine Anwendung in der Parfumindustrie zu etablieren (BARRAJÓN-CATALÁN *et al.* 2011). Bereits im Altertum und Mittelalter war das Labdanumharz für seinen Wohlgeruch und wundheilende Effekte bekannt (PETEREIT 1992). Publik wurde *C. incanus* vor allem im Jahr 1999 aufgrund der Auszeichnung als „Pflanze Europas 1999“ durch die Gesellschaft *Herba Historica* e.V..

2.1.2 Traditionelle Verwendung von *C. incanus*

Extrakte aus Pflanzenteilen von *C. incanus* wurden bereits seit dem 4. Jh. v. Chr. in der traditionellen Volksmedizin als antiinflammatorische, antiulzerogene, antimikrobielle und wundheilungsfördernde Medikamente verwendet (POTT 2010, BARRAJÓN-CATALÁN *et al.* 2011). Im Mittelalter diente vorwiegend das Labdanumharz als Expektoranz bei katarrhalischen Entzündungen oder als Zusatz in Wundsalben. Ebenso kam das Harz aufgrund der wohlriechenden Eigenschaften zu Räucherzwecken zum Einsatz. Traditionell wurden insbesondere im Norden Griechenlands die oberirdischen Pflanzenteile, bestehend aus verholzten Stängeln, Blättern sowie einigen Blüten, therapeutisch genutzt (PETEREIT 1992, MEYER-BUCHTELA 2001). Entsprechend der variierenden Indikationen der Droge wurden die luftgetrockneten Pflanzenteile hierfür sehr spezifisch zubereitet. Beispielsweise wurden für eine Behandlung inflammatorischer Hauterkrankungen, ebenso wie zur Unterstützung von Wundheilungsprozessen, kurz gekochte wässrige Extrakte eingesetzt. Diese wurden insbesondere traditionell von Wöchnerinnen für Körperwaschungen verwendet. Zur Infektionsprophylaxe wurden die Pflanzenteile zu einem Brei verarbeitet, der dann auf offene Wunden aufgetragen wurde. Dagegen wurden lang gekochte wässrige Extrakte als Antidiarrhoikum bei Diarrhö verabreicht. Als Basis für die Extrakte wurde in den beschriebenen nordgriechischen Gebieten ausschließlich *C. incanus* und nicht die ebenfalls in dieser Region verbreitete weiß blühende Art *C. salvifolius* eingesetzt (PETEREIT 1992).

2.1.3 Aktueller Forschungsstand zu *C. incanus*

Aktuell werden für *C. incanus* diverse gesundheitsfördernde Effekte diskutiert. Dabei stellen die Hauptwirkstoffe in *C. incanus* Extrakten phenolische Substanzen, insbesondere Verbindungen aus der Gruppe der Flavonoide, dar (POMPONIO *et al.* 2003). Für *C. incanus* sind verschiedene monomere und dimere Flavanole, Flavonolglycoside, Phenolsäuren und Ellagitannine in der Literatur beschrieben (PETEREIT 1991 und 1992, DANNE *et al.* 1993, BARRAJÓN-CATALÁN *et al.* 2011, SANTAGATI *et al.* 2008). Für das Labdanumharz sind bereits Strukturen von Diterpenen und Flavonoiden (Aglycone und Glycoside) bekannt (DEMETZOS *et al.* 1990). *C. incanus* Extrakte zeigten u.a. protektive Eigenschaften in Bezug auf eine DNA-Schädigung in Zellkulturzellen. Eine antimutagene sowie antikanzerogene Wirkungen von *C. incanus* Extrakten ist somit prinzipiell möglich (ATTAGUILE *et al.* 2000). Für *C. incanus* Extrakte sind weiterhin antibakterielle Effekte beschrieben. Beispielsweise konnte durch Mundspülungen auf Basis von *C. incanus* Tee eine Verringerung biofilminduzierter Erkrankungen innerhalb der Mundhöhle durch eine

reduzierte Bakterienanzahl und eine verringerte Bakterienadhäsion gezeigt werden (HANNIG *et al.* 2009 und 2008). Weiterhin wurden in Zellkulturen und Tierversuchen antivirale Effekte gegenüber verschiedenen Influenzaviren, wie Vogelgrippe (H7N7 und H5N1), Schweinegrippe (H1N1v) sowie humane Rhinoviren (HRV14) gezeigt (DROEBNER *et al.* 2011, EHRHARDT *et al.* 2007, DROEBNER *et al.* 2007). In einer klinischen Humanstudie zur Behandlung von Infektionen der oberen Atemwege mit einem *C. incanus* Extrakt konnte weiterhin eine verkürzte Dauer und verringerte Schwere der Symptome beobachtet werden (KALUS *et al.* 2009). In einer placebokontrollierten, randomisierten Humanstudie wurde ebenfalls erstmals gezeigt, dass erhöhte Cadmiumkonzentrationen in Blut und Urin von starken Rauchern durch Einnahme eines *C. incanus* Sudes signifikant reduziert werden können (ALI *et al.* 2013). Insgesamt könnten *C. incanus* Erzeugnisse auf Basis der bisherigen Forschungsergebnisse zukünftig möglicherweise als „Alleskönner“ zur allgemeinen Verbesserung der menschlichen Gesundheit und insbesondere zur Prävention zahlreicher degenerativer Erkrankungen sowie viraler Pandemien eingesetzt werden.

2.1.4 Übersicht *C. incanus* Produkte

Nachfolgend ist eine, auf einer Internetrecherche (Stand: April 2014) basierende, Übersicht über kommerziell verfügbare *C. incanus* Produkte verschiedener Hersteller dargestellt. Um eine Anonymität der Hersteller sicherzustellen, wurden die einzelnen Homepages zu diesem Abschnitt nicht im Literaturverzeichnis aufgeführt.

Im Internet sind aktuell vor allem verschiedene Kräutertees, teilweise auch in Form von Teemischungen, erhältlich. Die in diesen Produkten verarbeiteten *C. incanus* Pflanzen oder Extrakte hieraus können aus verschiedenen Herkunftsländern (meist Griechenland oder Türkei) stammen. Das verarbeitete Pflanzenmaterial ist teilweise Sorten und/oder biozertifiziert und kann aus traditioneller Wildsammlung sowie aus konventionellem Anbau stammen. Die vollständigen Informationen hierzu stehen dem Endverbraucher nur selten zur Verfügung. Neben den beschriebenen Kräutertees sind im Handel auch Halspastillen auf Basis von *C. incanus* Extrakten verfügbar. Diese werden innerhalb der EU in Österreich auch als Infektblockerlutschtabletten verkauft und dienen zur Vorbeugung von Erkältungskrankheiten, Virusinfektionen, bakteriellen Infektionen der Atemwege sowie zur unterstützenden Therapie bei Entzündungen des Mund- und Rachenraumes. Ähnliche Effekte sollen vermutlich auch die angebotenen *C. incanus* Sprays für Mund- und Rachenraum bieten. Weitere Produkte auf Basis von *C. incanus* sind Cremes und Salben als Naturkosmetik und zur Grundpflege bei Neurodermitiserkrankung. Ein ebenfalls im

Handel verfügbarer Sud aus *C. incanus* soll eine Ausleitung von Schwermetallen, z.B. bei einer Schwermetallakkumulation durch starkes Rauchen, fördern. Als Nahrungsergänzungsmittel sind *C. incanus* Kapseln kommerziell erhältlich, die mit hohen Gehalten phenolischer Substanzen mit antioxidativem und antibakteriellem Potential beworben werden. Ebenfalls erhältlich sind *C. incanus* Extrakt enthaltende Zahncremes.

2.1.5 Lebensmittelrechtliche Beurteilung und Einstufung von *C. incanus* als *Novel Food*

Nach den Leitsätzen des deutschen Lebensmittelbuchs für Tee, teeähnliche Erzeugnisse, deren Extrakte und Zubereitungen (Neufassung 1999) sind nachfolgende, für *C. incanus* Tee relevanten, Begriffsbestimmungen aufgelistet. Tee stammt dabei „ausschließlich aus Blättern, Blattknospen und zarten Stielen des Teestrauches *Camellia sinensis* L. O. Kuntze aus der Familie der Teegewächse (*Theaceae*), die nach den üblichen Verfahren bearbeitet sind“. Zu diesen Bearbeitungsverfahren zählt beispielsweise eine Fermentation des Tees. *C. incanus* wird nach den Leitsätzen entsprechend zu den teeähnlichen Erzeugnissen eingeordnet. Diese Produkte „bestehen aus Pflanzenteilen, die nicht vom Teestrauch stammen und die dazu bestimmt sind, in der Art wie Tee verwendet zu werden“ [1].

Zusätzlich sind seit dem Jahr 2007 *C. incanus* Produkte, die für den menschlichen Verzehr vorgesehen sind, nach Verordnung (EG) Nr. 258/97 über neuartige Lebensmittel und neuartige Lebensmittelzutaten [2] als *Novel Food* eingestuft [3]. Der Grund hierfür ist, dass diese Produkte vor dem 15. Mai 1997 innerhalb der Europäischen Gemeinschaft nicht in „nennenswertem Umfang für den menschlichen Verzehr verwendet wurden“ [2]. *C. incanus* Erzeugnisse müssen daher erneut zugelassen werden, um innerhalb der EU verkehrsfähig zu werden. Bei diesem Zulassungsverfahren handelt es sich um einen meist langwierigen und kostenintensiven Prozess. Hierbei müssen Nachweise erbracht werden, die bestätigen, dass entweder keine gesundheitlichen Risiken durch nicht geklärte pharmakologische Wirkungen vorliegen oder tatsächlich eine signifikante, traditionelle Verwendung als Lebensmittel besteht. Diesbezüglich existieren einige Quellen, nach denen *C. incanus* traditionell als Heilpflanze vor dem Jahr 1997 eingesetzt wurde (BARRAJÓN-CATALÁN *et al.* 2011, PETEREIT 1992). Dennoch stieß die aktuelle Einstufung als *Novel Food* teilweise auf Unverständnis bei Herstellern und langjährigen Konsumenten von *C. incanus* Erzeugnissen.

2.2 Sekundäre Pflanzenstoffe

Neben Produkten des Primärstoffwechsels – Kohlenhydrate, Proteine und Fette – produzieren Pflanzen eine große Anzahl weiterer, chemisch diverser Verbindungen. Diese Substanzen werden allgemein als sekundäre Pflanzenstoffe bezeichnet. Eine scharfe Abgrenzung zwischen primären und sekundären Pflanzenstoffen lässt sich allerdings nicht ziehen. Weiterhin stellt die Bezeichnung „sekundär“ hierbei keine Wertung dar. Der Begriff sekundärer Pflanzenstoff soll vielmehr zum Ausdruck bringen, dass diese Verbindungen nicht im Zellplasma jeder Pflanze zu finden sind, sondern jeweils charakteristisch für bestimmte Arten, Gattungen oder Familien sind. Die Funktionen sekundärer Pflanzenstoffe innerhalb der Pflanze sind sehr vielfältig. Es sind bisher u.a. Abwehrfunktionen gegen Mikroorganismen, Schutz gegen Tierfraß, Anlockung von Insekten zur Bestäubung sowie allelopathische Wirkungen zur Unterdrückung artfremder Pflanzen an einem Standort bekannt (NULTSCH 2001). Zu den sekundären Pflanzenstoffen zählen Carotinoide, Phytosterine, Saponine, Glucosinolate, phenolische Substanzen (häufig auch als Polyphenole bezeichnet), Proteaseinhibitoren, Terpene, Phytoöstrogene, Sulfide und Phytinsäuren. Diese Substanzgruppen gliedern sich wiederum in weitere Untergruppen auf (WATZL und LEITZMANN 2005).

2.2.1 Phenolische Substanzen

Unter dem Begriff phenolische Substanzen werden allgemein Substanzen zusammengefasst, die auf der Struktur des Phenols basieren. Insgesamt können diese Verbindungen in sieben Untergruppen unterteilt werden: einfache Phenole, Hydroxybenzoesäuren, Hydroxyzimtsäuren, Cumarine, Flavonoide, Lignane und Lignine (WATZL und LEITZMANN 2005). Die Konzentration dieser phenolischen Substanzen in pflanzlichen Lebensmitteln hängt u.a. stark von der jeweiligen Pflanzenart, Klima und Reifegrad ab (BELITZ *et al.* 2008).

In der vorliegenden Arbeit liegt der analytische Schwerpunkt bei den phenolischen Substanzen und hier insbesondere bei der Gruppe der Flavonoide ($C_6-C_3-C_6$ -Grundgerüst) sowie den Hydroxybenzoesäuren (C_6-C_1 -Grundgerüst), bzw. Hydroxyzimtsäuren (C_6-C_3 -Grundgerüst). Diese stellen nach SCALBERT *et al.* (2005) die Hauptklassen der phenolischen Verbindungen dar und werden nachfolgend kurz beschrieben. Weiterhin werden die Grundlagen und Analytik zu Lignin, das ebenfalls einen sekundären Pflanzenstoff aus der Gruppe der phenolischen Substanzen darstellt, nachfolgend in Kapitel 2.3, Holzstoffe und Gerüstsubstanzen, behandelt.

2.2.1.1 Flavonoide

Historisch wurden phenolische Substanzen erstmals in den 1930er Jahren bekannt. Zu dieser Zeit wurden gelbe flavonoide Pflanzenfarbstoffe (lateinisch: *flavus* = gelb), hierunter vor allem die Flavone und Flavonole, zunächst als Vitamin P bezeichnet. Dieser Begriff resultierte aus Studien von RUSZNYÁK und SZENT-GYÖRGYI (1936), in denen für diese Substanzen eine verbesserte vaskuläre Permeabilität beobachtet wurde. Das „P“ in Vitamin P stand hier fälschlicherweise für Permeabilität. Flavonoide tragen weiterhin allgemein zu Farbe und Geschmack von Obst bei (BELITZ *et al.* 2008) und sind für die gelben, orangen sowie roten Farbnuancen in blühenden Pflanzen verantwortlich (PIETTA 2003).

Chemisch betrachtet stellen Flavonoide Derivate des Benz- γ -Pyrons dar und sind in verschiedenen Strukturvarianten ubiquitär in Pflanzen enthalten (EBERMANN und ELMADFA 2008). Die chemische Basisstruktur der Flavonoide ist das Flavan. Dieses besteht aus 15 Kohlenstoffatomen, die in drei Ringen (A, C und B) angeordnet sind. Die Ringe bilden das C₆-C₃-C₆-Grundgerüst (STALIKAS 2007). In Abbildung 2.2 ist die Grundstruktur der Flavonoide dargestellt.

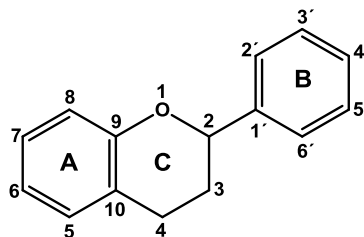


Abb. 2.2 Grundstruktur der Flavonoide nach CROZIER *et al.* (2009).

Die Gruppe der Flavonoide umfasst bisher über 8000 Verbindungen mit zunehmender Tendenz. Die Ursache hierfür liegt in der großen strukturellen Bandbreite der Substanzklasse. Diese resultiert hauptsächlich aus den unterschiedlichen Hydroxylierungs-, Methoxylierungs-, Glycosylierungs- sowie Acylierungsmuster des Flavangrundgerüsts (PIETTA 2003). Weiterhin sind der Redoxstatus des γ -Pyrone rings (EBERMANN und ELMADFA 2008) sowie die funktionellen Gruppen am C-Ring (D'ARCHIVIO *et al.* 2007) entscheidend für die Einteilung dieser Verbindungen. Flavonoide werden allgemein in sechs Unterklassen eingeteilt. In Abbildung 2.3 ist diese Einteilung in Flavanole, Anthocyanidine, Flavanone, Flavone, Flavonole und Isoflavone anhand deren Grundstrukturen veranschaulicht.

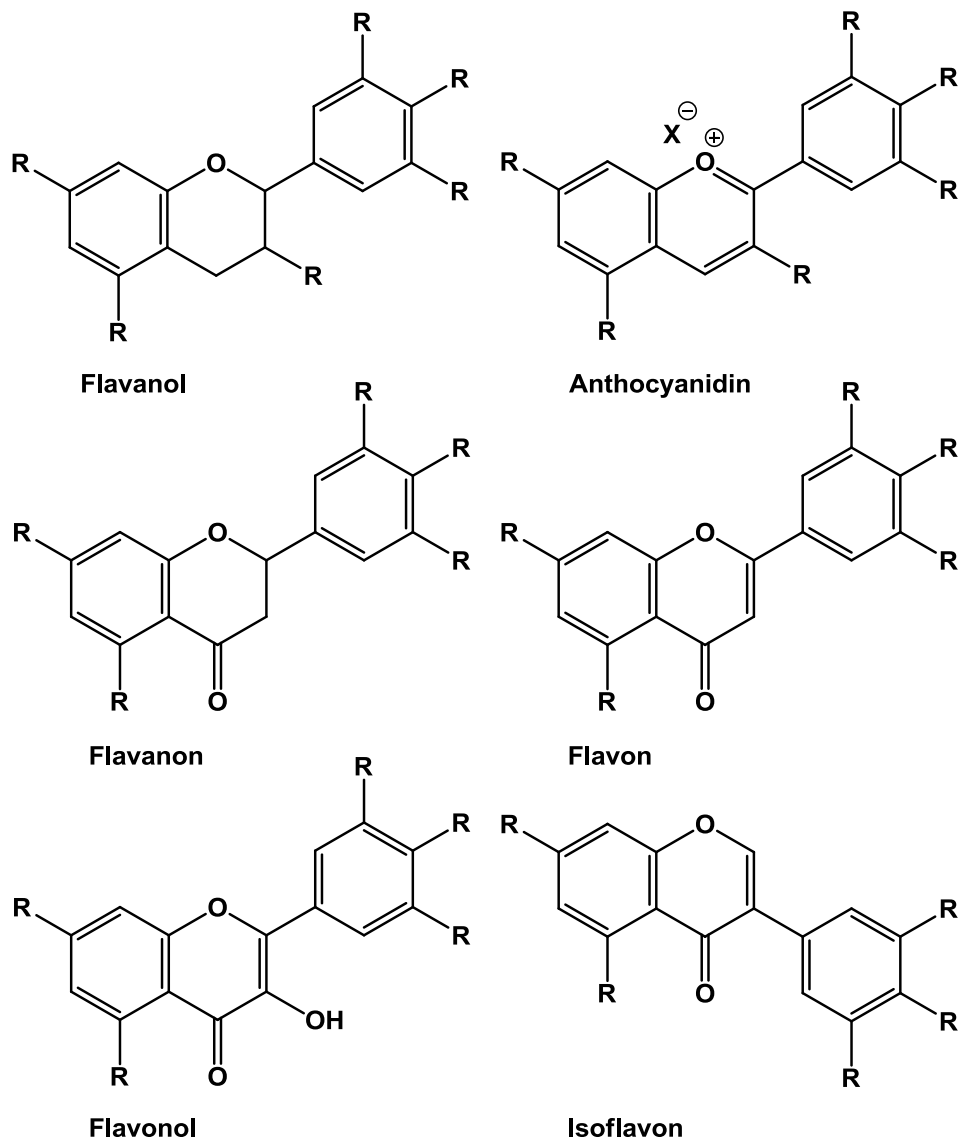


Abb. 2.3 Unterklassen der Flavonoide nach BELITZ *et al.* (2008). R: H, OH oder OCH₃; X[⊖]: Gegenanionen.

Die Unterklasse der Flavanole, häufig als Catechine bezeichnet, ist vorwiegend in Blättern enthalten und trägt insbesondere zum adstringierenden Geschmack von pflanzlichen Lebensmitteln bei. Diese Substanzen besitzen zwei asymmetrisch substituierte Kohlenstoffatome und können somit als diastereomere 5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavanole, Catechin und Epicatechin, vorliegen. Durch eine dritte Hydroxylgruppe an Ring B resultiert weiterhin das 5,7,3',4',5'-Pentahydroxyflavanol Gallocatechin, bzw. entsprechend Epigallocatechin. In Abbildung 2.4 sind die nach BELITZ *et al.* (2008) möglichen Konfigurationen der diastereomeren 5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavanole dargestellt.

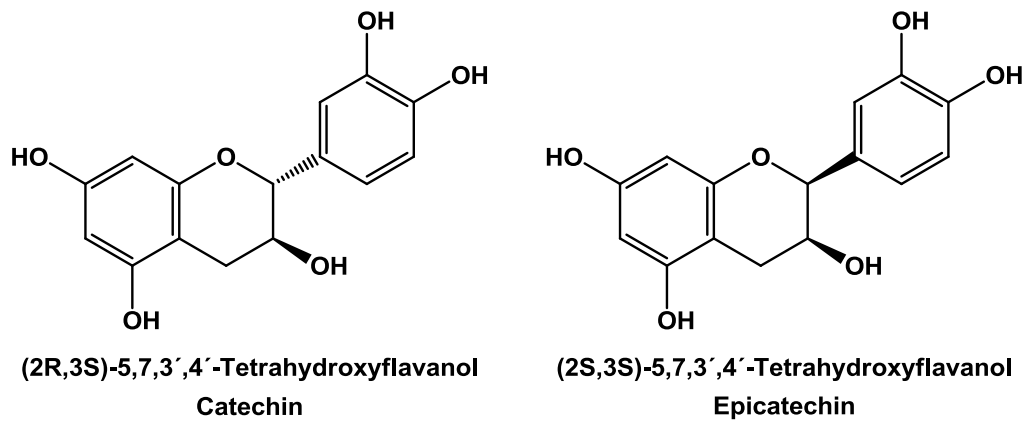


Abb. 2.4 C-Ring-Konfigurationen der 5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavanole nach BELITZ *et al.* (2008).

Die Biosynthese der Flavonoide erfolgt über den Shikimatsyntheseweg, aus welchem der B-Ring des Grundgerüsts resultiert. Über den Acetat-Malonat-Weg entsteht der A-Ring (Ross *et al.* 2002). Durch einen NADPH-Mangel während der Synthese der 5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavanole können weiterhin Dimere oder Oligomere aus Flavanolen entstehen. Diese werden dann als Proanthocyanidine oder Leucoanthocyanidine (farblose Vorstufe der Anthocyanidine) bezeichnet und zählen allgemein zu den kondensierten Gerbstoffen (BELITZ *et al.* 2008).

Weiterhin sind Anthocyanidine hauptsächlich in Obst, Gemüse und zahlreichen Blüten vorhanden (EBERMANN und ELMADFA 2008). Zu diesen rot, blau oder violett gefärbten Benzopyrylium- oder Flavyliumsalzen zählen nach BELITZ *et al.* (2008) u.a. Pelargonidin (3,5,7,4'-Tetrahydroxyflavylum), Cyanidin (3,4,5,7,3'-Pentahydroxyflavylum) und Delphinidin (3,5,7,3',4',5'-Hexahydroxyflavylum). Die Anthocyanidine (Aglycone) liegen natürlicherweise als Glycoside (Anthocyane) vor. Etwa 70 Verbindungen dieser Substanzklasse sind bekannt. Bezüglich der Farbe, bzw. der UV-Absorption, bewirkt eine zunehmende Hydroxylierung des Flavangrundgerüsts eine hypsochrome Absorptionsverschiebung (Blauverschiebung). Aus einer Glycosylierung oder Methylierung resultiert hingegen eine bathochrome Verschiebung (Rotverschiebung). Weiterhin hat der pH-Wert des jeweils umgebenen Mediums einen starken Einfluss auf die Farbe der Anthocyanidine. Diese Substanzen können in Abhängigkeit des pH-Wertes als Flavylumkation ($\text{pH} \leq 1$, rot), Chromenol ($\text{pH} 4-5$, farblos), chinoide Anhydrobase ($\text{pH} 6-7$, purpur), ionische Anhydrobase ($\text{pH} 7-8$, tiefblau) oder als Chalkon ($\text{pH} \geq 8$, gelb) vorliegen. Zusätzlich resultieren aus einer Komplexbildung von mehrwertigen Metallionen, z.B. Al^{3+} oder Fe^{3+} , aus dem zuvor genannten Chalkon tiefblau gefärbte Verbindungen (BELITZ *et al.* 2008).

Die Unterklasse der Flavanone, häufig auch als Dihydroflavone bezeichnet, ist vorwiegend in Zitrusfrüchten enthalten (EBERMANN und ELMADFA 2008). Zu diesen Verbindungen zählen nach BELITZ *et al.* (2008) u.a. Naringenin (5,7,4'-Trihydroxyflavanon) und Hesperetin (5,7,3'-Trihydroxy-4'-methoxyflavanon). Verschiedene Glycoside dieser Substanzen sind als Bitterstoffe in Zitrusfrüchten bekannt. Durch Ringöffnung entstehen Chalkone sowie durch anschließende Hydrierung Dihydrochalkone mit süßem Geschmack (bis zu 20-fach süßer als Saccharin), die auch industriell als Süßstoffe eingesetzt werden (BELITZ *et al.* 2008).

Weiterhin ist die ebenfalls in Abbildung 2.3 dargestellte Unterklasse der Flavone häufig in Doldenblütlern (*Apiaceae*) und als Bestandteil von weißen Blüten (EBERMANN und ELMADFA 2008) sowie in heimischen Obstsorten enthalten. Diese phenolischen Substanzen liegen meist als 3-Glycoside, aber zum Teil auch als 7-Glycoside vor. Typische Vertreter dieser Unterklasse der Flavonoide sind Apigenin (5,7,4'-Trihydroxyflavon) und Luteolin (5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavon) (BELITZ *et al.* 2008).

Phenolische Substanzen aus der Unterklasse der Flavonole sind ubiquitär in allen Pflanzenorganen enthalten. Vertreter dieser Verbindungen sind u.a. Kämpferol (5,7,4'-Trihydroxyflavonol) Quercetin (5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavonol), Myricetin (5,7,3',4',5'-Pentadroxyflavonol) (EBERMANN und ELMADFA 2008). Dabei ist insbesondere Quercetin ein hochwirksames Antioxidans (BELITZ *et al.* 2008).

Die ebenfalls zu den Flavonoiden zählenden Isoflavone sind hauptsächlich in Leguminosen (*Fabaceae*) enthalten (EBERMANN und ELMADFA 2008). Innerhalb der menschlichen Ernährung spielen diese Verbindungen vorwiegend in Sojaprodukten eine Rolle. Typische Vertreter dieser phenolischen Substanzen sind Daidzein (7,4'-Dihydroxyisoflavon) und Genistein (5,7,4'-Trihydroxyisoflavon).

Flavonoide liegen weiterhin überwiegend als Glycoside in Pflanzen vor. Durch eine glycosidische Bindung an Zucker steigt allgemein die Wasserlöslichkeit der sonst eher hydrophoben Flavonoide im pflanzlichen Zellsaft. Bei Flavonoidglycosiden handelt es sich fast ausschließlich um O-Glycoside. Diese können sowohl enzymatisch durch β -Glycosidasen, als auch chemisch durch Säuren gespalten werden. Weitaus seltener ist das glycosidische Kohlenstoffatom des Zuckerrestes kovalent mit einem Kohlenstoffatom des Flavangrundgerüsts verbunden. Dies wird als C-Glycosid bezeichnet (EBERMANN und ELMADFA 2008). Nach WILLIAMS und HARBORNE (1994) handelt es sich bei den glycosidisch gebundenen Zuckern um eine Vielzahl verschiedener Mono-, Di-, Tri- und

Tetrasaccharide. Nach DE RIJKE *et al.* (2006) umfassen diese vorwiegend Glucose, Galactose, Xylose oder Rhamnose. Aus der großen Bandbreite verschiedener Glycosylierungsmuster resultieren allein für die Flavonole ungefähr 900 verschiedene Glycoside. Die Zucker sind dabei meist nicht an mehr als zwei Hydroxylgruppen des Flavonoidkernes gebunden, wobei die Bindung an den Hydroxylgruppen in Ring A und C an Position 3 und/oder 7 erfolgt (WILLIAMS und HARBORNE 1994). Der B-Ring ist zusätzlich häufig an Position 3', 4' oder 5' bzw. auch an mehreren Positionen glycosyliert (ROSS *et al.* 2002). Neben den zuvor beschriebenen Glycosylierungen sind zusätzlich Acylierungen von Flavonoiden bekannt. Diese Modifikationen des Flavonoidgrundgerüsts erhöhen die Absorption von UV-B-Strahlung (FISCHBACH *et al.* 1999).

2.2.1.2 Phenolsäuren

Eine weitere Untergruppe der phenolischen Substanzen stellen neben den beschriebenen Flavonoiden die Phenolsäuren dar. Als Phenolsäuren werden die hydroxylierten Derivate der Benzoessäuren (Hydroxybenzoessäuren) und Zimtsäuren (Hydroxyzimtsäuren) verstanden (MATTILA und KUMPULAINEN 2002). Die Biosynthese der Phenolsäuren erfolgt ausgehend von L-Phenylalanin, einem Produkt des Shikimatsyntheseweges. Innerhalb des anschließenden Phenylpropanoidweges erfolgen eine Desaminierung der Aminosäure sowie mehrere Hydroxylierungsschritte (ROBBINS 2003). Die Grundstrukturen der Hydroxybenzoessäuren und Hydroxyzimtsäuren sind in Abbildung 2.5 dargestellt.

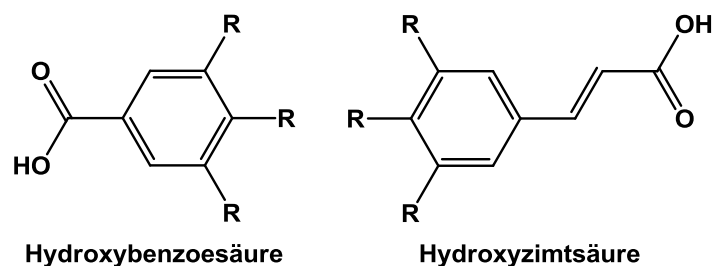


Abb. 2.5 Grundstrukturen der Phenolsäuren nach BELITZ *et al.* (2008). R: H, OH oder OCH₃.

Aus der Gruppe der Hydroxybenzoessäuren kommen in Pflanzen vor allem Salicylsäure (2-Hydroxybenzoessäure), Gentisinsäure (2,4-Dihydroxybenzoessäure), Protocatechusäure (3,4-Dihydroxybenzoessäure), Gallussäure (3,4,5-Trihydroxybenzoessäure), Vanillinsäure (3-Methoxy-4-hydroxybenzoessäure) und Ellagsäure vor (BELITZ *et al.* 2008). Dabei liegen die genannten Verbindungen in Pflanzen überwiegend als Konjugate vor, sind jedoch auch in einigen Früchten oder als Folge industrieller Verarbeitungsschritte in freier Form

enthalten (TOMÁS-BARBERÁN und CLIFFORD 2000). Darüber hinaus stellt Gallussäure ein strukturelles Grundgerüst hydrolysierbarer Tannine (CROZIER *et al.* 2009) dar. Das dimere Kondensationsprodukt aus zwei Gallussäuremolekülen wird als Hexahydroxydiphensäure bezeichnet (MATTILA und KUMPULAINEN 2002). Weiterhin stellt Ellagsäure das Dilacton der Hexahydroxydiphensäure dar. In höheren Konzentrationen ist Ellagsäure vor allem in Erdbeeren, Himbeeren und Brombeeren enthalten (BELITZ *et al.* 2008). Die Struktur dieser Substanz ist Abbildung 2.6 dargestellt. Neben Gallussäuredimeren sind u.a. auch entsprechende Trimere (Tergallussäuren) und das Tetramer (Gallagsäure) bekannt (TOMÁS-BARBERÁN und CLIFFORD 2000).

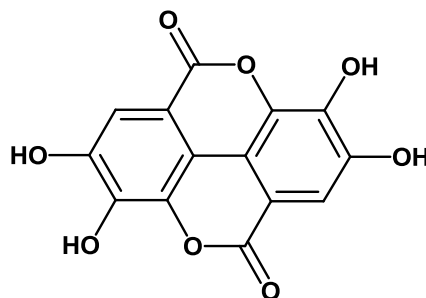


Abb. 2.6 Struktur der Ellagsäure nach BELITZ *et al.* (2008).

Weiterhin sind nach BELITZ *et al.* (2008) in pflanzlichen Produkten aus der Gruppe der Hydroxyzimtsäuren vor allem *p*-Cumarsäure (4-Hydroxyzimtsäure), Ferulasäure (4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure), Kaffeesäure (3,4-Dihydroxyzimtsäure) und Sinapinsäure (4-Hydroxy-3,5-dimethoxyzimtsäure) verbreitet. Im Pflanzenreich kommen insbesondere deren Ester mit D-Chinasäure und D-Glucose vor. Chinasäure weist dabei aufgrund von vier Hydroxylgruppen verschiedene Verknüpfungsmöglichkeiten auf, wobei die 3- und 5-Isomere die Häufigsten sind. So liegen in pflanzlichem Material meist Neochlorogensäure (3-Caffeoylchinasäure), Kryptochlorogensäure (4-Caffeoylchinasäure) und Chlorogensäure (5-Caffeoylchinasäure) vor.

2.2.1.3 Tannine

Eine weitere Gruppe phenolischer Substanzen stellen die Tannine dar. Diese weisen einen oligo- oder polymeren Charakter und Molekulargewichte von 3000 bis 30000 g/mol auf. Tannine werden allgemein auch als Gerbstoffe bezeichnet (BELITZ *et al.* 2008) und können Proteine sowie polymere Kohlenhydrate komplexieren. Basierend auf der

chemischen Struktur der monomeren Bausteine werden Tannine in vier Gruppen unterteilt.

Die erste Gruppe umfasst die bereits beschriebenen Proanthocyanidine, die auch als kondensierte Tannine bezeichnet werden. Diese sind aus Flavanolmonomeren aufgebaute oligo- oder polymere Tannine.

Die zweite Gruppe stellen die hydrolysierbaren Tannine dar, die durch Säureeinwirkung hydrolysiert werden. Diese Verbindungen liegen als diverse Polyhydroxyverbindungen vor, z.B. als Zucker verestert mit einer Phenolsäure (SERRANO *et al.* 2009). Sowohl einfache Ester mit verschiedenen Hydroxykomponenten, wie z.B. β -D-Glucogallin, Theogallin und den Flavan-3-ol-gallaten, als auch komplexe Polyester mit D-Glucose sind innerhalb dieser Gruppe bekannt (BELITZ *et al.* 2008). Handelt es sich bei der Phenolsäure um Gallussäure, so wird die Verbindung als Gallotannin bezeichnet. Liegt hingegen eine Veresterung mit Hexahydroxydiphensäure (HHDP) vor, so wird diese Verbindung als Ellagitannin bezeichnet. Auch gemischte Ester von Polyhydroxyverbindungen mit Gallussäure und HHDP kommen in der Natur vor. Weiterhin sind neben Gallussäure als Acylrest auch intermolekulare Gallussäureester (Depside) und Gallussäureether (Depsidone) bekannt.

Die dritte Gruppe der Tannine, bestehend aus Polymeren des 1,3,5-Trihydroxybenzols, wird als Phlorotannine bezeichnet. Die monomeren Untereinheiten sind in diesem Fall über Arylbindungen verknüpft.

Als vierte Gruppe werden gemischte Polymere aus den Strukturelementen der Tannine und anderer Makromoleküle beschrieben (SERRANO *et al.* 2009).

Die vollständige Biosyntheseweg der Tannine ist noch nicht aufgeklärt (GAGNE *et al.* 2010). Es wird jedoch davon ausgegangen, dass zunächst die monomeren Bausteine synthetisiert werden und diese erst anschließend verknüpft werden (LIEBERE *et al.* 2007). Insgesamt tragen Tannine, ähnlich wie die Flavanole, durch adstringierende Eigenschaften entscheidend zum Geschmack pflanzlicher Lebensmittel bei (BELITZ *et al.* 2008). Die vollständige Aufklärung der Tanninbiosynthese ist daher ein wichtiger Forschungsansatz zur Beeinflussung der Sensorik pflanzlicher Lebensmittel.

2.2.1.4 Stabilitäten phenolischer Substanzen während der Lebensmittelverarbeitung und -zubereitung

Das Profil und insbesondere die Konzentration phenolischer Inhaltsstoffe können durch die Verarbeitung eines Lebensmittels stark variieren. So ist z.B. bekannt, dass phenolische Substanzen während der Lebensmittelprozessierung Metallkomplexe bilden können, was zu Verfärbungen führt. Darüber hinaus können durch Komplexierung von Proteinen Trübungen verursacht werden (BELITZ *et al.* 2008). Während der Lebensmittelverarbeitung treten außerdem auch häufig enzymatische Bräunungsreaktionen auf. Hierfür sind phenolische Verbindungen, vor allem Flavonoide, sowie Metallenzyme die Voraussetzung. Zu den Metallenzymen zählen in diesem Zusammenhang die Phenoloxidasen und die Peroxidasen (EBERMANN und ELMADFA 2008).

Neben der enzymatischen Oxidation kann auch eine Autoxidation phenolischer Substanzen während der Lebensmittelverarbeitung auftreten. Diese ist insbesondere für die Gruppe der Flavanole beschrieben (HATHWAY und SEAKINS 1955) und läuft verstärkt in wässrigem Medium bei alkalischem pH-Wert ab (OSZMIANSKI *et al.* 1996). Zu den Autoxidationsprodukten der Flavanole zählen u.a. die Dehydrodicatchine. Diese sind strukturell verwandt mit den natürlich vorkommenden B-Typ Procyanidinen (dimere Flavan-3-ole). Allerdings unterscheiden sich die Bindungsmuster zwischen den monomeren Untereinheiten (HE *et al.* 2009). Die Untereinheiten der B-Typ Procyanidine sind über C-C-Interflavanbindungen zwischen den Positionen 4 und 8 oder 4 und 6 verknüpft (SUN und MILLER 2003). Die Autoxidationsdimere dagegen liegen entweder als A-Typ- (gelb gefärbt) oder B-Typ-Dehydrodicatchine (farblos) vor (HE *et al.* 2009). Letztere sind zwischen den Positionen 6' und 8 oder 6' und 6 über eine C-C Bindung verknüpft (SUN und MILLER 2003). Die A-Typ Dehydrodicatchine besitzen weiterhin eine zusätzliche C-O-C-Verknüpfung (HE *et al.* 2009). In Abbildung 2.7 sind exemplarisch die Strukturen von Dehydrodicatchin B₁₂ und Dehydrodicatchin A dargestellt.

Neben Oxidationsreaktionen sind thermische Einflüsse auf die Stabilität phenolischer Substanzen bekannt. So sind in der Literatur beispielsweise thermisch induzierte Epimerisierungen von Flavanolen, z.B. eine Reaktion von Catechin zu Epicatechin, in wässrigen Lösungen beschrieben (COURBAT *et al.* 1977, SETO *et al.* 1997, WANG *et al.* 2000). Weiterhin zeigen zahlreiche Studien eine thermische Zersetzung phenolischer Substanzen innerhalb des Zubereitungsprozesses von Lebensmitteln. So wurden in gekochtem Gemüse signifikant niedrigere Flavonoidkonzentrationen im Vergleich zum ungekochten Pflanzenmaterial gemessen (CROZIER *et al.* 1997).

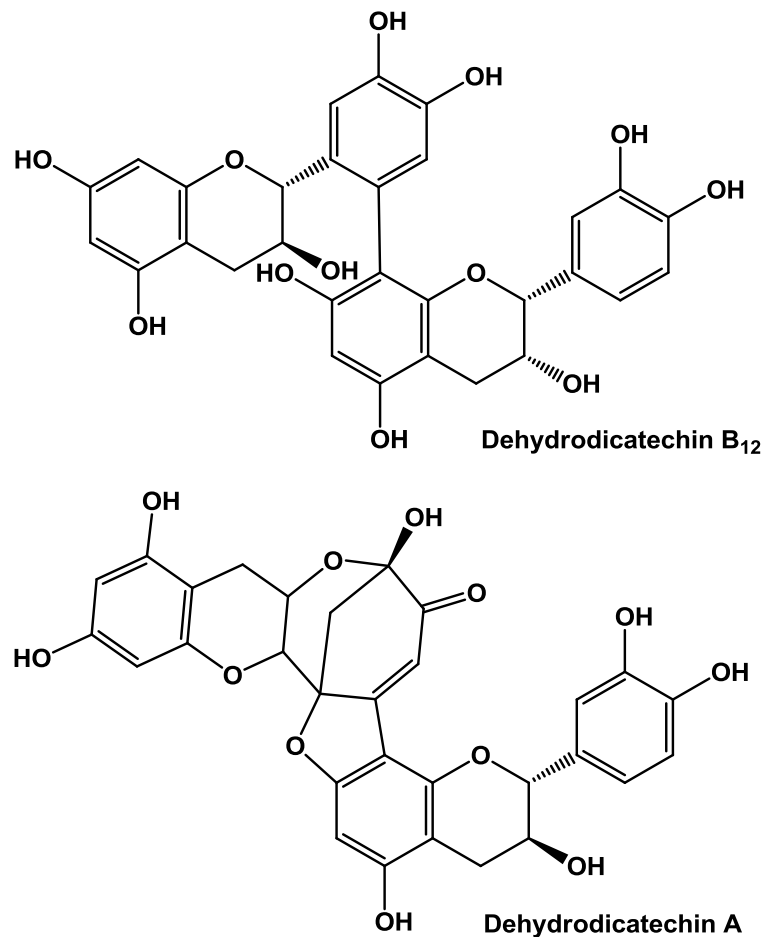


Abb. 2.7 Auswahl dimerer Flavanolautooxidationsprodukte nach SUN und MILLER (2003) und HE *et al.* (2009).

Ähnliche Ergebnisse wurden auch durch ROHN *et al.* (2007) für geröstete Flavonoidglycoside aus der Zwiebel beschrieben. Dabei konnten verschiedene Abbauprodukte des Flavonols Quercetin detektiert werden. Dies wird auch durch die Daten von BUCHNER *et al.* (2006) belegt, die ebenfalls eine Degradation sowie Strukturveränderungen der Flavonole Rutin und Quercetin in Verbindung mit reduzierten antioxidativen Kapazitäten nach thermischer Behandlung in einem wässrigen Medium zeigten.

Weitere Untersuchungen zur Stabilität phenolischer Substanzen während einer Verarbeitung von Lebensmitteln wurden u.a. von BIESAGA und PYRZYŃSKA (2012) durchgeführt. Hierbei wurde beobachtet, dass Flavonoidglycoside in Honig eine höhere Stabilität bei Ultraschall- und Mikrowellenextraktion aufwiesen, als deren Aglycone. Zusätzlich kann auch der pH-Wert einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität

phenolischer Substanzen haben. FRIEDMAN und JÜRGENS (2000) beobachteten hierbei substanzabhängige Unterschiede bei basischem pH-Wert des umgebenden Mediums.

Darüber hinaus können insbesondere innerhalb der Teezubereitung die verwendeten Zubereitungsparameter, z.B. Temperatur, Kochzeit, Kochwasser die Extrahierbarkeit und Stabilität phenolischer Substanzen beeinflussen. Durch den Kochprozess kann es hier zu einer Komplexbildung der phenolischen Inhaltsstoffe kommen. Hierbei handelt es sich um die Bildung einer sogenannten *Tea Cream* (JÖBSTL *et al.* 2005). Unter dem Begriff *Tea Cream* wird ein unerwünschtes Präzipitat verstanden, das beim Abkühlen von Tee, durch Interaktionen der phenolischen Inhaltsstoffe, meist in Verbindung mit Coffein, entsteht (ROBERTS 1963, COLLIER *et al.* 1972, RUTTER und STAINSBY 1975, D'AMELIO *et al.* 2009). Es resultieren hieraus sowohl homogene, als auch heterogene Komplexe phenolischer Substanzen (JÖBSTL *et al.* 2005). Diese Komplexe liegen nach PENDERS *et al.* (1998) als kleine kugelförmige Tröpfchen vor. Die *Tea Cream* gilt aufgrund des Ausflockungseffektes in Verbindung mit Farb- und Geschmacksänderungen des Tees allgemein als unerwünscht (YIN *et al.* 2009). Zusätzlich sinken die Konzentrationen phenolischer Substanzen im Tee (JÖBSTL *et al.* 2005) und damit auch potentielle positive Effekte auf die Gesundheit. Ein weiteres Erscheinungsbild der *Tea Cream* ist die Bildung eines ölig aussehenden Filmes aus komplexierten phenolischen Inhaltsstoffen auf der Oberfläche des Tees (TANIZAWA *et al.* 2007). Bereits bekannte Einflussfaktoren der *Tea Cream* Bildung sind u.a. das Volumenverhältnis zwischen Kochwasser und Teekraut, die hieraus resultierende Konzentration phenolischer Substanzen im Tee, sowie Kochtemperatur und pH-Wert des Kochwassers (CHAO und CHIANG 1999). Weiterhin sind die im Kochwasser enthaltenen Ionen, insbesondere Calciumionen, an der *Tea Cream* Bildung beteiligt (JÖBSTL *et al.* 2005). Auch sind substanzspezifische Einflüsse auf die *Tea Cream* Bildung beschrieben. Nach LIANG *et al.* (2002) tragen Gallocatechine stärker zu einer Präzipitation bei als Catechine. Dies ist vermutlich auf eine unterschiedliche Anzahl an Hydroxylgruppen zurückzuführen. Die Anzahl möglicher Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der Komplexbildungsreaktionen hängt dabei von der Anzahl dieser funktionellen Gruppen ab. Aber auch große phenolische Substanzen mit einem hohen Molekulargewicht tragen verstärkt zu einer *Tea Cream* Bildung bei (JÖBSTL *et al.* 2005). Weiterhin wird neben der Teekonzentration vermutet, dass die Löslichkeit der phenolischen Inhaltsstoffe maßgeblich dafür verantwortlich ist, welche Substanzen beim Abkühlen des Tees komplexieren und präzipitieren (JÖBSTL *et al.* 2005). Das Phänomen der *Tea Cream* Bildung ist insbesondere bei der industriellen Herstellung von sogenannten *Ready-to-Drink*-Tees, wie z.B. Eistee, problematisch. Der Herstellungsprozess dieser Tees umfasst ein Abkühlen des heißen Teeaufgusses sowie

eine kühle Lagerung über längere Zeiträume. Diese Prozessführung fördert eine *Tea Cream* Bildung. Durch eine Verringerung der Konzentrationen phenolischer Inhaltsstoffe könnte deren Präzipitation und die damit verbundenen unerwünschten Effekte zwar verringert werden, gleichzeitig würden aber auch die gesundheitsfördernden Eigenschaften der Tees hierdurch abnehmen. Nach JÖBSTL *et al.* (2005) können Hersteller die *Tea Cream* Bildung durch Zuckerzusatz während der Teeherstellung, z.B. vor der Fermentation, reduzieren. Hierdurch werden Glycosylierungen phenolischer Substanzen begünstigt und deren Löslichkeit im Tee gesteigert.

2.2.1.5 Bioverfügbarkeit phenolischer Substanzen

Nach FORBES und ERDMAN (1983) wird der Begriff der Bioverfügbarkeit definiert als Anteil eines Nährstoffes, der über physiologische Stoffwechselwege verdaut, resorbiert und metabolisiert wird.

Mit Blick auf die Zufuhr phenolischer Substanzen innerhalb der menschlichen Ernährung sind Obst, Gemüse und Getränke wie Tee oder Rotwein die Hauptzufuhrquellen. Dabei kann der Verzehr dieser Lebensmittel erheblich zwischen verschiedenen Ländern variieren (AHERNE und O'BRIEN 2002). Die geschätzte tägliche Aufnahme phenolischer Substanzen reicht von 20 mg/d bis zu 1 g/d (RICE-EVANS *et al.* 1996). Allgemein gilt es bei den Angaben der Zufuhrmengen zu beachten, dass diese teilweise auf Gehaltsbestimmungen einzelner Flavonoide beruhen. Damit kann häufig von einer Unterschätzung der tatsächlichen Gesamtflavonoidzufuhr ausgegangen werden (AHERNE und O'BRIEN 2002).

Allgemein existieren im menschlichen Körper, im Gegensatz zur Resorption und Metabolisierung von Vitaminen, keine spezifischen Mechanismen für eine Metabolisierung von sekundären Pflanzenstoffen. Diese Substanzen werden ähnlich wie Xenobiotika verstoffwechselt und ausgeschieden (CROZIER *et al.* 2009). Nachdem zahlreiche Studien eine Absorption von phenolischen Substanzen zeigten, ist die genaue Resorption im menschlichen Verdauungstrakt bis heute nicht vollständig geklärt. Hierbei ist eine bedeutende Frage, ob Flavonoide als Aglycone, als Glycoside oder ob beide der genannten Verbindungsklassen absorbiert werden (AHERNE und O'BRIEN 2002). So werden beispielsweise nach HOLLMAN *et al.* (1995) signifikante Mengen an Quercetin als Aglycon und in glucosidischer Form absorbiert. WALLE *et al.* (2000) hingegen zeigten, dass Quercetin-4'-O-glucosid und Quercetin-3,4'-O-diglucosid effektiv durch β -Glucosidasen im Dünndarm hydrolysiert und anschließend größtenteils absorbiert

werden. Für die Hydrolyse der Flavonoidglycoside ist vermutlich die Lactase-Phlorizin-Hydrolase, eine 1- β -Glycosidase, in der Bürstensaummembran des Dünndarms verantwortlich (DAY *et al.* 2000). Weiterhin spielt nach OLTHOF *et al.* (2000) die Position der Bindung des Glucoserestes an Quercetin keine Rolle für eine Absorption von Quercetinglucosiden. Da Flavonoidaglycone eher hydrophob sind, können diese möglicherweise mittels passiver Diffusion durch die Biomembranen im Darm transportiert werden. Durch eine Glycosylierung steigt allerdings die Hydrophilie der Flavonoide, was die Wahrscheinlichkeit für einen passiven Transportmechanismus verringert. Möglicherweise spielt daher für den Transport glycosidischer Verbindungen durch die Dünndarmzellwand der SGLT (*Sodium Dependent Glucose Transporter*) eine Rolle (HOLLMAN *et al.* 1995). Nach erfolgter Absorption werden Flavonoide an Albumin gebunden über die Pfortader zur Leber transportiert (MANACH *et al.* 1996). Zudem unterlaufen Flavonoide und deren Derivate Metabolisierungsreaktionen, wie Hydroxylierung, Methylierung und Reduktion (AHERNE und O'BRIEN 2002). So erfolgt beispielsweise der an Albumin gekoppelte Transport von Quercetin im Blut in 3'-methylierter und in mit Glucuronsäure sowie mit Sulfat konjugierter Form (MANACH *et al.* 1998). Nach KUHNLE *et al.* (2000) sind im Flavonoidmetabolismus insbesondere Glucuronidierungen, O-Methylierungen an 3'- und 4'-Position sowie O-Methyl-Glucuronidierungen unter Einwirkung von Catechol-O-Methyltransferasen im Dünndarm bedeutend. Die resultierenden Metabolite und Konjugate gelangen anschließend in die Pfortader. In den Microsomen der Leber sind weitere Glucuronidierungen von Flavonoiden (YILMAZER *et al.* 2001) mittels UDP-Glucuronosyltransferase (UGT-1A9) möglich (OLIVEIRA und WATSON 2000). Innerhalb des Flavonoidmetabolismus ist zudem die intestinale Microflora beteiligt. Hier sind u.a. Hydrolysierungen von Flavonoidglycosiden (BOKKENHEUSER *et al.* 1987) sowie Spaltungen des C-Rings zwischen C-Atom 3 und 4 der Aglycone durch bakterielle Enzyme bekannt (WINTER *et al.* 1989). Als Enzyme für die Hydrolyse wurden α -Rhamnosidasen, β -Glucosidasen sowie β -Galactosidasen beschrieben (BOKKENHEUSER *et al.* 1987). Die aus der mikrobiellen Verstoffwechselung der Flavonoide resultierenden Bruchstücke der Flavonoide werden zum Teil absorbiert. Die Exkretion phenolischer Substanzen erfolgt in der Regel nach erfolgter Konjugation mit Glucuronsäure über die Niere (EBERMANN und ELMADFA 2008).

Ähnlich wie zuvor für die Flavonoide beschrieben, hängt auch bei den Phenolsäuren die Verstoffwechselung von der Konjugation dieser Substanzen ab. Insgesamt ist die Bioverfügbarkeit von unveresterten Phenolsäuren hoch. Diese können im Dünndarm schnell und ohne vorausgehende Hydrolyse resorbiert werden. Allerdings liegen Phenolsäuren vorwiegend in veresterter Form vor, sodass aufgrund fehlender Esterasen

im humanen Verdauungstrakt keine Resorption im Dünndarm erfolgt. Veresterte Phenolsäuren werden daher erst im Dickdarm durch Mikroorganismen hydrolysiert und die entstehenden Metabolite anschließend resorbiert (D'ARCHIVIO *et al.* 2007).

Auch bei den Tanninen hängt die Bioverfügbarkeit, wie auch zuvor bei den Flavonoiden und den Phenolsäuren, von deren Struktur ab. Die hydrolysierbaren Tannine werden durch die Salzsäure im Magen gespalten. Die Resorption der resultierenden monomeren Bausteine erfolgt anschließend im oberen Dünndarm (SEERAM *et al.* 2006). Die kondensierten Tannine hingegen sind im Magen nicht hydrolysierbar und werden daher erst im Dickdarm durch Mikroorganismen zu Phenolsäuren abgebaut. Letztere werden anschließend im Dickdarm resorbiert (MANACH *et al.* 2005). Mit zunehmendem Polymerisierungsgrad eines Tannins sinkt jedoch die mikrobielle Metabolisierung im Dickdarm. Hierdurch ist auch die allgemein geringe Bioverfügbarkeit komplexer Tannine zu erklären (GONTHIER *et al.* 2003).

2.2.1.6 Bioaktivität und postulierte Wirkungen phenolischer Substanzen

Im Unterschied zur Gruppe der Vitamine sind sekundäre Pflanzenstoffe, darunter auch die phenolischen Substanzen, als tägliche Nahrungsbestandteile nicht essenziell für die menschliche Gesundheit (CROZIER *et al.* 2006). Phenolische Substanzen, insbesondere die Flavonoide und Phenolsäuren, sind jedoch die Hauptzufuhrquelle an Antioxidantien innerhalb der Ernährung des Menschen (SCALBERT *et al.* 2005). Da viele Erkrankungen durch Oxidationsreaktionen initiiert werden, darunter z.B. Krebs, kardiovaskuläre Erkrankungen, Osteoporose und andere altersbedingte degenerative Erkrankungen (SCALBERT *et al.* 2005), kommt antioxidativ wirksamen Substanzen möglicherweise eine besondere Bedeutung bezüglich Krankheitsprävention zu (EBERMANN und ELMADFA 2008). Allgemein können oxidative Schädigungen von Zellkomponenten, DNA, Proteinen und Lipiden, die während des Alterns zur Degeneration somatischer Zellen führen und somit entscheidend an der Pathogenese degenerativer Erkrankungen beteiligt sind, durch Antioxidantien verringert werden. Dabei können phenolische Verbindungen direkt auf ROS (*Reactive Oxygen Species*) einwirken, indem sie ein Elektron abgeben und ein relativ stabiles Phenoxylradikal bilden. Dadurch wird ein Kettenabbruch der Oxidationsreaktionen in den Zellen erzielt. Alternativ können phenolische Substanzen auch das endogene Abwehrsystem stimulieren (SCALBERT *et al.* 2005). Für den Menschen ist zudem entscheidend, dass phenolische Substanzen nicht vom tierischen und menschlichen Organismus synthetisiert werden können (EBERMANN und ELMADFA 2008), weshalb sich eine maßvolle Aufnahme von sekundären Pflanzenstoffen über einen

längeren Zeitraum positiv auf die Inzidenz von zahlreichen Erkrankungen auszuwirken scheint (CROZIER *et al.* 2006). Nach WATZL und LEITZMANN (2005) können phenolische Substanzen allgemein antikanzerogene, antimikrobielle, antioxidative, antithrombotische, immunmodulierende, entzündungshemmende, blutdruckregulatorische und blutglucose-senkende Wirkungen erzielen.

In Hinblick auf das Erkrankungsrisiko kardiovaskulärer Erkrankungen wurde durch zahlreiche Tierstudien gezeigt, dass eine Aufnahme phenolischer Substanzen die Ausbildung atheromatöser Läsionen verringert. Dabei beruhen diese Effekte auf einer verminderten Aufnahme von oxidiertem LDL (*Low Density Lipoprotein*) durch Macrophagen, einer insgesamt geringeren LDL-Oxidation, sowie auf einer geringeren Anfälligkeit bezüglich einer LDL-Aggregation (SCALBERT *et al.* 2005). Teilweise konnten auch durch phenolische Substanzen reduzierte Gesamtcholesterolspiegel (LEE *et al.* 1999), LDL-Spiegel und Triacylglycerolspiegel in Plasma (TEBIB *et al.* 1994) und Leber (BOK *et al.* 1999) beschrieben werden. Weiterhin können phenolische Substanzen antithrombotisch wirken. So wurde bereits eine Inhibierung der Plättchenaggregation *in vitro* belegt, allerdings liegt hierfür nur eine mangelhafte Evidenz bezüglich einer *in vivo* Wirkung vor. Einen zusätzlichen Beitrag zur Arterioskleroseprävention liefern die genannten Substanzen hierbei durch eine Verbesserung der endothelialen Dysfunktion in der frühen Phase der Pathogenese (SCALBERT *et al.* 2005). In einigen Kohortenstudien konnte zudem eine inverse Korrelation zwischen einer Flavonol- und Flavanonzufuhr und dem Risiko eines mortalen Herzinfarktes (KNEKT *et al.* 1996) sowie von nicht mortalen Herzinfarkten (HIRVONEN *et al.* 2001, YOCHUM *et al.* 1999) gezeigt werden. Weiterhin korreliert eine Catechinaufnahme möglicherweise mit einem geringeren Risiko mortaler koronarer Herzerkrankungen (ARTS *et al.* 2001). Zu beachten ist hierbei, dass Flavonole, Flavone und Catechine nur einen Bruchteil aller phenolischen Substanzen darstellen. Daher sind verlässliche Phenolprofile in Lebensmitteln für weitere Studien zur Abschätzung möglicher Korrelationen zwischen einer Aufnahme phenolischer Substanzen und Erkrankungsrisiken essentiell (SCALBERT *et al.* 2005).

Neben der Prävention von kardiovaskulären Krankheiten wurden vor allem antikanzerogene Effekte durch phenolische Substanzen in Tiermodellen nachgewiesen. Dabei zeigten viele dieser Verbindungen, darunter Quercetin, Catechin, Isoflavone, Lignane, Flavanone und Ellagsäure protektive Eigenschaften in Bezug auf das Krebsrisiko (SCALBERT *et al.* 2005). Gleiches gilt im Allgemeinen auch für die ubiquitär in Gemüse und Früchten vorkommenden Phenolsäuren, die ebenfalls aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften als protektive Faktoren gegen Krebs- und Herzkrankheiten gelten (MATTILA

und KUMPULAINEN 2002; SAKAKIBARA *et al.* 2003; ZUO *et al.* 2002). Bezüglich einer antikanzerogenen Wirkung von phenolischen Substanzen wurden verschiedene Wirkungsmechanismen postuliert. So können phenolische Substanzen u.a. als blockierende Agenzien in der Initiationsphase einer Krebserkrankung wirken. Diese beeinflussen innerhalb dieser Phase den Metabolismus der Prokarzinogene durch eine Modulation der Expression von Cytochrom P450 Enzymen, die wiederum an der Aktivierung von Prokarzinogenen zu Karzinogenen beteiligt sind. Aber auch eine effektivere Exkretion durch eine Konjugation der Karzinogene über eine gesteigerte Expression von Phase-II-Enzymen wird diskutiert (SUSCHETET *et al.* 1998). Dieser Mechanismus ist auf der eigenen Toxizität der phenolischen Substanzen begründet. Diese können potentiell toxische Chinone im menschlichen Körper bilden. Somit sind diese Substanzen allgemein Substrate der Phase-II-Enzyme (BAEZ *et al.* 1997). Eine Aufnahme dieser Verbindungen aktiviert die genannten Enzyme und fördert so den Xenobiotikastoffwechsel als Schutzmechanismus (TALALAY *et al.* 1988). Weiterhin kann auch eine Stimulation der DNA-Reparaturmechanismen durch phenolische Substanzen einer Bildung von Initiationszellen einer Krebserkrankung entgegenwirken (WEBSTER *et al.* 1996). Aber auch als mögliche Tumorsuppressoragenzien können phenolische Verbindungen wirken, indem diese Bildung und Wachstum eines Tumors aus Initiationszellen verhindern. Eine cytotoxische Wirkung auf diese Zellen konnte *in vitro* gezeigt werden (AGULLO *et al.* 1996). Auch wurden bereits Effekte phenolischer Substanzen auf verschiedene, mit Krebserkrankungen assoziierte, Signaltransduktionswege (DONG *et al.* 1997, BARTHELMAN *et al.* 1998) und die Onkogenexpression (LIN *et al.* 1997) *in vitro* belegt. Durch eine östrogene Wirkung phenolischer Phytoöstrogene (KUIPER *et al.* 1998) sind möglicherweise auch protektive Effekte von Genistein auf Brust- und Prostatakrebs in Tiermodellen zu erklären (LAMARTINIERE *et al.* 2002). Neben den genannten Mechanismen können phenolische Verbindungen auch Apoptose induzieren und dadurch ebenfalls ein Tumorwachstum verringern. Bei allen genannten antikanzerogenen Effekten existiert jedoch das Problem der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen. Speziell in Tier- oder Zellstudien übersteigt die Dosis häufig eine durchschnittliche Zufuhr phenolischer Substanzen über die alltägliche Ernährung. Weiterhin muss insbesondere zwischen pharmakologischen Dosen innerhalb einer Therapie von Krebserkrankungen und der Dosis für eine Krebsprävention durch die Ernährung unterschieden werden. Außerdem sollte auch die Art der Applikation der phenolischen Verbindungen, z.B. *per os* oder durch Injektion, bei der Beurteilung von Studien und den darin publizierten Effekten beachtet werden (SCALBERT *et al.* 2005).

Ein weiteres mögliches Einsatzgebiet bezüglich phenolischer Substanzen ist die Prävention neurodegenerativer Erkrankungen. Über 15 % der 65-Jährigen leiden unter Alzheimererkrankungen und mehr als 1 % der Bevölkerung erkrankt an Parkinson. Die Pathogenese dieser neurodegenerativen Erkrankungen wird durch oxidativen Stress mit beeinflusst. Somit können auch hier phenolische Antioxidantien zur Prävention dieser Krankheiten beitragen (SCALBERT *et al.* 2005). Tierversuche belegen diesbezüglich präventive Effekte von Antioxidantien und insbesondere eine Verbesserung kognitiver und neuronaler Funktionen wurde beobachtet (JOSEPH *et al.* 1998 und 1999). *In vitro* Experimente zeigen für Epigallocatechin-gallat konzentrationsabhängige neuroprotektive Effekte auf Nervenzellen. Eine niedrige Konzentration zeigte dabei hohe Effekte (LEVITES *et al.* 2002). Insgesamt sollte bei möglichen protektiven Effekten von phenolischen Substanzen auf neurodegenerative Erkrankungen des Gehirns, eine geringe Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke bezogen auf phenolische Substanzen berücksichtigt werden (TSAI 2002).

Bezüglich einer Korrelation zwischen phenolischen Substanzen und Diabetes wird eine Beeinflussung des Blutglucosespiegels über verschiedene Mechanismen postuliert. Diese umfassen u.a. eine Inhibierung der Glucoseabsorption im Darm. Insbesondere eine Inhibierung der α -Glucosidase sowie der α -Amylase und Sucrase der Darmmukosa, aber auch des Glucosetransporters GLUT 2 werden diskutiert. Weiterhin konnte auch in peripheren Geweben eine verringerte Glucoseabsorption durch phenolische Substanzen gezeigt werden (SCALBERT *et al.* 2005). Zusätzlich zeigten zahlreiche *in vitro* Studien eine erhöhte Glucoseaufnahme in peripheren Geweben, beispielsweise in Adipocyten (HSU *et al.* 1999) und Myoblasten (CHENG und LIU 2000). Insgesamt ist die Datenlage bezüglich einer Wirkung phenolischer Substanzen auf den Blutzuckerspiegel, bzw. auf das Diabetesrisiko stark limitiert. Allerdings können phenolische Substanzen möglicherweise mit Diabetes assoziierte Komplikationen und Spätfolgen, wie z.B. Nierenschädigungen, die durch AGEs (*Advanced Glycation Endproducts*) beeinflusst werden, verringern (SCALBERT *et al.* 2005).

Ebenso können phenolische Substanzen möglicherweise als Östrogensatzstoffe eingesetzt werden. Bei postmenopausalen Frauen ist ein Östrogenmangel einer der Hauptgründe für die Entwicklung einer Osteoporose. Häufig wird daher eine Hormonersatztherapie zur Vorbeugung eines Knochenmasseverlustes empfohlen. Allerdings ist eine solche Therapie mit zahlreichen Risiken, insbesondere bei jahrelanger Anwendung, verbunden (SCALBERT *et al.* 2005). Unter den phenolischen Substanzen stellen Isoflavone mit einer schwachen östrogenähnlichen Wirkung eine alternative

Behandlungsform für eine Osteoporoseprävention dar (ANDERSON und GARNER 1997). Die zugrunde liegenden Mechanismen hierfür sind jedoch kaum identifiziert. Es existieren dennoch Studien, die bei Frauen eine positive Korrelation zwischen Sojaverzehr, bzw. einer damit korrelierten Isoflavonidaufnahme und der Knochendichte (TSUCHIDA *et al.* 1999) sowie der Osteoblastenaktivität (CHIECHI *et al.* 2002) belegen.

Darüber hinaus wurden zahlreiche Flavonoide identifiziert, die antibakterielle, antivirale oder antimykotische Wirkungen zeigen. So erzielte beispielsweise Quercetin durch DNA-Gyrase hemmende Effekte und (-)-Epigallocatechin-gallat durch Inhibierung cytoplasmatischer Membranfunktionen antibakterielle Wirkungen (CUSHNIE und LAMB 2005). SHAHAT *et al.* (2001) beschrieben antivirale Effekte einiger O-glycosidischer Flavonoide und oligomerer Proanthocyanidine aus einer Weißdornart (*Crataegus sinaica*) gegen den *Herpes simplex* Virus Typ 1 (HSV-1). *In vitro* konnte zudem eine Inhibierung einer Influenza-Virus-A- sowie Influenza-Virus-B-Infektion durch (-)-Epigallocatechin-gallat und Theaflavin-di-gallat beschrieben werden. Als Mechanismus wurde hierfür eine Bindung phenolischer Substanzen an das Hämagglutinin des Grippevirus und eine damit verringerte Adsorption an MDCK-Zellen (*Madin-Darby Canine Kidney Zellen*) vorgeschlagen (NAKAYAMA *et al.* 1993). Auch ein phenolreicher Pflanzenextrakt aus *C. incanus*, Cystus052[®]-Extrakt, zeigte *in vitro* antivirale Wirkungen gegen verschiedene Influenzaviren (EHRHARDT *et al.* 2007, DROEBNER *et al.* 2007 und 2011).

Die wissenschaftliche Datenlage bezüglich positiver Gesundheitseffekte phenolischer Substanzen für den Menschen hat insgesamt zu einer weiten Verbreitung von phenolreichen Nahrungsergänzungsmitteln (NEM) geführt. Der Verzehr dieser Produkte kann zu einer stark erhöhten Zufuhr einzelner Verbindungen führen. Zwar wurde bisher noch nicht von toxischen Effekten durch eine überhöhte Zufuhr phenolischer Substanzen beim Menschen berichtet, allerdings könnte sich das Risiko für einige Erkrankungen dadurch erhöhen. Durch mögliche prooxidative Effekte einer hohen Zufuhr phenolischer Verbindungen könnte durch eine Reduktion von Fe (III) zu Fe (II) innerhalb der Fenton-Reaktion Hydroxylradikale gebildet werden. Ebenso sind mutagene Effekte, goitrogene Wirkungen einzelner Verbindungen sowie ein Eisenmangel, hervorgerufen durch Komplexbildung von Eisenionen durch phenolische Substanzen, denkbar. Personen mit einem Risiko bezüglich eines Eisenmangels wird daher empfohlen keine phenolreichen Getränke (z.B. Tee) zu den Mahlzeiten zu trinken. Auch ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen über eine, durch phenolische Verbindungen ausgelöste, Homocysteinämie ist möglich, jedoch bisher noch nicht nachgewiesen. Die Einnahme von NEM, die mit einzelnen phenolischen Verbindungen angereichert sind, sollte daher stark

kontrolliert und differenziert nach profitierenden Personengruppen bewertet werden (SCALBERT *et al.* 2005).

2.2.1.7 Analytik phenolischer Substanzen

2.2.1.7.1 Identifizierung und Quantifizierung

Innerhalb der Analytik phenolischer Substanzen zur Charakterisierung von Pflanzenextrakten ist zunächst die Identifizierung und anschließende Quantifizierung der phenolischen Inhaltsstoffe ein zentraler Punkt. Nach MERKEN und BEECHER (2000) ist die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*; häufig auch LC) die Methode der Wahl für die Analytik von phenolischen Verbindungen in Lebensmitteln. Hierbei kommen fast ausschließlich Umkehrphasensäulen (RP: *reversed-phase*), meist C18-gebundene Silicasäulen (DE RIJKE *et al.* 2006) zum Einsatz. Die überwiegende Verwendung der Umkehrphasentechnik liegt an deren Überlegenheit innerhalb der Analytik relativ polarer Substanzen wie den Flavonoiden. Des Weiteren kommen in der LC-Analytik von phenolischen Substanzen binäre Eluentensysteme zum Einsatz. Dabei ist einer der beiden Eluenten ein wässriges polares Lösungsmittel, z.B. verdünnte Ameisensäure, Essigsäure oder Phosphorsäure. Der andere Eluent hingegen ist meist ein weniger polares organisches Lösungsmittel, z.B. Methanol oder Acetonitril. Die Eluenten sind somit meist angesäuert (MERKEN und BEECHER 2000). Ein weiterer wichtiger Punkt in der Flavonoidanalytik mittels LC ist die Detektion. Diese erfolgt für die Flavonoide normalerweise im UV-Bereich mittels DAD (*Diode Array Detector*) (MERKEN und BEECHER 2000). Dies hängt damit zusammen, dass alle Flavonoidaglycone zumindest einen aromatischen Ring enthalten und infolgedessen effektiv UV-Licht absorbieren (DE RIJKE *et al.* 2006). Hierbei sind wiederum zwei Absorptionsbanden charakteristisch für die Flavonoide. Zum einen Bande II mit einem Absorptionsmaximum im 240-285 nm Bereich, die wahrscheinlich durch Ring A im Flavonoidgrundgerüst entsteht. Zum anderen existiert Bande I mit einem Maximum im 300-550 nm Bereich. Diese Bande ergibt sich vermutlich aus Ring B des Grundgerüsts der Flavonoide (MERKEN und BEECHER 2000). Dabei wird nach DE RIJKE *et al.* (2006) Bande I aus dem Substitutionsmuster sowie der Konjugation dieses Ringes beeinflusst. Allgemein verursachen einfache Substituenten wie Methyl-, Methoxy- und nicht dissoziierte Hydroxylgruppen eher geringfügige Verschiebungen der UV-Absorptionsmaxima.

Geht es innerhalb der Analytik von phenolischen Verbindungen um eine Identifizierung von unbekannten Substanzen, so sind spektrometrische Methoden und insbesondere deren Kopplung mit einer LC von Bedeutung (ROBARDS und ANTOLOVICH 1997). Die Massenspektrometrie (MS) ist dabei eine moderne Technik für die Ergänzung der LC-Analytik. Meist wird eine MS-Analyse in Kombination mit einer UV-Detektion durchgeführt.

Innerhalb der LC-MS-Analytik phenolischer Substanzen wird heute fast ausschließlich Elektrosprayionisation (ESI) verwendet. Sowohl eine positive als auch eine negative Ionisation sind hierbei gebräuchlich (DE RIJKE *et al.* 2006). Dabei ist nach FABRE *et al.* (2001) der negative Ionenmodus innerhalb der LC-MS-Analytik von Flavonoiden aus Pflanzenextrakten insgesamt selektiver und empfindlicher als der positive Ionenmodus. Weiterhin wird für eine Identifizierung von unbekannten Substanzen häufig die Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) oder MS^n eingesetzt. Diese ist aktuell die bedeutendste Technik in Hinblick auf eine Identifizierung von Zielmolekülen sowie bisher unbekannten phenolischen Substanzen. Allgemein kann für eine Strukturaufklärung dieser Substanzen zunächst eine einfache MS-Analyse durchgeführt werden, um die entsprechenden Quasimolekülionen zu erhalten. Diese werden dann wiederum innerhalb der MS/MS-Analyse meist mittels CID (*Collision Induced Fragmentation*) fragmentiert. Das Resultat ist ein substanzcharakteristisches Fragmentierungsmuster. Die Strukturaussagen des Musters können zudem noch durch weitere MS^n -Experimente unterstützt werden (FABRE *et al.* 2001). Insgesamt wird in der Erforschung von sekundären Pflanzenstoffen zur Charakterisierung von unbekannten Substanzen eine große Bandbreite an verschiedenen LC-MS/MS-Methoden als Ergänzung zur reinen LC-DAD-Analytik eingesetzt, um eine schnelle Identifikation zu erzielen.

Eine weitere Methode zur vollständigen Identifizierung unbekannter phenolischer Substanzen stellt deren Isolierung mittels präparativer LC und anschließender Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie (*Nuclear Magnetic Resonance*) (*offline-Technik*), bzw. eine LC-NMR-Kopplung (*online-Technik*), dar (DE RIJKE *et al.* 2006).

2.2.1.7.2 Bestimmung der antioxidativen Kapazität

Nach Analyse der phenolischen Inhaltsstoffprofile können Pflanzenextrakte anhand weiterer Laborparameter näher charakterisiert werden. Hierzu werden häufig Summenparameter wie der Gesamtphenolgehalt, der Tanningehalt oder die antioxidative Kapazität des Extraktes aber auch der einzelnen phenolischen Inhaltsstoffe bestimmt. Die

Forschung im Bereich der Antioxidantien hat hierbei insgesamt beträchtlich zugenommen. So wuchs beispielsweise die Zahl der Veröffentlichungen in der Medline Datenbank zwischen 1995 und 2005, die das Wort „Antioxidans“ beinhalten, um 340 % (PRIOR *et al.* 2005). Antioxidantien sind nach HERNÁNDEZ *et al.* (2009) allgemein Moleküle, die (1.) Elektronen oder Wasserstoffatome abgeben können; (2.) ein dabei aus dem jeweiligen Antioxidans entstandenes Radikal liefern, das (3.) von anderen Elektronen- oder Protonquellen effektiv über eine Quenchingreaktion eliminiert werden kann, um Zellschäden zu verhindern; und (4.) deren Eigenschaften räumlich und zeitlich mit oxidativen Stressereignissen korreliert. Zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität von phenolischen Substanzen wird häufig der von MILLER und RICE-EVANS (1993) entwickelte TEAC-Assay (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) angewendet (RICE-EVANS *et al.* 1996). Insgesamt existiert eine große Bandbreite an Methoden für die Bestimmung der antioxidativen Kapazität in Lebensmitteln. Die Methoden lassen sich allgemein basierend auf dem Reaktionsmechanismus, in zwei Gruppen einteilen. Der Mechanismus basiert entweder auf einem Wasserstoffatomtransfer (HAT: *Hydrogen Atom Transfer*) oder einem Elektronentransfer (ET). Die Basis dieser Einteilung bildet die Annahme, dass Antioxidantien mittels HAT- und ET-Mechanismen Radikale deaktivieren können (HUANG *et al.* 2005). Dabei ist das Endergebnis der beiden Mechanismen gleich, aber die Kinetiken und Nebenreaktionen unterscheiden sich. Zudem können auch an Protonen gekoppelte ET- und HAT-Reaktionen parallel auftreten. Dabei werden die dominierenden Mechanismen durch die Struktur der antioxidativen Substanz und deren Eigenschaften, wie Löslichkeit und Verteilungskoeffizient sowie durch das im System vorliegende Lösungsmittel beeinflusst. Die beiden Hauptfaktoren zur Beurteilung der Effizienz eines Antioxidans stellen dabei die Dissoziationsenergie der Bindungen und das Ionisierungspotential dar. Innerhalb HAT-basierender Methoden wird klassischer Weise die Fähigkeit eines Antioxidans gemessen, freie Radikale durch Donation eines Wasserstoffatoms innerhalb einer Quenchingreaktion zu eliminieren (PRIOR *et al.* 2005). HAT-Reaktionen sind von Lösungsmittel und pH-Wert abhängig und laufen in der Regel komplett innerhalb von Sekunden bis Minuten ab. Zwei Beispiele für reine HAT-Methoden zur Beurteilung der antioxidativen Kapazität von Lebensmitteln und NEM sind die Ermittlung der *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC) oder der *Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter* (TRAP). Mittels ET-basierender Methoden (auch als SET, *Single Electron Transfer*, bezeichnet) wird die Fähigkeit eines Antioxidans detektiert, ein Elektron zu übertragen um eine beliebige Substanz zu reduzieren. Unter „Substanz“ können Metalle, Carbonyle und Radikale verstanden werden. ET-Reaktionen sind ebenfalls pH-Wert abhängig, da ihre Reaktivität primär von der Deprotonierung und dem Ionisierungspotential der reagierenden funktionellen Gruppen abhängen. Allgemein sinkt

das Ionisierungspotential mit ansteigendem pH-Wert, was durch eine ansteigende Kapazität für eine Elektronenabgabe während der Abgabe eines Protons reflektiert wird. Weiterhin laufen ET-Reaktionen langsam ab und benötigen somit viel Zeit, um vollständig abzulaufen. Daher basieren die entsprechenden Methoden auf der prozentualen Bestimmung des Anstieges von Reaktionsprodukten anstatt auf kinetischen Messungen. Zwei Beispiele für ET-Methoden zur Beurteilung der antioxidativen Kapazität von Lebensmitteln und NEM sind die Bestimmung der *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP) und die Messung der *Cupric Reducing Antioxidant Capacity* (CUPRAC) (PRIOR *et al.* 2005).

Einige Methoden zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität beruhen, wie bereits erwähnt, auf HAT- und auf ET-Reaktionsmechanismen. Hierzu zählen u.a. der TEAC-Assay, aber auch die *Folin-Ciocalteu*-Methode zur Messung des Gesamtphenolgehaltes (PRIOR *et al.* 2005). Der TEAC-Assay basiert allgemein auf einer Redoxreaktion. Hierbei kommt es durch einen ET zu einer Farbveränderung des Oxidans. Diese ist proportional zu der Konzentration des Antioxidationsmittels und wird nach Reaktionsende, bzw. einer definierten Zeitspanne, fotometrisch gemessen (HUANG *et al.* 2005).

Innerhalb des TEAC-Assays dient eine Diamonium-2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure-Radikallösung (ABTS^{•+}) als Oxidans. Die intensiv grün-blaue ABTS^{•+}-Lösung wird meist durch eine Reaktion von ABTS mit Kaliumperoxodisulfat hergestellt (HUANG *et al.* 2005). Die ursprüngliche von MILLER und RICE-EVANS (1993) entwickelte Methode beinhaltet hingegen noch eine Herstellung der Radikallösung mittels Metmyoglobin und Wasserstoffperoxid. Nach Zugabe von Antioxidantien wird die Abnahme der Farbintensität bei einer Wellenlänge von 734 nm mittels Fotometer gemessen. Der Reaktionsmechanismus des TEAC-Assays ist in Abbildung 2.8 veranschaulicht. Als Referenzsubstanz dient das Tocopherolderivat 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylcroman-2-carbonsäure (Trolox). Die TEAC wird in Troloxäquivalenten (TE) berechnet (HUANG *et al.* 2005).

Neben der fotometrischen TEAC-Bestimmung als Summenparameter für Lebensmittelproben ist es heute zusätzlich technisch möglich die einzelnen antioxidativen Kapazitäten der in der Probe enthaltenen Substanzen zu bestimmen. Hierzu werden mittels LC-onlineTEAC die antioxidativen Substanzen zunächst chromatographisch getrennt und anschließend die TEAC mittels einer Nachsäulenderivatisierung ermittelt (KOLEVA *et al.* 2001). Bei der LC-onlineTEAC-Methode handelt es sich allgemein um eine einfache und selektive Methode zur simultanen Bestimmung der antioxidativen Kapazitäten von

Einzelsubstanzen in komplexen Matrices (KOLEVA *et al.* 2001; ZIETZ *et al.* 2010; FIOL *et al.* 2012). Hierbei werden die getrennten Substanzen in eine Reaktionskapillare geleitet, in die mittels einer Hilfspumpe ein konstanter Fluss $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Lösung gefördert wird.

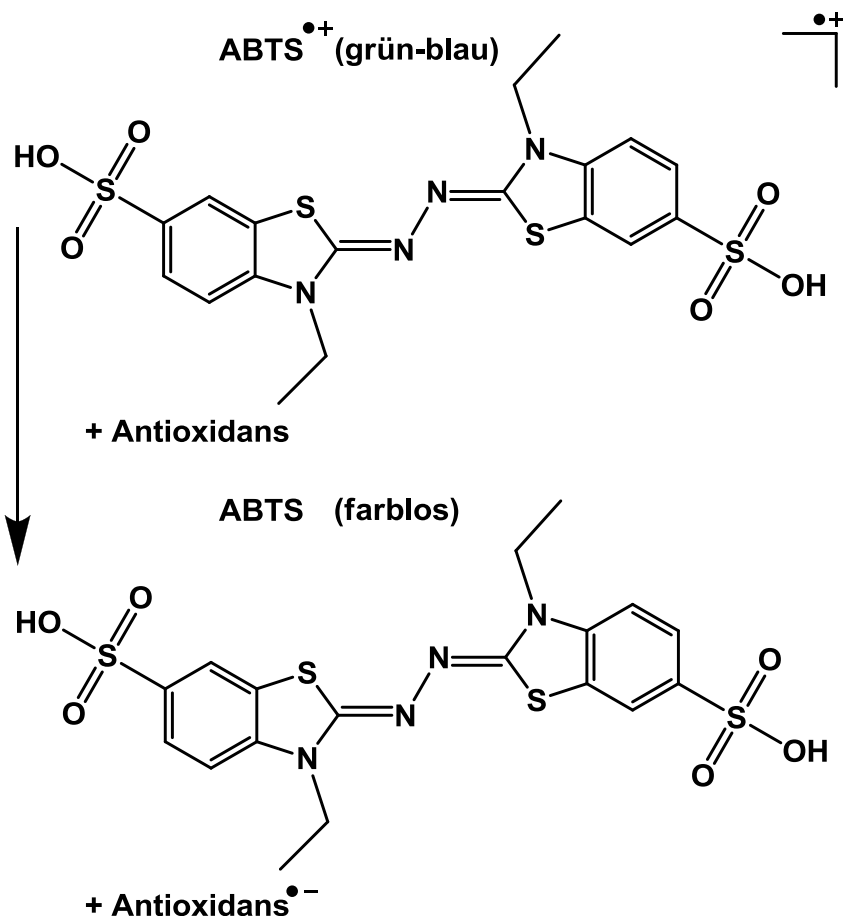


Abb. 2.8 Reaktionsmechanismus des TEAC-Assays (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) nach HUANG *et al.* (2005).

In der Reaktionskapillare findet dann die bereits beschriebene Reaktion zwischen den einzelnen antioxidativ wirksamen Substanzen mit der $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Lösung statt. Durch Elektronenübertragung auf das grün-blau gefärbte $\text{ABTS}^{\bullet+}$ reagiert dieses zum farblosen ABTS. Dies führt letztendlich zu einer Abnahme der Farbintensität und somit zu einer verringerten Extinktion (RAUDONIS *et al.* 2010). Die Extinktionsabnahme wird im zweiten Detektor als negativer Peak bei den beiden $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Absorptionsmaxima von 414 nm und 734 nm (RE *et al.* 1999) detektiert (ZIETZ *et al.* 2010). Abbildung 2.9 zeigt den Grundaufbau eines LC-onlineTEAC-Systems.

Innerhalb der LC-onlineTEAC ist insbesondere die Auswahl der Reaktionskapillare von entscheidender Bedeutung. Eine Veränderung der Länge, des Innendurchmessers oder der Flussrate hat hierbei einen bedeutenden Einfluss auf die Reaktionszeit und somit auf das Ergebnis der Messung (RAUDONIS *et al.* 2010). Die abschließende Berechnung der TEAC der einzelnen Substanzen erfolgt meist mittels Trolox als internem Standard (ZIETZ *et al.* 2010).

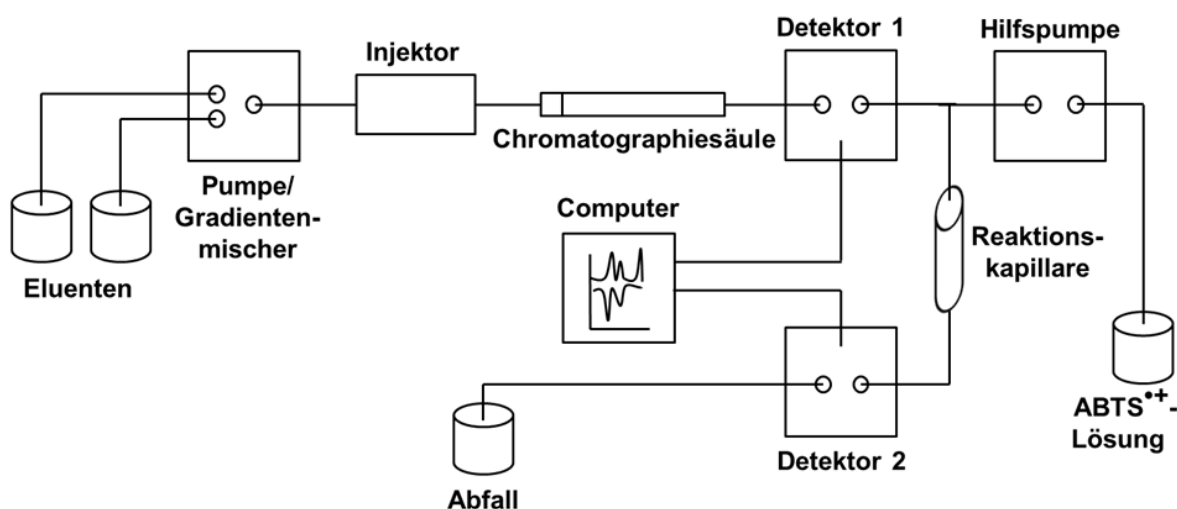


Abb. 2.9 Aufbau eines LC-onlineTEAC-Systems (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) zur Bestimmung antioxidativer Kapazitäten einzelner Substanzen modifiziert nach KOLEVA *et al.* (2001).

Eine weitere Methode zur Beurteilung der gesamten antioxidativen Kapazität einer Probe stellt neben fotometrischen Methoden die Messung mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR-Spektroskopie) dar. Diese Technik kann als einfache und schnelle Methode zur Ermittlung der Radikalfängereigenschaften und damit der antioxidativen Kapazität einer Probe eingesetzt werden (MACDONALD-WICKS *et al.* 2006). Hierbei basiert das Prinzip der ESR-Spektroskopie auf der Absorption von Mikrowellenstrahlung durch paramagnetische Substanzen innerhalb eines Magnetfeldes. Zur Gruppe der paramagnetischen Substanzen zählen, aufgrund ihrer ungepaarten Elektronen, freie Radikale (BALTES *et al.* 2004). Diese Radikale werden durch Antioxidantien eliminiert. Das hieraus resultierende Produkt besitzt keine ungepaarten Elektronen. Dies führt letztendlich zu einer Intensitätsabnahme des ESR-Signals, bzw. der Mikrowellenabsorption. Für ESR-Messungen zur Bestimmung von antioxidativen Kapazitäten kommen ausschließlich stabile Radikale, z.B. Kaliumnitrosodisulfonat, (Fremy's Salz) zum Einsatz (RÖSCH *et al.* 2003). Ein Vorteil der ESR-Spektroskopie, verglichen mit anderen spektrometrischen Methoden, besteht nach ROHN *et al.* (2005) in

der Anwendungsmöglichkeit auf Feststoffe sowie auf getrübbte Lösungen. Eine aufwendige Aufarbeitung der Proben kann somit meist entfallen. Eine weitere Einsatzmöglichkeit dieser Methode besteht darin, Aussagen über Oxidationsprozesse in Lebensmitteln zu treffen. Während dieser Prozesse entstehen freie Radikale, durch deren Quantifizierung der Verderbniszustand eines Lebensmittels beurteilt werden kann. Dies kann sogar noch vor auftretenden sensorischen Veränderungen am Produkt gemessen werden (BALTES *et al.* 2004).

2.2.1.7.3 Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes

Eine weitere Möglichkeit zur Charakterisierung von phenolreichen Pflanzenextrakten und Lebensmitteln stellt die Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes mittels der Methode nach *Folin-Ciocalteu* dar. Diese beruht wie der TEAC-Assay auf einem ET- und HAT-Reaktionsmechanismus (PRIOR *et al.* 2005). Der *Folin-Ciocalteu*-Assay wurde zunächst für Proteinuntersuchungen (Proteinbestimmung nach Lowry) entwickelt (HUANG *et al.* 2005). Die ursprüngliche, im Jahr 1927 entwickelte, Methode basiert auf einer Phenoloxidation durch ein Molybdatowolframatreagenz. Das hierfür beschriebene Reagenz ist eine Lösung aus Natriumwolframat ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$), Natriummolybdat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$), konzentrierter Salzsäure, Phosphorsäure (85 %) und Wasser, die für 10 h gekocht und anschließend mit Lithiumsulfat ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$), versetzt wird. Die *Folin-Ciocalteu*-Lösung ist gelb gefärbt, die chemischen Eigenschaften sind noch nicht vollständig identifiziert (HUANG *et al.* 2005). Aus der Reaktion zwischen *Folin-Ciocalteu*-Reagenz und phenolischen Verbindungen resultiert ein blaues Produkt mit einem UV-Absorptionsmaximum bei 745-750 nm. Abbildung 2.10 zeigt die grundlegende Farbreaktion der *Folin-Ciocalteu*-Methode (PRIOR *et al.* 2005).

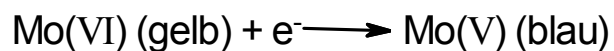


Abb. 2.10 Grundschemata der *Folin-Ciocalteu*-Farbreaktion nach PRIOR *et al.* (2005).

Die Methode ist einfach, sensitiv und präzise. Trotz allem läuft diese bei einem sauren pH-Wert nur langsam und mit mangelnder Spezifität bezüglich phenolischer Verbindungen ab. Aus diesem Grund optimierten SINGLETON und ROSSI (1965) die bestehende Methode. Das hierbei modifizierte Reagenz wird deutlich spezifischer von Phenolen reduziert. Das UV-Absorptionsmaximum des gebildeten blauen Reaktionsproduktes liegt bei einer Wellenlänge von 765 nm. Der Gesamtphenolgehalt

wird abschließend bezogen auf Gallussäure als Referenzsubstanz berechnet und in Form von Gallussäureäquivalenten (GE) angegeben. Zudem wurden von SINGLETON und ROSSI (1965) zwingend notwendige Reaktionsschritte und -bedingungen festgelegt, um reproduzierbare Ergebnisse zu gewährleisten. Hierzu zählen (1.) ein korrektes Volumenverhältnis zwischen Alkalien und *Folin-Ciocalteu*-Reagenz; (2.) eine optimale Reaktionszeit und -temperatur bezüglich Farbentwicklung; (3.) eine Aufzeichnung der optischen Dichte bei 765 nm; sowie (4.) die Verwendung von Gallussäure als Referenzsubstanz (PRIOR *et al.* 2005). Für die Interpretation der Ergebnisse aus dem *Folin-Ciocalteu*-Assay sollte bedacht werden, dass nicht nur phenolische Substanzen mit dem *Folin-Ciocalteu*-Reagenz reagieren. Prinzipiell handelt es sich hier um eine unspezifische Reaktion. Beispielsweise können Zucker, organische Säuren (PRIOR *et al.* 2005), Vitamin C oder Cu(I)-Ionen zu falsch positiven Ergebnissen führen. Die *Folin-Ciocalteu*-Reaktion ist zudem unspezifisch bezüglich der chemischen Struktur der phenolischen Substanzen (HUANG *et al.* 2005). Dennoch können durch einheitliche Versuchsdurchführung reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse zur Charakterisierung von pflanzlichen Extrakten und Lebensmitteln erzielt werden. Weitere Vorteile des *Folin-Ciocalteu*-Assays sind die allgemein einfache Durchführung und hohe Sensitivität (PRIOR *et al.* 2005).

2.2.1.7.4 Bestimmung des Tanningehaltes

Einen weiteren Parameter zur Charakterisierung von Pflanzenextrakten stellt der Tanningehalt dar. Tannine werden hierzu häufig mittels Methylcellulose-Präzipitations-Assay (MCP) quantitativ bestimmt. Diese Methode basiert auf der Präzipitation von Tanninen durch das Polymer Methylcellulose. Allgemein absorbieren Tannine Licht bei 280 nm, sodass eine fotometrische Detektion möglich ist. Die Extinktion des Probenextraktes wird vor und nach Methylcellulosefällung gemessen und die Differenz berechnet (SARNECKIS *et al.* 2006). Parallel erfolgt die Aufarbeitung einer Kontrollprobe, bei der statt einer Zugabe von Methylcellulose Wasser zugesetzt wird (MERCURIO *et al.* 2007). Zur Verstärkung der Präzipitation und Verhinderung eines erneuten Lösens des Präzipitates, erfolgt in den meisten Versuchsdurchführungen eine Zugabe von Ammoniumsulfatlösung sowie Zentrifugation (SARNECKIS *et al.* 2006). Die Extinktion der Kontrollprobe korreliert innerhalb des MCP-Assays mit der Konzentration sämtlicher Inhaltsstoffe, die bei 280 nm absorbieren (vorwiegend phenolische Substanzen). Da jedoch kleinere phenolische Verbindungen nicht durch Methylcellulose gefällt werden, stellt der MCP-Assay allgemein eine selektive Methode zur Quantifizierung von Tanninen

dar. Der Tanningehalt wird abschließend häufig bezogen auf Epicatechin als Referenzsubstanz berechnet und in Form von Epicatechinäquivalenten (EE) angegeben (SARNECKIS *et al.* 2006).

2.2.1.7.5 Statistische Versuchsplanung

Im Bereich der Naturwissenschaften wird häufig versucht Effekte verschiedener Faktoren auf Veränderungen einer oder mehrerer Zielgrößen zu analysieren. Beispielsweise soll innerhalb der analytischen Chemie häufig die Leistungsfähigkeit von Messgeräten oder Methoden optimiert werden. Für eine Optimierung der Zielgröße Leistungsfähigkeit müssen verschiedene Einflussfaktoren in unterschiedlichen Faktoreinstellungen getestet werden. Innerhalb der statistischen Versuchsplanung (DOE: *Design of Experiment*) und Durchführung können hierzu Werkzeuge, wie Wiederholungen, Blockbildung oder Randomisierung eingesetzt werden (RITER *et al.* 2005).

DOE stellt allgemein eine strukturierte, organisierte Methode dar, die dazu dient statistisch basiert mögliche Zusammenhänge von Variablen innerhalb eines bestimmten Prozesses zu erforschen (GUO *et al.* 2007). DOE wurde bereits in den 1920er Jahren von R. A. Fisher entwickelt. In den 1980er Jahren erlangte das Konzept an Bekanntheit, da durch Softwareapplikationen Schwankungen in modernen Produktionsprozessen effizient verringert werden konnten. Heute ist DOE in den Naturwissenschaften weit verbreitet und kommt vor allem in der pharmazeutischen Industrie zur wirtschaftlichen Prozessoptimierung und in der Produktentwicklung zum Einsatz (RITER *et al.* 2005).

Versuchsreihen, die statt auf DOE auf einem *One-Factor-at-a-Time* (OFAT) Prinzip aufbauen, sind sehr zeitaufwendig und neigen dazu Wechselwirkungen zwischen den untersuchten Faktoren zu übersehen. Letzteres kann zu Fehlinterpretationen der Ergebnisse führen. Statistisch geplante Experimente hingegen lösen durch gleichzeitige Veränderung der zu untersuchenden Faktoren die beschriebenen Probleme sehr effizient. Effekte einzelner Faktoren auf Zielgrößen sowie Wechselwirkungen zwischen den Einflussfaktoren werden berücksichtigt (PRAKASHAM *et al.* 2007).

2.3 Holzstoffe und Gerüstsubstanzen

Der Begriff Holz steht nach ELIAS *et al.* (1999) für einen Verbundstoff aus 42-60 % Cellulose, 23-29 % Lignin, 14-32 % Holzpolyosen und 0,3-3 % mineralischen Stoffen. Eine Verholzung von Pflanzenteilen kommt vor allem durch eine Einlagerung von Ligninen (sogenannten Holzstoffen) in die interfibrillären Räume der Zellwand zustande. Durch Verholzung kommt es zu einer erhöhten mechanischen Festigkeit, insbesondere gegen Druckbelastungen. Gleichzeitig resultieren hieraus jedoch ein Verlust an Elastizität und eine verringerte Wasserwegsamkeit der Zellwände durch das darin eingelagerte Lignin. Neben Lignin werden auch die zuvor beschriebenen Gerbstoffe während des Verholzungsprozesses in Zellwände eingelagert. Dies bietet der Pflanze Schutz vor einer mikrobiellen Zersetzung (NULTSCH 2001).

Unter Lignin werden holztechnologisch alle in verdünnten Säuren und organischen Lösungsmitteln unlöslichen Holzbestandteile verstanden (ELIAS *et al.* 1999). Chemisch gesehen sind Lignine Mischpolymere aus Phenylpropanen. Diese bilden ein dreidimensionales Gitternetz und durchdringen die Zellwand. Als Phenylpropane können die phenolischen Substanzen Coniferyl-, Cumaryl- und Sinapylalkohol Bestandteile von Lignin darstellen (NULTSCH 2001). Somit zählt Lignin ebenfalls innerhalb der sekundären Pflanzenstoffe zur Gruppe der phenolischen Substanzen. Abbildung 2.11 zeigt die Strukturen der monomeren Phenylpropanbausteine in Ligninen.

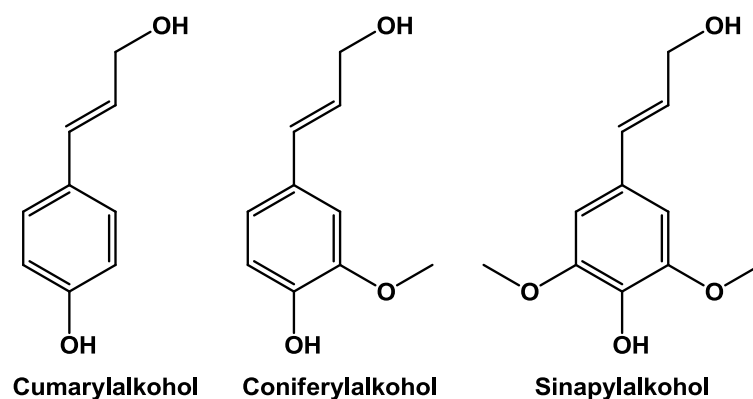


Abb. 2.11 Phenylpropanbestandteile in Ligninen nach NULTSCH (2001).

Durch enzymatische Katalyse mittels Peroxidasen resultiert bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxid aus einer dehydrierenden Polymerisationsreaktion der Phenylpropanbausteine das Polymer Lignin. In Abbildung 2.12 ist exemplarisch ein Ausschnitt aus der

Struktur von Lignin dargestellt. Diese resultiert aus einer Polymerisation von Conyferylalkohol.

Weiterhin wird unter Cellulose allgemein eine im Pflanzenreich verbreitete Zellwandsubstanz verstanden. Diese Substanz wird nicht durch körpereigene Enzyme des menschlichen Intestinaltraktes gespalten und bildet zusammen mit weiteren inerten Polysacchariden den als Rohfaser bezeichneten Ballaststoffanteil von pflanzlichen Lebensmitteln (BELITZ *et al.* 2008). Cellulose besteht aus β 1 $\rightarrow$ 4 verknüpften D-Glucoseeinheiten. Den Grundbaustein bildet das Disaccharid Cellobiose, bei dem der zweite Ring um 180 ° gedreht ist.

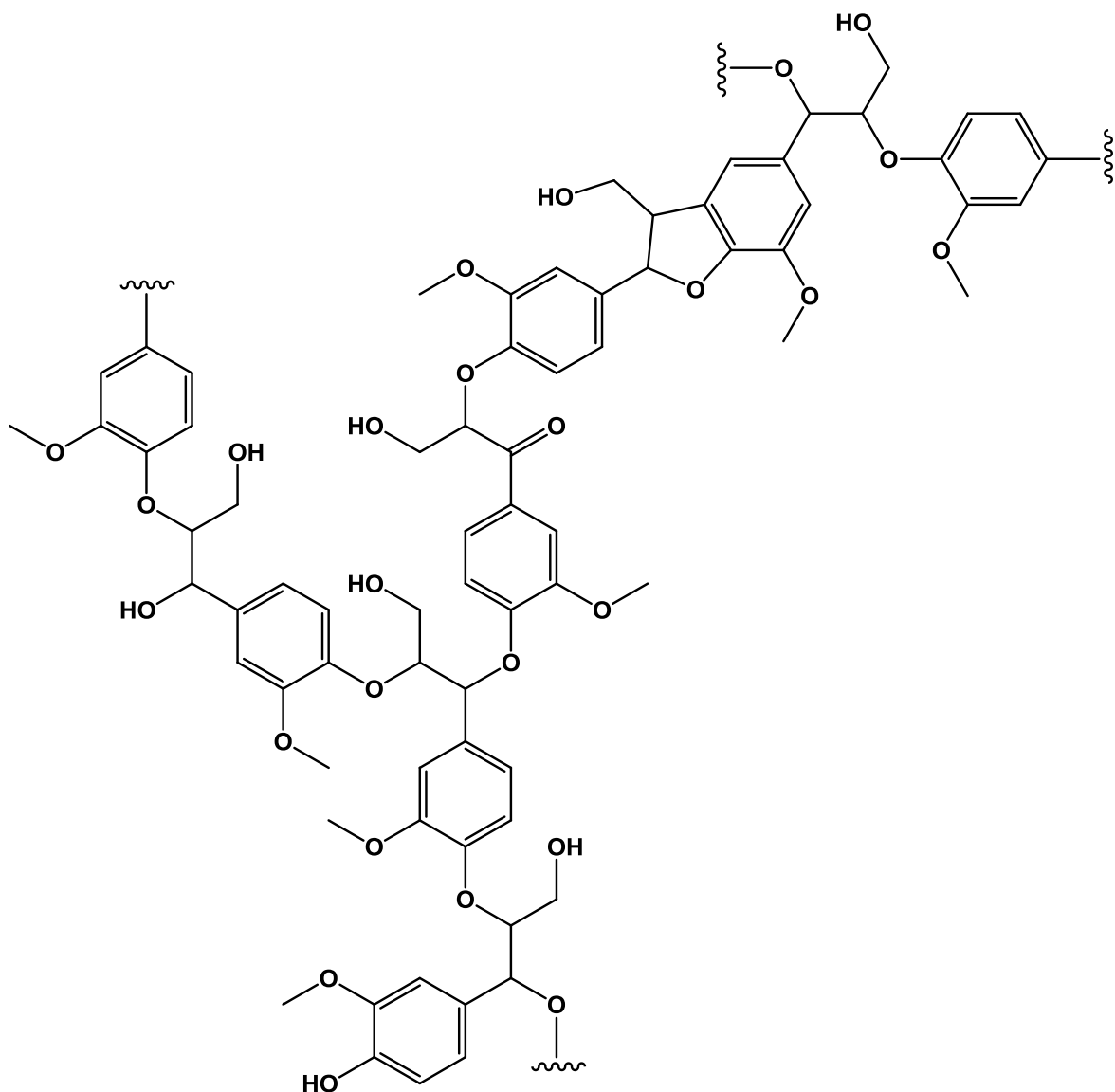


Abb. 2.12 Ausschnitt aus der Struktur von Lignin resultierend aus Polymerisation von Conyferylalkohol nach GOSSAUER (2006).

Es resultieren hieraus langgestreckte, unverzweigte und fadenförmige Moleküle. Die Kettenlänge kann dabei mehrere tausend Glucoseeinheiten betragen (NULTSCH 2001). Abbildung 2.13 zeigt die molekulare Grundstruktur der Cellulose. Bedingt durch das relativ hohe Molekulargewicht sowie die hochgeordnete Struktur ist Cellulose wasserunlöslich. Auch das Quellungsvermögen ist allgemein als gering zu beurteilen (BELITZ *et al.* 2008).

Unter Hemicellulosen werden Substanzen zusammengefasst, die innerhalb der Zellwände von Pflanzen die Räume zwischen den Cellulosefibrillen ausfüllen (BELITZ *et al.* 2008). Je nach den monomeren Bausteinen der Hemicellulosen werden diese als Pentosane (z.B. aus den Pentosen D-Xylose oder L-Arabinose) oder Hexosane (z.B. aus den Hexosen D-Glucose, D-Mannose oder D-Galaktose) bezeichnet. Hemicellulosen liegen zudem meist als Heteroglycane vor. So sind beispielsweise Xyloglucane, Arabinogalaktane oder Glucomannane bekannt, die aus kleinen, teilweise verzweigten und sich periodisch wiederholenden Einheiten bestehen (NULTSCH 2001).

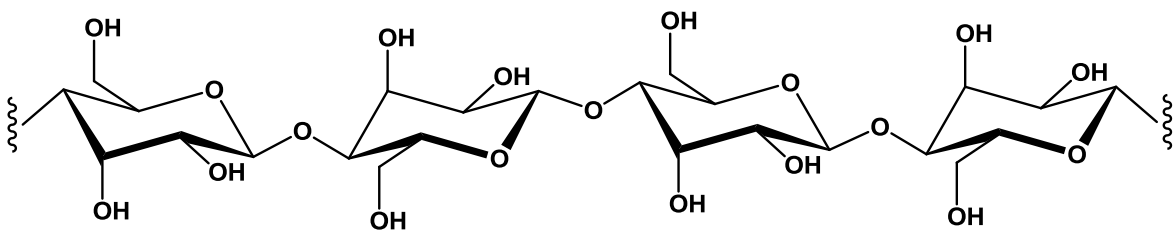


Abb. 2.13 Molekulare Struktur von Cellulose nach NULTSCH (2001).

2.3.1 Analytik von Holzstoffen und Gerüstsubstanzen

Insgesamt existiert eine große Bandbreite an Methoden zur Bestimmung von Holzstoffen sowie Gerüstsubstanzen, insbesondere für die Analytik von Lignin. Die Methoden zur Ligninbestimmung können prinzipiell in zwei Gruppen eingeteilt werden. Davon umfasst eine der Gruppen Methoden, die mittels starker mineralischer Säuren sämtliche Zellwandkomponenten hydrolisieren und Lignin abschließend als Hydrolysenrückstand gravimetrisch bestimmen. Die andere Gruppe beinhaltet Verfahren, innerhalb derer, mittels oxidierender Agenzien, Lignin selektiv aus der Matrix herausgelöst wird. Hier wird das Lignin entweder durch den Massenverlust der Probe oder mittels fotometrischem Assay für die resultierenden Oxidationsprodukte ermittelt (JUNG *et al.* 1997). Beispielsweise kann Lignin fotometrisch durch Zugabe eines Gemisches aus Phloroglucin und Salzsäure (Wiesner-Reagenz) bestimmt werden. Es entsteht ein rotgefärbter Komplex dessen Extinktion gemessen wird (NULTSCH 2001). In den meisten Fällen

werden für eine Ligninbestimmung jedoch zunächst durch Hydrolyse mit konzentrierter Schwefelsäure die Zellwandpolysaccharide gespalten und damit störende Matrixkomponenten entfernt. Der unlösliche Hydrolysenrückstand stellt dann das sogenannte *Klason*-Lignin dar und wird gravimetrisch gemessen (HATFIELD *et al.* 1994). Aus den Hydrolysaten können zudem die Holzzuckerprofile (Pentosen und Hexosen aus Gerüstsubstanzen) chromatographisch mittels Boratkomplex-Anionenaustauschchromatographie bestimmt werden. Aus diesen Zuckerprofilen wiederum werden Cellulose- und Hemicellulosegehalte berechnet (WILLFÖR *et al.* 2009).

3 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist zunächst eine Identifizierung und Quantifizierung der phenolischen Inhaltsstoffe in verschiedenen *C. incanus* Tees. Hierzu soll eine Probenaufarbeitung basierend auf einer verbraucherorientierten wässrigen Mazeration (Teekochen) sowie eine geeignete LC-DAD-ESI-MS/MS-Methode entwickelt werden, mit der die genannten Substanzen nach erfolgter Extraktion und Aufreinigung identifiziert werden. Mittels einer LC-DAD-Methode sollen die phenolischen Verbindungen im Anschluss quantifiziert werden, um signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen *C. incanus* Tees in Abhängigkeit von den Faktoren Partikelgröße, Holz- bzw. Blattanteil oder Herkunft des Teekrautes zu untersuchen. Für eine Bestimmung des Holzanteils in *C. incanus* Teekraut soll ebenfalls eine geeignete Analysenmethode im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelt werden.

Einen zweiten Schwerpunkt der Arbeit stellt die Charakterisierung von *C. incanus* Tee, bzw. der Bioaktivität der phenolischen Inhaltsstoffe, dar. Ein Teil dieser Charakterisierung soll hierbei über geeignete Summenparameter erfolgen. Hierzu werden Gesamtphenolgehaltbestimmungen mittels *Folin-Ciocalteu*-Assay, Untersuchungen der Tanningehalte mittels Methylcellulose-Präzipitations-Assay sowie Beurteilungen der gesamten antioxidativen Kapazitäten mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie durchgeführt. Neben diesen Parametern soll zusätzlich eine geeignete LC-onlineTEAC-Methode (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) etabliert werden, um die antioxidativen Kapazitäten der einzelnen phenolischen Substanzen in *C. incanus* Tee zu bestimmen. Mittels präparativer LC-DAD sollen weiterhin ausgewählte sowie zuvor identifizierte Substanzen isoliert und als Substrate für weiterführende Bioaktivitätstests, u.a. Untersuchungen zur antiviralen Aktivität, zur Verfügung gestellt werden.

Den dritten Hauptaspekt der Arbeit bildet die Beurteilung der Stabilität der phenolischen Inhaltsstoffe während des Prozesses der Teezubereitung. Hierbei sollen u.a. mittels softwaregestützter statistischer Versuchsplanung Modellversuche zur Analyse von Einflussfaktoren, z.B. Kochtemperatur, Kochzeit und Kochwasser, auf die Stabilität einzelner phenolischer Substanzen durchgeführt werden. Ebenso sollen mögliche Epimerisierungs- und Autoxidationsreaktionen phenolischer Inhaltsstoffe aus *C. incanus* Tee anhand eines Modellsystems untersucht werden. Ziel dieser Stabilitätsuntersuchungen ist es Optimierungsvorschläge für die Zubereitung von *C. incanus* Tee zu erhalten.

4 Material und Methoden

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die Analysen verwendeten Geräte sind im Anhang A1 aufgeführt. Weiterhin sind im Gefahrstoffverzeichnis (Anhang A2) die verwendeten Chemikalien dargestellt.

4.1 Probenmaterial

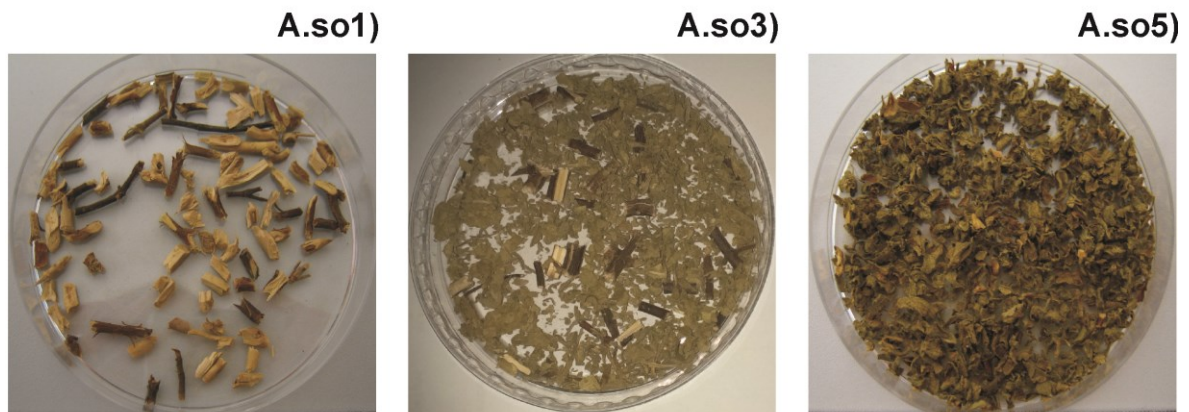
Die sieben nachfolgend in Tabelle 4.1 aufgeführten *C. incanus* Kräutertees (A-G) wurden für die vorliegende Arbeit über eine Versandapotheke und einen Online-Versandhändler erworben und analysiert. Die Proben stammten vorrangig aus der Türkei sowie aus Griechenland, es lagen jedoch nicht für alle Proben vollständige Herstellerinformationen zum Herkunftsland vor. Probe B enthielt zudem Pflanzenmaterial aus verschiedenen Herkunftsländern sowie einen Zusatz von 5 % Pfefferminze.

Insgesamt bestanden die Proben aus Teekraut variierender Partikelgrößen. So umfasste beispielsweise Probe A vorwiegend grobe Partikel mit einer inhomogenen Größenverteilung. Die Partikelgröße lag hierbei überwiegend zwischen 2 mm und 15 mm. Eine ähnliche inhomogene, grobe Partikelgröße lag auch in Probe D vor. Die anderen untersuchten Proben bestanden hingegen meist aus kleinen Partikeln mit relativ homogener Größenverteilung (durchschnittlich 2 mm-5 mm). Zudem war hier optisch ein höherer Blatt- bzw. geringerer Stängelanteil, als in den Proben A und D zu erkennen. In diesen Proben wiederum waren auch größere Stängelpartikel im Teekraut enthalten. Probe A wurde zusätzlich für weitere Versuche per Hand in Stängel (100 % w/w) und Blätter (100 % w/w) sortiert. Hieraus wurden wiederum drei Mischungen mit definierten Gewichtsanteilen an Blättern (0 % w/w, 25 % w/w, 50 % w/w, 75 % w/w, 100 % w/w) und Stängeln (100 % w/w, 75 % w/w, 50 % w/w, 25 % w/w, 0 % w/w) rekonstruiert. Es ergeben sich die sortierten Probe A.so1 - A.so5. Zusätzlich wurde Probe A mittels Siebmaschine in sechs Fraktionen definierter Partikelgrößen (durchschnittlich 0,3 mm-2,8 mm) gesiebt. Hieraus resultierten die Probe A.gs1 bis A.gs6. Sämtliche Proben sind ebenfalls in Tabelle 4.1 beschrieben. In Abbildung 4.1 sind exemplarisch die sortierten Probe A.so1, A.so3 und A.so5 sowie die gesiebten Probe A.gs1 bis A.gs6 zur Veranschaulichung der enthaltenen *C. incanus* Pflanzenteile und deren Partikelgrößen dargestellt. In den gesiebten Proben sind sowohl Blatt- als auch Stängelanteile in allen sechs Siebungen erkennbar.

Tab. 4.1 Beschreibungen der untersuchten *C. incanus* Tees (Handelsproben: A-G) sowie der aus Probe A handsortierten (A.so1-A.so5) und gesiebten (A.gs1-A.gs6) Teeproben. Grobe Partikelgröße: ca. 2-15 mm Pflanzenteile; feine Partikelgröße: ca. 2-5 mm Pflanzenteile. so: per Hand in Stängel, Blätter und definierte Mischungen aus Probe A sortiert; gs: mittels Siebmaschine aus Probe A gesiebte Fraktionen definierter Partikelgröße.

Probe	Herkunft	Beschreibung
A	Griechenland	inhomogene Partikelgröße (grob), hoher Stängelanteil
B	Griechenland und Türkei	homogene Partikelgröße (fein), hoher Blattanteil, 5 % Pfefferminzzusatz
C	Türkei	homogene Partikelgröße (fein), hoher Blattanteil
D	Griechenland	inhomogene Partikelgröße (grob), hoher Stängelanteil
E	Türkei	homogene Partikelgröße (fein), hoher Blattanteil
F	unbekannt	homogene Partikelgröße (fein), hoher Blattanteil
G	Türkei	homogene Partikelgröße (fein), hoher Blattanteil
A.so1	Griechenland	0 % (w/w) Blattanteil 100 % (w/w) Stängelanteil
A.so2	Griechenland	25 % (w/w) Blattanteil 75 % (w/w) Stängelanteil
A.so3	Griechenland	50 % (w/w) Blattanteil 50 % (w/w) Stängelanteil
A.so4	Griechenland	75 % (w/w) Blattanteil 25 % (w/w) Stängelanteil
A.so5	Griechenland	100 % (w/w) Blattanteil 0 % (w/w) Stängelanteil
A.gs1	Griechenland	2,5-3,1 mm Partikelgröße
A.gs2	Griechenland	2,0-2,5 mm Partikelgröße
A.gs3	Griechenland	1,4-2,0 mm Partikelgröße
A.gs4	Griechenland	1,0-1,4 mm Partikelgröße
A.gs5	Griechenland	0,5-1,0 mm Partikelgröße
A.gs6	Griechenland	0,0-0,5 mm Partikelgröße

Sortierte Proben:



Gesiebte Proben:

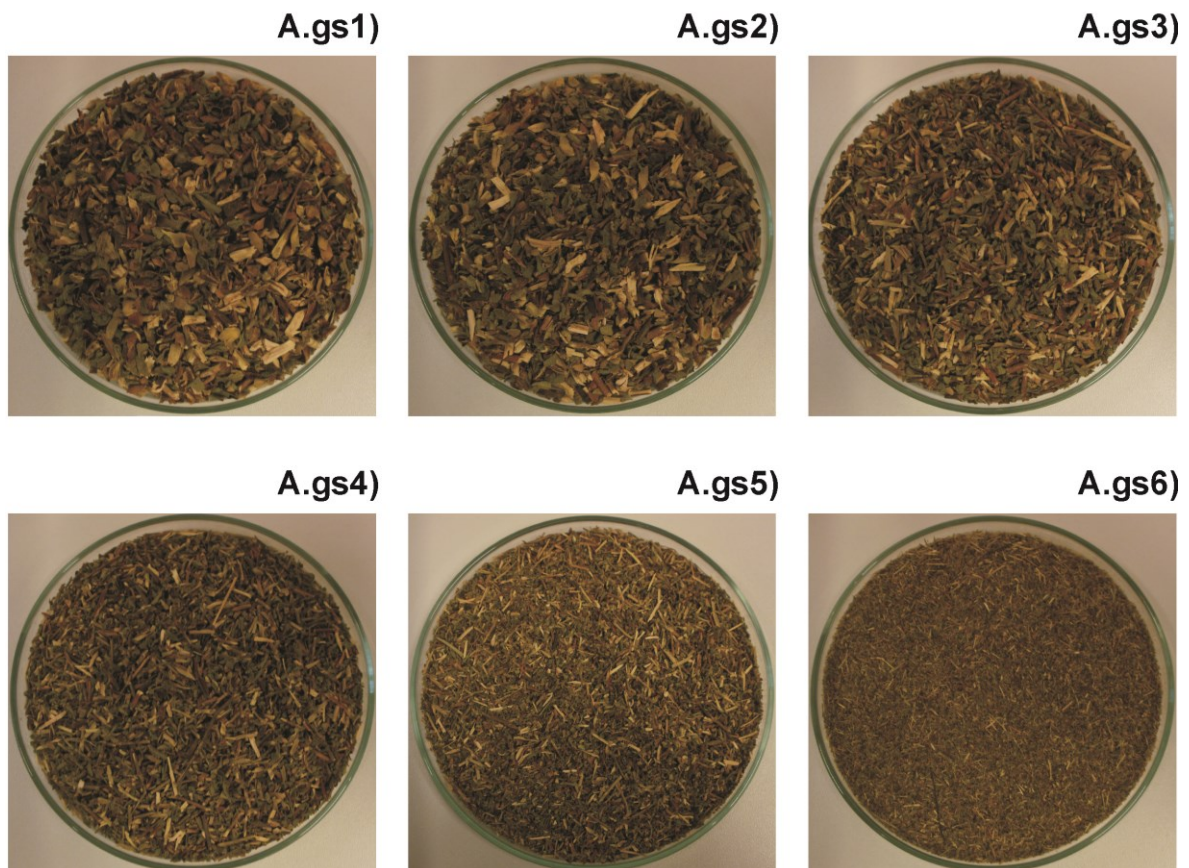


Abb. 4.1 Auswahl handsortierter (Blatt und Stängel) und gesiebter (Partikelgröße) *C. incanus* Proben. Blattanteile bzw. Stängelanteile sortierte Proben: A.so1: 0 % w/w Blatt, 100 % w/w Stängel; A.so3: 50 % w/w Blatt, 50 % w/w Stängel; A.so5: 100 % w/w Blatt, 0 % w/w Stängel. Durchschnittliche Partikelgrößen gesiebte Proben: A.gs1: 2,8 mm; A.gs2: 2,3 mm; A.gs3: 1,7 mm; A.gs4: 1,2 mm, A.gs5: 0,8 mm; A.gs6: 0,3 mm. Weitere Beschreibungen der Proben sind Tabelle 4.1 zu entnehmen.

4.2 Probenaufarbeitung

Für die Extraktion phenolischer Substanzen aus *C. incanus* Teekraut wurden die Proben weitgehend nach Herstellerangaben mazeriert. Hierzu wurden jeweils 0,7 g Teekraut eingewogen und mit 45 mL Millipore®-Wasser (entspricht einem Teekraut-zu-Wasser-Verhältnis von 15 g/L) bei 95 °C für 5 min erhitzt. Anschließend wurde für 10 min bei 3220×g zentrifugiert und ein Aliquot von 35 mL des Überstands abgenommen. Nach Lyophilisation wurde der trockene Rückstand in 4 mL Millipore®-Wasser aufgenommen.

Nachfolgend wurde zur Extraktreinigung und Vorfraktionierung der Analyten eine modifizierte Festphasenextraktion (*Solid Phase Extraction*, SPE) nach der Methode von BREITFELLNER *et al.* (2002) durchgeführt. Hierfür wurde zunächst 1 g Polyamid 6 in ein 6 mL SPE-Tube eingewogen und das Säulenmaterial mittels Polyethylenfritten fixiert. Im Anschluss erfolgte Waschen und Konditionierung der SPE-Säule mit jeweils 10 mL Methanol/Ammoniak (98:2 v/v), Wasser/Essigsäure (99:1 v/v) und Wasser. Nach Aufgabe von 4 mL Probenextrakt folgte ein Spülschritt mit 20 mL Wasser, danach eine erste Elution mit 50 mL Methanol und eine zweite Elution mit 50 mL Methanol/Ammoniak (98:2 v/v). Die zwei SPE-Eluate wurden mittels eines Probenkonzentrators unter Stickstoffstrom zur Trockne eingengt und jeweils in 2 mL Methanol/Wasser (70:30 v/v) aufgenommen. Nach Spritzenfiltration über eine Nylonmembran (0,45 µm Porengröße) wurden die Extrakte für die weitere Analytik eingesetzt.

Die *C. incanus* Proben wurde doppelt aufgearbeitet und analysiert. Die Ergebnisse sind entsprechend als Mittelwert und zugehörige Standardabweichung der Doppelbestimmung in den Abbildungen dargestellt.

4.3 Identifizierung phenolischer Substanzen mittels LC-DAD-ESI-MS/MS

Die Identifizierung der phenolischen Substanzen in den *C. incanus* Extrakten erfolgte mittels LC-DAD-ESI-MS/MS. In Tabelle 4.2 sind die hierzu verwendeten LC-DAD-Geräteparameter dargestellt.

Weiterhin wurden die in Tabelle 4.3. dargestellten binären Gradienten mit Wasser/Ameisensäure (99,9:0,1 v/v) als Eluent A und Acetonitril/Ameisensäure (99,9:0,1 v/v) als Eluent B eingesetzt. Der erste Gradient diente hierbei zur Analytik des methanolischen SPE-Eluates und der zweite Gradient wurde für die Messungen des Methanol/Ammoniak-SPE-Eluates eingesetzt.

Tab. 4.2 LC-DAD-Geräteparameter für die Identifizierung phenolischer Substanzen.

LC-Geräteparameter	Einstellung
Flussrate	0,5 mL/min
Temperatur Autosampler	15 °C
Injektionsvolumen	10 µL
Vorsäule	C18; 4×3,00 mm (Phenomenex Ltd, Aschaffenburg)
Säule	Luna®; C18 (2) 5 µm 100 Å; 150×3,00 mm (Phenomenex Ltd, Aschaffenburg)
Säulentemperatur	21 °C
Wellenlängen Detektion	280 nm, 325 nm, 350 nm, 365 nm
Scanbereich	180-800 nm

Tab. 4.3 LC-DAD-Gradienten zur Analytik phenolischer Substanzen des methanolischen (Gradient 1) und Methanol/Ammoniak-SPE-Eluates (Gradient 2). Eluent A: Wasser/Ameisensäure (99,9:0,1 v/v); Eluent B: Acetonitril/Ameisensäure (99,9:0,1 v/v).

Gradient 1		
Laufzeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0-2	95 (isokratisch)	5 (isokratisch)
2-6	95-90	5-10
6-45	90-70	10-30
45-55	70-5	30-95
55-60	5 (isokratisch)	95 (isokratisch)
60-65	5-95	95-5
65-75	95 (isokratisch)	5 (isokratisch)
Gradient 2		
Laufzeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0-5	98 (isokratisch)	2 (isokratisch)
5-30	98-85	2-15
30-50	85-70	15-30
50-60	70-5	30-95
60-65	5 (isokratisch)	95 (isokratisch)
65-70	5-98	95-2
70-80	98 (isokratisch)	2 (isokratisch)

Die Detektion der Hydroxybenzoesäuren, Ellagitannine und Flavanole erfolgte mittels DAD bei 280 nm, Hydroxyzimtsäuren wurden bei 325 nm und die Flavanole bei 350 nm gemessen (vgl. Tabelle 4.2). Weiterhin wurden für die ESI-MS/MS-Detektion die in

Tabelle 4.4 gezeigten Geräteparameter verwendet. Die Extrakte wurden konzentrationsabhängig mit Methanol/Wasser (70:30 v/v) für die MS-Analytik verdünnt.

Tab. 4.4 ESI-MS/MS-Geräteparameter zur Identifizierung phenolischer Substanzen.

ESI-MS/MS-Geräteparameter	Einstellung
Ionenmodus	negativ
Scanbereich	70-1500 <i>m/z</i>
Kapillartemperatur	350 °C
Kapillarspannung	4,5 kV
Flussrate Trockengas (N ₂)	10 L/min
Druck Nebulizer (N ₂)	55 psi
MS/MS-Modus	automatisch
Kollisionsgas	Helium
Anzahl Precursor Ionen	2
Schwellenwert Intensität (rel.)	25000
Amplitude MS/MS-Fragmentierung	1,0 V
Tuningmix für Scankalibrierung	ESI-L Low Concentration Tuning Mix (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen)

4.4 Quantifizierung phenolischer Substanzen mittels LC-DAD

Für die Quantifizierung der phenolischen Substanzen in den *C. incanus* Extrakten wurden zunächst Stammlösungen kommerziell erworbener Standardsubstanzen mit einer Konzentration von 1 mg/mL hergestellt. Die in Tabelle 4.5 angegebenen Substanzen wurden hierzu in Methanol, bzw. Gallussäure in Wasser, gelöst und die jeweilige chemische Reinheit der Substanzen für die Berechnung der Konzentration berücksichtigt. Weiterhin wurden für die Standardsubstanzen die im Anhang A4.1 dargestellten Kalibrierreihen hergestellt. Als untere Grenze der Kalibrierreihe wurde die Bestimmungsgrenze (LOQ: *Limit of Quantification*) der jeweiligen Standardsubstanz gewählt. Die Ermittlung der Bestimmungs- sowie des Nachweisgrenze (LOD: *Limit of Detection*) erfolgte nach KROMIDAS (2008) auf Basis des Grundrauschens von sechs Methanolmessungen (Blindwert) anhand der Gleichungen in Anhang A3.1.

Da nicht für alle detektierten phenolischen Inhaltsstoffe Standardsubstanzen kommerziell erhältlich waren, wurden einige Substanzen anhand strukturell verwandter Verbindungen quantifiziert. In den Berechnungen der Konzentrationen der phenolischen Substanzen in *C. incanus* Tee wurden hierfür Korrekturfaktoren für das abweichende Molekulargewicht

der quantifizierten Substanz von der eingesetzten Standardsubstanz berücksichtigt. Ebenso wurde die Reinheit der verwendeten Standards in die Formeln für die Berechnung integriert. Die verwendeten Standardsubstanzen und Korrekturfaktoren sind in Tabelle 4.5 dargestellt. Die genaue Berechnung der Konzentrationen phenolischer Substanzen in *C. incanus* Tee erfolgte mittels der im Anhang A3.2 dargestellten Gleichung.

Tab. 4.5 Eingesetzte Standardsubstanzen für die Quantifizierung phenolischer Inhaltsstoffe in *C. incanus* Tee. Korrekturfaktoren (KF) für chemische Reinheit und Molekulargewicht (MW) bei Quantifizierung über strukturell verwandte Verbindungen. HHDP-Glucose: Hexahydroxydiphenoyl-glucose; I1 und I2: Isomer 1 und Isomer 2, CHR: chromatographisch rein.

Standard-substanz	MW [g/mol]	Reinheit [%]; KF Reinheit	Quantifizierte Substanzen in <i>C. incanus</i> Tee	MW [g/mol]	KF für MW
Gallussäure	170,1	98 0,98	Gallussäure		
			Methylgallat	184,1	1,08
Ferulasäure	194,2	99 0,99	Hydroxyferulasäure-5-O-rhamnosid	356,4	1,18
			Hydroxyferulasäure-4-O-rhamnosid	356,4	1,18
			Hydroxyferuloyl-rhamnose	356,4	1,18
Ellagsäure	302,2	98 0,98	Ellagsäure		
			Ellagsäure-7-O-xylosid	434,3	1,44
			HHDP-Glucose (I1)	482,3	1,60
			HHDP-Glucose (I2)	482,3	1,60
Gallocatechin	306,3	98 0,98	Gallocatechin		
Catechin	290,3	CHR -	Catechin		
Procyanidin B1	578,5	90 0,90	Gallocatechin-(4 α -8)-catechin oder Catechin-(4 α -8)-gallocatechin	594,3	1,03
			Gallocatechin-(4 α -8)-gallocatechin oder Gallocatechin-(4 α -6)-gallocatechin	610,4	1,06
Myricitrin	464,4	99 0,99	Myricitrin		
			Myricetin-O-xylosid	450,35	0,97

Tab. 4.5 (Fortsetzung) Eingesetzte Standardsubstanzen für die Quantifizierung phenolischer Inhaltsstoffe in *C. incanus* Tee. Korrekturfaktoren (KF) für chemische Reinheit und Molekulargewicht (MW) bei Quantifizierung über strukturell verwandte Verbindungen. HHDP-Glucose: Hexahydroxydiphenoyl-glucose; I1 und I2: Isomer 1 und Isomer 2, CHR: chromatographisch rein.

Standard-substanz	MW [g/mol]	Reinheit [%]; KF Reinheit	Quantifizierte Substanzen in <i>C. incanus</i> Tee	MW [g/mol]	KF für MW
Myricetin-3-O-galactosid	480,4	99 0,99	Myricetin-3-O-galactosid		
			Myricetin-3-O-glucosid	480,38	1,00
Quercitrin	448,4	78 0,78	Quercitrin		
			Quercetin-3-O-galactosid	464,38	1,04
			Quercetin-3-O-glucosid	464,38	1,04
			Quercetin-O-xylosid	434,35	0,97
Tilirosid	594,5	96 0,96	trans-Tilirosid		
			cis-Tilirosid	594,52	1,00

Die Messung der Standardlösungen und Proben erfolgte als Doppelbestimmung mittels LC-DAD sowie den in Tabelle 4.3. beschriebenen Gradienten für die SPE-Eluate. In Tabelle 4.6 sind die verwendeten LC-DAD-Geräteparameter dargestellt. Die Quantifizierung der Hydroxybenzoesäuren, Ellagitannine und Flavanole erfolgte bei 280 nm, die der Hydroxyzimtsäuren bei 325 nm und die der Flavonole bei 350 nm.

Tab. 4.6 LC-DAD-Geräteparameter für die Quantifizierung phenolischer Substanzen.

LC-DAD-Geräteparameter	Einstellung
Flussrate	0,6 mL/min
Injektionsvolumen	10 µL
Vorsäule	C18; 4×3,00 mm (Phenomenex Ltd, Aschaffenburg)
Säule	Luna®, C18 (2) 5 µm 100 Å; 150×3,00 mm (Phenomenex Ltd, Aschaffenburg)
Säulentemperatur	21 °C (Raumtemperatur)
Wellenlängen Detektion	280 nm, 325 nm, 350 nm, 365 nm
Scanbereich	200-450 nm

4.5 Bestimmung antioxidativer Kapazitäten mittels LC-onlineTEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*)

Die Bestimmung der antioxidativen Kapazitäten der einzelnen phenolischen Inhaltsstoffe erfolgte mittels LC-onlineTEAC. Die verwendeten Geräteparameter des LC-onlineTEAC-Systems sind in Tabelle 4.7 dargestellt. Für die chromatographische Trennung der phenolischen Verbindungen wurde für das methanolische SPE-Eluat der in Tabelle 4.8 dargestellte Gradient 1 und für das Methanol/Ammoniak-SPE-Eluat der in Tabelle 4.3 beschriebene Gradient 2 verwendet. Als Reagenz für die Nachsäulenderivatisierung wurde eine 100 µmol/L ABTS^{•+}-Lösung eingesetzt. Hierzu wurden 54 mg ABTS und 9,4 mg K₂S₂O₈ in einen 50 mL Messkolben eingewogen, mit Wasser auf die Marke aufgefüllt und bei Raumtemperatur für ca. 20 h im Dunkeln inkubiert. Durch Zugabe von 950 mL Wasser wurde die Radikallösung auf eine finale ABTS^{•+}-Konzentration von 100 µmol/L verdünnt und nach 10 min Behandlung im Ultraschallbad für die Messungen eingesetzt. Als interner Standard wurde den Proben 10 mmol/L methanolische Troloxlösung zugesetzt, sodass eine Endkonzentration von 1 mmol/L Trolox im Probenvial vorlag.

Tab. 4.7 LC-onlineTEAC-Geräteparameter (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) zur Bestimmung der antioxidativen Kapazitäten der einzelnen phenolischen Inhaltsstoffe.

LC-onlineTEAC-Geräteparameter (methanolisches SPE-Eluat)	Einstellung
Flussrate	0,6 mL/min
Injektionsvolumen	10 µL
Vorsäule	C18; 4×3,00 mm (Phenomenex Ltd, Aschaffenburg)
Säule	Luna [®] ; C18 (2) 5 µm 100 Å; 150×3,00 mm (Phenomenex Ltd, Aschaffenburg)
Säulentemperatur	21 °C (Raumtemperatur)
Wellenlängen Detektion (positive Peaks)	280 nm, 325 nm, 350 nm, 365 nm
Scanbereich	200-450 nm
Flussrate ABTS ^{•+} -Lösung	0,6 mL/min
Länge Reaktionskapillare	5 m
Innendurchmesser Reaktionskapillare	0,25 mm
Temperatur Reaktionskapillare	40 °C
Wellenlängen Detektion (negative Peaks Nachsäulenderivatisierung)	414 nm, 734 nm

Tab. 4.7 (Fortsetzung) LC-onlineTEAC-Geräteparameter (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) zur Bestimmung der antioxidativen Kapazitäten der einzelnen phenolischen Inhaltsstoffe.

LC-onlineTEAC-Geräteparameter (Methanol/Ammoniak-SPE-Eluat)	Einstellung
Flussrate	0,7 mL/min
Injektionsvolumen	10 µL
Vorsäule	C18; 4×3,00 mm (Phenomenex Ltd, Aschaffenburg)
Säule	Luna [®] ; Phenylhexyl 5 µm 100 Å; 250×4,60 mm (Phenomenex Ltd, Aschaffenburg)
Säulentemperatur	21 °C (Raumtemperatur)
Wellenlängen Detektion (positive Peaks)	280 nm, 325 nm, 350 nm, 365 nm
Scanbereich	200-450 nm
Flussrate ABTS ^{•+} -Lösung	0,7 mL/min
Länge Reaktionskapillare	5 m
Innendurchmesser Reaktionskapillare	0,25 mm
Temperatur Reaktionskapillare	40 °C
Wellenlängen Detektion (negative Peaks Nachsäulenderivatisierung)	414 nm, 734 nm

Tab. 4.8 LC-onlineTEAC-Gradient (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) zur Trennung phenolischer Substanzen aus dem methanolischem SPE-Eluat. Eluent A: Wasser/Ameisensäure (99,9:0,1 v/v); Eluent B: Acetonitril/Ameisensäure (99,9:0,1 v/v).

Laufzeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0-5	90 (isokratisch)	10 (isokratisch)
5-10	90-85	10-15
10-30	85 (isokratisch)	15 (isokratisch)
30-40	85-80	15-20
40-60	80-45	20-55
60-65	45-5	55-95
65-70	5 (isokratisch)	95 (isokratisch)
70-75	5-90	95-10
75-85	90 (isokratisch)	10 (isokratisch)

Abschließend wurde die relative TEAC (antioxidative Kapazität ohne Berücksichtigung der Substanzkonzentration in der Probe) anhand der im Anhang A3.3 dargestellten Gleichung für die identifizierten phenolischen Substanzen und die absolute TEAC (antioxidative

Kapazität unter Berücksichtigung der Substanzkonzentration in der Probe) nach Anhang A.3.4 für die quantifizierten Inhaltsstoffe als Troloxäquivalente (TE) berechnet.

4.6 Isolierung phenolischer Substanzen mittels präparativer LC-DAD

Zur Isolierung phenolischer Substanzen aus *C. incanus* Tee erfolgte zunächst eine Probenaufarbeitung von Probe A (vgl. Tabelle 4.1). Um hohe Substanzausbeuten effizient zu erreichen, wurden statt einer Einwaage von ca. 0,7 g Teekraut (analytische Messungen), 1,5 g Teekraut für die Isolierung der phenolischen Inhaltsstoffe mittels präparativer LC-DAD eingewogen und analog der unter Kapitel 4.2 beschriebenen Probenaufarbeitung behandelt. Für höhere Extraktkonzentrationen wurden neben der geänderten Teekrauteinwaage die trockenen Rückstände der SPE-Eluate in 1,5 mL Methanol/Wasser (70:30 v/v) (statt in 2 mL für die analytischen Messungen) aufgenommen. Das Injektionsvolumen des aufkonzentrierten Extraktes innerhalb der präparativen LC-DAD betrug jeweils 1 mL. Für die Isolierung der phenolischen Substanzen aus dem methanolischen SPE-Eluat wurde auf Basis der zuvor beschriebenen analytischen LC-DAD-Methode ein *Up-scaling* auf das in Tabelle 4.9 dargestellte präparative LC-DAD-System mit Fraktionssammler durchgeführt.

Tab. 4.9 Geräteparameter für die Isolierung phenolischer Substanzen aus *C. incanus* Tee mittels präparativer LC-DAD.

Geräteparameter präparative LC-DAD	Einstellung
Flussrate	24,1 mL/min
Injektionsvolumen	1 mL
Vorsäule	Nucleodur [®] ; C18 HTec ; 10x16 mm (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren)
Säule	Nucleodur [®] ; C18 HTec, 5 µm; 250x21 mm (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren)
Säulentemperatur	21 °C (Raumtemperatur)
Wellenlängen Detektion	280 nm, 325 nm, 350 nm, 365 nm
Scanbereich	190-640 nm
Fraktionssammler	Festlegung der Zeitfenster anhand Retentionszeiten und Peakbreiten der zu isolierenden Substanzen

Die Zusammensetzung der Eluenten wurde aus der analytischen LC-DAD-Methode beibehalten. Weiterhin wurde der in Tabelle 4.10 dargestellte Gradient eingesetzt.

Tab. 4.10 Präparativer LC-DAD-Gradient zur Isolierung phenolischer Substanzen aus dem methanolischem SPE-Eluat. Eluent A: Wasser/Ameisensäure (99,9:0,1 v/v); Eluent B: Acetonitril/Ameisensäure (99,9:0,1 v/v).

Laufzeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0-4	95 (isokratisch)	5 (isokratisch)
4-12	95-90	5-10
12-40	90-83	10-17
40-50	83 (isokratisch)	17 (isokratisch)
50-80	83-72	17-28
80-100	72-5	28-95
100-105	5 (isokratisch)	95 (isokratisch)
105-106	5-95	95-5
106-120	90 (isokratisch)	10 (isokratisch)

Die gesammelten Fraktionen der einzelnen Inhaltsstoffe wurden anschließend mittels Rotationsverdampfer bei 40 °C und 25 mbar von den Eluenten befreit und auf ein Endvolumen von ca. 40 mL reduziert. Die wässrige Lösung wurde im Anschluss lyophilisiert. Die Reinheit der resultierenden Feststoffe wurde mittels LC-DAD-ESI-MS/MS überprüft und als chromatographische Reinheit bei einer Wellenlänge von 280 nm angegeben. Hierzu wurde das prozentuale Verhältnis der Peakfläche der isolierten Substanz an der Gesamtpeakfläche berechnet.

4.7 Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes mittels *Folin-Ciocalteu*-Assay

Für die Bestimmung der Gesamtphenolgehalte in den *C. incanus* Probenextrakten mittels FC-Assay wurde zunächst eine Kalibrierreihe für Gallussäure hergestellt. Hierzu wurden 10 mg Gallussäure in 10 mL Wasser gelöst. Aus dieser Stammlösung mit einer Gallussäurekonzentration von 1 mg/mL wurde dann eine Kalibrierreihe bestehend aus zwölf äquidistanten Standardkonzentrationen von 15-180 mg/L erstellt (vgl. Tabelle A4.2). Als Blindwert diente Millipore®-Wasser. Die Proben wurden je nach Konzentration phenolischer Inhaltsstoffe mit Wasser verdünnt. Von den Standards der Kalibrierreihe, dem Blindwert sowie den verdünnten Proben wurden jeweils 20 µL in die *well*s einer 96-*well*-Mikrotiterplatte pipettiert und mit 100 µL *Folin-Ciocalteu*-Reagenz (1:10 v/v verdünnt mit Wasser) sowie 75 µL Natriumcarbonatlösung (7,5 % w/v nach ZIETZ *et al.* 2010) versetzt. Nach 2 h Inkubation im Dunkeln wurde die Extinktion der Lösungen bei 740 nm gemessen (AL-DUAIS *et al.* 2009). Die Berechnung des Gesamtphenolgehaltes erfolgte als Gallussäureäquivalente (GE) und ist im Anhang unter A3.5 dargestellt.

4.8 Bestimmung des Tanningehaltes mittels Methylcellulose-Präzipitations-Assay

Für die Quantifizierung der in den Probenextrakten enthaltenen Tannine mittels MCP-Assay wurde eine Epicatechinkalibrierung durchgeführt. Hierzu wurden 99,7 mg Epicatechin in 5 mL Methanol gelöst. Aus dieser 20 mg/mL Stammlösung wurde eine Kalibrierreihe, bestehend aus neun äquidistanten Standardkonzentrationen von 25-224 mg/L hergestellt (vgl. Tabelle A4.3). Jede Standardkonzentration wurde einmal als Blindwert mit Wasser und einmal mit Methylcellulose hergestellt. Zur Herstellung der benötigten Methylcelluloselösung (0,04 %) wurden 200 mg Methylcellulose mit 300 mL 80 °C warmen Wassers versetzt und 1 h gerührt. Nach 15 min Behandlung im Ultraschallbad wurde für weitere 14 h gerührt und anschließend mit Wasser auf 500 mL Endvolumen aufgefüllt. Die zu analysierenden Probenextrakte wurden je nach Konzentration mit Wasser entsprechend verdünnt. Von diesen Lösungen wurden je zweimal 25 µL abgenommen. Ein Ansatz wurde zur Fällung der Tannine mit 300 µL Methylcelluloselösung versetzt (AP: Arbeitsprobe). Der andere Ansatz wurde als Kontrollprobe (KP) mit 300 µL Wasser versetzt. Die nachfolgend beschriebenen Schritte erfolgten für beide Ansätze analog. Nach 2 min Standzeit wurden 200 µL gesättigte Ammoniumsulfatlösung zugesetzt und das Volumen mit Wasser auf 1 mL aufgefüllt. Nach weiteren 10 min Standzeit wurden die Probenextrakte für 10 min bei 20000×g zentrifugiert. Vom resultierenden Überstand wurden anschließend 300 µL in die *well*s einer 96-*well*-Mikrotiterplatte gegeben und die Absorptionen bei 280 nm mittels Plattenlesegerät gemessen (MERCURIO *et al.* 2007). Die Aufarbeitung der Kalibrierreihe erfolgte ohne Kontrollprobe analog der zuvor beschriebenen Methode. Abschließend wurde der Tanningehalt aus der linearen Regression der Epicatechinkalibriergeraden und der Differenz der Absorptionen von Arbeits- und Blindprobe als Epicatechinäquivalente (EE) berechnet. Die Berechnung ist im Anhang A3.6 dargestellt.

4.9 Bestimmung der gesamten antioxidativen Kapazität mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

Die antioxidative Kapazität verschiedener *C. incanus* Probenextrakte wurde in der vorliegenden Arbeit mittels ESR-Spektroskopie unter Verwendung des Radikals Kaliumnitrosodisulfonat (Fremy's Salz) ermittelt (ZIETZ *et al.* 2010). Hierzu wurden zunächst 26,8 mg des Radikals in 10 mL Dinatriumhydrogenphosphatpuffer (0,05 mol/L, pH 7,4 bei 20 °C) gelöst und für die Messungen 1:10 v/v mit dem zuvor beschriebenen Puffer verdünnt. Dies entspricht einer finalen Radikalkonzentration von 1 mmol/L. Die zu

vermessenden Probenextrakte (Probenaufarbeitung analog zu Kapitel 4.2, jedoch ohne Spritzenfiltration der Extrakte) wurden je nach Konzentration mit Dinatriumhydrogenphosphatpuffer verdünnt. Für die ESR-Messung wurden anschließend 100 µL der verdünnten Probenextrakte mit 100 µL verdünnter Radikallösung versetzt, mittels Vortexer gründlich durchmischt und gegen den reinen Puffer (Blindwert) vermessen. Die verwendeten ESR-Geräteparameter nach BUCHNER *et al.* (2006) sind in Tabelle 4.11 dargestellt. Die Intensität des Magnetfeldes wurde zu Beginn der Kinetik und nach 30 min gemessen. Hieraus wurde abschließend die Abnahme der Feldintensität bezogen auf den zuvor gemessenen Blindwert ermittelt. Die Berechnung der antioxidativen Kapazität basierend auf der Abnahme der Signalintensität ist im Anhang A3.7 beschrieben.

Tab. 4.11 Geräteparameter zur Messung der gesamten antioxidativen Kapazitäten von *C. incanus* Tee mittels ESR-Spektroskopie (Elektronenspinresonanz-Spektroskopie).

ESR-Geräteparameter	Einstellung
Magnetfeldstärke	3350 G
Sweep	69 G
Sweepzeit	15 s
Modulation	1500 mG
Mikrowellen Attenuation	10 dB
Verstärkungsfaktor	6
Phase	180 °

4.10 Bestimmung des Lignin-, Holzzucker- und Cellulosegehaltes

Für die Bestimmung des Lignin-, Holzzucker- und Cellulosegehaltes der *C. incanus* Proben wurde das innerhalb der zuvor beschriebenen Probenaufarbeitung mazerierte Teekraut für ca. 72 h bei Raumtemperatur klimatisiert. Nach Bestimmung des Trockengewichtes wurde je Probe 0,5 g in eine ASE-Extraktionshülse (*Accelerated Solvent Extraction*) eingewogen. Es erfolgten zwei Extraktionsdurchgänge je 10 mL pro Lösungsmittel für 10 min bei 70 °C und 100 bar. Die folgenden Lösungsmittel wurden hierbei graduell nach ansteigender Polarität verwendet: Petrolether, Aceton/Wasser (9:1 v/v), Ethanol/Wasser (8:2 v/v) und Wasser.

Nach erneuter Klimatisierung für ca. 72 h bei Raumtemperatur wurden die ASE-Rückstände der Teekrautproben mittels Scheibenmühle fein vermahlen. Für die anschließende Prehydrolyse wurden 200 mg der gemahlenen Rückstände mit 2 mL

72 %iger Schwefelsäure versetzt und in einem Reaktionsgefäß unter mehrfachem Umrühren auf einem Thermostaten bei 30 °C für 1 h hydrolysiert. Durch Zugabe von 6 mL Wasser wurde die Reaktion gestoppt. Die Probe wurde anschließend für die Nachhydrolyse mit 50 mL Wasser in einen 100 mL Messkolben überführt und bei 120 °C und 1,2 bar für 30 min im Autoklaven hydrolysiert. Nach Abkühlung der Probe wurde der Kolben mit Wasser auf die Marke aufgefüllt, vorsichtig geschüttelt und über einen G4-Glasfilter abfiltriert. Im Anschluss wurde der Hydrolysenrückstand mit Wasser säurefrei gewaschen und bei 105 °C getrocknet. Abschließend wurde der Rückstand (*Klason*-Lignin) gewogen. Weiterhin wurden die Xylose- und Glucosegehalte der Hydrolysate mittels Boratkomplex-Anionenaustauschchromatographie nach der Methode von WILLFÖR *et al.* (2009) bestimmt.

Zur Absicherung der Ergebnisse wurde zusätzlich ein Test auf Stärke durchgeführt, um zu beurteilen, ob die enthaltene Glucose auf die Hydrolyse von Holzzuckern, wie z.B. Cellulosen und Hemicellulosen, oder aber auf die Hydrolyse von Stärke zurückzuführen ist. Für den Stärketest wurde zunächst das klimatisierte *C. incanus* Teekraut mittels Scheibenmühle feingemahlen. Anschließend wurden 200 mg in einen 25 mL Messkolben eingewogen und 20 mL Methanol/Wasser (3:1 v/v) zugegeben. Die Lösung wurde daraufhin geschüttelt, für ca. 15 h inkubiert und über einen G4-Glasfilter abfiltriert. Die Extraktionsrückstände wurden daraufhin mit 20 mL Methanol/Wasser (3:1 v/v) gewaschen und für ca. 5 d bei Raumtemperatur klimatisiert. Anschließend wurden je 25 mg der Rückstände bei 45 °C für 24 h mit 0,75 mL Enzymlösung (0,05 % Amylase und 0,05 % Amyloglucosidase in 0,1 M Ammoniumacetat Puffer pH 4,7) inkubiert. Nach Filtration der Lösungen wurde erneut der Glucosegehalt mittels Boratkomplex-Anionenaustauschchromatographie nach der Methode von WILLFÖR *et al.* (2009) bestimmt.

Der Cellulosegehalt der Probe wurde abschließend aus dem Glucosegehalt der Probe abzüglich dem aus der Stärkehydrolyse resultierendem Glucosegehalt (1 %) sowie abzüglich der Gewichtszunahme durch die Wasseranlagerung während der Hydrolyse (10 %) berechnet.

4.11 Versuche zur Untersuchung der Stabilitäten phenolischer Substanzen in *C. incanus* innerhalb des Prozesses der Teezubereitung

4.11.1 Versuche zum Einfluss von Kochwasser, Kochtemperatur und Kochzeit auf die Konzentrationen phenolischer Substanzen in *C. incanus* Tee

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Kochwässer auf die Konzentrationen phenolischer Substanzen in *C. incanus* Tee wurde Probe A (vgl. Tabelle 4.1) mittels der in Kapitel 4.2 beschriebenen Methode für 60 min bei 95 °C extrahiert. Hierbei wurden neben dem beschriebenen Millipore®-Wasser (pH 5,8; Wasserhärte 0 °dH), Leitungswasser (Trinkwasserqualität, pH 7,2; Wasserhärte 6 °dH) und ein kommerziell erhältliches Mineralwasser (pH 7,6; Wasserhärte 20 °dH) als Kochwasser innerhalb der Probenaufarbeitung eingesetzt. Der pH-Wert der Kochwässer wurde mittels pH-Meter und die Wasserhärte mittels Aquadur®-Teststäbchen zur Bestimmung der Wasserhärte (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) gemessen. Für die pH-Wert Bestimmung des Millipore®-Wassers mittels pH-Meter wurde 10 g/L KCl zur Leitfähigkeitserhöhung für die Messung zugegeben. Die phenolischen Substanzen der Probenextrakte wurden anschließend mittels der unter Kapitel 4.3 und 4.4 beschriebenen Methoden analysiert.

Für die Untersuchung des Einflusses der Kochtemperatur auf die Konzentrationen bioaktiver phenolischer Substanzen wurde *C. incanus* Handelsprobe A bei Temperaturen von 70 °C, 85 °C und 95 °C für 5 min mit Millipore®-Wasser mittels der in Kapitel 4.2 beschriebenen Methode aufgearbeitet. Die phenolischen Substanzen der Probenextrakte wurden anschließend mittels der unter Kapitel 4.3 und 4.4 beschriebenen Methoden analysiert.

Um einen möglichen Effekt der Kochzeit auf die Konzentrationen phenolischer Substanzen in *C. incanus* Tee zu untersuchen, wurde Probe A für 5 min, 20 min und 60 min bei 95 °C mit Millipore®-Wasser mittels der in Kapitel 4.2 beschriebenen Methode extrahiert. Die phenolischen Substanzen der Probenextrakte wurden anschließend mittels der unter Kapitel 4.3 und 4.4 beschriebenen Methoden analysiert.

4.11.2 Softwarebasierte statistische Versuchsplanung zur Untersuchung möglicher Effekte der Teezubereitung auf die Konzentrationen phenolischer Inhaltsstoffe in *C. incanus* Tee

Zur weiteren Untersuchung möglicher Effekte von Faktoren der Teezubereitung auf die Konzentrationen bioaktiver phenolischer Substanzen in *C. incanus* Tee sowie der Berechnung statistischer Modelle zur Beschreibung zugrundeliegender Effekte wurden weitere Versuche mittels der Statistiksoftware Design-Expert 8.0.7.1. (STATCON, Witzenhausen) geplant. Hierfür wurden zunächst potentielle Einflussfaktoren auf die Konzentrationen phenolischer Substanzen in *C. incanus* Tee für die Untersuchungen festgelegt. Als Einflussfaktoren wurden Kochtemperatur, Kochzeit, pH-Wert des Kochwassers sowie das Teekraut-zu-Kochwasser-Verhältnis ausgewählt. Ebenso wurden die während des Zubereitungsprozesses möglicherweise vorliegende und in den Versuchen realisierbaren minimalen und maximalen Einstellungen für die Faktoren, beispielsweise minimale und maximale Kochtemperatur, definiert. Für die genannten Faktoren wurde durch die Software ein zweistufiger Vollfaktorenversuchsplan mit randomisierter Messreihenfolge erstellt. Innerhalb dieses Versuchsplanes waren die Faktoren jeweils auf minimaler und maximaler Faktoreinstellung sowie fünffach in mittlerer Faktoreinstellung (Zentralpunkte) enthalten. Ebenso wurden sämtliche Faktorkombinationen zur Ermittlung möglicher bestehender Wechselwirkungen zwischen den Faktoren in den Versuchsplan aufgenommen. Die Zentralpunkte dienten zur Überprüfung einer innerhalb des Modells vorausgesetzten Linearität zwischen Faktoreinstellung und Zielgröße sowie zur Berechnung der Standardabweichung. In Tabelle 4.12 ist der zuvor beschriebene zweistufige Vollfaktorenversuchsplan für die Einflussfaktoren Kochtemperatur, Kochzeit, pH-Wert des Kochwassers und Teekraut-zu-Kochwasser-Verhältnis mit randomisierter Messreihenfolge dargestellt. Als Zielgrößen wurden die Konzentrationen dieser Inhaltsstoffe mittels der unter Kapitel 4.3 und 4.4 beschriebenen Methoden doppelt vermessen.

Als Probenmaterial wurde die unter Kapitel 4.1 beschriebene Probe A verwendet. Die Aufarbeitung des Teekrautes erfolgte dabei unter Berücksichtigung der in Tabelle 4.12 beschriebenen Faktoreinstellungen analog der unter Kapitel 4.2 beschriebenen Probenaufarbeitung. Zur Einstellung des pH-Wertes der für den Versuchsplan benötigten Kochwässer wurde Millipore®-Wasser durch tropfenweise Zugabe von 0,1 mmol/L NaOH auf einen pH-Wert von 10,5 eingestellt. Analog hierzu wurde ein Kochwasser pH-Wert von 3,5 durch tropfenweise Zugabe von 0,1 mol/L HCl eingestellt. Als pH-neutrales Kochwasser wurde frisch filtriertes Millipore®-Wasser eingesetzt.

Tab. 4.12 Zweistufiger Vollfaktorenversuchsplan mit randomisierter Messreihenfolge zur Untersuchung des Einflusses der Faktoren Kochtemperatur, Kochzeit, Teekraut-zu-Kochwasser-Verhältnis und pH-Wert des Kochwassers auf die Konzentration phenolischer Inhaltsstoffe in *C. incanus* Tee. (ma): maximale Faktoreinstellung; (mi): minimale Faktoreinstellung; (ze): mittlere Faktoreinstellung (Zentralpunkt).

Standard Nr.	Messung Nr.	Kochtemperatur [°C]	Kochzeit [min]	Teekraut/ Kochwasser [g/45 mL]	pH-Wert Kochwasser
1	2	40,0 (mi)	5,0 (mi)	0,50 (mi)	3,5 (mi)
2	19	40,0 (mi)	5,0 (mi)	0,50 (mi)	10,5 (ma)
3	9	40,0 (mi)	5,0 (mi)	2,00 (ma)	3,5 (mi)
4	17	40,0 (mi)	5,0 (mi)	2,00 (ma)	10,5 (ma)
5	18	95,0 (ma)	5,0 (mi)	0,50 (mi)	3,5 (mi)
6	16	95,0 (ma)	5,0 (mi)	0,50 (mi)	10,5 (ma)
7	3	95,0 (ma)	5,0 (mi)	2,00 (ma)	3,5 (mi)
8	12	95,0 (ma)	5,0 (mi)	2,00 (ma)	10,5 (ma)
9	11	40,0 (mi)	60,0 (ma)	0,50 (mi)	3,5 (mi)
10	13	40,0 (mi)	60,0 (ma)	0,50 (mi)	10,5 (ma)
11	8	40,0 (mi)	60,0 (ma)	2,00 (ma)	3,5 (mi)
12	7	40,0 (mi)	60,0 (ma)	2,00 (ma)	10,5 (ma)
13	15	95,0 (ma)	60,0 (ma)	0,50 (mi)	3,5 (mi)
14	20	95,0 (ma)	60,0 (ma)	0,50 (mi)	10,5 (ma)
15	4	95,0 (ma)	60,0 (ma)	2,00 (ma)	3,5 (mi)
16	5	95,0 (ma)	60,0 (ma)	2,00 (ma)	10,5 (ma)
17	21	67,5 (ze)	32,5 (ze)	1,25 (ze)	7,0 (ze)
18	10	67,5 (ze)	32,5 (ze)	1,25 (ze)	7,0 (ze)
19	14	67,5 (ze)	32,5 (ze)	1,25 (ze)	7,0 (ze)
20	1	67,5 (ze)	32,5 (ze)	1,25 (ze)	7,0 (ze)
21	6	67,5 (ze)	32,5 (ze)	1,25 (ze)	7,0 (ze)

4.11.3 Modellversuch zur Untersuchung möglicher Einflussfaktoren aus der Teezubereitung auf die Stabilität von Catechin

Die Untersuchungen zu Einflussfaktoren der Teezubereitung auf die Catechininstabilität im Modellsystem wurden mittels softwaregestützter Versuchsplanung (Software: Design-Expert 8.0.7.1.; STATCON, Witzenhausen) unter Verwendung von Catechinstandardlösungen durchgeführt. Als Einflussfaktoren aus der Teezubereitung wurden der Kochwasser pH-Wert, die Kochtemperatur und die Catechinkonzentration untersucht. Hierzu wurde zunächst eine methanolische Catechinstammlösung mit einer Konzentration von 50 mg/mL hergestellt. Diese wurde dem Kochwasser in entsprechenden Volumina

zugesetzt, um die vorgesehenen Catechinkonzentrationen im Modell zu erreichen. Der pH-Wert des Kochwassers wurde durch tropfenweise Zugabe von 0,1 mmol/L HCl und 0,1 mmol/L NaOH zu Millipore®-Wasser eingestellt. Da für den pH-Wert von einem nichtlinearen Zusammenhang zwischen Faktor und Zielgröße ausgegangen wurde, wurde das zweistufige Vollfaktorenmodell auf ein *face-centered Central-Composite-Design* erweitert. Hierbei werden die Faktoren auf fünf Stufen variiert. Der Abstand der Sternpunkte zum Mittelpunkt des Modells beträgt $\alpha = 1$ (*face-centered*). Auch hier dienten die Zentralversuche zur Bestimmung der Standardabweichung. In Tabelle 4.13 ist der Versuchsplan mit randomisierter Messreihenfolge dargestellt.

Tab. 4.13 Versuchsplan *Central-Composite-Design (face-centered)* mit randomisierter Messreihenfolge zur Untersuchung des Einflusses der Faktoren Kochtemperatur, Kochzeit, Catechinkonzentration und Kochwasser pH-Wert auf die Zielgröße Catechinstabilität im Modellsystem. (ma): maximale Faktoreinstellung; (mi): minimale Faktoreinstellung; (ze): mittlere Faktoreinstellung, bzw. Zentralpunkt, falls Vorliegen dieser Einstellung bei allen vier Faktoren; (ra): randomisierte Faktoreinstellung.

Standard Nr.	Messung Nr.	Kochtemperatur [°C]	Kochzeit [min]	Catechin-konzentration [mg/mL]	pH-Wert Kochwasser
1	21	30,00 (mi)	2,00 (mi)	0,01 (mi)	3,00 (mi)
2	12	30,00 (mi)	2,00 (mi)	0,01 (mi)	11,00 (ma)
3	8	95,00 (ma)	2,00 (mi)	0,01 (mi)	3,00 (mi)
4	11	95,00 (ma)	2,00 (mi)	0,01 (mi)	11,00 (ma)
5	13	30,00 (mi)	60,00 (ma)	0,01 (mi)	3,00 (mi)
6	14	30,00 (mi)	60,00 (ma)	0,01 (mi)	11,00 (ma)
7	3	95,00 (ma)	60,00 (ma)	0,01 (mi)	3,00 (mi)
8	7	95,00 (ma)	60,00 (ma)	0,01 (mi)	11,00 (ma)
9	4	30,00 (mi)	2,00 (mi)	1,00 (ma)	3,00 (mi)
10	1	30,00 (mi)	2,00 (mi)	1,00 (ma)	11,00 (ma)
11	20	95,00 (ma)	2,00 (mi)	1,00 (ma)	3,00 (mi)
12	15	95,00 (ma)	2,00 (mi)	1,00 (ma)	11,00 (ma)
13	5	30,00 (mi)	60,00 (ma)	1,00 (ma)	3,00 (mi)
14	2	30,00 (mi)	60,00 (ma)	1,00 (ma)	11,00 (ma)
15	18	95,00 (ma)	60,00 (ma)	1,00 (ma)	3,00 (mi)
16	10	95,00 (ma)	60,00 (ma)	1,00 (ma)	11,00 (ma)
17	17	62,50 (ze)	31,00 (ze)	0,51 (ze)	7,00 (ze)
18	19	62,50 (ze)	31,00 (ze)	0,51 (ze)	7,00 (ze)
19	9	62,50 (ze)	31,00 (ze)	0,51 (ze)	7,00 (ze)
20	6	62,50 (ze)	31,00 (ze)	0,51 (ze)	7,00 (ze)
21	16	62,50 (ze)	31,00 (ze)	0,51 (ze)	7,00 (ze)

Tab. 4.13 (Fortsetzung) Versuchsplan *Central-Composite-Design (face-centered)* mit randomisierter Messreihenfolge zur Untersuchung des Einflusses der Faktoren Kochtemperatur, Kochzeit, Catechinkonzentration und Kochwasser pH-Wert auf die Zielgröße Catechinstabilität im Modellsystem. (ma): maximale Faktoreinstellung; (mi): minimale Faktoreinstellung; (ze): mittlere Faktoreinstellung, bzw. Zentralpunkt, falls Vorliegen dieser Einstellung bei allen vier Faktoren; (ra): randomisierte Faktoreinstellung.

Standard Nr.	Messung Nr.	Kochtemperatur [°C]	Kochzeit [min]	Catechin Konzentration [mg/mL]	pH-Wert Kochwasser
22	31	62,50 (ze)	31,00 (ze)	0,51 (ze)	3,00 (mi)
23	28	62,50 (ze)	31,00 (ze)	0,51 (ze)	11,00 (ma)
24	27	30,00 (mi)	31,00 (ze)	0,51 (ze)	7,00 (ze)
25	24	95,00 (ma)	31,00 (ze)	0,51 (ze)	7,00 (ze)
26	29	62,50 (ze)	2,00 (mi)	0,51 (ze)	7,00 (ze)
27	30	62,50 (ze)	60,00 (ma)	0,51 (ze)	7,00 (ze)
28	23	62,50 (ze)	31,00 (ze)	0,01 (mi)	7,00 (ze)
29	22	62,50 (ze)	31,00 (ze)	1,00 (ma)	7,00 (ze)
30	25	62,50 (ze)	31,00 (ze)	0,51 (ze)	7,00 (ze)
31	26	62,50 (ze)	31,00 (ze)	0,51 (ze)	7,00 (ze)
32	33	95,00 (ma)	2,00 (mi)	0,67 (ra)	5,67 (ra)
33	32	51,67 (ra)	40,67 (ra)	1,00 (ma)	3,00 (mi)
34	45	30,00 (mi)	2,00 (mi)	0,01 (mi)	7,00 (ze)
35	52	62,50 (ze)	2,00 (mi)	0,01 (mi)	11,00 (ma)
36	39	30,00 (mi)	31,00 (ze)	0,01 (mi)	3,00 (mi)
37	49	95,00 (ma)	31,00 (ze)	0,01 (mi)	3,00 (mi)
38	44	95,00 (ma)	31,00 (ze)	0,01 (mi)	11,00 (ma)
39	40	30,00 (mi)	60,00 (ma)	0,01 (mi)	7,00 (ze)
40	41	62,50 (ze)	60,00 (ma)	0,01 (mi)	3,00 (mi)
41	38	95,00 (ma)	60,00 (ma)	0,01 (mi)	7,00 (ze)
42	51	30,00 (mi)	40,67 (ra)	0,34 (ra)	11,00 (ma)
43	43	30,00 (mi)	2,00 (mi)	0,51 (ze)	3,00 (mi)
44	34	95,00 (ma)	2,00 (mi)	0,51 (ze)	11,00 (ma)
45	50	95,00 (ma)	60,00 (ma)	0,51 (ze)	3,00 (mi)
46	35	73,33 (ra)	60,00 (ma)	0,67 (ze)	11,00 (ma)
47	47	51,67 (ra)	2,00 (mi)	1,00 (ma)	8,33 (ra)
48	37	73,33 (ra)	2,00 (mi)	1,00 (ma)	3,00 (mi)
49	46	30,00 (mi)	21,33 (ra)	1,00 (ma)	11,00 (ma)
50	48	95,00 (ma)	31,00 (ze)	1,00 (ma)	3,00 (mi)
51	53	95,00 (ma)	40,67 (ra)	1,00 (ma)	8,33 (ra)
52	36	30,00 (mi)	60,00 (ma)	1,00 (ma)	7,00 (ze)
53	42	62,50 (ze)	60,00 (ma)	1,00 (ma)	11,00 (ma)

Die Stabilität wurde hierbei als relative Catechinkonzentration angegeben. Diese resultiert aus der Differenz zwischen der Ausgangskonzentration der Catechinmodelllösung und der Konzentration der Lösung nach Versuchsdurchführung. Die Versuche wurden in einem 2 mL Ansatz in Eppendorfgefäßen durchgeführt. Nach Lyophilisation und Wiederaufnahme in 1 mL Wasser des entsprechenden pH-Wertes (hochkonzentrierte Modelllösungen), bzw. 0,5 mL Wasser (niedrig konzentrierte Modelllösungen) wurden die Proben mittels der unter Kapitel 4.3 und 4.4 beschriebenen Methoden doppelt analysiert.

4.12 Tea Cream-Charakterisierung in *C. incanus* Tee

Für die Untersuchungen der *Tea Cream* in *C. incanus* Tee wurden zunächst ca. 5 g Probe C (vgl. Tabelle 4.1) für 5 min bei 95 °C in 100 mL kommerziell erhältlichem Mineralwasser (pH 7,6; Wasserhärte 20 °dH) in einem breiten Becherglas erhitzt und anschließend ca. 1 Woche bei 5 °C gelagert. Als Referenzprobe wurde Probe C parallel mit Millipore®-Wasser (pH 5,8; Wasserhärte 0 °dH) aufgearbeitet. Der resultierende Oberflächenfilm (*Tea Cream*) wurde vorsichtig unter Verwendung eines Uhrglases von der Teeoberfläche abgeschöpft. Der Tee (wässriger Überstand) wurde anschließend vorsichtig über dem Bodensatz (*Tea Cream*) entfernt. Das Präzipitat am Boden des Becherglases wurde nachfolgend mittels Pasteurpipette und Spatel in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt. Der abgeschöpfte Oberflächenfilm wurde mit 1 mL Wasser zunächst in eine Petrischale gespült und anschließend in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Um am Oberflächenfilm und Präzipitat anhaftende Teereste zu entfernen wurden diese mit drei mal 2 mL Millipore®-Wasser für 5 min bei 95 °C erhitzt und durchmischt. Nach erfolgter Abkühlung und erneuter Präzipitierung und Oberflächenfilmbildung wurden diese jeweils in ein Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurden je 50 µL Präzipitat und 50 µL Oberflächenfilm mit 450 µL Methanol/Wasser (70:30 v/v) versetzt und mittels Vortexer gründlich durchmischt. Aufgrund der äußerst geringen Löslichkeit des Präzipitates sowie des Oberflächenfilms wurden diese als Suspension ohne vorherige Spritzenfiltration für die Bestimmung der gesamten antioxidativen Kapazität mittels ESR-Spektroskopie (vgl. Kapitel 4.9) eingesetzt.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1. *Profiling* bioaktiver phenolischer Substanzen in *C. incanus* Tee

Unter *Profiling* bioaktiver phenolischer Substanzen werden in der vorliegenden Arbeit eine Identifizierung der in den Extrakten enthaltenen Substanzen sowie eine nachfolgende Quantifizierung der Hauptinhaltsstoffe verstanden. Anhand der daraus resultierenden spezifischen chromatographischen Fingerprints wurden die *C. incanus* Tees verglichen.

5.1.1 Identifizierung phenolischer Substanzen

C. incanus enthält eine Vielfalt phenolischer Inhaltsstoffe verschiedener Substanzklassen. Für die Identifizierung dieser Substanzen wurden die Teeextrakte zunächst mittels SPE aufgereinigt und hierdurch in ein methanolisches sowie ein Methanol/Ammoniak-Eluat vorfraktioniert. Im methanolischen Eluat wurden vorwiegend Flavanole und Flavonole detektiert. Das Methanol/Ammoniak-SPE-Eluat beinhaltete überwiegend Ellagsäure-derivate sowie Ellagitannine. Mittels LC-DAD-ESI-MS/MS wurden anhand der LC-DAD-Retentionszeiten, der UV-Spektren sowie der ESI-MS/MS-Fragmentierungsmuster insgesamt 32 phenolische Substanzen in den *C. incanus* Tees identifiziert. In Abbildung 5.1a-b sind exemplarisch für Probe E die LC-DAD-Chromatogramme der SPE-Eluate bei 280 nm dargestellt. Für die Identifizierung der Inhaltsstoffe wurden die Daten mit Messungen kommerziell erhältlicher Standardsubstanzen sowie nachfolgend angegebenen Literaturdaten verglichen. In Tabelle 5.1 sind die Retentionszeiten, UV-Absorptionsmaxima und MS/MS-Fragmente mit zugehörigen Signalintensitäten der im methanolischen SPE-Eluat identifizierten phenolischen Substanzen dargestellt. Die entsprechenden Daten zu den Verbindungen aus dem Methanol/Ammoniak-SPE-Eluat sind in Tabelle 5.2 aufgeführt. Anhand der verfügbaren Standardsubstanzen wurden die Phenolsäuren und -derivate Nr. 1 sowie Nr. 31-32, die monomeren und dimeren Flavanole Nr. 3, Nr. 5-6 sowie Nr. 8, die Myricetinglycoside Nr. 10 und Nr. 14, die Quercetinglycoside Nr. 13, Nr. 16 und Nr. 18 sowie die Kämpferolderivate Nr. 21-22 identifiziert. Anhand der durch diese Substanzen zur Verfügung stehenden Informationen zu den Fragmentierungsmustern der Flavonoidaglyca, der theoretischen LC-DAD-Elutionsreihenfolge sowie unter Berücksichtigung der Ergebnisse von SARACINI *et al.* (2005) und FERNÁNDEZ-ARROYO *et al.* (2009) wurden die Phenolsäuren und -derivate Nr. 23, Nr. 25 sowie Nr. 30, die Myricetinglycoside Nr. 9, Nr. 11-12 und Nr. 19 sowie die Quercetinglycoside Nr. 15, Nr. 17 und Nr. 20 identifiziert.

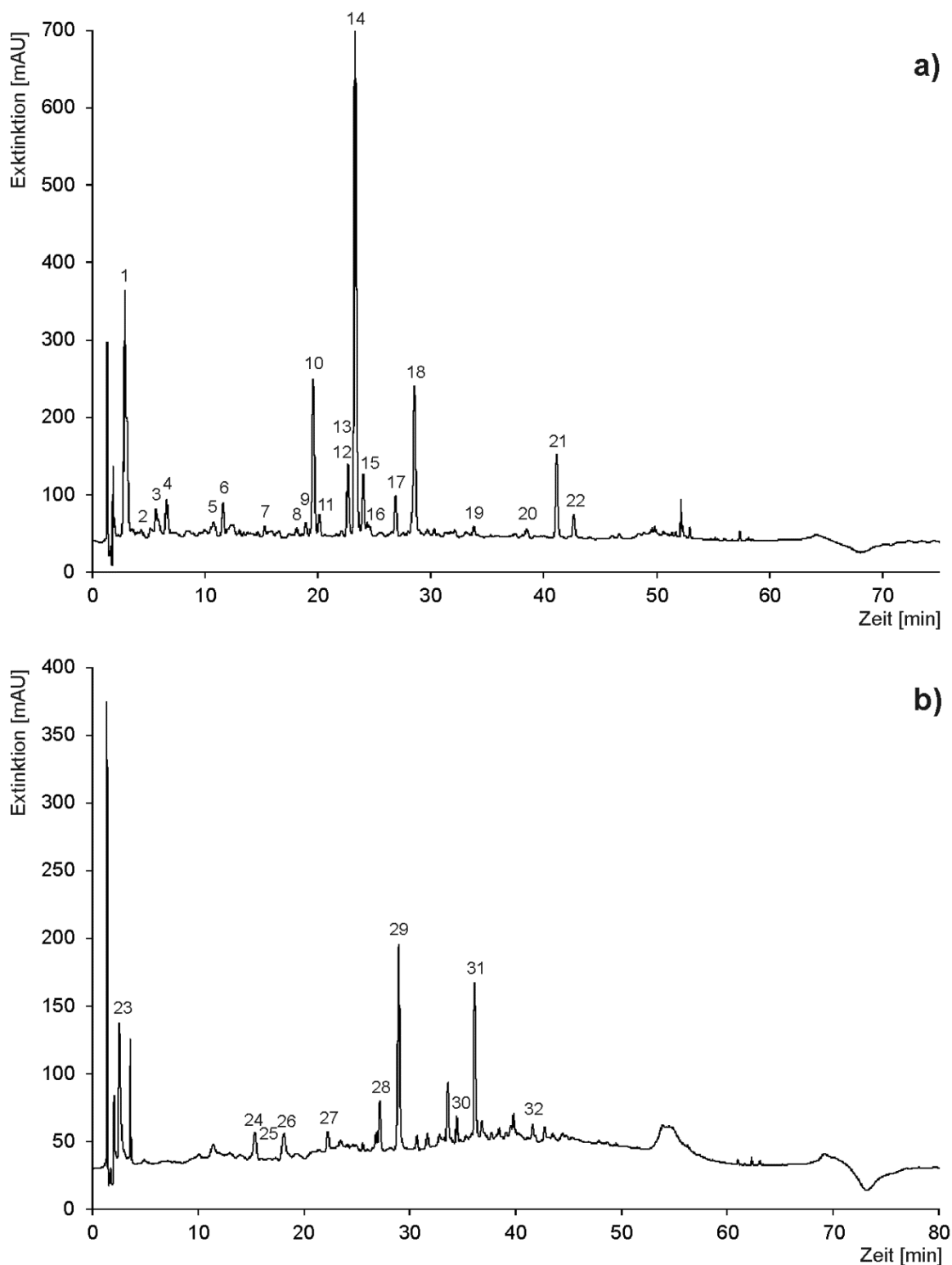


Abb. 5.1a-b LC-DAD-Chromatogramme der SPE-Eluate der Probe E bei 280 nm. a) methanolisches Eluat; b) Methanol/Ammoniak-Eluat. Die Bezeichnungen der 32 identifizierten Substanzen (Nr. 1-Nr. 32) sind in Tabelle 5.1 und 5.2 aufgeführt. Beschreibungen zur Probe sind in Tabelle 4.1 dargestellt.

Tab. 5.1 Identifizierte Substanzen in *C. incanus* Tee (methanolisches SPE-Eluat). Nr.: Peaknummer; [M-H]⁺: Quasimolekülon; R_t: LC-DAD-Retentionszeit; UV_{max}: UV-Absorptionsmaxima.

Nr.	Substanz	[M-H] ⁺ [m/z]	MS/MS-Fragmente (relative Intensität %)				R _t [min]	UV _{max} [nm]
1	Gallussäure	169	125 (100)				3,0	272
2	Gallocatechin-(4α-8)-gallocatechin oder Gallocatechin-(4α-6)-gallocatechin	609	591 (5)	483 (15)	441 (100)	423 (61)	305 (18)	271
3	Gallocatechin	305	287 (4)	261 (35)	221 (82)	219 (90)	179 (100)	269
4	Gallocatechin-(4α-8)-catechin oder Catechin-(4α-8)-gallocatechin	593	575 (3)	467 (10)	425 (100)	407 (28)	289 (14)	273
5	Procyanidin B ₁	577	559 (6)	451 (19)	425 (100)	407 (42)	289 (15)	272
6	Catechin	289	271 (3)	245 (100)	205 (38)	179 (14)		278
7	Vicenin-2	593	575 (5)	503 (27)	473 (100)	383 (22)	353 (46)	270; 333
8	Epigallocatechin-gallat	457	331 (67)	305 (23)	269 (6)	193 (8)	169 (100)	274
9	Myricetin-O-rhamnosid-O-hexosid	625	607 (21)	479 (2)	317 (100)	271 (14)	179 (4)	19,9
10	Myricetin-3-O-galactosid	479	461 (1)	317 (87)	316 (94)	271 (2)	179 (4)	20,4
11	Myricetin-3-O-glucosid	479	461 (3)	317 (94)	316 (98)	271 (1)	179 (4)	20,9
12	Myricetin-O-xylosid	449	431 (4)	317 (51)	316 (100)	271 (1)	179 (4)	23,2
13	Rutin	609	591 (3)	343 (4)	301 (100)	271 (3)	179 (3)	23,7
14	Myricitrin	463	445 (1)	317 (83)	316 (100)	179 (4)		23,8
15	Quercetin-3-O-galactosid	463	445 (1)	301 (100)	179 (3)			24,7
16	Quercetin-3-O-glucosid	463	445 (1)	301 (100)	179 (2)			25,3
17	Quercetin-O-xylosid	433	301 (100)	179 (2)				27,7
18	Quercitrin	447	429 (1)	301 (100)	179 (1)			29,4
19	Myricetin-O-rhamnosid-O-hexosid	625	607 (1)	479 (100)	317 (14)	271 (1)	179 (1)	35,0
20	Quercetin-O-rhamnosid-O-hexosid	609	463 (100)	301 (18)				38,3
21	<i>trans</i> -Tilirosid	593	447 (13)	307 (7)	285 (100)	257 (2)		42,3
22	<i>cis</i> -Tilirosid	593	447 (13)	307 (7)	285 (100)	257 (2)		43,6

Tab. 5.2 Identifizierte Substanzen in *C. incanus* Tee (Methanol/Ammoniak-SPE-Eluat). Nr.: Peaknummer; [M-H]⁺: Quasimolekülion; R_t: LC-DAD-Retentionszeit; UV_{max}: UV-Absorptionsmaxima.

Nr.	Substanz	[M-H] ⁺ [m/z]	MS/MS-Fragmente (relative Intensität %)					R _t [min]	UV _{max} [nm]			
23	Methylgallussäure	183	139	(100)				2,7	270			
24	Hydroxyferulasäure-5-O-rhamnosid	355	337	(20)	285	(14)	209	(24)	191	(100)	147	(4)
25	Uralenneosid	285	153	(100)	109	(6)						
26	Hydroxyferulasäure-4-O-rhamnosid	355	337	(14)	209	(24)	191	(100)	173	(3)	147	(2)
27	Hydroxyferuloyl-rhamnose	355	337	(17)	209	(22)	191	(100)	173	(3)	147	(3)
28	HHDP-Glucose (I1)	482	464	(3)	450	(33)	406	(3)	300	(100)	271	(5)
29	HHDP-Glucose (I2)	481	463	(20)	449	(100)	405	(16)	299	(54)	270	(7)
30	Ellagsäure-7-O-xylosid	433	301	(100)								
31	Ellagsäure	301	257	(11)	229	(7)	185	(1)				
32	Rosmarinsäure	359	223	(16)	197	(35)	179	(35)	161	(100)	135	(5)

HHDP-Glucose: Hexahydroxydiphenovl-glucose: I1 und I2: Isomer 1 und Isomer 2

HHDP-Glucose: Hexahydroxydiphenoyl-glucose; I1 und I2: Isomer 1 und Isomer 2

Weiterhin wurden in den *C. incanus* Extrakten Flavanoldimere im methanolischen SPE-Eluat identifiziert. So stellt Substanz Nr. 2 ein (Epi)gallocatechindimer mit $[M-H]^-$ m/z 609 und dem Fragmentation der (Epi)gallocatechinuntereinheit mit m/z 305 dar. Nach PETEREIT *et al.* (1991) werden für diese Substanz Gallocatechin-(4 α -8)-gallocatechin oder das Regioisomer Gallocatechin-(4 α -6)-gallocatechin als wahrscheinliche Strukturen vorgeschlagen. In Abbildung 5.2 ist exemplarisch das ESI-MS/MS-Spektrum des, bei der Retentionszeit von 3,7 min isolierten Quasimoleküls $[M-H]^-$ mit m/z 609 dargestellt.

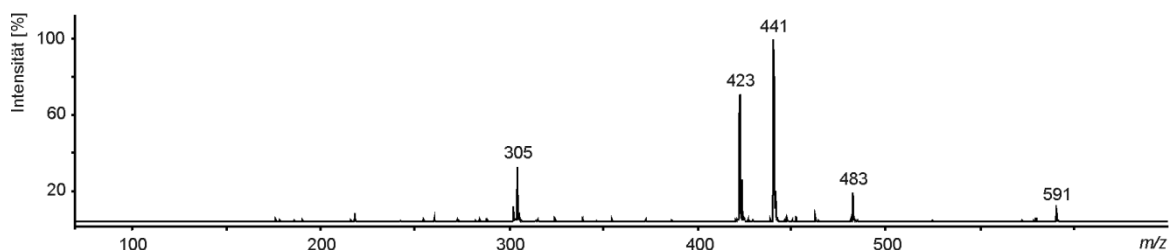


Abb. 5.2 ESI-MS/MS-Spektrum des Quasimoleküls $[M-H]^-$ von Gallocatechin-gallocatechin (Nr. 2) mit m/z 609. Analytische Daten zur Substanz vgl. Tabelle 5.1.

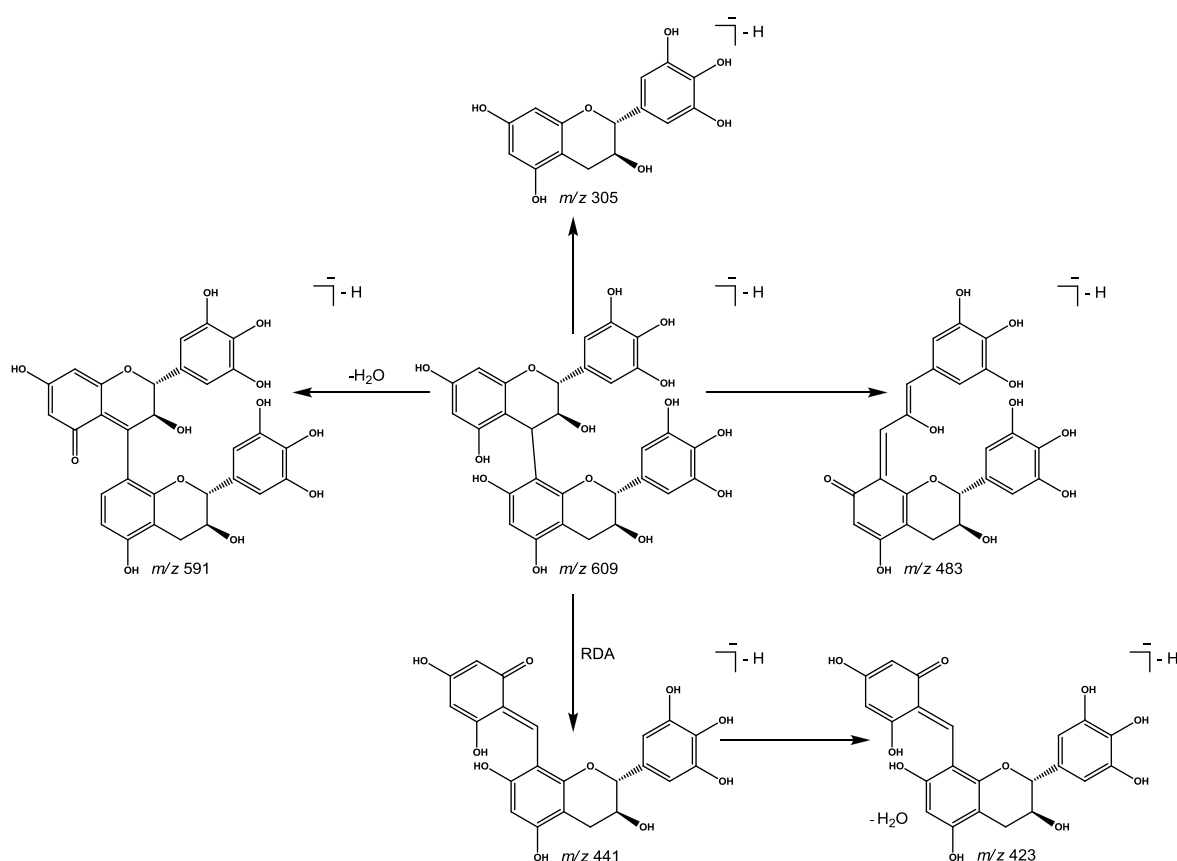


Abb. 5.3 Postulierte ESI-MS/MS-Fragmentierung des Quasimoleküls $[M-H]^-$ von Gallocatechin-gallocatechin (Nr. 2) mit m/z 609 modifiziert nach FRIEDRICH *et al.* (2000). Analytische Daten zur Substanz vgl. Tabelle 5.1. RDA: *Retro-Diels-Alder-Reaktion*.

Die postulierte MS/MS-Fragmentierung von $[M-H]^-$ zu den Produktionen mit m/z 591, m/z 483, m/z 441, m/z 423 und m/z 305 ist in Abbildung 5.3 skizziert. Aus einer *Retro-Diels-Alder*-Reaktion (RDA) entsteht hierbei das Hauptprodukt mit m/z 441. Aus diesem resultiert durch Wasserabspaltung das Fragment mit m/z 423. Analog hierzu entsteht aus dem Quasimolekülion das Fragment mit m/z 591. FRIEDRICH *et al.* (2000) zeigten diese Fragmentierung bereits für Proanthocyanidine. Ebenfalls handelt es sich auch bei Substanz Nr. 4 mit $[M-H]^-$ m/z 441 und dem zugehörigen Fragmention der Catechinuntereinheit mit m/z 289 um ein Flavanoldimer. Für diese Substanz werden nach PETEREIT *et al.* (1991) als Strukturen Gallocatechin-(4 α -8)-catechin oder Catechin-(4 α -8)-gallocatechin vorgeschlagen.

Die bei einer Retentionszeit von 16,8 min eluierende Substanz Nr. 8 mit $[M-H]^-$ m/z 593 wurde anhand des MS/MS-Fragmentierungsmusters sowie des mit Apigenin vergleichbaren UV-Absorptionsmaximums bei 333 nm als Vicenin-2 identifiziert. Abbildung 5.4 zeigt das zugehörige ESI-MS/MS-Spektrum des Quasimolekülions mit m/z 593. Bei dieser Substanz handelt es sich um das 6,8-Di-C-glucosid des Flavons Apigenin.

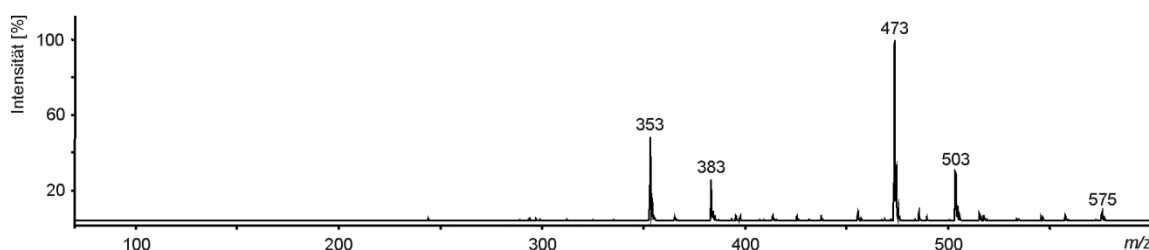


Abb. 5.4 ESI-MS/MS-Spektrum des Quasimolekülions $[M-H]^-$ von Vicenin-2 (Nr. 7) mit m/z 593. Analytische Daten zur Substanz vgl. Tabelle 5.1.

Das Fragmentierungsmuster dieser phenolischen Substanz mit den typischen Produktionen m/z 575, m/z 503, m/z 473, m/z 383 und m/z 353 ist nach SILVA *et al.* (2014) in Abbildung 5.5 dargestellt. Die Produktionen entstehen hierbei durch eine *Charge Remote Fragmentation* (CRF) der beiden Glucoseeinheiten. Dadurch kommt es zu den charakteristischen Masseverlusten von 120 Da und 90 Da. Vicenin-2 wurde in der Literatur bisher für *C. landanifer*, *C. monspeliensis* und *C. albidus* beschrieben (BARRAJÓN-CATALÁN *et al.* 2011, BARROS *et al.* 2013). In *C. incanus* Extrakten ist ein Vorkommen von Vicenin-2 bisher nicht bekannt. Innerhalb der menschlichen Ernährung ist diese eher seltene phenolische Substanz in Orangen bzw. in Konzentrationen von bis zu 80 mg/L in Orangensaft enthalten (GIL-IZQUIERDO *et al.* 2001).

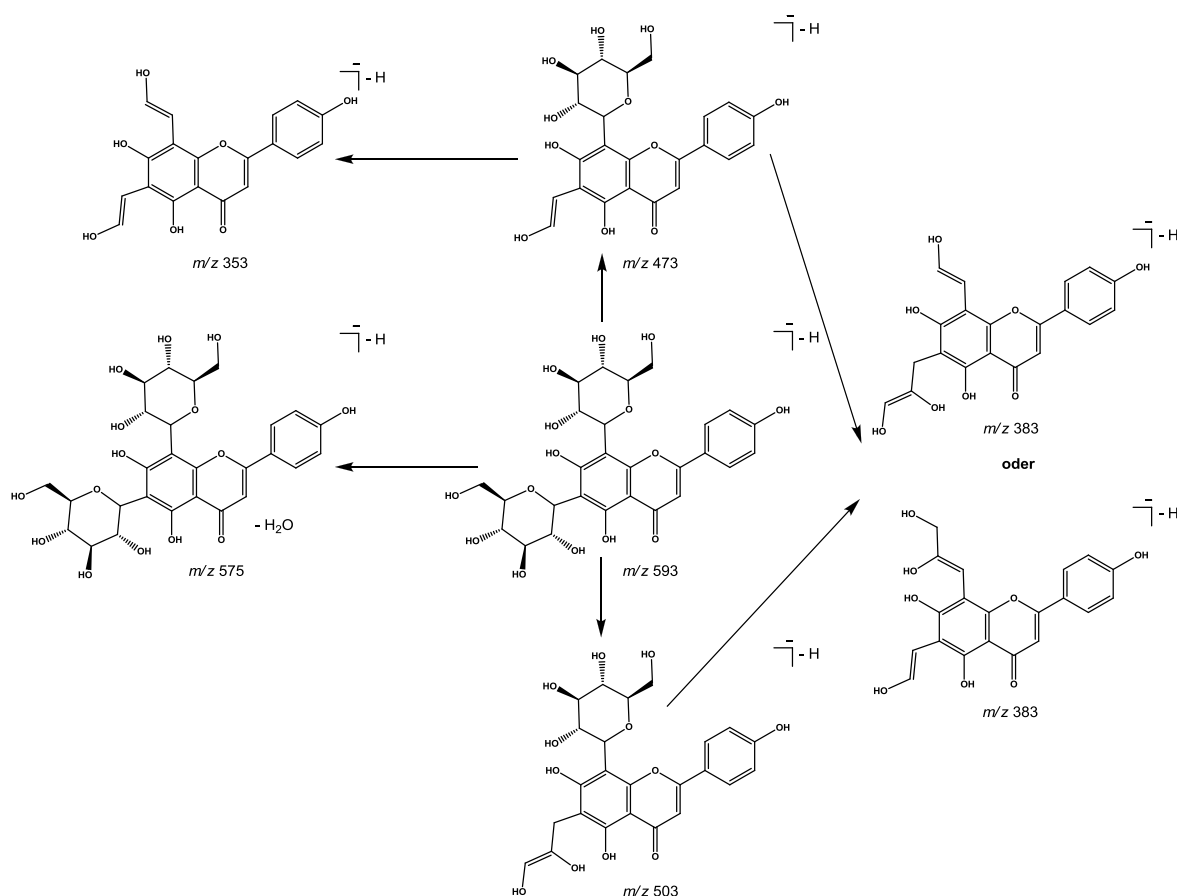


Abb. 5.5 Postulierte ESI-MS/MS-Fragmentierung des Quasimoleküls [M-H]⁻ von Vicenin-2 (Nr. 7) mit m/z 593 modifiziert nach SILVA *et al.* (2014). Analytische Daten zur Substanz vgl. Tabelle 5.1.

Weiterhin wurden in den Methanol/Ammoniak-SPE-Eluaten der *C. incanus* Extrakte drei Peaks mit m/z 355 bei Retentionszeiten von 16,9 min, 19,2 min und 22,8 min detektiert. Die UV-Spektren dieser Substanzen wiesen ein Absorptionsmaximum im Bereich von 310 nm auf und waren mit dem Spektrum der Standardsubstanz *trans*-Ferulasäure (UV_{max} 322 nm) vergleichbar. BARRAJÓN-CATALÁN *et al.* (2011) identifizierten darüber hinaus in *C. albidus* Extrakten Hydroxyferulasäure-O-rhamnosid mit [M-H]⁻ m/z 355. Basierend auf diesen Daten sowie auf den zugehörigen Polaritäten bzw. der Elutionsfolge wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals für *C. incanus* die Peaks Nr. 24, 26 und 27 als Hydroxyferulasäure-5-O-rhamnosid, Hydroxyferulasäure-4-O-rhamnosid und Hydroxyferuloyl-rhamnose identifiziert. In Abbildung 5.6 ist das ESI-MS/MS-Spektrum des Quasimoleküls [M-H]⁻ mit m/z 355 von Hydroxyferulasäure-5-O-rhamnosid (Substanz Nr. 24) dargestellt. Die hierzu postulierte MS/MS-Fragmentierung ist in Abbildung 5.7 skizziert. Hierbei resultiert durch Abspaltung von Wasser aus dem Quasimolekülion mit m/z 355 das Produktion mit m/z 337. Aus der Abspaltung der Rhamnoseinheit entstehen einerseits das Rhamnosylfragment mit m/z 147 sowie das reaktive Fragmention der

Hydroxyferulasäure mit m/z 209. Innerhalb der zuletzt genannten Struktur kommt es zwischen der Carboxylgruppe und des Kohlenstoffatoms an Position 6 des Benzolrings zum Ringschluss. Als Produkt entsteht das Hauptfragmentation mit m/z 191.

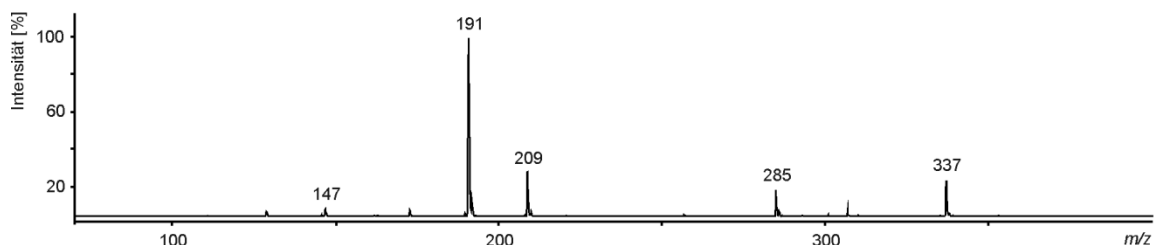


Abb. 5.6 ESI-MS/MS-Spektrum des Quasimoleküls $[M-H]^-$ von Hydroxyferulasäure-5-O-rhamnosid (Nr. 24) mit 355 m/z . Analytische Daten zur Substanz vgl. Tabelle 5.2.

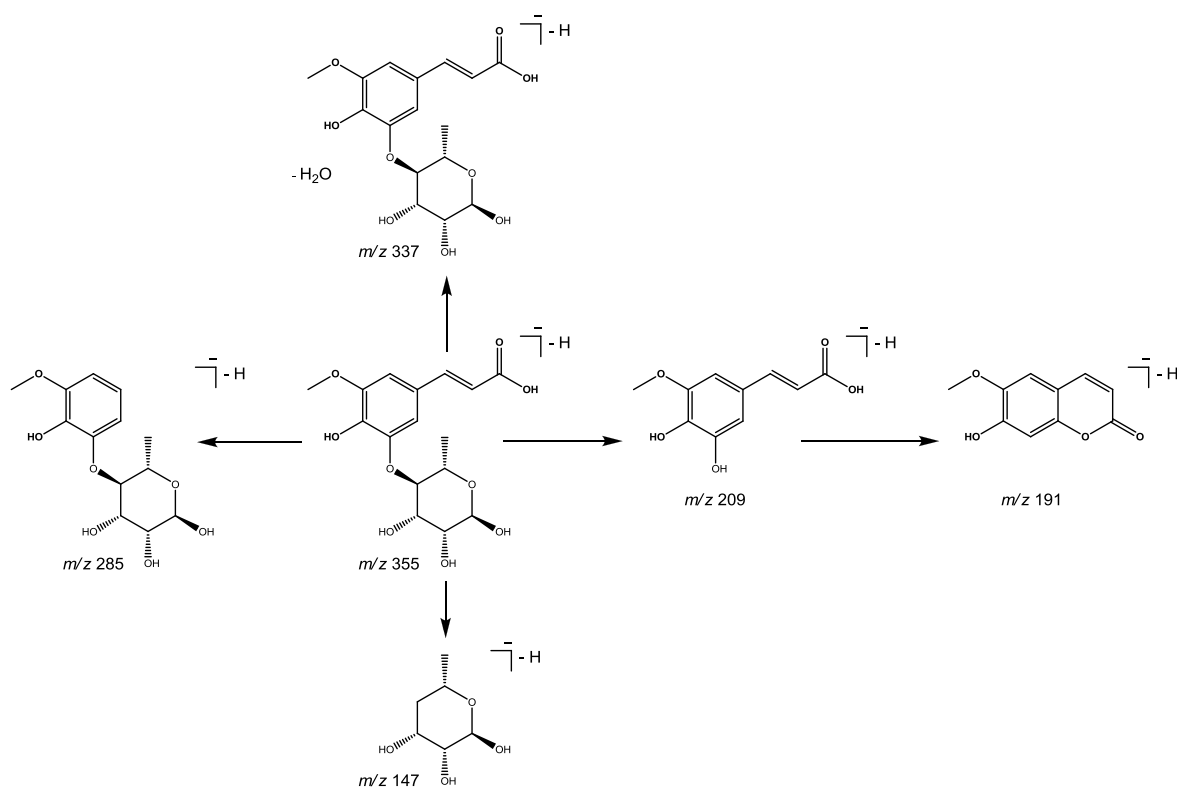


Abb. 5.7 Postulierte ESI-MS/MS-Fragmentierung des Quasimoleküls $[M-H]^-$ von Hydroxyferulasäure-5-O-rhamnosid (Nr. 24) mit m/z 355. Analytische Daten zur Substanz vgl. Tabelle 5.2.

Aus der Gruppe der Ellagitannine wurden in den analysierten Methanol/Ammoniak-SPE-Eluaten der *C. incanus* Tees bei den Retentionszeiten von 28,3 min und 30,1 min zwei Hexahydroxydiphenoyl-glucose (HHDP-Glucose) Isomere Nr. 28 und Nr. 29 identifiziert. Diese wiesen ein UV-Absorptionsmaximum bei 370 nm auf. Die UV-Spektren waren

zudem mit dem UV-Spektrum der Referenzsubstanz Ellagsäure ($UV_{\max}$ 367 nm) vergleichbar, was auf eine strukturelle Verwandtschaft hindeutete. Weiterhin wiesen die HHDP-Glucose Peaks mit $[M-H]^-$ m/z 482 und m/z 481 voneinander abweichende Masse-zu-Ladung-Verhältnisse auf. Nach FISCHER *et al.* (2011), die HHDP-Glucose in Granatapfel identifizierten, ist diese Abweichung um 1 Da auf das Vorliegen eines distonischen Radikals zurückzuführen. Diese beinhalten sowohl eine radikalische, als auch eine ionische Seite. Neben dem Quasimolekülion deutete somit auch das ebenfalls als $[M]^\bullet$ und $[M-H]^-$ vorliegenden Fragmentation der Ellagsäure mit m/z 300 und m/z 299 auf das Vorliegen von HHDP-Glucose hin. Aufgrund der unterschiedlichen LC-DAD-Retentionszeiten wurde daher von zwei Isomeren ausgegangen. Abbildung 5.8 zeigt das ESI-MS/MS-Spektrum des Quasimolekülions mit m/z 481 von HHDP-Glucose (Isomer2) (Substanz Nr. 29).

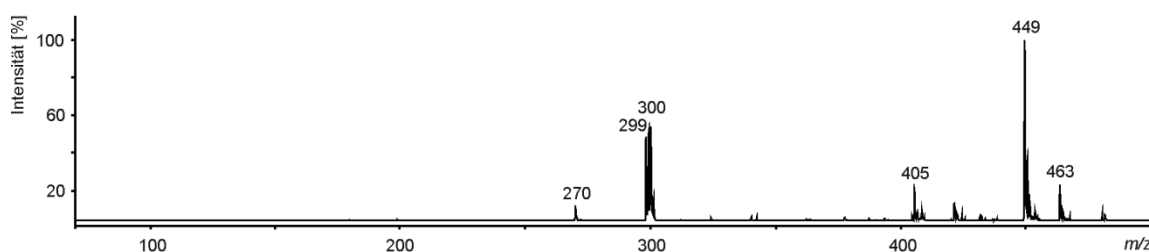


Abb. 5.8 ESI-MS/MS-Spektrum des Quasimolekülions $[M-H]^-$ von HHDP-Glucose Isomer 2 (Nr. 29) mit m/z 481. Analytische Daten zur Substanz vgl. Tabelle 5.2.

Die postulierte Fragmentierung von HHDP-Glucose ist exemplarisch für Substanz Nr. 29 in Abbildung 5.9 skizziert. Das Quasimolekülion $[M-H]^-$ mit m/z 481 fragmentiert dabei u.a. durch Wasserabspaltung zur Produktion mit m/z 463. Als distonisches Radikalion entsteht zudem, durch Abspaltung von Glucose, Achsenrotation der C-C-Bindung zwischen den zwei Gallussäureuntereinheiten und abschließender Veresterung der beiden Carboxylgruppen mit je einer der phenolischen Hydroxylgruppen, das distonische Radikalion der Ellagsäure mit m/z 300 bzw. das entsprechende $[M-H]^-$ mit m/z 299. BARRAJÓN-CATALÁN *et al.* (2011) detektierten HHDP-Glucose in insgesamt zehn *Cistus*-Arten, darunter auch *C. incanus*.

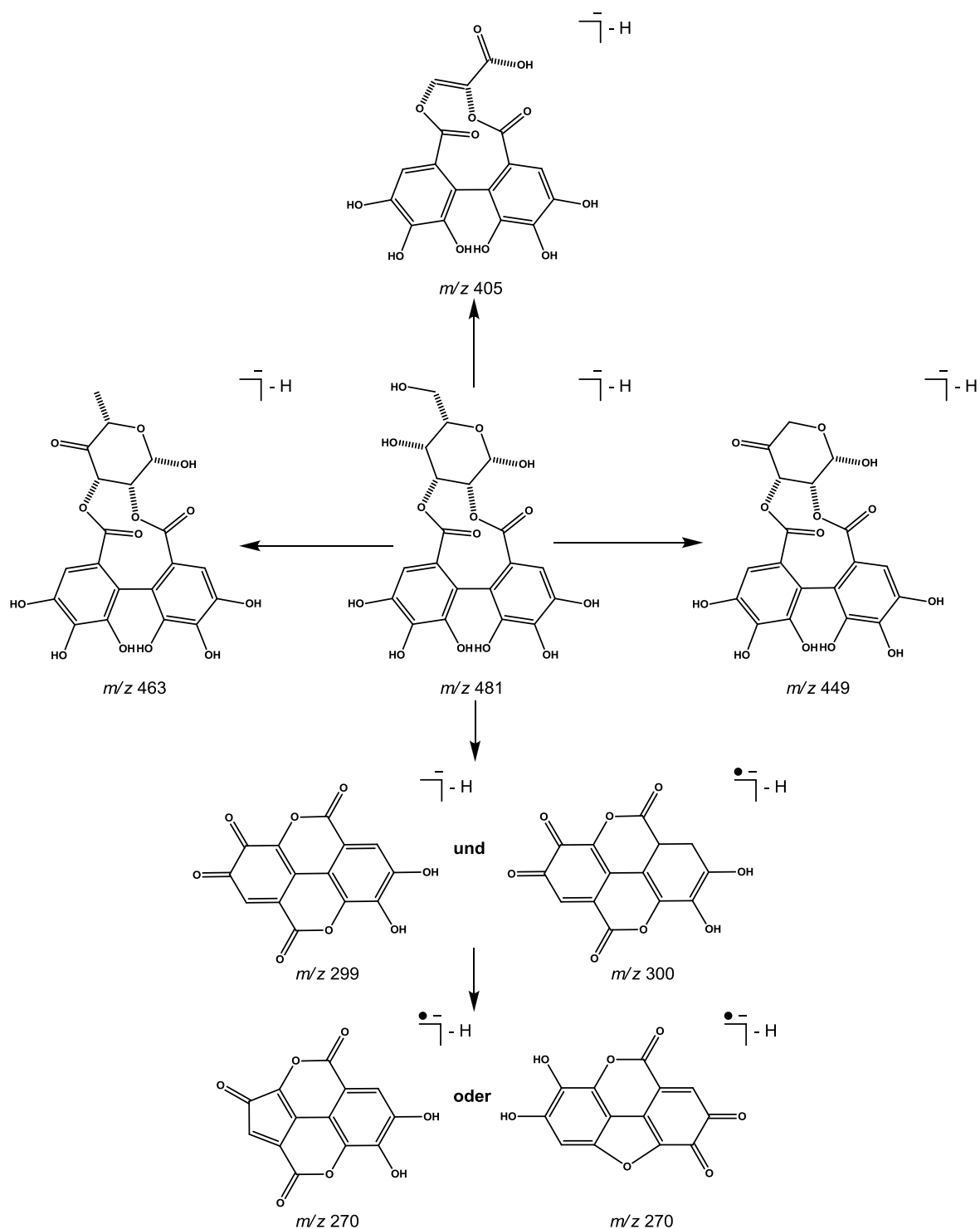


Abb. 5.9 Postulierte ESI-MS/MS-Fragmentierung des Quasimoleküls $[M-H]^-$ von HHDP-Glucose Isomer 2 (Nr. 29) mit m/z 481. Analytische Daten zur Substanz vgl. Tabelle 5.2.

Neben den 32 in den Handelsproben identifizierten Substanzen wurde in Probe B (*C. incanus* Tee mit 5 % Pfefferminzzusatz) bei der Retentionszeit von 21,7 min eine für *C. incanus* unbekannte phenolische Substanz detektiert. Für diesen Peak wurde ein UV-Absorptionsmaximum bei 280 nm, ein Quasimolekülion $[M-H]^-$ mit m/z 595 sowie ein MS/MS-Produktion mit m/z 287 detektiert. Diese Daten stimmen mit den von GUÉDON *et al.* (1994) und DOLZHENKO *et al.* (2010) beschriebenen UV-Absorptionsmaximum und MS/MS-Spektrum von Eriocitrin überein. Bei diesem phenolischen Hauptinhaltsstoff aus Pfefferminze (*Mentha×piperita* L.) handelt es sich um das 7-O-Rutinosid von Eriodictyol (5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavon). In Abbildung 5.10 ist das ESI-MS/MS-Spektrum des Quasimolekülions von Eriocitrin mit m/z 595 und des durch Abspaltung der Rutinose resultierenden Eriodictyolproduktions mit m/z 287 dargestellt.

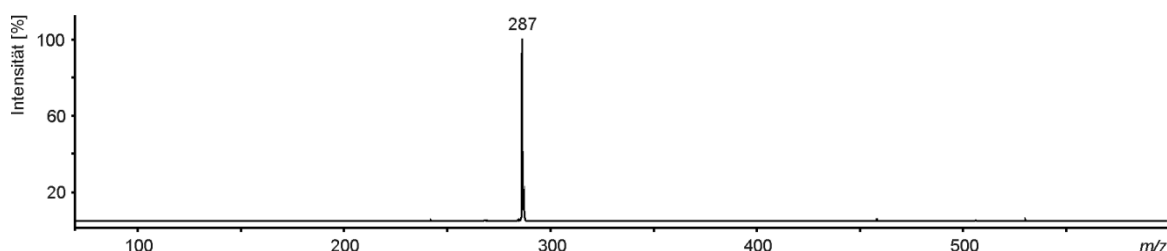


Abb. 5.10 ESI-MS/MS-Spektrum des in Probe B (*C. incanus* Kräutertee mit 5 % Pfefferminzzusatz) enthaltenen Eriocitrins, Quasimolekülion $[M-H]^-$ mit m/z 595.

Weiterhin wurde in Probe B eine große Peakfläche für Rosmarinsäure, (2R)-O-Caffeoyl-3-(3,4-dihydroxyphenyl)milchsäure, detektiert. Auch hierbei handelt es sich um eine phenolische Hauptsubstanz aus Pfefferminze. In den untersuchten *C. incanus* Tees wurde diese Substanz nur in geringen Konzentrationen in Probe E detektiert. Weiterhin sind nach GUÉDON *et al.* (1994) in Pfefferminze Eriocitrinkonzentrationen bis zu 15 g/100 g Trockenmasse und Rosmarinsäurekonzentrationen bis zu 4 g/100 g Trockenmasse enthalten. Abbildung 5.11 zeigt das LC-DAD-Chromatogramm des methanolischen SPE-Eluates aus Probe B mit Eriocitrinpeak (ER).

Anhand der genannten Rosmarinsäure sowie insbesondere durch Eriocitrin ist ein Pfefferminzzusatz von 5 % in *C. incanus* Tee anhand des abweichenden LC-DAD-Fingerprints der phenolischen Inhaltsstoffe analytisch nachweisbar. Eriocitrin könnte somit innerhalb von Authentizitäts- und Qualitätskontrollen von *C. incanus* Tees als ein analytischer Marker für einen Zusatz von Pfefferminze eingesetzt werden.

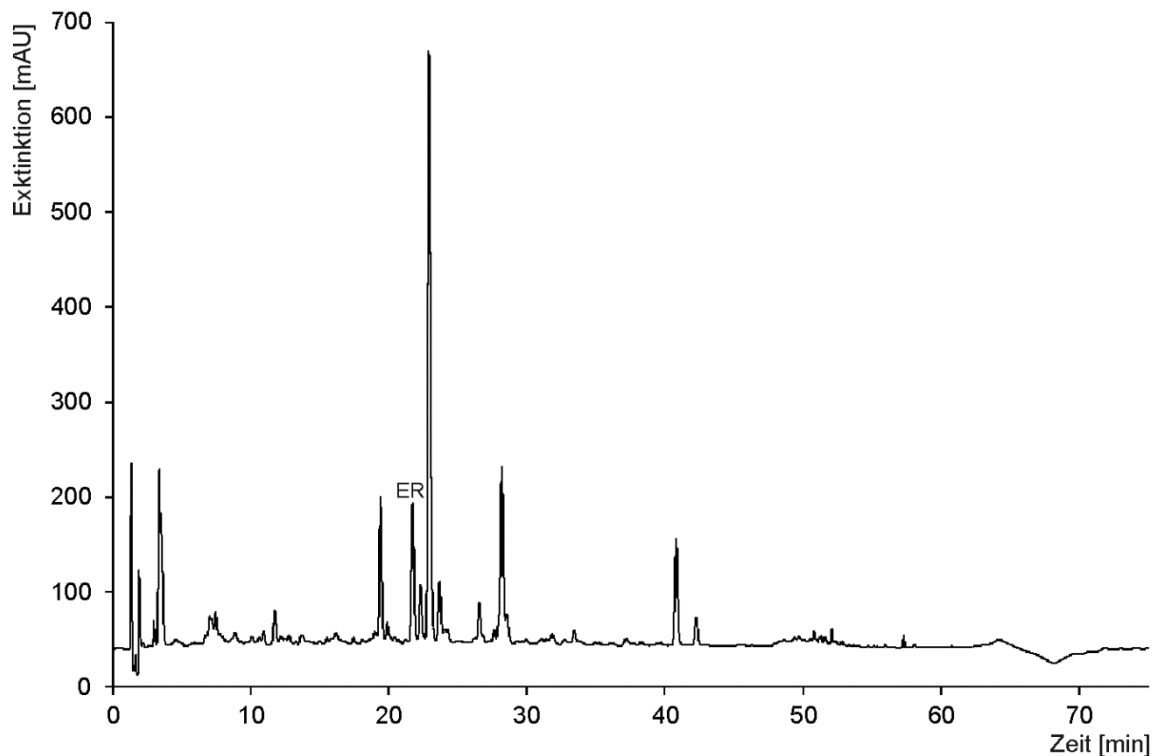


Abb. 5.11 LC-DAD-Chromatogramm des methanolischen SPE-Eluates der Probe B (*C. incanus* Tee mit 5 % Pfefferminzzusatz) bei 280 nm. ER: Eriocitrin (phenolische Substanz aus Pfefferminze).

5.1.2 Quantifizierung phenolischer Substanzen

Nach der Identifizierung der phenolischen Substanzen in den *C. incanus* Tee Handelsproben erfolgte die Quantifizierung der Hauptsubstanzen, um hierdurch mögliche signifikante Unterschiede zwischen den Tees festzustellen. Die Quantifizierung erfolgte hierzu mittels LC-DAD unter Verwendung kommerziell erhältlicher Standardsubstanzen. In Tabelle 5.3 sind die Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) der eingesetzten Standardsubstanzen dargestellt. Die Quantifizierung der identifizierten Substanzen mittels LC-DAD war somit je nach Substanz ab einem Konzentrationsbereich zwischen 3 µg/mL und 38 µg/mL möglich. Die entsprechenden Nachweisgrenzen lagen dabei zwischen 1 µg/mL und 15 µg/mL.

Tab. 5.3 Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) der Standardsubstanzen innerhalb der LC-DAD-Messungen.

Standardsubstanz	LOD [$\mu\text{g/mL}$]	LOQ [$\mu\text{g/mL}$]
Catechin	10	20
Ellagsäure	7	15
Ferulasäure	4	10
Gallocatechin	15	38
Gallussäure	1	3
Myricetin-3-O-galactosid	3	5
Myricitrin	2	5
Procyanidin B1	6	11
Quercitrin	1	3
Tilirosid	6	9

Insgesamt wurden in den sieben untersuchten *C. incanus* Tee Handelsproben 21 phenolische Substanzen quantifiziert. In Abbildung 5.12a-f sind die Konzentrationen dieser Inhaltsstoffe entlang sechs ausgewählter Substanzklassen, a) Phenolsäuren, b) monomere und dimere Flavanole, c) Myricetinglycoside, d) Quercetinglycoside, e) Tilirosidisomere und f) Ellagitannine dargestellt.

Innerhalb der Klasse der Phenolsäuren (Abb. 5.12a) wurden die höchsten Konzentrationen in den Proben E und F gemessen. Für die Summe der sechs quantifizierten Phenolsäuren, darunter Gallussäure (Nr. 1), Methylgallussäure (Nr. 23), Derivate der Hydroxyferulasäure (Nr. 24-27) sowie Ellagsäure (Nr. 31) wurden entsprechende Konzentrationen von 439,5 mg/100 g Teekraut und 423,7 mg/100 g Teekraut ermittelt. Der niedrigste Gesamtgehalt wurde mit 142,1 mg/100 g für Probe A gemessen. Es konnten somit Konzentrationsunterschiede um bis zu Faktor 3 zwischen den Handelsproben festgestellt werden. Probe E wies zudem mit 83,8 mg/100 g Teekraut eine über 3-fach höhere Gallussäurekonzentration auf als Probe A mit 26,4 mg/100 g Teekraut. Ein vergleichbarer signifikanter Unterschied zwischen den analysierten Handelsproben wurde für die Ellagsäurekonzentrationen festgestellt. Der höchste Gehalt wurde mit 93,9 mg/100 g in Probe G gemessen. Dieser Wert lag annähernd 5-fach über der Ellagsäurekonzentration von Probe A (19,8 mg/100 g Teekraut).

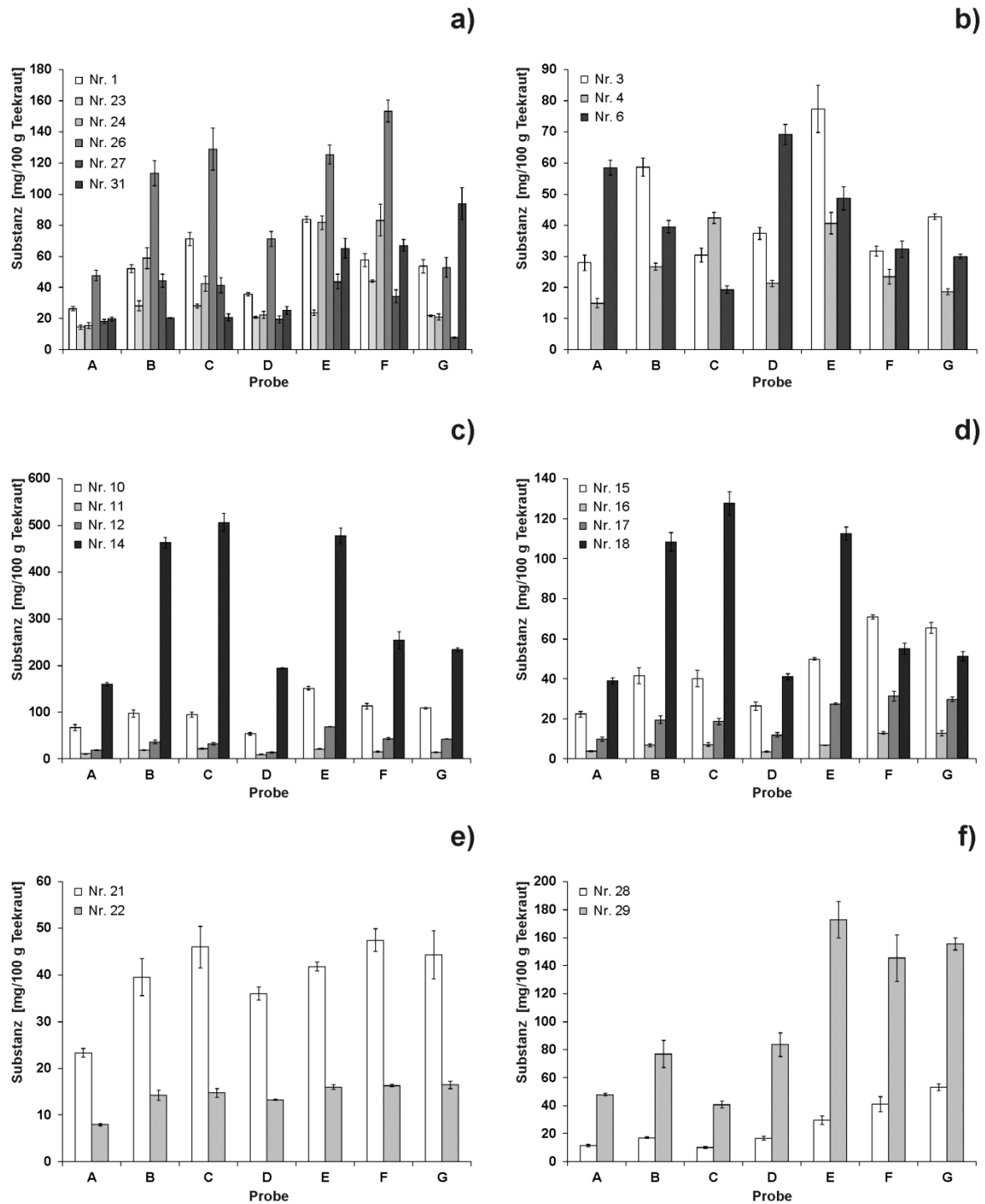


Abb. 5.12a-f Konzentrationen der 21 quantifizierten phenolischen Inhaltsstoffe in sieben *C. incanus* Tee Handelsproben. a) Phenolsäuren, b) monomere und dimere Flavanole, c) Myricetinglycoside, d) Quercetinglycoside, e) Tilirosidisomere und f) Ellagitannine. Teezubereitung vgl. Kapitel 4.2. Zugehörige Substanzbezeichnungen sind in Tabelle 5.1 sowie 5.2 und Beschreibungen der Proben in Tabelle 4.1 dargestellt.

Eine Erklärung für die hohen Phenolsäuregehalte in Probe E und F könnten möglicherweise deren, im Vergleich zu Probe A, hohe Blatt-, bzw. geringen Stängelanteile, sowie eine feine Partikelgröße des Teekrautes sein. Anhand von diesem Pflanzenmaterial wäre eine mögliche höhere Extrahierbarkeit aus kleinen Teekrautpartikeln bzw. ein überwiegendes Vorkommen phenolischer Substanzen in *C. incanus* Blättern denkbar. Diese These könnte auch durch die mit 194,3 mg/100 g Teekraut ebenfalls niedrige Konzentration der Phenolsäuren in Probe D gestützt werden. Das Teekraut dieser Probe wies analog zu Probe A ebenfalls einen hohen Stängelanteil zusammen mit einer groben Partikelgröße auf.

Auch in der Klasse der Flavanole (Abb. 5.12b) wurden die höchste Summe der Konzentrationen von Gallocatechin (Nr. 3), Gallocatechin-(4 α -8)-catechin bzw. Catechin-(4 α -8)-gallocatechin (Nr. 4) und Catechin (Nr. 6) mit 166,8 mg/100 g Teekraut in Probe E gemessen. Der niedrigste Gesamtgehalt der Flavanole wurde mit 87,4 mg/100 g Teekraut in Probe F gemessen. Somit wurden auch hier signifikante Abweichungen der Konzentrationen von annähernd 50 % zwischen den Handelsproben festgestellt. Mögliche Korrelationen zwischen dem Stängelanteil oder der Partikelgröße und der Konzentration der Flavanole konnten für diese Substanzklasse jedoch nicht bestätigt werden. Bezüglich der einzelnen Substanzen enthielt innerhalb der Klasse der Flavanole Probe D (hoher Stängelanteil und grobe, inhomogene Partikelgröße) mit 69,2 mg/100 g Teekraut die höchste Catechinkonzentration. Ebenso wurde in Probe A mit 58,4 mg/100 g Teekraut eine hohe Konzentration dieser Substanz gemessen. Diese Werte der Proben A und D deuten somit möglicherweise darauf hin, dass Catechin in den verholzten Stängeln von *C. incanus* enthalten ist und zudem aus diesen extrahiert wird. Bezüglich der Gallocatechinkonzentrationen enthielt Probe A dagegen mit 27,9 mg/100 g Teekraut die niedrigste Konzentration, während für Probe E mit 69,2 mg/100 g Teekraut ein annähernd 4-fach höherer Gehalt nachgewiesen wurde.

Bezüglich der Myricetinglycoside (Abb. 5.12c) wurden die höchste Gesamtkonzentration der Substanzen Myricetin-3-O-galactosid (Nr. 10), Myricetin-3-O-glucosid (Nr. 11), Myricetin-3-O-xylosid (Nr. 12) sowie Myricitrin (Nr. 14) mit 718,9 mg/100 g Teekraut in Probe E gemessen. Eine fast 3-fach geringere Konzentration enthielt mit 255,7 mg/100 g Probe A. Eine vergleichbar geringe Konzentration der Myricetinglycoside wurde mit 270,7 mg/100 g Teekraut in Probe D ermittelt. Mit Blick auf die Konzentrationen der einzelnen Vertreter dieser Substanzklasse wurde die höchste Myricitrinkonzentration mit 506,6 mg/100 g Teekraut in Probe C gemessen. Das *C. incanus* Teekraut dieser Handelsprobe wies ebenfalls einen hohen Blattanteil, bzw. geringen Stängelanteil, und

eine feine Partikelgröße des Teekrautes auf. Weiterhin stellte Myricitrin (Myricetin-3-O-rhamnosid) quantitativ betrachtet die phenolische Leitsubstanz in den untersuchten *C. incanus* Tees dar. Mit 159,6 mg/100 g Teekraut wurde die niedrigste Myricitrinkonzentration in Probe A detektiert. Die Spanne der gemessenen Gehalte variierte somit zwischen den Proben um über Faktor 3. Vergleichbare Konzentrationsunterschiede wurde auch für Myricetin-3-O-galactosid festgestellt. Hier lag die höchste Konzentration bei 151,3 mg/100 g Teekraut in Probe E und der niedrigste Gehalt bei 66,8 mg/100 g in Probe A. Insgesamt liegt also auch für die Myricetinglycoside möglicherweise ein Zusammenhang zwischen deren Konzentration im Tee und dem Blattanteil sowie der Partikelgröße des Teekrautes vor.

Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für die Quercetinglycoside (Abb. 5.12d) beobachtet. Der höchste Gesamtgehalt der Substanzen Quercetin-3-O-galactosid (Nr. 15), Quercetin-3-O-glucosid (Nr. 16), Quercetin-3-O-xylosid (Nr. 17) sowie Quercitrin (Nr. 18) wurde mit 196,8 mg/100 g Teekraut in Probe E gemessen. Analog zu den Ergebnissen der Myricetinglycoside wurde auch hier für Probe A mit 74,8 mg/100 g Teekraut eine um annähernd Faktor 3 niedrigere Konzentration der Quercetinglycoside bestimmt. Weiterhin enthielt auch Probe D mit 82,6 mg/100 g Teekraut einen geringen Anteil an Quercetinglycosiden. Unter den quantifizierten Einzelsubstanzen dieser Klasse stellte Quercitrin (Quercetin-3-O-rhamnosid) den Hauptinhaltsstoff dar. Die höchste Konzentration dieser Substanz wurde mit 127,8 mg/100 g Teekraut in Probe C gemessen. Die geringste Quercitrinkonzentration beinhaltete mit 38,9 mg/100 g Teekraut Probe A. Ebenfalls war Quercetin-3-O-galactosid in relativ hohen Konzentrationen in allen untersuchten Handelsproben enthalten. Der höchste Gehalt lag hier mit 70,9 mg/100 g Teekraut in Probe F vor. Die niedrigste Konzentration an Quercetin-3-O-galactosid wurde mit 22,4 mg/100 g Teekraut in Probe A bestimmt. Auch für diese Substanz wurden somit signifikante Unterschiede (größer Faktor 3) der Konzentrationen zwischen den analysierten Handelsproben ermittelt.

Der höchste Gesamtgehalt der Tilirosidisomere (Abb. 5.12e), *trans*- und *cis*-Tilirosid (Nr.21 und 22), wurde mit 63,8 mg/100 g Teekraut für Probe F bestimmt. Auch für diese Kämpferol-3-O-(6''-*trans*-*p*-coumaroyl)glucosid Isomere lagen die Konzentrationen in den Proben A und D mit 31,3 mg und 49,3 mg/100 g Teekraut im Vergleich deutlich niedriger. Für *trans*-Tilirosid wurde mit 47,4 mg/100 g Teekraut eine um über Faktor 2 höhere Konzentration in Probe F bestimmt als in Probe A mit 23,3 mg/100 g Teekraut. Somit könnte auch für diese Substanzen ein hoher Blattanteil sowie eine feine Partikelgröße des

C. incanus Teekrautes für entsprechend hohe Gehalte im trinkfertigen Tee von Bedeutung sein.

Ergebnisse mit abweichenden Tendenzen wurden für die Klasse der Ellagitannine (Abb. 5.12f), bestehend aus HHDP-Glucose Isomer 1 und 2 (Nr. 28 und Nr. 29) beobachtet. Innerhalb dieser Substanzklasse wurde der höchste Gesamtgehalt mit 208,9 mg/100 g Teekraut in Probe G gemessen. Die niedrigste Konzentration für die Summe der beiden Isomere wurde mit 50,8 mg/100 g Teekraut in Probe C detektiert. Beide Proben wiesen eine feine Partikelgröße sowie einen hohen Blattanteil auf und stammten aus der Türkei. Die signifikanten Abweichungen der gemessenen HHDP-Glucose Konzentrationen müssen somit vermutlich auf andere Einflussfaktoren als Blattanteil und Partikelgröße des Teekrautes zurückgeführt werden. Hier können z.B. regionale Klimaeinflüsse, Erntezeitpunkt oder die Lagerdauer in Betracht gezogen werden. Für die analysierten Handelsproben lagen jedoch keine der hierzu benötigten Herstellerinformationen vor. Weiterhin wurden ähnliche Abweichungen auch für die Hauptsubstanz der Ellagitannine in *C. incanus* Tee, HHDP-Glucose Isomer 2, festgestellt. Die höchste Konzentration war mit 172,8 mg/100 g Teekraut in Probe E enthalten. Probe C enthielt hingegen mit 40,8 mg/100 g Teekraut einen um über Faktor 4 niedrigeren Gehalt dieser Substanz.

Insgesamt wurde in den untersuchten Handelsproben ein hoher Gesamtgehalt phenolischer Inhaltsstoffe zwischen 0,6-1,8 g/100 g Teekraut mittels LC-DAD quantitativ bestimmt. Die niedrigste Konzentration wurde hierbei in Probe A und die höchste Konzentration in Probe E gemessen. Hohe Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe waren mit 1,4 g/100 g Teekraut ebenfalls in den Proben B, C und F enthalten. Für die Summe der quantifizierten phenolischen Substanzen scheinen somit ebenfalls eine feine Partikelgröße und ein hoher Blattanteil von Bedeutung zu sein. Die These eines Einflusses von Blatt- und Stängelanteil sowie der Partikelgröße des Teekrautes auf die Konzentration phenolischer Inhaltsstoffe in *C. incanus* Tee wird in Kapitel 5.4 genauer untersucht. Weiterhin scheint ein Zusatz von 5 % Pfefferminze in Probe B keinen signifikanten Einfluss auf den Gesamtgehalt der quantifizierten phenolischen *C. incanus* Inhaltsstoffe zu haben. Ebenso konnte anhand der sieben untersuchten Handelsproben und der zur Verfügung stehenden Herstellerinformationen kein direkter Zusammenhang zwischen dem Herkunftsland des Teekrautes sowie den damit verbundenen ökophysiologischen Faktoren und dem Gesamtgehalt phenolischer Inhaltsstoffe festgestellt werden.

5.2 Charakterisierung phenolischer Substanzen in *C. incanus* Tee

Nach erfolgter Identifizierung und Quantifizierung der phenolischen Inhaltsstoffe in den *C. incanus* Handelsproben erfolgte eine Charakterisierung dieser Tees bezüglich der Bioaktivität. Hierfür wurden als Summenparameter der Gesamtphenolgehalt, der Tanningehalt und die gesamte antioxidative Kapazität der Teeextrakte mittels der in Kapitel 4 beschriebenen Methoden bestimmt. Anhand dieser Parameter wurden anschließend die untersuchten Tees verglichen. Um abschließend Aussagen zur antioxidativen Kapazität und der damit einhergehenden Bioaktivität der einzelnen phenolischen Inhaltsstoffe zu erhalten, wurden diese zusätzlich mittels LC-onlineTEAC analysiert. Ebenso wurde eine Auswahl der phenolischen Substanzen in *C. incanus* Tee als Substrate für weiterführende Bioaktivitätstests, z.B. zur Untersuchung der bereits in der Literatur beschriebenen antibakteriellen oder antiviralen Wirkung von *C. incanus* Extrakten (vgl. Kapitel 2.1.3), isoliert. Darüber hinaus wurde die in Kapitel 2 beschriebene *Tea Cream* aus *C. incanus* Tee charakterisiert, um hierdurch einen Einfluss möglicher Komplexierungsreaktionen phenolischer Inhaltsstoffe auf die Bioaktivität des trinkfertigen Tees beurteilen zu können.

5.2.1 Gesamphenolgehalte, Tanningehalte und gesamte antioxidative Kapazitäten

Nachfolgend sind in Abbildung 5.13a-f die Ergebnisse für den Gesamtphenolgehalt (*Folin-Ciocalteu-Assay*), den Tanningehalt (*Methylcellulose-Präzipitations-Assay*) und die gesamte antioxidative Kapazität (*Elektronenspinresonanz-Spektroskopie*) aus sieben untersuchten *C. incanus* Handelsproben sowie der Siebungen (A.gs1-A.gs6) aus Probe A dargestellt. Die Gesamphenolgehalte sind hierbei als Gallussäureäquivalente (GE), die Tanningehalte als Epicatechinäquivalente (EE) und die gesamten antioxidativen Kapazitäten als Abbau des Radikals Fremy's Salz dargestellt. Die Ergebnisse sind jeweils für das methanolische und das Methanol/Ammoniak-SPE-Eluat aufgeführt. Das erstgenannte Eluat enthält überwiegend Substanzen aus der Klasse der Flavonoide während im zweiten SPE-Eluat Ellagitannine die Hauptinhaltsstoffe repräsentieren.

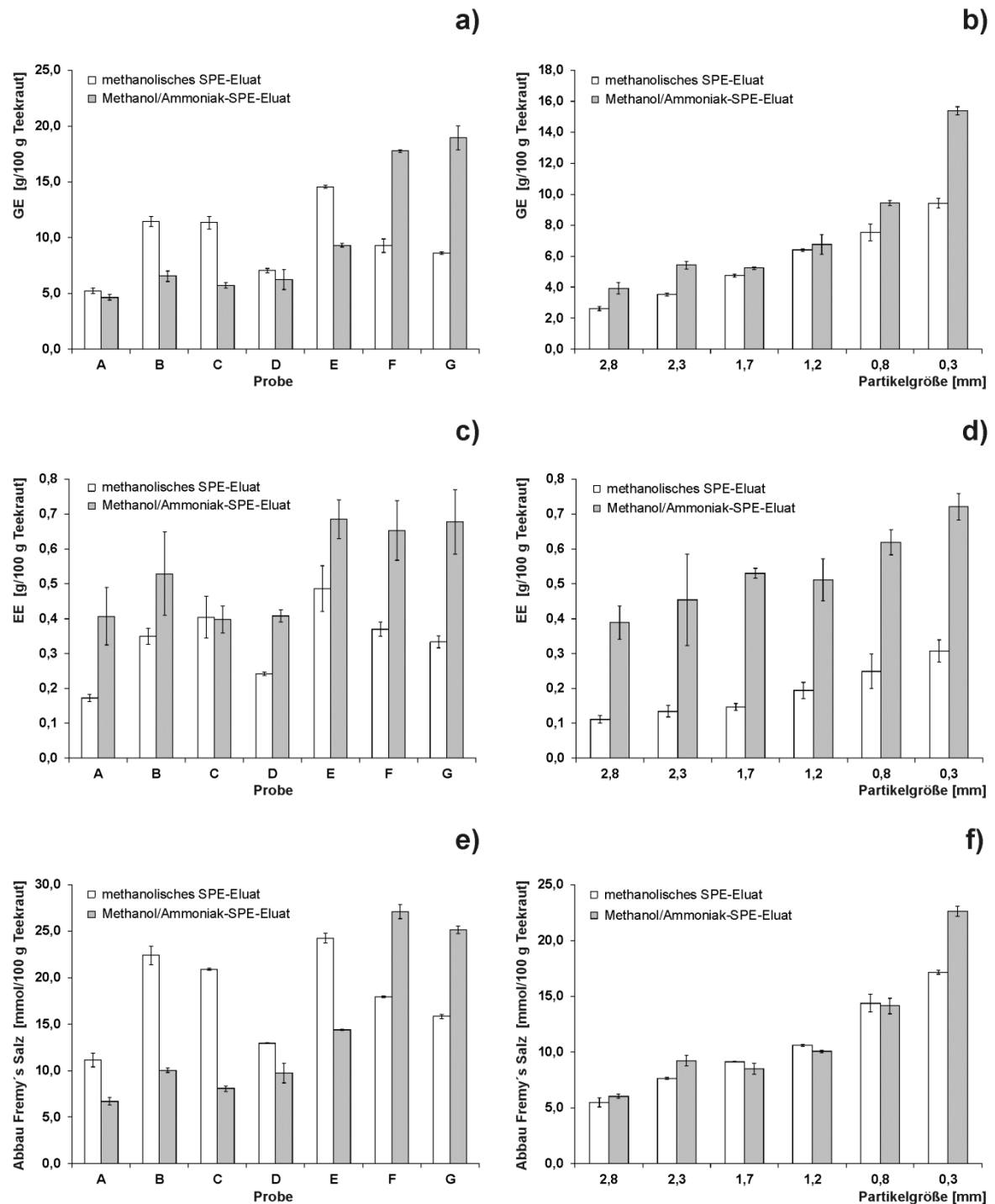


Abb. 5.13a-f a) und b) Gesamtphenolgehalte, c) und d) Tanningehalte sowie e) und f) gesamte antioxidative Kapazitäten der SPE-Eluate aus sieben *C. incanus* Tee Handelsproben (linke Spalte) sowie der gesiebten Fraktionen aus Probe A (rechte Spalte) mit durchschnittlichen Partikelgrößen von 2,8 mm; 2,3 mm; 1,7 mm; 1,2 mm; 0,8 mm und 0,3 mm. Teezubereitung vgl. Kapitel 4.2. Zugehörige Probenbeschreibungen sind in Tabelle 4.1 dargestellt. GE: Gallussäureäquivalente; EE: Epicatechinäquivalente; SPE: Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion).

Die höchsten Gesamtphenolgehalte innerhalb der untersuchten Handelsproben wurden für die Summe der SPE-Eluate mit 27,6 g GE/100 g Teekraut in Probe G und die niedrigsten Gehalte mit 9,9 g GE/100 g Teekraut in Probe A gemessen. Eine vergleichbare Tendenz wurde ebenfalls für das einzelne Methanol/Ammoniak-SPE-Eluat beobachtet. Hier wurde für Probe G im Vergleich zu Probe A ein über 4-fach höherer Gesamtphenolgehalt gemessen, der vermutlich auf die hohen Konzentrationen der enthaltenen HHDP-Glucose Isomere (Ellagitannine) zurückzuführen ist. Für das flavonoidreiche methanolische SPE-Eluat wurden die höchsten Gesamtphenolgehalte hingegen mit 14,5 g GE/100 g Teekraut in Probe E gemessen. Auch in diesem Eluat lagen die niedrigsten Gehalte mit 5,2 g GE/100 g Teekraut erneut in Handelsprobe A vor. Weiterhin wurden in den Proben A und D keine signifikanten Unterschiede der Gesamtphenolgehalte zwischen den zwei SPE-Eluaten detektiert. In den Proben B, C und E wurden dagegen signifikant höhere Gehalte für das methanolische SPE-Eluat ermittelt und in Probe E und F lagen die höheren Gesamtphenolgehalte im Methanol/Ammoniak-SPE-Eluat vor. Insgesamt lag somit eine unterschiedliche Verteilung der phenolischen Inhaltsstoffe zwischen dem flavonoidreichen, methanolischen und dem ellagitanninreichen Methanol/Ammoniak-Eluat vor. Die Gesamtphenolgehalte in den Handelsproben hängen hierbei analog zu den Konzentrationen der quantifizierten phenolischen Substanzen vermutlich mit dem Blatt- bzw. Stängelanteil der Proben und der Partikelgröße des Teekrautes zusammen. Die Proben A und D wiesen einen hohen Stängelanteil sowie eine grobe Partikelgröße auf. Im Gegensatz dazu bestanden Probe E und F vorwiegend aus Blättern mit einer feinen Partikelgröße.

Einen Effekt der Partikelgröße des *C. incanus* Teekrautes auf den Gesamtphenolgehalt des trinkfertigen Tees wurde anhand der Ergebnisse der sechs gesiebten Proben (A.gs1-A.gs6) bestätigt. Innerhalb dieser Proben wurden mit 24,8 g GE/100 g Teekraut die höchsten Gesamtphenolgehalte für die Summe der SPE-Eluate in Probe A.gs6 mit der geringsten durchschnittlichen Partikelgröße von 0,3 mm ermittelt. Die niedrigsten Gehalte wurden mit 6,5 g GE/100 g Teekraut hingegen in Probe A.gs1 mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von 2,8 mm gemessen. Vergleichbare Tendenzen wurden auch für die einzelnen SPE-Eluate festgestellt. Hier lagen die höchsten Gesamtphenolgehalte im methanolischen Eluat sowie im Methanol/Ammoniak-Eluat mit 9,4 g bzw. 15,4 g GE/100 g Teekraut in Probe A.gs6 mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von 0,3 mm vor. In den Proben mit einer gröberen Partikelgröße wurden in beiden SPE-Eluaten signifikant niedrigere Gesamtphenolgehalte bestimmt. Insgesamt lagen innerhalb der gesiebten Proben die Gesamtphenolgehalte im Methanol/Ammoniak-SPE-Eluat über den Gehalten des methanolischen Eluates. Eine Ausnahme stellte hierbei Probe A.gs4 mit einer

durchschnittlichen Partikelgröße von 1,2 mm dar, bei der keine signifikante Abweichung zwischen den Gesamtphenolgehalten der zwei SPE-Eluate festgestellt wurde. Probe A.gs4 repräsentierte zudem die umfangreichste Siebfraktion aus Handelsprobe A. Dies ist somit vermutlich auch eine Erklärung für die vergleichbaren Gesamtphenolgehalte der SPE-Eluate in Probe A. Weiterhin wurde eine stark negative Korrelation ($R^2=0,98$) zwischen der Partikelgröße des Teekrautes und dem Gesamtphenolgehalt des methanolischen SPE-Eluates berechnet. Für das Methanol/Ammoniak-Eluat hingegen wurde eine deutlich schwächere Korrelation ($R^2=0,78$) ermittelt. Somit scheinen die im methanolischen SPE-Eluat enthaltenen Flavonoide effektiver aus Teekraut mit einer kleinen Partikelgröße extrahiert zu werden. An der Extraktion der im Methanol/Ammoniak-SPE-Eluat enthaltenen Ellagitannine sind dagegen neben der Partikelgröße des Teekrautes vermutlich noch weitere Einflussfaktoren beteiligt. Bezüglich der dargestellten Ergebnisse ist auch zu berücksichtigen, dass diese auf einer exemplarischen Analyse der gesiebten Fraktionen aus Handelsprobe A basieren. Eine Untersuchung weiterer *C. incanus* Tees zur statistischen Absicherung der Ergebnisse stellt somit einen wichtigen Ansatzpunkt für weitere Forschungsarbeiten dar.

Innerhalb der untersuchten Proben wurden, mit Ausnahme von Probe C, die höchsten Tanningehalte in den Methanol/Ammoniak-SPE-Eluaten gemessen. In diesen Eluaten wurden zuvor auch die in *C. incanus* Tee enthaltenen Ellagitannine sowie Ellagsäure und deren Derivate identifiziert. Diese Ergebnisse werden somit auch durch die mittels MCP-Assay bestimmten Tanningehalte bestätigt. Die höchsten Tanningehalte wurden innerhalb der Handelsproben mit 0,7 g EE/100 g Teekraut im Methanol/Ammoniak-SPE-Eluat aus Probe E gemessen. Den niedrigsten Gehalt enthielt mit 0,4 g EE/100 g Teekraut Probe A. Somit variierten auch die Tanningehalte zwischen den Handelsproben signifikant um bis zu Faktor 2. Auch hier schien anhand der Ergebnisse von Handelsprobe A und E ein hoher Blattanteil sowie eine feine Partikelgröße des Teekrautes für hohe Tanningehalte in *C. incanus* Tees verantwortlich zu sein. So wurde neben Probe A auch in Probe D (ebenfalls grobe Partikelgröße und hoher Stängelanteil) analog der Ergebnisse für den Gesamtphenolgehalt ein niedriger Tanningehalt ermittelt.

Bezüglich eines möglichen Einflusses der Partikelgröße des Teekrautes auf die Konzentration der Tannine in *C. incanus* Tee wurde mit abnehmender Partikelgröße ein steigender Tanningehalt beobachtet. Dieser lag für das Methanol/Ammoniak-SPE-Eluat für Probe A.gs1 mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von 2,8 mm bei 0,4 g EE/100 g Teekraut und entsprechend für Probe A.gs6 mit einer Partikelgröße von 0,3 mm bei 0,7 g EE/100 g Teekraut. Für den negativen Zusammenhang zwischen Partikelgröße des

Teekrautes und Tanningehalt im Methanol/Ammoniak-SPE-Eluat wurde ein Korrelationskoeffizient von $R^2=0,92$ berechnet. Anhand der exemplarischen Ergebnisse für die gesiebten Fraktionen aus Probe A kann somit von einer effektiveren Extraktion der Tannine aus *C. incanus* Teekraut mit einer kleinen Partikelgröße ausgegangen werden.

Eine Abweichung von der Verteilung der Tanningehalte zwischen den SPE-Eluaten stellte, wie zuvor erwähnt, Handelsprobe C dar. Für diese Probe wurde im Gegensatz zu den anderen Handelsproben kein signifikanter Unterschied zwischen den Tanningehalten der SPE-Eluate beobachtet. Eine mögliche Erklärung hierfür ist der hohe Gehalt des Flavanoldimers Gallocatechin-catechin (Nr. 4) in Probe C (vgl. Abbildung 5.12). Eine Präzipitation oligomerer Substanzen innerhalb des MCP-Assays könnte somit ähnlich hohen Tanningehalte im methanolischen SPE-Eluat verglichen mit dem Methanol/Ammoniak-Eluat erklären. Insgesamt können diese, in variierenden Konzentrationen enthaltenen, dimeren Strukturen eine Erklärung für einen relativ hohen Tanningehalt im flavanoidreichen SPE-Eluat darstellen. Eine Anwendung des häufig in der Routineanalytik für Trauben und Wein (SARNECKIS *et al.* 2006, MERCURIO *et al.* 2007) eingesetzten MCP-Assays sowie die Interpretation der resultierenden Daten für *C. incanus* Tee sollte somit vorsichtig und differenziert für die unterschiedlichen Teeextrakte betrachtet werden. Zusätzlich ist für die Ergebnisse des Methanol/Ammoniak-Eluates eine hohe Standardabweichung der Wiederholungsmessungen zu beachten. Trotzdem können anhand der Tanningehalte und unter Berücksichtigung der bekannten Fehlerquellen des MCP-Assays *C. incanus* Tees charakterisiert werden.

Weiterhin wurde für eine Charakterisierung der *C. incanus* Tees deren gesamte antioxidative Kapazität mittels ESR-Spektroskopie bestimmt. Hierdurch sollten erste Hinweise bezüglich der Bioaktivität erhalten werden. Für Handelsprobe A bis E resultierte dabei in den methanolischen SPE-Eluaten eine höhere gesamte antioxidative Kapazität verglichen mit den Methanol/Ammoniak-Eluaten. In Probe F und G lagen hierbei die Werte des Methanol/Ammoniak-SPE-Eluates über denen des methanolischen Eluates. Insgesamt wurde die höchste gesamte antioxidative Kapazität innerhalb der flavonoidreichen, methanolischen SPE-Eluate mit einem Abbau von 24,3 mmol Fremy's Salz/100 g Teekraut in Handelsprobe E gemessen. Das methanolische Eluat dieser Probe wies, wie zuvor beschrieben, auch den höchsten Gesamtphenol- sowie Tanningehalt unter den analysierten Handelsproben auf. Der Gesamtphenolgehalt und die Konzentration der Tannine korrelierten somit innerhalb dieser Probe mit der antioxidativen Kapazität. Ähnliche Tendenzen wurden auch für Probe A festgestellt. Neben dem niedrigsten Gesamtphenol- und Tanningehalt wurde auch mit einem Abbau von

11,2 mmol Fremy's Salz/100 g Teekraut die geringste gesamte antioxidative Kapazität für das methanolische SPE-Eluat dieser Probe ermittelt. Etwas abweichende Tendenzen wurden für die höchste gesamte antioxidative Kapazität der analysierten Methanol/Ammoniak-SPE-Eluat sowie für die Summe der SPE-Eluat beobachtet. Mit einem Abbau von 27,1 mmol bzw. 45,1 mmol Fremy's Salz/100 g Teekraut lagen die höchsten Werte in Handelsprobe F vor. Diese Werte können auch hier durch die hohen Gesamtphenol- sowie Tanningehalte des Methanol/Ammoniak-SPE-Eluates der Probe erklärt werden. Weiterhin wurden die niedrigsten Gehalte mit einem jeweiligen Abbau von 6,1 mmol und 11,2 mmol Fremy's Salz/100 g Teekraut im Methanol/Ammoniak-Eluat sowie der Summe der SPE-Eluat von Probe A detektiert. Ebenfalls wies auch Probe D neben den zuvor analysierten niedrigen Gesamtphenol- und Tanningehalten eine niedrige gesamte antioxidative Kapazität auf. Auch hier wurde daher ein Zusammenhang zwischen Blattanteil sowie Partikelgröße des Teekrautes und der antioxidativen Kapazität der trinkfertigen *C. incanus* Tees vermutet.

Die Ergebnisse der gesiebten Fraktionen A.gs1 bis A.gs6 aus Handelsprobe A konnten die Vermutung des Einflusses der Teekrautpartikelgröße auf die gesamte antioxidative Kapazität des trinkfertigen Tees bestätigen. Sowohl im methanolischen als auch im Methanol/Ammoniak-SPE-Eluat wurden die höchsten gesamten antioxidativen Kapazitäten mit einem Abbau von 17,2 mmol bzw. 22,6 mmol Fremy's Salz/100 g Teekraut in Probe A.gs6 mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von 0,3 mm gemessen. Analog hierzu lagen die niedrigsten gesamten antioxidativen Kapazitäten mit einem signifikant geringeren Abbau von 5,5 mmol bzw. 6,0 mmol Fremy's Salz/100 g Teekraut in den SPE-Eluaten aus Probe A.gs1 mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von 2,8 mm vor. Für den negativen Zusammenhang zwischen der Partikelgröße des Teekrautes der gesamten antioxidativen Kapazität, wurde für das methanolische SPE-Eluat ein Korrelationskoeffizient von $R^2=0,95$ und entsprechend für das Methanol/Ammoniak-Eluat von $R^2=0,76$ berechnet. Diese waren hierbei annähernd identisch zu den zuvor beschriebenen Koeffizienten für die Korrelation zwischen dem Gesamtphenolgehalt und der Partikelgröße des Teekrautes. Der Gesamtphenolgehalt scheint somit einen bedeutenden Einflussfaktor für die gesamte antioxidative Kapazität von *C. incanus* Tee darzustellen.

Insgesamt konnten innerhalb der vorliegenden Arbeit durch die Bestimmung der Gesamtphenol- und Tanningehalte sowie deren Korrelationen mit der gesamten antioxidativen Kapazität erste Hinweise auf die Bioaktivität von *C. incanus* Tee erhalten werden. Dabei lieferten insbesondere die Messungen der gesamten antioxidativen

Kapazität mittels ESR-Spektroskopie Informationen zur Reaktivität der Inhaltsstoffe. Der Hauptvorteil dieser Methode liegt darin, dass keine der antioxidativen Substanzen in den Analysen diskriminiert werden. Dagegen kann innerhalb anderer Methoden zur Bestimmung der antioxidativen Kapazitäten unbemerkt ein Ausschluss bioaktiver Substanzen aus der Analytik unbemerkt erfolgen. Beispielsweise können in LC-onlineTEAC-Messungen durch Spritzenfiltration in der Probenaufarbeitung oder durch eine irreversible Retention in der Vorsäule bestimmte Substanzen nicht erfasst werden. Eine Kombination aus ESR-Spektroskopie und LC-onlineTEAC scheint somit eine sichere und präzise Beurteilung der antioxidativen Kapazitäten und der damit einhergehenden Bioaktivität von *C. incanus* Tee zu ermöglichen.

5.2.2 Antioxidative Kapazitäten der einzelnen phenolischen Inhaltsstoffe

Anhand der zuvor beschriebenen Ergebnisse der ESR-Messungen zur gesamten antioxidativen Kapazität der analysierten *C. incanus* Proben konnte keine präzise Aussage getroffen werden, welche Inhaltsstoffe im Einzelnen für die hohen antioxidativen Kapazitäten verantwortlich sind. Daher wurden zusätzlich mittels LC-onlineTEAC die antioxidativen Kapazitäten der einzelnen phenolischen Inhaltsstoffe analysiert. Die TEAC dieser Substanzen wurde zunächst relativ, d.h. ohne eine Berücksichtigung der jeweiligen Substanzkonzentrationen in der Probe, für alle identifizierten phenolischen Verbindungen ermittelt (vgl. Anhang A3.3). Weiterhin wurde die absolute TEAC, d.h. unter Berücksichtigung der Konzentrationen der phenolischen Substanzen, für die zuvor in *C. incanus* Tee quantifizierten antioxidativen Inhaltsstoffe berechnet (vgl. Anhang A3.4).

In Abbildung 5.14a-b sind exemplarisch für die analysierten *C. incanus* Tees die LC-onlineTEAC Chromatogramme für das methanolische SPE-Eluat (Abb. 5.14a) und das Methanol/Ammoniak-Eluat (Abb. 5.14b) für Handelsprobe A dargestellt. Die identifizierten phenolischen Substanzen (positive Peaks Nr. 1-Nr. 31 bei 280 nm) wurden für die TEAC-Bestimmung im Verhältnis zum internen Troloxstandard (1 mM) betrachtet. Innerhalb der Nachsäulenderivatisierung (onlineTEAC) resultierten aus einer Reduktion des ABTS-Radikalions die negativen Peaks, die bei 734 nm aufgezeichnet wurden.

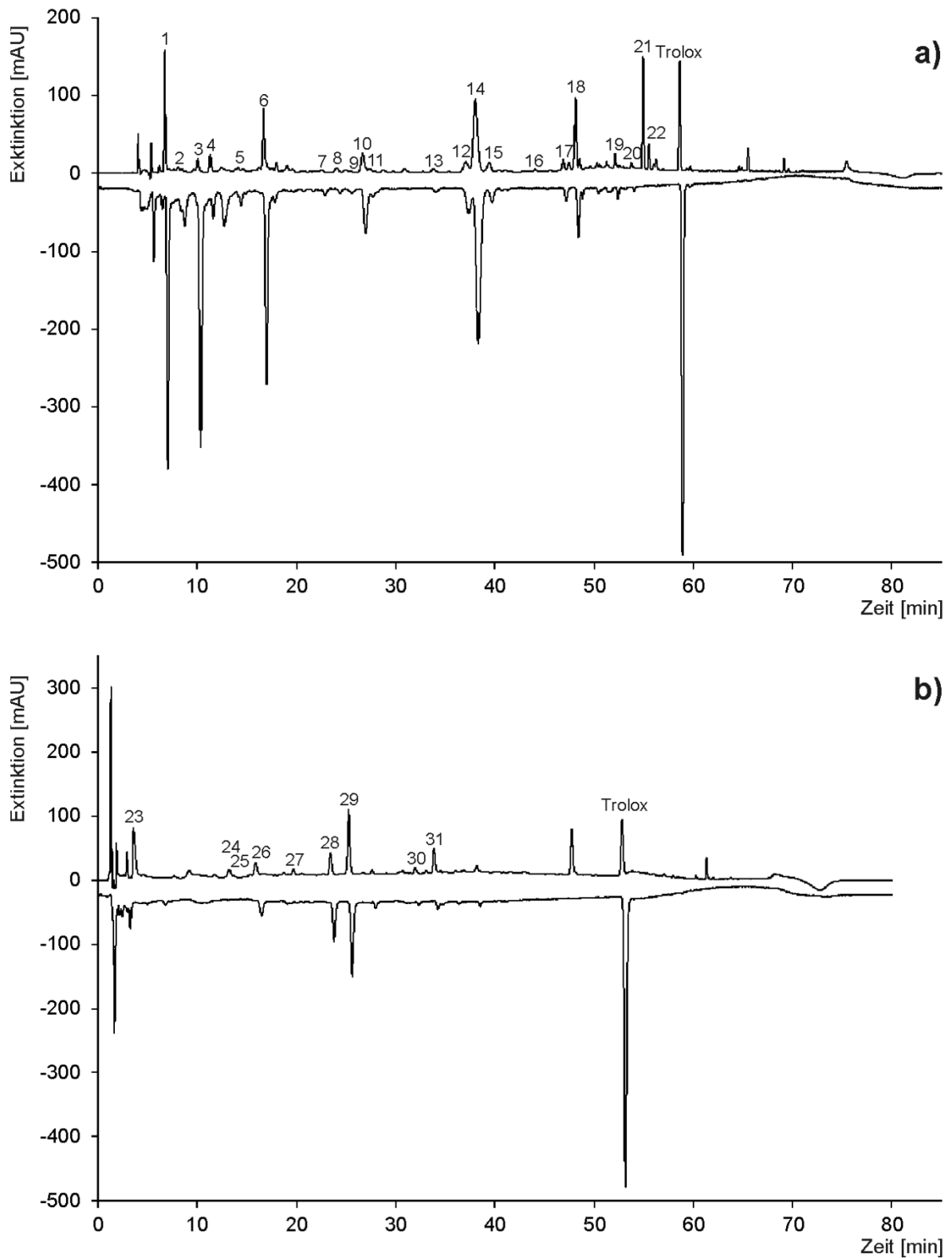


Abb. 5.14a-b LC-onlineTEAC-Chromatogramme (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) der SPE-Eluate der Probe A bei 280 nm (positive Peaks) und 734 nm (negative Peaks der TEAC-Nachsäulenderivatisierung) a) methanolisches SPE-Eluat; b) Methanol/Ammoniak-SPE-Eluat. Die Bezeichnungen der Substanzen (Nr. 1-Nr. 31) sind in Tabelle 5.1 und 5.2 aufgeführt. 1 mM Trolox wurde als interner Standard den SPE-Eluaten zugesetzt.

Tab. 5.4 Relative TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) der einzelnen phenolischen Inhaltsstoffe in *C. incanus* Tee (Probe A) sowie deren Anteil an der Gesamt-TEAC. TE: Troloxäquivalente; n.d.: nicht detektiert; HHDP-Glucose: Hexahydroxydiphenoyl-glucose; I1 und I2: Isomer 1 und 2.

Nr.	Substanz	TEAC [μmol TE/100 g Teekraut]	Anteil an Gesamt- TEAC (Nr. 1-Nr. 31) [%]
1	Gallussäure	240 ± 22	14 ± 1,3
2	Gallocatechin-(4α-8)-gallocatechin oder Gallocatechin-(4α-6)-gallocatechin	13 ± 3,1	0,8 ± 0,18
3	Gallocatechin	320 ± 14	19 ± 0,8
4	Gallocatechin-(4α-8)-catechin oder Catechin-(4α-8)-gallocatechin	26 ± 2,5	2 ± 0,15
5	Procyanidin B ₁	5 ± 0,4	0,3 ± 0,03
6	Catechin	259 ± 13	15 ± 0,8
7	Vicenin-2	7 ± 2,2	0,4 ± 0,01
8	Epigallocatechin-gallat	7 ± 0,1	0,4 ± 0,01
9	Myricetin-O-rhamnosid-O-hexosid	9 ± 1,6	0,5 ± 0,10
10	Myricetin-3-O-galactosid	90 ± 3,3	5 ± 0,19
11	Myricetin-3-O-glucosid	13 ± 1,9	0,7 ± 0,11
12	Myricetin-O-xylosid	58 ± 5,3	3 ± 0,31
13	Rutin	8 ± 1,6	0,5 ± 0,09
14	Myricitrin	375 ± 24	22 ± 1,4
15	Quercetin-3-O-galactosid	23 ± 1,3	1 ± 0,07
16	Quercetin-3-O-glucosid	n.d.	0,0
17	Quercetin-O-xylosid	15 ± 1,0	0,9 ± 0,06
18	Quercitrin	58 ± 2,9	3 ± 0,17
19	Myricetin-O-rhamnosid-O-hexosid	10 ± 0,3	0,6 ± 0,02
20	Quercetin-O-rhamnosid-O-hexosid	4 ± 0,6	0,2 ± 0,04
21	<i>trans</i> -Tilirosid	n.d.	0,0
22	<i>cis</i> -Tilirosid	n.d.	0,0
23	Methylgallussäure	2 ± 0,2	0,1 ± 0,01
24	Hydroxyferulasäure-5-O-rhamnosid	n.d.	0,0
25	Uralenneosid	n.d.	0,0
26	Hydroxyferulasäure-4-O-rhamnosid	n.d.	0,0
27	Hydroxyferuloyl-rhamnose	n.d.	0,0
28	HHDP-Glucose (I1)	48 ± 1,5	3 ± 0,09
29	HHDP-Glucose (I2)	94 ± 8,0	5 ± 0,46
30	Ellagsäure-7-O-xylosid	n.d.	0,0
31	Ellagsäure	10 ± 1,2	0,6 ± 0,07
Gesamt-TEAC (Nr. 1-Nr. 31)		1695 ± 114	

Zu erkennen ist in Abbildung 5.14a-b ebenfalls, dass ein Großteil der identifizierten phenolischen Substanzen in *C. incanus* Tee eine negative Peakfläche innerhalb der Nachsäulenderivatisierung und somit eine TEAC aufwiesen. Diese Substanzen tragen somit zur gesamten antioxidativen Kapazität der analysierten Tees bei. Die entsprechende relative TEAC sowie der prozentuale Anteil der identifizierten phenolischen Substanzen an der mittels LC-onlineTEAC gemessenen gesamten antioxidativen Kapazität in Probe A ist in Tabelle 5.4 dargestellt. Dabei wurden die fünf größten negativen Peakflächen und somit die fünf höchsten relativen TEAC-Werte für Myricitrin (Nr. 14), Gallocatechin (Nr. 3), Catechin (Nr. 6), Gallussäure (Nr. 1) und HHDP-Glucose Isomer 2 (Nr. 29) gemessen. Für diese antioxidativen *C. incanus* Inhaltsstoffe wurde jeweils eine relative TEAC von 375 μmol , 320 μmol , 259 μmol , 240 μmol und 94 μmol TE/100 g Teekraut in Probe A bestimmt. Insgesamt stellen diese fünf Substanzen mit 75 % den Hauptanteil der Gesamt-TEAC in *C. incanus* Tee dar. Somit ist nicht nur eine Klasse phenolischer Substanzen an der gesamten antioxidativen Kapazität beteiligt. Vielmehr ist eine spezifische Mischung antioxidativer Inhaltsstoffe aus den Klassen der Phenolsäuren, Flavanole, Flavonolglycoside und Ellagitannine für den Großteil der gemessenen Gesamt-TEAC verantwortlich. Bezüglich der relativen TEAC der einzelnen Inhaltsstoffe war zudem auffällig, dass einige Substanzen trotz geringer positiver Peakflächen eine sehr hohe antioxidative Kapazität aufwiesen (vgl. Abbildung 5.14a-b). So wurde für den Gallocatechinpeak (Nr. 3) mit einer geringen positiven Peakfläche eine hohe relative TEAC von 320 μmol TE/100 g Teekraut gemessen. Eine ähnlich hohe antioxidative Kapazität wurde mit 375 μmol TE/100 g Teekraut auch für den Myricitrinpeak mit einer deutlich größeren positiven Peakfläche gemessen. Für Myricitrin wurde in Probe A mit 159,6 mg/100 g Teekraut eine fast 6-fach höhere Konzentration im Vergleich zu Gallocatechin (27,9 mg/100 g Teekraut) bestimmt. Die TEAC der einzelnen phenolischen Inhaltsstoffe in *C. incanus* Tee war somit vermutlich stark von der spezifischen Molekülstruktur abhängig. So wurden auch für einige quantifizierte phenolische Substanzen in *C. incanus* Tee keine negative Peakfläche und somit auch keine antioxidative Kapazität gemessen. Zu diesen Inhaltsstoffen zählen die Tilirosidisomere (Nr. 22 und Nr. 23), die Derivate der Hydroxyferulasäure (Nr. 24; Nr. 26 und Nr. 27) sowie Uralenneosid (1-O-(3,4-Dihydroxybenzoyl)- β -D-ribofuranose) (Nr. 25). Ebenfalls wurde für das nur in sehr geringen Konzentrationen (3,7 mg/100 g Teekraut) in *C. incanus* Tee enthaltene Quercetin-3-O-glucosid (Nr. 16) keine negative Peakfläche detektiert. Für das mit 9,9 mg/100 g Teekraut in höheren Konzentrationen enthaltene und strukturell verwandte Quercetin-3-O-xylosid hingegen wurde eine relative TEAC von 15 μmol TE/100 g Teekraut ermittelt. Die mittels LC-onlineTEAC gemessenen Werte für die antioxidativen Kapazitäten einzelner phenolischer Substanzen waren somit neben

strukturellen Einflüssen auf molekularer Ebene vermutlich auch von der Konzentration der jeweiligen Substanz im Tee abhängig.

Für eine bessere Vergleichbarkeit der antioxidativen Kapazitäten wurde nachfolgend die absolute TEAC der quantifizierten Inhaltsstoffe bezogen auf 1 mmol Substanz bestimmt. Anhand dieser Werte können unabhängig von den jeweiligen Substanzkonzentrationen im Teekraut der Proben Aussagen zum Einfluss der Molekülstruktur auf die TEAC gegeben werden. Für die Bestimmung der absoluten TEAC wurde Probe E, aufgrund der hohen Konzentrationen antioxidativer Inhaltsstoffe, ausgewählt. Die damit einhergehenden großen negativen Peakflächen innerhalb der Nachsäulenderivatisierung gewährleisteten eine TEAC-Bestimmung auch für phenolische Minorkomponenten. In Tabelle 5.5 sind die berechneten absoluten TEAC-Werte der quantifizierten antioxidativen Substanzen in *C. incanus* Tee dargestellt. Die höchste absolute TEAC erzielten unter den zuvor quantifizierten Substanzen Gallocatechin (Nr. 3), HHDP-Glucose Isomer 1 (Nr. 28), Myricetin-3-O-glucosid (Nr. 11), Gallussäure (Nr. 1) sowie HHDP-Glucose Isomer 2 (Nr. 29). Die Werte lagen hier bei 5,3 mmol; 4,4 mmol; 2,9 mmol; 2,4 mmol und 2,2 mmol TE/mmol Substanz. Somit stellt Gallocatechin absolut betrachtet das stärkste Antioxidans in *C. incanus* Tee dar.

Weiterhin wiesen auch eine große Bandbreite phenolischer Substanzen aus unterschiedlichen Substanzklassen eine hohe absolute TEAC auf. Im direkten Vergleich zur relativen TEAC hatten hingegen einige Substanzen nur eine eher geringe absolute TEAC. Beispielsweise stellte Myricitrin mit der stärksten relativen TEAC innerhalb der absoluten TEAC-Werte nur noch das sechststärkste Antioxidans in *C. incanus* dar. Diese Abweichung ist wahrscheinlich durch die hohen Konzentrationen dieser phenolischen Leitsubstanz in *C. incanus* Tee begründet. Bezüglich der enthaltenen Minorkomponenten konnte in Probe E aufgrund der im Vergleich zu Probe A fast doppelten Konzentrationen von Quercetin-3-O-glucosid (6,7 mg/100 g Teekraut) auch für diese Substanz eine antioxidative Kapazität bestimmt werden.

Auf molekularer Ebene sind nach RICE-EVANS *et al.* (1996) für die antioxidative Kapazität einer phenolischen Substanz verschiedene strukturelle Merkmale von Bedeutung. Hierzu zählt insbesondere bei Flavonoiden innerhalb des B-Ringes im Grundgerüst ein Vorkommen von Hydroxylgruppen in ortho-Stellung zueinander.

Tab. 5.5 Absolute TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) der quantifizierten phenolischen Inhaltsstoffe in *C. incanus* Tee. TE: Troloxäquivalente; n.d.: nicht detektiert; HHDP-Glucose: Hexahydroxydiphenoyl-glucose; I1 und I2: Isomer 1 und 2.

Nr.	Substanz	TEAC [mmol TE/mmol Substanz]
1	Gallussäure	2,4 ± 0,10
3	Gallocatechin	5,3 ± 0,26
4	Gallocatechin-(4α-8)-catechin oder Catechin-(4α-8)-gallocatechin	1,2 ± 0,08
6	Catechin	1,5 ± 0,05
10	Myricetin-3-O-galactosid	2,0 ± 0,10
11	Myricetin-3-O-glucosid	2,9 ± 0,13
12	Myricetin-O-xylosid	1,6 ± 0,11
14	Myricitrin	2,0 ± 0,11
15	Quercetin-3-O-galactosid	1,5 ± 0,10
16	Quercetin-3-O-glucosid	0,9 ± 0,12
17	Quercetin-O-xylosid	1,2 ± 0,03
18	Quercitrin	0,9 ± 0,04
21	<i>trans</i> -Tilirosid	n.d.
22	<i>cis</i> -Tilirosid	n.d.
23	Methylgallussäure	0,9 ± 0,02
24	Hydroxyferulasäure-5-O-rhamnosid	n.d.
26	Hydroxyferulasäure-4-O-rhamnosid	n.d.
27	Hydroxyferuloyl-rhamnose	n.d.
28	HHDP-Glucose (I1)	4,4 ± 0,39
29	HHDP-Glucose (I2)	2,2 ± 0,17
30	Ellagsäure-7-O-xylosid	0,2 ± 0,03
31	Ellagsäure	0,7 ± 0,05

Diese fehlenden Hydroxylgruppen in ortho-Stellung könnten somit eine Erklärung für die nicht detektierte TEAC von Tilirosid (Nr. 21 und Nr. 22) darstellen. Diese Kämpferol-3-O-(6''-*trans-p*-coumaroyl)glucoside weisen am Kämpferolaglycon innerhalb des B-Ringens nur eine Hydroxylgruppe auf. Weiterhin verringert nach RICE-EVANS *et al.* (1996) eine Glycosylierung der Hydroxylgruppen des Flavonoidgrundgerüsts die antioxidative Kapazität. Auch hierdurch wäre wiederum die nicht detektierbare TEAC von Tilirosid zu erklären. Innerhalb dieser Struktur ist das Kämpferolaglycon über die 3-Hydroxylgruppe des C-Ringens O-glycosidisch an Glucose gebunden. In Abbildung 5.15 ist zur Veranschaulichung die Struktur von *trans*-Tilirosid (TEAC: 0,0 mmol TE/mmol Substanz) dargestellt.

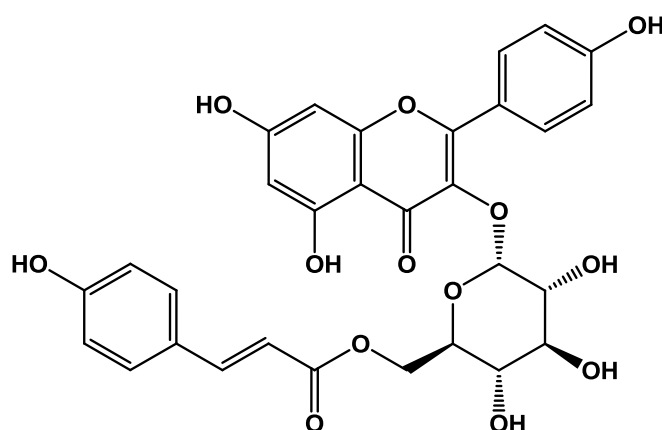


Abb. 5.15 Struktur von *trans*-Tilirosid mit einer TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) von 0,0 mmol TE/mmol Substanz. TE: Troloxäquivalente.

Weitere strukturelle Merkmale, die nach RICE-EVANS *et al.* (1996) zu einer hohen antioxidativen Kapazität phenolischer Substanzen beitragen, sind eine 2,3-Doppelbindung zusammen mit einer 4-Oxogruppe in Ring C des Flavonoidgrundgerüsts. Diese Strukturmerkmale begünstigen eine Elektronendelokalisierung im Ringsystem. Bei Kontakt der antioxidativen Substanz mit einem Radikal (z.B. ABTS^{•+}), wird das entstehende Phenoxylradikal effektiver stabilisiert. Ebenso steigern vorhandene 3- und 5-Hydroxylgruppen in Ring A des Flavonoidgrundgerüsts die Radikalfänger-eigenschaften und somit die antioxidative Kapazität eines Flavonoides (RICE-EVANS *et al.* 1996).

Weiterhin ist für Hydroxybenzoesäuren die höchste TEAC für Gallussäure beschrieben. Dies wird allgemein auf die drei verfügbaren Hydroxylgruppen des Benzolrings zurückgeführt. Eine höhere Anzahl an Hydroxylgruppen wirkt dem negativen Effekt der elektronenziehenden Carboxylgruppe auf die Protonenabgabe der phenolischen Hydroxylgruppen entgegen. Sowohl eine Substitution der Carboxyl- als auch der Hydroxylgruppen des Benzolrings (z.B. Methylierungen) reduzieren dagegen die TEAC von Hydroxybenzoesäuren (RICE-EVANS *et al.* 1996). Dieser Sachverhalt erklärt auch die signifikante Abweichung der absoluten TEAC von Gallussäure (Nr. 1; TEAC: 2,4 mmol TE/mmol Substanz) und Methylgallussäure (Nr. 23; TEAC: 0,9 mmol TE/mmol Substanz). In Abbildung 5.16 sind die Strukturen dieser Substanzen vergleichend dargestellt.

Ebenso kann möglicherweise die nicht detektierte TEAC für die mit Rhamnose substituierten Hydroxyferulasäurederivate (Nr. 24, Nr. 26 und Nr. 27) hierdurch erklärt werden.

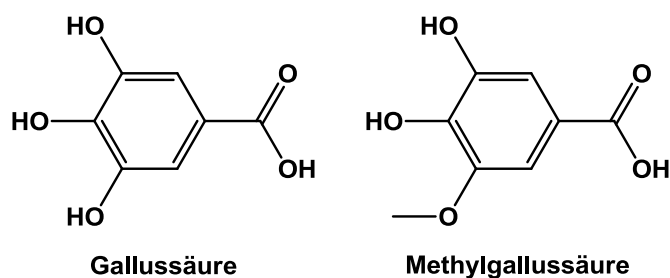


Abb. 5.16 Strukturen von Gallussäure mit einer TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) von 2,4 mmol TE/mmol Substanz und Methylgallussäure mit einer TEAC von 0,9 mmol TE/mmol Substanz. TE: Troloxäquivalente.

Für die Gruppe der Flavanole ist insbesondere eine signifikant höhere TEAC für 3',4',5'-Trihydroxyflavane im Vergleich zu den 3',4'-Dihydroxyflavanen in der Literatur beschrieben (MUZOLF *et al.* 2008). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde für das 3',4',5'-Trihydroxyflavanol Gallocatechin (Nr. 3) eine über 3-fach höhere TEAC (5,3 mmol TE/mmol Substanz) als für das 3',4'-Dihydroxyflavanol Catechin (Nr. 6) (1,5 mmol TE/mmol Substanz) bestimmt. Abbildung 5.17 zeigt die Strukturen dieser bioaktiven Flavanole.

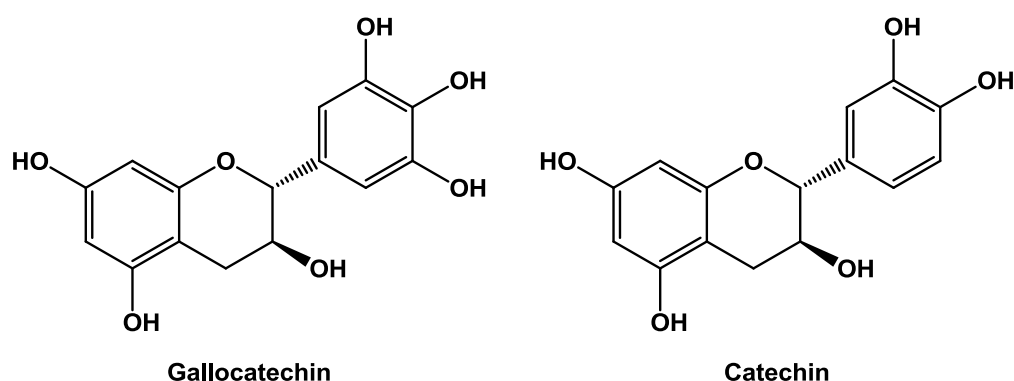


Abb. 5.17 Strukturen von Gallocatechin mit einer TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) von 5,3 mmol TE/mmol Substanz und von Catechin mit einer TEAC von 1,5 mmol TE/mmol Substanz. TE: Troloxäquivalente.

Insgesamt lieferten die mittels LC-onlineTEAC bestimmten antioxidativen Kapazitäten der einzelnen bioaktiven Inhaltsstoffe in *C. incanus* Tee eine wichtige Ergänzung zu den vorherigen Messungen der gesamten antioxidativen Kapazität mittels ESR-Spektroskopie. Somit kann nachfolgend anhand der absoluten TEAC der einzelnen Inhaltsstoffe deren theoretischer Anteil an der gesamten antioxidativen Kapazität des Tees berechnet werden. So wurden innerhalb der ESR-Messungen die höchsten Antioxidativitäten der methanolischen SPE-Eluat in Handelsprobe E gemessen. In diesem Eluat wurden

ebenfalls die höchsten Konzentrationen der antioxidativen Substanzen Gallocatechin (Nr. 3), Gallussäure (Nr. 1) sowie die zweithöchste Konzentration für Myricetin-3-O-glucosid (Nr. 11) der sieben analysierten Handelsproben gemessen. Beispielsweise lag im Vergleich zu Probe A mit der niedrigsten Gallocatechinkonzentration von 27,9 mg/100 g Teekraut der Gehalt dieses starken Antioxidans in Probe E bei 77,5 mg/100 g Teekraut. Probe A enthielt neben Gallocatechin auch die geringste Gallussäurekonzentration und zweitniedrigste Konzentration an Myricetin-3-O-glucosid der untersuchten Handelsproben. Hieraus resultierte vermutlich auch die geringe gesamte antioxidative Kapazität dieser Probe innerhalb der ESR-Messungen. Die Messwerte lagen für Probe E um über Faktor 2 über dem Wert der Probe A. Weiterhin wurde mittels ESR-Spektroskopie die höchste gesamte antioxidative Kapazität der Methanol/Ammoniak-SPE-Eluate in Handelsprobe F gemessen. Anhand der antioxidativen Kapazitäten der enthaltenen bioaktiven Substanzen kann dies durch die hohe Konzentration von HHDP-Glucose Isomer 1 (Nr. 28) von 41,1 mg/100 g Teekraut erklärt werden. Diese Substanz erzielte die höchste absolute TEAC der Inhaltsstoffe des Methanol/Ammoniak-SPE-Eluates. In Probe F wurde bezüglich dieser Substanz die zweithöchste Konzentration der analysierten Handelsproben gemessen. Den höchsten Wert erzielte hierbei Probe G, die zusätzlich auch höhere Konzentrationen der ebenfalls stark antioxidativen Substanz HHDP-Glucose Isomer 2 (Nr. 29) enthielt. Für das Methanol/Ammoniak-SPE-Eluat aus Probe G wurde jedoch mit einem Abbau von 25,2 mmol Fremy's Salz/100 g Teekraut eine geringfügig niedrigere gesamte antioxidative Kapazität mittels ESR-Spektroskopie gemessen als in Probe F mit einem Abbau von 27,1 mmol Fremy's Salz/100 g Teekraut. Über die Verteilung der bekannten phenolischen Inhaltsstoffe des Methanol/Ammoniak-SPE-Eluates ist diese niedrigere gesamte antioxidative Kapazität in Probe G nicht zu erklären. So müssten theoretisch die im Vergleich zu Probe F signifikant höheren Konzentrationen der HHDP-Glucose Isomere 1 und 2 (Nr. 28 und Nr. 29) die Abweichungen der Mehtylgallussäure- und Ellagsäurekonzentrationen zwischen den zwei Proben ausgleichen und somit zu einer deutlich höheren gesamten antioxidativen Kapazität in Probe Nr. 7 führen. Möglicherweise liegen somit in Probe F weitere, mittels LC-onlineTEAC nicht detektierte, Substanzen vor. Dabei könnte es sich z.B. um polymere phenolische Substanzen handeln, die durch Spritzenfiltration innerhalb der Probenaufarbeitung oder durch die LC-Vorsäule aufgrund ihrer Molekülgröße zurückgehalten wurden. Für die ESR-Messungen hingegen wurde keine Spritzenfiltration innerhalb der Probenaufarbeitung eingesetzt. Eine Detektion polymerer phenolischer Inhaltsstoffe ist somit mittels dieser Methode möglich. Die niedrigste innerhalb der Methanol/Ammoniak-SPE-Eluate mittels ESR-Spektroskopie gemessene gesamte antioxidative Kapazität in Probe A korrelierte wiederum sehr gut mit den geringen

Konzentrationen der HHDP-Glucose Isomere 1 und 2 (Nr. 28 und Nr. 29). Probe A enthielt mit 11,5 mg bzw. 48,0 mg/100 g Teekraut entsprechend die geringsten Gehalte dieser stark antioxidativen Ellagitannine.

Zusammenfassend resultiert aus den zuvor dargestellten Ergebnissen, dass für hohe antioxidative Kapazitäten in *C. incanus* Tee hohe Konzentrationen phenolischer Inhaltsstoffe aus einer großen Bandbreite phenolischer Substanzklassen verantwortlich sind. Ebenfalls sollte deren Stabilität innerhalb des Prozesses der Teezubereitung für die Beurteilung der Bioaktivität von *C. incanus* Tees berücksichtigt werden. In den nachfolgenden Kapiteln der vorliegenden Arbeit wurden daher mögliche Einflussfaktoren innerhalb der Teezubereitung auf die Stabilität der bioaktiven Substanzen näher untersucht. Ebenso wurde das Vorkommen bioaktiver Inhaltsstoffe in Blättern und Stängeln sowie deren Extraktion aus *C. incanus* Kraut verschiedener Partikelgrößen untersucht.

5.2.3 Isolierung phenolischer Substanzen für weiterführende Bioaktivitätstests

Für eine Charakterisierung potentieller Wirkungen der phenolischen Inhaltsstoffe aus *C. incanus* Tee wurden diese aus dem methanolischen SPE-Eluat isoliert und für weitere Untersuchungen zur Bioaktivität, z.B. bezüglich in der Literatur für *C. incanus* Extrakte beschriebener antimikrobieller sowie antiviraler Aktivitäten (vgl. Kapitel 2.3.5), bereitgestellt. Hierzu wurde anhand eines *Up-scaling*-Prozesses der analytischen LC-DAD-Methode eine präparative LC-DAD-Methode entwickelt. Insgesamt wurde die Mehrheit der im methanolischen SPE-Eluat identifizierten phenolischen Substanzen (Nr. 1 bis Nr. 22) mittels präparativen LC-DAD isoliert und für externe Analysen zur Verfügung gestellt. In Abbildung 5.18 ist das resultierende Chromatogramm für eine 1 mL Injektion des aufkonzentrierten methanolischen SPE-Eluates aus Probe A bei einer Wellenlänge von 280 nm dargestellt. Die Nummern in Klammern stehen analog zu den analytischen LC-DAD-Messungen für die identifizierten phenolischen Inhaltsstoffe (vgl. Tabelle 5.1). Für die Identifizierung der in den Fraktionen enthaltenen Substanzen wurden in den 14 präparativ gesammelten Fraktionen (F1 - F14) basierend auf dem Peakprofil der analytischen LC-DAD die vermutlich enthaltenen Substanzen zunächst zugeordnet. Diese wurden anschließend mittels analytischer LC-DAD-ESI-MS/MS anhand der UV-Spektren, Quasimolekülen und MS/MS-Fragmentierung bestätigt. Die analytischen Daten hierzu wurden bereits zuvor in Tabelle 5.1 dargestellt.

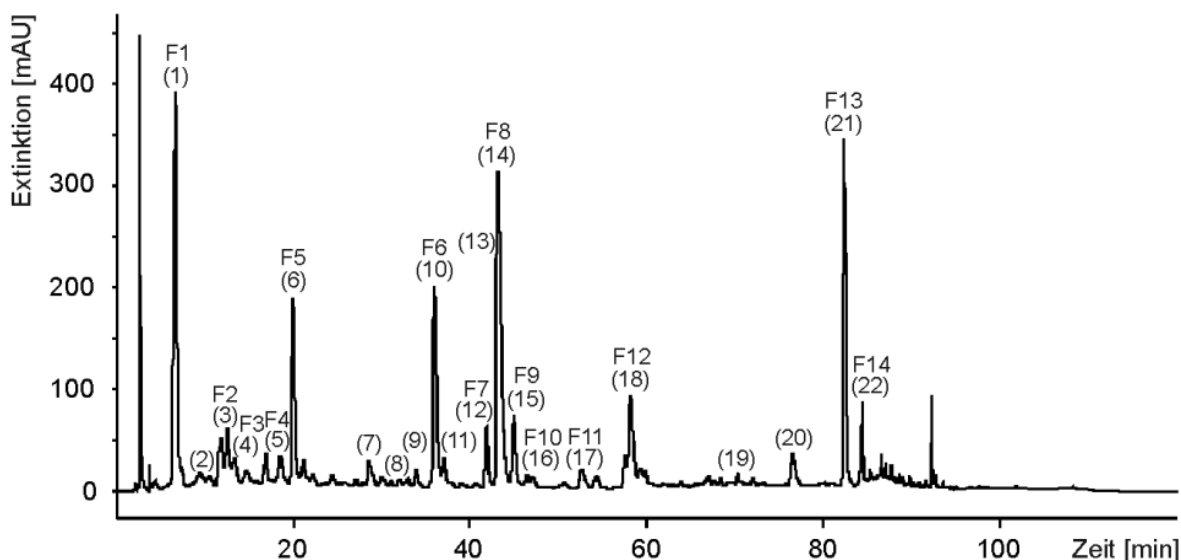


Abb. 5.18 Präparatives LC-DAD-Chromatogramm einer 1 mL Injektion des aufkonzentrierten methanolischen SPE-Eluates aus Probe A bei 280 nm. F1-F14: Gesammelte Fraktionen; (Nr. 1-Nr. 22): Identifizierte Substanzen. Die Bezeichnungen der identifizierten Substanzen sind in Tabelle 5.1 aufgeführt.

Aus 22 identifizierten Inhaltsstoffen wurden somit insgesamt 14 Substanzen (F1 bis F14) isoliert. Diese wurden anschließend wie unter Kapitel 4.8 beschrieben aufgearbeitet und als Feststoff für weitere Untersuchungen zur Bioaktivität bereitgestellt.

Weiterhin wurde die Reinheit der Fraktionen chromatographisch mittels analytischer LC-DAD ermittelt. Hierfür wurde jeweils die Peakfläche der isolierten Substanz bei einer Wellenlänge von 280 nm in das Verhältnis zur entsprechenden Gesamtpeakfläche sämtlicher eluierender Substanzen innerhalb der Messung gesetzt und als prozentualer Anteil berechnet. In Abbildung 5.19a-c sind für die isolierten Inhaltsstoffe die analytischen LC-DAD-Chromatogramme der Fraktionen a) F1 (Gallussäure), b) F7 (Myricetin-Oxylosid) sowie c) F13 (*trans*-Tilirosid) exemplarisch dargestellt.

In Tabelle 5.6 sind die abschließenden Daten zu den insgesamt 14, mittels präparativer LC-DAD aus dem methanolischen SPE-Eluat der *C. incanus* Tee Handelsprobe A isolierten, Substanzen dargestellt.

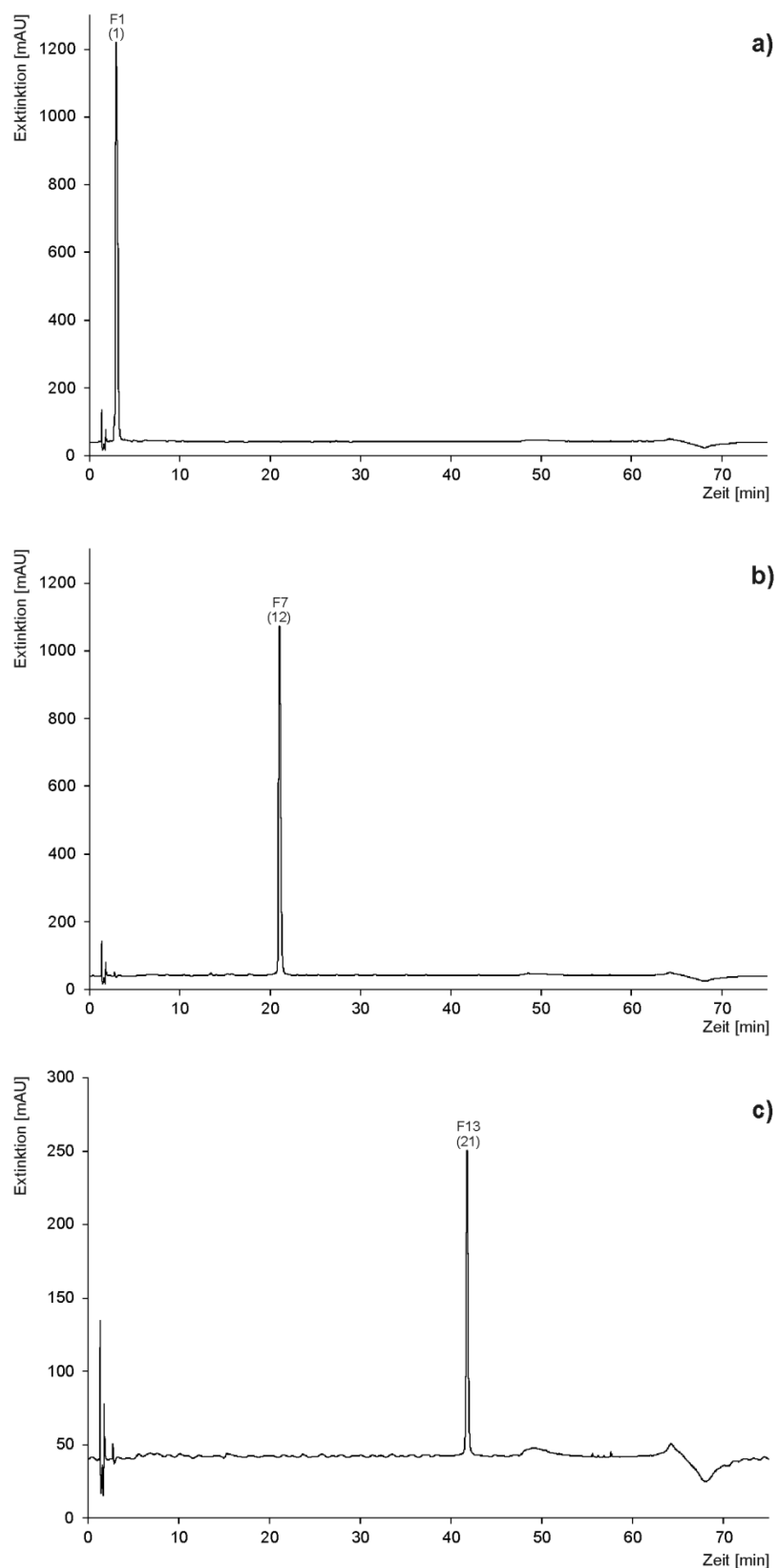


Abb. 5.19a-c Analytische LC-DAD-Chromatogramme der isolierten Fraktionen a) F1, b) F7 und c) F13 des methanolischen SPE-Eluates aus Probe A bei 280 nm. (Nr. 1): Gallussäure; (Nr. 12): Myricetin-*O*-xylosid; (Nr. 21): *trans*-Tilirosid. Analytische Daten der identifizierten Substanzen sind in Tabelle 5.1 aufgeführt.

Tab. 5.6 Isolierte Fraktionen (F1 bis F14) aus dem methanolischen SPE-Eluat der *C. incanus* Teeprobe A. Dargestellt sind die Elutionszeit (präparative LC-DAD), in der Fraktion identifizierte Substanzen (analytische Daten vgl. Tabelle 5.1), die chromatographische Reinheit sowie die Ausbeute (neun Injektionen) der Substanzen.

Fraktion Nr.	Elutionszeit [min]	Substanz (Nr.)	Reinheit [%]	Ausbeute [mg]
F1	5,80-7,00	Gallussäure (1)	98	5,7
F2	11,00-12,10	Gallocatechin (3)	80	5,3
F3	12,81-13,90	Gallocatechin-(4 α -8)-catechin oder Catechin-(4 α -8)-gallocatechin (4)	84	3,1
F4	17,90-19,00	Procyanidin B1 (5)	94	2,8
F5	19,41-20,30	Catechin (6)	97	6,4
F6	35,51-36,60	Myricetin-3-O-galactosid (10)	92	4,4
F7	41,15-42,30	Myricetin-O-xylosid (12)	100	2,7
F8	42,31-44,23	Rutin und Myricitrin (13 und 14)	98	8,0
F9	44,25-45,60	Quercetin-3-O-galactosid (15)	87	3,1
F10	45,71-46,40	Quercetin-3-O-glucosid (16)	72	2,5
F11	51,80-53,50	Quercetin-O-xylosid (17)	81	1,6
F12	57,60-58,40	Quercitrin (18)	95	2,5
F13	81,45-82,60	<i>trans</i> -Tilirosid (21)	100	2,2
F14	82,20-84,00	<i>cis</i> -Tilirosid (22)	69	2,1

Insgesamt konnten mittels der entwickelten Methode zur Isolierung phenolischer Inhaltsstoffe aus *C. incanus* Tee sechs phenolische Substanzen mit einer chromatographischen Reinheit von über 95 %, bzw. weitere sechs Substanzen mit einer Reinheit größer 80 %, jeweils in Mengen von mindestens 1,5 mg pro Substanz für weiterführende Untersuchungen zur Verfügung gestellt werden.

Ebenfalls wurden Versuche zur Löslichkeit der isolierten Substanzen in Wasser mit einem Zusatz von 50 % DMSO durchgeführt, um z.B. einen Einsatz in Zellkulturstudien zu gewährleisten. Eine sehr gute Löslichkeit wurde hierbei auch für hohe Konzentrationen von 5 mg/mL für die Testsubstanzen Gallussäure, Catechin und Rutin erzielt. Diese hohe Konzentration ist für die Herstellung von Stammlösungen für viele Assays ein entscheidender Aspekt.

Die aus den extern durchgeführten Bioaktivitätstests resultierenden Ergebnisse zu den Wirkungen der isolierten phenolischen Substanzen dürfen aus Gründen der Geheimhaltung zum derzeitigen Zeitpunkt nicht in der vorliegenden Dissertation veröffentlicht werden.

5.2.4 Tea Cream-Charakterisierung

Unter dem Begriff *Tea Cream* wird meist ein Präzipitat bezeichnet, das beim Abkühlen von Tee beobachtet wird (JÖBSTL *et al.* 2005). Ein weiteres Erscheinungsbild der *Tea Cream* ist die Bildung eines ölig aussehenden Filmes aus komplexierten phenolischen Substanzen auf der Teeoberfläche (TANIZAWA *et al.* 2007). Nach ROBERTS (1963) stellt die *Tea Cream* einen Komplex aus Koffein, Theaflavinen und Thearubigenen in schwarzem Tee (*Camellia sinensis*) dar. Aber auch in entkoffeinierten schwarzen Tee wurde eine *Tea Cream* Bildung bereits beobachtet (PENDERS *et al.* 1998). Für *C. incanus* Tee wurde dieses Phänomen noch nicht in der Literatur beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde dennoch von einer *Tea Cream* Bildung in *C. incanus* Tee ausgegangen, da hohe Konzentrationen reaktiver phenolischer Substanzen aus verschiedenen Substanzklassen zuvor im Tee nachgewiesen wurden. Hierunter waren insbesondere hohe Gehalte verschiedener monomerer und dimerer Flavanole. Nach CHAO und CHIANG (1999) sind dies die Hauptkomponenten, die an der *Tea Cream* Bildung in semifermentierten Tees beteiligten Substanzen. Darüber hinaus beschrieben JÖBSTL *et al.* (2005) eine Komplexierung der phenolischen Substanzen Gallussäure und Quercitrin innerhalb des Prozesses der *Tea Cream* Bildung. Diese phenolischen Substanzen wurden auch in *C. incanus* Tee in hohen Konzentrationen in den sieben untersuchten Handelsproben quantifiziert (vgl. Kapitel 5.1.2). Neben Art und Konzentration der phenolischen Inhaltsstoffe stellt nach JÖBSTL *et al.* (2005) insbesondere die Konzentration von Calciumionen des innerhalb der Teezubereitung eingesetzten Kochwassers einen entscheidenden Faktor für die Präzipitation phenolischer Teeinhaltsstoffe dar.

Um eine mögliche *Tea Cream* Bildung in *C. incanus* Tee zu untersuchen wurde exemplarisch Probe C mittels der in Kapitel 4.12 beschriebenen Methode unter Einsatz von Mineralwasser (pH 7,6; 20°dH) und Millipore®-Wasser (pH 5,8; 0°dH) aufgearbeitet und für eine Woche bei 5 °C kühl gelagert. In dem mit Millipore®-Wasser aufgearbeiteten Tee wurde anschließend weder ein Präzipitat (Bodensatz) noch ein Oberflächenfilm und somit keine *Tea Cream* beobachtet. Für den unter Verwendung von Mineralwasser aufgearbeiteten Tee war hingegen sowohl ein Präzipitat als auch ein Oberflächenfilm deutlich zu erkennen. In Abbildung 5.20 ist der resultierende Film auf der Oberfläche von Handelsprobe C zur Veranschaulichung dargestellt. Die gesamte antioxidative Kapazitäten des Oberflächenfilm, des Präzipitates sowie des Teeüberstandes wurden anschließend mittels ESR-Spektroskopie bestimmt, um hieraus Erkenntnisse bezüglich einer Komplexierung antioxidativer Substanzen in *C. incanus* Tee zu erhalten.

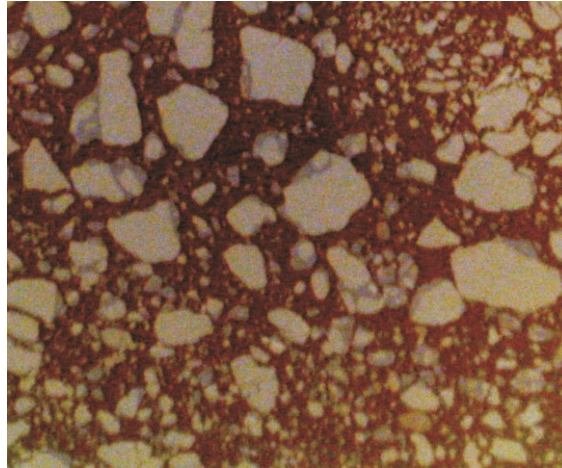


Abb. 5.20 *Tea Cream* in Form eines dünnen Oberflächenfilmes auf *C. incanus* Teeprobe C (Zubereitung mit Mineralwasser: pH 7,6; 20°dH; vgl. Kapitel 4.12) nach einer Lagerzeit von einer Woche bei einer Temperatur von 5 °C.

In Abbildung 5.21 sind die Fremy's Salz Abbaukinetiken (30 min) aus den ESR-Messungen der *C. incanus Tea Cream* (Oberflächenfilm und Präzipitat) dargestellt. Als Vergleich sind die Kinetiken der mit Millipore®-Wasser zubereiteten Teeprobe sowie des Dinatriumhydrogenphosphatpuffers (0,05 mol/L, pH 7,4 bei 20 °C) als Blindwert dargestellt. Deutlich erkennbar ist, dass der Überstand des mit Mineralwasser zubereiteten *C. incanus* Tees eine signifikant geringere gesamte antioxidative Kapazität, d.h. einen geringeren Abbau an Fremy's Salz nach 30 min Reaktionszeit, verglichen mit dem analog hierzu mit Millipore®-Wasser zubereiteten Tees aufwies. Weiterhin wurde für die mehrfach gewaschene *Tea Cream*, d.h. Präzipitat und Oberflächenfilm, eine hohe gesamte antioxidative Kapazität gemessen. Diese lag für den Oberflächenfilm ca. 1000-fach und für den Bodensatz ca. 2000-fach über der gesamten antioxidativen Kapazität des zugehörigen wässrigen Überstandes (Tee). Somit liegen in *C. incanus Tea Cream* vermutlich komplexierte Inhaltsstoffe mit hohen antioxidativen Kapazitäten vor. In der mit Millipore®-Wasser zubereiteten Referenzprobe hingegen lagen diese bioaktiven Substanzen gelöst im Tee vor. Durch den Verdünnungseffekt des Kochwassers resultierte für den Tee im Vergleich zu Oberflächenfilm und Präzipitat eine geringere gesamte antioxidative Kapazität. Diese war entsprechend im mit Millipore®-Wasser zubereiteten *C. incanus* Tee (Überstand) über 2,5-fach höher als im mit Mineralwasser aufgearbeiteten Tees (Überstand). Genauere Aussagen zur Struktur der Substanzen in *C. incanus Tea Cream* können jedoch nicht mittels der vorliegenden Daten gegeben werden. Aufgrund der äußerst geringen Löslichkeit der *Tea Cream* waren keine LC-DAD- oder ESI-MS/MS-Messungen dieser Proben zur Strukturaufklärung möglich. Auch liegen in der Literatur bisher keine genauen Ergebnisse zur Struktur der *Tea Cream* vor.

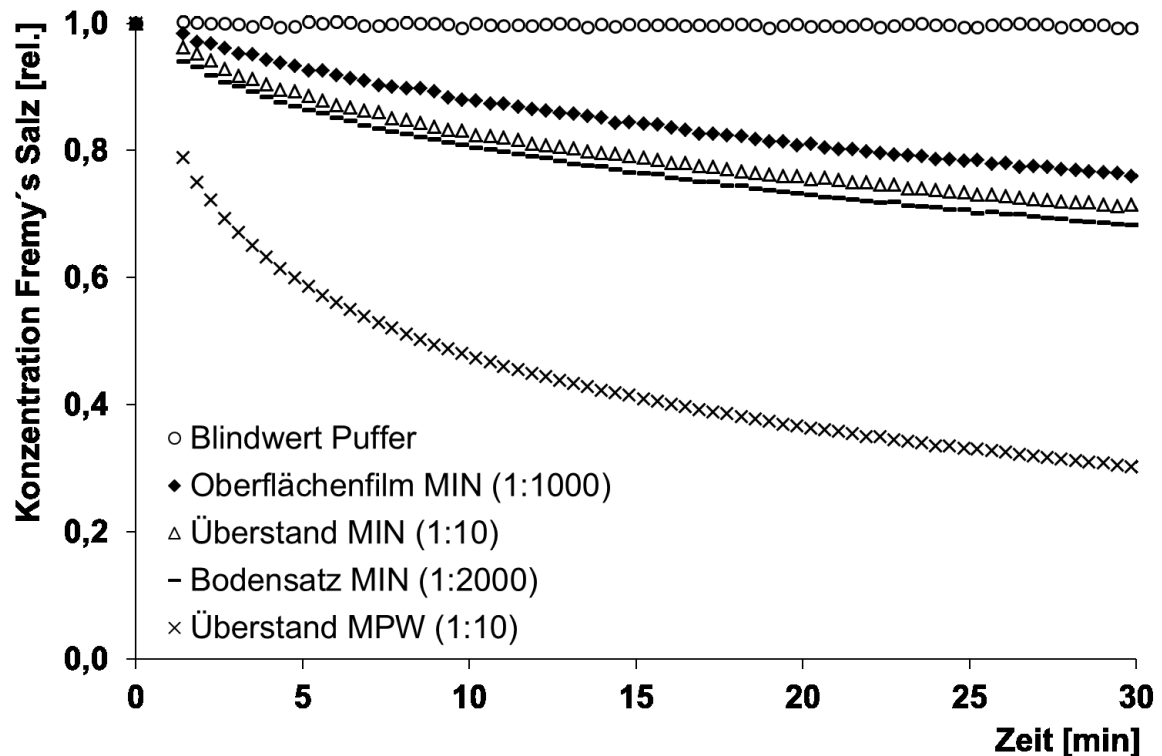


Abb. 5.21 Fremy's Salz Abbaukinetiken innerhalb der Messungen zur Bestimmung der gesamten antioxidativen Kapazität von *C. incanus* Tea Cream mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie. Dargestellt sind die Kinetiken für Oberflächenfilm, Präzipitat und Teeüberstand aus, unter Verwendung von Mineralwasser (MIN) zubereiteter, Handelsprobe C nach Lagerung für eine Woche bei 5 °C. Als Vergleich ist die Kinetik des Teeüberstandes aus einer Zubereitung mit Millipore®-Wasser (MPW) dargestellt. Teezubereitung vgl. Kapitel 4.12. Verdünnungen der Proben mit jeweiligem Kochwasser sind in Klammern dargestellt.

Zusammenfassend resultiert aus den Ergebnissen, dass bei Verwendung von mineralstoffreichem Kochwasser während des Abkühlens und Lagerung von *C. incanus* Tee eine *Tea Cream* entsteht. Diese enthält antioxidative Inhaltsstoffe. Somit kann allgemein für die Zubereitung von *C. incanus* Tees, mit Blick auf hohe Gehalte bioaktiver Inhaltsstoffe, die Verwendung von mineralstoffarmen Kochwässern empfohlen werden. Vorwiegend stellt eine Bildung von *Tea Cream* jedoch ein Problem für die Konsumenten und Hersteller gekühlter *Ready-to-drink*-Tees dar. Hier bildet sich bei Lagerung im Kühlschrank ein optisch unerwünschtes Präzipitat aus bioaktiven Substanzen. Bei einem Verzehr dieser Tees ist zudem der Verbleib der *Tea Cream*, z.B. wird an der Verpackung anhaftendes Präzipitat entsorgt, ebenso wie deren Bioverfügbarkeit noch ungeklärt. Bei einem Verzehr des frisch zubereiteten, heißen Tees liegen die bioaktiven Substanzen hingegen in Lösung vor. Hier wurde außer eines minimal ausgeprägten Oberflächenfilmes keine *Tea Cream* Bildung in *C. incanus* Tee beobachtet.

5.3 Einfluss ausgewählter Parameter der Teezubereitung auf die Konzentrationen bioaktiver phenolischer Inhaltsstoffe in *C. incanus* Tee

Innerhalb der Zubereitung von *C. incanus* Tees können verschiedene Parameter einen Einfluss auf die Extraktion, die Stabilität und somit letztendlich auf die Konzentrationen bioaktiver phenolischer Substanzen im trinkfertigen Tee haben. Aktuell liegt die Herstellerempfehlung für die Zubereitung von Handelsprobe A beispielsweise bei einer Einwaage von ca. 15 g Teekraut/Liter Kochwasser und einer Kochzeit von 5 min. Detailliertere Angaben bezüglich des optimalen Kochwassers, z.B. Wasserhärte, enthaltene Ionen oder pH-Wert, sowie eine genaue Temperaturangabe wurden für keine der sieben untersuchten *C. incanus* Tee Handelsproben angegeben. Nachfolgend werden daher der Einfluss verschiedener Kochwässer, Kochtemperaturen und Kochzeiten innerhalb der Teezubereitung auf die Konzentrationen der quantifizierten bioaktiven Inhaltsstoffe in *C. incanus* Tee untersucht.

5.3.1 Einfluss des Kochwassers

Nachfolgend wurde der Effekt des eingesetzten Kochwassers innerhalb der Zubereitung von *C. incanus* Tee auf die Konzentrationen 21 quantifizierter phenolischer Inhaltsstoffe analysiert. Insbesondere zur Untersuchung der thermischen Stabilität und der Extraktion dieser Substanzen wurde hierzu Handelsprobe A bei einer Temperatur von 95 °C für 60 min mit drei verschiedenen Kochwässern nach der in Kapitel 4.2 beschriebenen Methode aufgearbeitet und anschließend mittels LC-DAD vermessen. Die Kochwässer umfassten hierbei Mineralwasser (pH 7,6; 20°dH) Leitungswasser (Trinkwasserqualität, pH 7,2; 6°dH) und Millipore®-Wasser (pH 5,8; 0°dH). In Abbildung 5.22a-f sind die aus den Kochversuchen resultierenden Konzentrationen der 21 quantifizierten phenolischen *C. incanus* Inhaltsstoffe entlang sechs ausgewählter Substanzklassen a) Phenolsäuren, b) monomere und dimere Flavanole, c) Myricetinglycoside, d) Quercetinglycoside, e) Tilirosidisomere und f) Ellagitannine dargestellt.

Innerhalb der Klasse der Phenolsäuren (Abb. 5.22a) wurden alle sechs quantifizierten Substanzen in *C. incanus* Tee detektiert, der mit Millipore®-Wasser zubereitet wurde. In den Tees, die mit Mineralwasser oder mit Leitungswasser aufgebraut wurden, konnte hingegen ausschließlich Ellagsäure (Nr. 31) in stark ansteigenden Konzentrationen von 3,9 mg und 19,2 mg/100 g Teekraut gemessen werden.

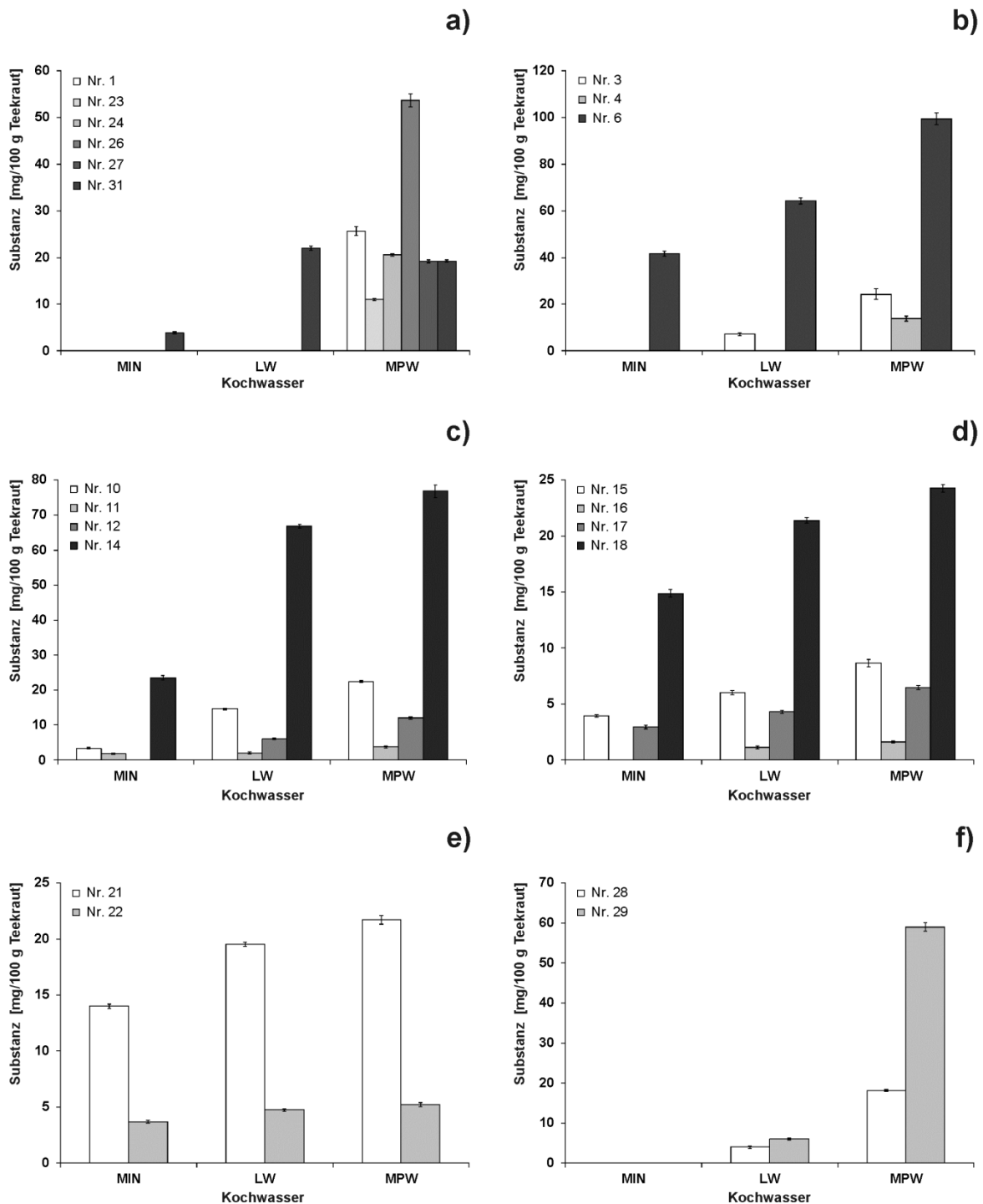


Abb. 5.22a-f Konzentrationen der 21 quantifizierten phenolischen Inhaltsstoffe in *C. incanus* Tee Handelsprobe A in Abhängigkeit des innerhalb der Teezubereitung (Zubereitung vgl. Kapitel 4.2; Kochdauer 60 min) eingesetzten Kochwassers. a) Phenolsäuren, b) monomere und dimere Flavanole, c) Myricetinglycoside, d) Quercetinglycoside, e) Tilirosidisomere und f) Ellagitannine. MIN: Mineralwasser (pH 7,6; 20°dH); LW: Leitungswasser (Trinkwasserqualität, pH 7,2; 6°dH); MPW: Millipore®-Wasser (pH 5,8; 0°dH). Zugehörige Substanzbezeichnungen sind in Tabelle 5.1 sowie 5.2 und Beschreibungen der Probe in Tabelle 4.1 dargestellt.

Somit hatte das Kochwasser einen signifikanten Einfluss auf die Konzentrationen der Phenolsäuren im trinkfertigen *C. incanus* Tee. Da die pH-Werte der drei eingesetzten Kochwässer nur geringfügig voneinander abwichen (pH 5,8 bis pH 7,6) lag hier vermutlich ein Effekt der Wasserhärte bzw. der Ionenkonzentrationen des Kochwassers auf die Gehalte der Phenolsäuren in *C. incanus* Tee vor. Dies ist vermutlich auf die Bildung einer *Tea-Cream* zurückzuführen. Nach JÖBSTL *et al.* (2005) sind an der *Tea Cream* Bildung vor allem im Kochwasser enthaltene Ionen und insbesondere Calciumionen beteiligt. Hohe Konzentrationen an Calciumionen können die Struktur des Teekrautes modifizieren, was zu geringeren Extraktionsausbeuten phenolischer Substanzen sowohl im sauren als auch im alkalischen pH-Bereich führt (COUZINET-MOSSION *et al.* 2010). Diese Strukturmodifikation resultiert dabei aus einer Bindung von Calciumionen an Pektin der Blattzellwände (MOSSION *et al.* 2008). Durch die nur in Spuren in Millipore®-Wasser enthaltenen Ionen können somit möglicherweise die hohen Gehalte phenolischer Substanzen im resultierenden Tee erklärt werden. Aus den hohen, in Mineralwasser enthaltenen, Konzentrationen verschiedener Ionen ergeben sich hingegen geringe Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe im trinkfertigen *C. incanus* Tee. Diese bioaktiven Substanzen liegen in diesem Fall komplexiert als Präzipitat sowie als Oberflächenfilm (*Tea Cream*) vor und werden zusätzlich aufgrund struktureller Veränderungen des Teekrautes weniger effektiv extrahiert.

Bezüglich eines Einflusses des Kochwassers auf die Konzentrationen der monomeren und dimeren Flavanole (Abb. 5.22b) wurden ebenfalls alle drei quantifizierten Substanzen dieser Klasse in *C. incanus* Tee detektiert, der mit Millipore®-Wasser zubereitet wurde. In Tee, der hingegen mit Mineralwasser extrahiert wurde, wurde ausschließlich Catechin (Nr. 6) quantifiziert werden. Insgesamt wurde Catechin ausgehend von einer Zubereitung mit Mineralwasser über Leitungswasser zu Millipore®-Wasser in signifikant ansteigenden Konzentrationen von 41,6 mg, 64,2 mg und 99,5 mg/100 g Teekraut für Probe A bestimmt. Gallocatechin (Nr. 3) wurde hingegen nur in Tee gemessen, der unter Verwendung von Leitungs- oder Millipore®-Wasser, hergestellt wurde. Die entsprechenden Konzentrationen lagen hier bei 7,1 mg bzw. 24,3 mg/100 g Teekraut. Die Ergebnisse bezüglich der Gehalte von Catechin und Gallocatechin in Abhängigkeit des verwendeten Kochwassers und einer möglichen damit einhergehenden *Tea Cream* Bildung können auch durch LIANG *et al.* (2002) bestätigt werden. Diese beschrieben für Gallocatechin eine stärkere Präzipitation als für Catechin und führten dies allgemein auf die unterschiedliche Anzahl der Hydroxylgruppen zurück. Weiterhin wurde das Dimer Gallocatechin-(4 α -8)-catechin (Nr. 4) innerhalb der durchgeführten Kochversuche nur in *C. incanus* Tee detektiert, der mit Millipore®-Wasser zubereitet wurde. Auch hierbei stellt

eine mögliche Präzipitation dieser bioaktiven phenolischen Substanz durch höhere Ionenkonzentrationen in Leitungs- und Mineralwasser die vermutliche Ursache dar. Dies kann auch durch die Ergebnisse von JÖBSTL *et al.* (2005) belegt werden, die eine verstärkte *Tea Cream* Bildung für Substanzen mit einer großen Molekülgröße beschrieben. Somit präzipitieren Dimere der Flavanole stärker als deren Monomere.

Für die bioaktiven Myricetinglycoside (Abb. 5.22c) wurden sukzessiv zunehmende Konzentrationen dieser bioaktiven Inhaltsstoffe für *C. incanus* Tee beginnend mit einer Zubereitung mit Mineralwasser, über Leitungswasser zu Millipore®-Wasser gemessen. So stiegen z.B. die Konzentration von Myricitrin (Nr. 14) von 23,5 mg über 66,9 mg auf 76,9 mg/100 g Teekraut oder die Gehalte von Myricetin-3-O-galctosid (Nr. 10) von 3,4 mg über 14,6 mg auf 22,5 mg/100 g Teekraut. Eine Ausnahme stellte hierbei Myricetin-O-xylosid (Nr. 12) dar. Diese Substanz wurde im Gegensatz zu den strukturell verwandten Myricetinglycosiden nicht in Tee detektiert, der mit Mineralwasser zubereitet wurde. Eine plausible Erklärung für diese Beobachtung wurde bisher noch nicht gefunden.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die Quercetinglycoside (Abb. 5.22d) beobachtet. Auch für diese bioaktiven Substanzen wurden zunehmende Konzentrationen in *C. incanus* Tee beginnend mit einer Zubereitung mit Mineralwasser, über Leitungswasser zu Millipore®-Wasser gemessen. So nahmen z.B. die Konzentration von Quercitrin (Nr. 18) von 14,9 mg über 21,4 mg auf 24,3 mg/100 g Teekraut oder die Gehalte von Quercetin-3-O-galactosid (Nr. 15) von 3,9 mg über 6,0 mg auf 8,7 mg/100 g Teekraut zu. Eine Ausnahme stellte innerhalb dieser Substanzklasse Quercetin-3-O-glucosid (Nr. 16) dar. Dieser phenolische Inhaltsstoff wurde im Gegensatz zu den strukturell verwandten Glycosiden nicht in Tee detektiert, der mit Mineralwasser zubereitet wurde. In Tee, der mit Leitungswasser oder Millipore®-Wasser hergestellt wurde, waren jedoch vergleichbare Konzentrationen von 1,1 mg und 1,6 mg/100 g Teekraut enthalten.

Weiterhin wurde bezüglich der Konzentrationen der Tilirosidisomere (Abb. 5.22e) nur ein geringer Einfluss des innerhalb der Teezubereitung verwendeten Kochwassers festgestellt. Sowohl *trans*-Tilirosid (Nr. 21) als auch *cis*-Tilirosid (Nr. 22) wurden bei Einsatz der drei Kochwässer im trinkfertigen Tee quantifiziert. Die Konzentration von *trans*-Tilirosid stieg beginnend bei einer Verwendung von Mineralwasser über Leitungswasser zu Millipore®-Wasser an. Der Gehalt dieses phenolischen Inhaltsstoffes lag hier jeweils bei 14,0 mg, 19,5 mg und 21,7 mg/100 g Teekraut. Die Konzentrationen von *cis*-Tilirosid hingegen stiegen nur leicht von 3,7 mg über 4,8 mg bis auf 5,2 mg/100 g Teekraut an.

Insgesamt waren somit die Konzentrationen der Flavonoidglycoside deutlich weniger vom eingesetzten Kochwasser und den darin enthaltenen Ionen abhängig, als die Phenolsäuren und Flavanole. Nach JÖBSTL *et al.* (2005) hängt dies vermutlich mit der höheren Löslichkeit der Glycoside im Vergleich zu nicht glycosylierten Substanzen zusammen. Eine verringerte *Tea Cream* Bildung sowie damit einhergehende niedrigere Konzentrationen bioaktiver Substanzen in Tee können somit möglicherweise auch durch einen Zuckerzusatz während der Teeherstellung reduziert werden. Hierdurch werden nach JÖBSTL *et al.* (2005) Glycosylierungen phenolischer Substanzen begünstigt und deren Löslichkeit im Tee gesteigert.

In der Klasse der Ellagitannine (Abb. 5.22f) wurde für die Konzentration der HHDP-Glucose Isomere 1 und 2 (Nr. 28 und Nr. 29) ein signifikanter Einfluss des innerhalb der Zubereitung von *C. incanus* Tee eingesetzten Kochwassers beobachtet. Diese Isomere waren bei Verwendung von Mineralwasser nicht im Tee enthalten und wurden auch bei einer Zubereitung mit Leitungswasser nur in geringen Konzentrationen von 4,0 mg und 6,0 mg/100 g Teekraut quantifiziert. Erfolgte die Aufarbeitung des *C. incanus* Teekrautes hingegen mit Millipore®-Wasser, so waren diese bioaktiven phenolischen Substanzen in signifikant höheren Konzentrationen von 18,1 mg und 59,0 mg/100 g Teekraut enthalten. Insgesamt komplexieren Ellagitannine somit vermutlich in Abhängigkeit zur Ionenkonzentration des Kochwassers innerhalb des Prozesses der Teezubereitung. Diese Präzipitation geht letztendlich mit niedrigen Konzentrationen dieser bioaktiven Substanzen im trinkfertigen *C. incanus* Tee einher.

Zusammenfassend kann für den Einfluss des innerhalb der Zubereitung von *C. incanus* Tee eingesetzten Kochwassers auf die Konzentrationen bioaktiver Substanzen gesagt werden, dass einige der phenolischen Inhaltsstoffe in Abhängigkeit von den im Kochwasser enthaltenen Ionen zu einer *Tea-Cream* Bildung neigen. Diese wurde bei einer Verwendung von Mineral- und Leitungswasser in Form eines Oberflächenfilmes sowie als Präzipitat beim Abkühlen von *C. incanus* Tee beobachtet. Zuvor wurde zudem gezeigt, dass diese *Tea Cream* eine hohe gesamte antioxidative Kapazität aufweist. Somit ist von einem Vorkommen bioaktiver *C. incanus* Inhaltsstoffe in der *Tea Cream* und damit einhergehenden niedrigeren Konzentrationen im resultierenden Tee auszugehen. Bei einer Verwendung von Millipore®-Wasser hingegen wurde weder ein Präzipitat noch ein Oberflächenfilm für *C. incanus* Tee beobachtet. Zusätzlich waren in diesem Tee signifikant höhere Konzentrationen von 20 der 21 quantifizierten phenolischen Substanzen enthalten. Eine Ausnahme stellte hierbei Ellagsäure dar, die in leicht höheren Konzentrationen in Tee quantifiziert wurde, der unter Verwendung von Leitungswasser

zubereitet wurde. Abschließend kann daher für hohe Konzentrationen bioaktiver phenolischer Substanzen in *C. incanus* Tee ein Kochwasser mit einer möglichst niedrigen, aber physiologisch für den Menschen verträglichen, Ionenkonzentration empfohlen werden. Zur Absicherung und Präzisierung dieser allgemeinen Empfehlung sollten zusätzlich in weiterführenden Versuchsreihen der Effekt definierter Ionenkonzentrationen und -zusammensetzungen im Kochwasser auf die Konzentrationen phenolischer Substanzen verschiedener *C. incanus* Teeproben untersucht werden.

5.3.2 Einfluss der Kochtemperatur

Um einen möglichen Effekt der Kochtemperatur auf die Extraktion sowie die thermische Stabilität der phenolischen Inhaltsstoffe in *C. incanus* Tee zu untersuchen, wurde exemplarisch Handelsprobe A bei einer Temperatur von 70 °C, 85 °C und 95 °C unter Verwendung von Millipore®-Wasser nach der in Kapitel 4.2 beschriebenen Methode aufgearbeitet. In den hieraus resultierenden Extrakten wurden anschließend die phenolischen Substanzen mittels LC-DAD analysiert. In Abbildung 5.23a-f sind die aus den Kochversuchen resultierenden Konzentrationen der 21 quantifizierten *C. incanus* Inhaltsstoffe entlang der sechs ausgewählten Substanzklassen a) Phenolsäuren, b) monomere und dimere Flavanole, c) Myricetinglycoside, d) Quercetinglycoside, e) Tilirosidisomere und f) Ellagitannine dargestellt.

In der Klasse der Phenolsäuren (Abb. 5.23a) wurden für einige Substanzen, darunter Hydroxyferulasäure-5-O-rhamnosid (Nr. 24), Hydroxyferulasäure-4-O-rhamnosid (Nr. 26) und Ellagsäure (Nr. 31), minimal höhere Konzentrationen durch eine Zubereitung bei 95 °C verglichen mit einer Kochtemperatur von 70 °C erzielt. Die entsprechenden Gehalte dieser Inhaltsstoffe lagen bei einer Kochtemperatur von 95 °C bei 29,1 mg, 60,3 mg und 11,8 mg/100 g Teekraut. Bei einer Temperatur von 70 °C wurden hingegen nur Konzentrationen von 12,2 mg, 50,6 mg und 4,2 mg/100 g Teekraut gemessen. Weiterhin resultierten bei einer Steigerung der Kochtemperatur von 70 °C auf 85 °C keine signifikanten Abweichungen innerhalb der Konzentrationen der sechs quantifizierten Substanzen aus der Klasse der Phenolsäuren. Bezüglich der Konzentrationen von Gallussäure (Nr. 1) und Methylgallussäure (Nr. 23) wurde zudem keinerlei Abweichungen der Konzentrationen bei allen drei untersuchten Extraktionstemperaturen beobachtet. Bei einer Kochzeit von 5 min waren die Phenolsäuren und deren Derivate in *C. incanus* Probe A somit thermisch stabil. Auch hohe Kochtemperaturen von 95 °C bewirkten keinen Abbau dieser Substanzen.

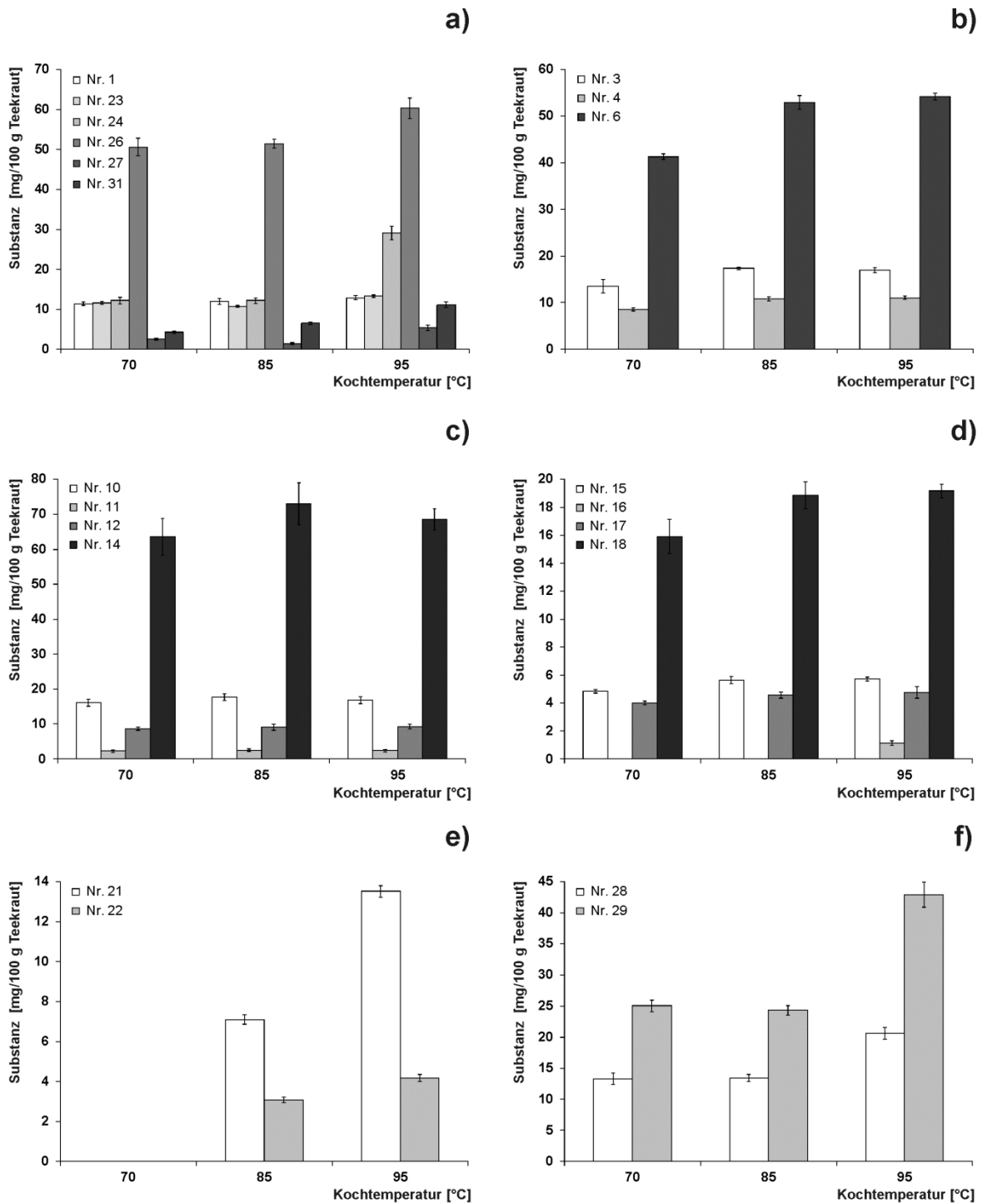


Abb. 5.23a-f Konzentrationen der 21 quantifizierten phenolischen Inhaltsstoffe in *C. incanus* Tee Handelsprobe A in Abhängigkeit der Kochtemperatur innerhalb der Teezubereitung (Zubereitung vgl. Kapitel 4.2). a) Phenolsäuren, b) monomere und dimere Flavanole, c) Myricetinglycoside, d) Quercetinglycoside, e) Tilirosidisomere und f) Ellagitannine. Zugehörige Substanzbezeichnungen sind in Tabelle 5.1 sowie 5.2 und Beschreibungen der Probe in Tabelle 4.1 dargestellt.

Innerhalb der Klasse der Flavanole (Abb. 5.23b) wurde bei einer Änderung der Kochtemperatur von 70 °C auf 85 °C innerhalb der Teezubereitung eine signifikante Zunahme der Konzentrationen von Gallocatechin (Nr. 3), Gallocatechin-(4 α -8)-catechin (Nr. 4) sowie Catechin (Nr. 6) gemessen. Die Konzentrationen dieser bioaktiven Inhaltsstoffe lagen nach Extraktion bei 70 °C bei 13,5 mg, 8,5 mg und 41,3 mg/100 g Teekraut. Erfolgte hingegen die Zubereitung bei einer Temperatur von 85 °C so stiegen die Werte auf 17,3 mg, 10,8 mg und 54,2 mg/100 g Teekraut. Aus einer weiteren Erhöhung der Kochtemperatur von 85 °C auf 95 °C resultierte hingegen kein weiterer Konzentrationsanstieg dieser Substanzen in *C. incanus* Tee. Für Gallocatechin wurde sogar eine leichte Abnahme der Konzentration auf 16,9 mg/100 g Teekraut beobachtet. Diese lag jedoch im Bereich der Standardabweichung und wurde daher als nicht signifikant betrachtet. Insgesamt erfolgte somit für die drei quantifizierten Flavanole in *C. incanus* Tee eine effektivere Extraktion bei einer Temperatur von 85 °C verglichen mit einer Kochtemperatur von 70 °C.

Für die Myricetinglycoside (Abb. 5.23c) wurde ebenfalls eine leichte Zunahme der Konzentrationen bei einer Erhöhung der Kochtemperatur von 70 °C auf 85 °C beobachtet. Diese stiegen beispielsweise für Myricetin-3-O-galactosid (Nr.10) von 16,1 mg auf 17,7 mg/100 g Teekraut und für Myricitrin (Nr. 14) von 63,7 mg auf 73,1 mg/100 g Teekraut. Aufgrund der relativ hohen Standardabweichungen sind diese Tendenzen jedoch als nicht signifikant zu betrachten. Weiterhin wurde nach einer Erhöhung der Kochtemperatur von 85 °C auf 95 °C ebenfalls keine signifikante Veränderung der Konzentrationen beobachtet. Bei direkter Betrachtung der Mittelwerte hingegen war eine leichte Abnahme der quantifizierten Myricetinglycoside zu erkennen.

Weiterhin wurde auch für die Quercetinglycoside (Abb. 5.23d) ein leichter Konzentrationsanstieg bei einer Erhöhung der Kochtemperatur von 70 °C auf 85 °C beobachtet. Hierbei stiegen die Gehalte für Quercetin-3-O-galactosid (Nr. 15) geringfügig von 4,8 mg auf 5,7 mg/100 g. Entsprechend hierzu wurde für Quercitrin (Nr. 18) ein signifikanter Konzentrationsanstieg von 15,9 mg auf 19,2 mg/100 g Teekraut gemessen. Eine weitere Erhöhung der Kochtemperatur auf 95 °C erzielte für die quantifizierten Quercetinglycoside, mit Ausnahme von Quercetin-3-O-glucosid (Nr. 16), bei einer Extraktionsdauer von 5 min keine höheren Konzentrationen im trinkfertigen Tee. Quercetin-3-O-glucosid hingegen wurde erst bei einer Kochtemperatur von 95 °C in einer Konzentration von 1,1 mg/100 g Teekraut quantifiziert. Bei den niedrigeren untersuchten Extraktionstemperaturen von 70 °C und 85 °C wurde diese Substanz vermutlich nicht aus *C. incanus* Teekraut innerhalb der Kochzeit von 5 min extrahiert.

Bezüglich der Konzentrationen der Tilirosidisomere (Abb. 5.23e) wurde ein signifikanter Einfluss der Kochtemperatur innerhalb des Prozesses der Teezubereitung beobachtet. So wurde bei einer Extraktionstemperatur von 70 °C keines der beiden Isomere detektiert. Bei Kochtemperaturen von 85 °C und 95 °C hingegen wurde sowohl *trans*-Tilirosid (Nr. 21) als auch *cis*-Tilirosid (Nr. 22) in ansteigenden Konzentrationen gemessen. Die Gehalte stiegen hierbei deutlich für *trans*-Tilirosid von 7,1 mg auf 13,5 mg/100 g Teekraut und für *cis*-Tilirosid von 3,1 mg auf 4,2 mg/100 g Teekraut. Beide Isomere sind somit während einer Kochzeit von 5 min bei einer Temperatur von 95 °C stabil bezüglich eines thermischen Abbaus.

Innerhalb der Klasse der Ellagitannine (Abb. 5.23f) wurde weiterhin ein Anstieg der Konzentrationen von HHDP-Glucose Isomer 1 und 2 (Nr. 28 und Nr. 29) bei einer Erhöhung der Kochtemperatur von 85 °C auf 95 °C detektiert. Die Konzentrationen stiegen hierbei signifikant für HHDP-Glucose Isomer 1 von 13,4 mg auf 20,6 mg/100 g Teekraut und für HHDP-Glucose Isomer 2 von 24,3 mg auf 43,0 mg/100 g Teekraut. Für die ebenfalls untersuchte Kochtemperatur von 70 °C wurde hingegen kein signifikanter Unterschied in den Konzentrationen der Ellagitannine im direkten Vergleich zu einer Temperatur von 85 °C innerhalb der Teezubereitung festgestellt. Für hohe Konzentrationen bioaktiver Ellagitannine in *C. incanus* Tee ist somit eine hohe Extraktionstemperatur von 95 °C innerhalb des Prozesses der Teezubereitung entscheidend.

Abschließend kann anhand der vorliegenden Ergebnisse für die Zubereitung von *C. incanus* Tee eine hohe Temperatur von 95 °C empfohlen werden. Bei einer aktuell durch den Hersteller angegebenen Kochzeit von 5 min fand für die bioaktiven phenolischen Inhaltsstoffe hierbei keine thermische Degradation statt. Zudem erfolgte bei dieser Temperatur eine effektivere Extraktion der Ellagitannine, die in großem Umfang zur gesamten antioxidativen Kapazität in *C. incanus* Tee beitragen. Insgesamt sind jedoch noch weitere Versuchsreihen notwendig, um mögliche Wechselwirkungen zwischen Extraktionstemperatur, -zeit oder Kochwasser zu untersuchen. So ist bei einer Kochzeit über 5 min durchaus ein thermischer Abbau der bioaktiven Substanzen in *C. incanus* Tee denkbar. Ebenso sollten die vorliegenden Ergebnisse durch Messungen weiterer handelsüblicher *C. incanus* Proben statistisch abgesichert werden, um mögliche Einflüsse unterschiedlichen Pflanzenmaterials auf die Konzentrationen der bioaktiven Inhaltsstoffe zu berücksichtigen. Hierbei können auch mögliche Chargenunterschiede innerhalb einer Probe eine Rolle spielen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden beispielsweise signifikante Abweichungen (teilweise über Faktor 2) der Konzentrationen phenolischer

Inhaltsstoffe zwischen zwei käuflich erworbenen Packungseinheiten von Handelsprobe A festgestellt. Dies wird bei einem Vergleich der in Abbildung 5.12 dargestellten Konzentrationen der bioaktiven Inhaltsstoffe von Probe A (Packungseinheit 2) mit dem entsprechenden Gehalt für Packungseinheit 1 (bei gleichen Extraktionsbedingungen: 95 °C, 5°min, Millipore®-Wasser) in Abbildung 5.23 deutlich. Hierbei lag z.B. die Konzentration für Myricitrin in Packungseinheit 2 bei 160 mg/100 g Teekraut während in Packungseinheit 1 nur ein Gehalt von 69 mg/100 g Teekraut gemessen wurde.

5.3.3 Einfluss der Kochzeit

Für die Beurteilung eines möglichen Effektes der Kochzeit auf die Extraktionsausbeute sowie die thermische Stabilität der phenolischen Inhaltsstoffe in *C. incanus* Tee wurde exemplarisch Handelsprobe A für 5 min, 20 min und 60 min bei 95 °C unter Verwendung von Millipore®-Wasser nach der in Kapitel 4.2 beschriebenen Methode aufgearbeitet. In den hieraus resultierenden Extrakten wurden anschließend die phenolischen Substanzen mittels LC-DAD analysiert. In Abbildung 5.24a-f sind die aus den Kochversuchen resultierenden Konzentrationen der 21 quantifizierten phenolischen *C. incanus* Inhaltsstoffe entlang der sechs ausgewählten Substanzklassen a) Phenolsäuren, b) monomere und dimere Flavanole, c) Myricetinglycoside, d) Quercetinglycoside, e) Tilirosidisomere und f) Ellagitannine dargestellt.

Innerhalb der Klasse der Phenolsäuren (Abb. 5.24a) wurde ein signifikanter Einfluss der Kochzeit auf die Konzentrationen dieser Substanzen in *C. incanus* Tee beobachtet. So stiegen beispielsweise für Gallussäure (Nr. 1) und Hydroxyferuloyl-rhamnose (Nr. 27) die Konzentrationen dieser phenolischen Inhaltsstoffe bei einer schrittweisen Erhöhung der Extraktionszeit von 5 min über 20 min auf 60 min. Die Gehalte stiegen dabei für Gallussäure von 12,9 mg über 18,8 mg auf 25,4 mg/100 g Teekraut und entsprechend für Hydroxyferuloyl-rhamnose von 4,0 mg über 10,4 mg auf 19,0 mg/100 g Teekraut. Diese Verbindungen wurden somit vermutlich nur langsam während der Zubereitung aus Handelsprobe A extrahiert und sind thermisch bei einer Kochtemperatur von 95 °C stabil. Letzteres kann ebenfalls durch die zuvor durchgeführten Versuche zum Einfluss der Kochtemperatur auf die Stabilität der Phenolsäuren bestätigt werden. Für Ellagsäure (Nr. 31) hingegen wurde eine Konzentrationsabnahme bei einer Erhöhung der Kochzeit von 20 min auf 60 min festgestellt. Die Gehalte sanken hierbei signifikant von 15,4 mg auf 10,1 mg/100 g Teekraut. Ebenfalls erfolgte für Hydroxyferulasäure-4-O-rhamnosid (Nr. 26) mit zunehmender Kochzeit bei 95 °C ein thermischer Abbau.

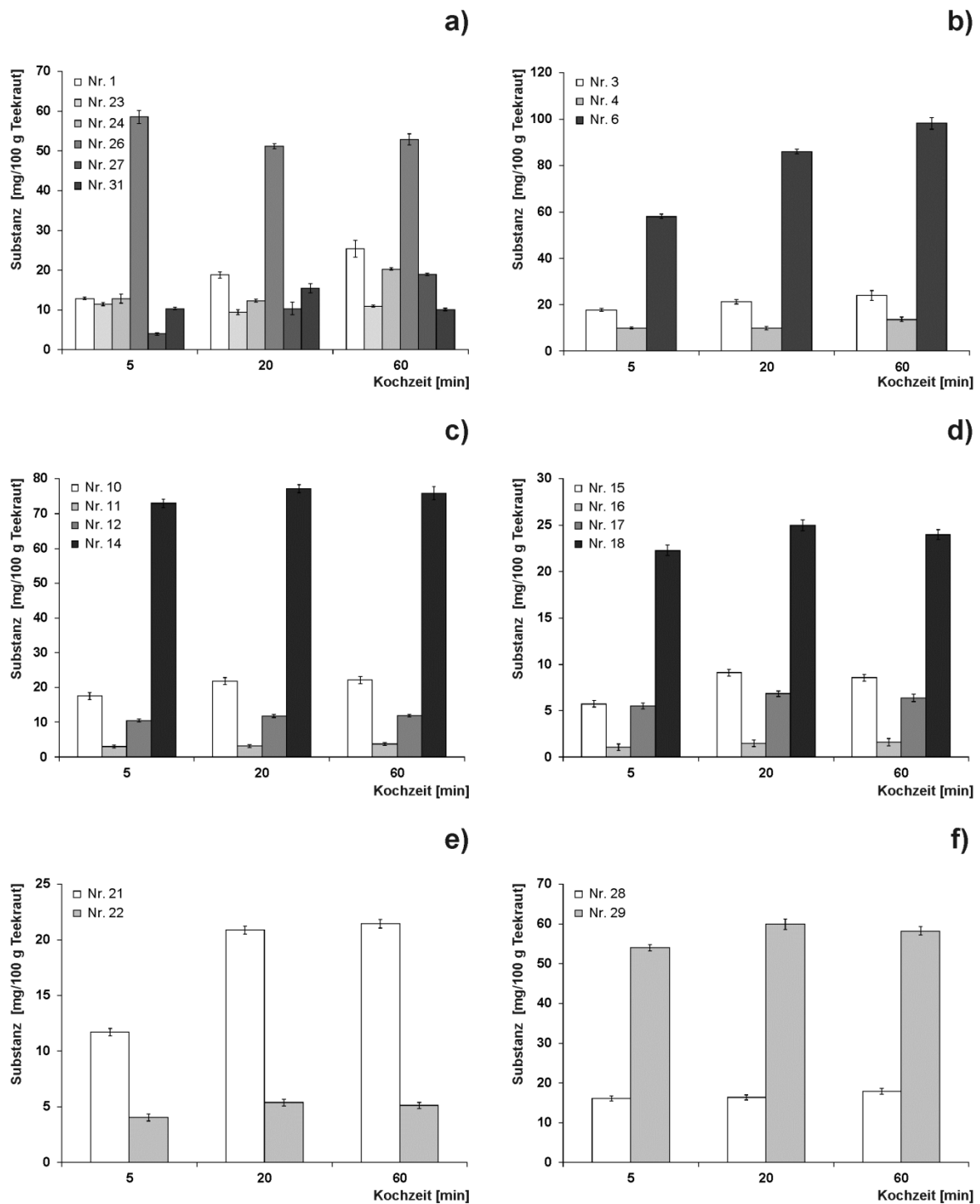


Abb. 5.24a-f Konzentrationen der 21 quantifizierten phenolischen Inhaltsstoffe in *C. incanus* Tee Handelsprobe A in Abhängigkeit der Kochzeit innerhalb der Teezubereitung (Zubereitung vgl. Kapitel 4.2). a) Phenolsäuren, b) monomere und dimere Flavanole, c) Myricetinglycoside, d) Quercetinglycoside, e) Tilirosidisomere und f) Ellagitannine. Zugehörige Substanzbezeichnungen sind in Tabelle 5.1 sowie 5.2 und Beschreibungen der Probe in Tabelle 4.1 dargestellt.

Bei einer Erhöhung der Kochzeit von 5 min auf 20 min sank die Konzentration dieser phenolischen Substanz von 58,6 mg auf 51,2 mg/100 g Teekraut. Die thermische Degradation der beiden zuvor genannten Verbindungen war hierbei vermutlich stärker zeit- als temperaturabhängig. In den zuvor durchgeführten Versuchen zum Einfluss der Kochtemperatur stiegen die Konzentrationen bei Erhöhung der Kochtemperatur und einer Kochzeit von 5 min an. Erst bei einer gleichzeitigen Erhöhung der Kochzeit resultierte hieraus ein thermischer Abbau dieser Inhaltsstoffe. Insgesamt wurden durch Veränderung der Kochzeiten substanzabhängig sowohl höhere als auch niedrigere Konzentrationen innerhalb der Klasse der Phenolsäuren festgestellt.

Weiterhin wurde für die Klasse der Flavanole und -dimere (Abb. 5.24b) ein Konzentrationsanstieg mit zunehmender Kochzeit innerhalb der Teezubereitung für Gallocatechin (Nr. 3) und Catechin (Nr. 6) festgestellt. Die Konzentrationen dieser bioaktiven Substanzen stiegen bei einer Erhöhung der Kochzeit von 5 min über 20 min auf 60 min für Gallocatechin von 17,7 mg über 21,3 mg auf 24,0 mg/100 g Teekraut. Für Catechin wurde ein entsprechender Anstieg der Konzentration von 58,1 mg über 86,1 mg auf 98,2 mg/100 g Teekraut detektiert. Für das Dimer Gallocatechin-(4 α -8)-catechin (Nr. 4) hingegen wurde erst nach einer Erhöhung der Kochzeit von 20 min auf 60 min ein signifikanter Konzentrationsanstieg von 9,8 mg auf 13,7 mg/100 g Teekraut beobachtet. Insgesamt waren die Flavanole somit innerhalb einer Teezubereitung von 60 min bei 95 °C thermisch stabil, bzw. ein möglicher thermischer Abbau dieser Verbindungen wurde durch höhere Extraktionsausbeuten bei zunehmender Kochzeit maskiert. Somit kann für hohe Konzentrationen bioaktiver Flavanole in *C. incanus* Tee die Kochzeit der aktuellen Herstellerempfehlung von 5 min ohne nachteilige Effekte bis auf 60 min erhöht werden. Zu beachten sind hierbei jedoch wiederum mögliche zeitabhängige Komplexierungsreaktionen mit Ionen des Kochwassers und phenolischen Inhaltsstoffen in *C. incanus* Tee. Bezüglich der dargestellten Ergebnisse fanden aufgrund der Verwendung von Millipore®-Wasser innerhalb der Versuchsdurchführung solche Komplexierungen nicht statt.

Für die Klasse der Myricetinglycoside (Abb. 5.24c) wurden weiterhin geringfügig höhere Konzentrationen bei einer Verlängerung der Kochzeit von 5 min auf 20 min gemessen. So stieg hierbei der Gehalt von Myricetin-3-O-galactosid (Nr. 10) von 17,6 mg auf 21,9 mg/100 g Teekraut und für Myricitrin (Nr. 14) von 73,0 mg auf 77,2 mg/100 g Teekraut. Eine weitere Erhöhung der Extraktionsdauer auf 60 min führte hierbei zu keinem weiteren Konzentrationsanstieg. Teilweise wurden hierbei sogar etwas niedrigere Konzentrationen gemessen, die aber aufgrund der relativ hohen Standardabweichung der einzelnen Messungen als nicht signifikant zu betrachten sind. Zur statistischen

Absicherung sollten daher die Versuche mit weiteren Handelsproben durchgeführt werden. Insgesamt sind die in *C. incanus* Tee enthaltenen Myricetinglycoside, innerhalb einer Teezubereitung von 60 min bei 95 °C, thermisch stabil. Zudem erzielte bereits eine Kochzeit von 5 min hohe Konzentrationen dieser Substanzen im trinkfertigen Tee.

Innerhalb der Klasse der Quercetinglycoside (Abb. 5.24d) wurde zunächst ein signifikanter Konzentrationsanstieg bei einer Erhöhung der Extraktionszeit von 5 min auf 20 min beobachtet. Hierbei stieg beispielsweise für Quercetin-3-O-galactosid (Nr. 15) die Konzentration von 5,7 mg auf 9,1 mg/100 g Teekraut und für Quercitrin von 22,3 mg auf 25 mg/100 g Teekraut. Eine weitere Erhöhung der Kochzeit auf 60 min bewirkte jedoch für diese bioaktiven Inhaltsstoffe eine leichte Konzentrationsabnahme auf 8,6 mg bzw. auf 24,0 mg/100 g Teekraut. Somit scheint ein thermischer Abbau dieser Substanzen bei Kochzeiten über 20 min und einer Extraktionstemperatur von 95 °C stattzufinden. Eine thermische Degradation von Quercetinglycosiden wurde auch bereits von ROHN *et al.* (2007) für in wässrigem Medium gekochte Flavonole beschrieben. Dabei konnten verschiedene Abbauprodukte des Flavonols Quercetin detektiert werden. Ebenso kann der thermische Abbau der Quercetinglycoside in *C. incanus* Tee auch durch die Ergebnisse von BUCHNER *et al.* (2006) belegt werden. Diese wiesen ebenfalls eine Degradation sowie Strukturveränderungen von Quercetin und des Quercetinglycosides Rutin in Verbindung mit reduzierten antioxidativen Kapazitäten nach thermischer Behandlung nach. Für *C. incanus* Tee mit hohen Konzentrationen bioaktiver Quercetinglycoside sollte somit bei einer Kochtemperatur von 95 °C die Kochzeit nicht über 20 min betragen.

Abweichende Ergebnisse wurden für die Tilirosidisomere (Abb. 5.24e) beobachtet. Sowohl für *trans*-Tilirosid (Nr. 21) als auch für *cis*-Tilirosid (Nr. 22) wurde ein deutlicher Anstieg der Konzentrationen bei einer Erhöhung der Extraktionszeit von 5 min auf 20 min beobachtet. Die Konzentrationen stiegen hierbei für *trans*-Tilirosid von 11,7 mg auf 20,9 mg/100 g Teekraut und entsprechend für das *cis*-Isomer von 4,1 mg auf 5,4 mg/100 g Teekraut. Eine längere Extraktionsdauer von 60 min erzielte hierbei keine signifikante Veränderung der Gehalte dieser phenolischen Substanzen. Wie auch aus den vorherigen Versuchen zum Einfluss der Kochtemperatur bereits bekannt, sind diese *C. incanus* Inhaltsstoffe bei 95 °C thermisch stabil und werden bei einer Extraktionszeit von 20 min deutlich effektiver extrahiert, als bei der aktuell meist von den Herstellern empfohlenen Kochzeit von 5 min.

Innerhalb der Klasse der Ellagitannine (Abb. 5.24f) wurde meist kein signifikanter Einfluss der Extraktionsdauer auf die Konzentration dieser bioaktiven Substanzen in *C. incanus* Tee beobachtet. Hierbei lagen die Konzentrationen für HHDP-Glucose Isomer 1 (Nr. 28) bei allen drei untersuchten Kochzeiten mit 16,1 mg, 16,4 mg und 17,9 mg/100 g Teekraut in einem ähnlichen Bereich. Für HHDP-Glucose Isomer 2 (Nr. 29) wurde bei Erhöhung der Kochzeit von 5 min auf 20 min eine Konzentrationszunahme von 54,1 mg auf 60,0 mg/100 g Teekraut ermittelt. Eine weitere Erhöhung führte hier zu einer geringfügigen, jedoch aufgrund der relativ hohen Standardabweichung nicht signifikanten, Konzentrationsabnahme auf 58,3 mg/100 g Teekraut. Somit sind auch die in *C. incanus* Tee enthaltenen Ellagitannine bei einer Kochzeit von bis zu 60 min sowie einer Kochtemperatur von 95 °C thermisch stabil. Jedoch sollte bei langen Kochzeiten und Kochwässern mit hohen Ionenkonzentrationen mögliche zeitabhängige Komplexierungsreaktionen berücksichtigt werden. Eine effektive Extraktion dieser Substanzen wurde bereits bei einer Kochzeit von 5 min erreicht, längere Kochzeiten lieferten kaum höhere Gehalte im trinkfertigen *C. incanus* Tee.

Zusammenfassend kann für die Zubereitung von *C. incanus* Tees eine Erhöhung der aktuellen Herstellerangaben zur Kochzeit (5 min) auf 20 min für hohe Konzentrationen bioaktiver Substanzen in *C. incanus* Tee empfohlen werden. Eine weitere Erhöhung der Kochzeit innerhalb der Teezubereitung bei 95 °C kann zu einer thermischen Degradation einiger phenolischer Inhaltsstoffe führen. Ebenfalls sollte die Temperatur während der Teezubereitung auf 95 °C gehalten werden. Niedrigere Temperaturen erzielten für die Mehrzahl der phenolischen Inhaltsstoffe geringere Konzentrationen im trinkfertigen *C. incanus* Tee. Zusätzlich sollte innerhalb der Teezubereitung insbesondere auf die Verwendung von mineralstoffarmen Kochwasser geachtet werden. Eine Verwendung von Mineralwasser kann hierbei Komplexierungsreaktionen und somit eine *Tea Cream* Bildung fördern. Diese geht wiederum mit niedrigeren Konzentrationen bioaktiver Substanzen im trinkfertigen Tee einher.

5.3.4 Einfluss möglicher Wechselwirkungen von Faktoren der Teezubereitung

In den zuvor beschriebenen Versuchen bezüglich der Einflüsse verschiedener Faktoren der *C. incanus* Teezubereitung wurden für die Faktoren Kochwasser, Kochtemperatur und Kochzeit bereits Effekte auf die Konzentrationen ausgewählter bioaktiver Inhaltsstoffe in *C. incanus* Tee nachgewiesen. Mögliche Wechselwirkungen zwischen diesen Faktoren sowie die Konzentrationen der Zielsubstanzen zwischen den einzelnen Faktorstufen wurden hierbei nicht berücksichtigt. Ebenfalls stellten diese Faktoren nur einen Teil der möglichen Einflussgrößen aus dem Prozess der Teezubereitung auf die Gehalte phenolischer Substanzen in *C. incanus* Tee dar. Zur Untersuchung des Einflusses weiterer Faktoren und insbesondere der Effekte vorliegender Wechselwirkungen zwischen diesen Faktoren auf die Konzentrationen bioaktiver Substanzen in *C. incanus* Tee wurden mittels statistischer Versuchsplanung die in Kapitel 4.11.2 beschriebenen Versuche durchgeführt. Der Zusammenhang zwischen den Faktoren aus dem Prozess der Teezubereitung und den Konzentrationen phenolischer Inhaltsstoffe als Zielgröße wurde softwaregestützt berechnet. Als Ergebnis resultierte ein statistisches Modell, das die Abhängigkeit der Zielgrößen von den Faktoren innerhalb des Versuchsraumes darstellt. Eine Berechnung der Zielgrößen bei beliebigen Faktoreinstellungen innerhalb des Versuchsraumes ist anhand dieses Modells möglich. Die statistische *Power* des 2-stufigen Vollfaktorenmodells lag bei 95 %, der Alpha-Fehler betrug 5 %. Eine Konzentrationsänderung der phenolischen Substanzen durch Variation der Faktoreinstellung wurde ab einer Höhe von zwei Standardabweichungen als signifikanter Effekt eingestuft. Die Standardabweichungen wurden hierbei für die Zielgrößen jeweils anhand der fünf Messungen der Zentralversuchspunkte (mittlere Faktoreinstellung) berechnet.

Nachfolgend sind die Ergebnisse für ausgewählte phenolische Substanzen aus *C. incanus* Handelsprobe A dargestellt. So wurde für die Konzentration von Gallussäure ein signifikanter Effekt der einzelnen Faktoren Kochzeit ($p < 0,0001$) und Kochtemperatur ($p < 0,0001$) sowie der Wechselwirkung dieser beiden Faktoren ($p < 0,0049$) beobachtet. Ein linearer Zusammenhang zwischen Faktoreinstellung und Zielgröße wurde hierbei anhand der Zentralpunkte belegt. Es resultierte eine nicht signifikante Krümmung für die Korrelation ($p < 0,1846$). Das Ergebnis des *Lack-of-fit*-Tests für die Passform des Modells war ebenfalls nicht signifikant ($p < 0,1836$). Das in Abbildung 5.25 dargestellte Modell beschreibt somit den bestehenden Zusammenhang zwischen der Kochzeit (5-60 min), der Kochtemperatur (40-95 °C) sowie der Wechselwirkung dieser Faktoren auf die Konzentration von Gallussäure in *C. incanus* Tee.

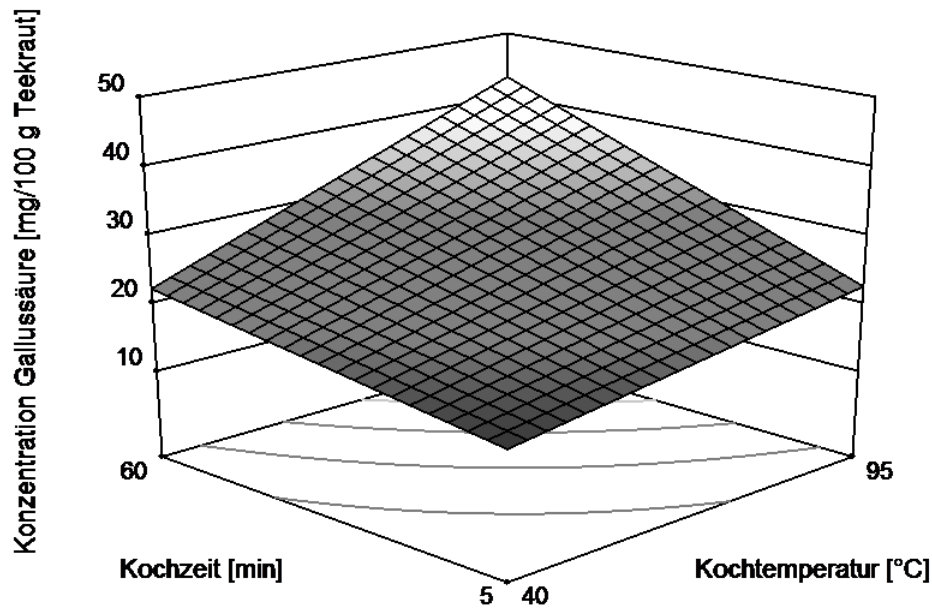


Abb. 5.25 Wechselwirkung der Zubereitungsparameter Kochzeit und Kochtemperatur auf die Konzentration von Gallussäure (Nr. 1) in *C. incanus* Teeprobe A. Ergebnisse dargestellt für eine Teezubereitung analog zu Kapitel 4.2 unter Verwendung von Millipore®-Wasser pH 7 sowie eines Teekraut-zu-Kochwasser-Verhältnisses von 1,25 g/45 mL. Analytische Daten zur Substanz sind in Tabelle 5.1 und Beschreibungen zur Probe sind in Tabelle 4.1 dargestellt.

Die Erhöhung der einzelnen Faktoren erzielte jeweils einen moderaten Anstieg der Gallussäurekonzentration von 15 mg auf 23 mg/100 g Teekraut. Dieser Konzentrationsanstieg in Abhängigkeit von der Kochtemperatur und der Kochzeit innerhalb der *C. incanus* Teezubereitung wurde auch bereits in den zuvor dargestellten Versuchen beobachtet. Werden jedoch die Faktoren Kochzeit und Kochtemperatur gleichzeitig erhöht, so resultiert aus der Wechselwirkung ein signifikant höherer Anstieg der Gallussäurekonzentration von 15 mg auf 43 mg/100 g Teekraut. Diese Konzentrationszunahme ist aufgrund der vorliegenden Wechselwirkung größer als die Summe der Konzentrationsanstiege resultierend aus den einzelnen Faktoren. Grafisch äußert sich dies in einer Krümmung der Ebene des in Abbildung 5.25 dargestellten Modells.

Weiterhin wurde auch für die Konzentration von Gallocatechin-(4 α -8)-catechin (Nr. 4) ein signifikanter Effekt der Faktoren Kochzeit ($p < 0,0001$), Kochtemperatur ($p < 0,0001$) und pH-Wert des Kochwassers ($p < 0,0103$) beobachtet. Anhand der Zentralpunkte wurde eine leichte Krümmung für den Zusammenhang zwischen Faktoreinstellung und Zielgröße ($p < 0,0041$) festgestellt. Eine exakte Punktvorhersage ist somit mittels des Modells nicht möglich. Es kann hierbei nur eine ungefähre Abschätzung der Datenpunkte erfolgen. Das

Ergebnis des *Lack-of-fit*-Tests für die Passform des Modells war nicht signifikant ($p < 0,8611$). Das in Abbildung 5.26 dargestellte Modell kann somit zur Abschätzung des Effektes der Kochzeit (5-60 min) sowie der Temperatur (40-95 °C), auf die Konzentration von Gallocatechin-(4 α -8)-catechin in *C. incanus* Tee eingesetzt werden.

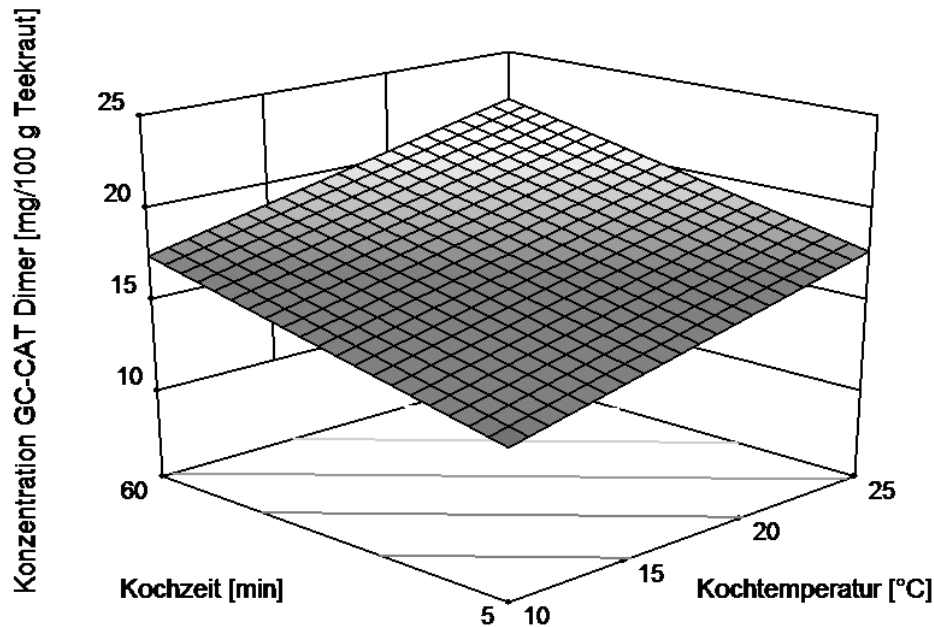


Abb. 5.26 Effekte der Zubereitungsparameter Kochzeit und Kochtemperatur auf die Konzentration von Gallocatechin-(4 α -8)-catechin (Nr. 4) in *C. incanus* Teeprobe A. GC-CAT: Gallocatechin-(4 α -8)-catechin. Ergebnisse dargestellt für eine Teezubereitung analog zu Kapitel 4.2 unter Verwendung von Millipore®-Wasser pH 7 sowie eines Teekraut-zu-Kochwasser-Verhältnisses von 1,25 g/45 mL. Analytische Daten zur Substanz sind in Tabelle 5.1 und Beschreibungen zur Probe sind in Tabelle 4.1 dargestellt.

Eine Erhöhung der einzelnen Faktoren erzielte hierbei jeweils einen Anstieg der Gallocatechin-(4 α -8)-catechin Konzentration von 13 mg auf 18 mg/100 g Teekraut. Werden die Faktoren Kochzeit und Kochtemperatur gleichzeitig erhöht, so resultiert eine Gallocatechin-(4 α -8)-catechin Konzentration von 23 mg/100 g Teekraut. Dies entspricht, im Gegensatz zu den zuvor für Gallussäure beschriebenen Ergebnissen, exakt der Summe der Konzentrationsanstiege resultierend aus der Veränderung der einzelnen Faktoren. Eine Wechselwirkung zwischen den Faktoren Kochzeit und Kochtemperatur bezüglich der Konzentration von Gallocatechin-(4 α -8)-catechin lag demnach nicht vor. Dies zeigt auch die Ebene (keine Krümmung) innerhalb des Modells (vgl. Abbildung 5.26). Der signifikante Effekt des Kochwasser pH-Wertes im untersuchten Bereich zwischen pH 3,5 bis pH 10,5 auf die Konzentration von Gallocatechin-(4 α -8)-catechin ist in Abbildung 5.27 dargestellt.

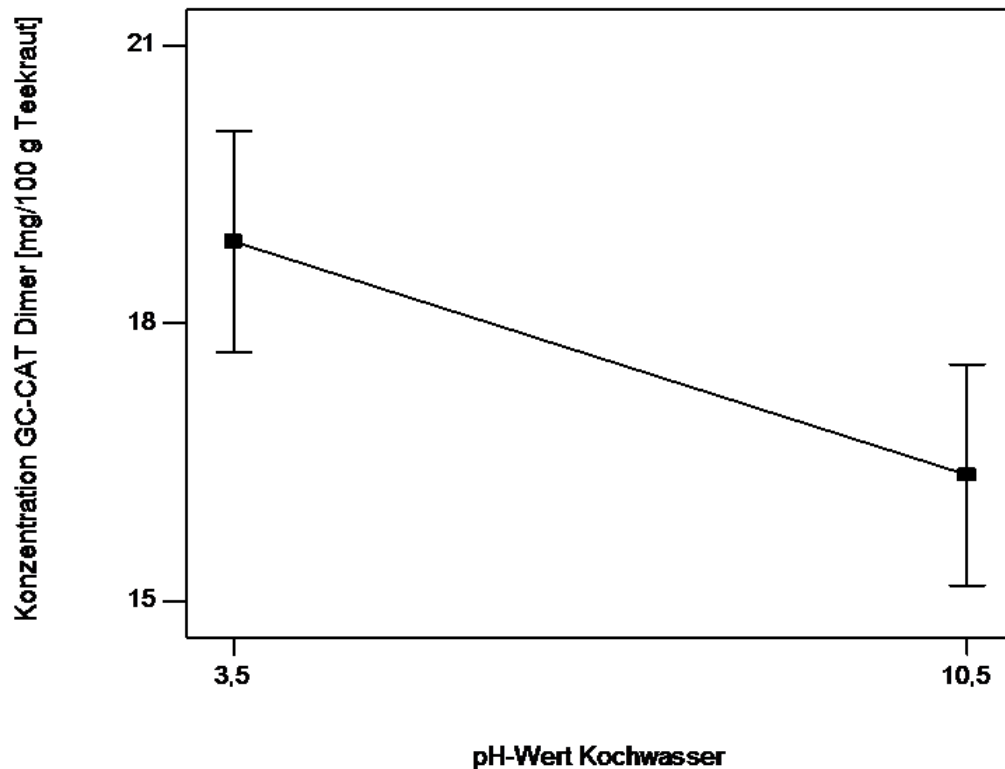


Abb. 5.27 Effekt des pH-Wertes des Kochwassers während der Teezubereitung auf die Konzentration von Gallocatechin-(4 α -8)-catechin (Nr. 4) in *C. incanus* Teeprobe A. GC-CAT: Gallocatechin-(4 α -8)-catechin. Ergebnisse dargestellt für eine Teezubereitung analog zu Kapitel 4.2 unter Verwendung eines Teekraut-zu-Kochwasser-Verhältnisses von 1,25 g/45 mL, einer Kochzeit von 32,5 min sowie einer Kochtemperatur von 67,5 °C. Analytische Daten zur Substanz sind in Tabelle 5.1 und Beschreibungen zur Probe sind in Tabelle 4.1 dargestellt.

Hierbei wurde eine signifikante Konzentrationsabnahme dieser Substanz bei einer Veränderung des pH-Wertes von 3,5 auf 10,5 beobachtet. Die Konzentrationen sanken von 19 mg auf 17 mg/100 g Teekraut. Ein durch das Kochwasser induzierter Abbau dimerer Flavanole in *C. incanus* Tee bei hohen pH-Werten stellt eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung dar. Auch sollten weitere Versuche mit verschiedenen *C. incanus* Handelsproben durchgeführt werden um diese Ergebnisse statistisch abzusichern.

Bezüglich der Myricitrinkonzentration in *C. incanus* Tee wurde ein signifikanter Effekt der Kochtemperatur ($p < 0,0001$) beobachtet. Ein linearer Zusammenhang zwischen Faktoreinstellung und Zielgröße wurde anhand der Zentralpunkte bestätigt. Es resultierte eine nicht signifikante Krümmung für diesen Zusammenhang ($p < 0,1853$). Das Ergebnis des *Lack-of-fit*-Tests für die Passform des Modells war nicht signifikant ($p < 0,3607$). Das in Abbildung 5.28 dargestellte Modell beschreibt somit den bestehenden Effekt der Kochtemperatur (40-95 °C) auf die Myricitrinkonzentration in *C. incanus* Tee.

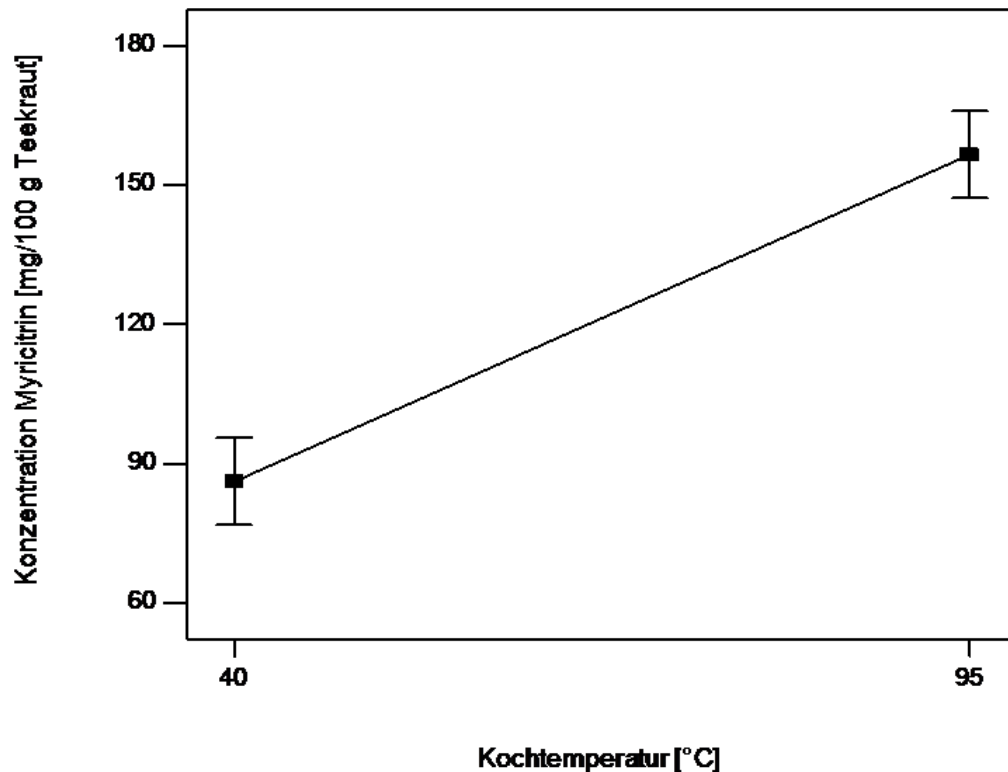


Abb. 5.28 Effekt der Kochtemperatur während der Teezubereitung auf die Konzentration von Myricitrin (Nr. 14) in *C. incanus* Teeprobe A. Ergebnisse dargestellt für eine Teezubereitung analog zu Kapitel 4.2 unter Verwendung von Millipore®-Wasser pH 7, eines Teekraut-zu-Kochwasser-Verhältnisses von 1,25 g/45 mL und einer Kochzeit von 32,5 min. Analytische Daten zur Substanz sind in Tabelle 5.1 und Beschreibungen zur Probe sind in Tabelle 4.1 dargestellt.

Bei einer Erhöhung der Kochtemperatur wurde ein signifikanter Anstieg der Myricitrinkonzentration von 86 mg auf 156 mg/100 g Teekraut ermittelt. Ergänzend zu den zuvor beschriebenen Versuchen kann anhand des in Abbildung 5.28 dargestellten Modells die Konzentration von Myricitrin in *C. incanus* Teeprobe A für Kochtemperaturen zwischen 40 °C und 95 °C mittels Software statistisch basiert berechnet werden.

Weiterhin war der untersuchte Einfluss des Kochwasser pH-Wertes (pH 3,5-10,5) auf die Konzentrationen der dargestellten Substanzen nicht signifikant. Eine Ausnahme stellte jedoch Gallocatechin-(4 α -8)-catechin (Nr. 4) dar. Für diese Substanz wurde ein signifikanter Einfluss nachgewiesen.

Darüber hinaus hatte auch das Teekraut-zu-Kochwasser-Verhältnis (0,5-2 g/45 mL) keinen signifikanten Effekt auf die Konzentration dieser Substanzen bezogen auf 100 g *C. incanus* Teekraut. Diese Ergebnisse bedeuten, dass bei einer Teekraut-Einwaage zwischen 11 g/L und 44 g/L noch keine Sättigung in der Extraktion dieser Substanzen

erreicht wird. Absolut betrachtet könnten durch höhere Teekraut-Einwaagen (aktuelle Herstellerempfehlung: 15 g Teekraut/L) im Bereich zwischen 11 g/L und 44 g/L vermutlich höhere Konzentrationen bioaktiver Substanzen im trinkfertigen Tee erzielt werden. Zur statistischen Absicherung sollten jedoch weitere Versuche durchgeführt werden.

Insgesamt wurden mittels softwaregestützter Versuchsplanung Modelle für den Einfluss verschiedener Parameter der Teezubereitung auf die Konzentrationen ausgewählter bioaktiver Inhaltsstoffe in *C. incanus* Tee berechnet. Mittels dieser Modelle ist eine statistische Vorhersage der Konzentrationen dieser Substanzen bei simulierbaren Faktoreinstellungen möglich. Eine Optimierung der Zielgröße, z.B. Maximierung der Konzentrationen bioaktiver Substanzen in *C. incanus* Tee, kann hierdurch erfolgen. Dies stellt einen Vorteil gegenüber den zuvor durchgeführten Kochversuchen dar, bei denen jeweils ein Faktor je Zeitpunkt variiert wurde. Diese *OFAT*-Versuchsreihen lieferten keine Informationen bezüglich der Konzentrationen der phenolischen Substanzen zwischen den einzelnen Faktoreinstellungen. Zudem konnten hierbei keine Wechselwirkungen zwischen den Einflussfaktoren innerhalb der Teezubereitung von *C. incanus* Tee auf die Konzentrationen der bioaktiven Inhaltsstoffe analysiert werden. Dies gelang erst durch eine gleichzeitige Veränderung der Faktoren mittels softwaregestützter statistischer Versuchsplanung. Einen Nachteil innerhalb der DOE-Versuche stellten jedoch die relativ hohen Standardabweichungen in den Messungen der Zentralversuchspunkte dar. Ein Effekt wurde für die berechneten statistischen Modelle mit einer ausreichenden statistischen *Power* erst ab einem Konzentrationsunterschied größer zwei Standardabweichungen erkannt. Dies bedeutete z.B. bei einer Standardabweichung der Gallussäurekonzentration von 10 %, dass erst ab einer, durch Veränderung der Faktoreinstellungen erzielten, Konzentrationsänderung von 20 % ein signifikanter Effekt vorlag. Eine Untersuchung weiterer *C. incanus* Handelsproben, bestehend aus homogenem Teekraut (Verteilung Blatt- und Stängelanteile und Partikelgrößen) könnte durch einer Verringerung der Standardabweichungen in den Experimenten zu einer Detektion kleinerer Effekte von Faktoren der Teezubereitung auf die Konzentration phenolischer Inhaltsstoffe beitragen. Weiterhin waren nicht alle Korrelationen zwischen Faktor- und Zielgröße linear. Eine statistisch sichere Berechnung mittels linearer Modelle war für die Konzentrationen dieser bioaktiven phenolischen Inhaltsstoffe aus *C. incanus* Tee nicht möglich. Hierzu kann eine Erweiterung dieser einfachen Modelle auf höhere quadratische oder kubische Modelle erfolgen. Allerdings würde hierbei die Versuchszahl erheblich ansteigen, weshalb eine Kosten-Nutzen-Kalkulation vor Versuchsdurchführung dieser höheren Modelle erfolgen sollte.

5.3.5 Einfluss von Epimerisierungs- und Autoxidationsreaktionen

Die Konzentrationen bioaktiver Substanzen in *C. incanus* Tee können weiterhin auch von Autoxidations- oder Epimerisierungsreaktionen innerhalb des Prozesses der Teezubereitung abhängen. Eine solche Autoxidation ist dabei vor allem für die Klasse der Flavanole beschrieben (HATHWAY und SEAKINS 1955). Diese Reaktionen laufen überwiegend in wässrigem Medium bei einem alkalischen pH-Wert ab (OSZMIANSKI *et al.* 1996). Als Reaktionsprodukte resultieren aus den Flavanolen u.a. verschiedene Dehydrodicatchine. Diese dimeren Autoxidationsprodukte liegen entweder als A-Typ- (gelb gefärbt) oder B-Typ-Dehydrodicatchin (farblos) vor (HE *et al.* 2009). Neben Autoxidationsreaktionen sind auch Epimerisierungen von Flavanolen, z.B. eine Reaktion von Catechin zu Epicatechin, in wässrigen Lösungen beschrieben (COURBAT *et al.* 1977, SETO *et al.* 1997, WANG *et al.* 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden in *C. incanus* Tee hohe Konzentrationen bioaktiver Flavanole sowie deren Dimere quantifiziert. Einer der Hauptinhaltsstoffe dieser Substanzklasse in *C. incanus* Tee stellte dabei Catechin dar. Um die Stabilität dieser Substanz während der Zubereitung von *C. incanus* Tee näher zu untersuchen, wurden die in Kapitel 4.11.3 beschriebenen Versuche softwaregestützt geplant und durchgeführt. Hierbei sollten insbesondere mögliche Effekte des Kochwasser pH-Wertes (pH 3-11), der Kochzeit (2-60 min), der Kochtemperatur (30-95 °C) sowie der Catechinkonzentration der Lösung (0,01-1,00 mg/mL) auf die Epimerisierung und Autoxidation von Catechin im Modellsystem untersucht werden. Als Zielgrößen wurden innerhalb dieser Stabilitätsversuche die Catechinkonzentration, die Bildung von Epicatechin als Marker für Epimerisierungen sowie das Vorkommen von Dehydrodicatchinen als Nachweis von Autoxidationsreaktionen mittels LC-DAD und LC-DAD-ESI-MS/MS analysiert. In Abbildung 5.29a-b sind die LC-DAD-Chromatogramme zweier Catechinmodellösungen der beschriebenen Versuche bei 280 nm und 365 nm dargestellt. Der in Abb. 5.29a gezeigte Catechinstandard (1 mg/mL) wurde bei einer Kochtemperatur von 95 °C in Millipore®-Wasser pH 3 für 60 min erhitzt. Neben Catechin (Nr. 6) bei einer Retentionszeit von 12 min wurden keine weiteren Substanzen bei 280 nm sowie 365 nm detektiert. Unter Abb. 5.29b sind entsprechend die LC-DAD-Chromatogramme der zuvor beschriebenen Catechinmodellösung bei 280 nm und 365 nm dargestellt. Die Lösung wurde hierbei jedoch in Millipore®-Wasser pH 11 erhitzt. Bei einer Wellenlänge von 280 nm wurde neben dem Catechinpeak (Nr. 6) zusätzlich Epicatechin (EC) bei einer Retentionszeit von 15 min detektiert. Ebenso wurde bei einer Wellenlänge von 365 nm ein Dehydrodicatchin A (DH) Peak bei einer Retentionszeit von 30 min aufgezeichnet.

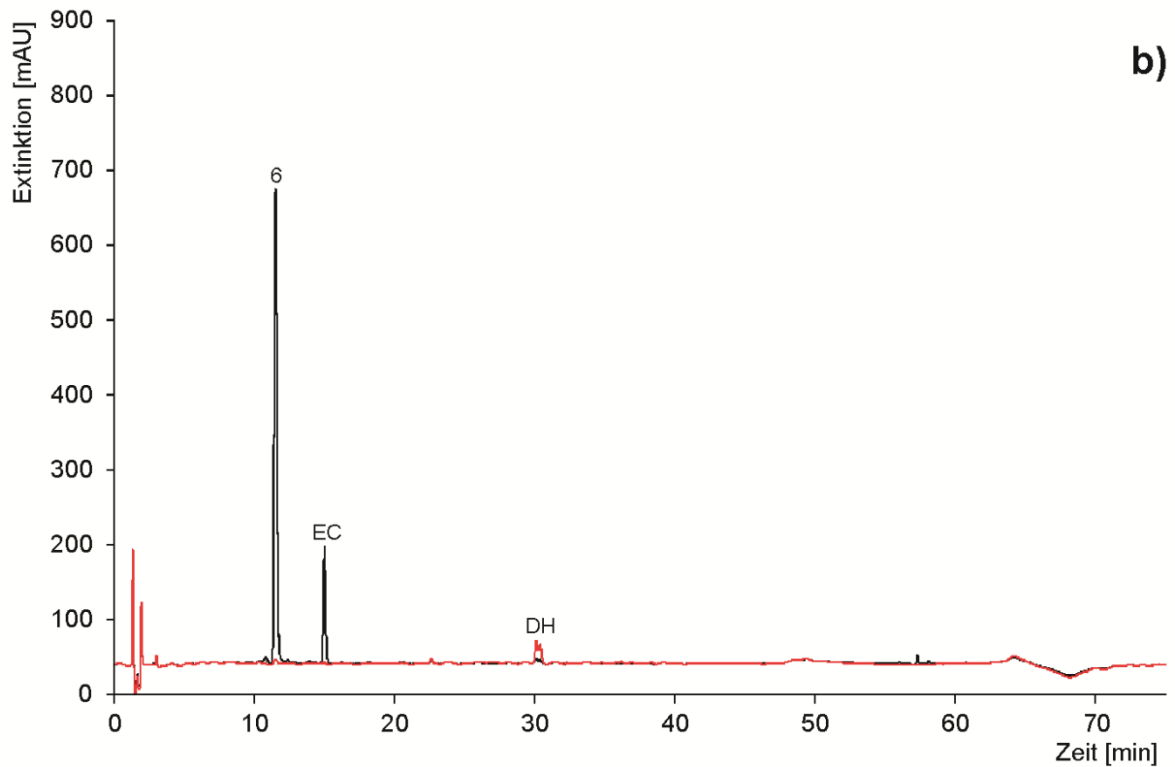
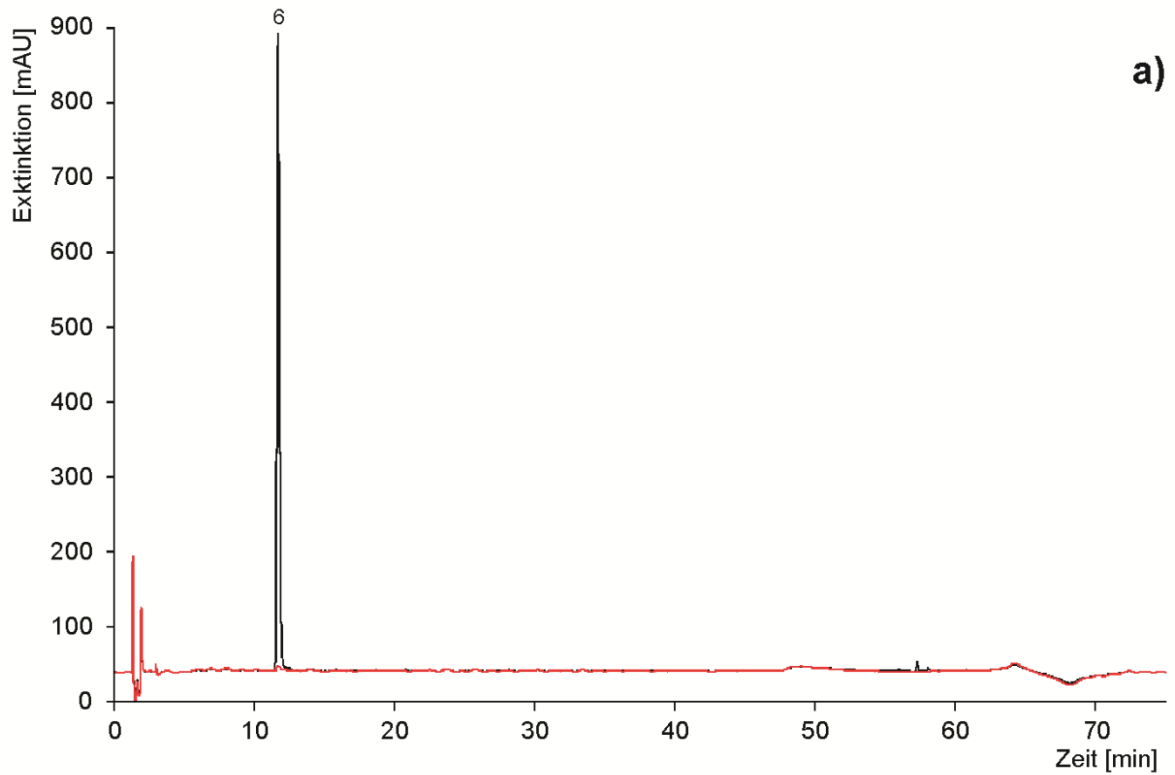


Abb. 5.29a-b LC-DAD-Chromatogramme von Catechin (Nr. 6) bei 280 nm (schwarz) und 365 nm (rot). a) Catechinstandard (1 mg/mL) erhitzt bei 95 °C für 60 min in Millipore®-Wasser pH 3; b) Catechinstandard (1 mg/mL) erhitzt bei 95 °C für 60 min in Millipore®-Wasser pH 11. EC: Epicatechin (Epimerisierungsprodukt); DH: Dehydrodicathechin A (Autoxidationsprodukt).

Die Identifizierung von Epicatechin und Dehydrodicatechin erfolgte weiterhin mittels UV-Spektren sowie der ESI-MS/MS-Fragmentierungsmuster. Für Epicatechin stimmten Retentionszeit, UV-Absorptionsmaxima sowie MS/MS-Fragmentierungsmuster mit der kommerziell erworbenen Standardsubstanz überein. Aus dem Quasimolekülion $[M-H]^-$ mit m/z 289 resultierten dabei analog zu Catechin die MS/MS-Produktionen mit m/z 271, m/z 245, m/z 205 und m/z 179. Das UV-Absorptionsmaximum lag bei 278 nm. Für den Dehydrodicatechin A Peak wurde ein UV-Absorptionsmaximums bei 380 nm detektiert. LÓPEZ-SERRANO und ROS BARCELÓ (2001) beschrieben für dieses dimere Autoxidationsprodukt ein vergleichbares UV-Absorptionsmaximum von 383 nm und GUYOT *et al.* (1996) ein UV_{max} von 385 nm. Anhand des Quasimolekülions $[M-H]^-$ mit m/z 575 sowie des in Abbildung 5.30 dargestellten ESI-MS/MS-Spektrums wurde Dehydrodicatechin A identifiziert.

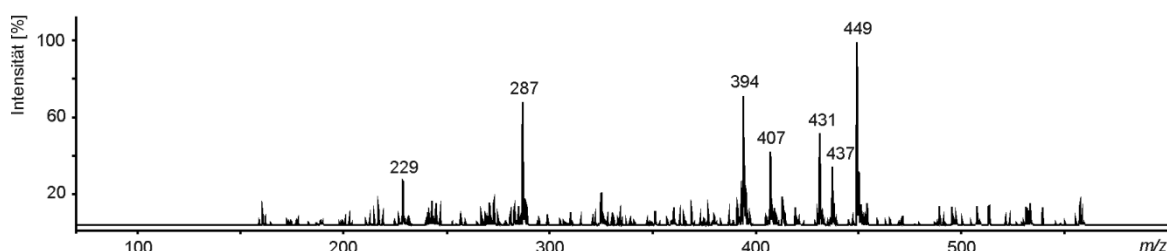


Abb. 5.30 ESI-MS/MS-Spektrum des Quasimolekülions $[M-H]^-$ (m/z 575) des dimeren Catechinoxidationsproduktes Dehydrodicatechin A.

In Abbildung 5.31 ist zusätzlich die postulierte MS/MS-Fragmentierung des dimeren Autoxidationsproduktes Dehydrodicatechin A dargestellt. Hierbei entsteht unter anderem durch eine Spaltung innerhalb des C-Ringes der oberen Catechineinheit des Quasimolekülions mit m/z 575 das Hauptproduktion mit m/z 449. Aus diesem Fragment resultiert wiederum durch anschließende Abspaltung von Wasser das Fragmention mit m/z 431. Ebenfalls entsteht durch Spaltung des kondensierten B-Ringes der oberen Catechineinheit des Quasimolekülions ein Produktion mit m/z 394. Dieses liegt, wie zuvor bereits auch für die Fragmentierung von HHDP-Glucose beschrieben, als distonisches Radikalion vor. Das Fragmention mit m/z 287 resultiert innerhalb der MS/MS-Fragmentierung aus einer gleichzeitigen Spaltung der Interflavanbindung und der Etherbrücke zwischen den Catechinuntereinheiten des Quasimolekülions. Ein ähnliches Fragmentierungsmuster wurde bereits von HE *et al.* (2009) für das trimere Autoxidationsprodukt Dehydrotricatechin A beschrieben. Auch hier wurden für die Fragmentierung als mögliche Schnittstellen der B-Ring der oberen Catechineinheit sowie

die Etherbrücke zusammen mit der Interflavanbindung zwischen den Catechineinheiten beschrieben.

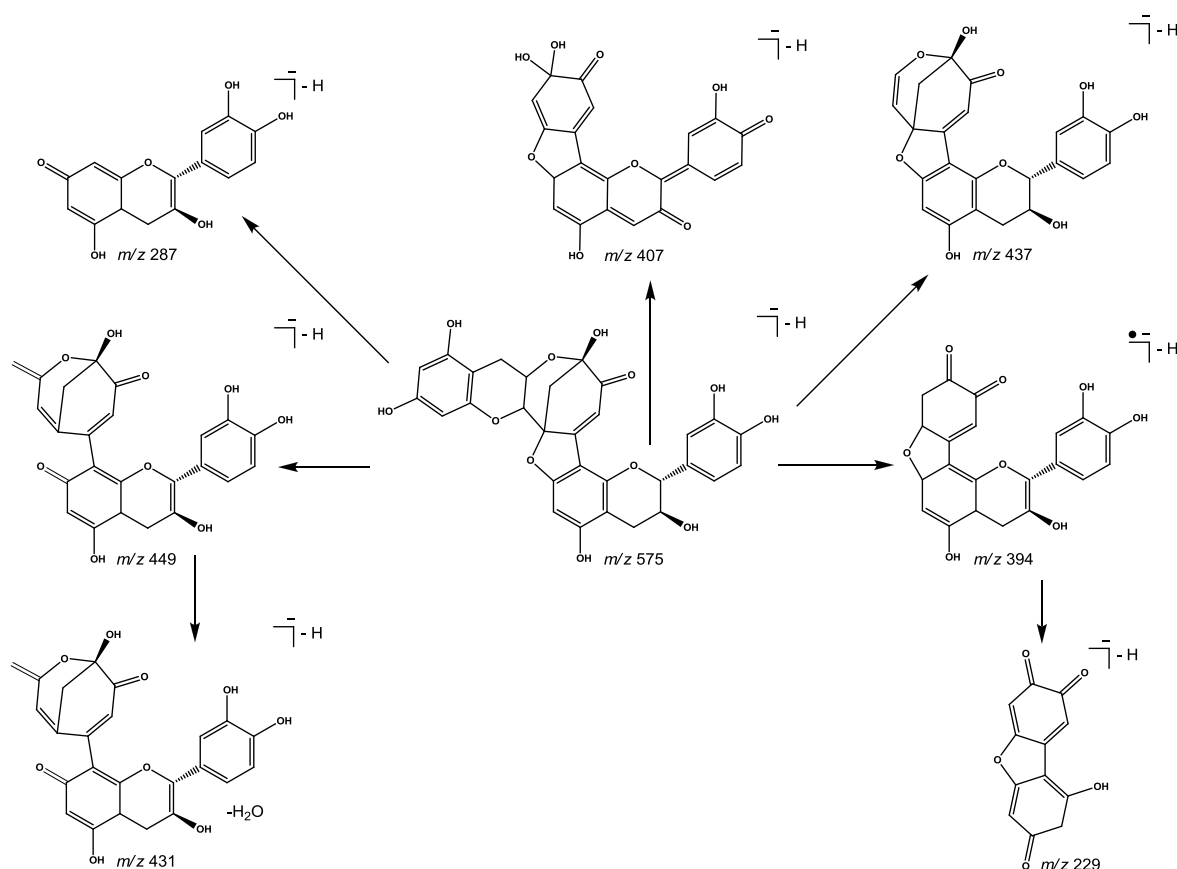


Abb. 5.31 Postulierte ESI-MS/MS-Fragmentierung des Quasimoleküls $[M-H]^-$ mit m/z 575 von Dehydrodicatechin A.

Wie in Abbildung 5.26 deutlich zu erkennen ist, ist die Stabilität von Catechin in wässrigen Modelllösungen vom pH-Wert des Mediums abhängig. Bei basischem pH-Wert des Kochwassers epimerisierte Catechin zu Epicatechin. Weiterhin resultierte in diesem wässrigen Kochmedium aus einer Catechinautoxidation das Produkt Dehydrodicatechin A. Beide Reaktionen bewirkten insgesamt eine Abnahme der Catechinkonzentration in der Modelllösung bei basischem pH-Wert des Kochwassers. Die vorliegenden Effekte der Teezubereitungsparameter auf die Catechininstabilität wurden ebenfalls anhand der in Kapitel 4.11.3 beschriebenen Versuche untersucht. Die Zielgröße Stabilität wurde hierbei als relative Catechinkonzentration gemessen. Diese wiederum resultierte aus der Differenz zwischen der Ausgangskonzentration der Catechinmodelllösung und der Konzentration der Lösung nach erfolgter thermischer Behandlung in wässrigem Milieu. Da in den zuvor durchgeführten Versuchen teilweise nichtlineare Zusammenhänge zwischen Faktoreinstellung und Konzentration phenolischer Substanzen in *C. incanus* Tee

resultierten, wurde für die Catechinstabilitätsversuche ein quadratisches Modell eingesetzt. Innerhalb dieses *face-centered Central-Composite-Designs* wurden die Faktoreinstellungen der Eingangsgrößen auf insgesamt fünf Stufen variiert. Der Abstand der Sternpunkte zum Mittelpunkt des Modells betrug $\alpha=1$. Aus diesem Modell resultierten signifikante Effekte des Kochwasser pH-Wertes ($p<0,0001$) und der Catechinkonzentration der Modelllösung ($p<0,0001$) auf die relative Stabilität von Catechin. In Abbildung 5.32 ist das entsprechende *Response-Surface*-Modell für diesen Zusammenhang dargestellt.

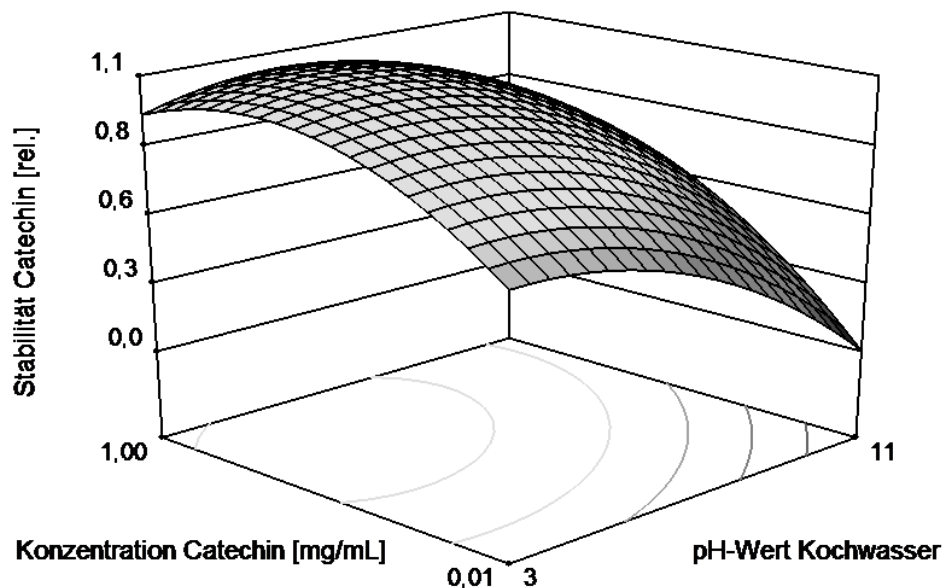


Abb. 5.32 *Response-Surface*-Modell zur Stabilität von Catechin innerhalb des Prozesses der Teezubereitung in Abhängigkeit von der Substanzkonzentration und des pH-Wertes des Kochwassers (Millipore®-Qualität). Die Ergebnisse sind für eine Kochzeit von 31 min und einer Kochtemperatur von 62,5 °C dargestellt.

Dieses Modell sollte jedoch aufgrund eines signifikanten Ergebnisses des *Lack-of-fit*-Tests ($p<0,0001$) nicht für eine exakte Berechnung der Zielgröße innerhalb des Versuchsraumes verwendet werden. Für eine präzisere Passform des Modells sind hierzu weitere Ergänzungsversuche zu den bereits einbezogenen 53 Modelllösungen notwendig. Grobe Tendenzen für die vorliegenden Zusammenhänge zwischen den Faktoren und der Zielgröße können dennoch aus dem Modell abgeleitet werden. Die statistische *Power* lag bei 95 %, der Alpha-Fehler betrug 5 %. Ein Effekt wurde ab einer Größe von zwei Standardabweichungen als signifikant betrachtet. Aus dem dargestellten Modell wird deutlich, dass Catechin innerhalb wässriger Lösungen in hohen Konzentrationen (1 mg/mL) stabiler gegenüber einer Degradation durch Epimerisierungs- und Autoxidationsreaktionen ist, als in geringer konzentrierten wässrigen Lösungen

(0,01 mg/mL). Ebenfalls ist dieses Flavanol im sauren pH-Bereich (pH 3) stabiler als in einem basischen Medium (pH 11).

Ein solcher pH-Wert abhängiger Abbau wurde auch zuvor für das in *C. incanus* Tee enthaltene Gallocatechin-(4 α -8)-catechin (Nr. 4) beschrieben. Vermutlich spielen die im Modellversuch dargestellten Prozesse der Autoxidation und Epimerisierung von Catechin somit auch in *C. incanus* Tee eine Rolle. So wurde bei der Zubereitung von *C. incanus* Teeprobe A innerhalb einer Zubereitung von 60 min bei 95 °C unter Verwendung von Millipore®-Wasser (pH 5,8; 0°dH), Leitungswasser (Trinkwasserqualität, pH 7,2; 6°dH) und Mineralwasser (pH 7,6; 0°dH) eine Abnahme der Catechinpeakfläche zusammen mit einer Zunahme der Epicatechinpeakfläche beobachtet. Zusätzlich wurde das Autoxidationsprodukt Dehydrodiccatechin A in allen drei beschriebenen *C. incanus* Tees mittels LC-DAD-ESI-MS/MS detektiert. Somit scheinen neben den Beobachtungen im Modell auch innerhalb der Teezubereitung die Epimerisierungsreaktionen vor allem vom pH-Wert des Kochwassers abhängig zu sein. Innerhalb der Zubereitung von *C. incanus* Tee könnte somit die Zugabe von etwas Säure (z.B. Zitronensaft) über eine Absenkung des pH-Wertes mögliche Epimerisierungs- aber auch Autoxidationsreaktionen der Flavanole während der Teezubereitung verringern. Hierbei sollten jedoch auch die sensorischen Aspekte eines sauren Tees berücksichtigt werden. Ein saurer *C. incanus* Tee (pH 3) würde vermutlich von den meisten Konsumenten abgelehnt werden.

5.4 Einfluss der Teekrautbeschaffenheit auf die Konzentrationen bioaktiver phenolischer Inhaltsstoffe in *C. incanus* Tee

5.4.1 Einfluss von Blatt- und Holzanteil des Teekrautes

Neben Einflüssen verschiedener Faktoren aus dem Prozess der Zubereitung von *C. incanus* Tee spielt vermutlich auch die Zusammensetzung des verwendeten Pflanzenmaterials eine Rolle. Anhand der quantitativen Ergebnisse der phenolischen Substanzen in sieben untersuchten Handelsproben (vgl. Kapitel 5.1.2) wurde ein möglicher Einfluss des Blatt- bzw. Stängelanteils (verholzte Pflanzenteile) in *C. incanus* Teekraut auf die Konzentrationen phenolischer Inhaltsstoffe im trinkfertigen Tee vermutet. Für die genauere Untersuchung eines solchen Effektes wurde exemplarisch Probe A wie in Kapitel 4.1 beschrieben per Hand in fünf Mischungen mit definierten Blatt- und Stängelanteilen von 0 % (w/w), 25 % (w/w), 50 % (w/w), 75 % (w/w) und 100 % (w/w) sortiert (vgl. Tabelle 4.1). Nach der Teezubereitung (vgl. Kapitel 4.2) erfolgte eine Analytik der in den sortierten Proben enthaltenen Holzzuckerprofile, um über diese Marker eine Aussage zum echten Holzanteil der Proben treffen zu können. Für die Korrelation der Holzanteile im Teekraut mit den phenolischen Inhaltsstoffen, wurden letztere mittels LC-DAD quantifiziert.

In Tabelle 5.7 sind die Ergebnisse der Holzzuckeranalytik für die fünf handsortierten Proben A.so1 bis A.so5 dargestellt. In der Holzanalytik stellt der Hydrolysenrückstand der schwefelsauren Hydrolyse meist den Anteil des säureunlöslichen Lignin (*Klason*-Lignin) dar. Das Lignin wiederum korreliert mit dem Holzanteil. Innerhalb der untersuchten *C. incanus* Proben A.so1 bis A.so5 lag der saure Hydrolysenrückstand jedoch bei allen fünf analysierten Proben in einem vergleichbaren Bereich von 26-35 %. Diese Werte korrelierten daher nicht wie zuvor vermutet mit den Anteilen verholzter Stängel zwischen 0-100 % (w/w). Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine Extraktion von weiteren Inhaltsstoffen, z.B. Proteinen, während der Hydrolyse. Die geringen Ligningehalte der Blätter können durch solche störende Matrixkomponenten fälschlicherweise erhöht werden und somit zu vergleichbar hohen Messwerten wie für die verholzten Stängel führen. Das *Klason*-Lignin stellt somit keinen geeigneten Parameter für die Beurteilung des Holzanteils in *C. incanus* Teekraut dar. Daher wurden als eine analytische Alternative die Holzzuckerprofile der Proben herangezogen. Die Leitsubstanzen der Holzzucker stellten hierbei Glucose und Xylose als Bausteine der Cellulose und Hemicellulosen dar. Die Summe der Konzentrationen dieser Substanzen liefert somit neben dem reinen Celluloseanteil einer Probe einen ergänzenden Parameter für den Holzanteil.

Tab. 5.7 Gesamter ASE-Extraktgehalt (*Accelerated Solvent Extraction*), Hydrolysenrückstand, Glucosegehalt, Xylosegehalt sowie Summe der beiden Gehalte und Cellulosegehalt der handsortierten *C. incanus* Teeproben (A.so1 bis A.so5). Glucosekonzentrationen aus dem Stärketest sind für Probe A.so1 und A.so5 dargestellt. Die Beschreibungen der Proben sind Tabelle. 4.1 zu entnehmen.

Probe	Blatt- anteil [% w/w]	Stängel- anteil [% w/w]	ASE- Extraktgehalt [%]	Hydrolysen- rückstand [%]	Glucose [%]	Xylose [%]	Glucose + Xylose [%]	Cellulose [%]	Glucose (aus Stärke) [%]
A.so1	0	100	2	26	34	21	55	30	1
A.so2	25	75	7	26	29	17	46	26	
A.so3	50	50	12	28	24	13	37	21	
A.so4	75	25	18	31	19	9	28	17	
A.so5	100	0	22	35	14	5	19	12	1

In der vorliegenden Arbeit wurde der Cellulosegehalt als analytischer Marker für den Holzanteil wie in Kapitel 4.10 beschrieben berechnet. Die resultierenden Cellulosekonzentrationen korrelierten hierbei stark positiv ($R^2=0,99$) mit dem Stängelanteil der handsortierten *C. incanus* Proben (vgl. Tabelle 5.4). Ebenso korrelierte auch der Summenparameter aus Glucose und Xylose stark positiv ($R^2=0,99$) mit dem Stängelanteil der Proben. Die Glucosekonzentrationen von 1 % aus dem für die Proben A.so1 und A.so5 durchgeführten Stärketest zeigten weiterhin, dass die für die Celluloseberechnungen eingesetzten Glucosekonzentrationen nicht signifikant aus einer Hydrolyse von Stärke stammten. Ein Korrekturfaktor von 1 % wurde dennoch für die Berechnungen der Cellulosegehalte berücksichtigt. Insgesamt kann der Cellulosegehalt in *C. incanus* Teekraut, im Gegensatz zu den Ligninkonzentrationen, als valider analytischer Marker des Holzanteils eingesetzt werden.

Nach erfolgter Analytik der Holzanteile wurden insgesamt 22 phenolische Hauptschubstanzen in den fünf handsortierten Proben quantitativ mittels LC-DAD bestimmt. In Abbildung 5.33a-f sind die Konzentrationen dieser Inhaltsstoffe entlang sechs ausgewählter Substanzklassen, a) Phenolsäuren, b) monomere und dimere Flavanole, c) Myricetinglycoside, d) Quercetinglycoside, e) Tilirosidisomere und f) Ellagitannine dargestellt.

Innerhalb der Klasse der Phenolsäuren (Abb. 5.33a) resultierten die stärksten Korrelationen zwischen dem Blattanteil des Teekrautes und der Anwesenheit phenolischer Substanzen für Gallussäure (Nr. 1; $R^2=0,96$) und Methylgallussäure (Nr. 23; $R^2=0,95$). Weiterhin waren diese Substanzen ebenfalls in Probe A.so1 mit einem Stängelanteil von 100 % (w/w) enthalten. Die Konzentrationen für Gallussäure lag zwischen 3,5 mg/100 g Teekraut (Probe A.so1) und 70,1 mg/100 g Teekraut (Probe A.so5) und für Methylgallussäure entsprechend zwischen 3,4 mg/100 g Teekraut (Probe A.so1) und 16,4 mg/100 g Teekraut (Probe A.so5). Somit sind bis zu 20-fach höhere Gallussäurekonzentrationen im trinkfertigen *C. incanus* Tee möglich, wenn dieser aus Teekraut mit einem Blattanteil von 100 % (w/w) zubereitet wird. Zudem zählt Gallussäure, wie zuvor in Kapitel 5.2.2 gezeigt, mit einer TEAC von 2,4 mmol TE/mmol Substanz zu den antioxidativen Inhaltsstoffen in *C. incanus* Tee. Für die anderen Phenolsäuren und deren Derivate wurde weiterhin eine ähnliche Verteilung zwischen Stängel- und Blattanteilen des Teekrautes festgestellt.

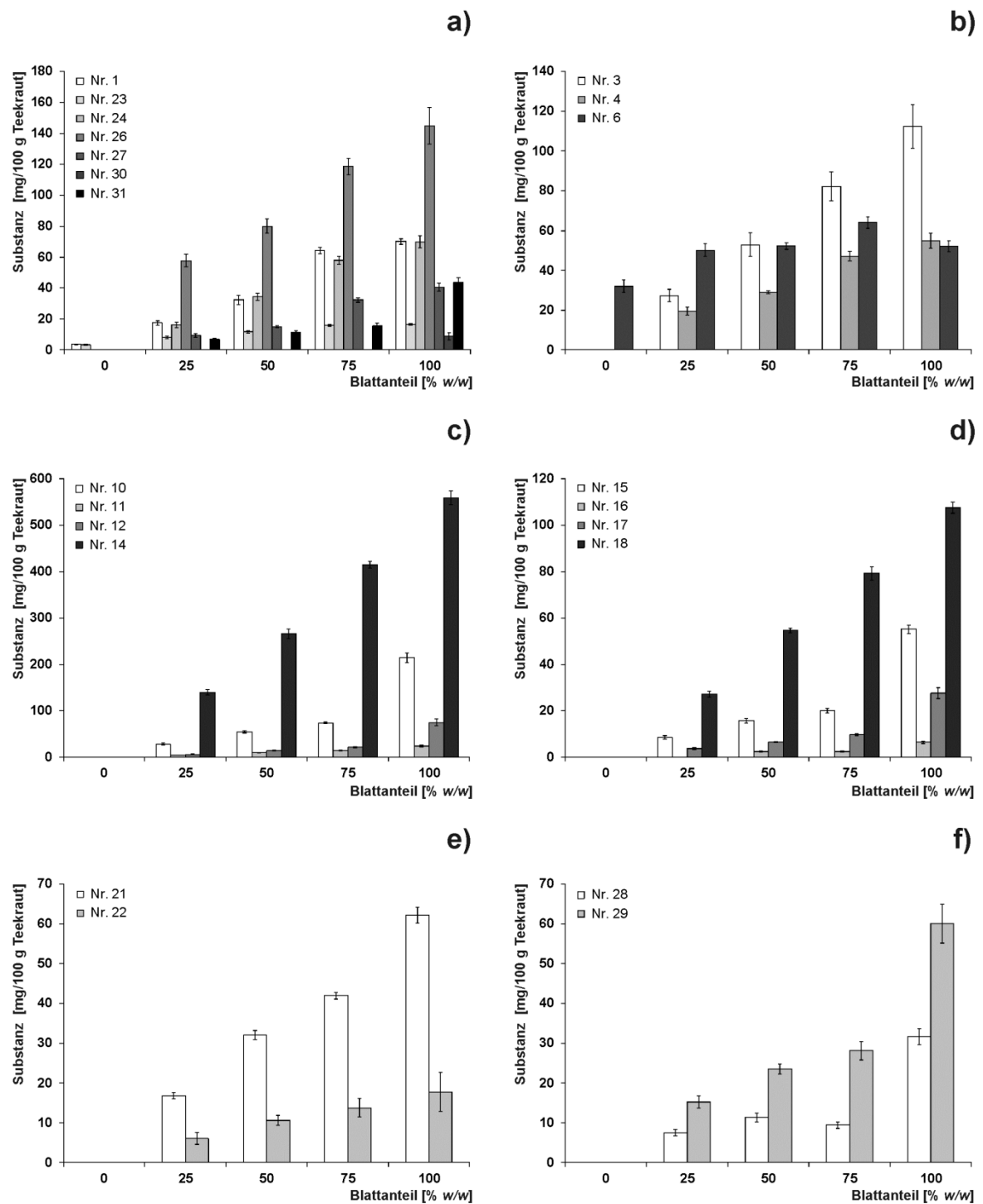


Abb. 5.33a-f Konzentrationen von 22 phenolischen Substanzen in fünf handsortierten *C. incanus* Teeproben (A.so1 bis A.so5) mit Blattanteilen von 0 % (w/w), 25 % (w/w), 50 % (w/w), 75 % (w/w) und 100 % (w/w) sowie entsprechenden Stängelanteilen von 100 % (w/w), 75 % (w/w), 50 % (w/w) und 0 % (w/w). a) Phenolsäuren, b) monomere und dimere Flavanole, c) Myricetinglycoside, d) Quercetinglycoside, e) Tilirosidisomere und f) Ellagitannine. Teezubereitung vgl. Kapitel 4.2. Zugehörige Substanzbezeichnungen sind in Tabelle 5.1 sowie 5.2 und Beschreibungen der Proben in Tabelle 4.1 dargestellt.

Innerhalb der Klasse der Flavanole (Abb. 5.33b) wurde die stärkste Korrelation zwischen dem Blattanteil des Teekrautes und dem Vorkommen phenolischer Substanzen für Gallocatechin (Nr. 3; $R^2=0,99$) beobachtet. Dabei reichte die Gallocatechinkonzentration von 0,0 mg/100 g Teekraut (Probe A.so1) bis 112,5 mg/100 g Teekraut (Probe A.so5). Bezüglich der antioxidativen Kapazität und damit auch der Bioaktivität eines *C. incanus* Tees ist der Gallocatechingehalt ein entscheidender Aspekt. Diese Substanz ist mit einer absoluten TEAC von 5,3 mmol TE/mmol Substanz der antioxidativste Inhaltsstoff in *C. incanus* Tee. Im Gegensatz zur Verteilung von Gallocatechin im Teekraut, wurden auffallend hohe Catechinkonzentrationen (Nr. 6) von 32,0 mg/100 g Teekraut in Probe A.so1 mit einem Stängelanteil von 100 % (w/w) ermittelt. Diese hohen Gehalte an Catechin in verholzten *C. incanus* Pflanzenteilen könnten daher ein Grund für die traditionelle Verarbeitung der oberirdischen Teile, inklusive hölzerner Stängel, in einigen *C. incanus* Tees darstellen (PETEREIT *et al.* 1992, MEYER-BUCHTELA 2001). Ein Vorkommen von Catechin und anderen Flavanolen in Stängeln oder Rinde ist zudem auch für zahlreiche andere Pflanzen verschiedener Gattungen und Familien bekannt (SOUQUET *et al.* 2000, LAVOLA *et al.* 2012, JÜRGENLIEMK *et al.* 2007). Neben dem Vorkommen in verholzten Pflanzenteilen sind in der Literatur jedoch allgemein höhere Catechinkonzentrationen für die Blätter beschrieben (HARRIS *et al.* 2007; TIAN *et al.* 2014). Das Vorkommen von Catechin in Blättern und Stängeln von *C. incanus* erklärt auch vermutlich die niedrige Korrelation ($R^2=0,55$) für den Einfluss des Blattanteils im Teekraut auf die Catechinkonzentration im trinkfertigen Tee. Insgesamt ist diese Substanz ebenfalls ein wichtiger Inhaltsstoff bezüglich der Bioaktivität von *C. incanus* Tee. Für Catechin wurde eine absolute TEAC von 1,5 mmol TE/100 g Teekraut bestimmt. Der Catechingehalt ist aber auch für die sensorischen Eigenschaften des Tees von Bedeutung. Nach PELEG *et al.* (1999) sind solche monomeren Flavanole für einen moderaten, bitteren Geschmack einhergehend mit einer Adstringenz verantwortlich. Weiterhin sollte insbesondere für das Aroma von Kräutertees berücksichtigt werden, dass wässrige Aufgüsse aus 100 % (w/w) *C. incanus* Blättern einen gewissen „grünen Geruch“ aufweisen können, welcher von vielen Konsumenten als unangenehm empfunden wird. Dieser resultiert aus flüchtigen Substanzen der Blätter, die strukturell auf C₆-Aldehyden und C₆-Alkoholen basieren (HATANAKA 1993, HONGSOONGNERN *et al.* 2008).

Mit Blick auf das Vorkommen der Flavonole (Abb. 5.33c und d) in den fünf handsortierten Proben wurden die höchsten Konzentrationen und Korrelationen für Myricitrin (Nr. 14) und Quercitrin (Nr. 18) bestimmt. Darüber hinaus wurden diese Substanzen ausschließlich in den Blättern beinhaltenden Proben A.so2 - A.so5 detektiert, nicht jedoch in Probe A.so1 mit einem Stängelanteil von 100 % (w/w). Für Myricitrin lagen die Konzentrationen in den

Proben zwischen 0,0 mg/100 g Teekraut (A.so1) und 559,2 mg/100 g Teekraut (A.so5) sowie für Quercitrin zwischen 0,0 mg/100 g Teekraut (A.so1) und 107,6 mg/100 g Teekraut (A.so5). Für beide Substanzen lag der Korrelationskoeffizient für den Zusammenhang zwischen Blattanteil des Teekrautes und Konzentration der Substanz bei $R^2=0,99$. Zusätzlich tragen diese Inhaltsstoffe mit einer absoluten TEAC von 2,0 mmol bzw. 0,9 mmol TE/mmol Substanz zur antioxidativen Kapazität von *C. incanus* Tee bei.

Eine ähnliche Verteilung zwischen den Pflanzenteilen des Teekrautes wurde auch für die Tilirosidisomere (Abb. 5.33e) festgestellt. Beide Substanzen waren nur in Proben mit Blattanteil (A.so2-A.so5) enthalten, hingegen nicht in Probe A.so1 mit einem Stängelanteil von 100 % (w/w). Für das dominierende Isomer *trans*-Tilirosid (Nr. 22) lagen die Konzentrationen zwischen 0,0 mg/100 g Teekraut (A.so1) und 62,3 mg/100 g Teekraut (A.so5). Der Korrelationskoeffizient von $R^2=0,99$ deutete auch hier auf einen stark positiven Zusammenhang zwischen dem Blattanteil des Teekrautes und der Tilirosidkonzentration im trinkfertigen *C. incanus* Tee hin.

Auch innerhalb der Klasse der Ellagitannine (Abb. 5.33f) wurde der zuvor beschriebene Zusammenhang in den Proben A.so1-A.so5 beobachtet, jedoch waren in diesem Fall die Korrelationen schwächer. Für HHDP-Glucose Isomer 1 (Nr. 28) wurden hierbei Konzentrationen zwischen 0,0 mg/100 g Teekraut (A.so1) und 31,7 mg/100 g Teekraut (A.so5) mit einer entsprechenden Korrelation von $R^2=0,76$ gemessen. Bezüglich HHDP-Glucose Isomer 2 (Nr. 29) lagen die Gehalte zwischen 0,0 mg/100 g Teekraut (A.so1) und 60,1 mg/100 g Teekraut (A.so5). Für den Konsumenten von *C. incanus* Tee ist insbesondere die Konzentration von HHDP-Glucose Isomer 1 im trinkfertigen Tee von Bedeutung für mögliche gesundheitsfördernde Wirkungen. Diese Substanz ist mit einer absoluten TEAC von 4,4 mmol TE/mmol Substanz das zweitstärkste Antioxidans in *C. incanus* Tee.

Bezüglich eines spezifischen Vorkommens und variierenden Konzentrationen phenolischer Substanzen in den Pflanzenteilen von *C. incanus* sollten neben der klassischen Laboranalytik auch die Pflanzenphysiologie sowie der Erntezeitpunkt dieser mediterranen Sträucher berücksichtigt werden. Wie bereits zu Beginn der Arbeit beschrieben, zählen diese zu den malakophyllen Xerophyten (POTT *et al.* 2007; POTT 2010). Durch den saisonalen Dimorphismus der Blätter kommt es zu einer Akkumulation phenolischer Inhaltsstoffe in den Sommerblättern und vergleichsweise niedrigen Konzentrationen dieser Substanzen in den Winterblättern (ARONNE *et al.* 2001; CHRISTODOULAKIS *et al.* 2014). Für hohe Konzentrationen phenolischer Substanzen in

C. incanus Teekraut ist daher eine Ernte und Verarbeitung der phenolreichen Sommerblätter vermutlich von entscheidender Bedeutung. Untersuchungen des Einflusses eines saisonalen Blattpolymorphismus auf das Profil phenolischer Substanzen in *C. incanus* bieten somit eine wichtige Grundlage für weiterführende Forschungsarbeiten.

Insgesamt sind nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit die phenolischen Inhaltsstoffe in *C. incanus* fast ausschließlich in den Blättern enthalten. Für den Zusammenhang zwischen Blattanteil des Teekrautes und der Konzentration phenolischer Inhaltsstoffe wurde ein Korrelationskoeffizient von $R^2=0,99$ für die Summe der 22 quantifizierten phenolischen Substanzen in *C. incanus* Tee berechnet. Eine Abweichung von dieser Korrelation stellte das Flavanol Catechin dar, das auch in den Stängeln von *C. incanus* enthalten ist. Für eine statistische Absicherung dieser Ergebnisse sollten zusätzlich weitere *C. incanus* Proben analysiert werden, um so mögliche Schwankungen innerhalb des Pflanzenmaterials zu berücksichtigen. Weiterhin sollte auch mit Blick auf die Verbraucherakzeptanz von *C. incanus* Tees beachtet werden, dass neben hohen Konzentrationen phenolischer Inhaltsstoffe ebenfalls das Aroma von Bedeutung ist. *C. incanus* Tees, die aus reinen Blattmischungen aufgebrüht werden, können hierbei möglicherweise einen unerwünschten „grünen Geruch“ aufweisen. Weiterhin sollte für die Stängel von *C. incanus* berücksichtigt werden, dass diese möglicherweise noch weitere Verbindungsklassen oder unter den eingesetzten Aufarbeitungsbedingungen nicht extrahierte Inhaltsstoffe enthalten. Veränderte Extraktionsverhältnisse, z.B. eine mehrfache Mazeration oder die Verwendung von organischen Lösungsmitteln können zu abweichenden Ergebnissen bezüglich der Konzentrationen phenolischer Inhaltsstoffe führen. Dies belegen auch die bereits zuvor beschriebenen traditionellen Extraktionsmethoden. Kurzextrahierte wässrige Extrakte der oberirdischen Teile von *C. incanus* wurden hierbei zur Therapie inflammatorischer Hauterkrankungen oder für eine Unterstützung von Wundheilungsprozessen eingesetzt. Länger gekochte wässrige Extrakte hingegen wurden zur Behandlung von Diarrhö genutzt (PETEREIT *et al.* 1992). Insgesamt stellen somit eine Produktoptimierung bezüglich der verarbeiteten Pflanzenteile sowie eine spezifische Überarbeitung der bestehenden Zubereitungsempfehlungen einen entscheidenden Punkt für die Sicherstellung von *C. incanus* Tees mit einem hohen Anteil bioaktiver phenolischer Inhaltsstoffe dar.

5.4.2 Einfluss der Partikelgröße des Teekrautes

Neben dem spezifischen Vorkommen phenolischer Substanzen in Blättern und Stängeln von *C. incanus* wurde auch die Partikelgröße des Probenmaterials als möglicher Einflussfaktor auf deren Konzentrationen, bzw. deren Extrahierbarkeit aus dem Teekraut, vermutet. Ein erster Hinweis auf das Vorliegen einer solchen Korrelation zeigte sich bereits anhand der zuvor beschriebenen quantitativen Ergebnisse der sieben untersuchten Handelsproben (vgl. Kapitel 5.1.2). Innerhalb dieser Proben wurden die höchsten Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in den Proben mit einer homogenen, feinen Partikelgröße gemessen. Die Proben mit einer eher inhomogenen, groben Partikelgröße enthielten hingegen signifikant geringere Konzentrationen der entsprechenden Substanzen. Zur genaueren Untersuchung der beschriebenen Hypothese wurde exemplarisch Probe A wie zuvor in Kapitel 4.1 beschrieben mittels einer Siebmaschine in sechs Fraktionen definierter Partikelgröße gesiebt (Probe A.gs1-A.gs6). Für die abschließende Korrelation der Teekrautpartikelgrößen mit den Konzentrationen der phenolischen Substanzen, wurden die Hauptinhaltsstoffe mittels LC-DAD quantifiziert.

In Abbildung 5.34a-f sind die Konzentrationen der 22 quantifizierten phenolischen Inhaltsstoffe aus den sechs gesiebten *C. incanus* Fraktionen aus Probe A entlang der ausgewählten Substanzklassen, a) Phenolsäuren, b) monomere und dimere Flavanole, c) Myricetinglycoside, d) Quercetinglycoside, e) Tilirosidisomere und f) Ellagitannine dargestellt.

Innerhalb der Klasse der Phenolsäuren (Abb. 5.33a) wurde für die Mehrheit der quantifizierten Substanzen ein signifikanter Anstieg der Konzentrationen im Tee parallel mit einer Abnahme der Partikelgröße des *C. incanus* Teekrautes von 2,8 mm (A.gs1) auf 0,3 mm (A.gs6) beobachtet. So stieg z.B. die Konzentration von Hydroxyferulasäure-4-O-rhamnosid (Nr. 26) schrittweise von 16,7 mg/100 g Teekraut (Probe A.gs1) auf 69,7mg/100 g Teekraut (Probe A.gs5). Der niedrigste Gehalt dieser Substanz wurde jedoch mit 11,5 mg/100 g Teekraut in Probe A.gs6 mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von 0,3 mm gemessen. Eine vergleichbare negative Korrelation zwischen Partikelgröße und Konzentration phenolischer Inhaltsstoffe in *C. incanus* Tee wurde ebenfalls für Gallussäure (Nr. 1), Methylgallussäure (Nr. 23) und Hydroxyferulasäure-5-O-rhamnosid (Nr. 24) beobachtet. Weiterhin wurden die höchsten Extraktionsausbeuten für Ellagsäure (Nr. 31) und Ellagsäure-7-O-xylosid (Nr. 30) bei Mazeration von Probe A.gs6 mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von 0,3 mm erzielt.

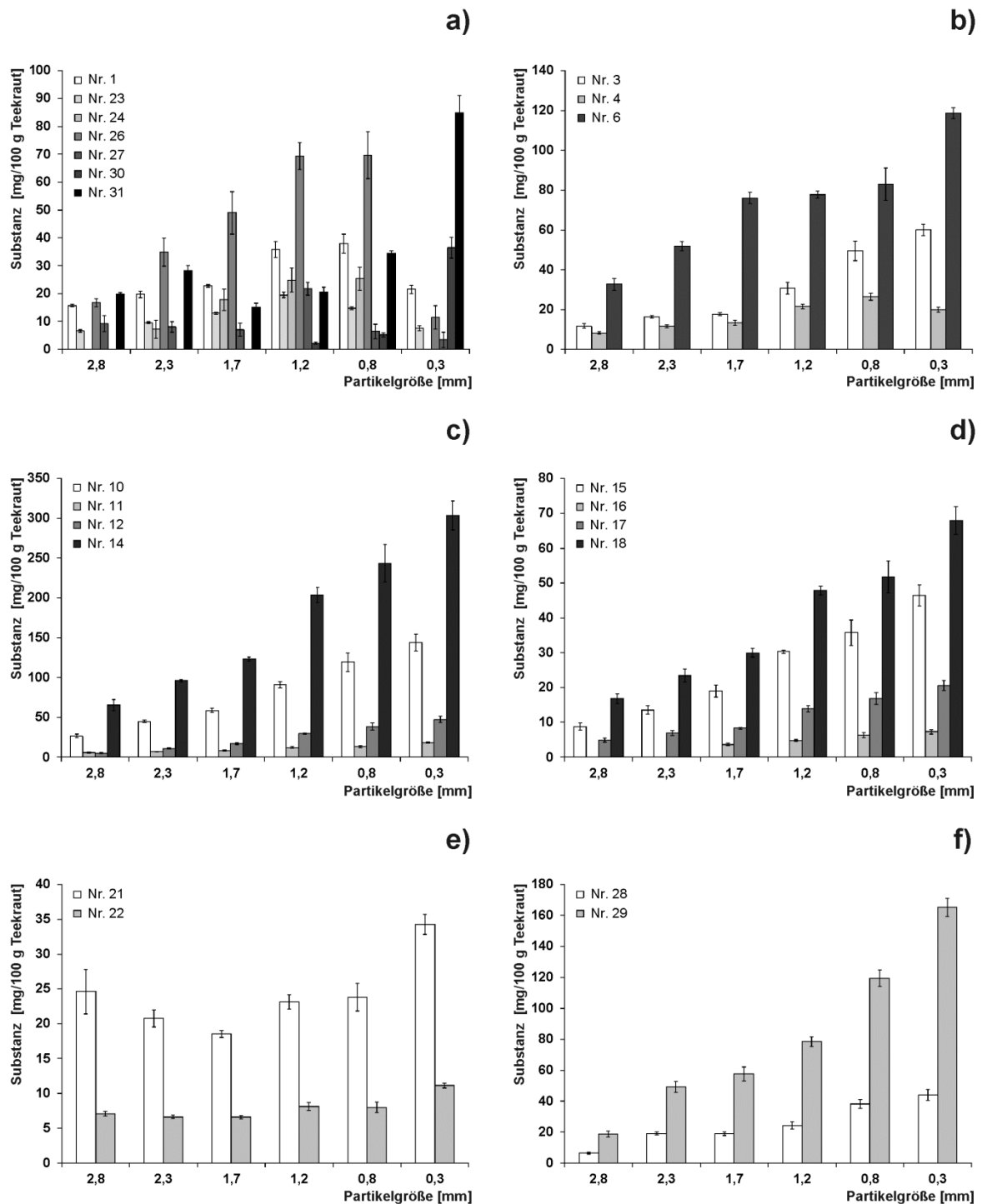


Abb. 5.34a-f Konzentrationen von 22 phenolischen Substanzen in sechs gesiebten *C. incanus* Teeproben (A.gs1 bis A.gs6) mit durchschnittlichen Partikelgrößen von 2,8 mm; 2,3 mm; 1,7 mm; 1,2 mm; 0,8 mm und 0,3 mm. a) Phenolsäuren, b) monomere und dimere Flavanole, c) Myricetinglycoside, d) Quercetinglycoside, e) Tilirosidisomere und f) Ellagitannine. Teezubereitung vgl. Kapitel 4.2. Zugehörige Substanzbezeichnungen sind in Tabelle 5.1 sowie 5.2 und Beschreibungen der Proben in Tabelle 4.1 dargestellt.

Darüber hinaus war Ellagsäure-7-O-xylosid (Nr. 30) ausschließlich in *C. incanus* Tees detektierbar, die aus Teekraut mit einer durchschnittlichen Partikelgröße kleiner als 1,7 mm zubereitet wurden. Weiterhin wurden die höchsten Konzentrationen von Hydroxyferuloyl-rhamnose (Nr. 27) im Teeaufguss aus *C. incanus* Probe A.gs4 mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von 1,2 mm gemessen. Insgesamt wurde somit eine sehr schwache Korrelation zwischen Partikelgröße des Teekrautes und Konzentration der Phenolsäuren in *C. incanus* Tee festgestellt. Diese Extraktionsergebnisse basieren jedoch auf der aktuellen Zubereitungsempfehlung des Herstellers und einer exemplarischen Analytik von Probe A. Veränderte Extraktionsbedingungen, z.B. Extraktionstemperatur oder -zeit, sowie Probenmaterial weiterer Hersteller können hierbei möglicherweise zu variierenden Konzentrationen bioaktiver Phenolsäuren führen.

Innerhalb der Gruppe der Flavanole und deren Dimeren (Abb. 5.33b) resultierte für Gallocatechin (Nr. 3) und Catechin (Nr. 6) die höchste Extrahierbarkeit aus der gesiebten Probe A.gs6 mit einer feinen Partikelgröße von durchschnittlich 0,3 mm. Insgesamt lagen die Gallocatechinkonzentrationen in den *C. incanus* Tees zwischen 11,7 mg/100 g Teekraut (Probe A.gs1) und 60,1 mg/100 g Teekraut (Probe A.gs6) sowie entsprechend für Catechin zwischen 32,6 mg/100 g Teekraut und 118,6 mg/100 g Teekraut. Die Korrelationskoeffizienten für den Einfluss der Partikelgröße auf die Konzentration phenolischer Substanzen in *C. incanus* Tee lagen hier bei $R^2=0,89$ für Gallocatechin und $R^2=0,93$ für Catechin. In der vorliegenden Arbeit wurde somit für Catechin eine fast 4-fach höhere Extraktionsausbeute aus *C. incanus* Teekraut mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von 0,3 mm (A.gs6) im Vergleich zu einer Partikelgröße von 2,8 mm (A.gs1) erzielt. Hierzu wurden in der Literatur kontroverse Ergebnisse für schwarzen Tee (*Camellia sinensis*) beschrieben. So stellten ASTILL *et al.* (2001) beispielsweise signifikant höhere Catechinkonzentrationen in schwarzem Tee fest, der aus ganzen Teeblättern aufgebrüht wurde. Als Vergleichsprobe diente in dieser Studie Teekraut mit einer sehr feinen Partikelgröße (*Dust*). Die Ursache für die niedrigeren Catechinkonzentrationen in schwarzem Tee-*Dust* lag hierbei in einem enzymatischen Abbau durch endogene Phenoloxidasen von *Camellia sinensis*. Diese werden während der Zerkleinerung des Blattmaterials aus den zerstörten Zellen freigesetzt. In *C. incanus* Tee scheint ein solcher enzymatische Abbau von Catechin nicht in signifikantem Umfang stattzufinden. Eine mögliche vorliegende Degradation von Catechin in *C. incanus* Teekraut könnte aber auch durch die erhöhte Extraktion aus Teekraut mit einer kleinen Partikelgröße kompensiert worden sein.

Eine vergleichbare Extrahierbarkeit wie für die Flavanole wurde auch für die Myricetin- (Abb. 5.33c) und die Quercetinglycoside (Abb. 5.33d) beobachtet. Die Konzentrationen von Myricitrin stiegen dabei mit abnehmender Partikelgröße von 65,4 mg/100 g Teekraut (Probe A.gs1) auf 303,6 mg/100 g Teekraut (Probe A.gs6) sowie entsprechend für Quercitrin von 16,8 mg/100 g Teekraut auf 68,0 mg/100 g Teekraut. Somit können fast 5-fach höhere Myricitrin- und entsprechend 4-fach höhere Quercitrinkonzentrationen aus *C. incanus* Teekraut mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von 0,3 mm verglichen mit Teekraut einer Partikelgröße von 2,8 mm extrahiert werden. Die zugehörigen Korrelationskoeffizienten für den Einfluss der Partikelgröße auf die Konzentration dieser Substanzen lagen für Myricitrin bei $R^2=0,97$ und für Quercitrin bei $R^2=0,96$.

Innerhalb der Gruppe der Tilirosidisomere (Abb. 5.33e) wurde hingegen eine von den zuvor beschriebenen Ergebnissen abweichende Extrahierbarkeit festgestellt. Für beide Isomere, *trans*-Tilirosid (Nr. 21) und *cis*-Tilirosid (Nr. 22), wurde nur eine annähernd 1,5-fach höhere Konzentration bei einer Extraktion aus Probe A.gs6 (durchschnittliche Partikelgröße 0,3 mm) verglichen mit Probe A.gs1 (2,8 mm Partikelgröße) ermittelt. Hieraus resultiert, dass diese acylierten Flavonolglucoside sehr effizient extrahiert werden. Auch aus *C. incanus* Teekraut mit einer eher großen Partikelgröße werden diese Substanzen bei Anwendung der aktuellen Zubereitungsempfehlung des Herstellers extrahiert.

In der Klasse der Ellagitannine (Abb. 5.33f) wurde ein starker Einfluss der Teekraut-Partikelgröße auf die Konzentrationen der HHDP-Glucose Isomere I1 und I2 (Nr. 28 und Nr. 29) beobachtet. Dabei wurde für HHDP-Glucose (Nr. 28) eine fast 7-fach höhere und für das zweite Isomer (Nr. 29) eine annähernd 9-fache Konzentration bei einer Zubereitung aus Probe A.gs6 (durchschnittliche Partikelgröße 0,3 mm) verglichen mit Probe A.gs1 (Partikelgröße 2,8 mm) bestimmt. Die absoluten Werte lagen hierbei für HHDP-Glucose (Nr. 28) zwischen 6,5 mg/100 g Teekraut und 44,1 mg/100 g Teekraut und für HHDP-Glucose (Nr. 29) entsprechend zwischen 18,7 mg/100 g Teekraut und 165,2 mg/100 g Teekraut. Für *C. incanus* Tees mit einer hohen Ellagitanninkonzentration sind somit, unter Berücksichtigung der aktuellen Zubereitungsempfehlungen der Hersteller, eine kleine Partikelgröße des verwendeten Teekrautes essentiell.

Abschließend kann für den Einfluss der Partikelgröße des *C. incanus* Teekrautes auf die Extrahierbarkeit der 22 quantifizierten phenolischen Inhaltsstoffe ein stark negativer Zusammenhang mit $R^2=0,98$ für die exemplarisch untersuchte Handelsprobe A festgehalten werden. Für fast alle bioaktiven Inhaltsstoffe, mit Ausnahme einzelner

Phenolsäuren, resultierten bei Verwendung von *C. incanus* Teekraut mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von 0,3 mm signifikant höhere Konzentrationen im Vergleich zu Pflanzenmaterial mit einer Partikelgröße von 2,8 mm als Basis für die Teezubereitung. Diese Daten bezüglich der Extrahierbarkeit phenolischer Substanzen werden auch beispielsweise durch die Ergebnisse von LANG und WAI (2001) bestätigt, die die Partikelgröße einer Probe generell als einen der kritischen Faktoren für eine zufriedenstellende Extraktion in pflanzlichen Naturprodukten beschrieben.

5.5 Vergleich der Konzentrationen bioaktiver Inhaltsstoffe in *C. incanus* Tee mit verschiedenen pflanzlichen Lebensmitteln

Nachfolgend werden die in *C. incanus* Tee enthaltenen Konzentrationen bioaktiver Inhaltsstoffe mit ausgewählten phenolreichen Lebensmitteln verglichen. Hierbei repräsentieren die dargestellten Gehalte in *C. incanus* Tee den Mittelwert aus sechs innerhalb der vorliegenden Arbeit analysierten Handelsproben (A und C-G). Diese wurden nach der aktuellen Herstellerempfehlung zubereitet. Entsprechend wurden 15 g Teekraut/L für 5 min bei 95 °C mazeriert. Innerhalb der Laboranalytik wurde weiterhin Millipore®-Wasser als Kochwasser eingesetzt. Verschiedene Extraktionsverfahren können hierbei signifikant abweichende Ergebnisse erzielen. Die Referenzwerte für den Vergleich verschiedener Lebensmittel stammen aus der Datenbank Phenolexplorer 3.0 [4] die auf den Arbeiten von NEVEU *et al.* (2010), ROTHWELL *et al.* (2012) und ROTHWELL *et al.* (2013) basiert. Diese Werte beziehen sich auf 100 g Frischmasse bzw. 100 mL Getränk. Weiterhin stellen diese Konzentrationen Mittelwerte aus einer unterschiedlichen Anzahl Forschungsarbeiten sowie verschiedener Probenzahlen dar. Die Standardabweichungen sind daher und aufgrund variierender Analysenmethoden (vor allem unterschiedliche Extraktionsverfahren) sowie natürlicher Schwankungen innerhalb des untersuchten Pflanzenmaterials teilweise sehr hoch. In Tabelle 5.8 sind die Konzentrationen von Gallussäure, Gallocatechin, Catechin und Quercetin-3-O-galactosid in *C. incanus* Tee im Vergleich zu grünem Tee (*Camellia sinensis*), schwarzem Tee (*Camellia sinensis*) und Rotwein (*Vitis vinifera*) dargestellt. Für diese Substanzen wurden innerhalb der vorliegenden Arbeit hohe antioxidative Kapazitäten nachgewiesen (vgl. Tabelle 5.5). Bezüglich Gallussäure enthält *C. incanus* Tee mit 0,8 mg/100 mL höhere Konzentrationen als grüner Tee mit 0,5 mg/100 mL. Zudem stellt die Gallussäurekonzentration für Grünen Tee einen Mittelwert aus 44 Teeproben aus insgesamt sieben Studien dar. Die Einzelwerte der Gallussäurekonzentrationen variierten hierbei in grünem Tee innerhalb eines weiten

Bereiches von 0,0 mg und 3,3 mg/100 mL. Auch die Gallussäurekonzentrationen der sechs analysierten *C. incanus* Handelsproben schwankte zwischen 0,4 mg und 1,3 mg/100 mL. Somit lagen bereits bei dieser vergleichsweise geringen Probenanzahl, die unter gleichen Bedingungen aufgearbeitet und analysiert wurden, relativ große Standardabweichungen vor. Dies verdeutlicht die Schwierigkeit eines absoluten Vergleiches der Konzentrationen bioaktiver Inhaltsstoffe in verschiedenen Lebensmitteln. Insgesamt enthält *C. incanus* jedoch vergleichsweise hohe Konzentrationen der in Tabelle 5.8. dargestellten phenolischen Substanzen. So lag hierbei auch der Gehalt von Quercetin-3-O-galactosid in einem vergleichbaren Bereich zu grünem Tee (1,0 mg/100 mL) und schwarzem Tee (0,7 g/100 mL).

Tab. 5.8 Vergleich der Konzentrationen [mg/100 mL] von Gallussäure, Gallocatechin und Catechin in Zistrosentee, grünem Tee, schwarzem Tee und Rotwein. Die Konzentrationen für *C. incanus* Tee stellen den Mittelwert aus sechs Handelsproben (A und C-G) dar. Beschreibungen der Proben sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Die Vergleichswerte der Lebensmittel stammen aus der Datenbank Phenolexplorer 3.0 [4] (NEVEU *et al.* 2010, ROTHWELL *et al.* 2012 und ROTHWELL *et al.* 2013).

	Zistrosentee (<i>Cistus incanus</i>)	Grüner Tee (<i>Camellia sinensis</i>)	Schwarzer Tee (<i>Camellia sinensis</i>)	Rotwein (<i>Vitis vinifera</i>)
Gallussäure	0,8 ± 0,3	0,5 ± 0,9	4,6 ± 4,4	3,6 ± 2,7
Gallocatechin	0,6 ± 0,3	2,3 ± 4,1	14,1 ± 14,6	0,1 ± 0,1
Catechin	0,6 ± 0,3	0,7 ± 1,1	2,5 ± 3,9	6,8 ± 6,2
Quercetin-3-O-galactosid	0,7 ± 0,3	1,0 ± 0,0	0,7 ± 0,4	–

Weiterhin sind in Tabelle 5.9 die Konzentrationen für die Summe der quantifizierten Quercetinglycoside in *C. incanus* Tee im Vergleich zur Summe der Quercetinglycoside in verschiedenen Zwiebeln (*Allium cepa* var. *cepa*) dargestellt. Wie in Tabelle 5.5 zuvor gezeigt, wurden für Quercetinverbindungen relativ hohe antioxidative Kapazitäten nachgewiesen. Die Zwiebel enthält hohe Konzentrationen verschiedener Quercetin-monoglycoside und -diglycoside. Hierbei fällt in direktem Vergleich auf, dass eine 250 mL Tasse *C. incanus* Tee mit durchschnittlich 5,5 mg deutlich geringere Konzentrationen an

bioaktiven Quercetinglycosiden enthält als 100 g gelbe oder rote Zwiebel mit 73,4 mg bzw. 157,6 mg.

Tab. 5.9 Vergleich der mittleren Konzentrationen quantifizierter Quercetinglycoside in Zistrosentee und verschiedenen Zwiebeln. Die Konzentrationen für *C. incanus* Tee stellen den Mittelwert aus sechs Handelsproben (A und C-G) dar. Beschreibungen der Proben sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Die Vergleichswerte der Lebensmittel stammen aus der Datenbank Phenolexplorer 3.0 [4] (NEVEU *et al.* 2010, ROTHWELL *et al.* 2012 und ROTHWELL *et al.* 2013). Angaben in g Frischmasse.

	Zistrosentee (<i>Cistus incanus</i>)	Zwiebel (weiß) (<i>Allium cepa</i> var. <i>cepa</i>)	Zwiebel (gelb) (<i>Allium cepa</i> var. <i>cepa</i>)	Zwiebel (rot) (<i>Allium cepa</i> var. <i>cepa</i>)
Quercetin-glycoside	2,2 mg/100 mL	5,4 mg/100 g	73,4 mg/100 g	157,6 mg/100 g

Die durch einen Verzehr von 100 g Zwiebel (Frischmasse) aufgenommenen hohen Mengen an Quercetinglycosiden können auch durch große Mengen optimal zubereiteten *C. incanus* Tee vermutlich nicht durch ein durchschnittliches Konsumverhalten erreicht werden. Selbst ein Verzehr von 2 L *C. incanus* Tee (zubereitet nach aktueller Herstellerempfehlung) würde nur eine Zufuhr von 43,8 mg Quercetinglycosiden erzielen. Auch durch eine höhere Teekrauteinwaage und optimierte Teezubereitung würden hierdurch vermutlich keine Zufuhrmengen, wie durch einen Verzehr von 100 g roter Zwiebel, durch den Konsumenten erreicht. Jedoch enthält *C. incanus* Tee im Gegensatz zu Zwiebeln neben Quercetinglycosiden zusätzlich eine große Vielfalt weiterer bioaktiver Substanzen in hohen Konzentrationen.

In Tabelle 5.10 sind beispielsweise die in *C. incanus* Tee enthaltenen Konzentrationen der Summe der Myricetinglycoside im Vergleich zu den Myricetinglycosiden in Heidelbeere (*Vaccinium corymbosum*), schwarzer Johannisbeere (*Ribes nigrum*) und Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) dargestellt. Auch für diese Substanzen wurden innerhalb der vorliegenden Arbeit hohe TEAC-Werte ermittelt (vgl. Tabelle 5.4). Von diesen bioaktiven Inhaltsstoffe enthält bereits eine 250 mL Tasse *C. incanus* Tee mit durchschnittlich 17,0 mg Myricetinglycosiden höhere Konzentrationen als beispielsweise 100 g Heidelbeeren (13,2 mg), schwarze Johannisbeeren (5,9 mg) oder Cranberrys (5,3 mg).

Tab. 5.10 Vergleich der Konzentrationen quantifizierter Myricetinglycoside in Zistrosetee und ausgewählten Beeren. Die Konzentrationen für *C. incanus* Tee stellen den Mittelwert aus sechs Handelsproben (A und C-G) dar. Beschreibungen der Proben sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Die Vergleichswerte der Lebensmittel stammen aus der Datenbank Phenolexplorer 3.0 [4] (NEVEU *et al.* 2010, ROTHWELL *et al.* 2012 und ROTHWELL *et al.* 2013). Angaben in g Frischmasse.

	Zistrosetee (<i>Cistus incanus</i>)	Heidelbeere (<i>Vaccinium corymbosum</i>)	Schwarze Johannisbeere (<i>Ribes nigrum</i>)	Cranberry (<i>Vaccinium macrocarpon</i>)
Myricetin- glycoside	6,8 mg/100 mL	13,2mg/100 g	5,9 mg/100 g	5,3 mg/100 g

Auch enthält *C. incanus* Tee z.B. bezüglich Ellagsäure relativ hohe Konzentrationen. In Tabelle 5.11 sind diese im Vergleich zu Erdbeere (*Fragaria*), Brombeere (*Rubus*) und Walnuss (*Juglans regia*) dargestellt. Eine 250 mL Tasse *C. incanus* Tee enthält hierbei zwar höhere Ellagsäurekonzentrationen als 100 g Erdbeeren (1,2 mg), jedoch können hierbei durch den Konsumenten auch bei einer optimalen Zubereitung und höheren Teekrauteinwaage vermutlich keine vergleichbaren Zufuhrmengen wie durch den Verzehr von 100 g Brombeeren (43,7 mg) oder Walnüssen (28,5 mg) erzielt werden.

Tab. 5.11 Vergleich der Ellagsäurekonzentrationen in Zistrosetee, Erdbeere, Brombeere und Walnuss. Die Konzentrationen für *C. incanus* Tee stellen den Mittelwert aus sechs Handelsproben (A und C-G) dar. Beschreibungen der Proben sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Die Vergleichswerte der Lebensmittel stammen aus der Datenbank Phenolexplorer 3.0 [4] (NEVEU *et al.* 2010, ROTHWELL *et al.* 2012 und ROTHWELL *et al.* 2013). Angaben in g Frischmasse.

	Zistrosetee (<i>Cistus incanus</i>)	Erdbeere (<i>Fragaria</i>)	Brombeere (<i>Rubus</i>)	Walnuss (<i>Juglans regia</i>)
Ellagsäure	0,7 ± 0,5 mg/100 mL	1,2 ± 0,8 mg/100 g	43,7 ± 24,5 mg/100 g	28,5 ± 5,0 mg/100 g

Zusammenfassend enthält *C. incanus* Tee somit hohe Konzentrationen einer großen Vielfalt bioaktiver Substanzen. Die Konzentrationen einzelner Substanzen liegen zwar in einigen anderen Lebensmitteln höher, jedoch enthalten diese häufig nur geringe Konzentrationen weiterer phenolischer Verbindungen. Beispielsweise enthält schwarzer Tee hohe Konzentrationen verschiedener Flavanole jedoch keine Myricetinglycoside.

Ebenso enthält die Zwiebel sehr hohe Konzentrationen an Quercetinglycosiden aber keine signifikanten Konzentrationen weiterer phenolischer Inhaltsstoffe (Datenbank Phenolexplorer 3.0 [4]; NEVEU *et al.* 2010, ROTHWELL *et al.* 2012 und ROTHWELL *et al.* 2013).

6 Schlussfolgerung

C. incanus Tee enthält eine Vielfalt phenolischer Inhaltsstoffe aus verschiedenen Substanzklassen. Diese Verbindungen umfassen Phenolsäuren, monomere und dimere Flavanole, Flavonolglycoside und Ellagitannine. Die Konzentrationen dieser Inhaltsstoffe lagen insbesondere bezogen auf die Summe der Substanzen in vergleichbaren Bereichen anderer phenolreicher Lebensmittel wie grüner Tee (*Camellia sinensis*), Zwiebeln oder Rotwein (Datenbank Phenolexplorer 3.0 [4]; NEVEU *et al.* 2010, ROTHWELL *et al.* 2012 und ROTHWELL *et al.* 2013). Zwischen den untersuchten *C. incanus* Tees wurden für die Gehalte der 21 quantifizierten phenolischen Inhaltsstoffe signifikante Unterschiede festgestellt. Diese Konzentrationsunterschiede waren, neben möglichen ökophysiologischen Faktoren oder dem Erntezeitpunkt, vor allem abhängig von Blatt- bzw. Stängelanteil sowie der Partikelgröße des Teekrautes. Insgesamt kann ein hoher Blattanteil, bzw. ein geringer Stängelanteil, in Kombination mit einer kleinen Partikelgröße des Teekrautes für *C. incanus* Tees mit hohen Konzentrationen phenolischer Substanzen auf Basis der Ergebnisse aus dieser Arbeit empfohlen werden.

Detaillierte Aussagen zu einer Korrelation zwischen Herkunftsland oder Erntezeitpunkt des *C. incanus* Teekrautes und den Konzentrationen phenolischer Substanzen wurden aufgrund häufig nicht verfügbarer Herstellerangaben in dieser Arbeit nicht gegeben. Neben stark variierenden Konzentrationen der phenolischen Substanzen war jedoch das Profil dieser Verbindungen in den untersuchten Handelsproben sehr homogen. Ein Zusatz von Kräutern, z.B. 5 % Pfefferminze, zu *C. incanus* Tee war innerhalb der vorliegenden Arbeit daher möglich. Zur statistischen Absicherung dieser Ergebnisse sollten jedoch noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Auch sollte überprüft werden, ob ein Zusatz von weiteren *Cistus*-Arten oder Unterarten zu *C. incanus* Tee mittels der in dieser Arbeit beschriebenen Methode detektiert werden kann. Ein *Profiling* phenolischer Inhaltsstoffe in *C. incanus* Tee könnte bei einer Bestätigung der Ergebnisse innerhalb von Qualitäts- und Authentizitätskontrollen zukünftig eine wichtige Rolle spielen. Hierdurch könnten beispielsweise anhand der Konzentration ausgewählter phenolischer Substanzen als Marker Rückschlüsse auf den ungefähren Blattanteil des verarbeiteten *C. incanus* Teekrautes gezogen werden oder nicht gekennzeichnete Zusätze weiterer Pflanzenarten zu *C. incanus* Tee festgestellt werden. Auch liefern die Ergebnisse zum Profil sowie den Konzentrationen der phenolischen Inhaltsstoffe in *C. incanus* Tee eine erste Datengrundlage für eine mögliche Neubewertung des aktuellen *Novel Food* Status durch die Europäische Kommission. Hierfür müssen Nachweise erbracht werden, dass

entweder keine gesundheitlichen Risiken durch nicht geklärte pharmakologische Wirkungen vorliegen oder tatsächlich eine signifikante, traditionelle Verwendung als Lebensmittel bereits vor dem 15. Mai 1997 innerhalb der Europäischen Gemeinschaft vorlag. Für den Nachweis zu pharmakologischen Wirkungen können wiederum die phenolischen Inhaltsstoffe als Substrate für die durchzuführenden Studien dienen.

Neben der Beschaffenheit des Teekrautes beeinflusst vor allem die Zubereitung von *C. incanus* Tee die Konzentrationen phenolischer Substanzen im trinkfertigen Tee. Innerhalb der *C. incanus* Teezubereitung sollte von Verbrauchern und insbesondere von Herstellern von *Ready-to-drink*-Tees ein mineralstoffarmes Kochwasser verwendet werden. Hohe Mineralstoffkonzentrationen im Kochwasser bewirken eine Komplexierung phenolischer Substanzen in *C. incanus* Tee. Dies führt zu einer *Tea Cream* Bildung in Form eines dünnen Oberflächenfilmes sowie eines Präzipitates im abgekühlten Tee. Letzteres würde im aktuell wachsenden Marktsegment der *Ready-to-drink*-Tees leicht zu einer Ablehnung durch den Verbraucher aufgrund einer unerwünschten optischen Beschaffenheit des Produktes führen. Ebenfalls sind Verbleib und Bioverfügbarkeit der *Tea Cream* bei Verzehr des Tees, z.B. ein Zurückbleiben des Präzipitates als Bodensatz in der Verpackung oder Tasse, nicht geklärt. Die phenolischen Substanzen werden somit möglicherweise nicht verzehrt oder nicht resorbiert und mögliche gesundheitsfördernde Wirkungen würden somit ausbleiben. Die beschriebene Bildung einer *Tea Cream* ist bisher in der Literatur vor allem für grünen und schwarzen Tee (*Camellia sinensis*) beschrieben (ROBERTS 1963, JÖBSTL *et al.* 2005, TANIZAWA *et al.* 2007, PENDERS *et al.* 1998) und wurde durch die vorliegende Arbeit auch für *C. incanus* Tee bestätigt.

Neben der Ionenkonzentration beeinflusst auch der pH-Wert des Kochwassers die Konzentrationen phenolischer Substanzen im trinkfertigen Tee. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in einem Modellversuch gezeigt, dass ein basischer pH-Wert innerhalb der Teezubereitung zu einer Autoxidation von Catechin zu Dehydrodicatechin A beitragen kann. Diese bereits in der Literatur (HATHWAY und SEAKINS 1955, COURBAT *et al.* 1977) beschriebene Reaktion wurde auch innerhalb der Zubereitung von *C. incanus* Tee in der vorliegenden Arbeit beobachtet. Weiterhin wurde auch eine beschriebene Epimerisierung von Catechin zu Epicatechin (SETO *et al.* 1997, WANG *et al.* 2000) in *C. incanus* Tee durch einen basischen pH-Wert des Kochwassers innerhalb der Zubereitung begünstigt. Somit könnte eine Zugabe von etwas Säure, z.B. Zitronensaft, eine Absenkung des Kochwasser pH-Wertes erzielen und so die Stabilität bioaktiver phenolischer Substanzen während der *C. incanus* Teezubereitung gesteigert werden.

Bezüglich der Stabilität gegenüber thermischen Einflüssen waren die phenolischen Substanzen in *C. incanus* Tee bei hohen Temperaturen von bis zu 95 °C und Kochzeiten bis 20 min stabil. Erst bei einer längeren Kochdauer wurde eine geringe thermische Degradation einzelner Substanzen, z.B. Quercetinglycoside, beobachtet. Ein solcher thermischer Abbau von Flavonoglycosiden ist ebenfalls aus der Literatur bekannt (BUCHNER *et al.* 2006). Insgesamt kann für die Zubereitung von *C. incanus* Tee mit hohen Konzentrationen phenolischer Inhaltsstoffe eine Erhöhung der aktuellen Herstellerempfehlungen für die Kochzeit von 5 min auf 20 min empfohlen werden. Zudem sollte während der Teezubereitung die Kochtemperatur beibehalten werden, d.h. ein meist durch den Verbraucher durchgeführtes Aufbrühen des Teekrautes mit kochendem Wasser und anschließende Mazeration des Tees ohne Wärmequelle sollte vermieden werden. Das hieraus resultierende Absinken der Kochtemperaturen kann zu geringeren Konzentrationen phenolischer Substanzen im trinkfertigen *C. incanus* Tee führen.

Für *C. incanus* Tee sowie insbesondere für die einzelnen phenolischen Inhaltsstoffe wurden in dieser Arbeit meist hohe antioxidative Kapazitäten gemessen. Die antioxidative Kapazität stellt ebenfalls ein gutes Maß für die Reaktivität, Stabilität und Bioaktivität dieser Substanzen dar. Diese bioaktiven Inhaltsstoffe und/oder synergistische Effekte, resultierend aus einer komplexen Mischung dieser Verbindungen, sind somit vermutlich für die zahlreichen beschriebenen Wirkungen von *C. incanus* Tee und Extrakten (ATTAGUILE *et al.* 2000, HANNIG *et al.* 2009 und 2008, DROEBNER *et al.* 2011, EHRHARDT *et al.* 2007, DROEBNER *et al.* 2007, KALUS *et al.* 2009, ALI *et al.* 2013) verantwortlich. Darüber hinaus werden viele Krankheiten darunter Krebs, kardiovaskuläre Erkrankungen, Osteoporose oder altersbedingte degenerative Erkrankungen, durch Oxidationsreaktionen initiiert (SCALBERT *et al.* 2005). *C. incanus* Tee mit hohen Konzentrationen antioxidativer, phenolischer Inhaltsstoffe könnte möglicherweise einen Beitrag innerhalb der Prävention dieser Erkrankungen leisten. Weiterführende Bioaktivitätstests zu den Wirkungen einzelner phenolischer *C. incanus* Inhaltsstoffe stellen somit eine Grundlage für zukünftige Forschungsarbeiten dar. Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Assays zu den Wirkungen einzelner phenolischer Substanzen aus *C. incanus* Tee dürfen aus Gründen der Geheimhaltung nicht genannt werden. Insgesamt könnte *C. incanus* Tee aber aufgrund der großen Bandbreite sowie hohen Konzentrationen bioaktiver Inhaltsstoffe als möglicher „Alleskönner“ zu einer Verbesserung der menschlichen Gesundheit und insbesondere zur Prävention zahlreicher Zivilisationskrankheiten und degenerativer Erkrankungen beitragen. Um es nach dem Zitat von George Orwell zu Beginn dieser Arbeit zu sagen: „Echte Teeliebhaber trinken ihren Tee mit jedem abgeschlossenen Lebensjahr etwas stärker“.

7 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 32 phenolische Substanzen in *C. incanus* Tee mittels LC-DAD-ESI-MS/MS identifiziert. Bei diesen Inhaltsstoffen handelt es sich um ein breites Spektrum an Phenolsäuren, monomeren und dimeren Flavanolen, Flavonolglycosiden und Ellagitanninen. Weiterhin wurden mittels LC-DAD 21 phenolische Inhaltsstoffe in sieben *C. incanus* Handelsproben quantifiziert. Hierbei wurden signifikante Konzentrationsunterschiede beobachtet. Diese wurden größtenteils auf die Partikelgröße des Teekrautes sowie die darin enthaltenen *C. incanus* Blatt- und Stängelanteile zurückgeführt. Eine Quantifizierung der phenolischen Substanzen in gesiebten (Partikelgrößen: 0,3 mm-2,8 mm) sowie in handsortierten Proben mit definierten Blatt- und Stängelanteilen (0 % w/w-100 % w/w Blattanteil) bestätigte dies. Weiterhin wurde eine Methode zur Bestimmung des Holzanteiles im Teekraut anhand des Cellulosegehaltes für *C. incanus* Tee etabliert. Hierbei korrelierte ein hoher Cellulosegehalt stark mit dem Holzanteil der Probe. Insgesamt resultierten aus Teekraut mit einer feinen Partikelgröße (0,3 mm) höhere Konzentrationen phenolischer Inhaltsstoffe, als aus Proben mit einer groben Partikelgröße (2,8 mm). Zusätzlich waren bei hohen Blattanteilen, bzw. niedrigen Stängelanteilen des Teekrautes, signifikant höhere Konzentrationen der phenolischen Substanzen im trinkfertigen *C. incanus* Tee enthalten.

Weiterhin erfolgte eine Charakterisierung der *C. incanus* Proben anhand der Gesamtphenolgehalte (*Folin-Ciocalteu-Assay*), Tanningehalte (*Methylcellulose-Präzipitations-Assay*) und gesamten antioxidativen Kapazitäten (*Elektronenspinresonanz-Spektroskopie*). Die Ergebnisse dieser Summenparameter korrelierten ebenfalls mit der Beschaffenheit des Teekrautes (Partikelgröße und Blatt-/ Stängelanteil des Teekrautes). In Handelsproben mit einer feinen Partikelgröße (0,3 mm) wurden höhere Werte für diese Parameter gemessen. Ein ähnliches Ergebnis resultierte aus hohen Blatt- bzw. niedrigen Stängelanteilen des Teekrautes. Insgesamt enthielten die *C. incanus* Handelsproben hohe Gesamtphenol- und Ellagitanningehalte. Diese phenolischen Verbindungen waren in *C. incanus* Tee für die gesamte antioxidative Kapazität und damit für einen Großteil der Bioaktivität verantwortlich. Die absoluten antioxidativen Kapazitäten von insgesamt 22 phenolischen Inhaltsstoffen in *C. incanus* Tee wurden mittels LC-onlineTEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) bestimmt. Die Höhe der antioxidativen Kapazitäten dieser Substanzen war hierbei stark von deren Molekülstruktur abhängig. Darüber hinaus wurden 14 identifizierte Substanzen mittels präparativer LC-DAD isoliert und für weitere Bioaktivitätstests zur Verfügung gestellt. Unter diesen Substanzen waren Phenolsäuren,

monomere und dimere Flavanole sowie Flavonolglycoside. Die Ergebnisse zu den Wirkungen dieser Substanzen dürfen aus Gründen der Geheimhaltung nicht in der vorliegenden Arbeit präsentiert werden.

Weiterhin wurden Effekte verschiedener Faktoren aus dem Prozess der Teezubereitung auf die Konzentrationen bioaktiver Substanzen in *C. incanus* Tee untersucht. Hierbei wurden durch hohe Kochtemperaturen (95 °C) die höchsten Konzentrationen erzielt. Zudem waren die quantifizierten phenolischen Substanzen bei diesen Temperaturen auch über längere Kochzeiten stabil. Ein Abbau wurde erst ab einer Kochzeit über 20 min beobachtet. Einen bedeutenden Faktor bezüglich hoher Konzentrationen bioaktiver Inhaltsstoffe in *C. incanus* Tee stellte der Einsatz von mineralstoffarmen Kochwasser innerhalb der Teezubereitung dar. Eine Verwendung von Mineralwasser führte hingegen beim Abkühlen des Tees zu einer Komplexierung phenolischer Inhaltsstoffe. Dies zeigte sich optisch in der Bildung eines Präzipitates sowie eines dünnen Oberflächenfilmes auf dem Tee (*Tea Cream*). Für beide Ausprägungen der *Tea Cream* wurden in *C. incanus* Tee hohe gesamte antioxidative Kapazitäten mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie nachgewiesen. Für den wässrigen Überstand (Tee) resultierte durch Bildung der *Tea Cream* eine geringere gesamte antioxidative Kapazität im Vergleich zu einem Tee ohne eine solche Komplexierung bioaktiver Substanzen. Weiterhin konnte in einem Modellversuch zur Stabilität von Catechin in Abhängigkeit vom pH-Wert des Kochwassers sowie der Substanzkonzentration Epimerisierungs- sowie Autoxidationsreaktionen nachgewiesen werden. Durch die Reaktion von Catechin, insbesondere bei basischem pH-Wert (pH 11) des Kochwassers und bei vergleichbaren Catechinkonzentrationen (0,01 mg/mL) wie in *C. incanus* Tee, wurde eine Epimerisierung zu Epicatechin sowie eine Autoxidation zu Dehydrodicatechin A beobachtet. Beide Substanzen wurden auch in *C. incanus* Tee nach längerer thermischer Behandlung (60 min bei 95 °C) mit Mineralwasser (pH 7,6) detektiert.

Insgesamt können für die Zubereitung von *C. incanus* Tee mit hohen Konzentrationen bioaktiver Inhaltsstoffe nachfolgende Empfehlungen gegeben werden. Als pflanzliche Basis für den Teeaufguss sollte *C. incanus* Kraut mit hohem Blattanteil sowie feiner Partikelgröße eingesetzt werden. Innerhalb der Zubereitung sollte ein mineralstoffarmes Wasser verwendet werden. Die Kochzeit sollte zusätzlich von der aktuellen Herstellerempfehlungen (5 min) auf 20 min erhöht werden. Darüber hinaus können hohe Kochtemperaturen von 95 °C für *C. incanus* Tee empfohlen werden. Ein Absinken der Temperatur während der Zubereitung sollte vermieden werden.

8 Summary

Within the present work 32 phenolic substances were identified in *C. incanus* infusions by the use of LC-DAD-ESI-MS/MS. These compounds included a wide range of phenolic acids, monomeric and dimeric flavanols, flavonol glycosides as well as ellagitannins. Further on, 21 of these phenolic compounds were quantified in infusions brewed from seven commercially available *C. incanus* herbal teas by LC-DAD. Significant differences in the concentrations of these substances were the result. These varying contents were ascribed mainly to the particle size of the herb material and to the processed contents of leaves and stems therein. A quantification of phenolic substances in sieved (particle sizes: 0.3 mm-2.8 mm) and manually sorted (0 % w/w-100 % w/w leaf content) *C. incanus* herbal tea samples confirmed this assumption. Furthermore, a method for determining the real wood content in herbal material for *C. incanus* infusions was established in this work. Within this method the cellulose content correlated strongly with the wood content of the herbal tea samples. Altogether brewing of *C. incanus* herb with a small particle size (0.3 mm) resulted in higher concentrations of phenolic substances in the infusion, than brewing herb with a larger particle size (2.8 mm). Additionally, high leaf or low stem contents of herbal tea achieved higher concentrations of these compounds in *C. incanus* infusions.

In the second part of this work characterizations of the *C. incanus* infusions, based on determinations of total phenol contents (*Folin-Ciocalteu* assay), tannin contents (methylcellulose precipitation assay) and total antioxidant capacities (electron spin resonance spectroscopy), were performed. The results for the aforementioned analytical parameters correlated with the constitution of herb material (particle size and leaf or stem content) too. In the commercially available *C. incanus* herbal tea samples with a small herbal particle size (0.3 mm), higher values were measured for these parameters. Similar results were observed for high leaf or low stem contents of the herbal material. Altogether the seven analyzed *C. incanus* infusions contained high total phenol and high ellagitannin contents. These phenolic substances were responsible for the total antioxidant capacity and therewith for most of the bioactivity of *C. incanus* herbal infusions. By use of LC-onlineTEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) the absolute antioxidant capacity of 22 phenolic ingredients of the herbal infusions were determined. The TEAC depended on the molecular structure of these single compounds. For a further investigation of bioactivity and potential health benefiting effects, 14 of the identified substances were isolated by preparative LC-DAD and provided for external analyses. These isolated

compounds included phenolic acids, monomeric and dimeric flavanols as well as flavonol glycosides of *C. incanus* herbal infusions. The results of the external analyses were not allowed to be shown in the present work due to secrecy reasons.

In the last part of this work the effects of chosen factors of the brewing process on the concentrations of bioactive substances in *C. incanus* infusions were investigated. The highest contents of these compounds were achieved by high temperatures (95 °C) during the brewing process. In addition these substances were heat-resistant at the described temperature even for long brewing times. A thermal degradation was not observed before a brewing time of 20 min. The use of brewing water with low mineral contents was identified as an important factor in achieving high concentrations of bioactive substances in *C. incanus* infusions. The application of mineral water led to a complex formation of phenolic substances during cooling of the infusions. The result was a tea cream formation in terms of a precipitate on the base of the cup and a thin film on the surface of the infusion. For both, precipitate and surface film, high total antioxidant capacities were proven by electron spin resonance spectroscopy. For the aqueous supernatant (tea) a much lower antioxidant capacity was measured due to complex formation of bioactive substances. In infusions without such a tea cream formation higher total antioxidant capacities were observed. Additionally, in a model test the resistance of catechin against epimerization and autoxidation was dependent of the pH-value of the brewing water as well as the substance concentration in the test solution. Through reaction of catechin, especially at an alkaline pH-value (pH 11) of brewing water and a catechin concentration of the test solution comparable to *C. incanus* herbal infusions (0.01 mg/mL), an epimerization to epicatechin as well as an autoxidation to dehydrodicarthechin A was observed. Both reaction products of catechin were detected in *C. incanus* herbal infusions after a prolonged heat treatment (60 min at 95 °C) with mineral water (pH 7.6).

Finally, for the brewing of *C. incanus* herbal infusions with high concentrations of bioactive substances the following recommendations can be given. As a basis for the infusion *C. incanus* herbal tea with a small particle size and high leaf contents should be applied. Brewing water with low mineral contents should be used for the preparation of the infusions. The actual manufacturer's recommendation for the brewing time (5 min) should be increased to 20 min. Additionally, a high brewing temperature of 95 °C should be recommended for *C. incanus* infusions and a reduction of temperature during the brewing process should be avoided.

9 Literatur

- AGULLO G, GAMET-PAYRASTRE L, FERNANDEZ Y, ANCIAUX N, DEIGNÉ C, RÉMÉSY C (1996) Comparative effects of flavonoids on the growth, viability and metabolism of a colonic adenocarcinoma cell line (HT29 cells). *Cancer Letters* 105: 61-70.
- AHERNE SA, O'BRIEN NM (2002) Dietary flavonols: Chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* 18: 75-81.
- AL-DUAIS M, MÜLLER L, BÖHM V, JETSCHKE G (2009) Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays. *European Food Research and Technology* 228: 813-821.
- ALI SFA, ASIF A, MIRZA EH, HASSAN SN (2013) Reduction in increased cadmium concentration from human blood and urin of cigarette smokers by using cystus-sud. *M. Long (Ed.): World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering. IFMBE Proceedings* 39, pp. 132-135.
- ANDERSON JJB, GARNER SC (1997) The effects of phytoestrogens on bone. *Nutrition Research* 17: 1617-1632.
- ARONNE G, DE MICCO V (2001) Seasonal dimorphism in the Mediterranean *Cistus incanus* L. subsp. *incanus*. *Annals of Botany* 87: 789-794.
- ARTS ICW, JACOBS DR, HARNACK LJ, GROSS M, FOLSOM AR (2001) Dietary catechins in relation to coronary heart disease death among postmenopausal women. *Epidemiology* 12: 668-675.
- ASTILL C, BIRCH MR, DACOMBE C, HUMPHREY PG, MARTIN PT (2001) Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5340-5347.
- ATTAGUILE G, RUSSO A, CAMPISI A, SAVOCA F, ACQUAVIVA R, RAGUSA N, VANELLA A (2000) Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of extracts from *Cistus incanus* L. and *Cistus monspeliensis* L.. *Cell Biology and Toxicology* 16: 83-90.
- BAEZ S, SEGURA-AGUILAR J, WIDERSTEN M, JOHANSSON AS, MANNERVIK B (1997) Glutathion transferases catalyse the detoxication of oxidized metabolites (O-quinones) of catecholamines and may serve as an antioxidant system preventing degenerative cellular processes. *Biochemical Journal* 324: 25-28.

BALTES W, KROH LW (2004) Schnellmethoden zur Beurteilung von Lebensmitteln und ihren Rohstoffen. 3. Auflage, Behrs-Verlag, Berlin: 251 ff..

BARRAJÓN-CATALÁN E, FERNÁNDEZ-ARROYO S, ROLDÁN C, GUILLÉN E, SAURE D, SEGURA-CARRETERO A, MICOL V (2011) A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: Evolutionary relationship. *Phytochemical Analysis* 22: 303-312.

BARROS L, DUEÑAS M, ALVES CT, SILVA S, HENRIQUES M, SANTOS-BUELGA C, FERREIRA ICFR (2013) Antifungal activity and detailed chemical characterization of *Cistus landanifer* phenolic extracts. *Industrial Crops and Products* 41: 41-45.

BARTHELMAN M, BAIR WB, STICKLAND KK, CHEN W, TIMMERMAN BN, VALCIC S, DONG Z, BOWDEN GT (1998) (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibition of ultraviolet B-induced AP-1 activity. *Carcinogenesis* 19: 2201-2204.

BELITZ HD, GROSCH W, SCHIEBERLE P (2008) Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 6. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

BIESAGA M, PYRZYŃSKA K (2013) Stability of bioactive polyphenols from honey during different extraction methods. *Food Chemistry* 136: 46-54.

BOK SH, LEE SH, PARK YB, BAE KH, SON KH, JEONG TS, CHOI MS (1999) Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase and acyl CoA: Cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. *Journal of Nutrition* 129: 1182-1185.

BOKKENHEUSER VD, SHACKLETON CHL, WINTER J (1987) Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal *Bacteroides* from humans. *Biochemical Journal* 248: 953-956.

BREITFELLNER F, SOLAR S, SONTAG G (2002) Effect of gamma irradiation on flavonoids in strawberries. *European Food Research and Technology* 215: 28-31.

BUCHNER N, KRUMBEIN A, ROHN S, KROH LW (2006) Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20: 3229-3235.

CHAO YC, CHIANG BH (1999) Cream formation in a semifermented tea. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1774: 1767-1774.

CHEERS G (2000) Botanica. 1. Auflage, Edition Könemann, Tandem Verlag GmbH, Potsdam, 230.

CHENG JT, LIU IM (2000) Stimulatory effect of caffeic acid on α_1 -adrenoceptors to increase glucose uptake into cultured C₂C₁₂ cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 362: 122-127.

CHIECHI LM, SECRETO G, D'AMORE M, FANELLI M, VENTRULLI E, CANTATORE F, VALERIO T, LASELVA G, LOIZZI P (2002) Efficacy of soy rich diet in preventing postmenopausal osteoporosis: the Menfis randomized trial. *Maturitas* 42: 295-300.

CHRISTODOULAKIS NS, GEORGOUDI M, FASSEAS C (2014) Leaf structure of *Cistus creticus* L. (Rock Rose), a medicinal plant widely used in folk remedies since ancient times. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* 20: 103-114.

COLLIER PD, MALLOWS R, THOMAS PE (1972) Interactions between theaflavins, flavanols and caffeine. *Phytochemistry* 11: 867.

COURBAT P, WEITH A, ALBERT A (1977) Contribution à l'étude du comportement de la catéchine en milieu alcalin. *Helvetica Chimica Acta* 60:1665-1675.

COUZINET-MOSSION A, BALAYSSAC S, GILARD V, MALET-MARTINO M, POTIN-GAUTIER M, BEHRA P (2010) Interaction mechanism between caffeine and polyphenols in infusion of *Camellia sinensis* leaves. *Food Chemistry* 119: 173-181.

CROZIER A, JAGANATH IB, CLIFFORD MN (2006) Phenols, polyphenols and tannins: An overview. In: CROZIER A, CLIFFORD MN, ASHIHARA H (eds.) Plant secondary metabolites. Occurrence, structure and role in the human diet. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, Ames, Carlton: 1-207.

CROZIER A, LEAN MEJ, MCDONALD MS, BLACK C (1997) Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 590-595.

CROZIER A, JAGANATH IB, CLIFFORD MN (2009) Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports* 26: 1001-1043.

CUSHNIE TPT, LAMB AJ (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26: 343-356.

D'AMELIO N, FONTANIVE L, UGGERI F, SUGGI-LIVERANI F, NAVARINI L (2009) NMR reinvestigation of the caffeine-chlorogenate complex in aqueous solution and in coffee brews. *Food Biophysics* 4: 321-330.

DANNE A, PETEREIT F, NAHRSTEDT A (1993) Proanthocyanidins from *Cistus incanus*. *Phytochemistry* 34: 1129-1133.

D'ARCHIVIO M, FILESÌ C, DI BENEDETTO R, GARGIULO R, GIOVANNINI C, MASELLA R (2007) Polyphenols , dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* 43: 348-361.

DAY AJ, CAÑADA FJ, DÍAZ JC, KROON PA, MCLAUCHLAN R, FAULDS CB, PLUMB GW, MORGAN MRA, WILLIAMSON G (2000) Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Letters* 468: 166-170.

DEMETZOS C, HARVALA C, PHILIANOS SM (1990) A new labdane-type diterpene and other compounds from the leaves of *Cistus incanus* ssp. *creticus*. *Journal of Natural Products* 53: 1365-1368.

DE RIJKE E, OUT P, NIESSEN WMA, ARIESE F, GOOIJER C, BRINKMAN UAT (2006) Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A* 1112: 31-63.

DE WITT HCD (1964) Knaurs Pflanzenreich in Farben; Droemersch Verlagsgesellschaft A. G., Zürich: 238-239.

DOLZHENKO Y, BERTEA CM, OCCHIPINTI A, BOSSI S, MAFFEI ME (2010) UV-B modulates the interplay between terpenoids and flavonoids in peppermint (*Mentha × piperita* L.). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 100: 67-75.

DONG Z, MA W, HUANG C, YANG CS (1997) Inhibition of tumor promoter-induced activator protein 1 activation and cell transformation by tea polyphenols, (-)-epigallocatechin gallate, and theaflavins. *Cancer Research* 57: 4414-4419.

DROEBNER K, EHRHARDT C, POETTER A, LUDWIG S, PLANZ O (2007) CYSTUS052, a polyphenol-rich plant extract, exerts anti-influenza virus activity in mice. *Antiviral Research* 76: 1-10.

DROEBNER K, HAASBACH E, MUELLER C, LUDWIG S, PLANZ O (2011) The polyphenol rich plant extract CYSTUS052 is highly effective against H5N1 and pandemic H1N1v influenza A viruses. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 5: 230-251.

EBERMANN R, ELMADFA I (2008) Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung. Springer-Verlag, Wien, New York: 187-208.

EHRHARDT C, HRINCIUS ER, KORTE V, MAZUR I, DROEBNER K, POETTER A, DRESCHERS S, SCHMOLKE M, PLANZ O, LUDWIG S (2007) A polyphenol rich plant extract, CYSTUS052, exerts anti influenza virus activity in cell culture without toxic side effects or the tendency to induce viral resistance. *Antiviral Research* 76: 38-47.

ELIAS HG (1999) Makromoleküle; Wiley-VCH Verlag, Weinheim.

FABRE N, RUSTAN I, DE HOFFMANN E, QUTIN-LECLERQ J (2001) Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* 12: 707-715.

FERNÁNDEZ-ARROYO S, BARRAJÓN-CATALÁN E, MICOL V, SEGURA-CARRETERO A, FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ A (2009) High-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a *Cistus ladanifer* aqueous extract. *Phytochemical Analysis* 21: 307-313.

FIOL M, ADERMANN S, NEUGART S, ROHN S, MÜGGE C, SCHREINER M, KRUMBEIN A, KROH LW (2012) Highly glycosylated acylated flavonols isolated from kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) – Structure-antioxidant activity relationship. *Food Research International* 47: 80-89.

FISCHBACH RJ, KOSSMANN B, PANTEN H, STEINBRECHER R, HELLER W, SEIDLITZ HK, SANDERMANN H, HERTKORN N, SCHNITZLER JP (1999) Seasonal accumulation of ultraviolet-B screening pigments in needles of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Plant, Cell and Environment* 22: 27-37.

FISCHER AU, CARLE R, KAMMERER DR (2011) Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSn. *Food Chemistry* 127: 807-821.

FORBES RM, ERDMAN JW (1983) Bioavailability of trace mineral elements. *Annual Review of Nutrition* 3: 213-231.

FRIEDMAN M, JÜRGENS HS (2000) Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 2101-2110.

FRIEDRICH W, EBERHARDT A, GALENSA R (2000) Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry. *European Food Research and Technology* 211: 56-64.

GAGNE S, LACAMPAGNE S, GENY L (2010) Impact of abscisic acid on the metabolism of phenolic compounds in grape skins: modulation of anthocyanin and tannin accumulation throughout growth. *Acta Horticulturae* 2: 1159-1166.

GIL-IZQUIERDO A, GIL MI, FERRERES F, TOMÁS-BARBERÁN FA (2001) In vitro availability of flavonoids and other phenolics in orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 1035-1041.

GONTHIER MP, DONOVAN JL, TEXIER O, FELGINES C, RÉMÉSY C, SCALBERT A (2003) Metabolism of dietary procyanidins in rats. *Free Radical Biology & Medicine* 35: 837-844.

GOSSAUER A (2006) Struktur und Reaktivität der Biomoleküle. Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich.

GUÉDON DJ, PASQUIER BP (1994) Analysis and distribution of flavonoid glycosides and rosmarinic acid in 40 *Mentha × piperita* clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 679-684.

GUO Y, SRINIVASAN S, GAIKI S (2007) Investigating the effect of chromatographic conditions on retention of organic acids in hydrophilic interaction chromatography using a design of experiment. *Chromatographia* 66: 223-229.

GUYOT S, VERCAUTEREN J, CHEYNIER V (1996) Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from (+)-catechin coupling catalyzed by grape polyphenoloxidase. *Phytochemistry* 42: 1279-1288.

HANNIG C, SORG J, SPITZMÜLLER B, HANNIG M, AL-AHMAD A (2009) Polyphenolic beverages reduce initial bacterial adherence to enamel *in situ*. *Journal of Dentistry* 37: 560-566.

HANNIG C, SPITZMÜLLER B, AL-AHMAD A, HANNIG M (2008) Effects of *Cistus*-tea on bacterial colonization and enzyme activities of the *in situ* pellicle. *Journal of Dentistry* 36: 540-545.

- HARRIS CU, BURT AJ, SALEEM A, MAILE P, MARTINEU LC, HADDAD PS, BENNETT SAL, AANASON JT (2007) A single HPLC-PAD-APCI/MS method for the quantitative comparison of phenolic compounds found in leaf, stem, root and fruit extracts of *Vaccinium angustifolium*. *Phytochemical Analysis* 18: 161-169.
- HATANAKA A (1993) The biogenesis of green odor by green leaves. *Phytochemistry* 34: 1201-1218.
- HATFIELD RD, JUNG HJG, RALPH J, BUXTON DR, WEIMER PJ (1994) A Comparison of the insoluble residues produced by the Klason lignin and acid detergent lignin procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65: 51-58.
- HATHWAY DE, SEAKINS JWT (1955) Autoxidation of catechin. *Nature* 176: 218.
- HE F, PAN QH, SHI Y, ZHANG XT, DUAN CQ (2009) Identification of autoxidation oligomers of flavan-3-ols in model solutions by HPLC-MS/MS. *Journal of Mass Spectrometry* 44: 633-640.
- HERNÁNDEZ I, ALEGRE L, BREUSEGEM FV, MUNNÉ-BOSCH S (2009) How relevant are flavonoids as antioxidants in plants?. *Trends in Plant Science* 14: 125-132.
- HIRVONEN T, PIETINEN P, VIRTANEN M, OVASKAINEN ML, HÄKKINEN S, ALBANES D, VIRTAMO J (2001) Intake of flavonols and flavones and risk of coronary heart disease in male smokers. *Epidemiology* 12: 62-67.
- HOLLMAN PCH, DE VRIES JHM, VAN LEEUWEN SD, MENGELERS MJB, KATAN MB (1995) Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *The American Journal of Clinical Nutrition* 62: 1276-1282.
- HONGSOONGNERN P, CHAMBERS IV E (2008) A lexicon for green odor or flavor and characteristics of chemicals associated with green. *Journal of Sensory Studies* 23: 205-221.
- HSU FL, CHEN YC, CHENG JT (1999) Caffeic Acid as active principle from the fruit of *Xanthium strumarium* to lower plasma glucose in diabetic rats. *Planta Medica* 66: 228-230.
- HUANG D, OU B, PRIOR RL (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 1841-1856.
- JÖBSTL E, FAIRCLOUGH JPA, DAVIES AP, WILLIAMSON MP (2005) Creaming in black tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 7997-8002.

JOSEPH JA, SHUKITT-HALE B, DENISOVA NA, BIELINSKI D, MARTIN A, MCEWEN JJ, BICKFORD PC (1999) Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. *The Journal of Neuroscience* 19: 8114-8121.

JOSEPH JA, SHUKITT-HALE BS, DENISOVA NA, PRIOR RL, CAO G, MARTIN A, TAGLIALATELA G, BICKFORD PC (1998) Long-term dietary strawberry, spinach, or vitamin E supplementation retards the onset of age-related neuronal signal-transduction and cognitive behavioral deficits. *The Journal of Neuroscience* 18: 8047-8055.

JUNG HG, MERTENS DR, PAYNE AJ (1997) Correlation of acid detergent lignin and Klason lignin with digestibility of forage dry matter and neutral detergent fiber. *Journal of Dairy Science* 80: 1622-1628.

JÜRGENLIEMK G, PETEREIT F, NAHRSTEDT A (2007) Flavan-3-ols and procyanidins from the bark of *Salix purpurea* L.. *Pharmazie* 62: 231-234.

KALUS U, GRIGOROV A, KADECKI O, JANSEN JP, KIESEWETTER H, RADTKE H (2009) *Cistus incanus* (CYSTUS052) for treating patients with infection of the upper respiratory tract. A prospective, randomised, placebo-controlled clinical study. *Antiviral Research* 84: 267-271.

KNEKT P, JÄRVINEN R, REUNANEN A, MAATELA J (1996) Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *British Medical Journal* 312: 478-81.

KOLEVA II, NIEDERLÄNDER HAG, VAN BEEK TA (2001) Application of ABTS radical cation for selective on-line detection of radical scavengers in HPLC eluates. *Analytical Chemistry* 73: 3373-3381.

KROMIDAS S (2008) Validierung in der Analytik. 1. Auflage, Wiley-VCH Verlag, Weinheim: 41-204.

KUHNLE G, SPENCER JPE, SCHROETER H, SHENOY B, DEBNAM ES, SRAI SKS, RICE-EVANS C, HAHN U (2000) Epicatechin and catechin are O-methylated and glucuronidated in the small intestine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 277: 507-512.

KUIPER GGJM, LEMMEN JG, CARLSSON B, CORTON JC, SAFE SH, VAN DER SAAG PT, VAN DER BURG B, GUSTAFSSON JA (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology* 139: 4252-4263.

LAMARTINIERE CA, CORTRONEO MS, FRITZ WA, WANG J, MENTOR-MARCEL R, ELGAVISH A (2002) Genistein chemoprevention: Timing and mechanisms of action in murine mammary and prostate. *Journal of Nutrition* 132: 552S-558S.

LANG Q, WAI CM (2001) Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies - a practical review. *Talanta* 53: 771-782.

LAVOLA A, KARJALAINEN R, JULKUNEN-TIITTO R (2012) Bioactive polyphenols in leaves, stems, and berries of Saskatoon (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 1020-1027.

LEE SH, PARK YB, BAE KH, BOK SH, KWON YK, LEE ES, CHOI MS (1999) Cholesterol-lowering activity of naringenin via Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and acyl coenzyme A: Cholesterol acyltransferase in rats. *Annals of Nutrition & Metabolism* 43: 173-180.

LEVITES Y, AMIT T, YODIM MBH, MANDEL S (2002) Involvement of protein kinase C activation and cell survival/ cell cycle genes in green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate neuroprotective action. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 30574-30580.

LIANG Y, LU J, ZHANG L (2002) Comparative study of cream in infusion on black tea and green tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. *International Journal of Food Science and Technology* 37: 627-634.

LIEBEREI R, REISDORFF C (2007) Nutzpflanzenkunde. 7. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart: 56.

LIN JK, CHEN YC, HUANG YT, LIN-SHIAU SY (1997) Suppression of protein kinase C and nuclear oncogene expression as possible molecular mechanisms of cancer chemoprevention by apigenin and curcumin. *Journal of Cellular Biochemistry Supplements* 28/29: 39-48.

LÓPEZ-SERRANO M, ROS BARCELÓ A (2001) Reversed-phase and size-exclusion chromatography as useful tools in the resolution of peroxidase-mediated (+)-catechin oxidation products. *Journal of Chromatography A* 919: 267-273.

MACDONALD-WICKS LK, WOOD LG, GARG ML (2006) Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86: 2046-2056.

MANACH C, MORAND C, CRESPIY V, DEMIGNÉ C, TEXIER O, RÉGÉRAT F, RÉMÉSY C (1998) Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Letters* 426: 331-336.

MANACH C, RÉGÉRAT F, TEXIER O, AGULLO G, DEMIGNÉ C, RÉMÉSY C (1996) Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids. *Nutrition Research* 16: 517-544.

MANACH C, WILLIAMSON G, MORAND C, SCALBERT A, RÉMÉSY C (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 81: 230-242.

MATTILA P, KUMPULAINEN J (2002) Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3660-3667.

MERCURIO MD, DAMBERGS RG, HERDERICH MJ, SMITH PA (2007) High throughput analysis of red wine and grape phenolics-adaptation and validation of methyl cellulose precipitable tannin assay and modified somers color assay to a rapid 96 well plate format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 4651-4657.

MERKEN HM, BEECHER GR (2000) Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 577-599.

MEYER-BUCHTELA E (2001) Tee-Rezepturen: Ein Handbuch für Apotheker und Ärzte mit 2. Ergänzungslieferung. Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart.

MOSSION A, POTIN-GAUTIER M, DELERUE S, LE HÉCHO I, BEHRA P (2008) Effect of water composition on aluminium, calcium and organic carbon extraction in tea infusions. *Food Chemistry* 106: 1467-1475.

MILLER NJ, RICE-EVANS C, DAVIES MJ, GOPINATHAN V, MILNER A (1993) A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science* 84: 407-412.

MUZOLF M, SZYMUSIAK H, GLISZCZYNSKA-SWIGLO A, RIETJENS IMCM, TYRAKOWSKA B (2008) pH-dependent radical scavenging capacity of green tea catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 816-823.

NAKAYAMA M, SUZUKI K, TODA M, OKUBO S, HARA S, SHIMAMURA T (1993) Inhibition of the infectivity of influenza virus by tea polyphenols. *Antiviral Research* 21: 289-299.

NEVEU V, PÉREZ-JIMÉNEZ J, VOS F, CRESPI V, DU CHAFAUT L, MENNEN L, KNOX C, EISNER R, CRUZ J, WISHART D, SCALBERT A (2010) Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database* 2010: 1-9.

NULTSCH W (2001) Allgemeine Botanik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

OLIVEIRA EJ, WATSON DG (2000) In vitro glucuronidation of kaempferol and quercetin by human UGT-1A9 microsomes. *FEBS Letters* 471: 1-6.

OLTHOF MR, HOLLMAN PCH, VREE TB, KATAN MB (2000) Bioavailabilities of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans. *Journal of Nutrition* 130: 1200-1203.

OSZMIANSKI J, CHEYNIER V, MOUTOUNET M (1996) Iron-catalyzed oxidation of (+)-catechin in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 1712-1715.

PELEG H, GACON K, SCHLICH P, NOBLE AC (1999) Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 79: 1123-1128.

PENDERS MHGM, JONES DP, NEEDHAM D, PELAN EG (1998) Mechanistic study of equilibrium and kinetic behavior of tea cream formation. *Food Hydrocolloids* 12: 9-15.

PETEREIT F (1992) Polyphenolische Inhaltsstoffe und Untersuchungen zur entzündungshemmenden Aktivität der traditionellen Arzneipflanze *Cistus incanus* L. (Cistaceae). Dissertation, Universität Münster.

PETEREIT F, KOŁODZIEJ H, NAHRSTEDT A (1991) Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Cistus incanus*. *Phytochemistry* 30: 981-985.

PIETTA P, GARDANA C, PIETTA A (2003) Flavonoids in herbs. In: RICE-EVANS CA, PACKER L (eds.) Flavonoids in health and disease. 2nd edition, Marcel Dekker, Inc. , New York, Basel: 43-70.

POLUNIN O (1971) Pflanzen Europas. BLV Verlagsgesellschaft mbH, München.

POMPONIO R, GOTTI R, SANTAGATI N, CAVRINI V (2003) Analysis of catechins in extracts of *Cistus* species by microemulsion electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A* 990: 215-223.

POTT R (2010) Naturwirkstoffe aus Pflanzen. Biodiversitätsforschung. *Chemie in unserer Zeit* 44: 260-274.

POTT R, HÜPPE J (2007) 9 Anpassungen der Pflanzen. In Spezielle Geobotanik: Pflanze – Klima – Boden. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: 232-282.

PRAKASHAM RS, RAO CS, RAO RS, LAKSHIMI GS, SARMA PN (2007) L-asparaginase production by isolated *Staphylococcus* sp. – 6A: design of experiment considering interaction effect for process parameter optimization. *Journal of Applied Microbiology* 102: 1382-1391.

PRIOR RL, WU X, SCHAICH K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 4290-4302.

RAUDONIS R, BUMBLAUSKIENE L, JAKSTAS V, PUKALSKAS A, JANULIS V (2010) Optimization and validation of post-column assay for screening of radical scavengers in herbal raw materials and herbal preparations. *Journal of Chromatography A* 1217: 7690-7698.

RE R, PELLEGRINI N, PROTEGGENTE A, PANNALA A, YANG M, RICE-EVANS C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* 26: 1231-1237.

RICE-EVANS CA, MILLER NJ, PAGANGA G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* 20: 933-956.

RITER LS, VITEK O, GOODING KM, HODGE BD, JULIAN KR (2005) Statistical design of experiments as a tool in mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 40: 565-579.

ROBARDS K, ANTOLOVICH M (1997) Analytical chemistry of fruit bioflavonoids: A review. *Analyst* 122: 11R-34R.

ROBBINS R (2003) Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2866-2887.

ROBERTS EAH (1963) The phenolics substances of manufactured tea. X.- The cream down of tea liquors. *Journal of the Science of Food Agriculture* 14: 700-705.

ROHN S, BUCHNER N, DRIEMEL G, RAUSER M, KROH LW (2007) Thermal degradation of onion quercetin glucosides under roasting conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 1568-1573.

ROHN S, KROH LW (2005) Electron spin resonance - A spectroscopic method for determining the antioxidative activity. *Molecular Nutrition and Food Research* 49: 898-907.

RÖSCH D, BERGMANN M, KNORR D, KROH LW (2003) Structure-antioxidant efficiency relationships of phenolic compounds and their contribution to the antioxidant activity of sea buckthorn juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 4233-4239.

ROSS JA, KASUM CM (2002) Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition* 22: 19-34.

ROTHWELL JA, PÉREZ-JIMÉNEZ J, NEVEU V, MEDINA-RAMON A, M'HIRI N, GARCÍA-LOBATO P, MANACH C, KNOX K, EISNER R, WISHART D, SCALBERT A (2013) Phenol-Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content. *Submitted*.

ROTHWELL JA, URPI-SARDA M, BOTO-ORDOÑEZ M, KNOX C, LLORACH R, EISNER R, CRUZ J, NEVEU V, WISHART D, MANACH C, ANDRES-LACUEVA C, SCALBERT A (2012) Phenol-Explorer 2.0: a major update of the Phenol-Explorer database integrating data on polyphenol metabolism and pharmacokinetics in humans and experimental animals. *Database* 2012: 1-8.

RUSZNYÁK ST, SZENT-GYÖRGYI A (1936) Vitamin P: Flavonols as vitamins. *Nature* 138: 27.

RUTTER P, STAINSBY G (1975) The solubility of tea cream. *Journal of the Science of Agriculture* 26: 455-463.

SANTAGATI NA, SALERNO L, ATTAGUILE G, SAVOCA F, RONSISVALLE G (2008) Simultaneous determination of catechins, rutin, and gallic acid in *Cistus* species extracts by HPLC with diode array detection. *Journal of Chromatographic Science* 46: 150-156.

SAKAKIBARA H, HONDA Y, NAKAGAWA S, ASHIDA H, KANAZAWA K (2003) Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 571-581.

SARACINI E, TATTINI M, TRAVERSI ML, VINCIERI FF, PINELLI P (2005) Simultaneous LC-DAD and LC-MS determination of ellagitannins, flavonoid glycosides, and acyl-glycosyl flavonoids in *Cistus salvifolius* L. leaves. *Chromatographia* 62: 245-249.

SARNECKIS CJ, DAMBERGS RG, JONES P, MERCURIO M, HERDERICH MJ, SMITH PA (2006) Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: development and validation of an optimised tool for grape and wine analysis. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12: 39-49.

- SCALBERT A, MANACH C, MORAND C, RÉMÉSY C, JIMÉNEZ L (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45: 287-306.
- SEERAM NP, HENNING SM, ZHANG Y, SUCHARD M, LI Z, HEBER D (2006) Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours. *Journal of Nutrition* 136: 2481-2485.
- SERRANO J, PUUPPONEN-PIMIÄ R, DAUER A, AURA AM, SAURA-CALIXTO F (2009) Tannins : Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular Nutrition and Food Research* 53: 310-329.
- SETO R, NAKAMURA H, NANJO F, HARA Y (1997) Preparation of epimers of tea catechins by heat treatment. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 61: 1434-1439.
- SHAHAT AA, COS P, DE BRUYNE T, APERS S, HAMMOUDA FM, ISMAIL SI, AZZAM S, CLAEYS M, GOOVAERTS E, PIETERS L, VANDEN BERGHE D, VLIETINCK AJ (2001) Antiviral and antioxidant activity of flavonoids and proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*. *Planta Medica* 68: 539-541.
- SILVA DB, TURATTI ICA, GOUVEIA DR, ERNST M, TEIXEIRA SP, LOPES NP (2014) Mass spectrometry of flavonoid vicenin-2, based sunlight barriers in *Lychnophora species*. *Scientific Reports* 4: 4309.
- SINGLETON VL, ROSSI JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158.
- SOUQUET JM, LABARBE B, LE GUERNEVÉ C, CHEYNIER V, MOUTOUNET M (2000) Phenolic composition of grape stems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 1076-1080.
- STALIKAS CD (2007) Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science* 30: 3268-3295.
- SUN W, MILLER JM (2003) Tandem mass spectrometry of B-type procyanidins in wine and B-type dehydrocatechins in an autoxidation mixture of (+)-catechin and (-)-epicatechin. *Journal of Mass Spectrometry* 38: 438-446.
- SUSCHETET M, SIESS MH, LE BON AM, CANIVENC-LAVIER MC (1998) Anticarcinogenic properties of some flavonoids. In: VERCAUTEREN J, CHEZE C, TRIAUD J (eds.) Polyphenols 96. INRA Editions, Paris: 165-204.

TALALAY P, DE LONG MJ, PROCHASKA HJ (1988) Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 8261-8265.

TANIZAWA Y, ABE T, YAMADA K (2007) Black tea stain formed on the surface of teacups and pots. Part 1 – Study on the chemical composition and structure. *Food Chemistry* 103: 1-7.

TEBIB K, BESANÇON P, ROUANET JM (1994) Dietary grape seed tannins affect lipoprotein lipases and tissue lipids in rats fed hypercholesterolemic diets. *Journal of Nutrition* 124: 2451-2457.

TIAN C, WANG M, LIU X, WANG H, ZHAO C (2014) HPLC quantification of nine chemical constituents from the five parts of *Abutilon theophrasti* Medic. *Journal of Chromatographic Science* 52: 258-263.

TOMÁS-BARBERÁN FA, CLIFFORD MN (2000) Dietary hydroxybenzoic acid derivatives – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 80: 1024-1032.

TSAI T (2002) Determination of naringin in rat blood, brain, liver, and bile using microdialysis and its interaction with cyclosporine A, a P-glycoprotein modulator. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6669-6674.

TSUCHIDA K, MIZUSHIMA S, TOBA M, SODA K (1999) Dietary soybeans intake and bone mineral density among 995 middle-aged women in yokohama. *Journal of Epidemiology* 9: 14-19.

WALLE T, OTAKE Y, WALLE UK, WILSON FA (2000) Quercetin glucosides are completely hydrolyzed in ileostomy patients before absorption. *Journal of Nutrition* 130: 2658-2661.

WANG H, HELLIWELL K (2000) Epimerisation of catechins in green tea infusions. *Food Chemistry* 70: 337-344.

WATZL B, LEITZMANN C (2005) Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln. 3. Auflage, Hippokrates Verlag, Stuttgart: 15-46.

WEBSTER RP, GAWDE MD, BHATTACHARYA RK (1996) Protective effect of rutin, a flavonol glycoside, on the carcinogen-induced DNA damage and repair enzymes in rats. *Cancer Letters* 109: 185-191.

WILLFÖR S, PRANOVICH A, TAMMINEN T, PULS J, LAINE C, SUURNÄKKI A, SAAKE B, UOTILA K, SIMOLIN H, HEMMING J, HOLMBOM B (2009) Carbohydrate analysis of plant materials with uronic acid-containing polysaccharides - A comparison between different hydrolysis and subsequent chromatographic analytical techniques. *Industrial Crops and Products* 29: 571-580.

WILLIAMS CA, HARBORNE JB (1994) Flavone and flavonol glycosides. In: HARBORNE JB (ed.) *The Flavonoids: advances in research since 1986*. 1. Auflage, Chapman & Hall, London, Glasgow, New York, Tokyo, Melbourne, Madras: 337-385.

WINTER J, MOORE LH, DOWELL VR, BOKKENHEUSER VD (1989) C-Ring cleavage of flavonoids by human intestinal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 1203-1208.

YILMAZER M, STEVENS JF, BUHLER DR (2001) In vitro glucuronidation of xanthohumol, a flavonoid in hop and beer, by rat and human liver microsomes. *FEBS Letters* 491: 252-256.

YIN JF, XU YQ, YUAN HB, LUO LX, QIAN XJ (2009) Cream formation and main chemical components of green tea infusion processed from different parts of new shoots. *Food Chemistry* 114: 665-670.

YOCHUM L, LAWRENCE HK, MAYER K, FOLSOM AR (1999) Dietary Flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *American Journal of Epidemiology* 149: 943-949.

ZIETZ M, WECKMÜLLER A, SCHMIDT S, ROHN S, SCHREINER M, KRUMBEIN A, KROH LW (2010) Genotypic and climatic influence on the antioxidant activity of flavonoids in kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 2123-2130.

ZUO Y, WANG C, ZHAN J (2002) Separation, characterization, and quantitation of benzoic and phenolic antioxidants in American cranberry fruit by GC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3789-3794.

Internetquellen:

- [1] Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, Leitsätze des deutschen Lebensmittelbuchs für Tee, teeähnliche Erzeugnisse, deren Extrakte und Zubereitungen:
http://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Ernaehrung/Lebensmittelbuch/LeitsaetzeTee.pdf?__blob=publicationFile
(23.04.2014)

- [2] Amtsblatt der europäischen Gemeinschaften, *Verordnung (EG) Nr. 258/97*:
<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1997R0258:20090120:DE:PDF>
(23.04.2014)

- [3] *Novel Food* Liste der Europäischen Kommission:
http://ec.europa.eu/food/food/biotechnology/novelfood/nfnetweb/mod_search/index.cfm?action=mod_search.details&seqfce=112
(23.04.2014)

- [4] Datenbank Phenolexplorer 3.0:
<http://www.phenol-explorer.eu/>
(30.06.2014)

Anhang

A1 Geräte

LC-DAD-ESI-MS/MS

System/ Typ	UHPLC Ultimate3000 (Dionex GmbH, Idstein)
Pumpe	HPG-3200RS
Autosampler	WPS-3000TRS (Analytical)
Säulenofen	TCC-3000RS
Diodenarraydetektor	DAD-3000RS
Software	Chromeleon 6.8 (Dionex GmbH, Idstein) HyStar 3.2 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen)
ESI-MSn	amaZon ETD (Bruker Daltonik GmbH, Bremen)
Software	TrapControl 7.0 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) DataAnalysis 4.0 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) HyStar 3.2 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen)

LC-onlineTEAC

System/ Typ	Smartline Serie (Knauer GmbH, Berlin)
Manager	S5000
Pumpe	S1000
Autosampler	S3950
Säulenofen	Knauer Jet Stream Oven
Diodenarraydetektor (Detektor 1)	S2600
Hilfspumpe	S100
Ofen für Reaktionskapillare	Knauer Jet Stream Oven
UV-Detektor (Detektor 2)	S2550
Software	Clarity Chrom 3.0.7.622 (Knauer GmbH, Berlin)

LC-DAD

System/ Typ	Smartline Serie (Knauer GmbH, Berlin)
Manager	S5050
Pumpe	S1000
Autosampler	S3950
Diodenarraydetektor	S2600
Software	Clarity Chrom 3.0.7.622 (Knauer GmbH, Berlin)

Präparative LC-DAD

System/ Typ	1260 Infinity (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen)
Pumpe	1260 Preparative Pump G1361A
Injektion, manuell	1260 Manual Injector G1328C
Diodenarraydetektor	1260 Diode-Array-Detector G1315D
Fraktionssammler	Fraction Collector PS G1364B
Software	OpenLAB Chromatographie Data System (CDS) ChemStation Edition (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen)

Plattenlesegerät

System/ Typ	Synergy HAT (BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall)
Software	Gen5 2.00 (BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall)

Elektronenspinresonanz-Spektrometer

System/ Typ	MiniScope MS200 (Magnettech GmbH, Berlin)
Software	Miniscope Control 6.51 (Magnettech GmbH, Berlin) PPBatch Show 2.03 (Magnettech GmbH, Berlin) Kinetic Show 2.03 (Magnettech GmbH, Berlin)

Accelerated Solvent Extraction System

System/ Typ	ASE 200 (Dionex GmbH, Idstein)
Software	AutoASE Software (Dionex GmbH, Idstein)

Boratkompex-Anionenaustauschchromatographie

System/ Typ	UHPLC Ultimate3000 (Dionex GmbH, Idstein)
Pumpe	HPG-3200RS
Autosampler	WPS-3000TRS (Analytical)
Säulenofen	TCC-3000RS
Variabler Wellenlängendetektor	MWD-3000RS
Software	Chromeleon 6.8 (Dionex GmbH, Idstein)

Weitere Geräte

Analysenwaage	1602 004 (Sartorius AG, Göttingen)
Gefriertrocknung	Alpha 1-4 LSC (Martin Christ GmbH, Osterode)
Magnetrührer	RTC basic safety control (IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen)
pH-Meter	ino Lab Series; Elektrode: SenTix 41 (WTW GmbH, Weilheim)
Pipetten	Research plus (Volumina: 10-100 µL; 20-200 µL und 100-1000 µL) (Eppendorf GmbH, Hamburg)
Probenkonzentrator	Stuart Sample Concentrator SBHCONC/1 (Bibby Scientific Limited, Stone, UK)
Rotationsverdampfer	Laborota 4000 (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach)
Scheibenmühle	Typ T 1000 (Siebtechnik GmbH, Mühlheim)
Siebmaschine	Typ 3D (Retsch GmbH, Haan)
Ultraschallbad	Sonorex Super (Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin)
Vortexmischer	Digital Vortex Mixer (VWR International GmbH, Darmstadt)
Wasserbad	SW 22 (Julabo GmbH, Seelbach)
Zentrifuge	Centrifuge 5810 R (Eppendorf GmbH, Hamburg)

A2 Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	CAS-Nr.	Hersteller	GHS Symbol	H-Sätze	P-Sätze
ABTS (≥98 %)	30931-67-0	Sigma Aldrich Chemie GmbH	GHS07	315-319-335	261-305+351+338
Aceton (ACS reagent)	67-64-1	Fisher Scientific GmbH	GHS02, GHS07	225-319-336	210-261-305+351+338
Acetonitril (gradient grade)	75-05-8	VWR International GmbH	GHS02, GHS05	225-302-312-319-332	210-280-305+351+338
Ameisensäure (≥99 %)	64-18-6	Carl Roth GmbH & Co KG	GHS02, GHS05	226-314	280-305+351+338-310
Ammoniak (25 %)	1336-21-6	Th. Geyer GmbH & Co. KG	GHS05, GHS07, GHS09	314-335-400	273-280-305+351+338
Ammoniumsulfat (≥99 %)	7783-20-2	AppliChem GmbH	Dieser Stoff ist gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 nicht als gefährlich eingestuft.		
Amylase	9000-92-4	Merck KGaA	GHS08	334	261-342+311
Amyloglucosidase	9032-08-0	Roche Diagnostics GmbH	Dieser Stoff ist gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 nicht als gefährlich eingestuft.		
Bicinchoninsäure (98-100 %)	1245-13-2	Fisher Scientific GmbH	Dieser Stoff ist gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 nicht als gefährlich eingestuft.		
Borsäure (Ph. Eur.)	10043-35-3	Fisher Scientific GmbH	GHS08	360FD	201-308+313
Catechin (~CHR)	154-23-4	Carl Roth GmbH & Co KG	GHS07	315-319-335	261-305+351+338
Calciumchlorid (≥96 %)	10043-52-4	Carl Roth GmbH & Co. KG	GHS07	319	305+351+338
Dinatrium-hydrogenphosphat Dodecahydrat (≥98 %)	10039-32-4	Carl Roth GmbH & Co. KG	Dieser Stoff ist gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 nicht als gefährlich eingestuft.		
DMSO (anhydrous)	67-68-5	Honeywell Holding GmbH	GHS07	335	305+351+338
Ellagsäure (≥98 %)	476-66-4	Carl Roth GmbH & Co. KG	GHS07	315-319-335	261-305+351+338
Epicatechin (≥90 %)	490-46-0	Sigma Aldrich Chemie GmbH	GHS07	315-319-335	261-305+351+338

Substanz	CAS-Nr.	Hersteller	GHS Symbol	H-Sätze	P-Sätze
Epigallocatechin (≥90 %)	970-74-1	Sigma Aldrich Chemie GmbH	GHS07	315-319-335	261-305+351+338
Epigallocatechin-gallat (98 %)	989-51-5	TransMIT GmbH	Dieser Stoff ist gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 nicht als gefährlich eingestuft.		
Essigsäure (99,9 %)	64-19-7	Carl Roth GmbH & Co. KG	GHS02, GHS05	226-314	280-305+351+338-310
Ethanol (ACS reagent)	64-17-5	Fisher Scientific GmbH	GHS02, GHS07, GHS08	225-302-371	210-260
Ferulasäure (99 %)	1135-24-6	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	GHS07	315, 319, 335	261, 305+351+338
<i>Folin-Ciocalteu</i> Reagenz	–	Merck KGaA	GHS05	314	280-305+351+338-310
Galocatechin (≥98 %)	3371-27-5	Sigma Aldrich Chemie GmbH	GHS07	315-319-335	261-305+351+338
Gallussäure (98 %)	149-91-7	Acros Organics BVBA	GHS07	315-319-335	261-305+351+338
Glucose (≥99,5 %)	50-99-7	Carl Roth GmbH & Co KG	Dieser Stoff ist gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 nicht als gefährlich eingestuft		
Kaliumchlorid (99 %)	7447-40-7	Grüssing GmbH Analytica	Dieser Stoff ist gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 nicht als gefährlich eingestuft.		
Kaliumnitroso-disulfonat	14293-70-0	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	GHS02, GHS07	260, 302, 312, 332	223, 231+232, 280, 370+378, 442, EUH014
Kaliumperoxo-Disulfat (≥99,5 %)	7727-21-1	Sigma Aldrich Chemie GmbH	GHS03, GHS07, GHS08	272-302-315-317-319-334-335	220-261-280-305+351+338-342+311
Kaliumtetraborat (99,5 %)	12045-78-2	ChemPur GmbH	GHS08	360FD	201-308+313
Kupfer(II) sulfate pentahydrate (Ph. Eur.)	7758-99-8	Th. Geyer GmbH & Co. KG	GHS07, GHS09	302-315-319-410	273-305+351+338-501
L-Asparaginsäure (Ph. Eur.)	56-84-8	Merck KGaA	Dieser Stoff ist gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 nicht als gefährlich eingestuft.		
Magnesiumchlorid Hexahydrat (reinst)	7791-18-6	Merck KGaA	Dieser Stoff ist gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 nicht als gefährlich eingestuft.		

Substanz	CAS-Nr.	Hersteller	GHS Symbol	H-Sätze	P-Sätze
MCI Gel CA08F	–	Mitsubishi Chemical Corporation	Dieser Stoff ist gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 nicht als gefährlich eingestuft.		
Methanol (gradient grade)	67-56-1	VWR International GmbH	GHS02, GHS06, GHS08	225-301-311-331-370	210-260-280-301 + 310-311
Methylcellulose (Viskosität 1500 cP)	9004-67-5	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Dieser Stoff ist gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 nicht als gefährlich eingestuft.		
Myricetin-3-O-galactosid (≥99 %)	15648-86-9	Extrasynthese SAS	Dieser Stoff ist gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 nicht als gefährlich eingestuft.		
Myricitrin (≥99 %)	17912-87-7)	Sigma Aldrich Chemie GmbH	GHS07	315-319-335	261-305+351+338
Natriumcarbonat (≥99,5 %)	497-19-8	Carl Roth GmbH & Co. KG	GHS07	319	305+351+338
Natriumchlorid (≥99,5 %)	7647-14-5	VWR International GmbH	Dieser Stoff ist gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 nicht als gefährlich eingestuft.		
Natriumhydroxid (Ph. Eur.)	1310-73-2	Th. Geyer GmbH & Co. KG	GHS05	314	280, 305+351+338, 310
Petrolether (40-60 °C) (ACS reagent)	101316-46-5	Sigma Aldrich Chemie GmbH	GHS02, GHS07, GHS08, GHS09	225-304-315-336-361-373-411	210-261-273-281-301+310-331
Polyamid 6 (0,05-0,16 mm)	63428-84-2	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	Dieser Stoff ist gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 nicht als gefährlich eingestuft		
Procyanidin B1 (≥90 %)	20315-25-7	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Dieser Stoff ist gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 nicht als gefährlich eingestuft		
Procyanidin B2 (90 %)	29106-49-8	Sigma Aldrich Chemie GmbH	GHS07	315-319-335	261-305+351+338
Quercetin (≥98 %)	117-39-5	Sigma Aldrich Chemie GmbH	GHS06	301	301+310
Quercetin-3-O-glucosid (≥90 %)	482-35-9	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Dieser Stoff ist gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 nicht als gefährlich eingestuft		
Quercitrin×4 H2O (≥78 %)	208-322-5	Sigma Aldrich Chemie GmbH	GHS07	315-319-335	261-305+351+338
Rosmarinsäure (≥98 %)	20283-92-5	Sigma Aldrich Chemie GmbH	GHS06, GHS09	301-400	273-301+310
Rutin×3 H2O (≥97 %)	250249-75-3	Acros Organics BVBA	GHS07	315-319-335	261-305+351+338

Substanz	CAS-Nr.	Hersteller	GHS Symbol	H-Sätze	P-Sätze
Salzsäure (37 %)	7647-01-0	VWR International GmbH	GHS05, GHS07	314, 335	261, 280, 305, 351, 338, 310
Schwefelsäure (>95 %)	7664-93-9	Fisher Scientific GmbH	GHS05	314	280-305+351+338-310
Trolox (97 %)	53188-07-1	Sigma Aldrich Chemie GmbH	GHS07	315-319-335	261-305+351+338
Tilirosid (97 %)	20316-62-5	PhytoLab GmbH & Co. KG	Dieser Stoff ist gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 nicht als gefährlich eingestuft.		
Xylose (>99 %)	58-86-6	Carl Roth GmbH & Co KG	Dieser Stoff ist gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 nicht als gefährlich eingestuft.		

A3 Formeln und Berechnungen

A3.1 Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Quantifizierung phenolischer Substanzen (LC-DAD)

Für die Berechnung der Nachweis- (LOD: *Limit of Detection*) und Bestimmungsgrenzen (LOQ: *Limit of Quantification*) nach KROMIDAS (2008) wurden Mittelwert und Standardabweichung des Grundrauschens aus zehn Messpunkten aus sechs LC-DAD-Messungen eines Methanolblindwertes mittels folgender Gleichungen berechnet:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

$\bar{x}$	Mittelwert Peakflächen Blindwerte [mAU×s]
x_i	Einzelne Peakflächen Blindwerte [mAU×s]
n	Anzahl der Peakflächen (60)

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

s_x	Standardabweichung Peakflächen Blindwerte [mAU×s]
x_i	Einzelne Peakflächen Blindwerte [mAU×s]
$\bar{x}$	Mittelwert Peakflächen Blindwerte [mAU×s]
n	Anzahl der Peakflächen (60)

Anschließend wurden LOD und LOQ mittels folgender Gleichungen für die Standardsubstanzen berechnet:

$$LOD = \frac{(\bar{x} + 3 \times s_x) \times c_{Std}}{H_{Std}}$$

$$LOQ = \frac{(\bar{x} + 10 \times s_x) \times c_{Std}}{H_{Std}}$$

LOD	Nachweisgrenze Standardsubstanz [mg/mL]
LOQ	Bestimmungsgrenze Standardsubstanz [mg/mL]
$\bar{x}$	Mittelwert Peakflächen Blindwerte [mAU×s]
s_x	Standardabweichung Peakflächen Blindwerte [mAU×s]
c_{Std}	Konzentration Standardsubstanz [mg/mL]
H_{Std}	Peakhöhe Standardsubstanz [mAU]

A3.2 Berechnung der Konzentrationen phenolischer Substanzen (LC-DAD)

Die Proben wurden jeweils doppelt aufgearbeitet und doppelt vermessen. Die Berechnung der Konzentrationen der identifizierten Substanzen erfolgte anhand folgender Gleichung:

$$C_{Subst} = \left[\frac{(A_{Pr} - b)V_{Ex} \times V_{Tee}}{a \times m_{Pr} \times V_{Aliquot}} \right] \times 100 \text{ g} \times f_1 \times f_2 \times f_3$$

C_{Subst}	Konzentration Substanz [mg/100 g Teekraut]
A_{Pr}	Peakfläche der jeweiligen Substanz in der Probe [mAU×s]
b	y-Achsenabschnitt der Regressionsgeraden [mAU×s]
V_{Ex}	Volumen Probenextrakt (0,004 L)
V_{Tee}	Volumen des eingesetzten Kochwassers (45 mL)
a	Steigung der Regressionsgeraden [(mAU×s)/(mg/mL)]
m_{Pr}	Einwaage Teekraut [g]
$V_{Aliquot}$	Volumen des Aliquots innerhalb der Probenaufarbeitung (35 mL)
100 g	Bezug auf 100 g Teekraut
f_1	Verdünnungsfaktor
f_2	Korrekturfaktor für Reinheit der Standardsubstanz
f_3	Korrekturfaktor für Molekulargewicht (für strukturell verwandte Substanzen)

A3.3 Berechnung der relativen *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (LC-onlineTEAC)

Aus den LC-onlineTEAC Daten wurden die antioxidativen Kapazitäten der identifizierten Substanzen relativ in μmol Troloxäquivalenten (TE) pro 100 g Teekraut berechnet. Dies erfolgte mittels nachfolgender Gleichung:

$$\text{TEAC}_{\text{rel}} = \frac{A_{\text{Sub}} \times c_{\text{Trolox}} \times V_{\text{Ex}} \times V_{\text{Vial ges}} \times V_{\text{Tee}} \times f \times 1000}{A_{\text{Trolox}} \times m_{\text{Pr}} \times V_{\text{Aliquot}} \times V_{\text{Vial Pr}}} \times 100 \text{ g}$$

TEAC	relative TEAC einer Substanz [$\mu\text{mol TE}/100 \text{ g Teekraut}$]
A_{Sub}	negative Peakfläche der Substanz bei 734 nm [$\text{mAU} \times \text{s}$]
c_{Trolox}	Konzentration interner Troloxstandard (1 mmol/L)
V_{Ex}	Volumen Probenextrakt (0,004 L)
$V_{\text{Vial ges}}$	Gesamtvolumen im Vial (150 μL)
V_{Tee}	Volumen des eingesetzten Kochwassers (0,045 L)
f	Verdünnungsfaktor
1000	Umrechnungsfaktor: mmol auf μmol
A_{Trolox}	negative Peakfläche des Troloxpeaks bei 734 nm [$\text{mAU} \times \text{s}$]
m_{Pr}	Einwaage Teekraut [g]
V_{Aliquot}	Volumen des Aliquots innerhalb der Probenaufarbeitung (0,035 L)
$V_{\text{Vial Pr}}$	Volumenanteil der Probe im Vial (135 μL)
100 g	Bezug auf 100 g Teekraut

A3.4 Berechnung der absoluten *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (LC-onlineTEAC)

Anhand der LC-onlineTEAC Daten wurden die antioxidativen Kapazitäten der quantifizierten Substanzen absolut in mmol Troloxäquivalenten (TE) pro mmol Substanz berechnet. Dies erfolgte mittels nachfolgender Gleichung:

$$\text{TEAC}_{\text{abs}} = \frac{A_{\text{Sub}} \times c_{\text{Trolox}} \times V_{\text{Ex}} \times V_{\text{Vial ges}} \times V_{\text{Tee}} \times f \times M_{\text{Sub}} \times 100 \text{ g}}{A_{\text{Trolox}} \times m_{\text{Pr}} \times V_{\text{Aliquot}} \times V_{\text{Vial Pr}} \times c_{\text{Sub}}}$$

TEAC_{abs}	absolute TEAC einer Substanz [$\text{mmol TE}/\text{mmol Substanz}$]
A_{Sub}	negative Peakfläche der Substanz bei 734 nm [$\text{mAU} \times \text{s}$]

C_{Trolox}	Konzentration interner Troloxstandard (1 mmol/L)
V_{Ex}	Volumen Probenextrakt (0,004 L)
$V_{\text{Vial ges}}$	Gesamtvolumen im Vial (150 μL)
V_{Tee}	Volumen des eingesetzten Kochwassers (0,045 L)
f	Verdünnungsfaktor
M_{Sub}	Molekulargewicht der Substanz [mg/mmol]
A_{Trolox}	negative Peakfläche des Troloxpeaks bei 734 nm [mAU $\times$ s]
m_{Pr}	Einwaage Teekraut [g]
V_{Aliquot}	Volumen des Aliquots innerhalb der Probenaufarbeitung (0,035 L)
$V_{\text{Vial Pr}}$	Volumenanteil der Probe im Vial (135 μL)
100 g	Umrechnungsfaktor von c_{Sub} auf mg
C_{Sub}	Konzentration der Substanz [mg/100 g Teekraut]

A3.5 Berechnung des Gesamtphenolgehaltes (*Folin-Ciocalteu-Assay*)

Die Bestimmung der Gesamtphenolgehalte mittels FC-Assay erfolgte unter Verwendung einer externen Gallussäurekalibrierung. Die Gesamtphenolgehalte wurden in mg Gallussäureäquivalenten (GE) pro 100 g Teekraut mittels folgender Gleichung berechnet:

$$C_{\text{Phenol}} = \frac{((E_{\text{Pr}} - E_{\text{BW}}) - b) \times V_{\text{Ex}} \times V_{\text{well}} \times V_{\text{Tee}} \times f}{a \times m_{\text{Pr}} \times V_{\text{Aliquot}} \times V_{\text{Pr}} \times 10^3} \times 100 \text{ g}$$

C_{Phenol}	Gesamtphenolgehalt [g GE/100 g Teekraut]
E_{Pr}	Extinktion der Probe bei 740 nm [Skt]
E_{BW}	Extinktion Blindwert bei 740 nm [Skt]
b	y-Achsenabschnitt der Regressionsgeraden [Skt]
V_{Ex}	Volumen Probenextrakt (0,004 L)
V_{well}	Gesamtvolumen im well der Platte (195 μL)
V_{Tee}	Volumen des eingesetzten Kochwassers (0,045 L)
f	Verdünnungsfaktor
a	Steigung der Regressionsgeraden [Skt $\times$ mg/L]
m_{Pr}	Einwaage Teekraut [g]
V_{Aliquot}	Volumen des Aliquots innerhalb der Probenaufarbeitung (0,035 L)
V_{Pr}	Volumen Probe (verdünnt) für die Messung (20 μL)
10^3	Umrechnungsfaktor: mg auf g

100 g Bezug auf 100 g Teekraut

A3.6 Berechnung des Tanningehaltes (Methylcellulose-Präzipitations-Assay)

Die Quantifizierung von Tanninen mittels MCP-Assay erfolgte unter Verwendung einer externen Epicatechinkalibrierung. Die Tanninkonzentrationen wurden in mg Epicatechin-äquivalenten (EE) pro 100 g Teekraut mittels folgender Gleichung berechnet:

$$C_{\text{Tannin}} = \frac{((\Delta E_{\text{KP}} - \Delta E_{\text{AP}}) - b) \times V_{\text{Ex}} \times V_{\text{Ges}} \times V_{\text{Tee}} \times f}{a \times m_{\text{Pr}} \times V_{\text{Aliquot}} \times V_{\text{Pr}} \times 10^3} \times 100 \text{ g}$$

C_{Tannin}	Tanningehalt [mg EE/100 g Teekraut]
ΔE	Differenz Extinktion bei 280 nm zwischen Kontroll- (KP) bzw. Arbeitsprobe (AP) (abzüglich des jeweiligen Blindwertes) [Skt]
b	y-Achsenabschnitt der Regressionsgeraden [Skt]
V_{Ex}	Volumen Probenextrakt (0,004 L)
V_{Ges}	Gesamtvolumen pro Ansatz (1 mL)
V_{Tee}	Volumen des eingesetzten Kochwassers (45 mL)
f	Verdünnungsfaktor
a	Steigung der Regressionsgeraden [Skt×mg/mL]
m_{Pr}	Einwaage Teekraut [g]
V_{Aliquot}	Volumen des Aliquots innerhalb der Probenaufarbeitung (35 mL)
V_{Pr}	Volumen Probe für die Messung (0,025 mL)
10^3	Umrechnungsfaktor: mg auf g
100 g	Bezug auf 100 g Teekraut

A3.7 Berechnung der gesamten antioxidativen Kapazität (Elektronenspinresonanz-Spektroskopie)

Die mittels ESR-Spektroskopie gemessene antioxidative Kapazität wird angegeben als Menge Fremy's Salz, die von in 100°g Teekraut enthaltenen Antioxidantien umgesetzt wird. Die Berechnung der antioxidativen Kapazität erfolgte mittels nachfolgender Gleichung:

$$AK = \left(c_{Fremy} - \frac{c_{Fremy} \times I_{Ende}}{I_{Start}} \right) \times \frac{V_{Ex} \times V_{Tee} \times f_1 \times f_2}{V_{Aliquot} \times m_{Pr}} \times 100 \text{ g}$$

AK	Antioxidative Kapazität [Abbau mmol Fremy's Salz/100 g Teekraut]
c_{Fremy}	Konzentration Fremy's Salz in der Messkapillare [0,5 mmol/L]
I_{Ende}	Signalintensität am Endpunkt der Messung (nach 30 min) [Skt]
I_{Start}	Signalintensität zu Messbeginn (= Blindwert) [Skt]
V_{Ex}	Volumen Probenextrakt (0,004 L)
V_{Tee}	Volumen des eingesetzten Kochwassers (0,045 L)
f_1	Verdünnungsfaktor
f_2	Verdünnungsfaktor = 2 (100 µL der Probe wurden für die Messung mit 100 µL Puffer versetzt)
$V_{Aliquot}$	Volumen des Aliquots innerhalb der Probenaufarbeitung (0,035 L)
m_{Pr}	Einwaage Teekraut [g]
100 g	Bezug auf 100 g Teekraut

A4 Kalibriergeraden

A4.1 Kalibriergeraden für die Quantifizierung phenolischer Substanzen (LC-DAD)

Für die Quantifizierung phenolischer Substanzen in *C. incanus* Tee mittels LC-DAD wurden nachfolgende Kalibriergeraden eingesetzt:

Catechin ($R^2=0,999$; $y=8362,4x-11,205$)							
Konzentration [mg/L]	13	63	113	163	213	263	313
Peakfläche [mAU×s]	92	531	904	1372	1778	2185	2601
Ellagsäure ($R^2=0,982$; $y=13869x+46,8$)							
Konzentration [mg/L]	4	33	63	92	122	180	
Peakfläche [mAU×s]	57	675	841	1171	1832	2555	

Ferulasäure ($R^2=0,997$; $y=7436,1x+147,52$)								
Konzentration [mg/L]	2	105	164	224	283	343	402	
Peakfläche [mAU×s]	233	828	1348	1855	2264	2668	3161	
Galocatechin ($R^2=0,999$; $y=7344,7x+21,377$)								
Konzentration [mg/L]	25	98	172	245	319	392	466	
Peakfläche [mAU×s]	244	746	1238	1768	2378	2919	3454	
Gallussäure ($R^2=0,999$; $y=41571x+58,78$)								
Konzentration [mg/L]	3	27	52	76	101	125	150	
Peakfläche [mAU×s]	176	1141	2232	3255	4339	5313	6198	
Myricetin-3-O-galactosid ($R^2=0,999$; $y=30932x-13,465$)								
Konzentration [mg/L]	5	10	57	106	153	201	249	297
Peakfläche [mAU×s]	140	262	1739	3309	4710	6264	7770	9078
Myricitrin ($R^2=0,999$; $y=25211x+176,97$)								
Konzentration [mg/L]	7	116	225	334	443	551	660	
Peakfläche [mAU×s]	160	3058	5942	8848	11341	14233	16534	
Procyanidin B1 ($R^2=0,996$; $y=14408x-21,694$)								
Konzentration [mg/L]	9	23	36	50	63	77	90	
Peakfläche [mAU×s]	139	270	554	594	903	1091	1290	
Quercitrin ($R^2=0,997$; $y=32396x+27,562$)								
Konzentration [mg/L]	4	7	36	65	94	123	151	187
Peakfläche [mAU×s]	143	226	1166	2101	3045	4246	4938	5960
Tilirosid ($R^2=0,999$; $y=24350x-94,594$)								
Konzentration [mg/L]	4	33	61	90	119	148	177	
Peakfläche [mAU×s]	73	694	1358	2025	2812	3483	4274	

A4.2 Gallussäurekalibriergerade für die Gesamtphenolbestimmung (*Folin-Ciocalteu-Assay*)

Konzentration Gallussäure [mg/L]	Extinktion (E) [Skt]	$E_{\text{Probe}} - E_{\text{Blindwert}}$ [Skt]
0,0 (Blindwert)	0,047	—
15	0,163	0,116
30	0,275	0,228
45	0,382	0,335
60	0,490	0,442
75	0,597	0,550
90	0,697	0,650
105	0,811	0,764
120	0,913	0,866
135	1,011	0,964
150	1,117	1,070
165	1,223	1,175
180	1,329	1,282
$R^2=0,999; y=0,0071x+0,0151$		

A4.3 Epicatechinkalibriergerade für die Tanninbestimmung (Methylcellulose-Präzipitations-Assay)

Konzentration Epicatechin [mg/L]	Extinktion (E) [Skt]	$E_{\text{Probe}} - E_{\text{Blindwert}}$ [Skt]
0,0 (Blindwert)	0,056	—
25	0,274	0,218
50	0,512	0,456
75	0,756	0,700
100	1,006	0,950
125	1,206	1,150
150	1,449	1,393
175	1,680	1,624
200	1,961	1,905
225	2,129	2,073
$R^2=0,999$; $y=0,0094x-0,0083$		

Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit

Phenolische Inhaltsstoffe in *Cistus incanus* Tee – Charakterisierung und Stabilität innerhalb der Teezubereitung

selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Hamburg, 29.08.2014

Peer Riehle