

# **Optimierte Analyse von Flavonoiden mit HPLC-MS**

Menelaos Papagiannopoulos



# **Optimierte Analyse von Flavonoiden mit HPLC-MS**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Menelaos Papagiannopoulos

aus

Hannover

Bonn 2007



Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. R. Galensa

2. Referent: Prof. Dr. G. König

Tag der Promotion: Mittwoch, 5. September 2007

Erscheinungsjahr: 2008

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn

[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert









Seht Ihr den Mond dort stehen?  
Er ist nur halb zu sehen,  
Und ist doch rund und schön!

So sind wohl manche Sachen,  
Die wir getrost belachen,  
Weil unsre Augen sie nicht sehn.

Aus: Abendlied (Matthias Claudius 1779)



## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	1
Abstract .....	5
Veröffentlichungen, Vorträge und Poster .....	9
Danksagung und Zusammenarbeit .....	17
Abkürzungen und Konventionen .....	19
1. Einleitung .....	23
Polyphenole: Vorkommen, Substanzgruppen und Biosynthese.....	23
Physiologische Wirkungen.....	26
Technologische Eigenschaften .....	27
Analyseverfahren.....	28
Ziel der Arbeit .....	29
2. Ergebnisse und Diskussion .....	
2.1 Extraktion fester Proben .....	31
Grundlagen und Anforderungen.....	31
Die beschleunigte Lösungsmittelextraktion .....	32
Extraktion von Gerstenmalz .....	35
Extraktion eines Johannisbrotproduktes .....	38
Fraktionierte Extraktion von Hopfenpellets .....	43
Fraktionierte Extraktion von Gerstenmalz .....	45
2.2 Festphasenextraktion .....	47
Grundlagen und Anforderungen.....	47
Charakterisierung der Festphasenextraktion .....	48
Verschiedene Phasenmaterialien .....	49
Auftragen auf Polyamid mit organischem Lösungsmittelanteil .....	53
Elution und fraktionierte Elution von Polyamid.....	55
Weitere Parameter .....	56
Eigenschaften und Vorteile der automatisierten Festphasenextraktion.....	59
Kopplung von ASE und ASPEC .....	60
2.3 Chromatographische Trennung .....	63
Grundlagen und Anforderungen.....	63
Stationäre Phase.....	64
Mobile Phase .....	66
Säulendimensionen.....	67
Charakterisierung der Trennung .....	68
Trennung von Anthocyanen .....	70

2.4 Massenspektrometrie .....	73
Grundlagen .....	73
Aufbau und Funktion des Ionenfallen-Massenspektrometers .....	74
Fragmentierung in der Ionenfalle .....	77
Optimierung der massenspektrometrischen Detektion .....	80
Reproduzierbarkeit der Fragmentspektren .....	82
Quantifizierung mit dem Ionenfallen-Massenspektrometer .....	82
Strukturaufklärung und Identifizierung mit Fragmentspektren .....	86
Fragmentierung von Proanthocyanidinen .....	87
Proanthocyanidine in Gerstenmalz .....	93
Flavanolglykoside in Gerstenmalz .....	107
Prenylflavonoide in Hopfen .....	118
Humulone und Lupulone in Hopfen .....	121
2.5 Prozessanalytik und präparative Anwendungen.....	125
Proanthocyanidine im Brauprozess .....	125
Der Brauprozess .....	126
Analyse von Proanthocyanidinen im Brauprozess .....	127
Johannisbrot ( <i>Ceratonia siliqua</i> L.) .....	134
Analyse von Polyphenolen in Johannisbrotprodukten .....	134
Präparative Anwendungen .....	141
3. Material und Methoden .....	145
Chemikalien und Probenmaterialien .....	145
Beschleunigte Lösungsmittlextraktion .....	148
Festphasenextraktion .....	149
Hochleistungsflüssigchromatographie .....	150
Massenspektrometrie .....	153
Präparative Trennungen .....	154
4. Literaturverzeichnis.....	155
Anhang A – Abbildungen Proanthocyanidine in Malz .....	169
Anhang B – Abbildungen Flavanolglykoside in Malz.....	223

### **Zusammenfassung**

Polyphenole sind Metaboliten des sogenannten Sekundärstoffwechsels von Pflanzen und kommen in ihnen meist als Minorkomponenten vor. In der Pflanze spielen sie eine Rolle unter anderem als UV- und Fraßschutz, Schutz vor Pilzbefall und als Allelochemikalien. Einige Polyphenole tragen durch ihre Farbe (z.B. Anthocyane) oder ihre Adstringenz (z.B. Proanthocyanidine) zur Qualität pflanzlicher Lebensmittel bei. In der Lebensmitteltechnologie haben sie durch ihre Farbe, ihre antioxidativen Eigenschaften (Geschmacksstabilität) und ihre zum Teil proteinbindende Wirkung (Auftreten von Trübungen) Bedeutung.

Seit einigen Jahren ist das Interesse an diesen Pflanzeninhaltsstoffen stark gestiegen, da zahlreiche Studien positive physiologische Wirkungen nachgewiesen haben. Einige Polyphenole haben eine ausgeprägte antioxidative Kapazität, andere haben östrogene Eigenschaften oder können bestimmte Enzymsysteme günstig beeinflussen. Die Aufnahme von Polyphenolen mit der Nahrung wird in vielen Studien in Zusammenhang mit einem verminderten Risiko für z.B. kardiovaskuläre Erkrankungen oder Krebs gebracht.

Grundlage der Erforschung technologischer oder gesundheitlicher Wirkungen ist eine profunde Analytik der Polyphenole. Die geringen Konzentrationen, die komplexen Matrices, die große Strukturvielfalt der Polyphenole, die Empfindlichkeit der Analyten gegenüber Sauerstoff, Wärme, Licht und Hydrolyse, sowie der Mangel an kommerziell verfügbaren Standards von ausreichender Reinheit erschweren die Untersuchungen. Die Analytik individueller Verbindungen muss daher sowohl eine schonende Konzentrierung und Abtrennung von der Matrix als auch eine hochauflösende Trennung und eine selektive und empfindliche Detektion umfassen.

Ziel der Arbeit war deshalb eine leistungsstarke, optimierte und automatisierte Analytik von Polyphenolen mittels Hochleistungsflüssigchromatographie und Ionenfallen-Massenspektrometrie. Dafür wurde die Kopplung von beschleunigter Lösungsmittelextraktion (PLE), Festphasenextraktion (SPE), Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC), Ultraviolett-Diodenarraydetektion (UV-DAD) und Massenspektrometrie (MS) entwickelt, die die oben genannten Ansprüche erfüllt.

Zur Optimierung wurden bestehende Verfahren detailliert untersucht, adaptiert, automatisiert und beschleunigt sowie miteinander gekoppelt. Die optimierten Methoden erlauben eine weitgehend automatisierte, schnelle Analytik in weniger Arbeitsschritten mit einem deutlich

verringerten manuellen Arbeitsaufwand und geringerem Verbrauch an Lösungsmitteln als die bisher genutzten Verfahren. So wird die Analytik individueller Polyphenole in einer großen Zahl von Proben ermöglicht. Die methodische Entwicklung, Etablierung und Nutzung dieser Kopplungstechnik erfolgte hier erstmalig für die lebensmittelchemische Analytik.

Die beschleunigte Lösungsmittlextraktion und die automatisierte Festphasenextraktion wurden erfolgreich eingesetzt, um schnell und unter schonenden Bedingungen Extrakte mit einer hohen Konzentration an Analyten zu gewinnen. Konzentrationen in dieser Höhe konnten mit den bisher eingesetzten manuellen Aufarbeitungsmethoden nicht erreicht werden. Dazu wurden die bestehenden Verfahren und die sie beeinflussenden Parameter gründlich untersucht und modifiziert. Die schonenden Extraktions- und Aufarbeitungsbedingungen vermindern die Gefahr einer Artefaktbildung oder des Abbaus empfindlicher Analyte. Die zuvor erreichte Reproduzierbarkeit wurde durch die Automatisierung und die Verwendung kommerzieller Festphasenkartuschen noch deutlich verbessert. Die fraktionierte Extraktion wurde erfolgreich zur Abtrennung störender Matrixbestandteile verwendet. Die verbesserten Probenvorbereitungstechniken sind damit die Grundlage für die Detektion neuer Inhaltsstoffe und die genaue Quantifizierung der Polyphenole in einer großen Probenanzahl.

Die gute chromatographische Trennung und die hohe Selektivität der massenspektrometrischen Detektion erlauben, viele verschiedene aber strukturell ähnliche Verbindungen nebeneinander nachzuweisen. Die genaue Quantifizierung und die gute Reproduzierbarkeit ermöglichen, auch geringe Veränderungen von Einzelsubstanzen in komplexen Prozessproben festzustellen.

Mit der optimierten MS-Detektion wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Proanthocyanidine verlässlich über das massenspektrometrische Signal quantifiziert werden können. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit zur quantitativen Analyse einer weit größeren Zahl dieser Verbindungen als mit bisherigen Analyseverfahren auch in für die UV-Detektion nicht ausreichenden Konzentrationen und ohne die Notwendigkeit einer aufwändigen, vollständigen chromatographischen Trennung. Diese wäre sonst nur durch mehrfache aufeinanderfolgende fraktionierte Trennungen auf unterschiedlichen Phasensystemen zu erreichen. Die detaillierte Analyse der Fragmentspektren und der zugrundeliegenden Reaktionen lässt Aussagen über mehr strukturelle Details zu als bisher möglich schien. So lassen sich z.B. Verzweigungen von Proanthocyanidinen und die Position der Interflavanbindung über die Fragmentspektren nachweisen, was sonst nur mit aufwändigen chemischen Abbaumethoden oder Kernspinresonanzspektroskopie nach Isolierung der Substanzen möglich ist. Diese strukturellen

Eigenschaften können einen Einfluss z.B. auf die Löslichkeit, die antioxidative Aktivität, die Affinität zur Proteinbindung oder die Bioverfügbarkeit dieser Verbindungen haben.

Mit der entwickelten Methode wurden 41 einzelne phenolische Verbindungen in Johannisbrot (*Ceratonia siliqua* L.) und die Proanthocyanidine in Gerstenmalz (*Hordeum vulgare* L.) identifiziert und strukturell beschrieben. In Johannisbrot und daraus hergestellten Produkten konnten zum ersten Mal die enthaltenen Flavonoide, hydrolysierbaren Tannine und Phenolcarbonsäuren identifiziert, strukturell charakterisiert und quantifiziert werden. In Malz wurden 58 bisher dort nicht strukturell beschriebene Proanthocyanidine nachgewiesen. Neben Catechin und Galocatechin wurde erstmals auch (epi)Afzelechin als Monomer der Proanthocyanidine im Malz identifiziert. Neben den in Malz bekannten 4→8 Verknüpfungen wurden in dieser Arbeit auch 4→6 Verknüpfungen und verzweigte Verbindungen nachgewiesen. Auch 21 Flavanolglykoside und ein glykosyliertes dimeres Proanthocyanidin wurden erstmals in Malz identifiziert, die im Gegensatz zu den verbreitet in Pflanzen enthaltenen Flavonolglykosiden deutlich seltener zu finden sind. Die als Folge der Biosynthese entstehende Vielfalt der neu identifizierten Substanzen eröffnet die Möglichkeit, im Zusammenspiel mit der in dieser Arbeit gezeigten massenspektrometrischen Quantifizierung neben den Hauptverbindungen viele weitere strukturell verwandte Verbindungen für die Bestimmung der Sorten und Herkünfte heranzuziehen. Damit erweitern sich die analytischen Möglichkeiten für die Authentizitäts- und Herkunftsbestimmung anhand der Polyphenolmuster auch in anderen pflanzlichen Produkten. In Hopfen wurden bisher dort nicht beschriebene Prenylflavonoide, Humulone und Lupulone identifiziert. Dies zeigt, dass eine größere Anzahl dieser Sekundärmetaboliten gebildet wird als bisher bekannt war. Es wurden in dieser Arbeit erstmals höher prenylierte Flavonoide nachgewiesen, die aufgrund des östrogenen Potentials dieser Verbindungen, welches von der Prenylierung beeinflusst wird, von Bedeutung sein könnten. Die neu identifizierten Humulone und Lupulone stellen in der Alkyl-Seitenkette modifizierte Homologe der Bitterstoffe des Hopfens dar.

Es wurden im Anschluss Prozessproben aus der Brauerei und aus der Johannisbrotverarbeitung untersucht und die Veränderungen der Konzentrationen einzelner Polyphenole verfolgt. Die entwickelten Methoden erlauben durch die empfindliche und reproduzierbare Analyse der Veränderungen individueller Polyphenole einen zuvor nicht erreichten detaillierten Einblick in den Prozess und seine Auswirkungen auf einzelne, unterschiedliche Substanzen. Daraus lassen sich wertvolle Informationen für die Verarbeitung dieser Lebensmittel ableiten. Bei der Röstung von Johannisbrot könnten die Gehalte und das Muster der enthaltenen Polyphenole durch entsprechende Prozessführung gezielt gesteuert

werden. Auch kann die mit hohen Kosten verbundene PVPP-Filtration des Bieres vor der Abfüllung bei genauer Kenntnis des Konzentrationsverlaufes einzelner trübungsaktiver Proanthocyanidine optimiert werden, die bei der bisherigen empirischen Steuerung des Prozesses nicht berücksichtigt wurden. Als Ausgangspunkt für differenzierte Untersuchungen bieten die entwickelten Methoden die Möglichkeit, auch weitere Parameter des Brauprozesses, z.B. im Bereich des Maischens, Läuterns und Würzekochens, an eine gewünschte Beeinflussung der Polyphenole anzupassen.

Für die eingehende Untersuchung technologischer oder gesundheitlicher Wirkungen müssen neben der genauen Analyse auch reine Einzelsubstanzen verfügbar sein und auch für die Analytik sind Referenzsubstanzen ein großer Vorteil. Das kommerzielle Angebot für strukturell komplexe Polyphenole, insbesondere für Proanthocyanidine, ist allerdings sehr gering. Daher wurden die eingesetzten Analyseschritte in ihrem Verhalten gegenüber verschiedenen Substanzen charakterisiert und neben der analytischen Verwendung auch die Anwendung auf eine präparative Arbeit erprobt. Erfolgreich konnten Xanthohumol und 8-Prenylnaringenin, der Pflanzeninhaltsstoff mit der bisher stärksten bekannten östrogenen Aktivität, aus Hopfen als Reinsubstanzen isoliert werden. Das gewonnene 8-Prenylnaringenin wurde anschliessend als Referenzverbindung zur Entwicklung einer chiralen Trennung mittels Kapillarelektrophorese eingesetzt. Die Proanthocyanidine aus Gerstenmalz konnten im präparativen Maßstab nach ihrem Oligomerisationsgrad fraktioniert werden. Die so gewonnenen hochkonzentrierten Misch-Standards wurden erfolgreich in der analytischen Methodenentwicklung eingesetzt. Sie bieten aber auch den Ausgangspunkt für detaillierte Untersuchungen zur Abhängigkeit der Trübungsaktivität von der Struktur, und damit für ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen.

Die entwickelten Analysenmethoden wurden darüber hinaus für die Untersuchung von Polyphenolen verschiedener Substanzgruppen in weiteren Probenmaterialien eingesetzt und zeigen damit ihre Eignung über die hier besprochenen Anwendungen hinaus. So wurden Polyphenole im Rahmen weiterer Untersuchungen unter anderem in Zitrusfrüchten, Açaí-Früchten (*Euterpe Oleracea* Mart.), Camu-Camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh), Tamarillo (*Cyphomandra betacea*), Guaraná (*Paullinia cupana*), Tee- und Kakaoextrakten, Trauben- und Apfelsäften identifiziert.



## Abstract

Polyphenols are so called secondary metabolites in plants and are found usually as minor constituents. For the plant, they serve as allelo-chemicals and as a protection against ultraviolet light, herbivores and several plant pathogens. Some polyphenols contribute to the quality of plant derived food by their color (e.g. anthocyanins) or their astringency (e.g. proanthocyanidins). In food technology, their color, their antioxidative properties (flavor stability) and their protein precipitative properties (formation of cloudiness) are of considerable interest.

In recent years, the interest in these compounds has increased tremendously due to studies revealing a beneficial physiological action of flavonoids and related substances. Some polyphenols present antioxidant properties, others have a considerable estrogenic potential or the ability to beneficially influence specific metabolic functions. Several studies show a correlation of the nutritional intake of polyphenols and a reduced risk to develop e.g. cardiovascular diseases or cancer.

A suitable analytical methodology is the key to the investigation of technological and health related properties of polyphenols. The analysis is often impaired by small concentrations, the complex matrices, their structural diversity, and their susceptibility to oxygen, light, elevated temperature, and acidic or basic conditions. Furthermore, reference compounds of suitable purity are only available in a few cases. Therefore, the analysis of individual compounds has to comprise a careful concentration and purification as well as a high performance separation and selective and sensitive detection.

Therefore, the aim of this work was a powerful, optimized and automated analysis of polyphenols using high performance liquid chromatography and ion trap mass spectrometry. Accelerated Solvent Extraction (ASE), solid phase extraction (SPE), high performance liquid chromatography (HPLC), ultraviolet diode array detection (UV-DAD), and mass spectrometry (MS) were coupled to meet these needs.

Established analytical methods were investigated in detail, modified, automated and coupled. This enables a rapid analysis with a reduced consumption of solvents, requiring less steps and markedly reduced manual work compared to previous procedures. This allows the sensitive and reproducible analysis of individual polyphenols in a high number of process samples and is able to quantify even small changes in their concentrations. The method

development, implementation and usage of this coupling technique in the present work is a first for food chemical analysis.

Accelerated Solvent Extraction and automated solid phase extraction were successfully used for rapid and gentle extraction yielding higher analyte concentrations compared to previous manual procedures. Existing methods and the parameters influencing their performance were thoroughly investigated and modified accordingly. The gentle conditions of the sample extraction and preparation minimize analyte degradation and the formation of artifacts. The reproducibility was improved compared to that obtained by the former manual method using commercially available cartridges and the automated process. The fractionated extraction was successfully applied to remove matrix compounds prior to the extraction of the analytes. The optimized sample preparation techniques are the key to the detection of new phenolic compounds and to the reliable quantitation in a high number of samples.

Because of the good chromatographic separation and the high selectivity of the mass spectrometric detection, many similar but structurally different compounds can be identified and quantified in a single run. The exact quantification and the good reproducibility help to quantify even minor concentration changes of individual compounds in complex samples from food processing.

The results of this work show that proanthocyanidins can be quantified reliably by mass spectrometry using the optimized method. This opens a door for the quantitative analysis of a high number of these compounds without the necessity for a laborious, complete chromatographic separation. This could only be achieved by sequential fractionation on different phase systems. The detailed investigation of the mass spectrometric fragmentation patterns and the underlying reactions enables the detection of more structural details than previously thought, which otherwise calls for laborious chemical degradation methods or nuclear magnetic resonance spectroscopy after isolation of the compounds. For example, the branching of proanthocyanidins and the position of the interflavonoid bond can be differentiated by mass spectrometric fragmentation. These structural features are able to influence the properties of these compounds, e.g. their solubility, their antioxidant properties, their affinity to protein precipitation and their bioavailability.

The analytical procedure was used to identify and structurally characterize 41 polyphenols in carob (*Ceratonia siliqua* L.) and the proanthocyanidins in barley malt (*Hordeum vulgare* L.). The flavonoids, hydrolyzable tannins and phenolic acids in carob and derived products were identified, characterized and quantified for the first time. In malt, 58 different proanthocyanidins

are structurally described for the first time in malt. (epi)Afzelechin was confirmed to occur as a monomer of the malt proanthocyanidins besides catechin and galocatechin. The 4→6 linkage of the interflavonoid bond was identified in addition to the known 4→8 linkage and furthermore branched proanthocyanidins were found. In addition, 21 flavanoglycosides and one glycosylated dimeric proanthocyanidin were discovered, which are rare plant constituents in contrast to the ubiquitous flavonoglycosides. This diversity of phenolic compounds is a direct consequence of plant specific biosynthesis. By employing the advantages of mass spectrometric quantitation it could possibly be used in addition to the main proanthocyanidins to certify the authenticity, in malt as well as in other plant derived sample material. Previously not described prenylflavonoids, humulones and lupulones were identified in hops. This demonstrates a larger number of these secondary metabolites than formerly known. For the first time, higher prenylated flavonoids were identified in this work. These compounds are of interest due to their estrogenic potential which is influenced by the degree of prenylation. The newly identified humulones and lupulones are homologues of the bitter compounds in hops, modified in the alkyl side chain.

Subsequently, samples from carob pod processing as well as samples from the beer brewing process were analyzed for their changes in the concentrations of individual polyphenols. Owing to the good sensitivity and reproducibility for even small changes in the concentrations of individual polyphenols, insight into the process and its influence on different compounds can be gained in far more detail than previously possible. Valuable information for food processing can be derived from these data. Process control of carob roasting could aim at specific influence on the pattern and content of polyphenols. The cost-intensive filtration of beer with PVPP could be optimized with the knowledge of the changes in the concentrations of single haze-active proanthocyanidins, which so far relies on empirical control. As a starting point for differentiated investigations, the developed methods could also deliver information for adapting process control in mashing, lautering and wort boiling to a desired influence on individual polyphenol concentrations.

Pure single compounds are needed for the detailed investigation of technological or physiological effects as well as for the analysis itself. Only a few reference compounds are commercially available in sufficient purity, and especially structurally complex substances like proanthocyanidins are very rare. The different steps of the analytical procedure were therefore characterized and their ability to serve for an isolation and purification strategy was examined. Xanthohumol and 8-prenylnaringenin, the most potent phytoestrogen, were successfully isolated and purified from hops. The purified 8-prenylnaringenin was used as a reference compound for

the chiral separation with capillary electrophoresis. The proanthocyanidins from barley malt were separated according to their degree of oligomerization in the preparative scale. The high concentrated standards were used in analytical method development. They could as well be used for detailed studies of the structure activity relationship regarding their protein precipitative properties.

The developed analytical procedures were successfully employed to the investigation of different flavonoids in other sample material. This shows the versatility of the procedures and their applicability to further analytical problems. For several further studies, polyphenols were identified with these methods in citrus fruits, açai (*Euterpe Oleracea Mart.*), camu-camu (*Myrciaria dubia (H.B.K.) Mc Vaugh*), tamarillo (*Cyphomandra betacea*), guaraná (*Paullinia cupana*), tea and cocoa extracts, and grape and apple juices.

## Veröffentlichungen, Vorträge und Poster

Einige Ergebnisse aus dieser Arbeit und aus damit zusammenhängenden Untersuchungen im gleichen Zeitraum wurden bereits in folgenden Veröffentlichungen, Vorträgen und Postern vorgestellt:

### Veröffentlichungen

PAPAGIANNPOULOS M, ZIMMERMANN B, MELLENTHIN A, KRAPPE M, MAIO G, GALENSA R  
*ASE-ASPEC-HPLC Kopplung – Automatisierte Bestimmung von Proanthocyanidinen in Malz*  
GIT Labor-Fachzeitschrift 09/2001 950-952 **2001**

PAPAGIANNPOULOS M, ZIMMERMANN B, MELLENTHIN A, KRAPPE M, MAIO G, GALENSA R  
*Online Coupling of Pressurized Liquid Extraction, Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography for Automated Analysis of Proanthocyanidins in Malt*  
Journal of Chromatography A 958 9-16 **2002**

ZIMMERMANN B, PAPAGIANNPOULOS M, MELLENTHIN A, KRAPPE M, MAIO G, GALENSA R  
*Coupling of ASE, ASPEC and HPLC – Automated Determination of Proanthocyanidins in Malt*  
G.I.T. Laboratory Journal 04/2002 175-177 **2002**

PAPAGIANNPOULOS M, MELLENTHIN A  
*Automated Sample Preparation by Pressurized Liquid Extraction – Solid-Phase Extraction for the Liquid Chromatographic – Mass Spectrometric Investigation of Polyphenols in the Brewing Process*  
Journal of Chromatography A 976 345-348 **2002**

PALMBACH G, PAPAGIANNPOULOS M, GALENSA R  
*Flavonoids in Nutrition / Flavonoide in der Ernährung*  
Ernährung/Nutrition 28 201-211 **2004**

PAPAGIANNPOULOS M, WOLLSEIFEN HR, MELLENTHIN A, HABER B, GALENSA R  
*Identification and Quantification of Polyphenols in Carob Fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and Derived Products by HPLC-UV-ESI/MS<sup>n</sup>*  
Journal of Agricultural and Food Chemistry 52 3784-3791 **2004**

PAPAGIANNOPOULOS M, GALENSA R

*Verstärkte Retention polarer Flavonoide in der RP-HPLC auf der Polaris Amide C18 Phase*

Inspirations – Applications and Solutions from Varian n°3 12-13 **2004**

*Auch in englischer, französischer, italienischer und spanischer Übersetzung erschienen*

LICHTENTHÄLER R, RODRIGUES RB, MAIA JG, PAPAGIANNOPOULOS M, FABRICIUS H, MARX F

*Total Oxidant Scavenging Capacities of Euterpe Oleracea Mart. (Açai) Fruits*

International Journal of Food Sciences and Nutrition 56 53-64 **2005**

RODRIGUES RB, LICHTENTHÄLER R, ZIMMERMANN BF, PAPAGIANNOPOULOS M, FABRICIUS H, ALMEIDA O, MAIA JGS, MARX F

*Total Oxidant Scavenging Capacity of Euterpe Oleracea Mart. (Açai) Seeds and Identification of their Polyphenolic Compounds*

Journal of Agricultural and Food Chemistry 54 4162-4167 **2006**

RODRIGUES RB, PAPAGIANNOPOULOS M, MAIA JGS, YUYAMA K AND MARX F

*Antioxidant capacity of camu camu (Myrciaria dubia (H.B.K.) Mc Vaugh) pulp*

Ernährung/Nutrition 30 357-362 **2006**

KOFINK M, PAPAGIANNOPOULOS M, GALENSA R

*Enantioseparation of catechin and epicatechin in plant food by chiral capillary electrophoresis*

European Food Research and Technology *Online first* DOI 10.1007/s00217-006-0455-1 **2006**

## **Vorträge**

Der oder die VORTRAGENDEN sind jeweils unterstrichen

ZIMMERMANN B, PAPAGIANNOPOULOS M

*Die ASE-ASPEC Kopplung in der lebensmittelanalytischen Methodenentwicklung – Ein Erfahrungsbericht*

Anwenderforum Automatisierte Festphasenextraktion, Abimed, Frankfurt a. M., 31. Oktober **2000**

FRIEDRICH W, GALENSA R, MELLENTHIN A, PAPAGIANNOPOULOS M, ZIMMERMANN B

*Quantifizierung von Proanthocyanidinen in Gersten und korrespondierenden Malzen*

26. Brautechnologisches Colloquium, Brauerei Beck&Co, Bremen, 11.-12. Januar **2001**

ZIMMERMANN B, PAPAGIANNPOULOS, GALENSA R

*Online Kopplung von ASE, SPE und HPLC am Beispiel der Polyphenolanalytik in Malz;  
oder: Warum Espresso besser schmeckt als Filterkaffee*

Regionaltagung NRW der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Paderborn, 15. März **2001**

*Zusammenfassung in: Lebensmittelchemie 55 66-67 2001*

ZIMMERMANN B, PAPAGIANNPOULOS M

*Die ASE-ASPEC-HPLC-Kopplung: Probieren geht über Studieren*

Anwenderforum Automatisierte Festphasenextraktion, Abimed, Hamburg, 5. April **2001**

MELLENTIN A, PAPAGIANNPOULOS M, KINITZ C, ZIMMERMANN B, GALENSA R

*Bedeutung und Analytik von Polyphenolen im Brauprozess*

30. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Braunschweig, 10.-12. September **2001**

*Zusammenfassung in: Lebensmittelchemie 55 143-144 2001*

PAPAGIANNPOULOS M, MELLENTIN A

*Vollautomatisierte Probenvorbereitung für die LC/MS: Problempunkte und Lösungsansätze*

4. LC/MS-Diskussionstreffen, Deutsche Gesellschaft für Massenspektrometrie, Wuppertal,  
27. November **2001**

MELLENTIN A, PAPAGIANNPOULOS M, KINITZ C

*LC/MS-Bestimmung von Polyphenolen in Bier*

27. Brautechnologisches Colloquium, Brauerei Beck&Co, Bremen, Januar **2002**

PAPAGIANNPOULOS M, MELLENTIN A

*ASE-ASPEC-Kopplung als Probenvorbereitung für die LC/MS*

ASE- und HPLC-Anwendertreffen, Dionex, Trier, 27. Februar **2002**

PAPAGIANNPOULOS M, MELLENTIN A

*Selektive und effiziente Probenvorbereitung für die Polyphenolanalytik*

Regionaltagung NRW der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Wuppertal, 13. März **2002**

*Zusammenfassung in: Lebensmittelchemie 56 54 2002*

PAPAGIANNOPOULOS M, MELLENTHIN A, GALENSA R

*Optimization Strategies for the Specific Analysis of Polyphenols in Plants by HPLC-MS*

26<sup>th</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2002), Montréal (Quebec, Kanada), 2.-7. Juli **2002**

PAPAGIANNOPOULOS M, MELLENTHIN A, GALENSA R

*Identifikation von Polyphenolen mittels HPLC-IonTrap MS<sup>nt</sup>*

31. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Frankfurt a.M., 9.-11. September **2002**

*Zusammenfassung in: Lebensmittelchemie 56 141 2002*

GALENSA R, KINITZ C, PAPAGIANNOPOULOS M, ZIMMERMANN B

*Einsatz der ASE-ASPEC-HPLC-Kopplung zur Bestimmung von phenolischen Verbindungen in verschiedenen Matrices*

GDCh-Fortbildung „Fruchtsäfte, fruchtsafthaltige Getränke: Technologie, Untersuchung und Beurteilung“, Darmstadt, 16.-18. Oktober **2002**

PAPAGIANNOPOULOS M

*Polyphenolanalytik im Brauprozess*

28. Brautechnologisches Colloquium, Brauerei Beck&Co, Bremen, 7.-8. Januar **2003**

PAPAGIANNOPOULOS M, KINITZ C

*Eigenschaften der Anthocyanogene und ihr Verhalten im Brauprozess*

29. Brautechnologisches Colloquium, Brauerei Beck&Co, Bremen, 8.-9. Januar **2004**

PAPAGIANNOPOULOS M

*Kreuz und Quer durchs Schaltventil – Mikropräparative HPLC mit Chromolith*

Anwendertreffen Chromforum, VWR International, Düsseldorf, 3. Juni **2004**

PAPAGIANNOPOULOS M, KINITZ C, GALENSA R

*Analysis of Polyphenols: Benefits of Method-Optimization*

22<sup>nd</sup> International Conference on Polyphenols (ICP 2004), Helsinki (Finnland), 25.-28. August **2004**

*Zusammenfassung in: Polyphenols Communications 2004 O31*



PAPAGIANNPOULOS M, KINITZ C, LOCH-AHRING S, LUSTIG S, GALENSA R

*Analytik von Polyphenolen mit HPLC-UV/DAD-MS<sup>n</sup>: Die Veränderung ihres Spektrums im Brauprozess*

33. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Bonn, 13.-15. September **2004**

*Zusammenfassung in: Lebensmittelchemie 59 77-78 2005*

KINITZ C, PAPAGIANNPOULOS M, GALENSA R

*Adsorptionsverhalten der Polyphenole auf PVPP: Vergleich der Filtration in der Produktion und im Technikum*

30. Brautechnologisches Colloquium, Brauerei Beck&Co, Bremen, 13.-14. Januar **2005**

KINITZ C, PAPAGIANNPOULOS M, GALENSA R

*Narrow Bore-LCMS zur Polyphenol-Analytik – Prozeßkontrolle in Brauereien*

Anwendertreffen Summit-HPLC, Dionex, Düsseldorf, 16. Februar **2005**

PAPAGIANNPOULOS M, KINITZ C

*Strukturvielfalt der Proanthocyanidine im Malz*

31. Brautechnologisches Colloquium, Brauerei Beck&Co, Bremen, 12.-13. Januar **2006**

## Poster

PAPAGIANNPOULOS M, ZIMMERMANN B, MELLENTHIN A, GALENSA R

*Online Sample Preparation and HPLC Analysis of Solid Samples*

25<sup>th</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2001), Maastricht (Niederlande), 17.-22. Juni **2001**

PAPAGIANNPOULOS M, MELLENTHIN A

*HPLC-MS Analyse des Polyphenolspektrums im Brauprozess*

30. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Braunschweig, 10.-12. September **2001**

*Zusammenfassung in: Lebensmittelchemie 55 157-158 2001*

PAPAGIANNPOULOS M, MELLENTIN A

*Accelerated Solvent Extraction in the Investigation of Polyphenols*

Eurofoodchem XI, Norwich (Norfolk, UK), 26.-28. September **2001**

*Zusammenfassung in: PFANNHAUSER W, FENWICK GR, KHOKHAR S (EDITORS), 2001  
Biologically-Active Phytochemicals in Food: Analysis, Metabolism, Bioavailability and  
Function, Proceedings Eurofoodchem XI, Royal Society of Chemistry, Seiten 199-201 (RSC,  
ISBN 0-85404-806-5*

Ausgezeichnet mit dem 1. Posterpreis

MELLENTIN A, PAPAGIANNPOULOS M, KINITZ C

*Polyphenols in Brewing – Significance, Analysis, Characterisation*

Eurofoodchem XI, Norwich (Norfolk, UK), 26.-28. September **2001**

*Zusammenfassung in: PFANNHAUSER W, FENWICK GR, KHOKHAR S (EDITORS), 2001  
Biologically-Active Phytochemicals in Food: Analysis, Metabolism, Bioavailability and  
Function, Proceedings Eurofoodchem XI, Royal Society of Chemistry, Seiten 202-205 (RSC,  
ISBN 0-85404-806-5*

PAPAGIANNPOULOS M, MELLENTIN A

*ASE-ASPEC-HPLC-MS: Automated Sample Preparation for the Mass Spectrometric  
Investigation of Polyphenols in the Brewing Process*

7<sup>th</sup> International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Hyphenated  
Chromatographic Analyzers (HTC-7), Brügge (Belgien), 6.-8. Februar **2002**

ZIMMERMANN B, PAPAGIANNPOULOS M, MELLENTIN A, GALENSA R

*Extraktion von Polyphenolen aus Getreide mit der ASE*

Dionex Anwendertreffen ASE/HPLC, Trier, 27. Februar **2002**

WOLLSEIFEN HR, HENKE C, PAPAGIANNPOULOS M, MELLENTIN A, GALENSA R

*Polyphenole in Johannisbrot (Ceratonja Siliqua)*

31. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Frankfurt a.M., 9.-11. September **2002**

*Zusammenfassung in: Lebensmittelchemie 57 29 2003*

LACHENMEIER K, PAPAGIANNPOULOS M, GALENSA R

*Untersuchung und Optimierung der Festphasenextraktion polyphenolischer Verbindungen*

Regionaltagung NRW der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Bonn, 12. März **2003**

*Zusammenfassung in: Lebensmittelchemie 57 80 2003*

ZIMMERMANN B, PAPAGIANNPOULOS M, GALENSA R

*Convenience, Sensitivity and Selectivity: How to Analyze Proanthocyanidins by Online Coupled Sample Preparation and HPLC with Coulometric Electrode Array Detection*

24<sup>th</sup> International Symposium on Chromatography (ISC 2002), Leipzig, 15.-20. September **2002**

PAPAGIANNPOULOS M, GALENSA R

*Identifizierung neuer Hopfen-Inhaltsstoffe mittels HPLC-MS/MS*

32. Deutscher Lebensmittelchemikertag, München, 9.-11. Oktober **2003**

*Zusammenfassung in: Lebensmittelchemie 58 19 2004*

KINITZ C, PAPAGIANNPOULOS M, GALENSA R

*Determination of phenolic ingredients in beer by LC-DAD-MS<sup>n</sup>*

22<sup>nd</sup> International Conference on Polyphenols (ICP 2004), Helsinki (Finnland), 25.-28. August **2004**

*Zusammenfassung in: Polyphenols Communications 2004 P254*

LOCH-AHRING S, KINITZ C, PAPAGIANNPOULOS M, GALENSA R

*HPLC-MS mit Ionenfallen- und Time-of-Flight-Massenspektrometrie: Vergleich der Techniken am Beispiel der Polyphenolanalytik von Bier*

33. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Bonn, 13.-15. September **2004**

*Zusammenfassung in: Lebensmittelchemie 58 138 2004*

KINITZ C, PAPAGIANNPOULOS M, GALENSA R

*Das ist Ihr Bier! Übersicht über die phenolischen Inhaltstoffe von Bier und ihre Identifizierung mit HPLC-MS<sup>n</sup>*

33. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Bonn, 13.-15. September **2004**

*Zusammenfassung in: Lebensmittelchemie 59 42-43 2005*

KOFINK M, PAPAGIANNPOULOS M, GALENSA R

*Identifizierung und chirale Trennung östrogenaktiver Substanzen aus Hopfen mittels HPLC-MS und Kapillarelectrophorese*

33. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Bonn, 13.-15. September **2004**

*Zusammenfassung in: Lebensmittelchemie 59 38 2005*

RODRIGUES RB, LICHTENTHÄLER R, PAPAGIANNPOULOS M, ZIMMERMANN B, FABRICIUS H, MAIA JGS, ALMEIDA O, MARX F

*Evaluation of the Total Oxidant Scavenging Capacity of Açai Seeds (Euterpe Oleracea Mart.)*

33. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Bonn, 13.-15. September **2004**

*Zusammenfassung in: Lebensmittelchemie 59 37 2005*

PAPAGIANNPOULOS M, GALENSA R, KORTE E

*Increased Retention of Polar Flavonoids in RP-HPLC on a Polaris Amide C18 Column*

2<sup>nd</sup> International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, Prag (Tschechische Republik), 2.-4. November **2005**

RODRIGUES RB, LICHTENTHÄLER R, ZIMMERMANN B, PAPAGIANNPOULOS M, FABRICIUS H, MARX F, ALMEIDA O, MAIA JGS

*Total oxidant scavenging capacities of Euterpe oleracea Mart. (açai seeds) and their polyphenolic compounds*

29<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (29<sup>a</sup> RASBQ), Química é Energia: transforma a vida e preserva o ambiente, Águas de Lindóia (São Paulo, Brasilien), 19.- 22. Mai **2006**

KOFINK M, PAPAGIANNPOULOS M, GALENSA R

*Chirale Untersuchung von Catechin und Epicatechin in Kakao und Kakaoprodukten mittels Kapillarelektrophorese*

35. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Dresden, 18.-20. September **2006**

*Zusammenfassung in: Lebensmittelchemie in Druck 2007*

BRACHMANN S, PAPAGIANNPOULOS M, GALENSA R

*Einflüsse auf die Lagerstabilität von Trauben- und Apfelsäften: Veränderungen der antioxidativen Kapazität sowie des Gehaltes an Polyphenolen, HMF und Vitamin C*

35. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Dresden, 18.-20. September **2006**

*Zusammenfassung in: Lebensmittelchemie in Druck 2007*

RODRIGUES RB, PAPAGIANNPOULOS M, MAIA JGS, YUYAMA K AND MARX F

*Camu-camu: a promising fruit from the Amazon basin*

Tropentag 2006, Prosperity and Poverty in a Globalized World – Challenges for Agricultural Research, Bonn, 11.-13. Oktober **2006**

## **Danksagung und Zusammenarbeit**

Die praktischen Untersuchungen zu den in der vorliegenden Arbeit geschilderten Ergebnissen wurden im Zeitraum Juni 2000 bis Juni 2006 am Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften (IEL), Bereich Lebensmittelchemie I (früher Institut für Lebensmittelwissenschaft und Lebensmittelchemie) der Landwirtschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Galensa durchgeführt. Ich danke ihm herzlich für seine fortwährende Unterstützung, sein Vertrauen und sein stets großes Interesse an dieser Arbeit. Der Beginn der Arbeiten wurde zusätzlich von Frau Dr. Mellenthin geleitet. Ich danke ihr für die Einführung in das Thema und die gute Betreuung.

Ich danke Frau Professor Dr. König für ihr Interesse an diesen Arbeiten und die Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens.

Frau Privatdozentin Dr. van Echten-Deckert und Herrn Privatdozent Dr. Marx danke ich für ihre Bereitschaft, als Mitglieder der Promotionskommission zur Verfügung zu stehen.

Ein Teil der Arbeiten (Analytik des Brauprozesses) wurde in Zusammenarbeit mit Frau Kinitz im Rahmen ihres Promotionsprojektes durchgeführt. Ich bedanke mich bei ihr ganz besonders für die immer gute und erfolgreiche Zusammenarbeit und das stets freundliche Arbeitsklima.

Ein weiterer Teil (Methodenentwicklung ASE-ASPEC-Kopplung zur Malzanalyse) wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Zimmermann im Rahmen seines Promotionsprojektes „Proanthocyanidins in Barley and Malt Analyzed by Pressurized Liquid Extraction, Solid-Phase Extraction and HPLC“ erarbeitet. Ich danke ihm herzlich für die gute, ergebnisreiche und harmonische Zusammenarbeit.

Einen Teil der praktischen Arbeiten zur Untersuchung der Festphasenextraktion mit Referenzverbindungen führte Frau Dr. Lachenmeier im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit „Untersuchung und Optimierung der Festphasenextraktion polyphenolischer Verbindungen für die Bieranalytik“ durch. Ich danke ihr für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit.

Die praktischen Arbeiten zur Untersuchung von Johannisbrot und daraus hergestellten Produkten sowie der dafür nötigen Methodenoptimierung führte Herr Wollseifen im Rahmen

seiner wissenschaftlichen Abschlußarbeit „Polyphenole in Johannisbrot (*Ceratonia Siliqua* L.) und daraus hergestellten Produkten“ durch. Ich danke ihm herzlich für die gute und ergebnisreiche Zusammenarbeit.

Ich danke der Brauerei C.&A. Veltins GmbH&Co. KG (Grevenstein) und ihren Mitarbeitern, besonders Herrn Dr. Bauer, Herrn Loch-Ahring und Frau Kickelbick, für die Zusammenarbeit, das große Interesse an diesen Arbeiten und die großzügige Unterstützung.

Ich danke der Brauerei Beck GmbH&Co. KG (Bremen) und ihren Mitarbeitern, insbesondere Herrn Dr. Bellmer, Herrn Dr. Lustig, Herrn Dr. Eger und Herrn Schmid, für die Möglichkeit, Brauprozessproben untersuchen zu können, für ihr großes Interesse an den Ergebnissen sowie für ihre Unterstützung.

Ich danke der Firma NATECO<sub>2</sub> GmbH&Co. KG (Wolnzach), besonders Herrn Dr. Forster, Herrn Schmidt, Frau Beck und Frau Massinger, für die Bereitstellung von Probenmaterial, für die gute Zusammenarbeit, ihr großes Interesse und die Förderung der Arbeit.

Ich danke der Firma Nutrinova Nutrition Specialties & Food Ingredients GmbH (Frankfurt a. M.) und Herrn Dr. Haber für ihre Unterstützung und für die Bereitstellung von Proben von Caromax und aus der Verarbeitung von Johannisbrot.

Ich danke den Firmen Dionex GmbH (Idstein) und Abimed Analysen-Technik GmbH (Langenfeld), insbesondere Herrn Dr. Maio und Herrn Dr. Krappe, für die Unterstützung bei der Methodenentwicklung der ASE-ASPEC-Kopplung sowie das Interesse und die gute Zusammenarbeit bei der Publikation der Ergebnisse.

Ich danke der Firma Varian Deutschland GmbH (Darmstadt), insbesondere Frau Dr. Korte, für die Bereitstellung einer speziellen HPLC-Säule sowie das Interesse und die gute Zusammenarbeit bei der Publikation der Ergebnisse.

Ich danke der Firma Dr. Willmar Schwabe GmbH&Co. KG (Karlsruhe), insbesondere Herrn Dr. Lang, Herrn Dr. Hauer und Herrn Dr. Erdelmeier, für das lebhaftes Interesse, die großzügige Unterstützung und die gute Zusammenarbeit bei der Untersuchung verschiedener Pflanzenextrakte mit den in dieser Arbeit entwickelten Methoden.

Ich bedanke mich bei allen meinen Kollegen, die mich während der Arbeit unterstützt haben, für die gute Zusammenarbeit und das freundliche Miteinander.

## Abkürzungen und Konventionen

In dieser Arbeit werden die folgenden **Abkürzungen** verwendet:

Abs	Absorption bei der UV Detektion
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
API	Atmospheric Pressure Ionization
ASE	Accelerated Solvent Extraction (Beschleunigte Lösungsmittlextraktion)
ASPEC	Automated Sample Preparation with Extraction Cartridges (automatisierte Festphasenextraktion)
AU	Absorption Units (Absorptions-Einheiten bei der UV Detektion)
CE	Capillary Electrophoresis (Kapillarelektrophorese)
CEAD	Coulometric Electrode Array Detection
DAD	Diode Array Detection (Diodenarray-Detektion)
DMF	N,N-Dimethylformamid
EGCG	Epigallocatechingallat
ESI	Electrospray Interface
FAB-MS	Fast Atom Bombardment-Mass Spectrometry
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigchromatographie)
HPLC-MS	Kopplung von HPLC und MS
HRF	Heterocyclic Ring Fission (Heterozyklische Ringspaltung)
LCMS	Kopplung von HPLC und MS
m/z	Masse/Ladungsverhältnis
MeOH	Methanol
MS	Mass Spectrometry (Massenspektrometrie)
MS <sup>2</sup>	Fragmentspektrum
MS <sup>3</sup>	Fragmentspektrum eines Produkt-Ions aus einem MS <sup>2</sup> -Fragmentspektrum
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernspinresonanz)
nq	nicht quantifizierbar
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
RDA	Retro-Diels-Alder
Rel. Intensität	Relative Intensität
RT	Retention Time (Retentionszeit)
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
TIC	Total Ion Current (Total-Ionenstrom)
UV	Ultraviolett
vis	visible (sichtbar)

Für die **Angabe der Strukturen oder der Struktureinheiten der Proanthocyanidine** wurden in dieser Arbeit die Trivialnamen (PORTER 1988, PORTER 1994) sowie vereinfachte Formen gewählt:

### Monomere

A	Afzelechin
C	Catechin
G	Gallocatechin
(epi)Afzelechin	bezeichnet Epiafzelechin <u>oder</u> Afzelechin, wenn diese nicht unterschieden werden können.
(epi)Catechin	bezeichnet Epicatechin <u>oder</u> Catechin, wenn diese nicht unterschieden werden können.
(epi)Gallocatechin	bezeichnet Epigallocatechin <u>oder</u> Gallocatechin, wenn diese nicht unterschieden werden können.

### Oligomere

Der zuerst genannte Baustein ist die „obere Einheit“ des Proanthocyanidins, der letztgenannte Baustein die „untere Einheit“, also die Starteinheit der Biosynthese. Dazwischen werden die Positionen der Interflavanbindung und ihre Stereochemie angegeben.

Procyanidin B2	Epicatechin(4 $\beta$ →8)-Epicatechin
Procyanidin B3	Catechin(4 $\alpha$ →8)-Catechin
Procyanidin B5	Epicatechin(4 $\beta$ →6)-Epicatechin
Procyanidin B6	Catechin(4 $\alpha$ →6)-Catechin
Prodelphinidin B3	Gallocatechin(4 $\alpha$ →8)-Catechin
Procyanidin C2	Catechin(4 $\alpha$ →8)-Catechin(4 $\alpha$ →8)-Catechin
Prodelphinidin C2	Gallocatechin(4 $\alpha$ →8)-Gallocatechin(4 $\alpha$ →8)-Catechin
Beispiel: GCC	Kurzform für die im Malz vorkommenden Proanthocyanidine. Bezeichnet ein lineares, trimeres Proanthocyanidin vom B-Typ mit der Sequenz Gallocatechin-Catechin-Catechin mit Catechin als „unterer Einheit“, also Starteinheit der Biosynthese, und Gallocatechin als „oberer Einheit“. Die Position und Stereochemie der Interflavanbindungen (4 $\alpha$ →8) ist für die zwei dominanten Dimeren und die vier dominanten Trimeren in Gerstenmalz geklärt (OUTTRUP UND SCHAUMBURG 1981).



### Massenspektren und Fragmentierungen

Die **Angabe des gemessenen Masse/Ladungsverhältnisses  $m/z$**  erfolgt in den Abbildungen der Massenspektren mit einer Nachkommastelle, im Text ganzzahlig gerundet.

Da zur Aufnahme der Fragmentspektren einzelne Proanthocyanidine und Flavanolglykoside gezielt fragmentiert werden mussten, wurden mehrere Chromatogramme aufgenommen und die Daten aus verschiedenen Messungen dargestellt. Die für die Peaks der einzelnen Substanzen erhaltenen **Retentionszeiten** können daher zwischen den verschiedenen Chromatogrammen leicht variieren, und werden deshalb auf ein Referenzchromatogramm bezogen.

Die **Bezeichnung der  $MS^2$ - und  $MS^3$ -Spektren** wird (beispielhaft) wie folgt angegeben:

$MS^2$ -Spektrum 613                      Fragmentspektrum der Ionen mit  $m/z$  613

$MS^3$ -Spektrum 613→289              Fragmentspektrum der Ionen mit  $m/z$  289, die als Fragment-Ionen im  $MS^2$ -Spektrum 613 auftreten

### Markenzeichen

ASE®                      Eingetragenes Markenzeichen der Firma Dionex

ASPEC™                  Markenzeichen der Firma Gilson

Caromax™                Markenzeichen der Firma Nutrinova

Auf die wiederholte Kennzeichnung dieser Begriffe als Markenzeichen wurde im Text der vorliegenden Arbeit verzichtet.

### Literaturangaben

Die Angabe der verwendeten Literatur erfolgt im Text durch die Namen der Autoren bzw. des Erstautors (bei mehr als zwei Autoren) und die Jahreszahl der Veröffentlichung in Klammern und Kapitälchen. In einigen Fällen ist zur eindeutigen Bezeichnung der Jahreszahl ein Buchstabe angefügt. Im alphabetisch sortierten Literaturverzeichnis findet sich die entsprechende Veröffentlichung ebenfalls unter dem Namen des Erstautors. Die Einträge sind nach folgendem Muster aufgebaut:

AUTOR(EN) MIT INITIALEN **Erscheinungsjahr** *Titel der Veröffentlichung* Abkürzung des Zeitschriftentitels Band Seitenzahl(en)

AUTOR(EN) MIT INITIALEN **Erscheinungsjahr** (*Titel des Kapitels in:*) Titel des Buchs (Verlag)



## 1 – Einleitung

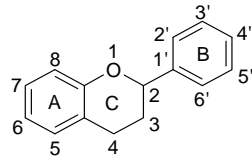
### **Polyphenole: Vorkommen, Substanzgruppen und Biosynthese**

Polyphenole sind Metaboliten des sogenannten Sekundärstoffwechsels von Pflanzen und kommen in ihnen meist als Minor Komponenten vor. Ausnahmen sind dabei z.B. Kakao, Tee und Kaffee, die einen hohen Anteil an Polyphenolen (mehrere Prozent der Trockenmasse) aufweisen. Sie kommen verbreitet im gesamten Pflanzenreich vor, allerdings sind die Gehalte und die vorkommenden Verbindungen stark unterschiedlich. Die Polyphenole werden in verschiedene Gruppen eingeteilt, von denen die Gruppe der Flavonoide eine der größten und für die Ernährung des Menschen am wichtigsten ist. Die Flavonoide werden je nach Oxygenierung des Grundkörpers in verschiedene Untergruppen eingeteilt, wovon die wichtigsten die Flavanone, Flavone, Isoflavone, Flavonole, Anthocyane, Flavanole und Proanthocyanidine sind (Abbildung 1-1). Daneben spielen im Lebensmittelbereich die Phenolcarbonsäuren (Benzoessäure- und Zimtsäurederivate) und deren Chinasäureester (Chlorogensäuren) sowie die hydrolysierbaren Tannine (mit Zucker veresterte Gallussäurederivate) eine wichtige Rolle.

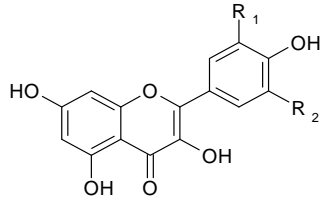
Die Polyphenole entstammen einem gemeinsamen Biosyntheseweg, der heute in weiten Teilen funktionell und regulativ aufgeklärt ist (STAFFORD 1990). Gemeinsame Vorläufersubstanz ist das Naringenin, welches durch die Chalconsynthase und die Chalconisomerase aus einer p-Coumaroyl-CoA- und drei Malonyl-CoA-Einheiten synthetisiert wird. Der A-Ring wird aus den Malonylresten gebildet, der B-Ring des resultierenden Flavonoidgrundgerüsts entstammt dabei der Coumaroyleinheit. Der Heterocyclus C entsteht aus der Verknüpfung der beiden Einheiten. Weitere Oxidations-, Reduktions- und Hydroxylierungs-Reaktionen führen dann zu den anderen Untergruppen.

In der Regel liegen die Flavonoide in den Pflanzen glykosidisch gebunden vor, mit Ausnahme der Flavanole, die meist mit Säuren verestert (z.B. galloyliert) und/oder zu Proanthocyanidinen oligomerisiert bzw. polymerisiert vorkommen. Daneben sind die Hydroxylierung, Methylierung, Acylierung, Prenylierung und Sulfonierung häufig anzutreffende Reaktionen, die zu entsprechenden Derivaten führen. Daraus ergibt sich insgesamt eine große Vielfalt möglicher Verbindungen, die bei der Analyse individueller Substanzen zu berücksichtigen ist. Bis heute wurden viele tausend verschiedene Verbindungen identifiziert und strukturell aufgeklärt (HARBORNE ET AL. 1975, HARBORNE 1988, HARBORNE 1994, HARBORNE UND BAXTER 1999, HARBORNE ET AL. 1999, HARBORNE UND BAXTER 2001).

# 1 – Einleitung

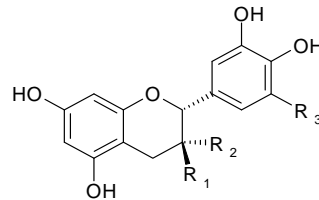


Flavan-Grundgerüst



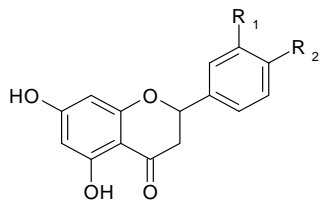
Flavonole

Kämpferol:  $R_1 = H$   $R_2 = H$   
 Quercetin:  $R_1 = OH$   $R_2 = H$   
 Myricetin:  $R_1 = OH$   $R_2 = OH$



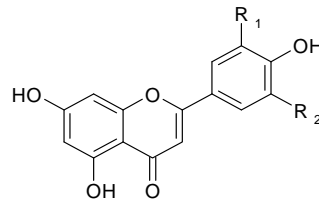
Flavanole

(+)-Catechin:  $R_1 = OH$   $R_2 = H$   $R_3 = H$   
 (-)-Epicatechin:  $R_1 = H$   $R_2 = OH$   $R_3 = H$   
 (+)-Gallocatechin:  $R_1 = OH$   $R_2 = H$   $R_3 = OH$   
 (-)-Epigallocatechin:  $R_1 = H$   $R_2 = OH$   $R_3 = OH$



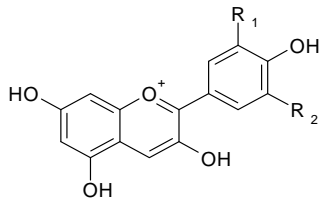
Flavanone

Naringenin:  $R_1 = H$   $R_2 = OH$   
 Hesperetin:  $R_1 = OH$   $R_2 = OCH_3$



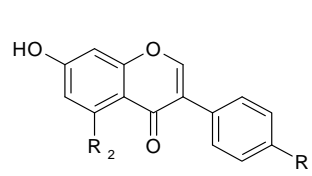
Flavone

Apigenin:  $R_1 = H$   $R_2 = H$   
 Luteolin:  $R_1 = OH$   $R_2 = H$



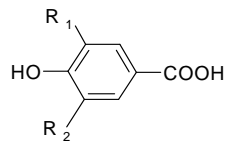
Anthocyane

Cyanidin:  $R_1 = OH$   $R_2 = H$   
 Delphinidin:  $R_1 = OH$   $R_2 = OH$   
 Malvidin:  $R_1 = OCH_3$   $R_2 = OCH_3$



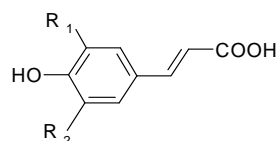
Isoflavone

Daidzein:  $R_1 = OH$   $R_2 = H$   
 Genistein:  $R_1 = OH$   $R_2 = OH$



Hydroxybenzoensäuren

p-Hydroxybenzoensäure:  $R_1 = H$   $R_2 = H$   
 Protocatechusäure:  $R_1 = H$   $R_2 = OH$   
 Gallussäure:  $R_1 = OH$   $R_2 = OH$   
 Vanillinsäure:  $R_1 = H$   $R_2 = OCH_3$   
 Syringasäure:  $R_1 = OCH_3$   $R_2 = OCH_3$



Hydroxycinnensäuren

p-Cumarsäure:  $R_1 = H$   $R_2 = H$   
 Kaffeesäure:  $R_1 = H$   $R_2 = OH$   
 Ferulasäure:  $R_1 = H$   $R_2 = OCH_3$   
 Sinapinsäure:  $R_1 = OCH_3$   $R_2 = OCH_3$

Abbildung 1-1: Strukturen der wichtigsten Untergruppen der Flavonoide und der Phenolcarbonsäuren

In Pflanzen spielen Polyphenole unter anderem eine Rolle als UV- und Fraßschutz, als Schutz vor Pilzbefall und als Allelochemikalien. Die Synthese dieser Verbindungen ist enzymatisch kontrolliert, sodass sowohl einzelne Pflanzen als auch verschiedene Pflanzenteile jeweils charakteristische Muster dieser Substanzen aufweisen. Aber auch zwischen einzelnen Sorten findet man, gemäß der genetischen Unterschiede, Differenzen im Muster dieser Metaboliten. Da außerdem der Standort, das Klima und die Witterungsbedingungen, der Erntezeitpunkt und die Lagerungsbedingungen einen Einfluss auf die Gehalte der Polyphenole haben können, findet man bei der Analyse der Polyphenole neben den sorten- auch jahrgangsbedingte Unterschiede (HERMANN 1979, ZIMMERMANN 2005, ZIMMERMANN UND GALENSA 2007).

Die in der vorliegenden Arbeit geschilderte Optimierung der Analysemethode zielte insbesondere auf die Untersuchung von Proanthocyanidinen ab. Einen beispielhaften Überblick über ihren prinzipiellen Aufbau zeigt Abbildung 1-2. Proanthocyanidine sind oligomere oder polymere Flavan-3-ole, die zumeist aus Catechin und/oder Gallocatechin und ihren Epimeren (Epicatechin und Epigallocatechin) als Monomereinheit aufgebaut sind. Daneben kommen als Bausteine auch Afzelechin (mit nur einer p-Hydroxylgruppe im B-Ring) und sein Epimeres sowie am 3-OH galloylierte Monomere vor. Nach derzeitigem Kenntnisstand ist das Vorkommen nennenswerter Mengen der Enantiomere (also (-)-Catechin und (+)-Epicatechin, auch mit Vorsilbe „ent“- bezeichnet) auf wenige Pflanzen (z.B. Guaraná) beschränkt (KOFINK ET AL. 2007). Sie können aber auch in kleinen Mengen im Zuge einer Verarbeitung von Lebensmitteln bei bestimmten Verfahrensschritten (z.B. Erhitzung im alkalischen Milieu) entstehen (KENNEDY ET AL. 1984). Trotz intensiver Forschungsbemühungen zahlreicher Disziplinen ist bis heute die Synthese der Proanthocyanidine aus den monomeren Einheiten, insbesondere die Kontrolle und Regulation dieser Schritte, nicht bekannt (TANNER ET AL. 2003). Bei der Biosynthese der Proanthocyanidine kommt es zu einer Verknüpfung des C-4 eines Flavanols („obere Einheit“, auch „elongation unit“) mit dem C-6 oder C-8 einer weiteren Einheit („untere Einheit“, auch „starting unit“). Die untere Einheit stellt dabei die Starteinheit der Biosynthese dar, die mögliche weitere Verknüpfung einzelner Bausteine erfolgt an den freien C-6 oder C-8 Positionen des Moleküls. Neben einem linearen Aufbau sind dabei auch Verzweigungen möglich, da an einem Baustein des Moleküls sowohl an der C-6 als auch an der C-8 Position weitere Einheiten mit ihrem C-4 gebunden werden können. Die so aufgebauten Proanthocyanidine werden als B-Typ bezeichnet. Daneben kann es zu einer doppelten Verknüpfung zweier Einheiten durch eine zusätzliche Etherbindung zwischen dem C-2 der oberen und dem an C-7 der unteren Einheit gebundenen Sauerstoff kommen, diese Substanzen

werden als A-Typ bezeichnet. Die Bezeichnung Proanthocyanidine stellt den Überbegriff für Verbindungen dieses Typs dar. Liegen in einem Molekül nur Catechin oder Epicatechin als Bausteine vor, spricht man von Procyanidinen, ist auch Gallocatechin oder Epigallocatechin als Einheit anzutreffen, spricht man von Prodelphinidinen, bei Afzelechin und Epiafzelechin entsprechend von Propelargonidinen.

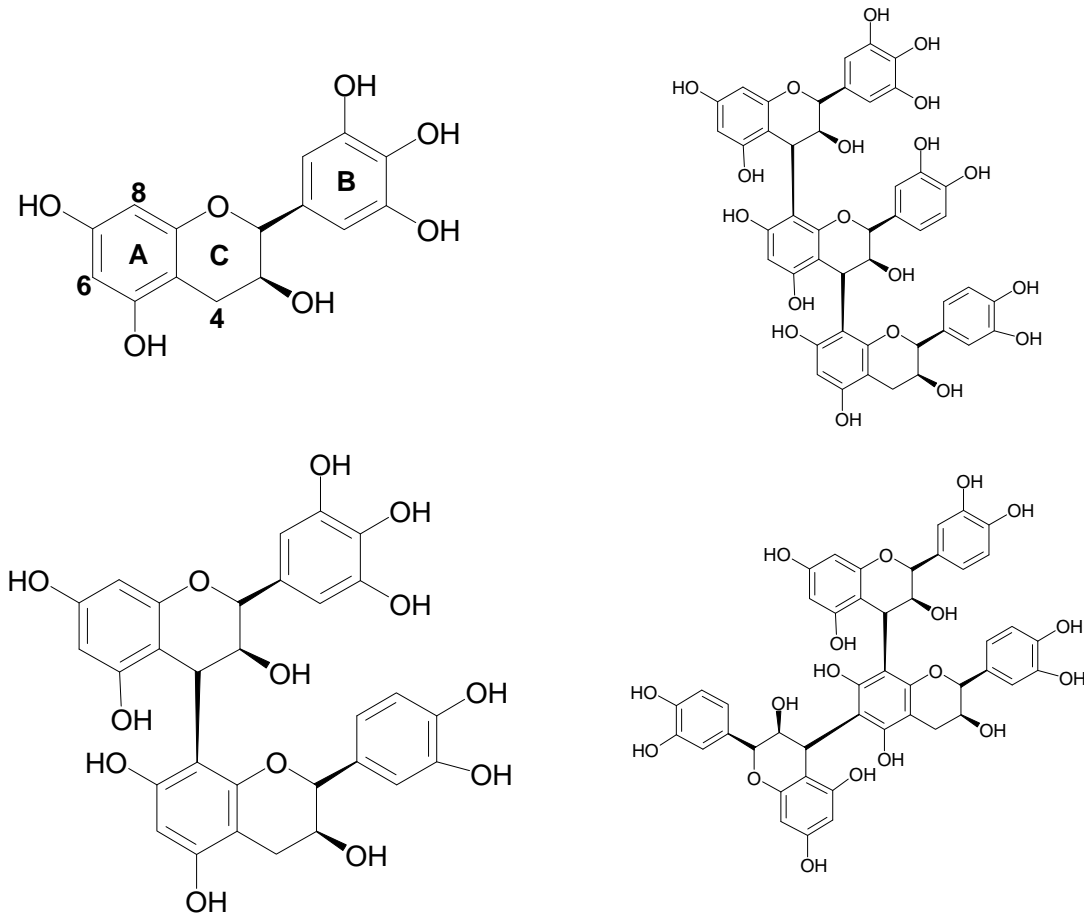


Abbildung 1-2: Beispielstrukturen für Flavanole. Links oben: ein monomeres Flavanol (Gallocatechin) mit der Nomenklatur der Ringe und den wichtigsten Positionen für die Bindungen in Proanthocyanidinen. Links unten: Prodelphinidin B3, ein Dimer bestehend aus Gallocatechin (obere Einheit) und Catechin (untere Einheit). Rechts oben: lineares Trimer, nur 4→8 Verknüpfungen. Rechts unten: Verzweigtes Trimer, enthält 4→8 und 4→6 Verknüpfungen

## Physiologische Wirkungen

Seit einigen Jahren ist das Interesse an diesen Pflanzeninhaltsstoffen stark gestiegen, da zahlreiche Studien positive physiologische Wirkungen nachgewiesen haben. Polyphenole haben eine zum Teil ausgeprägte antioxidative Kapazität (DE GAULEJAC ET AL. 1999, Counet und Collins 2003, ), einige haben östrogene Eigenschaften oder können bestimmte Enzymsysteme günstig beeinflussen (SANTOS-BUELGA UND SCALBERT 2000, SCALBERT UND WILLIAMSON 2000,

FERREIRA UND SLADE 2002, HIGDON UND FREI 2003, SERAFINI ET AL. 2003, MANACH ET AL. 2004, PALMBACH ET AL. 2004). Die Aufnahme von Polyphenolen mit der Nahrung wird in vielen Studien in Zusammenhang mit einem verminderten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und Krebs gebracht.

Die Bestimmung der physiologischen Wirkungen ist von einigen Schwierigkeiten geprägt. Um den Einfluss einzelner Verbindungen zu testen, müssen diese als reine Referenzverbindungen zur Verfügung stehen. Dies ist jedoch häufig nicht der Fall. Daneben aber geht aus einigen Untersuchungen hervor, dass es deutliche Einflüsse einer Co-Administration verschiedener Polyphenole aber auch anderer Nahrungsmittelbestandteile gibt. Viele Wirkungen wurden *in vitro* nachgewiesen, ihre Übertragbarkeit auf die *in vivo* Bedingungen ist nicht immer klar (DWYER UND PETERSON 2002).

Die Absorption und Bioverfügbarkeit, der Metabolismus, die physiologischen Wirkungen und die Epidemiologie des Flavonoidkonsums mit der Ernährung wurden in einer inzwischen fast unüberschaubaren Zahl von Studien untersucht, die allerdings zum Teil zu gegensätzlichen Ergebnissen kommen. Generell wurde für alle Untergruppen der Flavonoide gezeigt, dass zumindest eine teilweise Aufnahme nach dem Verzehr gegeben ist, da die entsprechenden Verbindungen im Blut nachgewiesen wurden (SCALBERT UND WILLIAMSON 2000). Die Bioverfügbarkeit und auch die Kinetik des Metabolismus hängen dabei stark von der Struktur der aufgenommenen Polyphenole ab. In Bezug auf die Abhängigkeit bestimmter physiologischer Faktoren von der Flavonoidzufuhr sowie auf einen positiven gesundheitlichen Langzeiteffekt einer stetigen Flavonoidaufnahme mit der Nahrung sind die Daten allerdings widersprüchlich. Zur Zeit wird deshalb keine Zufuhrempfehlung im Hinblick auf einen protektiven Effekt durch Flavonoide ausgesprochen (DGE 2004).

### **Technologische Eigenschaften**

Neben den physiologischen Wirkungen ist der Einfluss der Polyphenole auf die Produktqualität in der Lebensmitteltechnologie Ausgangspunkt vieler Studien (ENGELHARDT UND GALENSA 1997). Die farbigen Anthocyane bestimmen z.B. direkt die optischen Qualitäten von Lebensmitteln. Proanthocyanidine und hydrolysierbare Tannine zeigen eine z.T. starke proteinbindende Wirkung. Dadurch tragen sie zur Adstringenz von Lebensmitteln bei und verursachen Trübungen in Fruchtsäften und Bier (WACKERBAUER UND ANGER 1984, VAN WAESBERGHE 2001, VIDAL ET AL. 2003). Durch ihre antioxidativen Eigenschaften bieten viele Polyphenole allerdings auch einen Schutz des Lebensmittels vor oxidativen Einflüssen und

verbessern somit die Geschmacksstabilität (WACKERBAUER UND HARDT 1996, WALTERS ET AL. 1997).

Die Beurteilung der Polyphenole in der Lebensmitteltechnologie ist daher ambivalent. Während ihr antioxidatives Potential geschätzt wird, sind die Trübungseigenschaften unerwünscht. Vielfach wird daher als einer der Endschritte bei der Fruchtsaft- und Bierproduktion im Rahmen einer Filtration die Konzentration der die Trübungen verursachenden Proanthocyanidine soweit gesenkt, dass ein blankfiltriertes Getränk (z.B. klarer Apfelsaft, Pilsbier) seine optischen Eigenschaften über einen möglichst langen Zeitraum behält. Trotz intensiver Bemühungen konnte der Mechanismus der zugrundeliegenden Reaktionen bis heute nicht vollständig aufgeklärt werden (MIEDL ET AL. 2006, KUSCHE UND GEIGER 2007). Die technologischen Maßnahmen beruhen damit zum Großteil auf empirischen Erfahrungen. Ein detaillierterer Einblick wäre hier sicher wünschenswert.

Daneben hat die Analyse der Polyphenole pflanzlicher Lebensmittel eine Bedeutung für die Qualitäts-, Sorten- und Herkunftsbestimmung (GALENSA 1988, HEIMHUBER 1989, BRONNER UND GALENSA 1994, BRONNER 1996, PIERZINA 1996, FULEKI UND DA SILVA 2003, ZIMMERMANN UND GALENSA 2007). Die Weiterentwicklung leistungsfähiger Identifizierungs- und Quantifizierungsmethoden nach einer hochauflösenden Trennung individueller polyphenolischer Verbindungen sowie semipräparativer Isolationsmethoden bieten damit zusätzliche Untersuchungsmöglichkeiten auf diesem Gebiet in Ergänzung zur Bestimmung der Stabil-Isotopenverhältnisse (WOLLSEIFEN ET AL. 2006).

### **Analyseverfahren**

Viele verschiedene Verfahren kommen für die Analyse von Polyphenolen zur Anwendung. Dabei lassen sich zwei große Gruppen unterscheiden (HARBORNE UND HARBORNE 2005):

Verschiedene Methoden bestimmen Polyphenole als **Summenparameter**. Sie machen sich spezifische Reaktionen der phenolischen Hydroxylgruppen oder des Flavangrundgerüsts zunutze. Diese Methoden sind nicht Gegenstand dieser Arbeit und wurden auch nicht vergleichend herangezogen. Die wichtigsten sind der Folin-Ciocalteu-Assay, die Bestimmung der Anthocyanogene, die PVPP-Fällung, die spektrometrische Bestimmung der durch Hydrolyse entstehenden Anthocyanidine als Farbe und der chemische Abbau von Proanthocyanidinen (MEBAK 1993, SIEBERT UND LYNN 2006). Die Vorteile der Bestimmung von Summenparametern liegen in der schnellen, einfachen und kostengünstigen Durchführung, so



dass diese auch ohne hochspezialisierte Analyseninstrumente angewendet werden können. Die Nachteile liegen in der mangelnden Spezifität der zugrundeliegenden Reaktionen, den dadurch möglichen Störeinflüssen und einer substanzabhängigen Signalstärke, die einer genauen Quantifizierung entgegenstehen. Eine Unterscheidung einzelner Verbindungen, die auch bei ähnlicher Struktur stark unterschiedliche physiologische oder technologische Eigenschaften haben können, ist so nicht möglich. Demnach eignen sich die Summenparameter nur für eine schnelle, orientierende Analytik oder z.B. im Rahmen einer Qualitätskontrolle oder Serienanalytik zum Vergleich gleichartiger Proben.

Für die identifizierende oder quantifizierende Analyse individueller polyphenolischer Verbindungen sind daher **Trennverfahren** notwendig, die vor der eigentlichen Bestimmung eine Auftrennung der Polyphenole untereinander und von störenden Begleitstoffen gewährleisten und danach eine Identifizierung und/oder Quantifizierung der Substanzen getrennt voneinander ermöglichen (ROBARDS UND ANTOLOVICH 1997, MERKEN UND BEECHER 2000, DE RIJKE ET AL. 2006). Dafür haben sich die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) und die Kapillarelektrophorese (CE) bewährt (KREIMEYER ET AL 1998, KOFINK UND GALENSA 2005, KOFINK ET AL. 2007), meist in Verbindung mit einer Ultraviolett-Dioden-Array-Detektion (UV-DAD) und/oder der Massenspektrometrie (MS) (TREUTTER ET AL. 1994). Die Dünnschichtchromatographie wird nur für etablierte oder einfache Nachweise eingesetzt. Die Niederdruck-Flüssig-Chromatographie kommt heute praktisch nur noch bei präparativen Arbeiten zum Einsatz (BAOSHAN ET AL. 1989, DE PASCUAL-TERESA ET AL. 2000, ESCARPA ET AL. 2000, BARTOLOMÉ ET AL. 2000, CIFUENTES ET AL. 2001, CASTELLARI ET AL. 2002, CHINNICI ET AL. 2004, .

Die Massenspektrometrie bietet durch ihre gute Massenauflösung und damit die sehr selektive Detektion sowie durch die Möglichkeit, aus Fragmentspektren strukturelle Informationen zu gewinnen, eine sehr wertvolle Detektionsmethode. Dementsprechend kommt sie trotz ihres hohen Preises, des erforderlichen speziellen Instrumentariums und der notwendigen Praxiserfahrung mit dieser Analysetechnik in den letzten Jahren verstärkt für diese Fragestellungen zum Einsatz, wie die Anzahl der Publikationen zu dieser Thematik zeigt (DE RIJKE ET AL. 2006).

## **Ziel der Arbeit**

Voraussetzung für die Erforschung technologischer oder gesundheitlicher Wirkungen der Polyphenole ist eine optimale Analytik. Die geringen Konzentrationen, die komplexen Matrices,

die überaus große Strukturvielfalt, die Empfindlichkeit der Analyten gegenüber Sauerstoff, Wärme, Licht und extremen pH-Werten sowie der Mangel geeigneter kommerzieller Referenzsubstanzen ausreichender Reinheit erschweren die Analytik. Sie muss daher eine schonende Extraktion, Konzentrierung und Abtrennung der Analyten von der Matrix, eine hochauflösende Trennung und eine selektive Detektion umfassen.

Ausgehend von bewährten Analyseschritten sollten in dieser Arbeit die **Optimierung und Automatisierung der Polyphenolanalytik** mit dem Schwerpunkt Proanthocyanidine erreicht werden. Die vorliegende Arbeit baut teilweise auf den früher durchgeführten Entwicklungen von Roeder und Friedrich auf und setzt die dortigen Untersuchungen fort (ROEDER 1997, FRIEDRICH 2000). Teile der hier geschilderten Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit den Arbeiten von Zimmermann und Kinitz im gleichen Arbeitskreis durchgeführt (ZIMMERMANN 2005). Dazu wurden die beschleunigte Lösungsmittelextraktion (ASE), Festphasenextraktion (SPE), Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC), Diodenarraydetektion (UV-DAD) und Massenspektrometrie (MS) optimiert und miteinander gekoppelt, um die vorgenannten Anforderungen zu erfüllen. Damit können viele verschiedene aber strukturell ähnliche Verbindungen mit guter Empfindlichkeit nebeneinander identifiziert und quantifiziert werden. Die einzelnen Methoden können automatisiert werden, so dass die Analyse einer großen Zahl von Proben möglich und die Reproduzierbarkeit verbessert wird.

Die entwickelte Analyseverfahren bildete die Grundlage für die erfolgreiche Identifizierung der Polyphenole in Johannisbrot, der Proanthocyanidine und Flavanolglykoside in Malz sowie von Prenylflavonoiden und Bitterstoffen in Hopfen.

Mit der entwickelten Analyse wurden vorwiegend Proanthocyanidine in Proben aus dem Brauprozess und Flavonoide in Proben der Johannisbrotverarbeitung und deren **Veränderungen während des Verarbeitungsprozesses** untersucht. Die entwickelte Analytik wurde aber auch für weitere Untersuchungen, z.B. die Identifizierung antioxidativer phenolischer Verbindungen in tropischen Früchten, eingesetzt (LICHTENTHÄLER 2004, LICHTENTHÄLER ET AL. 2005, RODRIGUES ET AL. 2005, RODRIGUES ET AL. 2006A, RODRIGUES ET AL. 2006B).

Für die Untersuchung technologischer oder gesundheitlicher Wirkungen müssen neben der genauen Analyse reine Einzelsubstanzen als Referenz verfügbar sein. Daher wurden die verwendeten Analyseschritte in ihrem Verhalten gegenüber verschiedenen Substanzen charakterisiert und neben der analytischen Verwendung auch die **Anwendung zur präparativen Gewinnung** erprobt.

## 2.1 – Ergebnisse und Diskussion – Extraktion fester Proben

### Grundlagen und Anforderungen

Die Extraktion stellt neben einer adäquaten Probenahme und –lagerung den ersten Analyseschritt bei festen Proben dar. Auch bei flüssigen Proben kann sie angewendet werden, wenn diese zuvor durch Einengen im Vakuum oder durch Gefriertrocknung getrocknet oder auf ein geeignetes Adsorbens aufgebracht wurden. Die in der Probe vorhandenen Analyten sollten bei der Extraktion vollständig und ohne Veränderung gelöst werden. Matrixbestandteile sollen dabei möglichst nicht extrahiert werden, so dass bereits in diesem ersten Schritt eine weitgehende Trennung von Analyten und unerwünschten störenden Begleitstoffen aus der Matrix erfolgt. Das Ergebnis der Extraktion ist eine möglichst konzentrierte Lösung der Analyten, die in ihrer Zusammensetzung schon für die weitergehende Analytik geeignet ist oder dazu kompatibel gemacht werden muss.

Für die Extraktion von Polyphenolen aus festen Proben wurden verschiedene Extraktionsverfahren und Lösungsmittel beschrieben (ROBARDS UND ANTOLOVICH 1997). Suspendieren der zerkleinerten Probe im Lösungsmittel, eventuell unter Rühren oder mit Hilfe von Ultraschall, Soxhlet-Extraktion und mikrowellenunterstützte Extraktion sind häufig angewendete Verfahren. Als Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemische kommen dabei sowohl rein wässrige Lösungen oder Puffer als auch organische Lösungsmittel (Aceton, Alkohole, Dimethylformamid, Ethylacetat etc.) zum Einsatz. Manche Autoren verwenden zusätzlich Antioxidantien (z.B. Ascorbinsäure oder Sulfit) oder Inertgase, um die Analyten während der Extraktion vor oxidativen Veränderungen zu schützen. Leider sind nur wenige Ergebnisse detaillierter vergleichender Untersuchungen zur Extraktion von Polyphenolen mit den verschiedenen Verfahren oder Lösungsmitteln veröffentlicht.

Diese Extraktionsmethoden haben den Nachteil, dass für eine vollständige Extraktion ein großes Lösungsmittelvolumen im Verhältnis zur Probenmenge eingesetzt werden muss, und dass die Extraktionszeiten verhältnismäßig lang sind. Dadurch müssen die Extrakte in der Regel vor der weiteren Verarbeitung eingeengt werden, und durch die lange Extraktionszeit und den erforderlichen Konzentrationsschritt steigt die Gefahr der Bildung von Artefakten. Auch ist durch die notwendigen manuellen Zwischenschritte die Analytik mit diesen Verfahren nicht zu automatisieren und der Aufwand steht einer Untersuchung größerer Probenmengen entgegen.

Die für die hier beschriebenen Untersuchungen verwendete beschleunigte Lösungsmittel-extraktion wurde in den letzten Jahren entwickelt und etabliert. Sie bietet sich als Alternative zu den klassischen Extraktionsverfahren an und wird weiter unten ausführlich beschrieben (RICHTER ET AL. 1996, RICHTER 1999, BULDINI ET AL. 2002, RAYNIE 2004).

In dieser Arbeit lag ein Schwerpunkt auf der Untersuchung von Proanthocyanidinen. Als Lösungsmittel zur Extraktion von Proanthocyanidinen haben sich Mischungen organischer Lösungsmittel mit Wasser als geeignet erwiesen, insbesondere Mischungen aus Aceton, Methanol oder Ethanol mit Wasser. Die Proanthocyanidine zeigen mit Wasser oder mit organischem Lösungsmittel allein schlechtere Extraktionsausbeuten als mit einer Mischung. Ein Aceton-Wasser-Gemisch mit 50-80% vol Aceton eignet sich besonders, da hiermit die höchsten Extraktionsausbeuten erzielt werden (FRIEDRICH 2000).

### **Die beschleunigte Lösungsmittel-extraktion**

Die beschleunigte Lösungsmittel-extraktion (allgemein: Pressurized Liquid Extraction, PLE; Bezeichnung der Firma Dionex: Accelerated Solvent Extraction, ASE) wird seit einigen Jahren erfolgreich insbesondere in der Umwelt- und Rückstandsanalytik angewendet und ist als eine Referenzmethode in den Richtlinien der Umweltschutzbehörde der USA (EPA) festgeschrieben. Sie ist wegen der schnellen und schonenden Extraktion mit geringen Lösungsmittelvolumina eine gute Alternative zur aufwändigen und langwierigen Soxhlet-Extraktion (HÖFLER 2000).

Bei der ASE wird die Probe in einem geschlossenen Gefäß unter hohem Druck und erhöhter Temperatur mit einem kleinen Lösungsmittelvolumen extrahiert. Der hohe Druck verbessert die Penetration der Probe mit dem Lösungsmittel und erlaubt die Verwendung von Lösungsmitteln auch bei Temperaturen über ihrem Siedepunkt bei Normalbedingungen; trotzdem handelt es sich nicht um eine überkritische Extraktion.

In dieser Arbeit wurde für die beschleunigte Lösungsmittel-extraktion eine ASE200 mit einem Solventcontroller der Firma Dionex benutzt. Abbildung 2.1-1 zeigt eine Ansicht des Gerätes (in Kopplung mit dem ASPEC und einer HPLC; siehe dazu auch Abschnitt 2.2-Kopplung, Seite 60). Der Solvent Controller ermöglicht die Auswahl und Mischung von bis zu 4 Lösungsmitteln, die ständig mit Stickstoff begast werden, so dass das System weitgehend sauerstofffrei ist. Eine Pumpe fördert das Lösungsmittel oder –gemisch durch die Extraktionszelle, die in einem Ofen eingespannt ist. Der resultierende Extrakt wird in einem Probengläschen im unteren Drehteller aufgefangen.



Abbildung 2.1-1: Kopplung von ASE, ASPEC und HPLC (von links nach rechts)

Abbildung 2.1-2 zeigt den funktionellen Aufbau des Gerätes sowie schematisch den Ablauf einer Extraktion. Für die Extraktion wird die Probe zunächst in verschraubbare Extraktionszellen aus Edelstahl gefüllt. Dabei wird die Probe mit Sand oder Hydromatrix (Diatomeenerde) vermischt, damit sie aufgelockert ist und vom Lösungsmittel gut durchdrungen werden kann. Bei der Extraktion wird zunächst solange Lösungsmittel durch die in den Ofen eingespannte Zelle gepumpt, bis es das Probengefäß erreicht und somit die Zelle komplett mit Lösungsmittel gefüllt ist. Danach wird der Druck aufgebaut und für eine einstellbare Zeit konstant gehalten. Während dieser Zeit findet die eigentliche Extraktion statt. Am Ende der Extraktionszeit wird der Extrakt mit frischem Lösungsmittel in das Probengefäß überführt und die Probe ausgespült, und danach mit Stickstoff das restliche Lösungsmittel so weit wie möglich in das Probengefäß gebracht. Bei Auswahl mehrerer Extraktionszyklen wird bereits während der Extraktion frisches Lösungsmittel zugeführt, um die Ausbeuten gegebenenfalls zu verbessern. Die ASE200 erlaubt auch die mehrfache Extraktion einer Probe mit dem gleichen oder mit verschiedenen Lösungsmitteln oder Lösungsmittelgemischen nacheinander, so dass fraktionierte Extraktionen oder die Entfettung einer Probe vor der eigentlichen Extraktion möglich sind.

Neben ihrer ursprünglichen Anwendung für die Rückstands- und Umweltanalytik wurde die ASE in den letzten Jahren vermehrt für die Extraktion von Polyphenolen eingesetzt, die bisher beschriebenen Anwendungen sind allerdings noch nicht sehr zahlreich.

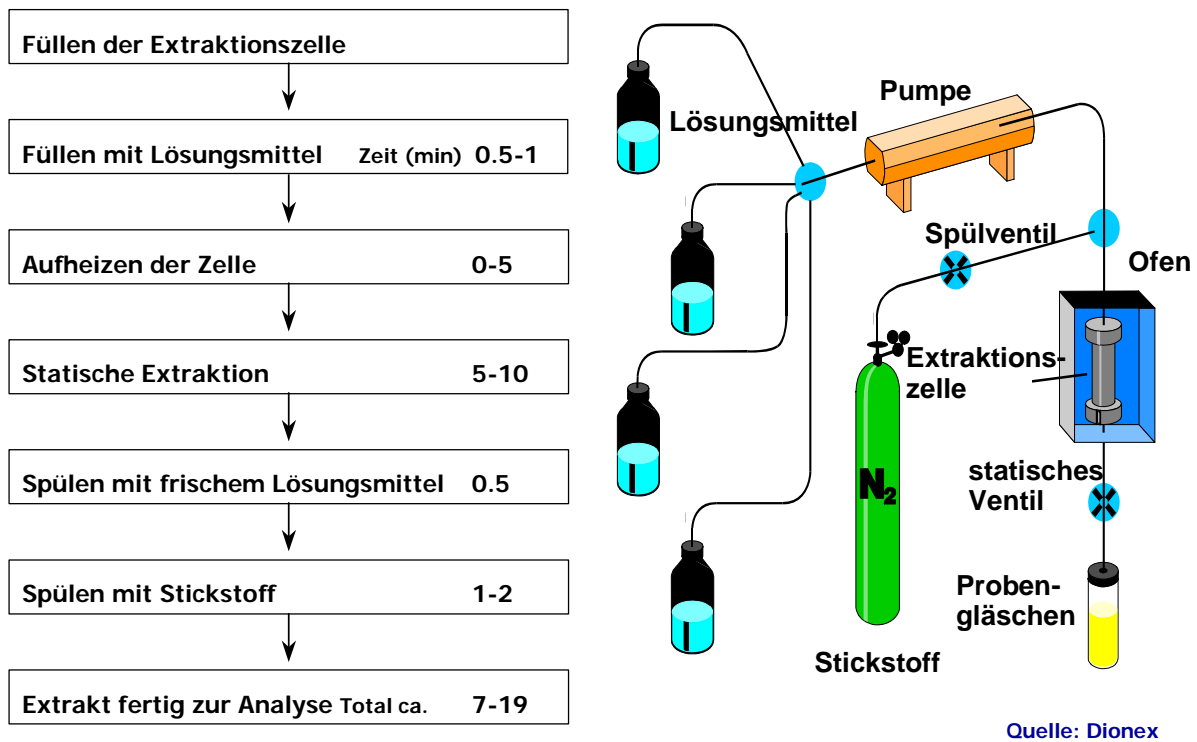


Abbildung 2.1-2: Schematischer Aufbau der ASE und typischer Ablauf einer Extraktion

In einer Übersicht beschrieb Ezzel die Anwendungen der ASE außerhalb der Umweltanalytik (EZZEL 2000). Die ASE wurde von verschiedenen Autoren erfolgreich zur Extraktion von Polyphenolen aus Äpfeln (ALONSO-SALCES ET AL. 2001A, ALONSO-SALCES ET AL. 2001B) und Trauben (PALMA ET AL. 2001, PALMA ET AL. 2002, JU UND HOWARD 2003), freier und gebundener Phenole aus Gerste (BONOLI ET AL. 2004) sowie von Isoflavonen aus Soja (ROSTAGNO ET AL. 2004) eingesetzt. Weitere Arbeiten beschreiben die Extraktion von Catechinen (PINEIRO ET AL. 2004) sowie die Stabilität von Phenolen während der Extraktion (PALMA ET AL. 2001). Weitere Veröffentlichungen, die aus der vorliegenden Arbeit und der Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Benno Zimmermann hervorgingen, beschreiben die Extraktion von Proanthocyanidinen aus Malz und Hopfen (PAPAGIANNPOULOS ET AL. 2002, PAPAGIANNPOULOS UND MELLENTIN 2002, ZIMMERMANN 2005). In Zusammenarbeit mit Herrn Hans-Rainer Wollseifen wurde über die Anwendung der ASE für die Extraktion von Johannisbrot berichtet (PAPAGIANNPOULOS ET AL. 2004).

In dieser Arbeit wurde die Extraktion von Polyphenolen mit der beschleunigten Lösungsmittelextraktion anhand von Malz und eines Johannisbrotproduktes (Caromax) detailliert untersucht sowie für Hopfenproben angepasst und optimiert.

## Extraktion von Gerstenmalz

Einer der Schwerpunkte dieser Arbeit war die Analytik der in Gerste (*Hordeum vulgare* L.) und in Gerstenmalz enthaltenen Proanthocyanidine. Daher wurde die Extraktion der Proanthocyanidine aus Gerstenmalz ausgehend von der bisher im Arbeitskreis etablierten manuellen Extraktion (FRIEDRICH 2000) mit der ASE intensiv untersucht und verglichen. Damit sollte ein automatisierbares und direkt mit der weiteren Analytik koppelbares Extraktionsverfahren entwickelt werden.

In Anlehnung an die Ergebnisse von Friedrich zur Auswahl des Lösungsmittels wurden verschiedene Aceton/Wasser-Gemische eingesetzt und die Zusammensetzung des Lösungsmittelgemisches, die Temperatur und Extraktionszeit, die Anzahl der Extraktionszyklen, das Nachspülvolumen sowie die maximale Füllmenge für die Extraktionszellen und die Anforderungen an das Mahlen der Probe untersucht. Dazu wurden jeweils mehrfache Extraktionen von gemahlenem Malz der Gerstensorte Prisma durchgeführt und die Proanthocyanidine in den erhaltenen Extrakten direkt sowie nach Festphasenextraktion mittels HPLC quantifiziert. Für die Rohextrakte kam dabei aufgrund ihrer guten Empfindlichkeit die Coulometrische Elektroden-Array Detektion (CEAD) zum Einsatz, in den Eluaten der Festphasenextraktion konnten die Proanthocyanidine auch mittels UV quantifiziert werden.

Die **Lösungsmittelzusammensetzung** hat einen entscheidenden Einfluss auf die Extraktionsausbeuten. Abbildung 2.1-3 zeigt die Abhängigkeit der Extraktionsausbeute von der Zusammensetzung des Aceton/Wasser-Gemisches. Daraus ergibt sich für die Extraktion der Proanthocyanidine ein enger optimaler Bereich mit einer maximalen Extraktionsausbeute bei 80 % vol Aceton in Wasser. Ausgehend vom Optimum fallen die Extraktionsausbeuten mit steigendem Acetongehalt stark ab (geringere Löslichkeit, schlechtere Lösung aus der Matrix), mit abnehmendem Acetongehalt fallen die Ausbeuten langsamer ab. Dies ist vermutlich auf ein stärkeres Quellen der Stärke im Malz bei höherem Wasseranteil zurückzuführen. Es ist aber auch deutlich, dass im Bereich von Acetongehalten geringer als 80% die Substanzen abhängig von ihrer Struktur diskriminiert werden. So werden die Dimere noch gut extrahiert, während Trimere in Abhängigkeit vom Gallocatechinanteil deutlich schlechter extrahiert werden. Ein Vergleich mit der optimalen Lösungsmittelzusammensetzung für die Extraktion von Johannisbrotprodukten (siehe Abschnitt 2.1-Johannisbrot, Seite 38), und die Erfahrung mit verschiedenen anderen Probenmaterialien zeigt, dass für Gerstenmalz das Optimum bei höheren Acetongehalten liegt als für andere Proben. Dort ist üblicherweise ein breiter optimaler Bereich mit einem Maximum bei etwa 50% vol Aceton zu beobachten. Wie auch für die eingehend untersuchten

Johannisbrotprodukte ist die optimale Lösungsmittelzusammensetzung für die manuelle Extraktion und die beschleunigte Lösungsmittelextraktion identisch.

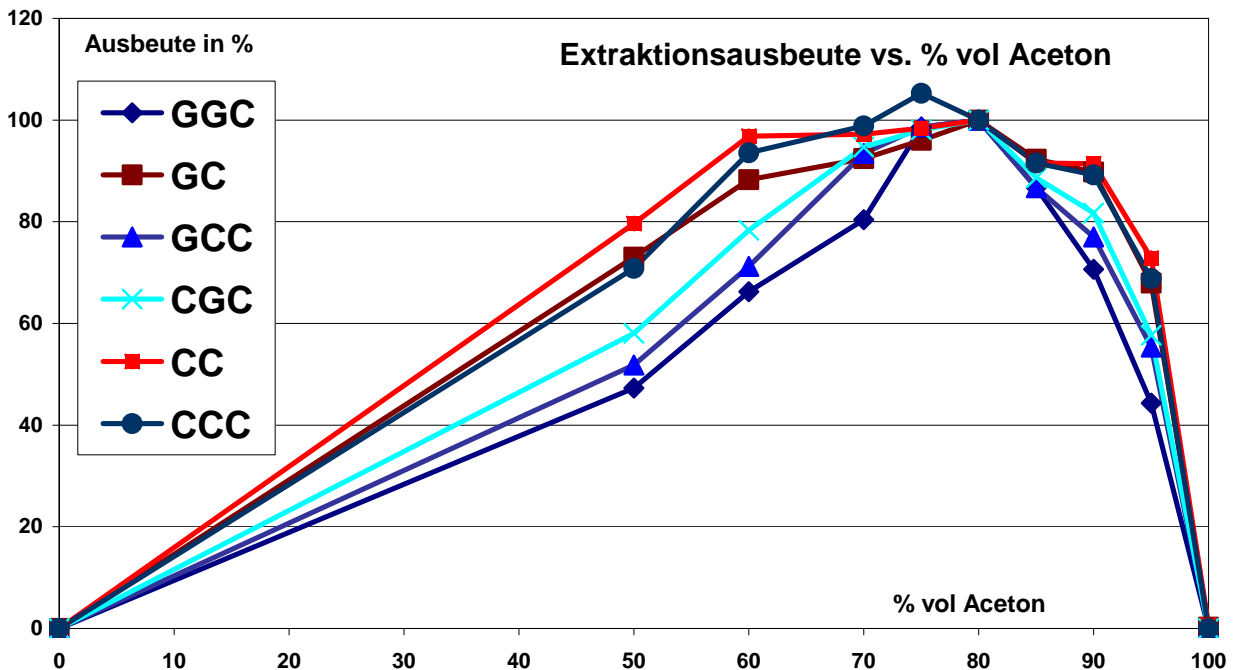


Abbildung 2.1-3: Extraktionsausbeute einzelner Proanthocyanidine aus Gerstenmalz in Abhängigkeit vom Acetongehalt bei 60 °C

Die **Temperatur** ist ein weiterer wichtiger Parameter für die Extraktion. Bei zu niedrigen Temperaturen wird trotz verlängerter Extraktionszeiten keine optimale Ausbeute erreicht. Bei zu hohen Temperaturen nimmt die Ausbeute wegen der stärkeren thermischen Belastung wieder ab. Bei Versuchen mit Raumtemperatur, 40, 60, 80 und 100 °C wurde die optimale Extraktionstemperatur mit 60 °C ermittelt.

Die **Extraktionszeit** hat bei der Wahl des optimalen Lösungsmittelgemisches und Temperatur einen Einfluss auf die erreichbare Ausbeute an Proanthocyanidinen. Eine zu kurze Extraktion liefert noch keine vollständige Ausbeute, ab einer Extraktionszeit von 10 min wird erschöpfend extrahiert, Zeiten darüber können die Ausbeute nicht mehr steigern, sondern im Gegenteil durch die verlängerte thermische Belastung wieder verringern.

Die **Anzahl der Extraktionszyklen** kann in der ASE eingestellt werden, um durch das zwischenzeitliche Nachfüllen von frischem Lösungsmittel das Gleichgewicht für die Extraktion der Analyten zu verbessern. Bei der Wahl der optimalen Lösungsmittelzusammensetzung, Temperatur und Zeit wurde eine vollständige Extraktion bereits in einem Schritt erreicht. Dies



wirkt sich günstig auf das Extraktvolumen aus, das dadurch so klein wie möglich gehalten werden kann.

Das **Nachspülvolumen** ist bei der ASE einstellbar zwischen 50% und 150% des Zellvolumens, um ein vollständiges Auswaschen des Extraktes aus der Zelle zu gewährleisten. Bereits mit dem kleinsten Nachspülvolumen wurden vollständige Ausbeuten bei ansonsten optimalen Bedingungen erreicht, wodurch das Extraktvolumen klein gehalten wird. Die Zeit der **Spülung mit Stickstoff** zur Überführung der Flüssigkeitsreste in das Sammelgefäß erwies sich als unkritisch. Als Einstellung wurde standardmäßig 60 sec gewählt.

**Der Mahlgrad** hat bei einer manuellen Extraktion einen entscheidenden Einfluss auf die Extraktionsausbeute. Bei der bisherigen Methode wurde daher das Malz mit einer Kugelmühle unter Stickstoffkühlung gemahlen, um ein möglichst feines Pulver zu erhalten (FRIEDRICH 2000). Bei der Extraktion der Proanthocyanidine mit der ASE wurde kein signifikanter Unterschied in den Ausbeuten gefunden, wenn Malz mit oder ohne Stickstoffkühlung 10 min gemahlen und bei ansonsten optimalen Bedingungen extrahiert wurde.

Die **Füllmenge der Extraktionszellen** hat einen Einfluss auf die Ausbeute: bei zu großer Füllmenge findet keine vollständige Extraktion mehr statt. Maximal 6 g Malz können bei gleicher Hydromatrixmenge in eine 11 ml Zelle gefüllt werden. Für größere Einwaagen muss die Menge an zugegebener Hydromatrix reduziert werden, da sonst durch das Quellen des Malzpulvers bei der Extraktion die Zelle nicht mehr vom Lösungsmittel durchströmt wird und das Gerät die Extraktion abbricht. Bis zu 4 g Malz ist die Ausbeute unabhängig von der Füllmenge, bei Einwaagen darüber aber sinkt sie bei einfacher Extraktion, so dass für ein optimales analytisches Ergebnis eine Einwaage von 4 g Malz nicht überschritten werden sollte.

Die **optimalen Einstellungen** für die Extraktion der Proanthocyanidine aus Malz mit der ASE sind eine Vermahlung mit der Kugelmühle bei Raumtemperatur für 10 min, eine Einwaage von 4 g für die eingesetzten 11 ml Zellen, 5 min Vorwärmen, eine Extraktion mit 80% vol Aceton in Wasser bei 60 °C für 10 min in einem Extraktionszyklus bei 100 MPa, ein Nachspülen mit 50% des Zellvolumens und ein Spülen mit Stickstoff für 60 sec. Eine Extraktion dauert 25 min und liefert ca. 14 ml Extraktvolumen.

Die **Wiederfindung**, also die Extraktionsausbeute in Bezug auf die extrahierbaren Analyte, konnte in Ermangelung von Referenzverbindungen nicht durch Dotieren mit Standards bestimmt werden. Außerdem würde dieses Verfahren nicht eine mögliche Bindung der natürlich in der Probe vorliegenden Substanzen an die Matrix, die eine dotierte Substanz gegebenenfalls nicht hat, berücksichtigen. Die mit zugesetzten Standards ermittelten Extraktionsausbeuten können

daher besser sein als die der endogenen Verbindungen. Die Ausbeuten wurden deshalb durch Vergleich mit der vorher verwendeten manuellen Extraktionsmethode und Literaturwerten sowie durch mehrfache Extraktion derselben Probe bestimmt, so dass durch Quantifizierung in den Nachextrakten die vorher nicht extrahierten Substanzmengen ermittelt wurden. Die Extraktionsausbeuten beziehen sich daher nur auf die prinzipiell mit dieser Methode extrahierbaren Analytmengen (HOLTEKJØLEN ET AL. 2006). Dadurch ergaben sich für die sechs quantitativ im Malz dominierenden Proanthocyanidine bei optimalen Extraktionsbedingungen Ausbeuten besser als 98%.

Durch 18 unabhängige Extraktionen unter optimalen Bedingungen wurde die **Reproduzierbarkeit** der Methode ermittelt. Für die sechs quantitativ im Malz dominierenden Proanthocyanidine ist die Standardabweichung  $\pm 3\%$ .

Die entwickelte und optimierte Methode zur Extraktion der Proanthocyanidine aus Gerstenmalz mittels beschleunigter Lösungsmittlextraktion ist schnell, sehr gut reproduzierbar, robust und erreicht hohe Ausbeuten. Da nach dem Einrichten des Gerätes und dem Füllen der Extraktionszellen mit den Proben keine manuellen Schritte mehr nötig sind, ist, wie weiter unten beschrieben, diese Methode geeignet, die Extraktion automatisiert durchzuführen und mit der nachfolgenden Analytik direkt zu koppeln.

Neben der guten Reproduzierbarkeit bietet diese Extraktion einen Zeitvorteil. Nicht nur die einzelne Extraktion ist schneller als bei der manuellen Extraktion, sondern der Einsatz des Gerätes ist rund um die Uhr möglich. Eine ausreichende Zahl von Extraktionszellen erlaubt zudem, die Rüstzeiten zu minimieren.

### **Extraktion eines Johannisbrotproduktes**

Mit Caromax, einem Produkt aus der Verarbeitung von Johannisbrotschoten (*Ceratonia siliqua* L.), wurde die Extraktion strukturell verschiedener Polyphenole mit der beschleunigten Lösungsmittlextraktion detailliert untersucht. Im Gegensatz zum Malz handelt es sich bei Caromax um ein stark verarbeitetes Produkt. Die entkernten und zerkleinerten Schoten werden nach einer Kaltwasserextraktion (zur Gewinnung der Kohlenhydrate) gemahlen und getrocknet. Das resultierende Pulver ist reich an löslichen Ballaststoffen und enthält eine große Zahl strukturell verschiedener Polyphenole (siehe Abschnitt 2.5-Analyse von Polyphenolen in Johannisbrotprodukten, Seite 134).

Der Einfluss der einstellbaren Parameter Lösungsmittelart, Temperatur, Zeit und Anzahl der Extraktionszyklen sowie deren Kombinationen auf die Ausbeute der einzelnen Analyten wurde durch eine große Anzahl von Extraktionen bestimmt. Dazu wurden jeweils mehrfache Extraktionen der gleichen Probe mit der ASE durchgeführt und einige ausgewählte Analyten in den resultierenden Extrakten mittels HPLC quantifiziert. Abbildung 2.1-4 zeigt ein typisches Chromatogramm mit den für die Beurteilung der Extraktion quantifizierten Substanzen. Diese decken das Spektrum der in der Probe enthaltenen Gruppen phenolischer Substanzen ab.

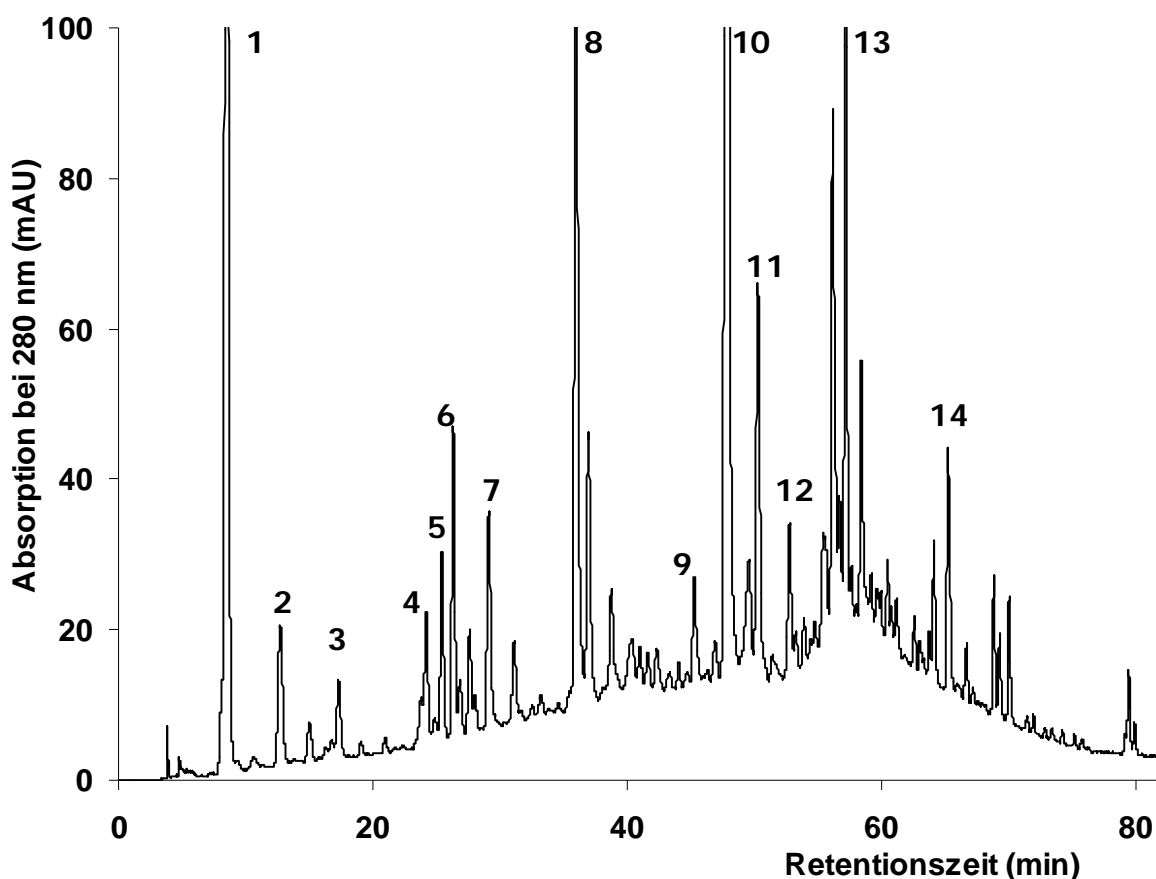


Abbildung 2.1-4: Chromatogramm eines Caromaxextraktes nach beschleunigter Lösungsmittel-Extraktion. 1 Gallussäure; 2 Hexose + 2 Gallussäuren; 3 Hexose + 2 Gallussäuren; 4 Pentose + 2 Gallussäuren; 5 Procyanidin-Trimer; 6 Hexose + 2 Gallussäuren; 7 2 Pentosen + 2 Gallussäuren; 8 Hexose + 3 Gallussäuren; 9 Myricetinpentosid; 10 Hexose + 4 Gallussäuren; 11 Myricetindesoxyhexosid; 12 Quercetinhexosid; 13 Quercetindesoxyhexosid; 14 Kämpferol.

Den größten Einfluss auf die Extraktionsausbeute hat die Wahl des Lösungsmittels. Abbildung 2.1-5 zeigt einen Vergleich der Chromatogramme nach Extraktion mit Wasser, Methanol/Wasser oder Aceton/Wasser aus einem Vorversuch. Da sich mit Aceton bzw. einem Aceton/Wasser-Gemisch bessere Extraktionsausbeuten als mit Methanol oder einem Methanol/Wasser-Gemisch ergaben, wurde für die weiteren Untersuchungen Aceton als

organisches Lösungsmittel eingesetzt und die Zusammensetzung des Aceton/Wasser-Gemisches optimiert.

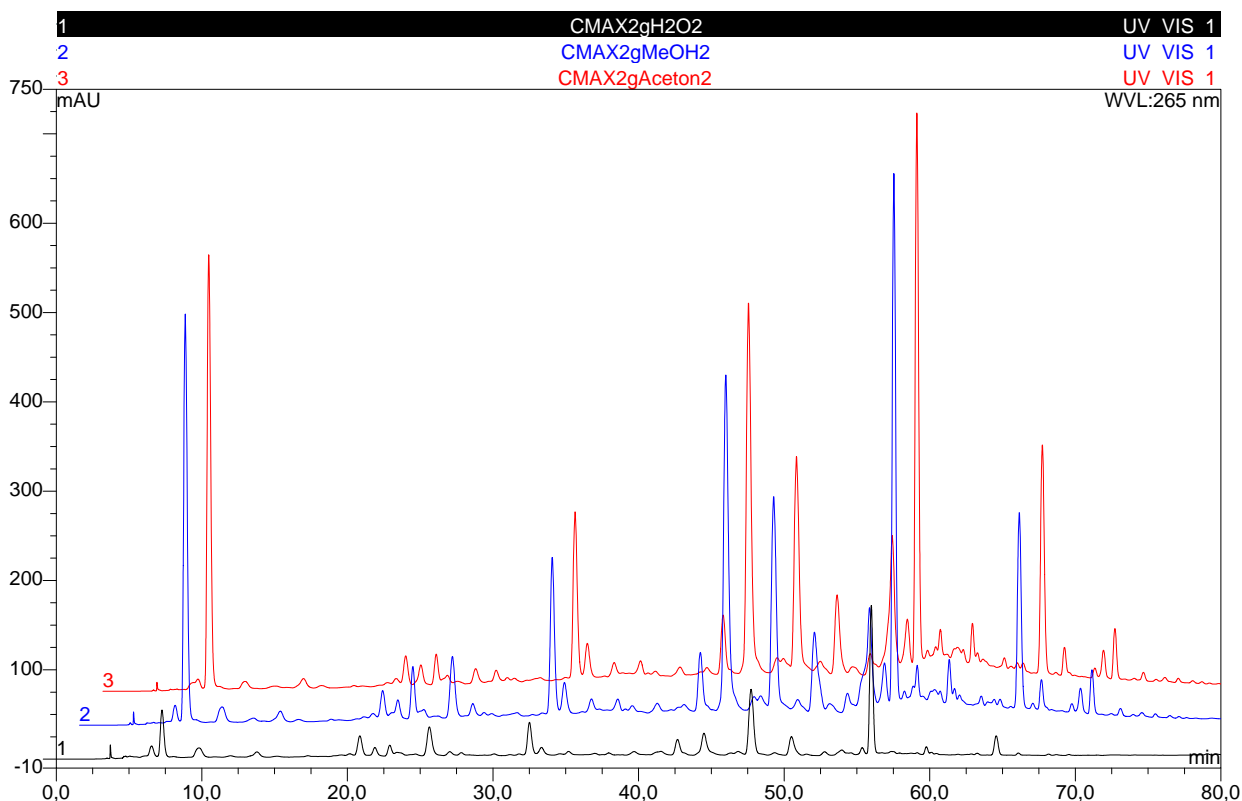


Abbildung 2.1-5: Vergleich der Extrakte von Caromax mit (1) Wasser, (2) MeOH/Wasser und (3) Aceton/Wasser

Bei der Verwendung des optimalen Lösungsmittelgemisches haben die anderen Parameter kaum noch einen Einfluss auf die Extraktionsausbeuten. Abbildung 2.1-6 zeigt die Abhängigkeit der Extraktionsausbeute von dem Verhältnis Aceton zu Wasser, welches als Gemisch verwendet wurde. Im Bereich einer geringen Zumischung von Aceton sowie im Bereich einer sehr geringen Wasserzumischung sind die Ausbeuten sehr niedrig. Erwartungsgemäß werden bei hohen Acetongehalten die lipophileren Analyten (Flavonolglykoside) bevorzugt extrahiert, während im stärker wässrigen Bereich die hydrophilen Analyten (hydrolysierbare Tannine) dominieren. Die für eine optimale Extraktion zu wählende Mischung liegt bei etwa 50%, wobei kein scharfes Maximum zu beobachten ist. Die Methode ist damit in Bezug auf die Lösungsmittelmischung recht robust. Da bei optimalem Lösungsmittelgemisch die anderen Parameter nur einen geringen Einfluss haben, ergibt sich insgesamt eine sehr robuste Extraktionsmethode.

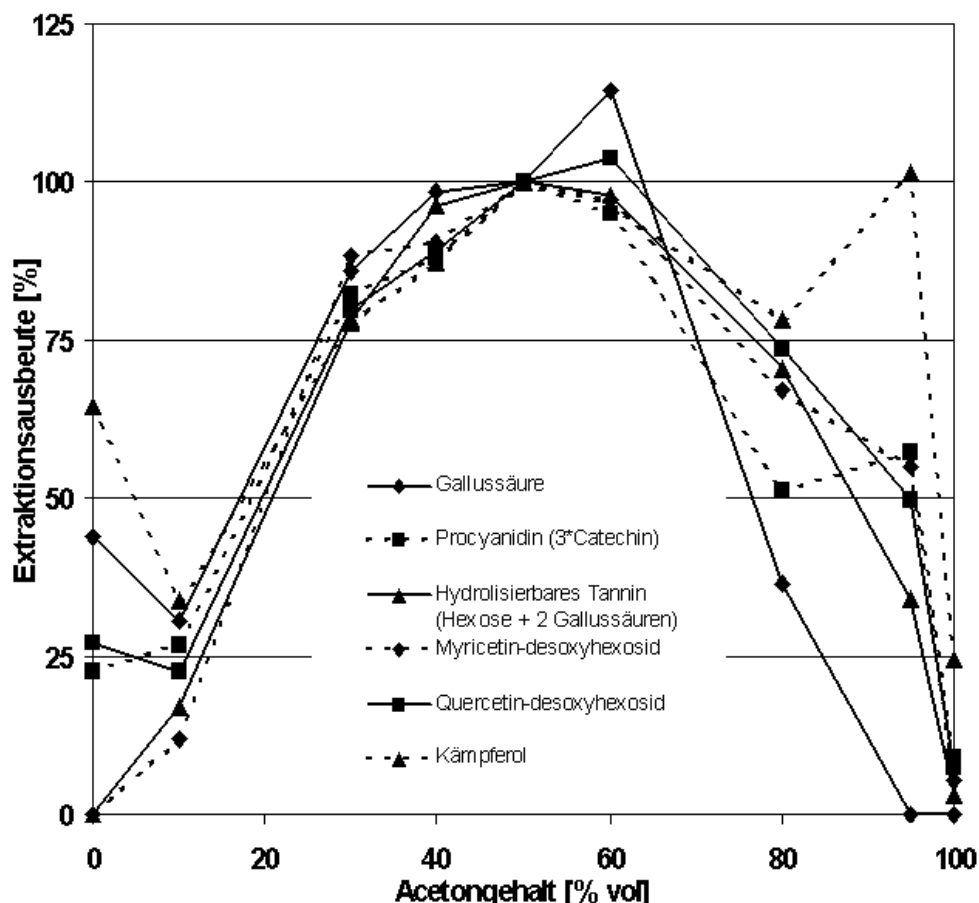


Abbildung 2.1-6: Extraktionsausbeute einzelner Polyphenole aus Caromax in Abhängigkeit vom Acetongehalt

Den zweitstärksten Effekt hat die **Extraktionstemperatur**, dieser Effekt ist aber nur signifikant, wenn nicht mit optimalen Lösungsmittelgemischen gearbeitet wird. Bei niedrigen Temperaturen verläuft die Extraktion unvollständig, bzw. es muss zur Verbesserung der Ausbeute eine längere Extraktionszeit gewählt werden. Bei zu hohen Temperaturen steigt die thermische Belastung und es kommt damit wieder zu einer Abnahme der Ausbeute. Mit dem optimalen Lösungsmittelgemisch ist kein signifikanter Einfluss der Temperatur zu beobachten. Im Gegensatz dazu spielt bei der ASE von Gerstenmalz die Temperatur, wie weiter oben geschildert, auch bei sonst optimalen Bedingungen eine Rolle. Es liegt nahe, dass dafür die Art der Probe, ein schon stark verarbeitetes, vorextrahiertes und damit schon „aufgeschlossenes“ Produkt, verantwortlich ist.

Der Effekt der **Extraktionszeit** auf die Ausbeute ist ebenfalls nur signifikant bei der Wahl eines nicht optimalen Lösungsmittelgemisches. Längere Extraktionszeiten führen erwartungsgemäß bei moderaten Temperaturen zu verbesserten Ausbeuten, bei höheren Temperaturen allerdings sinken die Ausbeuten bei längerer Extraktionszeit durch die dann

stärkere thermische Belastung. Auch hier liegt die Vermutung nahe, dass die Probenart für diesen Effekt verantwortlich ist.

Die **optimalen Einstellungen** für die Extraktion der Polyphenole aus Caromax mit der ASE sind eine Einwaage von 1 g für die eingesetzten 11 ml Zellen, eine Extraktion mit 50% vol Aceton in Wasser bei 60 °C für 5 min in zwei Extraktionszyklen, ein Nachspülen mit 50% des Zellvolumens und ein Spülen mit Stickstoff für 60 sec.

Die Unabhängigkeit der Ausbeuten von Temperatur und Extraktionszeit bei optimalem Lösungsmittel zeigt sich auch bei einem Vergleich der beschleunigten Lösungsmittelextraktion mit der manuellen Extraktion bei Raumtemperatur durch Rühren einer Suspension. Damit werden praktisch die gleichen Extraktionsergebnisse erreicht wie mit der beschleunigten Lösungsmittelextraktion. Dies ist allerdings bei Malz nicht der Fall, dort haben bei Wahl eines optimalen Lösungsmittelgemisches die Temperatur und die Zeit noch einen signifikanten Einfluss, und die mit der ASE erzielten Ausbeuten können manuell nur bei Mehrfachextraktion mit wesentlich größeren Lösungsmittelvolumina erreicht werden. Dies kann wohl auf die im Malz vorhandene quellfähige Stärke, die enthaltenen Proteine und andere Matrixkomponenten zurückgeführt werden. Caromax ist durch die vorherige wässrige Extraktion und das thermische Trocknen schon soweit vorbehandelt, dass kaum noch Kohlenhydrate enthalten sind und die Matrix „aufgeschlossen“ wurde. Bei der Extraktion von grünem Tee mit der beschleunigten Lösungsmittelextraktion hingegen, die hier nicht im Detail vorgestellt wird, hat neben der Wahl des Lösungsmittels die Vermahlung den größten Einfluss auf die Extraktionsausbeuten. Bei Vermahlen des Tees mit einer Kugelmühle bei Raumtemperatur oder unter Kühlung mit Stickstoff (man erhält ein deutlich feineres Pulver als ohne Stickstoffkühlung) können auch mit optimalem Lösungsmittelgemisch und mehrfacher Extraktion mit dem gröberen Pulver nicht die Ausbeuten an Flavanolen erreicht werden, die mit dem feinen Pulver erzielt werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass neben der Art der Analyten auch die Art und Beschaffenheit des Probenmaterials die Extraktion beeinflussen. Das bedeutet, dass die Erfahrungen mit der beschleunigten Lösungsmittelextraktion und die als optimal ermittelten Parameter als Ausgangspunkt für die Extraktion neuer Probenmaterialien genutzt werden können, dass aber jeweils eine kritische Überprüfung des Extraktionsergebnisses und eine eventuelle Optimierung der Extraktion bei neuen Proben oder Analyten notwendig sind.

## Fraktionierte Extraktion von Hopfenpellets

Eine mehrfache sequentielle Extraktion der gleichen Probe ist mit der ASE leicht durchführbar. Dies kann mit demselben oder bei Einsatz des Solvent Controllers auch mit verschiedenen Lösungsmitteln oder Lösungsmittelgemischen geschehen. Dadurch können einerseits Matrixbestandteile vor der Extraktion der Analyten abgetrennt werden, um die Weiterverarbeitung der Extrakte zu vereinfachen oder Störungen in der weiteren Analytik zu vermeiden. Andererseits können verschiedene Inhaltsstoffe der Probe bereits in diesem ersten Schritt der Probenaufarbeitung voneinander getrennt werden.

Pelletierter Hopfen (*Humulus lupulus* L.) ist ein Produkt, welches heute gegenüber den Hopfendolden von vielen Brauereien bevorzugt verwendet wird. Im pelletierten Hopfen sind die Lupulindrüsen des Hopfens mit den enthaltenen Bittersäuren angereichert, während das Blattmaterial abgereichert wurde. Die Hopfenpellets sind leichter zu lagern, besser haltbar und einfacherer zu dosieren als Doldenhopfen (KNORR UND KREMKOW 1972, VERZELE UND DE KEUKELEIRE 1991).

Bei der Extraktion der Polyphenole aus Hopfenpellets macht sich der hohe Anteil an Wachsen, Ölen und anderen lipophilen Bestandteilen störend bemerkbar. Unter den für Proanthocyanidine optimalen Extraktionsbedingungen werden diese Matrixbestandteile mitextrahiert, fallen aber beim Abkühlen des Extraktes und beim Senken des organischen Anteils im Extrakt wieder aus. Erst nach Zentrifugation und Filtration ist die Lösung dann für eine weitere Festphasenextraktion oder die direkte Analyse des Rohextraktes nutzbar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erprobt, inwieweit mit der ASE eine Abtrennung dieser störenden Matrixkomponenten durch eine Vorextraktion mit einem lipophilen Lösungsmittel möglich ist. Als Lösungsmittel wurde Pentan gewählt, da dieses bei Raumtemperatur flüssig aber gleichzeitig gut flüchtig ist und sich nach der Vorextraktion damit auch rasch und nahezu vollständig wieder aus der Probe entfernen lässt.

Abbildung 2.1-7 zeigt einen Vergleich der Chromatogramme von Hopfenpellets nach Extraktion mit der ASE mit Pentan bzw. Aceton/Wasser. Gezeigt ist der Bereich des Chromatogrammes, in dem die lipophileren Bestandteile, wie die Humulone und Lupulone, aber auch Xanthohumol und Isoxanthohumol eluieren. Diese lipophilen Bestandteile können erfolgreich durch die Pentanextraktion abgetrennt werden und führen so bei der Weiterverarbeitung der Aceton/Wasser-Extrakte nicht mehr zu Problemen.

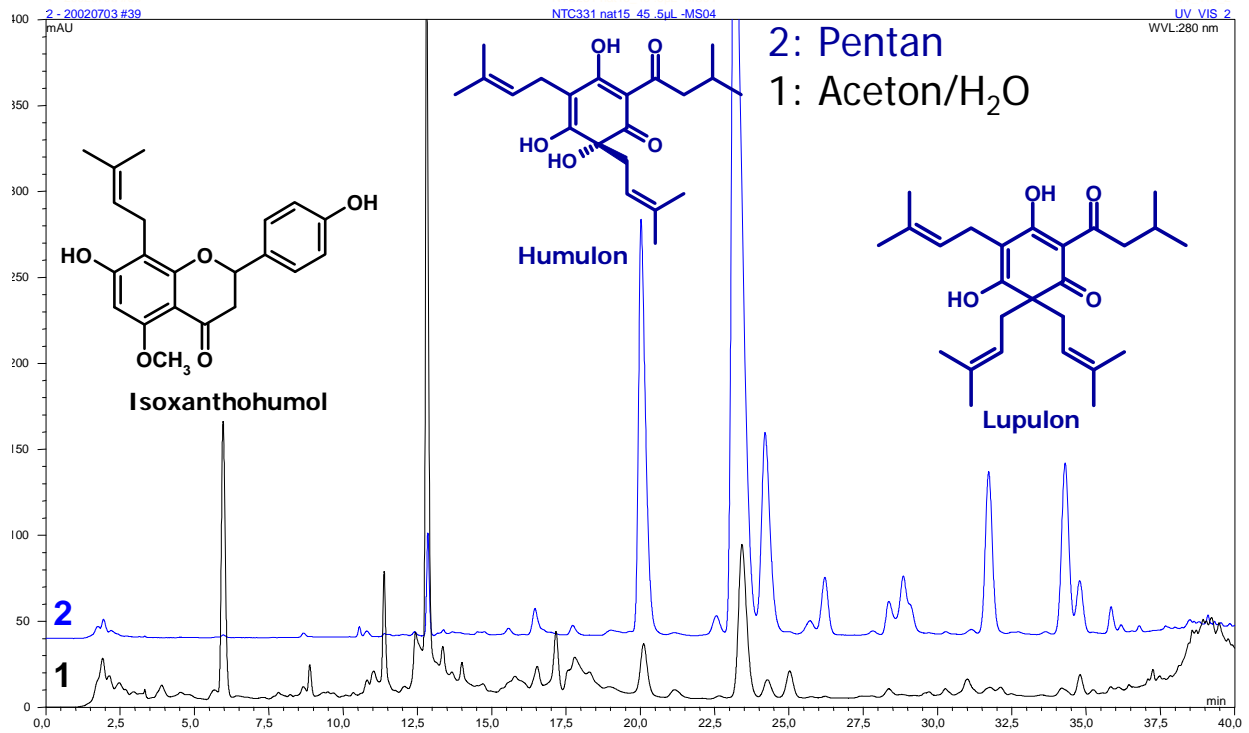


Abbildung 2.1-7: Vergleich von Hopfenpellet-Extrakten mit (1) Aceton/Wasser und (2) Pentan



### **Fraktionierte Extraktion von Gerstenmalz**

Auch für Gerstenmalz kann die fraktionierte Extraktion verwendet werden, um durch eine Vorextraktion mit Pentan lipophile Begleitstoffe (z.B. Keimöl und hydrophobe Proteine wie die Hordeine) zu entfernen. Diese werden bei der Extraktion der Proanthocyanidine mit 80 % vol Aceton in Wasser mitextrahiert, führen aber beim Abkühlen des Extraktes oder beim Senken des Acetongehaltes durch Zumischen von Wasser oder Einengen im Vakuum zur Trübung des Extraktes und fallen bei längerem Stehen der Probe aus, so dass sie vor einer weiteren Festphasenextraktion entfernt werden müssen, wenn der Extrakt nicht sofort weiterverarbeitet wird. Zwar bringt die Vorextraktion keinen direkten Vorteil für die Trennung und Detektion, verbessert aber die Verarbeitung der Extrakte in der Festphasenextraktion erheblich.

Eine Vorextraktion mit Wasser, um polare Stoffe wie Zucker oder Stärke zu entfernen, erwies sich als nicht durchführbar. Die Extraktion mit Wasser führt generell zu einem sehr starken Quellen der Probe, so dass die Einwage deutlich gesenkt werden muss, um ein Verstopfen der Extraktionszelle und damit einen Abbruch der Extraktion durch das Gerät zu verhindern. Bei einer kalten Extraktion werden keine nennenswerten Mengen an Matrixbestandteilen extrahiert, da die Stärke erst bei höheren Temperaturen gelöst wird. Eine rein wässrige Extraktion bei erhöhter Temperatur löst allerdings quantitative bedeutende Mengen der Proanthocyanidine, so dass diese bei einer etwaigen Vorextraktion verloren gehen.



## 2.2 – Ergebnisse und Diskussion – Festphasenextraktion

### Grundlagen und Anforderungen

Die Konzentrationen der Polyphenole in den Probenmaterialien sind meist gering und eine auf Selektivität optimierte Extraktion führt zu Matrixkomponenten in den Rohextrakten. Dies macht vor der eigentlichen analytischen Trennung und Messung in der Regel einen weiteren Arbeitsschritt nötig, der die Analyten von der Matrix trennt und konzentriertere Lösungen liefert.

Die Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) ist eine leistungsfähige Methode zur Anreicherung von Analyten und zur Abtrennung von Matrixkomponenten durch Adsorption an einem festen Phasenmaterial. Vom Prinzip her entspricht die Festphasenextraktion der Flüssigchromatographie, es wird aber nicht eine gute Trennung einzelner Analyten voneinander angestrebt sondern in erster Linie die Abtrennung unerwünschter Inhaltsstoffe von den interessierenden Analyten. Die in der Probe vorhandenen Analyten sollen nach der SPE vollständig und ohne Veränderung erhalten werden. In der Regel wird zunächst eine Adsorption der Analyten an der stationären Phase angestrebt, während die Matrixkomponenten nicht an das Material binden sollen. Nach dem Auftragen der Probe und dem Waschen des Adsorbens, um restliche Matrixbestandteile zu entfernen, werden die Analyten dann mit einem geeigneten Lösungsmittel, meist mit einem deutlich kleineren Volumen als beim Auftragen, wieder desorbiert. In diesem Fall sollte das verwendete Material eine möglichst selektive Wechselwirkung mit den Analyten eingehen können. Es kann aber auch im umgekehrten Fall eine Adsorption der Matrix angestrebt werden, während die Analyten keine Wechselwirkung mit dem Festphasenmaterial zeigen (eine Art Filtration). In letzterem Fall erfolgt allerdings keine Steigerung der Konzentration der Analyten. Natürlich lassen sich auch beide Varianten sequentiell kombinieren.

Im Gegensatz zur Flüssig-Flüssig-Extraktion, die ebenfalls zur Konzentrierung und Matrixabtrennung verwendet werden kann, sind in der Regel für die Festphasenextraktion wesentlich geringere Lösungsmittelvolumina erforderlich. Außerdem kann mit entsprechenden Geräten die Festphasenextraktion automatisiert durchgeführt werden und lässt sich mit anderen analytischen Verfahren, wie z.B. der beschleunigten Lösungsmittlextraktion und der HPLC, wie weiter unten beschrieben, direkt koppeln.

Für die Festphasenextraktion von Polyphenolen wurden in der Literatur verschiedene Adsorbentien und Lösungsmittel beschrieben. Eines der am häufigsten verwendeten Materialien

ist Polyamid, das durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen phenolische Stoffe gut bindet (MABRY ET AL. 1970). Dabei bietet es eine gute Selektivität für Polyphenole, allerdings werden auch andere Substanzen, die Wasserstoffbrücken ausbilden können, adsorbiert, und es kommt zu einer Adsorption aufgrund hydrophober Wechselwirkungen zwischen gelösten Substanzen und den die Amidgruppen verbindenden Alkylketten oder anderen lipophilen Strukturen. Für einige Flavonoidgruppen (Flavanoglykoside, Flavonglykoside, Anthocyane) erreicht man allerdings mit reversed-phase Materialien bessere Ergebnisse (KRAEMER-SCHAFHALTER ET AL. 1998, GEL-MORETÓ 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Festphasenextraktion neben dem bewährten Polyamid verschiedene neu auf den Markt gebrachte Adsorbentien getestet, die besonders für die Festphasenextraktion von hydrophilen Substanzen ausgelegt sind. Die Bedingungen für das Konditionieren der Kartuschen, das Auftragen der Probe und das Eluieren sowie verschiedene mögliche Einflussfaktoren (Temperatur, Matrixkomponenten, Viskosität, Fließgeschwindigkeit, Ionenstärke, pH-Wert) wurden detailliert untersucht. Ein Schwerpunkt der Untersuchungen lag auf der Kompatibilität der Extraktion, der Festphasenextraktion und der nachfolgenden chromatographischen Trennung, um eine automatisierte, gekoppelte Analytik zu etablieren. Dafür wurde eine bisher für die Proanthocyanidinanalytik verwendete Methode miniaturisiert und von handgefüllten Polyamidsäulen auf kommerzielle Kartuschen umgestellt. Darüber hinaus sollten die Einflussfaktoren der Festphasenextraktion charakterisiert werden, um daraus Strategien für präparative Arbeiten abzuleiten.

### **Charakterisierung der Festphasenextraktion**

Die Festphasenextraktion wurde zunächst mit Hilfe erhältlicher Referenzverbindungen eingehend untersucht, leider stand dafür aber nur eine sehr begrenzte Zahl an Substanzen zur Verfügung. Die gewählten Verbindungen repräsentieren dabei Phenolcarbonsäuren und verschiedene Untergruppen der Flavonoide. Die Untersuchungen wurden mit manueller Festphasenextraktion an einem entsprechenden „Trog“ durchgeführt, so dass die Lösungen durch die Kartuschen durchgesaugt wurden. Die Kartuschen wurden konditioniert, ein Mischstandard wurde portionsweise auf die Kartuschen aufgetragen, die Kartuschen gewaschen und fraktioniert eluiert. Alle eluierenden Lösungen wurden aufgefangen und die darin enthaltenen Substanzen durch HPLC-Messungen quantifiziert. Abbildung 2.2-1 zeigt ein typisches Chromatogramm der Referenzmischung. Dadurch lässt sich das Verhalten der Substanzen auf der Kartusche unter den verschiedenen gewählten Bedingungen quantitativ beschreiben.

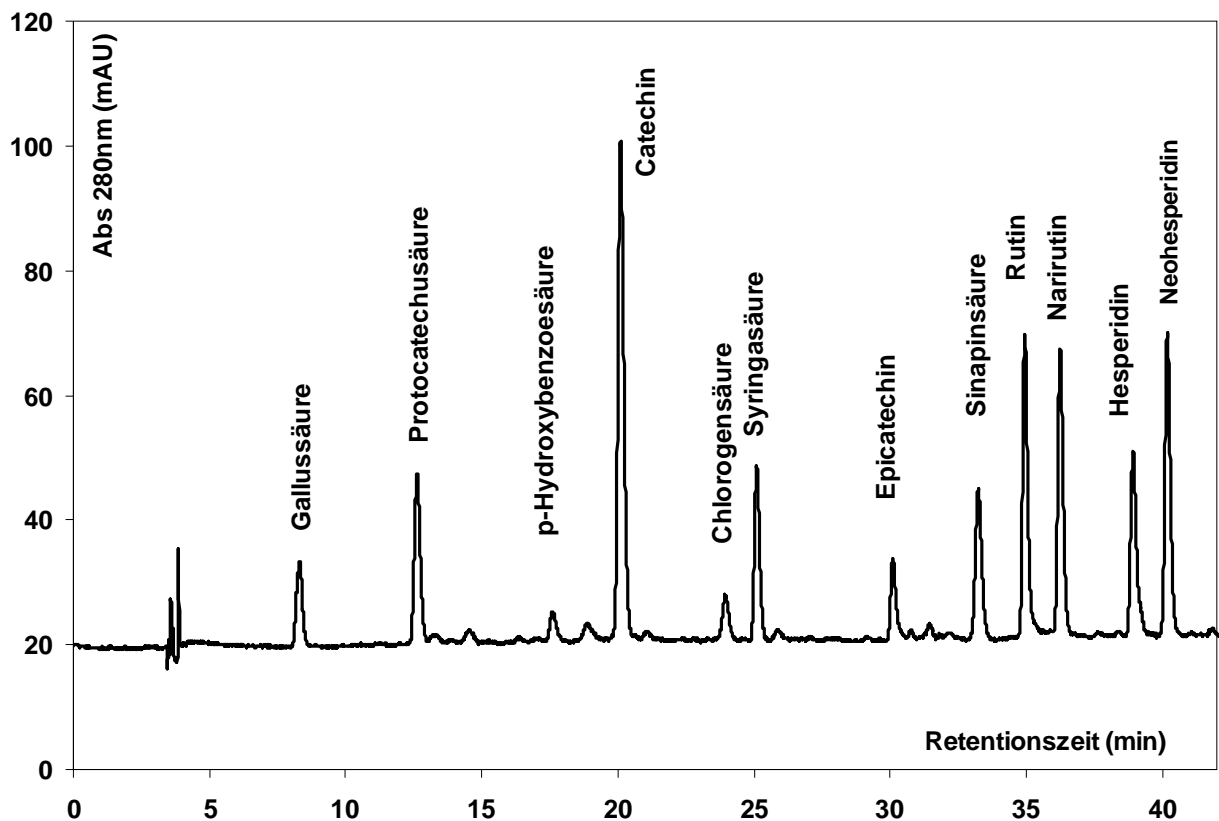


Abbildung 2.2-1: Typisches Chromatogramm der Referenzmischung mit Zuordnung der Peaks

### Verschiedene Phasenmaterialien

Zum Einsatz kamen sowohl Polyamid als auch verschiedene organische Harze (Styrol-Divinylbenzol-Harze) und auf Silica basierende reversed-phase Materialien verschiedener Hersteller, die für hydrophile Substanzen optimiert sind. Die Kartuschen wurden konditioniert (siehe Abschnitt 3-Material und Methoden), aufgetragen wurde die Mischung der Standardverbindungen mit 10% vol Aceton, da eine gewisse Toleranz der Materialien für einen geringen Anteil organischen Lösungsmittels (z.B. als Rest aus der Extraktion) für diese Arbeit verlangt wurde. Dadurch lässt sich statt einer aufwendigen Entfernung des organischen Lösungsmittels aus den Rohextrakten sein Anteil durch Verdünnen mit Wasser genügend senken.

Die Materialien unterscheiden sich deutlich sowohl beim Auftragen der Substanzen als auch beim Eluieren und damit auch in den erreichbaren Wiederfindungen. Innerhalb der beiden Gruppen „silicabasierte Phasen“ und „organische Harze“ waren die Unterschiede gering, während bei den verschiedenen Polyamiden deutliche Unterschiede sichtbar waren. Die Abbildungen 2.2-2 bis 2.2-6 zeigen Chromatogramme der Elutionsfraktionen von je einer Silica

C18 und einer organischen Harz-Kartusche, sowie von drei verschiedenen Polyamiden (PVPP Divergan, BASF; DPA-6S, Supelco; Polyamid, Macherey-Nagel).

Auf den **silicabasierten reversed-phase Materialien** (Abbildung 2.2-2) waren generell schlechte Wiederfindungen zu beobachten, da die Substanzen bis auf die Flavanonglykoside schon beim Auftragen stark durchbrachen. Durch Vergleichsuntersuchungen ohne Zusatz von 10% vol Aceton in der Auftragslösung konnte ermittelt werden, dass dafür, ausser bei den hydrophilsten Verbindungen (Gallussäure und Protocatechusäure), der organische Lösungsmittelanteil verantwortlich war. Die Elution der adsorbierten Substanzen erfolgte in einer einzigen Fraktion, ist also mit einem sehr geringen Lösungsmittelvolumen möglich. Diese Materialien eignen sich daher nicht für die angestrebte Analytik, sind aber zur selektiven Trennung einzelner Polyphenole sowie zur Festphasenextraktion der lipophileren Flavanonglykoside geeignet.

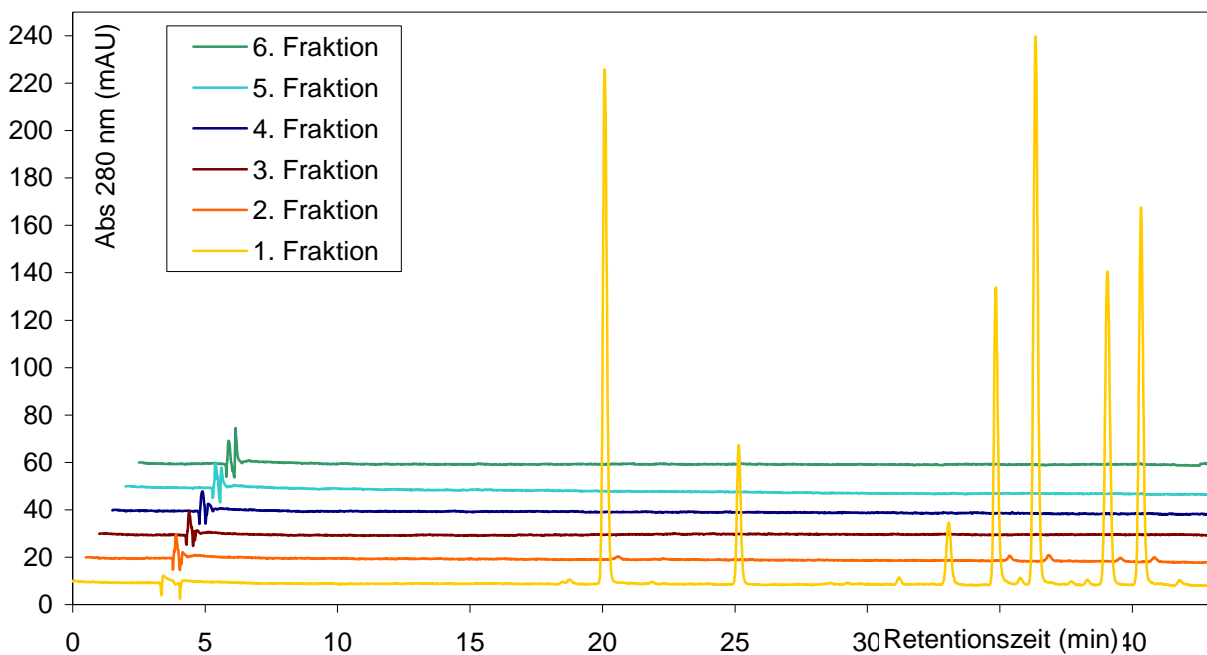


Abbildung 2.2-2: Chromatogramme der Elutionsfraktionen der Referenzlösung von reversed-phase Material (Chromabond C18 ec)

Die **organischen Harze** (Abbildung 2.2-3) zeigten ebenfalls einen Durchbruch vieler Substanzen beim Auftragen, insbesondere der Säuren, und damit schlechte Wiederfindungen. Auch hier ist der organische Lösungsmittelanteil hauptverantwortlich. Die Elution der adsorbierten Substanzen erfolgte im Gegensatz zu den silicabasierten Materialien in mehreren Fraktionen, es ist also ein größeres Lösungsmittelvolumen erforderlich. Diese Materialien eignen sich daher nicht für die in dieser Arbeit angestrebte Analytik, sind aber ebenfalls zur selektiven

Trennung einzelner Polyphenole geeignet. Durch die schlechteren Elutionseigenschaften der Harze sind allerdings die silicabasierten reversed-phase Materialien vorzuziehen.

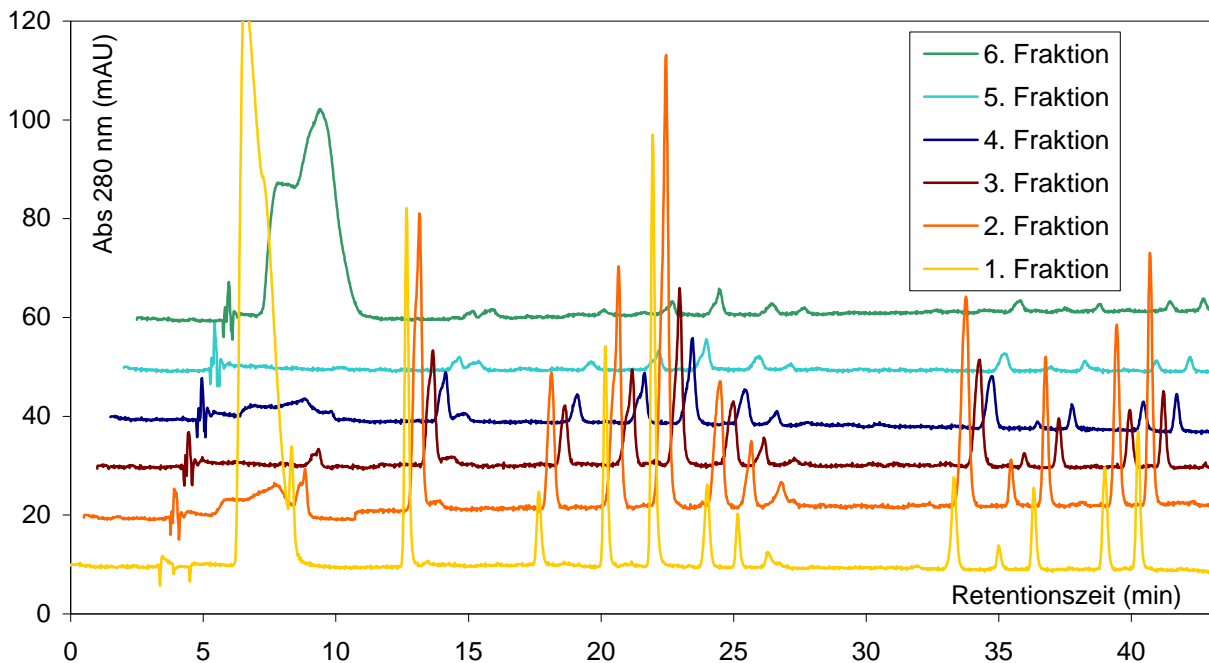


Abbildung 2.2-3: Chromatogramme der Elutionsfraktionen der Referenzlösung von organischem Harz (HRP)

Die Optimierung der silicabasierten reversed-phase Materialien und der organischen Harze für die Festphasenextraktion hydrophiler Substanzen verbessert zwar das Verhalten des Adsorbens bei stark wässrigen Bedingungen, kann aber die Retention bei geringen organischen Lösungsmittelanteilen nicht maßgeblich steigern.

Die **Polyamide** (Abbildungen 2.2-4 bis 2.2-6) zeigen untereinander deutlichere Unterschiede als die beiden anderen Gruppen. Das Problem des Durchbruchs ist hier geringer, nur die Flavanoglykoside sind davon signifikant betroffen. Polyamide eignen sich damit für die Hauptanalyten der vorliegende Arbeit am besten. Die Elution erfolgt hier auch in mehreren Fraktionen, das Polyamidmaterial der Firma Macherey-Nagel, ein feinvermahlendes Nylon 6-6, zeigt das günstigste Verhalten durch das für eine vollständige Elution kleinste erforderliche Volumen. Für die Polyamide wurden aber nicht nur deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Materialien beobachtet, sondern auch chargenabhängiges Verhalten, wie dies aus früheren Arbeiten bekannt ist (SIEWEK 1984, ROEDER 1997, PÄTZOLD 1999, FRIEDRICH 2000). Daher sollte jede Charge vor Gebrauch auf ihre Eignung für die zu bearbeitende Fragestellung geprüft werden.

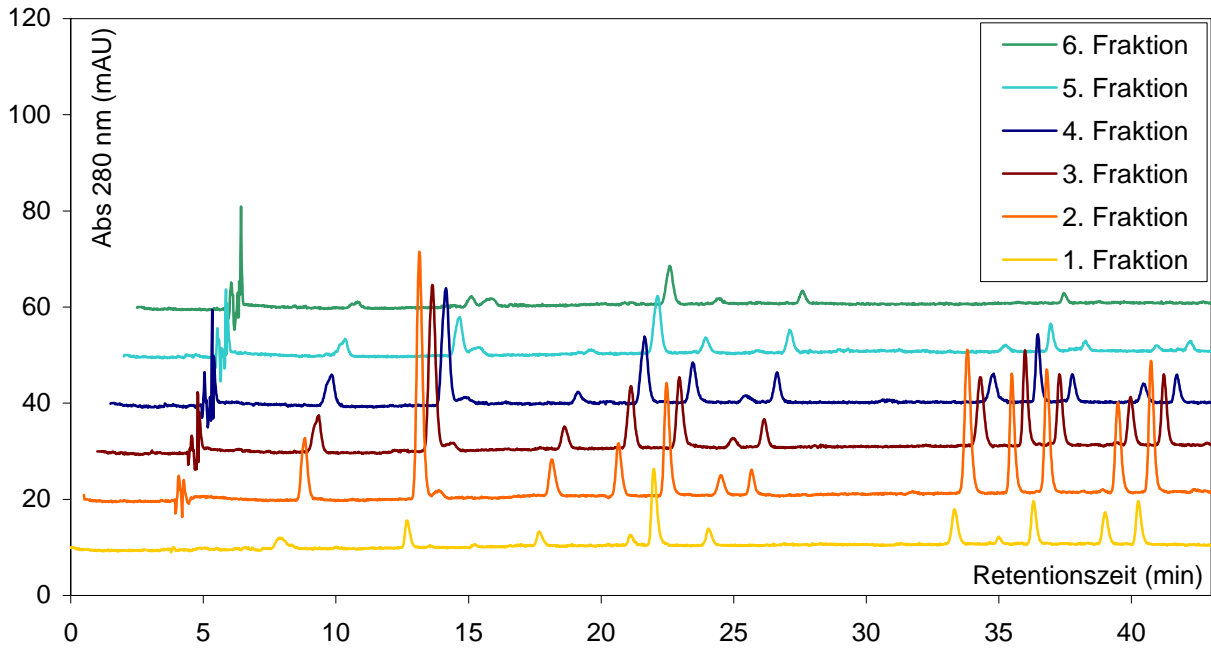


Abbildung 2.2-4: Chromatogramme der Elutionsfraktionen der Referenzlösung von PVPP Divergan (BASF)

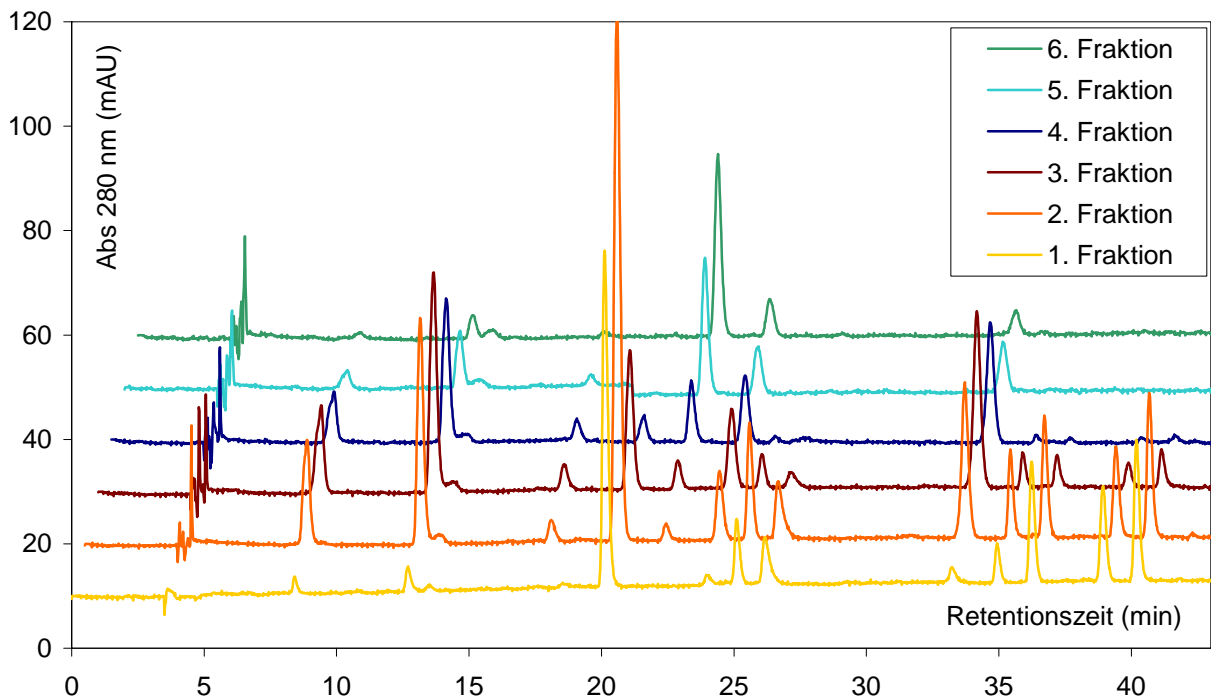


Abbildung 2.2-5: Chromatogramme der Elutionsfraktionen der Referenzlösung von DPS-6S (Supelco)



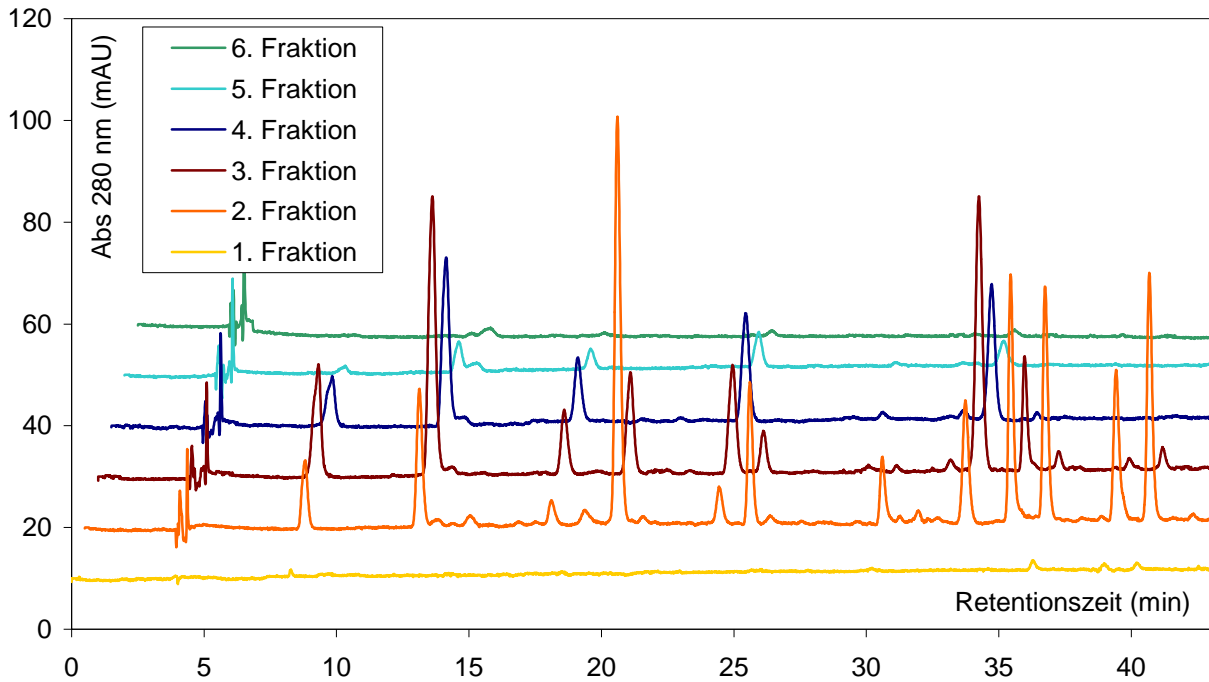


Abbildung 2.2-6: Chromatogramme der Elutionsfraktionen der Referenzlösung von Polyamid (Macherey-Nagel)

Da sich aus den Versuchen mit den verschiedenen Phasen das Polyamidmaterial der Firma Macherey-Nagel als das beste erwies, wurden die weiteren Untersuchungen zur Festphasenextraktion mit diesem Material durchgeführt.

### **Auftragen auf Polyamid mit organischem Lösungsmittelanteil**

Um eine vollständige Adsorption der Analyten an der stationären Phase beim Auftragen der Probe und damit eine gute Wiederfindung zu gewährleisten, sollte die Probelösung keine oder nur sehr geringe Elutionskraft haben. Das bedeutet, dass an die Zusammensetzung der Probelösung besondere Anforderungen gestellt werden müssen. Einerseits ist das Lösungsmittel von Bedeutung, das zwar die Analyten gut lösen soll, aber die Wechselwirkung zwischen Analyten und stationärer Phase nicht behindern darf. Andererseits können enthaltene Matrixkomponenten die Adsorption beeinflussen, wenn sie mit Analyten wechselwirken können und so in Konkurrenz zum Adsorbens treten. Bei der Methodenentwicklung und -optimierung muss dementsprechend geprüft werden, ob die Bedingungen beim Auftragen der Probe eine vollständige aber reversible Adsorption der Analyten zulassen.

Ein besonderer Schwerpunkt lag bei diesen Untersuchungen auf dem Einfluss organischer Lösungsmittel als Bestandteil der Auftragslösung, da wie beschrieben die Extraktion der Proanthocyanidine und auch anderer Polyphenole in der Regel mit wässrig-organischen Lösungsmittelgemischen erfolgt. Die meisten in der Literatur beschriebenen Proben-vorbereitungsverfahren entfernen nach der Extraktion das organische Lösungsmittel vollständig, z.B. durch Verdampfen am Rotavapor oder durch Gefriertrocknung (NACZK UND SHAHIDI 2004). Die Nachteile dieses Vorgehens sind die zeitintensiven Arbeitsschritte, die z.B. durch thermische oder oxidative Belastung die Probe verändern können und insbesondere nicht für eine gekoppelte, automatisierte Analytik geeignet sind.

Dementsprechend wurde in dieser Arbeit getestet, welchen Einfluss ein gewisser Anteil organischer Lösungsmittel in der Auftragslösung auf die Adsorption der Analyten am Festphasenmaterial hat. Als organische Lösungsmittel wurden Aceton und DMF bis 40% vol gewählt, da diese sich am besten als Extraktionsmittel für feste Proben respektive Elutionsmittel für die Festphasenextraktion an Polyamid eignen. Der Unterschied zwischen Aceton und DMF ist in Bezug auf die Wiederfindungen gering, allerdings kann mit 30% vol Aceton aufgetragen werden, ohne dass ein Durchbruch (mit Ausnahme der Flavanonglykoside) beobachtet wird, während mehr als 20% vol DMF einen Durchbruch erzeugen. Mit 40% vol Aceton bzw. 30% vol DMF beginnen die Polyphenole durchzubrechen, so dass keine guten Wiederfindungen mehr erreicht werden. Die Substanzen sind dabei unterschiedlich stark betroffen. Abbildung 2.2-7 zeigt als Beispiel den Durchbruch der Referenzverbindungen beim Auftragen mit verschiedenen Gehalten DMF in der Auftragslösung. Als erste zeigen bei steigendem Lösungsmittelgehalt Catechin und Epicatechin einen Durchbruch, während die Phenolcarbonsäuren erst bei höheren Gehalten betroffen sind. Epigallocatechingallat hingegen zeigt auch bei 40% vol DMF noch eine komplette Retention auf dem Polyamid.

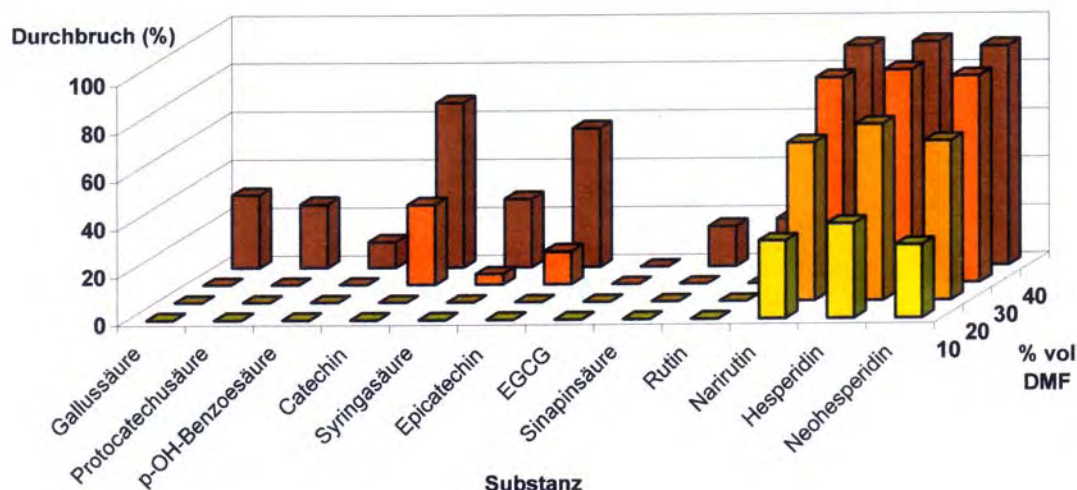


Abbildung 2.2-7: Durchbruch der Referenzsubstanzen auf Polyamid (Macherey-Nagel) in Abhängigkeit vom DMF-Gehalt der Auftragslösung

Dies bedeutet, dass das Auftragen der Probelösungen auf Polyamid mit bis zu 30% vol Aceton noch eine vollständige Adsorption und somit gute Wiederfindung ermöglicht. Damit wird es möglich, nach der Extraktion der Polyphenole mit Aceton-Wasser-Gemischen noch einen Anteil Aceton in der Lösung zu belassen, indem entweder nur ein Teil des Acetons entfernt oder der Extrakt mit Wasser verdünnt wird (siehe Abschnitt 2.2 – Kopplung von ASE und ASPEC, Seite 60).

### Elution und fraktionierte Elution von Polyamid

Die Elution der Referenzverbindungen von Polyamid hängt vom Elutionsmittel und von der Struktur der Substanzen ab. Abbildung 2.2-8 zeigt die Konzentrationen der Standards in den einzelnen Elutionsfraktionen bei einer Elution mit 85% vol DMF in Wasser. Während die Phenolcarbonsäuren einen recht breiten Elutionspeak zeigen, werden die Flavonoide fast vollständig in einer Fraktion, d.h. mit einem kleineren Lösungsmittelvolumen eluiert. Mit Ausnahme von Gallussäure eluieren die Säuren später als die Flavonoide. Dies ließe sich nach weiterer Untersuchung, insbesondere bei Verwendung längerer Polyamidsäulen, zur Trennung der Phenolcarbonsäuren und der Flavonoide nutzen.

Das organische Lösungsmittel in der Auftragslösung hat auch einen Einfluss auf die Elution der Verbindungen. Je höher der organische Anteil ist, desto eher werden die Verbindungen eluiert, d.h. sie eluieren schon in früheren Fraktionen bzw. mit geringeren Volumina. Der Effekt ist signifikant, aber nicht besonders ausgeprägt, zumindest nicht bei diesen Untersuchungen mit

Standardsubstanzen und ohne Matrixkomponenten. Dies erklärt sich durch die Retention der Analyten auf dem Kartuschenmaterial. Je höher der organische Lösungsmittelanteil in der Auftragslösung ist, desto weiter wandern die Substanzen beim Auftragen bereits in die Kartusche, da die Retention vermindert ist. Dies ist analog zur Verringerung der Retention bei der Gradientenelution in der reversed-phase Chromatographie.

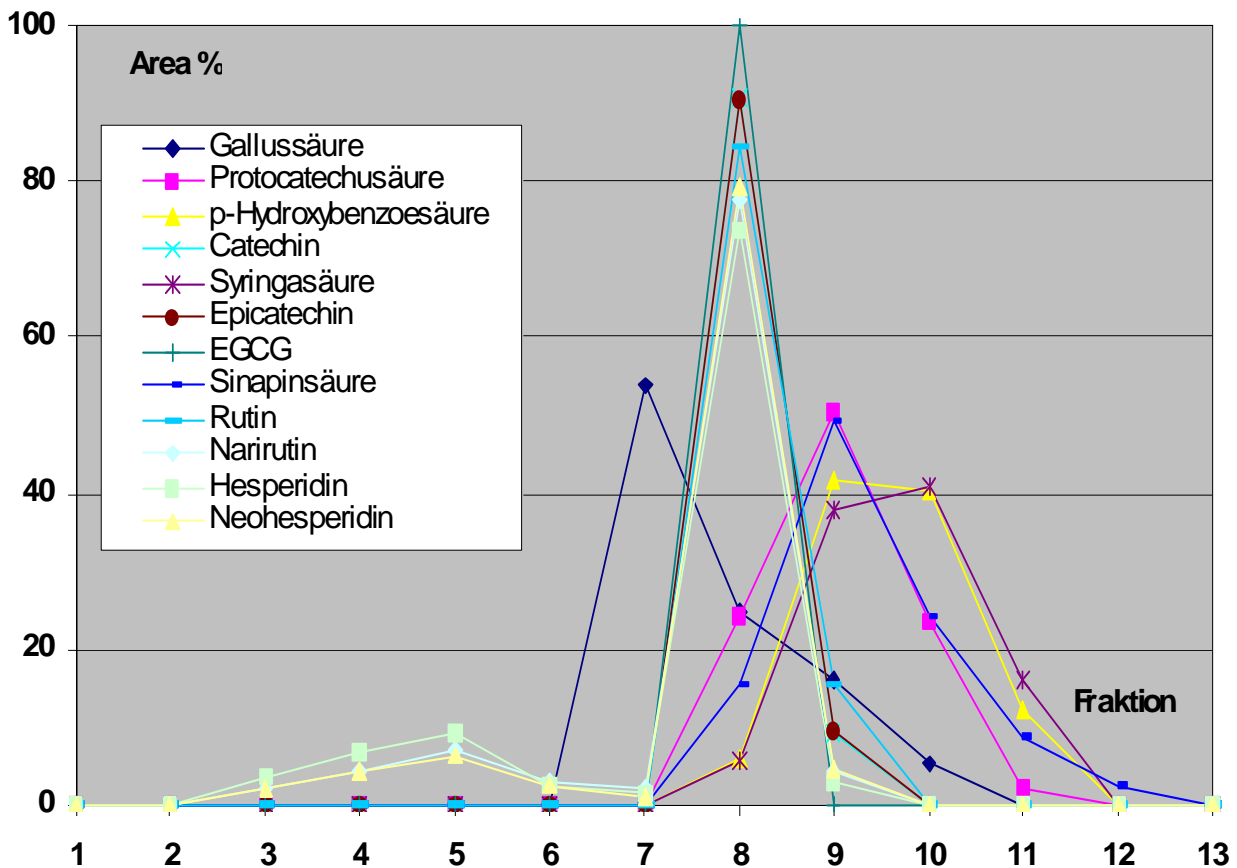


Abbildung 2.2-8: Fraktioniertes Auftragen (1-5), Waschen (6) und Eluieren (7-13) einer Referenzmischung an Polyamid (Macherey-Nagel)

## Weitere Parameter

Neben der Untersuchung verschiedener Adsorbentien sowie der Auftrags- und der Elutionsbedingungen wurden weitere Parameter getestet, die die Festphasenextraktion möglicherweise beeinflussen.

Vielfach wird bei der Festphasenextraktion das „**Trockensaugen**“ vermieden, d.h. es wird jeweils ein minimaler Flüssigkeitsrest über dem Phasenmaterial belassen, um das Adsorbens

ständig benetzt zu lassen und das Eindringen von Luft ins Säulenbett zu verhindern. Dies könnte das Adsorptions- und Elutionsverhalten der Analyten ungünstig beeinflussen. Bei den durchgeführten Untersuchungen wurde bei keinem der getesteten Materialien, und weder bei Verwendung einer manuellen Festphasenextraktion (durch Saugen an einem entsprechenden „Trog“) noch bei der automatisierten Festphasenextraktion durch Drücken, ein negativer Einfluss des „Trockensaugens“ oder „Trockendrückens“ beobachtet. Bei der automatisierten Festphasenextraktion ist das „Trockendrücken“ das Standardverfahren; nur so kann bei unterschiedlichen Viskositäten eine gleichbleibende Festphasenextraktion gewährleistet werden.

Das **Konditionieren** des Adsorbens vor dem Auftragen der Probe dient der Benetzung und eventuell dem Quellen des Materials. Für Polyamid wurde das Konditionieren detaillierter untersucht, um einen eventuellen Einfluss auf die Adsorption der Analyten durch unterschiedliche Konditionierung zu ermitteln. Polyamidkartuschen wurden unterschiedlich lang (zwischen 5 und 75 Minuten) mit Wasser, 50% vol Methanol in Wasser, 50% vol Aceton in Wasser oder 50% vol DMF in Wasser konditioniert. Es war kein signifikanter Einfluss der Konditionierung auf die Adsorption der Analyten feststellbar. Allerdings lösen sich durch organische Lösungsmittel Oligomere aus dem Polyamid (Reste der Kunststoffherstellung), die zwar nicht in der UV-Detektion sichtbar sind, aber bei massenspektrometrischer Detektion im Chromatogramm auftauchen. Abbildung 2.2-9 zeigt das Chromatogramm von zum Konditionieren genutzten DMF nach Detektion im Massenspektrometer und ein dazugehöriges Fragmentspektrum als Beispiel (der in der massenspektrometrischen Fragmentierung detektierte neutral loss von 113 entspricht dem Monomeren des Polyamids). Um diese Interferenzen in den Chromatogrammen so weit wie möglich zu reduzieren und ein Waschen des Polyamids bei mehrfacher Nutzung einer Kartusche sicherzustellen, wurde für die weiteren Arbeiten zum Konditionieren jeweils das zum Eluieren genutzte Lösungsmittel gewählt.

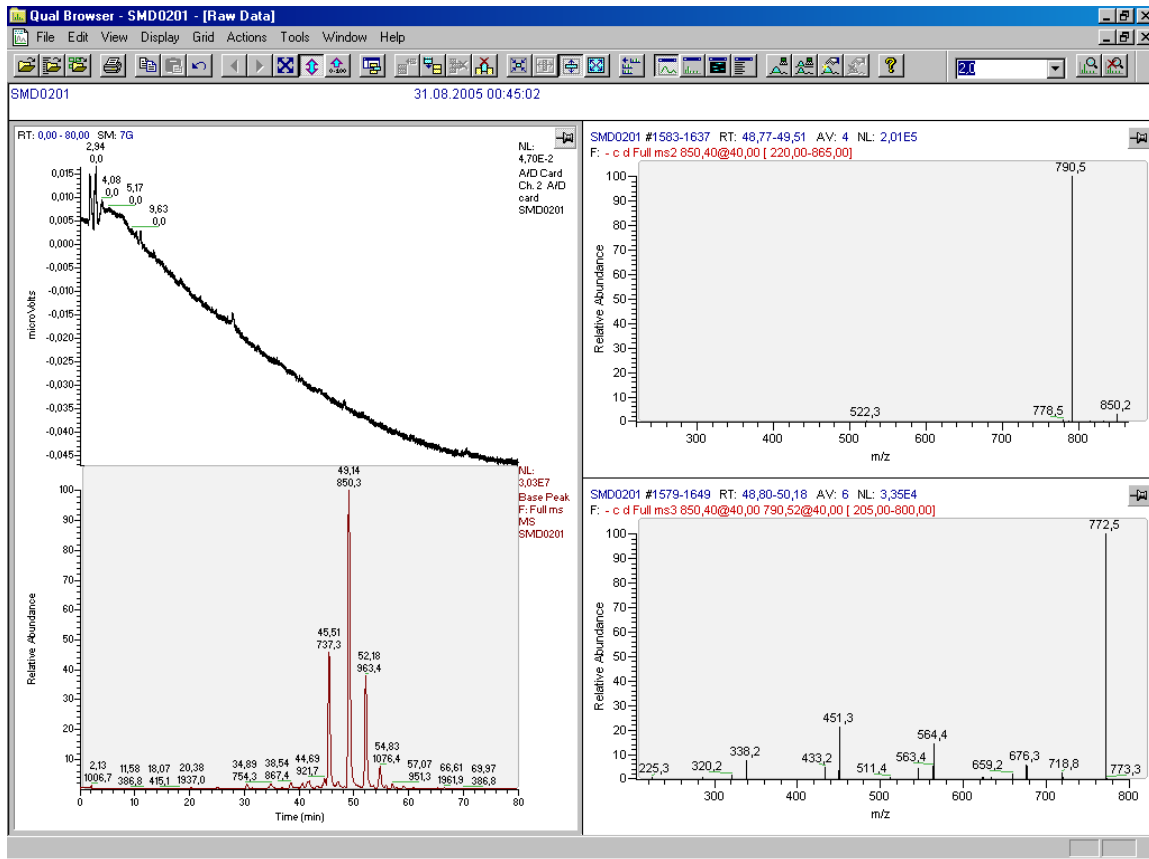


Abbildung 2.2-9: Chromatogramm von zum Konditionieren genutzten DMF. Links oben: UV-Signal bei 280 nm. Links unten: BasePeak Darstellung des MS-Signals. Rechts: oben MS2- und unten MS3-Fragmentspektren des Peaks mit m/z 850,3 bei 49,1 min

Ein **Temperatureinfluss** auf die Adsorption bei Festphasenextraktion mit auf 0 °C und 40 °C temperierten Lösungen ließ sich nicht feststellen. Dafür ist vermutlich die unter den gewählten Bedingungen sehr gute Adsorption der Analyten verantwortlich.

Um den Einfluss von **Matrixbestandteilen und von Zusätzen zur Auftragslösung** zu testen, wurden Untersuchungen mit Zusatz von Saccharose zur Erhöhung der Viskosität, NaCl zur Erhöhung der Ionenstärke, Essigsäure, Ameisensäure und Natronlauge für verschiedene pH-Werte und Ascorbinsäure als Antioxidans durchgeführt. Außerdem wurden ASE-Extrakte der Malzsorte Caminant (proanthocyanidinarme Gerstensorte) mit der Standardmischung dotiert, um die Adsorption der Substanzen in wässriger Lösung und in einem Malzextrakt zu vergleichen. Nur beim pH-Wert zeigte sich ein signifikanter Einfluss auf die Adsorption. Ein pH-Wert über 5,5 wirkte sich generell negativ auf die Adsorption aus. Ein saurer pH-Wert verbessert die Adsorption insbesondere der Flavonolglykoside beim Auftragen größerer Probenvolumina. So wurden für die späteren Versuche die Brauprozessproben mit Ameisensäure und Ascorbinsäure versetzt, um enzymatische und oxidative Einflüsse zu minimieren.

## **Eigenschaften und Vorteile der automatisierten Festphasenextraktion**

Die Festphasenextraktion lässt sich mit Hilfe geeigneter Geräte automatisiert durchführen. In dieser Arbeit wurde ein ASPEC XLi der Firma Gilson verwendet. Abbildung 2.1-1 (Seite 33) zeigt ein Bild des Gerätes im Labor.

Auf einer Arbeitsplatte werden die Proben sowie die verwendeten Lösungsmittel bereitgestellt. In einem verschiebbaren Kunststoffblock stecken die Kartuschen, die je nach Bedarf über einer Abfallstation (zum Konditionieren, Auftragen und Waschen) oder über den Eluatgefäßen (zum Auffangen des resultierenden Eluats) positioniert werden. Die Flüssigkeiten werden durch Saugen und Drücken mittels einer Spritzenpumpe gefördert, die Steuerung wird durch einen Computer mit spezieller Software übernommen. Durch die sehr flexible Programmierung ist eine Anpassung an eine Vielzahl von Anwendungszwecken möglich. Das Gerät erlaubt zudem bequem die Methodenentwicklung z.B. durch das Auffangen mehrerer Elutionsfraktionen von einer Kartusche.

In erster Linie ist das Gerät ein Pipettierroboter, der die sonst manuell durchgeführten Schritte maschinell und automatisiert durchführt. Das Gerät kann eine große Anzahl Proben nacheinander ohne nötigen manuellen Eingriff bearbeiten. Es bestehen zudem wesentliche methodische Unterschiede zur manuellen Festphasenextraktion. Während bei dieser die Flüssigkeiten in der Regel mit Hilfe von Unterdruck durch das Adsorbens gesaugt werden, wird beim ASPEC die Flüssigkeit durch die Kartuschen gedrückt. Die Flüssigkeiten werden mit einer Spritzenpumpe durch eine Kanüle gefördert, die druckdicht in ein auf die Kartuschen aufgesetztes Deckelchen sticht. Dadurch wird beim Fördern der Flüssigkeit durch Kompression des Luftraums in der Kartusche ein Überdruck aufgebaut, der die Flüssigkeit durch die Kartusche fließen lässt. Dadurch ist der Fluss wesentlich besser reproduzierbar einzustellen als bei der manuellen Festphasenextraktion. Daneben hat die Automatisierung insgesamt durch das stets gleiche Vorgehen einen positiven Effekt für die Reproduzierbarkeit.

Die Automatisierung stellt aber auch spezielle Anforderungen an die verwendete Analytik (SMITH 2003). So müssen alle für die Festphasenextraktion erforderlichen Arbeitsschritte so gestaltet werden, dass sie ohne Eingriff oder nicht automatisierbare Vorgänge auskommen, wenn die Proben in einem Arbeitsgang komplett bearbeitet werden sollen. Dies schließt zum Beispiel eine zwischenzeitliche Filtration, Zentrifugation oder Flüssig-Flüssig-Extraktion aus, und auch das Einengen von Lösungen ist nur bei leicht flüchtigen Lösungsmitteln durch längeres Trockenblasen möglich.

Für die automatisierte Analyse von Malz bedeutet dies, dass die bisher im Arbeitskreis genutzte manuelle Methode adaptiert werden musste, um ausschließlich automatisierbare Verfahren zu nutzen. Dabei musste die an manuell gepackten 10g Polyamid-Säulen durchgeführte Festphasenextraktion auf kommerzielle Kartuschen (maximale Füllmenge 1 g) umgestellt werden. Das Auftragen des Extraktes mit Aceton in der Auftragslösung war dafür Bedingung.

Die manuelle und die automatisierte Festphasenextraktion unterscheiden sich sowohl im Zeit- und Arbeitsaufwand als auch in der Gleichartigkeit der Durchführung einzelner Extraktionen sowie der dadurch erreichbaren Reproduzierbarkeit. So können durch die automatisierte SPE bessere Reproduzierbarkeiten erreicht werden. Die Wiederfindung der Proanthocyanidine aus Malz war dabei gleich bzw. in einigen Fällen besser als bei der bisher eingesetzten manuellen Methode.

### **Kopplung von ASE und ASPEC**

Die geräteseitige Kopplung der beschleunigten Lösungsmittelextraktion und der Festphasenextraktion ist ein wichtiger Schritt für die automatisierte Probenvorbereitung. Da sowohl die ASE als auch der ASPEC die Proben automatisch verarbeiten können, ist bei direkter Kopplung der Geräte auch zur Überführung des Extraktes kein manueller Zwischenschritt erforderlich. In Zusammenarbeit mit den Firmen Dionex und Abimed sowie Herrn Dr. Zimmermann wurde die Kopplung der beiden Geräte und zusätzlich mit einer HPLC-Anlage realisiert und dazu die vorherige manuelle Probenvorbereitungsmethode für die Proanthocyanidine im Malz entsprechend umgestellt. Damit wurde erstmalig diese Gerätekopplung etabliert und für die lebensmittelchemische Analytik eingesetzt (PAPAGIANNPOULOS ET AL. 2001, PAPAGIANNPOULOS ET AL. 2002, PAPAGIANNPOULOS UND MELLNTHIN 2002, ZIMMERMANN ET AL. 2002). Ihre Routinetauglichkeit bewies die Methode im Rahmen eines weiteren Promotionsprojektes zur Quantifizierung der Malz-Proanthocyanidine in einem großen Probenkollektiv (ZIMMERMANN 2005).

Für die Kopplung müssen die **Geräte mechanisch verbunden** werden, so dass der ASPEC die fertigen Extrakte der ASE aufsaugen und weiterverarbeiten kann. Außerdem ist eine **Kommunikation** der Steuerungen beider Geräte nötig, damit das Ende der Extraktion und das Ende des Aufsaugens der Probe als Signal dienen, mit der nächsten Festphasenextraktion bzw. der nächsten Extraktion zu beginnen.



Daneben muss allerdings auch die für die Extraktion und die Festphasenextraktion verwendete **Analytik kompatibel** sein. Die Extrakte der ASE müssen für eine Weiterverarbeitung durch den ASPEC geeignet sein, bzw. vom ASPEC kompatibel gemacht werden. Für die Analytik der Proanthocyanidine im Malz musste dazu ausgehend von der etablierten manuellen Extraktion, die den Extrakt eindampft und so das Volumen reduziert und das Aceton entfernt, ein anderer Weg gefunden werden, die Extraktlösung so zu modifizieren, dass eine vollständige Adsorption der Analyten auf den Polyamidkartuschen erreicht wird. Da die Extrakte der ASE ein wesentlich kleineres Volumen haben als das der manuellen Extraktion (typisch ca. 15 ml), kann durch Verdünnen mit Wasser (Auffüllen mit ca. 25 ml) der Acetonanteil von ursprünglich 80% vol auf 30% vol so weit abgesenkt werden, dass eine vollständige Adsorption der Proanthocyanidine sichergestellt ist. Das Zudosieren des Wassers und das Mischen kann der ASPEC automatisch durchführen.

Um das bei der manuellen Probenvorbereitung erforderliche Einengen des erhaltenen Eluates, welches nicht kompatibel mit einer automatisierten Probenvorbereitung ist, zu umgehen, wurde durch eine fraktionierte Elution das zur vollständigen Elution minimal erforderliche Volumen ermittelt. Abbildung 2.2-10 zeigt Chromatogramme der erhaltenen Fraktionen. Daraus ergibt sich, dass mit einem Volumen von 2,5 ml die Proanthocyanidine von den Polyamidkartuschen vollständig eluiert werden können.

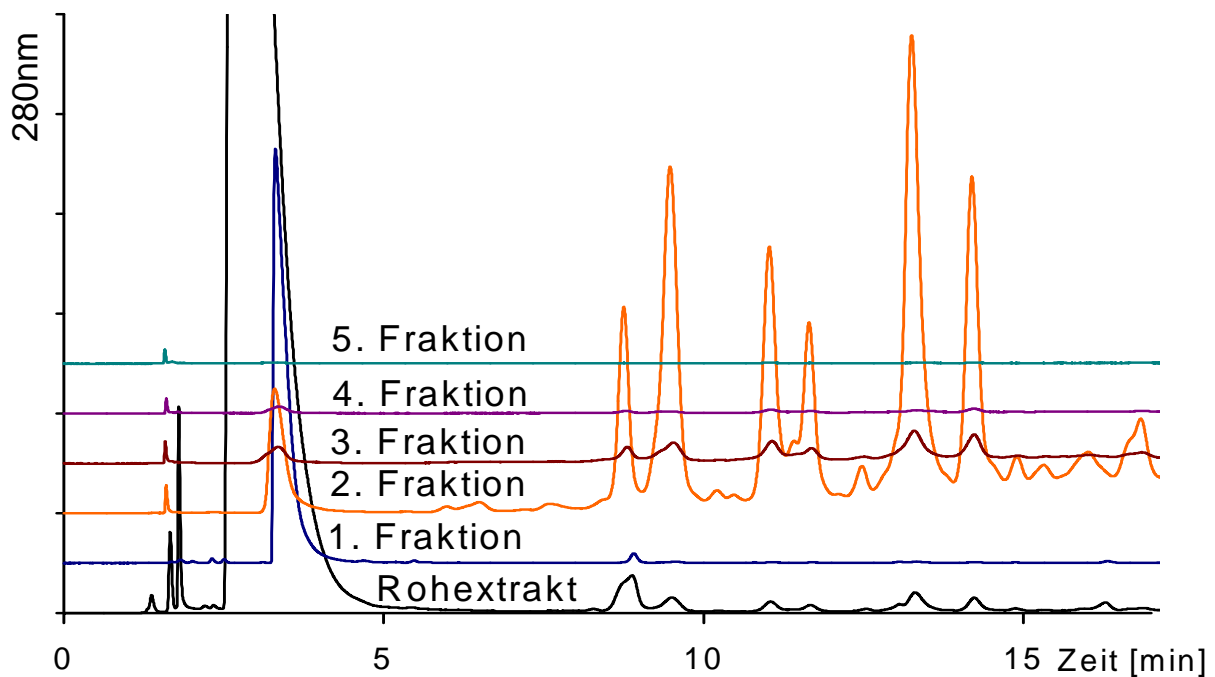


Abbildung 2.2-10: Chromatogramme der Elutionsfraktionen (je 1 ml) eines ASE-Malzextraktes von Polyamid (Macherey-Nagel)

Einen Vergleich der beiden Methoden mit einer Übersicht der einzelnen Prozessschritte und der resultierenden Zeitersparnis zeigt Abbildung 2.2-11.

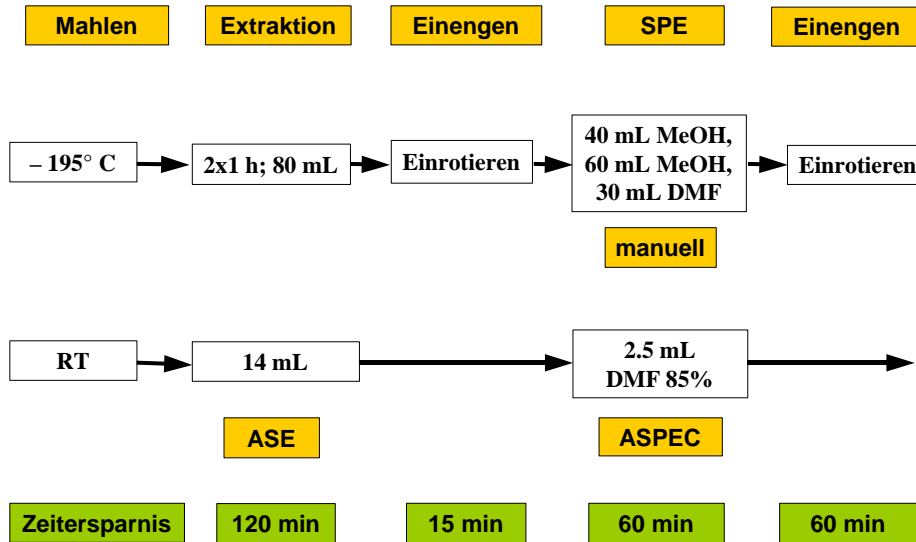


Abbildung 2.2-11: Vergleich der manuellen und der gekoppelten automatisierten Probenvorbereitung für die Bestimmung von Proanthocyanidinen in Gerstenmalz mit der resultierenden Zeitersparnis

## 2.3 – Ergebnisse und Diskussion – Chromatographische Trennung

### Grundlagen und Anforderungen

Die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) ist heute die Standardtechnik zur Trennung und Analyse von Polyphenolen. Mit ihrem verstärkten Einsatz hat sie die früher häufig verwendeten Verfahren der Säulen- und Dünnschichtchromatographie weitgehend verdrängt. Aufgrund ihrer besseren Trennleistung und Detektionsempfindlichkeit sowie der Möglichkeit zur Kopplung mit der Massenspektrometrie bietet sie entscheidende Vorteile für eine Identifizierung und Quantifizierung individueller Verbindungen auch in niedrigen Konzentrationen und in komplex zusammengesetzten Proben. Die Anwendung der Gaschromatographie beschränkt sich aufgrund der geringen Flüchtigkeit der meisten Polyphenole auf Spezialfälle, häufig nach Derivatisierung oder Pyrolyse der Substanzen. Daneben wird die Kapillarelektrophorese (CE) für die Trennung von Polyphenolen, insbesondere zur chiralen Trennung, genutzt, stellt aber eine deutlich seltener verwendete Technik dar (KREIMEYER ET AL 1998, KOFINK UND GALENSA 2005, KOFINK ET AL. 2007). Grund dafür ist die geringere Verbreitung der Kapillarelektrophorese generell, sowie ihre gegenüber der HPLC geringere Empfindlichkeit und Robustheit.

Die in der apparativen chemischen Analytik generell und auch in der Polyphenol-Analytik am häufigsten verwendete HPLC-Methode ist die reversed-phase Chromatographie, d.h. der Einsatz lipophiler stationärer Phasen und organisch-wässriger mobiler Phasen (ROHR 2002, ROBARDS 2003, DE RIJKE ET AL. 2006). Da die meisten Polyphenole sehr hydrophile Verbindungen sind, muss mit einem geringen Anteil eines organischen Lösungsmittels (meist Acetonitril und/oder Methanol) eluiert werden, wobei in der Regel eine Gradientenelution durchgeführt wird. Die Normalphasenchromatographie hat aufgrund ihrer schlechteren Handhabbarkeit eine geringere Anwendungsbreite, wird aber von einigen Autoren erfolgreich für die Trennung von Proanthocyanidinen nach ihrem Molekulargewicht genutzt (BAOSHAN ET AL. 1998, YANAGIDA ET AL. 2003, KELM ET AL. 2006, KARONEN ET AL. 2006).

Durch das große Interesse an den Polyphenolen, das insbesondere in den letzten Jahren aufgrund der möglichen positiven gesundheitlichen Wirkungen stark gewachsen ist, existiert allerdings inzwischen eine unüberschaubare Menge wissenschaftlicher Literatur. Leider hat auch die starke Entwicklung der Forschung und Analytik in diesem Gebiet nicht zur Bildung von allgemein festgelegten und akzeptierten Probenaufarbeitungs- und Trennverfahren geführt, was den Vergleich der Daten unterschiedlicher Untersuchungen deutlich erschwert. Eine

Harmonisierung auf diesem Gebiet würde eine bessere Vergleichbarkeit der analytischen Daten ermöglichen, ist allerdings zur Zeit nicht abzusehen.

### **Stationäre Phase**

Da aufgrund der Hydrophobizität der meisten Polyphenole mit geringen Anteilen organischen Lösungsmittels in der mobilen Phase eluiert wird, muss die stationäre Phase eine gute Stabilität gegenüber stark oder rein wässrigen Bedingungen haben. Da für die Polyphenolanalytik in der Regel dem Eluenten Säure zugesetzt wird, um die Dissoziation der Hydroxylgruppen zu unterbinden, muss das Trennmateriale auch im sauren pH-Bereich stabil sein. In den letzten Jahren sind verschiedene neue Phasen auf den Markt gekommen, die für die Trennung stark hydrophiler Verbindungen mit sehr wässrigen Eluenten optimiert sind. Diese Phasen weisen ein hydrophiles Endcapping auf oder einen hydrophilen sogenannten „Spacer“ zwischen Silicamaterial und Alkylketten („embedded“ Phasen). In beiden Fällen wird verhindert, dass es bei längerer Verwendung eines stark oder rein wässrigen Eluenten durch das Auswaschen des organischen Modifiers aus der stationären Phase zu einer Desolvation der Alkylketten kommt. Diese können sonst zusammenklumpen und es resultiert ein teilweise irreversibler Verlust an Trennleistung.

Ein weiteres entscheidendes Kriterium für die erfolgreiche Trennung der Analyten ist die Selektivität des Trennsystems, die sowohl von der stationären als auch von der mobilen Phase abhängt.

Detaillierte Untersuchungen zur Trennung von Polyphenolen auf einer Auswahl von Trennsäulen der neueren Generation wurden von Kinitz durchgeführt (KINITZ UND MELLENTIN 2003). Die Aqua C18-Säule (Phenomenex) erwies sich als eine geeignete Trennsäule für die in dieser Arbeit bearbeiteten Fragestellungen, insbesondere aufgrund ihrer sterischen Selektivität bei der Trennung der Proanthocyanidine in Malz und Gerste. Da die Vielzahl der in Gerstenmalz, Johannisbrot und vielen anderen Pflanzenmatrices vorkommenden Polyphenole eine vollständige Trennung aller im Rahmen dieser Arbeit interessierenden Verbindungen schon theoretisch unmöglich macht, wurden keine weiteren systematischen Untersuchungen verschiedener stationärer Phasen durchgeführt. Neben der erwähnten Aqua C18-Säule wurde die Polaris Amide C18-Säule, eine reversed-phase Säule mit einer Amidgruppe als hydrophilem „Spacer“, erprobt. Die Abbildungen 2.3-1 und 2.3-2 zeigen typische Chromatogramme der Proanthocyanidine einer Malzprobe auf den zwei unterschiedlichen Säulen bei ansonsten gleichen chromatographischen Bedingungen. Deutlich ist die prinzipiell stärkere Retention der

Substanzen auf dem Phasenmaterial mit der Amidgruppe, bedingt durch die möglichen Wechselwirkungen (Wasserstoffbrückenbindungen) der phenolischen OH-Gruppen mit der Amidgruppe des „Spacers“. Dementsprechend ist dieser Effekt auch von der Anzahl der Gallocatechineinheiten abhängig. Die früh im Chromatogramm eluierenden Substanzen, die durch den größeren Anteil an Gallocatechineinheiten hydrophiler sind, zeigen die deutlichste Zunahme bei der Retentionszeit. Daneben ist aber im Beispiel der trimeren Verbindungen GCC und CGC zu sehen, dass der Stellungsunterschied der Gallocatechineinheit in der Sequenz dieses Proanthocyanidins auf der Amid-Phase nicht aufgelöst wird. Da dadurch die sterische Selektivität der Amid-Phase für die Proanthocyanidine in Gerstenmalz geringer ist und gleichzeitig der Zeitbereich der Elution dieser Verbindungen verringert wird, wurde diese Phase nicht für die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen genutzt.

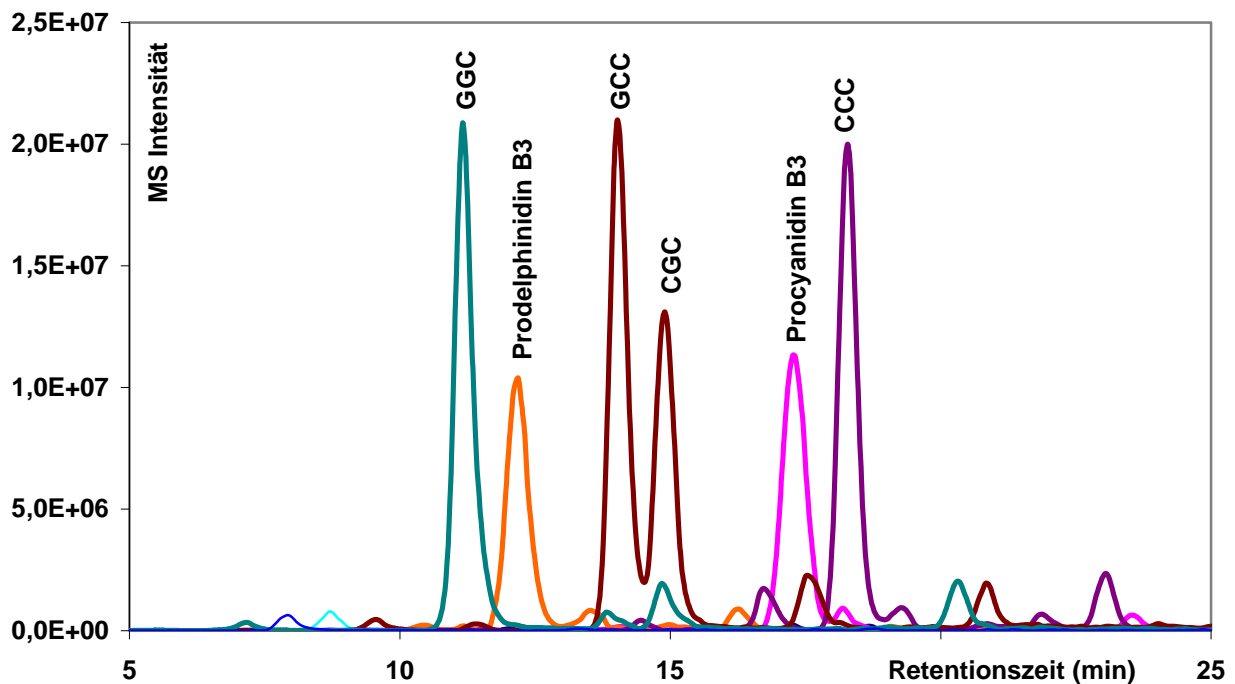


Abbildung 2.3-1: Chromatogramm (Massenspuren) der Malzproanthocyanidine auf Aqua C18 (Phenomenex)

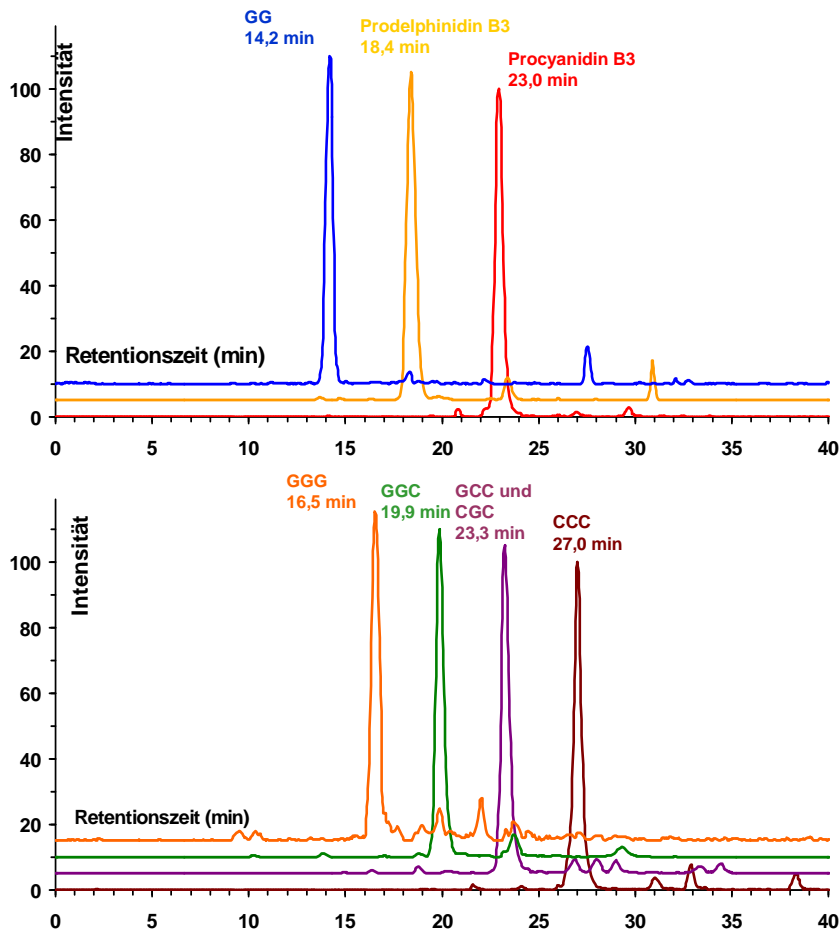


Abbildung 2.3-2: Chromatogramm (Massenspuren) der Malzproanthocyanidine auf Polaris Amide C18 (Varian). Die Massenspuren sind hier getrennt dargestellt, da Procyanidin B3 und die zwei Trimere bei 23,3 min praktisch co-eluieren

## Mobile Phase

Die Wahl der mobilen Phase richtet sich in erster Linie nach den Anforderungen der Trennung.

Für die Verwendung der HPLC-MS Kopplung sollten möglichst alle Komponenten des Eluenten flüchtig sein. Andernfalls lagern sich die nicht flüchtigen Substanzen in der Ionenquelle ab und verschlechtern oder verhindern sehr schnell weitere Messungen, da durch die entstehenden Ablagerungen die Kapillaren verstopfen. Um auch nicht flüchtige Zusätze (z.B. anorganische Puffer oder Ionenpaar-Reagenzien) einsetzen zu können, wurden spezielle apparative Möglichkeiten wie der „Off-Axis“ Spray und der „Orthogonal Spray“ geschaffen, die aber für das in dieser Arbeit verwendete Massenspektrometer nicht zur Verfügung standen. Als mobile Phase wurden daher Wasser und Acetonitril gewählt, denen 1% vol Essigsäure zugesetzt

wurde, um die Dissoziation der phenolischen OH-Gruppen zu unterdrücken. Es wurde eine Gradientenelution mit stetiger Steigung verwendet, beginnend mit rein wässriger Elution.

Für die Analytik der geladenen Anthocyane wurde die mobile Phase mit 0,2% vol Trifluoressigsäure versetzt, um die pH-Wert abhängige Umlagerung (Ringöffnung) der Verbindungen zu unterdrücken und somit scharfe Peaks zu erhalten (siehe 2.3 – Trennung von Anthocyanen, Seite 70).

### **Säulendimensionen**

Die meisten kommerziell angebotenen Phasenmaterialien sind in verschiedenen Korngrößen (oft nominal 2, 3, 5 und 10  $\mu\text{m}$ ) erhältlich. Auch die Abmessungen der Trennsäule selber sind wählbar, verschiedene Innendurchmesser (typischerweise 1, 2, 4 oder 4,6 mm) und Säulenlängen (typisch zwischen 100 und 300 mm) können für analytische Zwecke genutzt werden. Erst in den letzten Jahren ist die Fertigung von Säulen mit 2 oder 3  $\mu\text{m}$ -Teilchen bzw. mit Innendurchmessern von 2 mm und kleiner („narrow bore“) so weit fortgeschritten, dass diese Säulen in gleicher Qualität wie die über viele Jahre in der analytischen HPLC vorherrschenden „Standardgrößen“ (5 oder 10  $\mu\text{m}$ -Teilchen, 4 oder 4,6 mm Innendurchmesser und 200 oder 250 mm Länge) erhältlich sind.

Entscheidend für die Trennung ist die Chemie des Phasensystems, also die Kombination von Phasenmaterial und Eluenten, weil dadurch die Verteilung der Analyten zwischen mobiler und stationärer Phase und damit Kapazitätsfaktor und Selektivität bestimmt werden. Die Säulendimensionen liefern einen Beitrag durch die Anzahl theoretischer Trennstufen und die inherente Peakdispersion. Da die Anzahl theoretischer Trennstufen vom Quotienten aus Säulenlänge und Teilchengröße abhängt, kann mit dem Übergang zu kürzeren Trennsäulen mit kleineren Teilchen die Anzahl theoretischer Trennstufen beibehalten werden. Bei guter Packungsqualität der Säulen ist kein negativer Effekt auf die Trennung zu beobachten. Durch die verringerte Länge der Säule verkürzt sich aber die Dauer der Chromatographie, so dass die Analyse beschleunigt wird.

Der Übergang zu kleineren Innendurchmessern äußert sich bei guter Packungsqualität in einer deutlichen Reduktion des Volumenflusses, der für einen optimalen linearen Fluss durch die Trennsäule erforderlich ist. Da der Fluss vom Querschnitt abhängig ist, reduziert sich z.B. beim Übergang von einer 4,6 mm auf eine 2 mm Säule der Fluss von 1 ml/min auf 250  $\mu\text{l}/\text{min}$  bei gleicher linearer Geschwindigkeit der mobilen Phase. Dadurch reduziert sich sowohl der

Lösungsmittelverbrauch als auch die zu verdampfende Lösungsmittelmenge bei der Ionisierung im Massenspektrometer. Gerade bei der Verwendung von Eluenten mit einem hohen Wasseranteil (und damit verbundener hoher Oberflächenspannung und großer Verdampfungsenthalpie) ist letzteres ein entscheidender Vorteil für eine gute Ionisierung.

In dieser Arbeit wurden nach Vorversuchen auf Säulen mit der „Standardgröße“ von 4,6 mm für die LCMS-Analytik konsequent „narrow-bore“-Säulen mit 2 mm Innendurchmesser, 150 mm Länge und 3 µm mittlerem Teilchendurchmesser verwendet. Dadurch entfiel der bei 4,6 mm Säulen genutzte 1:10 Split des HPLC-Eluenten vor dem Massenspektrometer und der damit einhergehende Empfindlichkeitsverlust wurde vermieden.

### **Charakterisierung der Trennung**

Die Charakterisierung eines Phasensystems für die Trennung von Polyphenolen lässt sich durch unterschiedliche Methoden erreichen. Die Frage, ob die eine oder die andere Säule, der eine oder der andere Eluent oder Gradient für die Trennung besser ist, ist nicht ohne weiteres zu beantworten. Was optimal ist, hängt von der jeweiligen Fragestellung, den zu untersuchenden Proben, der Matrix und den Analyten ab.

Der Einfluss der Säulendimensionen, des Flusses oder anderer Faktoren, die die Selektivität der Trennung nicht beeinflussen, lässt sich relativ einfach durch Vergleich ermitteln. Die Bewertung einer Selektivitätsänderung und die Festlegung eines Optimums der Trennung ist aber nicht unmittelbar möglich. Neben der prinzipiellen Möglichkeit eines rein empirischen Vorgehens bietet sich vor dem theoretischen Hintergrund der chromatographischen Trennung die Analyse des Kapazitätsfaktors bei isokratischen Bedingungen an. Der Kapazitätsfaktor berechnet sich als  $(\text{Retentionszeit eines Analyten minus Totzeit}) / (\text{Totzeit})$  und ist damit ein von den Säulendimensionen unabhängiges Maß für die Retention einer Verbindung. Zwischen dem Logarithmus des Kapazitätsfaktors und dem Anteil organischen Modifiers in der mobilen Phase gibt es in der Regel einen linearen Zusammenhang. Abbildung 2.3-3 zeigt diesen Zusammenhang für die dimeren, trimeren und tetrameren Proanthocyanidine in Malz auf der Aqua C18-Säule im beschriebenen mobilen Phasensystem Wasser-Acetonitril-Essigsäure für drei verschiedene isokratische Bedingungen. Es soll hier nicht auf die einzelnen Verbindungen eingegangen werden, da durch den parallelen Verlauf der Geraden sofort ersichtlich ist, dass die Selektivität der einzelnen Verbindungen vom Modifieranteil nicht maßgeblich beeinflusst wird. Dadurch ist auch zu sehen, dass eine Änderung der isokratischen oder Gradienten-Elutionsbedingungen keinen maßgeblichen Erfolg für die Trennung der Verbindungen haben



wird. Diese Untersuchungen wurden deshalb, auch wegen ihres großen Zeit- und Materialaufwandes, nicht fortgeführt.



Abbildung 2.3-3: Verhältnis des natürlichen Logarithmus des Kapazitätsfaktors der Proanthocyanidine in Malz zum Anteil Acetonitril in der mobilen Phase bei isokratischer Elution

Neben den hier vorgestellten Untersuchungen wurden die entwickelten Analysemethoden auch erfolgreich für den Nachweis und die Identifizierung von Polyphenolen verschiedener Substanzgruppen in anderen Probenmaterialien angewendet und zeigen damit ihre Eignung über die hier besprochenen Anwendungen hinaus. So wurden Polyphenole im Rahmen weiterer Untersuchungen unter anderem in Zitrusfrüchten, Açai-Früchten (*Euterpe Oleracea Mart.*), Camu-Camu (*Myrciaria dubia (H.B.K.) Mc Vaugh*), Tamarillo (*Cyphomandra betacea*), Guaraná (*Paullinia cupana*), Tee- und Kakaoextrakten, Trauben- und Apfelsäften identifiziert. Auf die Ergebnisse dieser Untersuchungen wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter eingegangen, für eine teilweise Auflistung veröffentlichter Ergebnisse siehe auch Abschnitt Veröffentlichungen, Vorträge und Poster, Seite 9.

## Trennung von Anthocyanen

Neben der Analyse von Proanthocyanidinen zeigt die Analyse von Anthocyanen beispielhaft die Eignung des entwickelten chromatographischen Trennsystems für andere Flavonoidgruppen.

Schon in früheren Untersuchungen von Siewek und Roeder wurden die Anthocyane aus roten und schwarzen Johannisbeeren untersucht, um einen Zusatz von rotem zu schwarzem Johannisbeersaft oder –nektar nachweisen zu können (Verfälschungsnachweis) (SIEWEK 1984, ROEDER 1997). Schwarze Johannisbeeren enthalten vier verschiedene Anthocyane (Delphinidin-3-glucosid, Delphinidin-3-rutinosid, Cyanidin-3-glucosid und Cyanidin-3-rutinosid). In roten Johannisbeeren finden sich nur Cyanidin-, aber keine Delphinidinderivate. Neben den beiden auch in den schwarzen Beeren vorkommenden Derivaten finden sich zusätzlich noch sortenabhängig zwei oder vier weitere Cyanidinderivate (Cyanidin-3-sophorosid, Cyanidin-3-(2<sup>G</sup>-glucosylrutinosid), Cyanidin-3-sambubiosid und Cyanidin-3-(2<sup>G</sup>-xylosylrutinosid). Zwei dieser in schwarzen Johannisbeeren nicht vorkommenden Verbindungen sind in allen roten Johannisbeeren zu finden (Cyanidin-3-sambubiosid und Cyanidin-3-(2<sup>G</sup>-xylosylrutinosid) und eignen sich damit prinzipiell zum Nachweis eines Zusatzes roter zu schwarzen Johannisbeeren. Aufgrund der damaligen materiellen und apparativen Voraussetzungen gelang zwar die Identifizierung und teilweise Trennung der Anthocyane, ein Zusatz von unter 10% roten zu schwarzen Beeren war aber nicht mehr nachweisbar. Neben den Einschränkungen der massenspektrometrischen Detektion mit Thermospray-Ionisierung wurde die Analytik insbesondere durch sehr breite Peaks erschwert, die aus der Umlagerung der Anthocyane resultieren. Nur im stark sauren Milieu kann diese Umlagerung unterdrückt werden, allerdings sind die HPLC-Trennsäulen in der Regel bei solchen pH-Werten nicht mehr stabil, es kommt zu einer allmählichen Ablösung der Alkylketten.

In dieser Arbeit wurden für die Trennung eine Phenomenex Aqua C18-Säule und 0,2% vol Trifluoressigsäure als Zusatz zur mobilen Phase verwendet. Bei einem Acetonitril-Anteil von mehr als 10% vol in der mobilen Phase konnte auch über lange Zeit keine Abnahme der Qualität der Trennsäule beobachtet werden. Dazu tragen sicher die Verwendung einer organischen Säure (im Gegensatz zu einer Mineralsäure) und der deutliche Anteil organischen Modifiers bei. Unter rein wässrigen Bedingungen wurde mit einer alten Säule eine rasche irreversible Verringerung der Trennleistung beobachtet. Wie aus Abbildung 2.3-4 ersichtlich, kann durch geschickte Wahl der Zusammensetzung der mobilen Phase (16% vol B) in einem isokratischen Lauf eine vollständige Basislinientrennung der nur in den roten Johannisbeeren vorkommenden

Anthocyane von denen der schwarzen Beeren erreicht werden, wobei je zwei der vier Verbindungen der schwarzen Beeren co-eluieren.

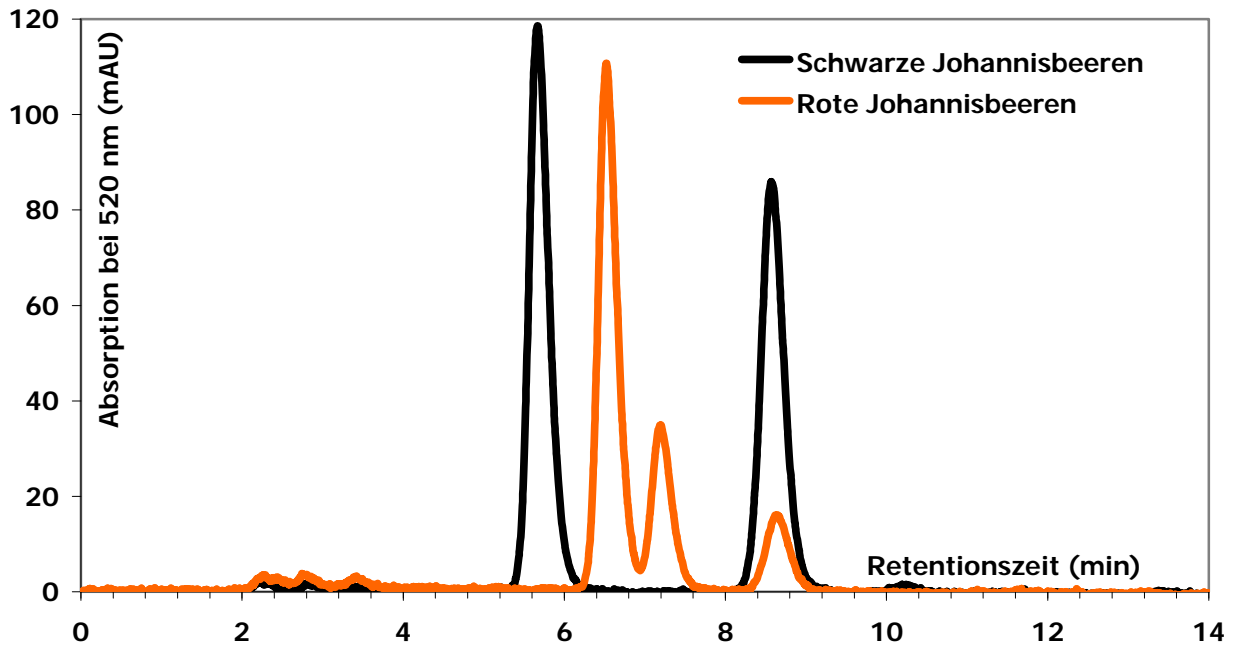


Abbildung 2.3-4: Chromatogramme von schwarzen und roten Johannisbeeren bei 16% vol B



## 2.4 – Ergebnisse und Diskussion – Massenspektrometrie

### Grundlagen

Die Kopplung der Massenspektrometrie mit der HPLC (HPLC-MS oder auch LCMS) ist durch die technischen Verbesserungen in den letzten Jahren zu einer robusten und äußerst leistungsfähigen Methode geworden und wird heute standardmäßig für die Analytik eingesetzt. Sie bietet die Möglichkeit, die nach der Trennung von der HPLC-Säule eluierenden Analyten nach ihrer Ionisierung nachzuweisen und ihre Masse (genauer: ihr Masse zu Ladungs-Verhältnis  $m/z$ ) zu bestimmen. Die gute Massenselektivität des Spektrometers erlaubt dabei die getrennte Detektion von Verbindungen unterschiedlicher Masse, auch wenn diese nicht chromatographisch getrennt wurden (WATSON 1985, BUSCH ET AL. 1988, ARDREY 2003).

Insbesondere die Entwicklung schonender Ionisierungstechniken wie die Electrospray-Technik (ESI) erlaubt die Ionisierung der intakten Moleküle ohne Fragmentierung der Substanzen. Eine gezielte Fragmentierung der Analyten kann dann nach der Isolierung einer einzelnen Masse in einem Quadrupol oder in einer Ionenfalle (Ion-Trap) erfolgen, so dass es nicht zu einer Überlagerung der einzelnen Fragmentspektren co-eluierender Substanzen kommt. Aus den Fragmentspektren können strukturelle Eigenschaften des Moleküls abgeleitet werden, da die Bindungsbrüche vom Bau des Moleküls und damit von der Lage starker und schwacher Bindungen in seiner Struktur abhängen. Die HPLC-MS eignet sich damit prinzipiell zur Identifizierung und zur Quantifizierung von Substanzen (MARCH UND TODD 1995, COLE 1997, PRAMANIK ET AL. 2002).

Seit der stärkeren Verbreitung der HPLC-MS in der instrumentellen chemischen Analytik wird diese Technik auch häufig für die Analyse von Naturstoffen, darunter auch Polyphenolen, eingesetzt. Haupteinsatz ist dabei die eindeutige Identifizierung von Substanzen oder die Beschreibung ihrer strukturellen Merkmale (DASS 2000, MELLON ET AL. 2000, BUDDE 2001, ROSSI UND SINZ 2001). Die Anzahl einzelner Berichte über die Identifizierung verschiedener Flavonoide in bestimmten Pflanzen oder Lebensmitteln hat inzwischen ein kaum mehr überschaubares Maß angenommen.

Nachfolgend werden Aufbau und Funktion der für diese Arbeit verwendeten Electrospray-Quelle, des Massenspektrometers und der Ionenfalle, sowie der Ablauf bei der Messung eines Fragmentspektrums kurz vorgestellt und erläutert. Dabei stehen die für diese Arbeit bedeutenden Aspekte im Vordergrund.

## Aufbau und Funktion des Ionenfallen-Massenspektrometers

Die in dieser Arbeit eingesetzte **Electrospray (ESI)-Ionenquelle** ist eine Weiterentwicklung des Thermospray-Verfahrens und zählt mit der Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI) zu den Atmospheric Pressure Ionisation (API)-Verfahren. Sie bieten den Vorteil einer sehr schonenden Ionisierung durch eine geringe Energieübertragung auf die Analyten und damit weitestgehend den Erhalt der Molekülstruktur, ohne dass es bei der Ionisierung selber schon zur Fragmentierung der Substanzen kommt. Die APCI eignet sich vorwiegend für flüchtige HPLC-Laufmittel und damit für lipophile Substanzen. Für sehr wässrige Eluenten mit geringem organischem Lösungsmittelanteil liefert die ESI in der Regel eine bessere Ionisierung.

Die Geräte der verschiedenen Hersteller unterscheiden sich voneinander in vielen Details, so dass die direkte Übertragung von Methoden auf andere Geräte nur schwer möglich ist. Den schematischen Aufbau des in dieser Arbeit verwendeten ESI-Ionenfallen-Massenspektrometers zeigt Abbildung 2.4-1.

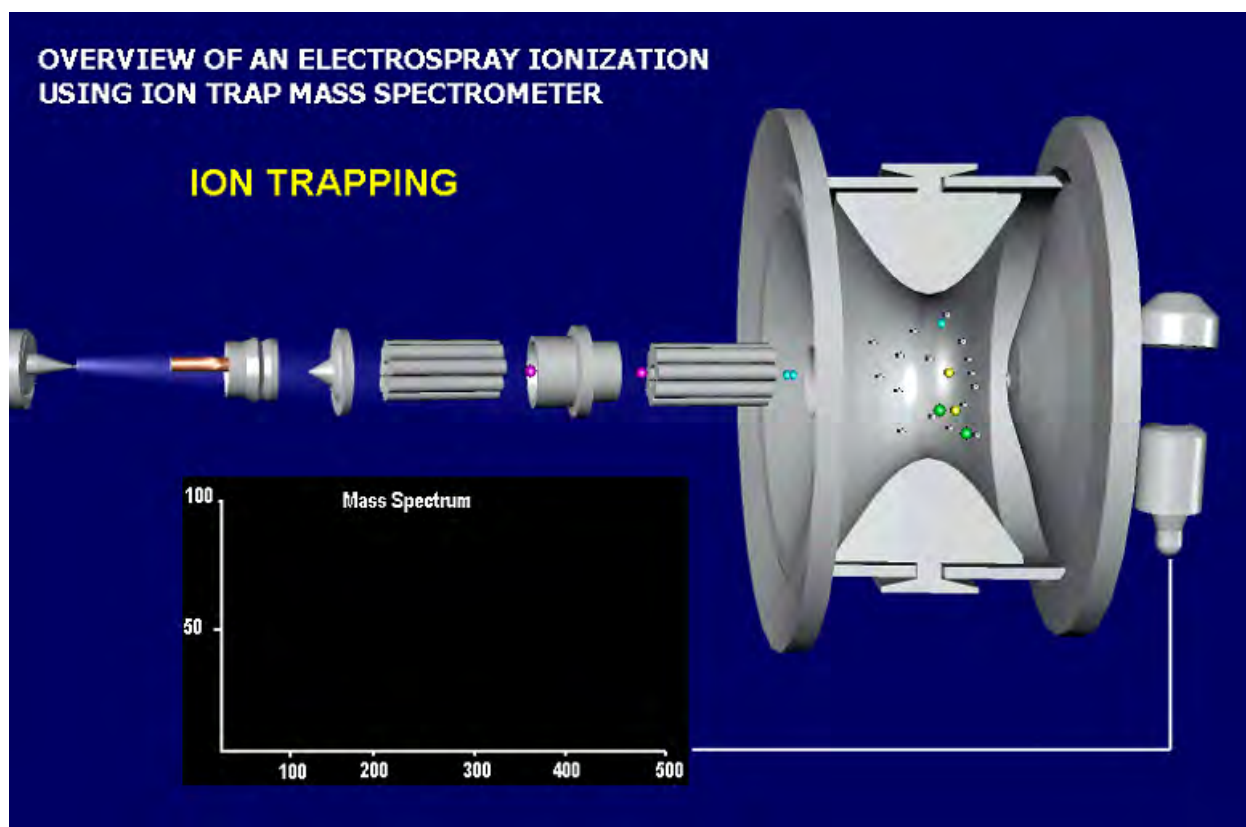


Abbildung 2.4-1: Übersicht über den Aufbau des in dieser Arbeit genutzten Ionenfallen-MS. Von links nach rechts: ESI nozzle, spray, heated capillary, tube lens, skimmer, first octapole, interoctapole lens, second octapole, ion trap, conversion dynode und multiplier (Quelle: Thermo Fisher Scientific)

Der Eluent tritt durch eine sehr dünne Kapillare (ESI-Needle) in die Quelle ein. Mit Hilfe des axial um die ESI-Needle ausströmenden Sheath- und Auxillary-Gases sowie die zwischen ESI-Needle und Heated Capillary angelegte Hochspannung kommt es zur Ausbildung eines Sprays. Dieser zielt bei der hier verwendeten Quelle direkt auf die Öffnung der Heated Capillary, spätere Entwicklungen verwenden vorteilhaft einen „Off-Axis“ Spray oder einen „Orthogonal-Spray“ und reduzieren so die Verschmutzung der Heated Capillary. In den Tröpfchen des Sprays kommt es zur Verdampfung des Lösungsmittels, unterstützt durch die große Oberfläche und die Gasströme in der Quelle. Dazu kann zusätzlich das Auxilliary-Gas genutzt werden. Aber auch die angelegte Spannung trägt wesentlich zur Verdampfung bei, denn die gleichsinnigen Ladungen im Tropfen stoßen sich gegenseitig ab. Übersteigt die Abstoßung die Oberflächenspannung der Tröpfchen, kommt es zu sogenannten „Coulomb-Explosionen“, die das Tröpfchen zerreißen und damit die Oberfläche erneut vergrößern. Bis heute werden zwei unterschiedliche Theorien zu den Vorgängen bei der Verdampfung und Ionisierung diskutiert. Im Kern betreffen diese die Frage, ob bei der Coulomb-Explosion einige etwa gleichgroße Teilchen entstehen, oder ob es zur Bildung vieler sehr kleiner Tröpfchen unter Erhalt eines relativ großen Tropfens kommt (COLE 1997). Praktische Versuche und Beobachtungen unterstützen sowohl die eine als auch die andere Theorie. In der Messpraxis hat dies keine Auswirkungen – Resultat der Vorgänge ist die weitgehende Verdampfung der mobilen Phase auf sehr kurzer Strecke. Zurück bleiben die nichtflüchtigen Verbindungen, auf denen letztlich die auf die Tropfen übertragenen Ladungen verbleiben. So kommt es im Endeffekt zur Ionisierung der Analyten. Dabei kann zwischen positiver und negativer Ionisierung, je nach Polarität der an die Kapillare angelegten Spannung, gewählt werden. Dadurch entstehen entweder Kationen oder Anionen, die anderen im Massenspektrometer verwendeten Spannungen werden in ihrer Polarität automatisch entsprechend ausgerichtet. Bei positiver Ionisierung wird in der Regel ein Addukt aus dem Analyten und einem Kation detektiert. Dabei werden oft  $H^+$ , Natrium-, Kalium- oder Ammonium-Ionen am Analyten gebunden, manchmal entstehen auch mehrere verschiedene Addukte. Bei Bindung eines  $H^+$ -Ions werden die entstehenden Analyt-Ionen dann als  $[M+H]^+$ -Ionen bezeichnet (M für Molekül, bei Bindung anderer Kationen entsprechende Bezeichnung). Dies erschwert die Detektion im Massenspektrum. Im Fall der Anthocyane und anderer schon als Kation vorliegender Verbindungen wird der Analyt in der Regel als solcher detektiert. Bei negativer Ionisierung werden die Analyten in der Regel nach Dissoziation eines  $H^+$ -Ions als Anion detektiert und entsprechend als  $[M-H]^-$ -Ionen bezeichnet. Die detektierte Masse, bzw. das detektierte Masse/Ladungsverhältnis  $m/z$  liegt dann ein Dalton unter der eigentlichen Molekularmasse und wird auch als Pseudomolekularmasse bezeichnet.

Im sogenannten **API-Stack** werden die Tröpfchen bzw. die resultierenden ionisierten Verbindungen durch ihre Ladung zur Heated Capillary hin beschleunigt und durchfliegen sie wegen des durch das Vakuum im Inneren verursachten Luftstroms und des Potentialgefälles. Dabei werden restliche auf dem ionisierten Analyten verbliebene Lösungsmittelmoleküle verdampft, so dass am Ende der Heated Capillary im Idealfall nur mehr ionisierte Analyten austreten. Durch die etwas von der Achse abweichende Stellung der Heated Capillary zum Skimmer und zur Tube Lens werden direkt hinter der Heated Capillary die Ionen in den hinteren Teil des Massenspektrometers, die sogenannte Ionenoptik, überführt, während nicht geladene Teilchen und eingesaugter Staub am Skimmer abgelagert werden.

Die **Ionenoptik**, bestehend aus zwei Octapolen und einer Interocapole Lens, dient zur Überführung der Ionen in die Ionenfalle. Die Ionen werden dabei beschleunigt und der Massenbereich ausgewählt. Dazu dient ein Potentialgefälle, welches in der Regel so gewählt ist, dass es zu keiner Fragmentierung der Ionen kommt. Durch ein gezielt vergrößertes Potentialgefälle kann allerdings eine Fragmentierung in dieser Stufe des Massenspektrometers durch verstärkte Stöße mit den restlichen Gasmolekülen hervorgerufen werden.

Die **Ionenfalle** geht auf eine Entwicklung von Wolfgang Paul im Jahre 1953 zurück, für die ihm 1989 der Nobelpreis für Physik verliehen wurde. Von ihrer prinzipiellen Funktion her entspricht die Ionenfalle einem Quadrupol, durch ihre Geometrie eignet sie sich aber auch zum gezielten Speichern und Manipulieren von Ionen.

Die in die Ionenfalle eintretenden Ionen werden zunächst abgebremst und auf kleinen, kreisförmigen Bahnen in der Mitte der Falle konzentriert. Dies geschieht durch Anlegen von Gleichspannungen und Wechselspannungen bestimmter Amplituden und Frequenzen zwischen der Ringelektrode und den Endkappen. Zur Messung der Massen und der Anzahl der in der Ionenfalle befindlichen Ionen werden diese durch Anlegen einer Wechselspannung bestimmter Frequenz zwischen den Endkappen zum Schwingen angeregt und verlassen schließlich die Endkappe durch eine kleine Öffnung. Die Ionen werden dann mit gleichem Impuls auf eine sogenannte Konversionsdynode beschleunigt, wo sie unabhängig von ihrer Masse Elektronen freisetzen, die dann zum Multiplier beschleunigt und dort gemessen werden. Aus dem Messsignal des Multipliers kann somit auf die Anzahl der Ionen geschlossen werden. Dies bildet die Grundlage für eine quantitative Bestimmung. Durch die Frequenz der Wechselspannung, die die Ionen aus der Ionenfalle entfernt, lässt sich das Masse/Ladungsverhältnis  $m/z$  bestimmen, da jeweils die Ionen mit entsprechender davon abhängiger Resonanzfrequenz betroffen sind. Die Frequenz dieser Wechselspannung wird über die Zeit verändert, so dass nacheinander die Ionen



unterschiedlicher Masse die Ionenfalle verlassen und gemessen werden. Diesen Vorgang nennt man Scannen. Die Zeit für einen Scan ist sehr kurz, typischerweise wird bei der Messung von HPLC-MS Chromatogrammen etwa 1 Scan pro Sekunde aufgenommen, der wiederum aus drei hintereinanderfolgenden gemittelten Messungen, sogenannten microscans, und den dazugehörigen prescans besteht.

Aus dem über die Zeit bestimmten Messsignal des Multipliers wird dann durch die bekannte Frequenz die Ionenmasse berechnet und das Ergebnis als Massenspektrum dargestellt. Dabei wird die Intensität des MS-Signals gegen das Masse/Ladungsverhältnis  $m/z$  aufgetragen. Üblicherweise wird dabei die relative Intensität (relative Abundance) der Ionen dargestellt, wobei auf das höchste Signal mit 100% skaliert wird. Werden im Laufe eines Chromatogramms die Intensitäten eines einzelnen Masse/Ladungsverhältnisses gegen die Retentionszeit aufgetragen, so spricht man von einer Massenspur. Werden die in jedem Massenspektrum jeweils höchsten Signale gegen die Retentionszeit aufgetragen, erhält man die BasePeak-Darstellung. Die Gesamtintensität aller Ionen eines Spektrums aufgetragen gegen die Retentionszeit liefert den Total-Ionenstrom (TIC, Total Ion Current).

### **Fragmentierung in der Ionenfalle**

Die Fragmentierung in der Ionenfalle ist ein wichtiges und leistungsfähiges Instrument für die Strukturaufklärung ionisierbarer Substanzen. Dazu werden sowohl die Massen der in den Fragmentspektren auftretenden Ionen als auch die sich ergebenden Differenzen (neutral loss) analysiert und mit Fragmentspektren von Verbindungen bekannter Struktur verglichen. Daraus lassen sich wertvolle Informationen über den molekularen Aufbau von Analyten auch ohne eine für die NMR-Spektroskopie notwendige Isolierung und Aufreinigung von Milligramm-Mengen erreichen.

Neben der oben beschriebenen Messung der in der Ionenfalle befindlichen Analyten gibt es die Möglichkeit, Fragmente ausgewählter Ionen zu erzeugen. Dazu werden nach dem Füllen der Ionenfalle zunächst alle Ionen nicht interessierender Masse aus der Falle entfernt, die Ionen der ausgewählten Masse der interessierenden Substanz aber nicht. Dies geschieht durch entsprechende Auswahl der Frequenzen der angelegten Wechselspannungen. Danach sind in der Ionenfalle nur noch Ionen einer Masse, die nun durch Spannungen an den Elektroden der Falle auf größere Bahnen gebracht werden. Dadurch wird der Zusammenstoß mit Heliumatomen verstärkt, die der Ionenfalle mit geringem Druck zugeführt werden. Die entstehenden Fragmente werden wieder in der Mitte der Ionenfalle gebündelt und analog der oben beschriebenen

Aufnahme eines Massenspektrums gemessen. Das resultierende Spektrum wird als  $MS^2$ -Spektrum bezeichnet. Es kann aber auch erneut eine Auswahl unter den resultierenden Fragment-Ionen getroffen und diese erneut fragmentiert und gemessen werden. Das Fragmentspektrum eines Fragmentes wird analog als  $MS^3$ -Spektrum bezeichnet, bzw. bei mehrfacher Fragmentierung als  $MS^n$ -Spektrum.

Durch den Stoß mit Heliumatomen kommt es zur Übertragung der Stoßenergie auf das Analytmolekül und kann dort zu Bindungsbrüchen führen. Erwartungsgemäß brechen die schwächsten Bindungen am ehesten und das resultierende Fragmentspektrum ist damit von der Struktur der Substanz abhängig. Durch die Analyse von Fragmentspektren können bei bekannter Struktur die zugrundeliegenden Fragmentierungswege ermittelt werden. Dadurch lassen sich aus dem Fragmentspektrum einer unbekannt Substanz Rückschlüsse auf ihre Struktur ziehen.

Ein Beispiel für die Möglichkeiten, die sich durch die Fragmentierung in der Ionenfalle des Massenspektrometers bieten, zeigt Abbildung 2.4-2. Dargestellt ist ein Ausschnitt des Chromatogramms eines Carob-Extraktes sowie die Massenspektren zweier enthaltener Flavonolglykoside. Beide Substanzen weisen ein sehr ähnliches UV-Spektrum auf, so dass eine Differenzierung als Quercetin- oder Myricetinderivat bei kleinen oder überlagerten Peaks nicht mehr möglich ist. Die Massen der Ionen sind ebenfalls in beiden Fällen gleich, aber aus der Fragmentierung lassen sich die entsprechenden strukturellen Unterschiede ersehen. In beiden Fällen werden jeweils die Zuckerreste als Neutralteilchen abgespalten (Massendifferenz 162 entsprechend der Molekularmasse einer Hexose, 180 Dalton, minus des bei der Bindung verlorenen Wassers mit 18 Dalton; Massendifferenz 146 entsprechend der Molekularmasse einer Desoxyhexose, 164 Dalton, minus des bei der Bindung verlorenen Wassers mit 18 Dalton). Als Produkt-Ion erhält man das Aglykon, da die Ladung auf dem elektronegativeren Molekülteil verbleibt. Die zwei  $MS^2$ -Produkt-Ionen mit einer Masseneinheit Unterschied sind typisch für Flavonole, durch ihre charakteristischen  $MS^3$ -Fragmentspektren lässt sich die Zuordnung zusätzlich absichern.

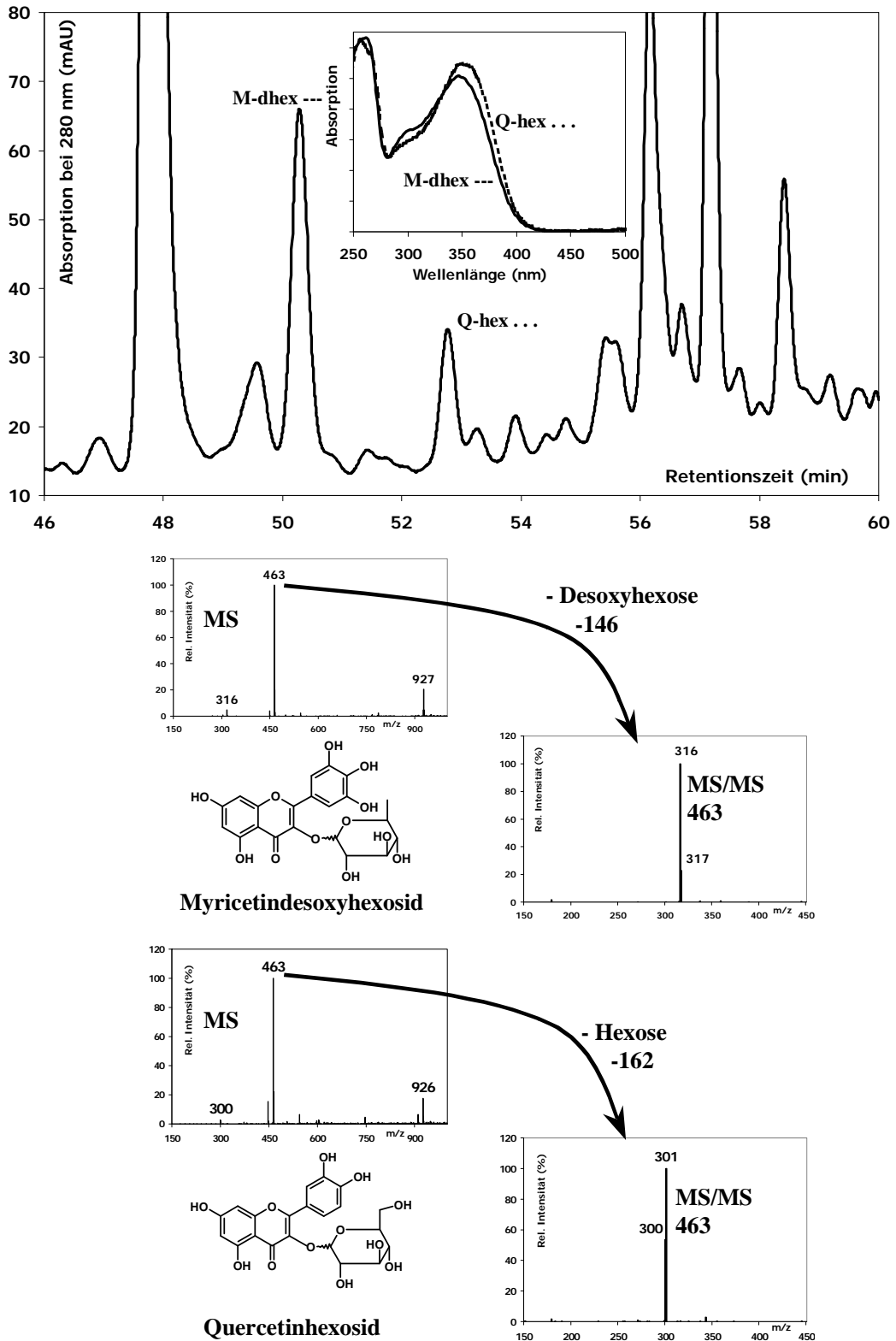


Abbildung 2.4-2: Chromatogramm eines Caromax-Extraktes. Markierte Peaks: Myricetin-desoxyhexosid und Quercetinhexosid mit zugehörigen UV-, Massen- und Fragmentspektren

## Optimierung der massenspektrometrischen Detektion

Die Messungen mit einem Massenspektrometer werden von einer Vielzahl von Parametern beeinflusst, von denen einige gezielt eingestellt und somit zur Optimierung der Detektion genutzt werden können. Dazu zählen:

- Zusammensetzung der mobilen Phase
- Fluss der mobilen Phase
- Art der Ionenquelle
- Polarität der Ionisierung
- Kapillarspannung
- Stärke des Sheath- und Auxillary-Gases
- Temperatur der Heated Capillary
- Potentialgefälle in der Ionenoptik
- Auswahl des Massenbereiches
- Energie für die Fragmentierung

Die Optimierung, das sogenannte Tuning, erfolgt üblicherweise mit Hilfe von Referenzsubstanzen, die als Lösung mit einer Spritzenpumpe dem HPLC-Fluss zudosiert werden. So kann für eine längere Zeit eine gleichbleibende Konzentration des Analyten sichergestellt und der Effekt von Parameteränderungen auf das Messsignal untersucht werden.

Die oben aufgeführten Parameter werden in vier Gruppen unterteilt: Die Bedingungen der in die Ionenquelle fließenden Lösung, der Ionisierung, des Ionentransfers und der Fragmentierung. Diese müssen unterschiedlich optimiert werden.

Die **Zusammensetzung und der Fluss des HPLC-Eluenten** werden von den Anforderungen an die chromatographische Trennung bestimmt. Bei zu hohem Fluss ist eine vollständige Verdampfung nicht mehr möglich und es kommt zu schlechten Ionisationsausbeuten. Dem kann durch „Splitten“ des Flusses vor dem Massenspektrometer begegnet werden, dadurch gehen aber auch große Anteile des Analyten für die Ionisierung verloren. In dieser Arbeit wurde der Fluss durch die Verwendung von Säulen mit geringerem Innendurchmesser (2 mm statt ursprünglich 4 oder 4,6 mm) reduziert, so dass bei niedrigerer Flussrate (300 statt 1000  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) der weitgehend gleiche lineare Fluss resultiert und die chromatographische Trennung nicht negativ beeinflusst wird. Damit wird gleichzeitig der Lösungsmittelverbrauch sowie der entstehende Eluentenabfall in der HPLC deutlich reduziert. Da die in dieser Arbeit untersuchten Polyphenole sehr hydrophil sind und auf reversed-phase Materialien nur eine geringe Retention haben, muss mit sehr wässrigem Eluenten

chromatographiert werden, d.h. mit geringem Anteil organischen Modifiers. Dies ist ungünstig für die Verdampfung durch den geringen Dampfdruck des Wassers, seine hohe Verdampfungsenthalpie und die hohe Oberflächenspannung. Dem HPLC-Eluenten wurden deshalb nach Austritt aus dem UV-DAD unmittelbar vor der ESI-Quelle mit einer zusätzlichen Pumpe 100 µl/min Methanol zudosiert, um den organischen Anteil zu steigern und dadurch die Ionisierung zu verbessern. Durch diese Maßnahmen wurden insgesamt auf Seiten der Chromatographie gute Bedingungen für eine effiziente Ionisierung der Analyten im ESI erhalten. Bedingt durch den Transfer des Eluenten vom UV-Detektor zum ESI kommt es zu einer scheinbaren Retentionszeitverschiebung zwischen UV- und MS-Signal der Peaks in den Chromatogrammen von ca. 0,1 min.

Die **Parameter der Ionisierung** hängen voneinander ab und lassen sich zum Teil nicht abrupt ändern, wie z.B. die Temperatur der Heated Capillary. Auch sind die Auswirkungen oft nicht eindeutig zu bewerten. So kann es durchaus günstig sein, eine etwas schlechtere Intensität in Kauf zu nehmen, wenn dadurch aber das Signal/Rausch-Verhältnis verbessert wird. Oder es muss für die Ionisierung ein Kompromiss gefunden werden, der zwischen beginnender Fragmentierung der Analyten (z.B. aufgrund einer Erhöhung der Kapillartemperatur) und einer Dimerisierung oder Adduktbildung (z.B. aufgrund zu geringer Kapillartemperatur) liegt. Dies hängt von der jeweiligen Fragestellung ab und kann nicht vollständig automatisiert durchgeführt werden, weshalb für diesen Bereich des Massenspektrometers immer eine manuelle Optimierung erforderlich ist. Mit Ausnahme der Anthocyane wurden alle in der vorliegenden Arbeit geschilderten Untersuchungen mit negativer Ionisierung durchgeführt. Die negative Ionisierung zeigte für Polyphenole eine selektivere Ionisation, geringeren Hintergrund unspezifischer Ionen und damit ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis, größere Signalintensitäten und eine robustere Detektion als mit positiver Ionisierung. Es wurden nur einfach geladene Ionen detektiert.

Die **Bedingungen des Ionentransfers** sind von der eigentlichen Ionisierung und auch voneinander unabhängig, so dass in diesem Bereich automatisch optimiert werden kann. Dabei werden die 5 Parameter Capillary Voltage, First Octapole Offset, Interocapole Lens Voltage, Second Octapole Offset und Coarse Trap DC nacheinander optimiert, indem in einem vorgegeben Bereich das Messsignal verändert und die Einstellung mit der höchsten Ionenintensität ausgewählt wird. Dies kann manuell simuliert werden, um z.B. die Einstellungen robuster zu machen.

Die Optimierung des Massenspektrometers wurde für die vorliegende Arbeit mit Referenzlösungen aus verschiedenen Verbindungsklassen durchgeführt. Mit jeder Einzel-

substanz bzw. einem Mischstandard wurde die Optimierung bei einer Zusammensetzung des HPLC-Eluenten, die jeweils zur Retentionszeit des entsprechenden Analyten herrscht, durchgeführt. Die resultierenden besten Einstellungen für jede Substanz wurden dann genutzt, um Einstellungen zu finden, die für alle Substanzen gleichermaßen ein gutes Ergebnis bringen. Dabei wurde zwischen einem guten Signal/Rausch-Verhältnis, einer guten Intensität und einem Kompromiss zwischen Fragmentierung und Adduktbildung abgewogen, um eine gute Ionisierung für alle Analyten gleichermaßen zu finden.

Die **Optimierung der Fragmentierung** beschränkt sich im wesentlichen auf die Auswahl der Fragmentierungsenergie und des Massenbereiches (Intervall um die resultierende Masse). Die Fragmentierungsenergie sollte gerade groß genug sein, um alle Analytmoleküle zu fragmentieren. Sie hängt von der Bindungsstärke im Molekül ab und kann daher für verschiedene Verbindungsklassen unterschiedlich sein. Der Massenbereich sollte so groß sein, dass alle Analyten auch erfasst werden, benachbarte Massen aber möglichst nicht interferieren.

### **Reproduzierbarkeit der Fragmentspektren**

Verglichen wurden die Fragmentspektren von Catechin sowie der 6 dominanten dimeren und trimeren Proanthocyanidine aus Gerstenmalz, die im Laufe dieser Arbeit aufgenommen wurden. Die in den Fragmentspektren auftretenden Massen sind identisch, die Intensitäten der Hauptfragmente zeigen eine größte Abweichung von ca.  $\pm 5\%$  im Verlauf von vier Jahren bei Verwendung des gleichen Gerätes und der gleichen Messparameter am Massenspektrometer. Damit liegt eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Fragmentspektren vor, die eine notwendige Grundlage für die Erstellung von Vergleichsspektren und entsprechenden Datenbanken ist.

### **Quantifizierung mit dem Ionenfallen-Massenspektrometer**

Für die Quantifizierung einzelner Analyten kann neben dem Signal des UV-Detektors auch das massenspektrometrische Signal herangezogen werden. Die Nachteile der UV-Detektion sind neben der begrenzten Empfindlichkeit die Grenzen bei der Quantifizierung sich überlagernder oder nicht getrennter Peaks. Die Absorptionsbanden im UV-Vis-Bereich sind meistens recht breit, so dass sich die Signale von Substanzen überlagern, auch wenn diese unterschiedliche Absorptionsmaxima haben. Durch seine gute Massenselektivität bietet das Massenspektrometer in diesem Punkt einen großen Vorteil, da co-eluierende Verbindungen nebeneinander bestimmt werden können, wenn ihre Massen unterschiedlich sind. Bei co-eluierenden Verbindungen

gleicher Masse aber unterschiedlichen Fragmentspektrums können die resultierenden Ionen des  $MS^2$  herangezogen werden. Bei Flavonoiden ist das Massenspektrometer mit der in dieser Arbeit beschriebenen Methode in der Regel empfindlicher als der UV-Detektor, eine Ausnahme sind die Phenolcarbonsäuren, für die wegen ihrer schlechten Ionisierbarkeit nur eine geringe Empfindlichkeit erreicht wird, sowie die monomeren Flavanole und die Flavonolaglykone.

Die unterschiedlichen MS-Gerätetypen eignen sich nicht alle gleich gut für quantitative Bestimmungen. Während Quadrupol- und Triplequad-Geräte gut für die Quantifizierung geeignet sind, wird die Stärke der Ionenfallen-Geräte in der Möglichkeit zur Gewinnung struktureller Informationen gesehen, während quantitative Bestimmungen nur mit Einschränkungen möglich sind (TRALDI ET AL. 2006). Deshalb wurde für die vorliegende Arbeit bestimmt, inwieweit unter den gegebenen Voraussetzungen eine Quantifizierung möglich und wie genau sie ist. Für eine empfindliche UV-Quantifizierung einer Vielzahl strukturell ähnlicher Substanzen, wie z.B. den Proanthocyanidinen im Malz, ist eine vollständige Trennung notwendig. Diese ist jedoch mit großem Aufwand verbunden und praktisch nur durch die Kopplung mehrerer Fraktionierungs- und Trennschritte auf unterschiedlichen Phasensystemen erreichbar. Die gute Selektivität des Massenspektrometers ermöglicht eine Quantifizierung auch ohne vollständige Trennung, jedoch wird prinzipbedingt durch die Einflüsse von Matrixkomponenten und andere Störungen die Genauigkeit der UV-Detektion meist nicht erreicht. Durch die bessere Empfindlichkeit für Proanthocyanidine sind mit dem Massenspektrometer aber auch Substanzen quantifizierbar, für die aufwendige Anreicherungsverfahren vor einer UV-Quantifizierung nötig wären.

Entscheidend für eine gute Quantifizierung mit dem Massenspektrometer ist eine stabile und reproduzierbare Ionisierung, die möglichst frei von Störeinflüssen ist. Nur ein Teil der in der ESI-Quelle versprühten Analyten wird ionisiert, und die Ausbeute bei der Erzeugung der Ionen hängt von mehreren Faktoren ab. Neben den physikalisch-chemischen Eigenschaften des Analyten selber spielen insbesondere co-eluierende Analyten oder Matrixkomponenten eine Rolle. Werden diese auch ionisiert, so kommt es zu einer Konkurrenz um die im Spray übertragenen Ladungen. Die Ionisierung einer einzelnen Substanz hängt dann von den Konzentrationsverhältnissen ab. Es kann dabei zu einer Unterdrückung oder Verstärkung der Ionisierung kommen. Ebenfalls haben Puffersalze und andere im HPLC-Strom befindliche Ionen einen Einfluss, da sie ebenfalls um die Ladungen konkurrieren und zur Adduktbildung führen können, so dass sich in den Massenspektren neben den Molekül-Ionen auch verschiedene Addukte finden und sich somit die Intensität auf mehrere Signale verteilt. Darüberhinaus sind die Bedingungen im Spray nicht immer konstant, so dass die Signalintensität insgesamt schwankt.

Diesen Einflüssen kann man begegnen, indem man isotop substituierte Analyten als internen Standard zur Quantifizierung einsetzt. Sie unterscheiden sich in ihrer Masse, so dass die Signale im Massenspektrum getrennt detektiert werden, haben aber die gleichen chemischen Eigenschaften und co-eluieren somit im Chromatogramm. Alternativ kann eine strukturell und chemisch ähnliche Substanz dem HPLC-Fluss vor dem Eintritt in die Ionenquelle in konstanter Konzentration zudosiert werden. Der Einfluss auf die Signalstärke durch mögliche Störbedingungen ist für beide Substanzen, den eigentlichen Analyten sowie die Referenzsubstanz im wesentlichen gleich, so dass für die Quantifizierung das Verhältnis von Analyt zu Standard eingesetzt werden kann. Eine gegenseitige Beeinflussung des Analyten und des Standards bei der Konkurrenz um die Ionisierung wird damit nicht ausgeschlossen, aber der Effekt von Störeinflüssen bei der Quantifizierung stark vermindert.

Für die in dieser Arbeit untersuchten Analyten stehen leider keine geeigneten Referenzsubstanzen zur Verfügung, so dass die Quantifizierung über diese Methode nicht möglich ist. Dennoch ist die Intensität des Signals ein quantitatives Maß, und es war zu klären, wie dieses von der Konzentration der Analyten in Höhe und Reproduzierbarkeit abhängt.

Um die Möglichkeiten zur Quantifizierung mittels des für diese Arbeiten genutzten Ionenfallen-Massenspektrometers zu prüfen, wurde daher ein Vergleich zwischen dem UV-Signal und der Intensität des Molekül-Ions gezogen. Dazu wurden die Peakhöhen nach Integration des UV-Chromatogramms und die Intensität des MS-Signals der jeweiligen Massenspur am Peakmaximum nach der üblichen 7-Punkt-Gauss-Glättung verglichen. Über das UV-Signal steht damit eine genaue Quantifizierung zur Verfügung. Dabei ergeben sich für unterschiedliche Analyten stark abweichende Ergebnisse.

Abbildung 2.4-3 zeigt den Zusammenhang zwischen MS-Intensität und Konzentration für verschiedene Standardverbindungen. Es ergeben sich für die untersuchten Substanzen über den betrachteten Konzentrationsbereich eine gute Linearität des MS-Signals und akzeptable Abweichungen. Abbildung 2.4-4 zeigt den Zusammenhang zwischen MS-Signalintensität und UV-Signal für die dimeren und trimeren Proanthocyanidine im Malz. Auch hier ergibt sich eine gute Linearität und eine geringe Standardabweichung.

Im Kontrast dazu steht die Abhängigkeit, wie sie anhand von Catechin und Epicatechin in einer Standardlösung über einen großen Konzentrationsbereich bestimmt wurde. Zwar ist eine eindeutige Korrelation des MS-Signals mit der Konzentration gegeben, es herrscht jedoch ein nichtlinearer Zusammenhang über den ganzen Konzentrationsbereich, und die Standardabweichung liegt geringfügig unter 10% (hier nicht gezeigt).



Die Ergebnisse zeigen, dass mit Hilfe des Ionenfallen-Massenspektrometers eine Quantifizierung möglich ist, diese aber im Zusammenhang mit dem Analyten jeweils im Einzelfall betrachtet werden muss. Man kann nicht davon ausgehen, dass die Kalibrationsfunktion linear ist. Sie sollte daher jeweils über den in Frage kommenden Konzentrationsbereich bestimmt werden.

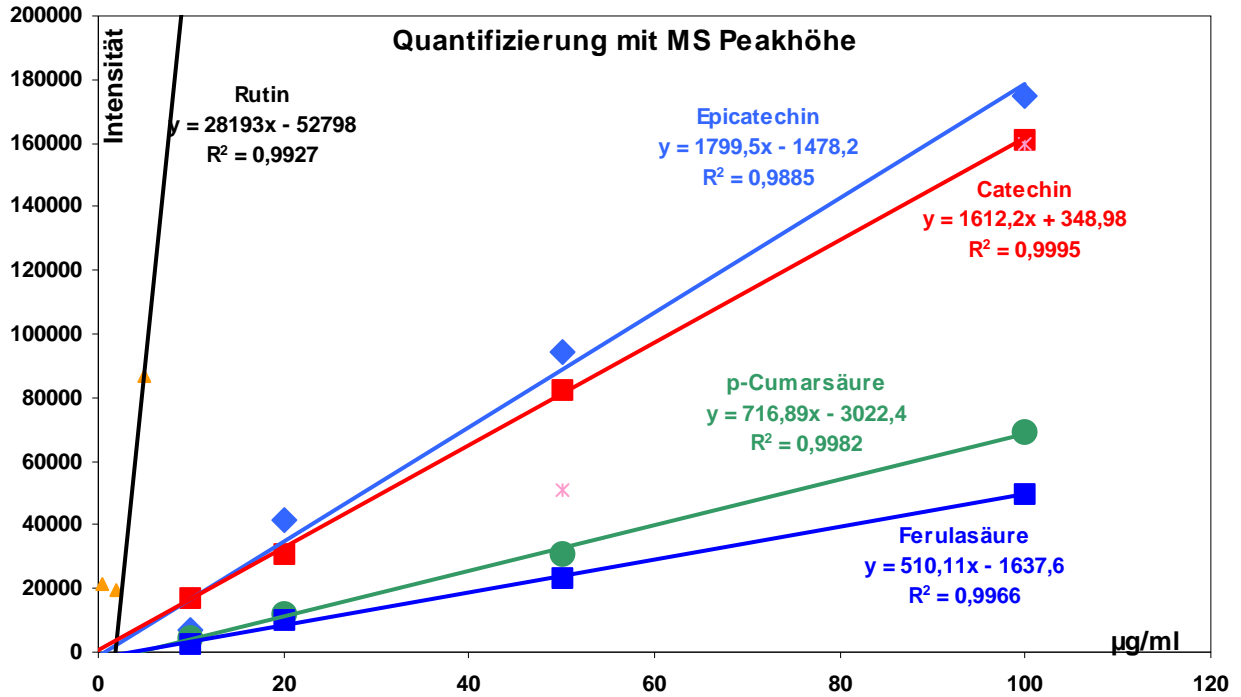


Abbildung 2.4-3: Quantifizierung von Standardverbindungen mit der MS-Peakhöhe

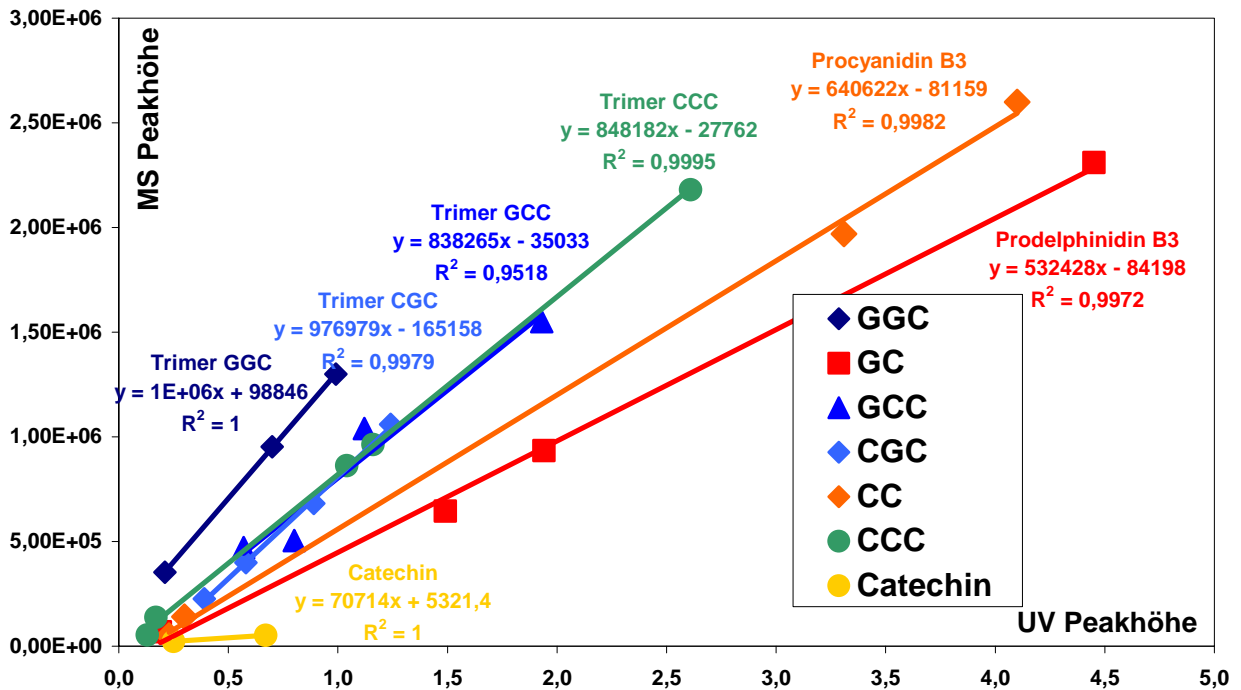


Abbildung 2.4-4: Vergleich der Peakhöhen des MS- und des UV-Signals für Proanthocyanidine im Malz

## **Strukturaufklärung und Identifizierung mit Fragmentspektren**

Die Fragmentierung von Analyten kann bei der Ionisierung, beim Transfer der Ionen durch die Ionenoptik sowie in der Ionenfalle selber stattfinden. Die Methodenentwicklung bei der massenspektrometrischen Detektion, also die Untersuchung der die Ionisierung, den Ionen-Transfer und die eigentliche Messung beeinflussenden Parameter, zielt in der Regel darauf ab, die Ionen ohne Fragmentierung in die Ionenfalle zu bringen. Dadurch vereinfacht sich die Interpretation der Fragmentspektren und individuelle Substanzen können durch Isolieren der einzelnen Masse gezielt fragmentiert werden.

Einzelne Verbindungen erzeugen spezifische Fragmentmuster, da der Bindungsbruch strukturabhängig ist. Die schwächsten Bindungen eines Moleküls sind die, die am leichtesten und schnellsten brechen, die Fragmentierung hängt aber auch von der Stelle und Richtung des Stoßes mit den Heliumatomen ab. Bei Vorliegen einer einzelnen mit Abstand schwächsten Bindung im Molekül kommt es dann zum Bruch praktisch nur dieser Bindung. Wenn mehrere schwache Bindungen vorhanden sind, kann es an der einen oder der anderen zum Bruch kommen. Da bei jeder Fragmentierung von Ionen eine Vielzahl gleichartiger Moleküle in der Ionenfalle ist, gibt das resultierende Fragmentspektrum die jeweiligen Wahrscheinlichkeiten, mit denen eine der Bindungen bricht, als Verhältnis der Intensitäten der Produkt-Ionen wieder. Das Fragmentspektrum ist somit eine Überlagerung vieler individueller Molekül-Fragmentierungen und gibt die Statistik der Bindungsbrüche an.

Nach dem Bruch eines Moleküls verbleibt die Ladung, je nach der Elektronegativität der Bruchstücke, auf einem der Teile. Nur dieses kann als Produkt-Ion im Fragmentspektrum nachgewiesen werden, das ungeladene Teilchen wird als „neutral loss“ bezeichnet und seine Masse ergibt sich aus der Differenz des Ausgangs-Ions („Parent Ion“) und eines der Produkt-Ionen. Ein Fragment ist aber nicht unbedingt stabil und kann durch weitere Stöße oder Umlagerungen auch teilweise weiterfragmentiert werden. Zudem besteht, wie oben beschrieben, die Möglichkeit, die Masse eines Fragmentes zu isolieren und dieses Molekül in einer nächsten Stufe wieder zu fragmentieren.

Aus dem resultierenden Fragmentspektrum kann somit auf zugrundeliegende strukturelle Eigenschaften geschlossen werden. Dazu kommen meist weitere Informationen über die Retentionszeit und das UV-Spektrum der Substanz sowie das Verhalten während der Probenvorbereitung und -aufarbeitung.

## Fragmentierung von Proanthocyanidinen

Die HPLC-Trennung und massenspektrometrische Detektion werden von vielen Autoren zur Analyse von Proanthocyanidinen eingesetzt (ROEDER ET AL. 1995, ROEDER 1997, PICINELLI ET AL. 1997, HAMMERSTONE ET AL. 1999, WHITTLE 1999, LAZARUS ET AL. 1999, FULCRAND ET AL. 1999, PÄTZOLD 1999, FRIEDRICH 2000, FRIEDRICH ET AL. 2000, YANG UND CHIEN 2000, PRIOR ET AL. 2001, PENG ET AL. 2001, OSSIPOVA ET AL. 2001, WOLLGAST ET AL. 2001, SVEDSTRÖM ET AL. 2002, KINITZ UND MELLENTIN 2002, FLAMINI 2003, GU ET AL. 2003A, GU ET AL. 2003B, KRUEGER ET AL. 2003, MONAGAS ET AL. 2003, GU ET AL. 2004, WOLLERSEN 2004). Durch die verstärkte Untersuchung der Polyphenole und die weitere Verbreitung der HPLC-MS in den letzten Jahren ist hier eine kaum zu überblickende Fülle an Literatur vorhanden. Die Identifizierung struktureller Eigenschaften der Proanthocyanidine durch massenspektrometrische Fragmentierung ist von verschiedenen Autoren beschrieben worden. Allerdings wird meist das Fragmentspektrum nur als „Fingerprint“ neben der Molekularmasse zur Identifizierung als Proanthocyanidin herangezogen, genauere strukturelle Eigenschaften wurden daraus nicht abgeleitet. Nur in wenigen Fällen wurden die Fragmentierungswege detailliert untersucht und beschrieben und die auftretenden Massen entsprechend interpretiert (KARCHESY ET AL. 1986, MA ET AL. 1997, DE RIJKE ET AL. 2006).

Genauere Untersuchungen zur Ionenfallen-Fragmentierung negativ ionisierter Proanthocyanidine in Malz wurden von Friedrich beschrieben (FRIEDRICH 2000, FRIEDRICH ET AL. 2000). Abbildung 2.4-5 und 2.4-6 zeigen als Beispiel das Fragmentspektrum von Prodelphinidin B3 (das Dimer Gallocatechin-(4 $\alpha$ →8)-Catechin) im Überblick, die Fragmente mit niedrigerer Intensität im Detail und ein Schema der wichtigsten Fragmentierungsreaktionen des Moleküls. Auffallend ist, dass die Fragmentspektren der Proanthocyanidine im Gegensatz zu denen der Flavonolglykoside eine Vielzahl unterschiedlicher Bruchstücke liefern, da keine Bindung im Molekül besonders schwach ist. Dies kann für die Analyse struktureller Eigenschaften genutzt werden. Aus den Massen der Produkt-Ionen kann demnach die Sequenz der Monomereinheiten im Proanthocyanidin angegeben werden, da die **Retro-Diels-Alder (RDA) Reaktion** (Abspaltung des B-Rings) bevorzugt in der „oberen Einheit“ stattfindet. Ebenfalls bietet der **Bruch der Interflavanbindung** die Möglichkeit, die untere und obere Einheit des Moleküls zu unterscheiden, da die obere Einheit nach der Fragmentierung eine Doppelbindung aufweist und damit 2 Masseneinheiten unter ihrer Molekularmasse detektiert werden. Daneben spielt die **Spaltung des Heterozyklus C (HRF, heterocyclic ring fission)** eine wichtige Rolle und liefert dominante Fragmente, die sich allerdings nur wenig zur Strukturaufklärung nutzen lassen. Sie ermöglicht aber bei Trimeren und höheren Oligomeren

eine Aussage über Verzweigungen im Proanthocyanidin-Molekül. Außerdem stellte Friedrich fest, dass die Fragmentierungsreaktionen bei verschiedenen verwendeten Geräten und Verfahren (FAB-MS, Thermospray, Ionenfalle) prinzipiell gleich waren, was ein Vergleich der in dieser Arbeit erhaltenen Fragmentspektren mit Spektren der Literatur bestätigt.

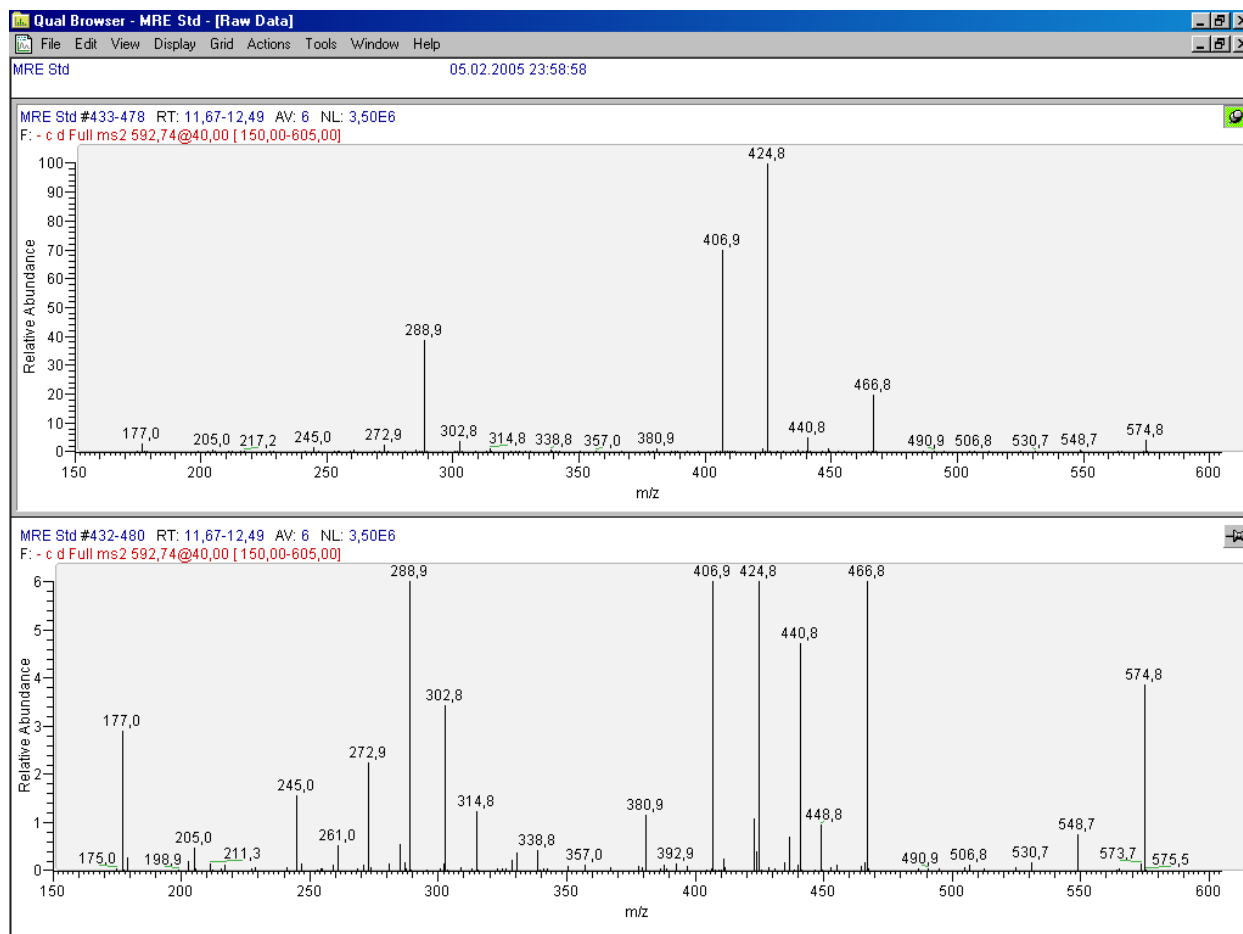


Abbildung 2.4-5: Oben: MS-Fragmentspektrum von Prodelphinidin B3. Unten: vergrößerte Darstellung der Ionen geringer Intensität (y-Achse gestreckt)

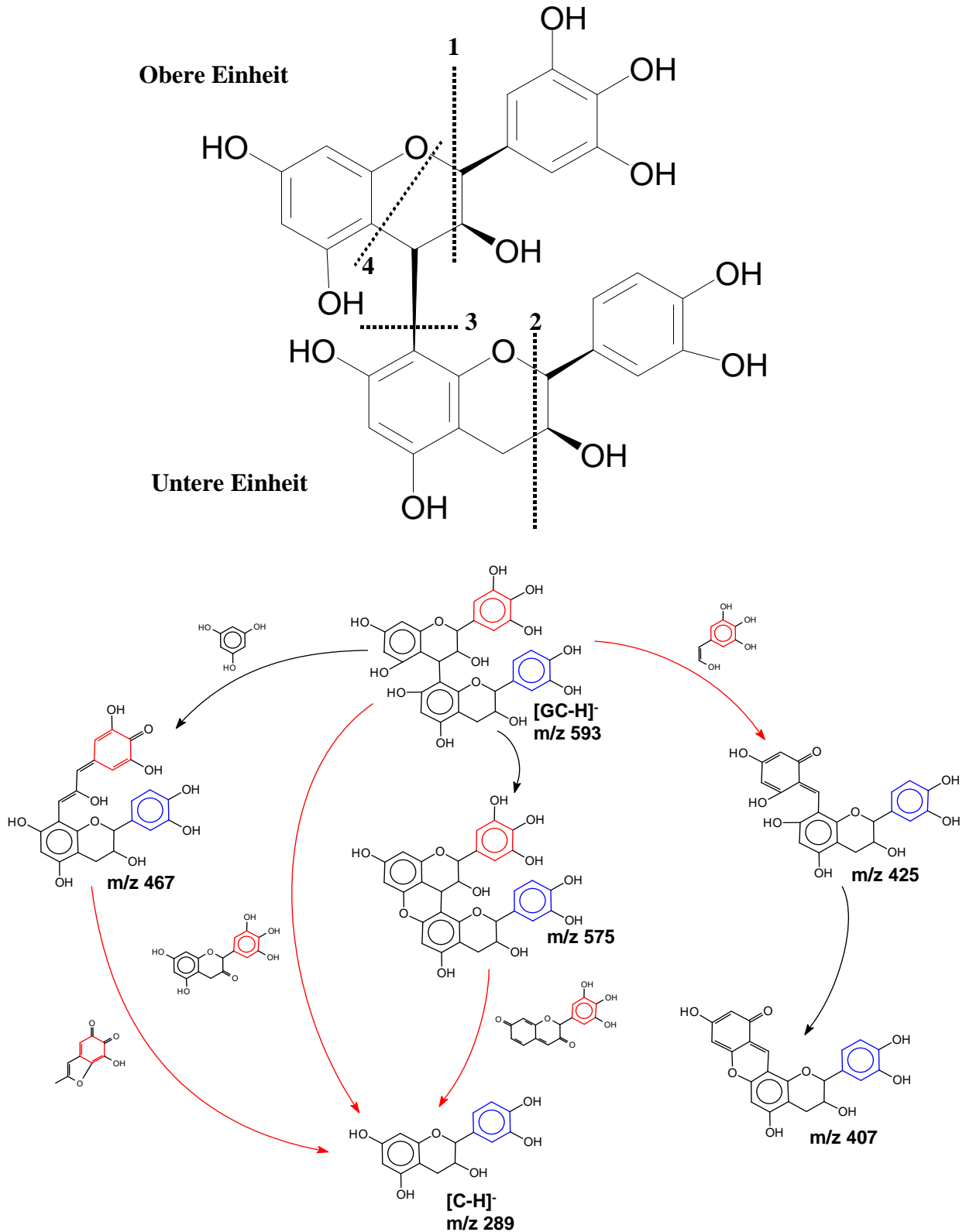


Abbildung 2.4-6: Oben: Hauptbindungsbrüche von Prodelphinidin B3. 1 und 2: RDA-Reaktion. 3: Bruch der Interflavan-Bindung. 4: HRF. Unten: Schema der MS-Fragmentierung von Prodelphinidin B3. Die Position der negativen Ladung kann nicht angegeben werden, die Strukturen sind daher für die ungeladenen Moleküle wiedergegeben

Für diese Arbeit wurden die Fragmentierungsreaktionen der Proanthocyanidine im Malz anhand der in den Fragmentspektren auftretenden Massen detailliert untersucht. Neben den drei schon von Friedrich hervorgehobenen Hauptreaktionen sowie der Abspaltung von Wasser spielen für die Fragmentierung einige weitere Reaktionen eine Rolle, wobei jeweils zwei Bindungen des Heterozyklus brechen, so dass der Ring B mit einem Teil des Heterozyklus als neutral loss abgespalten wird. Diese Reaktionen und ihre Kombinationen führen zu den im Fragmentspektrum zu beobachtenden Signalen geringerer Intensität. Bei Trimeren und Tetrameren ist aber zu beobachten, dass eine wesentlich größere Vielfalt unterschiedlicher Fragmente entsteht. Daraus lässt sich schließen, dass in Trimeren und höheren Oligomeren die Bevorzugung bestimmter Bindungsbrüche nicht mehr so ausgeprägt ist wie bei den Dimeren. Dies erschwert die Analyse der Fragmentspektren bei diesen Substanzen, zumal bei den durch die geringeren Mengen schwächeren Signalintensitäten die Detektion reproduzierbarer Spektren ohnehin erschwert ist. Dadurch lassen sich für die in dieser Arbeit gefundenen Proanthocyanidine in Malz nicht alle aus Fragmentspektren ableitbaren Strukturen angeben. Dazu kommt, dass die Fragmentierungsreaktionen und ihr Zusammenhang mit der Molekülstruktur nur an wenigen Substanzen untersucht wurden. Die Übertragbarkeit auf anders aufgebaute Proanthocyanidine ist daher nicht sicher.

Durch die Untersuchung der massenspektrometrischen Fragmentierung lassen sich einige Strukturmerkmale eines Proanthocyanidins identifizieren, es sind aber nicht alle Merkmale zugänglich, da diese keinen bekannten Einfluss auf die Fragmentierung haben, d.h. die Fragmentspektren in dieser Hinsicht unterschiedlich aufgebauter Verbindungen unterscheiden sich nicht signifikant. Die Fragmentspektren von **Catechin** und **Epicatechin** zeigen erwartungsgemäß keinen Unterschied, d.h. die Stereochemie an C-2 und C-3 hat keinen Einfluss auf die Fragmentierung. Insofern kann bei den in Proanthocyanidinen vorliegenden Monomereinheiten allein durch die massenspektrometrische Fragmentierung nicht zwischen Afzelechin und Epiafzelechin, zwischen Catechin und Epicatechin, bzw. zwischen Gallocatechin und Epigallocatechin unterschieden werden.

Dies gilt vermutlich auch für die **Stereochemie der Interflavanbindung**, was allerdings aus Mangel an Standardverbindungen nicht sicher angegeben werden kann. In den bisher beschriebenen Proanthocyanidinen finden sich in der Regel die sterisch bevorzugten Konformationen, d.h. bei Catechin- und Gallocatechin-Einheiten ist die  $4\alpha$ -Stellung zu finden, bei Epicatechin und Epigallocatechin entsprechend die  $4\beta$ -Stellung (HARBORNE UND BAXTER 1999).

Ob generell durch die massenspektroskopische Fragmentierung eine Unterscheidung zwischen einer **4→6 oder 4→8 Verknüpfung** möglich ist, kann ebenfalls aus Mangel an genügenden Referenzverbindungen bisher nicht angegeben werden. Die Fragmentspektren von 4→6 oder 4→8 verknüpften (epi)Catechin-Dimeren zeigen einen Unterschied im Verhältnis der Intensität des RDA-Produktes und seiner weiteren Wasserabspaltung. Dies wurde schon für FAB-MS Untersuchungen positiv ionisierter Proanthocyanidine beschrieben (HEMINGWAY ET AL. 1982, KARCHESY ET AL. 1986). So unterscheiden sich z.B die Fragmentspektren des Procyanidin B2 (Epicatechin-(4 $\beta$ →8)-Epicatechin) und B5 (Epicatechin-(4 $\beta$ →6)-Epicatechin) aus Kakao signifikant im Verhältnis der Peakintensitäten (Abbildung 2.4-7). Ein solcher Unterschied in den Signalintensitäten lässt sich auch für die beiden dominanten Procyanidine in Gerstenmalz beobachten, woraus mit Vorbehalt ebenfalls auf das Vorliegen einer 4→8 und einer 4→6 Verknüpfung geschlossen werden kann (Abbildung 2.4-8). Die Peakintensitäten werden aber ebenfalls von anderen Struktureigenschaften beeinflusst. Die Untersuchung einer größeren Zahl von Proanthocyanidinen bekannter Struktur ist daher notwendig, um daraus einen generellen Zusammenhang mit der Position der Verknüpfung abzuleiten.

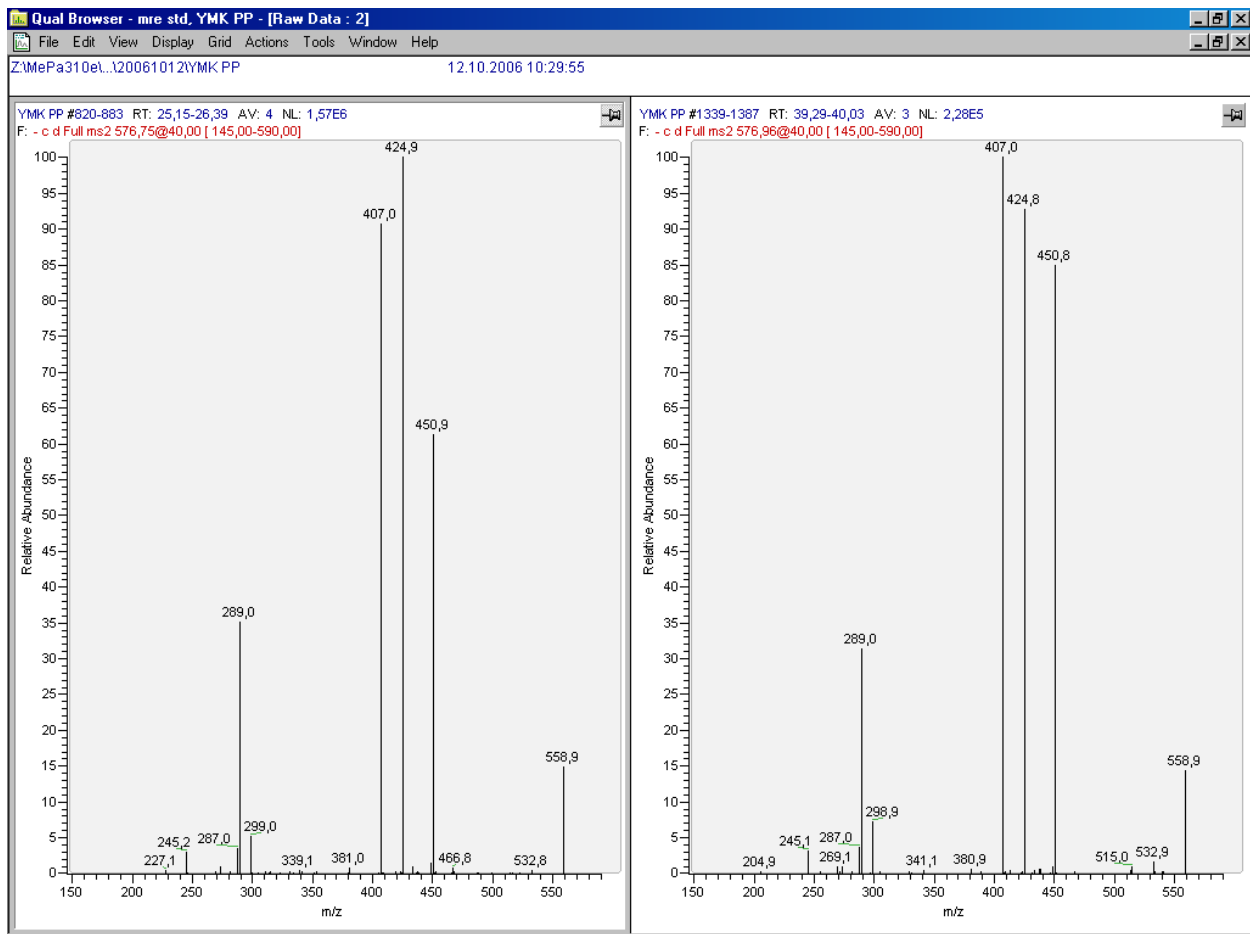


Abbildung 2.4-7: Vergleich der MS-Fragmentspektren der beiden dominanten Procyanidine (B2 mit 4→8 und B5 mit 4→6 Verknüpfung) in Kakao

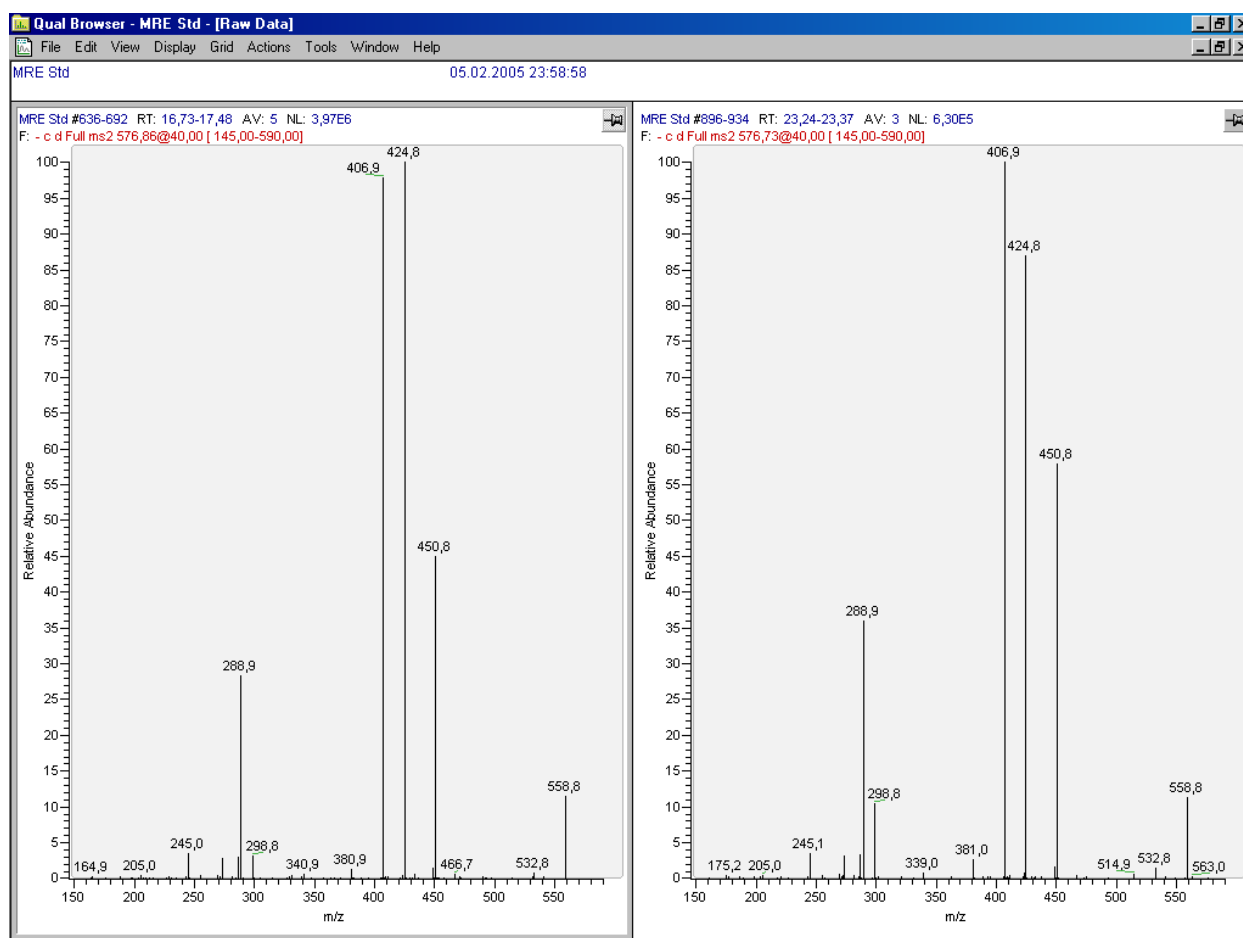


Abbildung 2.4-8: Vergleich der MS-Fragmentspektren der beiden dominanten Procyanidin-Dimere in Malz

Allerdings kann anhand theoretischer Überlegungen gezeigt werden, dass bei Trimeren und höheren Oligomeren das Vorliegen einer **Verzweigung sicher detektiert** werden kann. Die HRF stellt wie beschrieben eine der Hauptfragmentierungsreaktionen dar. Bei einem linearen Proanthocyanidin kann diese Abspaltung nur einmal erfolgen, da ansonsten der Rest des Moleküls zerbrechen würde. Bei einer Verzweigung kann diese Abspaltung entsprechend zweimal oder mehrmals erfolgen, jeweils aus den beiden oberen Monomereinheiten. Dies kann entsprechend an Proanthocyanidinen in Malz nachvollzogen werden (siehe weiter unten im Abschnitt 2.4-Proanthocyanidine in Gerstenmalz). Karchesy et al. leiteten aus dem Verhältnis der Produkt-Ionen des Interflavanbindungs-Bruchs für FAB-MS Untersuchungen positiv ionisierter Proanthocyanidine eine Unterscheidung der 4→8 und 4→6 Verknüpfung ab (KARCHESY ET AL. 1986).

Auch wenn die Strukturmerkmale der Proanthocyanidine nicht vollständig anhand der Fragmentspektren abgeleitet werden können, lassen sich bei genauerer Analyse, wie hier gezeigt, weitere strukturelle Eigenschaften sicher detektieren. Damit wird die massenspektrometrische



Fragmentierung zu einem noch wichtigeren Instrument der Strukturaufklärung von Proanthocyanidinen als bisher. Besonders wertvoll wäre die Untersuchung der Fragmentierung einer größeren Zahl unterschiedlicher Proanthocyanidine mit bekannter Struktur, um den Zusammenhang zwischen der Fragmentierung und den vorhandenen Strukturelementen abzuleiten.

### **Proanthocyanidine in Gerstenmalz**

Das Vorkommen und die Identifizierung der Proanthocyanidine in Gerste (*Hordeum vulgare* L.) und Malz sind bereits mehrfach detailliert beschrieben worden (JERUMANIS 1979, MULKAY ET AL. 1981, OTTRUP UND SCHAUMBURG 1981, BRANDON ET AL. 1982, MCMURROUGH ET AL. 1983, DERDELINCK UND JERUMANIS 1984, JERUMANIS 1985, DELCOUR 1988, JENDE-STRID 1988, EBERHARDT 1992, MADIGAN ET AL. 1994, LAM 1995, ROEDER ET AL. 1995, MCMURROUGH ET AL. 1996, ROEDER 1997, WHITTLE ET AL. 1999, FRIEDRICH 2000, FRIEDRICH ET AL. 2000).

Von den Monomeren finden sich quantitativ bedeutend nur Catechin und das Catechin-7-O-glucosid. Aber auch Epicatechin, Gallocatechin und Epigallocatechin wurden beschrieben. Die quantitativ dominierenden sechs Proanthocyanidine (zwei Dimere und vier Trimere) sind bisher im Detail strukturell beschrieben worden. Durch NMR-Messungen konnte nach Isolierung eine Strukturabsicherung durchgeführt werden, so dass die Stereochemie und die Sequenz der Monomereinheiten bekannt sind (OTTRUP UND SCHAUMBURG 1981). Daneben wurden zwei weitere Dimere und ein Trimer beschrieben. Für das mögliche Vorliegen eines Propelargonidins (mit Afzelechin als Monomereinheit) wurde ein Hinweis durch das Auftreten des entsprechenden Ions im Thermospray-Massenspektrum gegeben, eine Absicherung der Struktur konnte aus Empfindlichkeitsgründen aber nicht erfolgen (ROEDER ET AL. 1995, ROEDER 1997). Darüber hinaus konnten etwa 50 Proanthocyanidine bis zu Pentameren mittels HPLC-MS detektiert werden, für die allerdings keine genauen strukturellen Informationen vorliegen (WHITTLE ET AL. 1999). Ein typisches Chromatogramm der Proanthocyanidine mit der in dieser Arbeit beschriebenen Methode zeigt Abbildung 2.4-9.

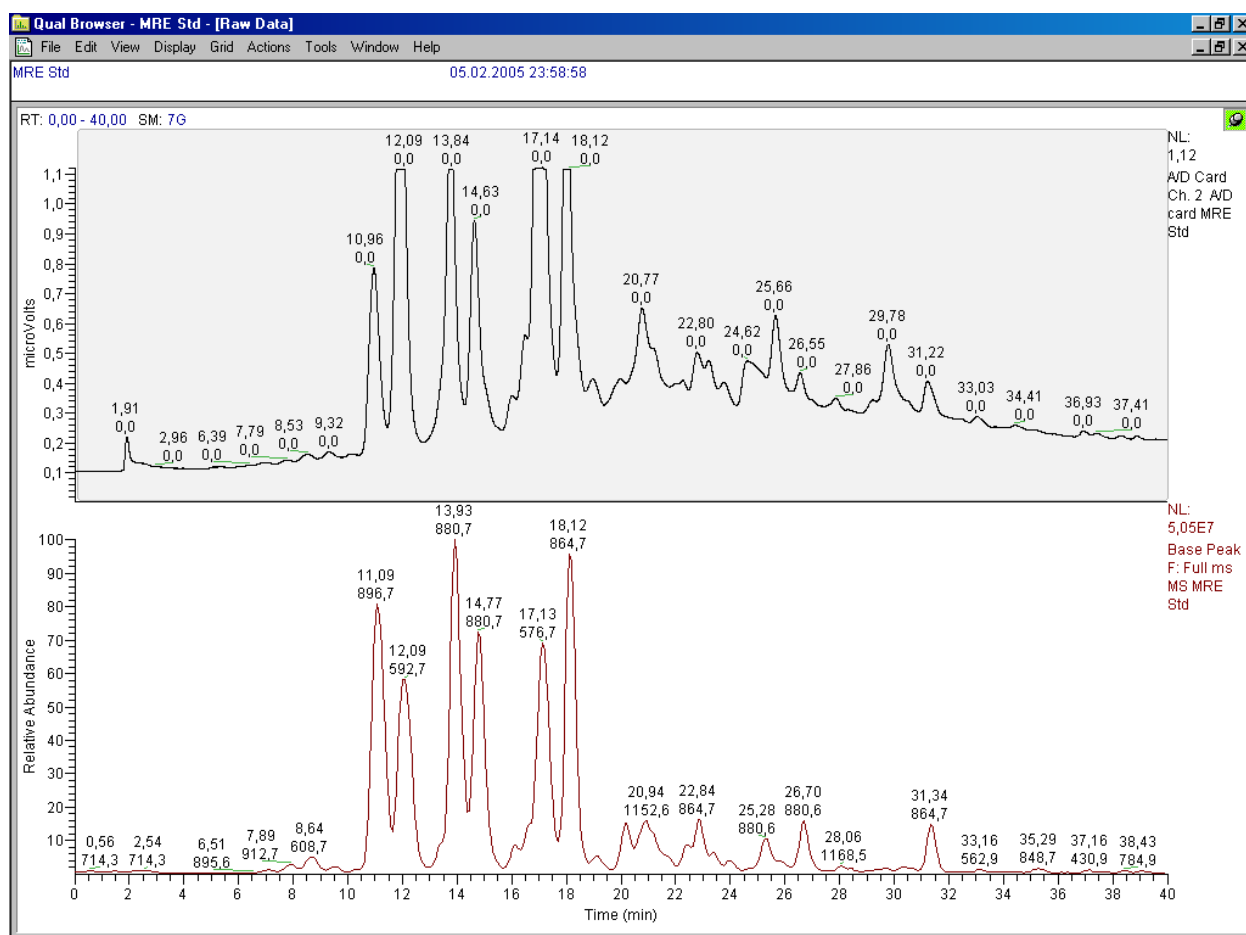


Abbildung 2.4-9: Typisches Chromatogramm eines Malzextraktes mit der hier entwickelten Methode. Oben: UV-Chromatogramm bei 280 nm. Unten: BasePeak-Darstellung der massenspektrometrischen Detektion

In dieser Arbeit wurden Malzextrakte auf das Vorkommen weiterer Proanthocyanidine untersucht. Dazu wurden in den Massenspuren, die sich aus den möglichen Kombinationen der Monomere (epi)Afzelechin, (epi)Catechin und (epi)Gallocatechin ergeben, die auftretenden Peaks auf ihre massenspektrometrische Fragmentierung überprüft. Einen Überblick über die entsprechenden Massenspuren der **dimeren, trimeren und tetrameren Proanthocyanidine**, in denen signifikante Peaks gefunden wurden, zeigen die Abbildungen 2.4-10 bis 2.4-13. Bei den Pentameren konnten aufgrund der Signalintensität und der starken Überlagerung einzelner Peaks keine aussagekräftigen Fragmentspektren erhalten werden. Aus Gründen der Übersichtlichkeit finden sich hier im Text nur jeweils Beispiele für strukturell neuartige Proanthocyanidine. Im Anhang A finden sich in den Abbildungen A1 bis A103 die Massenspuren der dimeren, trimeren und tetrameren Verbindungen jeweils einzeln und detaillierter sowie die Fragmentspektren aller ihrer signifikanten Peaks. Die Tabelle 2.4-1 am Ende dieses Abschnitts (Seite 104-106) gibt einen Überblick über die identifizierten Peaks und ihre Fragmentspektren.

## 2.4 – Ergebnisse und Diskussion – Massenspektrometrie

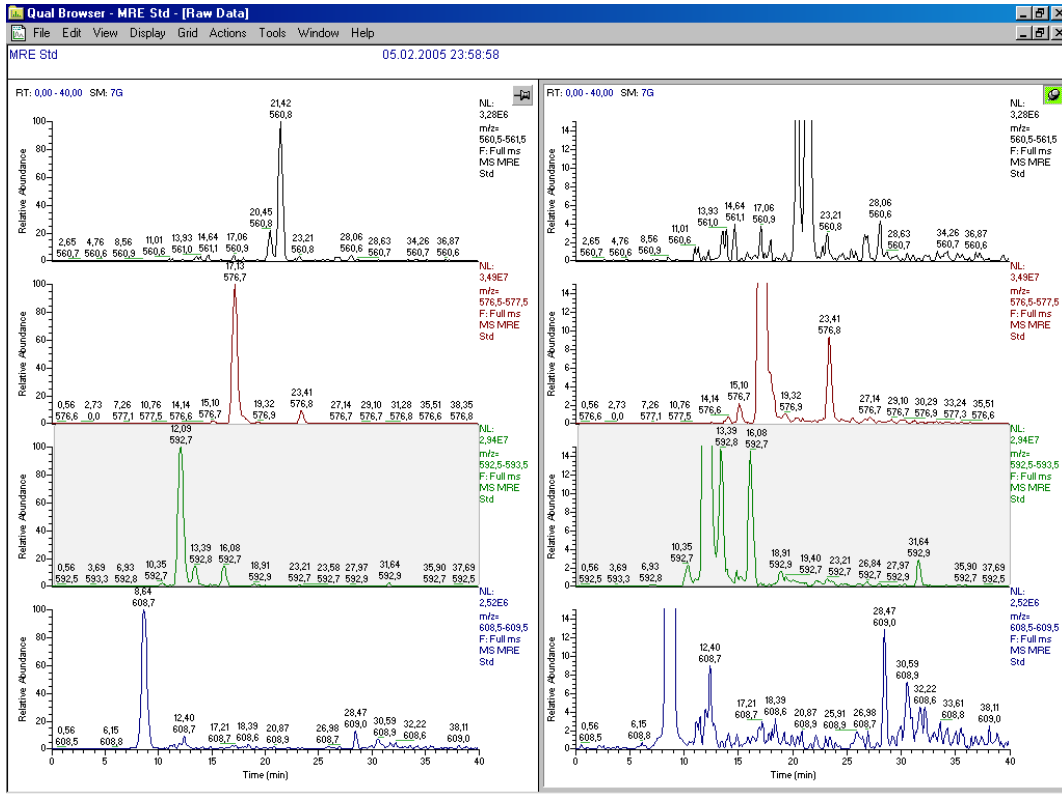


Abbildung 2.4-10: Massenspektren der dimeren Proanthocyanidine in Malz. Links: Überblick. Rechts: vergrößerte Darstellung der Signale geringerer Intensität

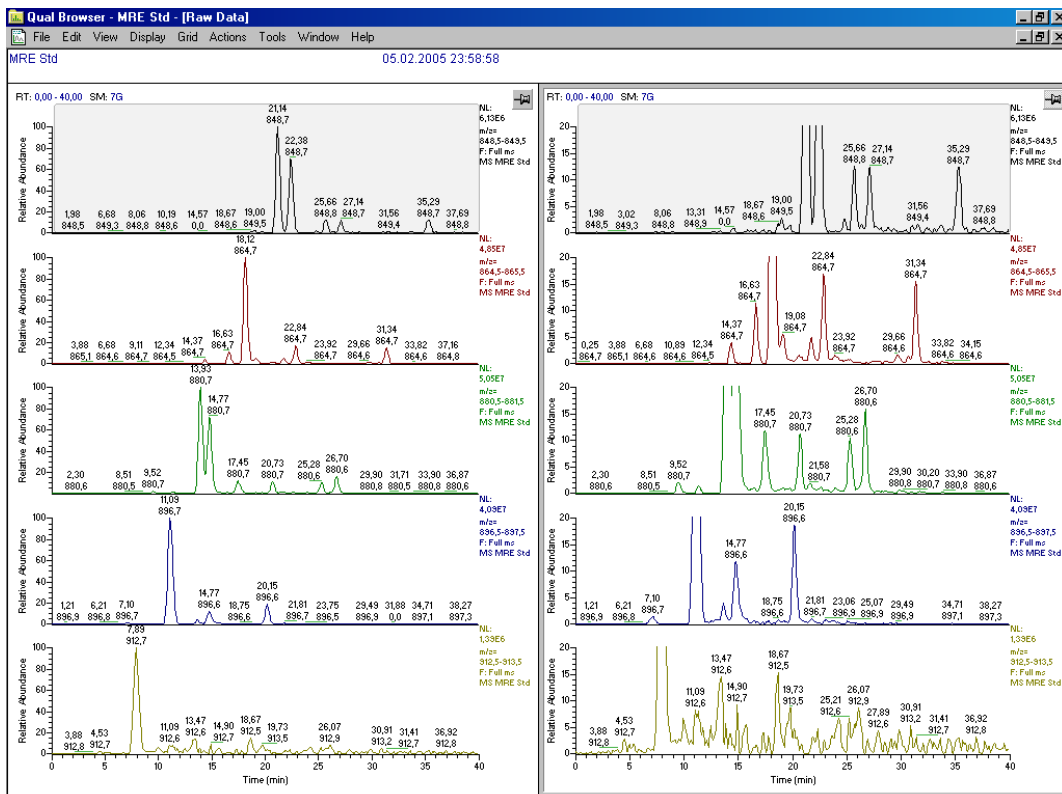


Abbildung 2.4-11: Massenspektren der trimeren Proanthocyanidine in Malz. Links: Überblick. Rechts: vergrößerte Darstellung der Signale geringerer Intensität

## 2.4 – Ergebnisse und Diskussion – Massenspektrometrie

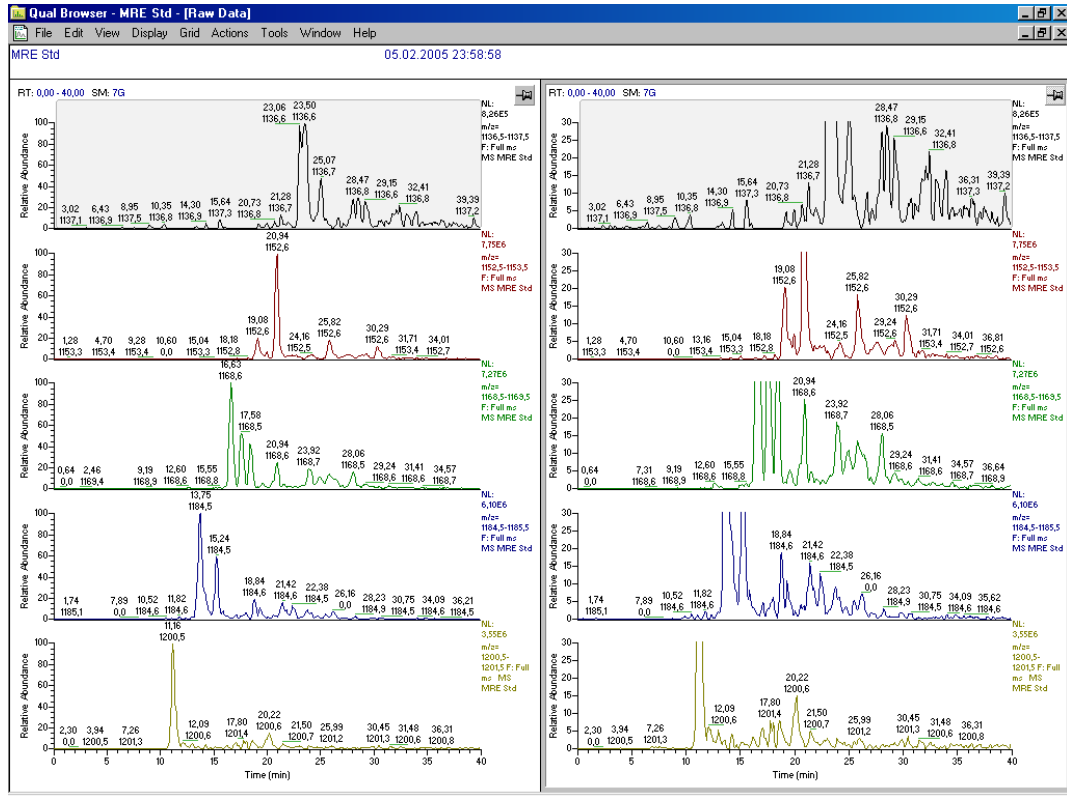


Abbildung 2.4-12: Massenspektren der tetrameren Proanthocyanidine in Malz. Links: Überblick. Rechts: vergrößerte Darstellung der Signale geringerer Intensität

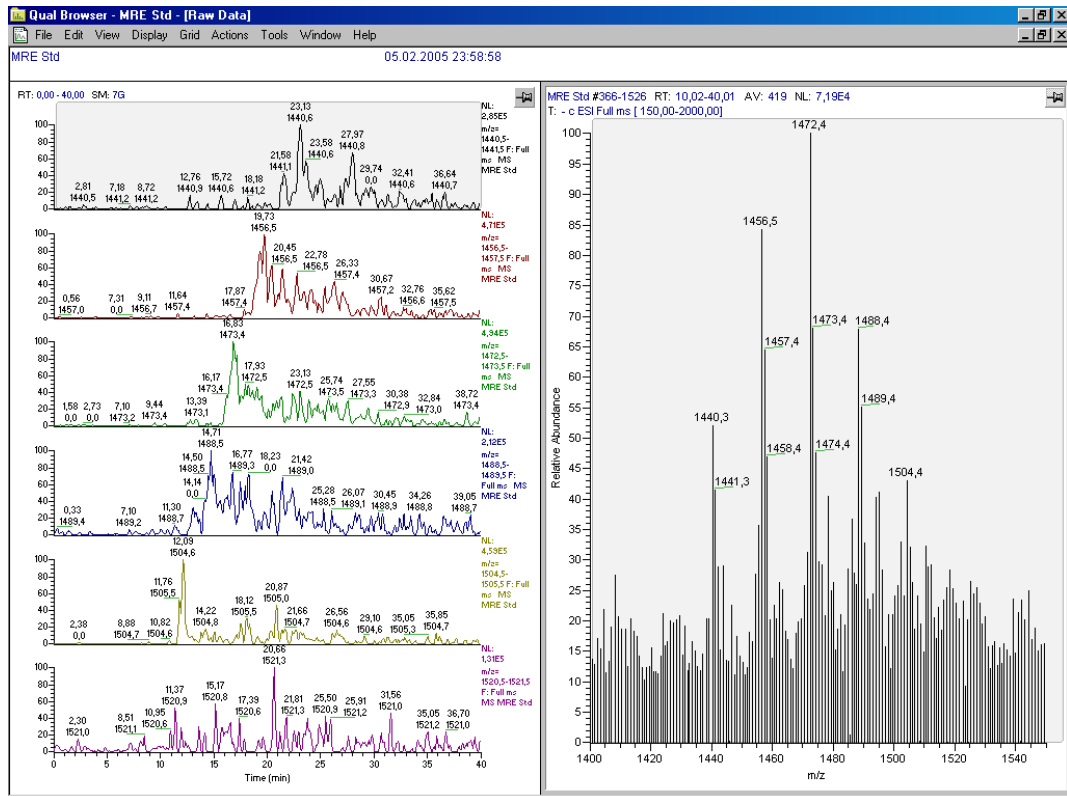


Abbildung 2.4-13: Links: Massenspektren der pentameren Proanthocyanidine in Malz. Rechts: Ausschnitt des Massenbereichs der Pentamere im Zeitraum 10-40 min

Schon im Überblick der Massenspuren fällt auf, dass jeweils innerhalb der Gruppe eines Polymerisationsgrades mit steigendem Molekulargewicht, also größerer Anzahl der phenolischen OH-Gruppen, die Retentionszeit der Verbindungen abnimmt, wie man es nach der stärkeren Hydrophilie erwarten würde. Neben den bekannten aus Catechin und Gallocatechin aufgebauten Dimeren und Trimeren mit den sechs quantitativ dominierenden Verbindungen wurden noch deutlich mehr Proanthocyanidine sicher identifiziert und strukturell charakterisiert. Es wurde dabei kein Indiz für das Vorliegen von A-Typ Proanthocyanidinen gefunden.

Den sechs in Gerste und Malz quantitativ dominierenden Proanthocyanidinen ist Catechin als untere, also Startereinheit der Biosynthese gemeinsam. Gallocatechin kommt nur als Verlängerungseinheit vor. Bei den dimeren Proanthocyanidinen konnte in dieser Arbeit neben dem dominanten Gallocatechin-Catechin-Dimer (Prodelphinidin B3) auch ein (epi)Catechin-(epi)Gallocatechin-Dimer identifiziert werden, bei dem **(epi)Gallocatechin als untere, also Startereinheit der Biosynthese**, vorkommt (Abbildung 2.4-14). Dies ist ebenfalls bei dem schon von Roeder beschriebenen (epi)Gallocatechin-(epi)Gallocatechin-Dimer der Fall (ROEDER 1997). Das Auftreten des Produkt-Ions mit  $m/z$  305 entspricht der unteren (epi)Gallocatechin-Einheit nach Bruch der Interflavanbindung, das Ion  $m/z$  287 (untere Einheit (epi)Catechin) hat nur eine sehr schwache Intensität, während das Ion  $m/z$  289 noch dem kurz vorher eluierenden Prodelphinidin B3 zugeschrieben werden kann, auf dessen Flanke der Peak aufsitzt. Das Intensitätsverhältnis der Signale bei  $m/z$  441/423 (-152 und -152-18, entspricht der RDA-Reaktion einer (epi)Catechineinheit und weiterführende Wasserabspaltung) und bei  $m/z$  425/407 (-168 und -168-18, entspricht der RDA-Reaktion einer (epi)Gallocatechineinheit und weiterführende Wasserabspaltung) spricht ebenso für (epi)Gallocatechin als untere Einheit, da die RDA-Reaktion bevorzugt in der oberen Einheit stattfindet. Es wäre wünschenswert, hier noch eine bessere chromatographische Trennung der beiden Verbindungen mit  $m/z$  593 zu erreichen, um den Einfluss des mengenmäßig dominanten Prodelphinidin B3 auf die Fragmentierung zu unterdrücken.

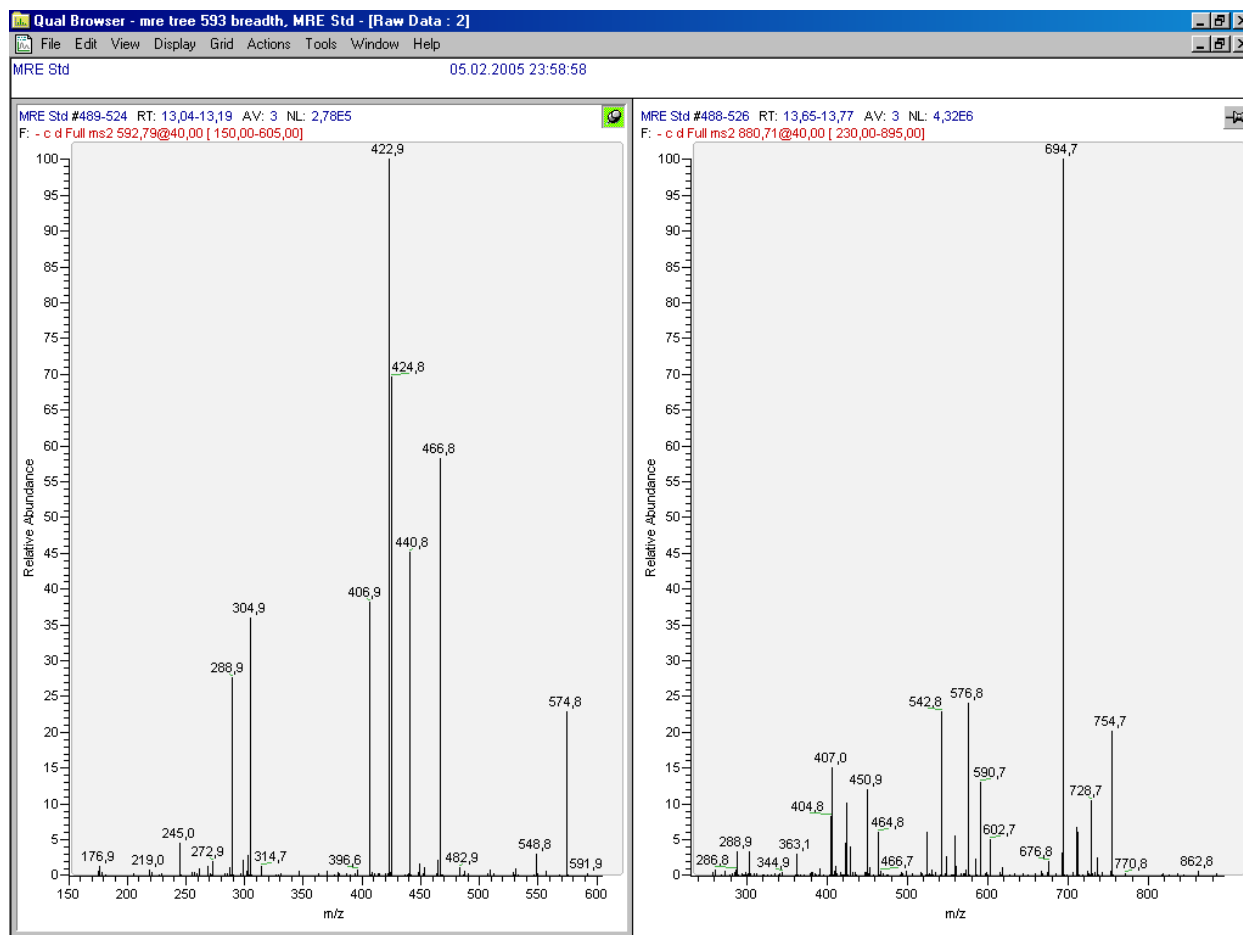


Abbildung 2.4-14: Links: Fragmentspektrum des CG-Dimers bei 13,4 min. Rechts: Fragmentenspektrum des dominanten co-eluierenden Trimers mit m/z 881

Die schon von anderen Autoren vermuteten **Propelargonidine** (MULKAY ET AL. 1981, MCMURROUGH ET AL. 1983), also Proanthocyanidine mit einer (epi)Afzelecheneinheit, konnten anhand der Fragmentspektren erstmals sicher identifiziert werden. Abbildungen 2.4-15 und 2.4-16 zeigen die Massenspuren und Fragmentspektren der zwei Dimere und der zwei dominanten Trimere, die neben (epi)Catechin auch jeweils eine (epi)Afzelecheneinheit enthalten. Aus den Fragmentspektren lässt sich die Sequenz der Einheiten eindeutig ableiten: Für das Dimer bei 20,5 min ergibt sich aus m/z 409 (-152, entspricht der RDA-Reaktion einer (epi)Catechineinheit) und m/z 287 (obere (epi)Catechineinheit nach Spaltung der Interflavanbindung) ein (epi)Catechin-(epi)Afzelecheneinheit-Dimer (die RDA-Reaktion ist in der oberen Einheit bevorzugt). Analog ergibt sich für das Dimer bei 21,4 min aus m/z 425/407 (-136 und -136-18, entspricht der RDA-Reaktion einer (epi)Afzelecheneinheit) und m/z 289 (untere (epi)Catechineinheit nach Spaltung der Interflavanbindung) ein (epi)Afzelecheneinheit-(epi)Catechineinheit-Dimer. Das hier auftretende Ion bei m/z 273 ist dem Fragment nach doppelter RDA-Reaktion (561-152-136), also den zwei verknüpften A-Ringen, zuzuordnen und lässt sich auch in nahezu allen anderen Dimerenspektren

beobachten. Für das Trimer bei 21,1 min ergibt sich aus  $m/z$  561/559 (entspricht einem unteren bzw. oberen Dimer mit einer (epi)Catechin- und einer (epi)Afzelecheneinheit) ein (epi)Catechin-(epi)Afzelechin-(epi)Catechin-Trimer. Für das Trimer bei 22,4 min ergibt sich entsprechend aus  $m/z$  559 (entspricht einem oberen Dimer mit einer (epi)Catechin- und einer (epi)Afzelecheneinheit) und dem Fehlen des Ions bei  $m/z$  561 ein (epi)Afzelechin-(epi)Catechin-(epi)Catechin-Trimer. Die anderen in den Fragmentspektren auftretenden Signale sind ebenfalls in allen Fällen mit diesen Strukturen konsistent. Mit dem (epi)Catechin-(epi)Afzelechin-Dimer liegt ein weiteres Beispiel vor, dass nicht ausschließlich Catechin als Startereinheit der Biosynthese vorkommt.

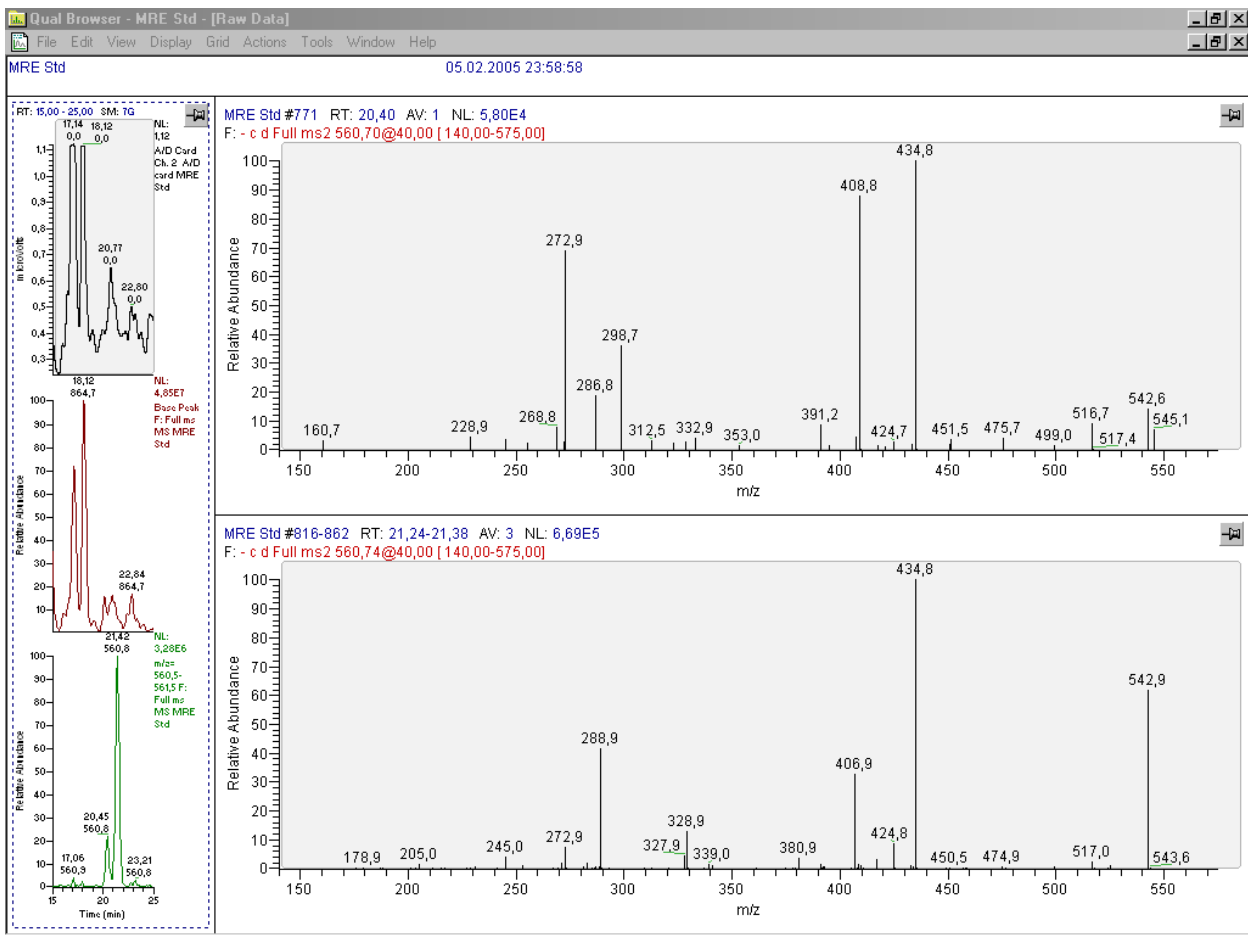


Abbildung 2.4-15: Fragmentspektren der dimeren Propelargonidine mit  $m/z$  561 bei 20,5 min (oben) und 21,4 min (unten)

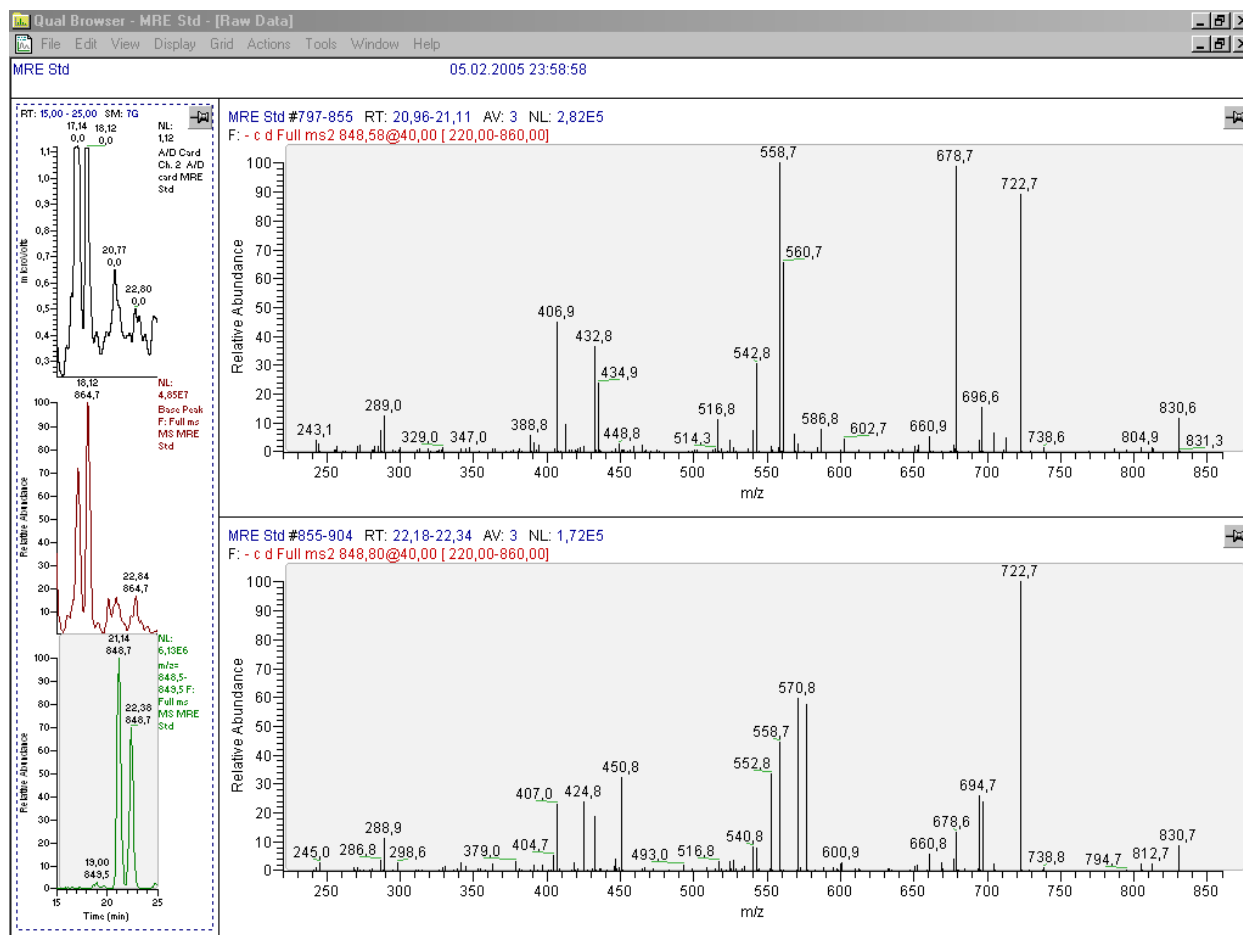


Abbildung 2.4-16: Fragmentspektren der trimeren Propelargonidine mit  $m/z$  849 bei 21,1 min (oben) und 22,4 min (unten)

Darüber hinaus konnte ein Dimer detektiert werden, dessen Sequenz durch das resultierende Fragmentspektrum als **(epi)Afzelechin-(epi)Gallocatechin** identifiziert werden kann (Abbildung 2.4-17). Bei der Identifizierung ist zu beachten, dass dieses Dimer dieselbe Masse aufweist wie das quantitativ dominierende Catechin-Catechin-Dimer Procyanidin B3, aber mit einem wesentlich schwächeren Signal detektiert wird. Lediglich die Position einer OH-Gruppe im Molekül ist unterschiedlich, dadurch ist auch die Retentionszeit der beiden Verbindungen kaum verschieden. Das Fragmentspektrum zeigt aber eindeutig die aufbauenden Monomereinheiten sowie ihre Sequenz. Aus  $m/z$  273 und 303 ergeben sich (epi)Afzelechin als untere und (epi)Gallocatechin als obere Einheit. Die Signale bei  $m/z$  425/407 können der beginnenden Flanke des Procyanidin B3-Peaks zugeschrieben werden, da es sich um die Produkte einer RDA-Spaltung in einer Catechineinheit handelt. Hier wäre ebenfalls eine bessere chromatographische Trennung wünschenswert. Auch das Vorkommen dieser Verbindung zeigt, dass (epi)Gallocatechin als Startereinheit in der Biosynthese vorkommen kann.



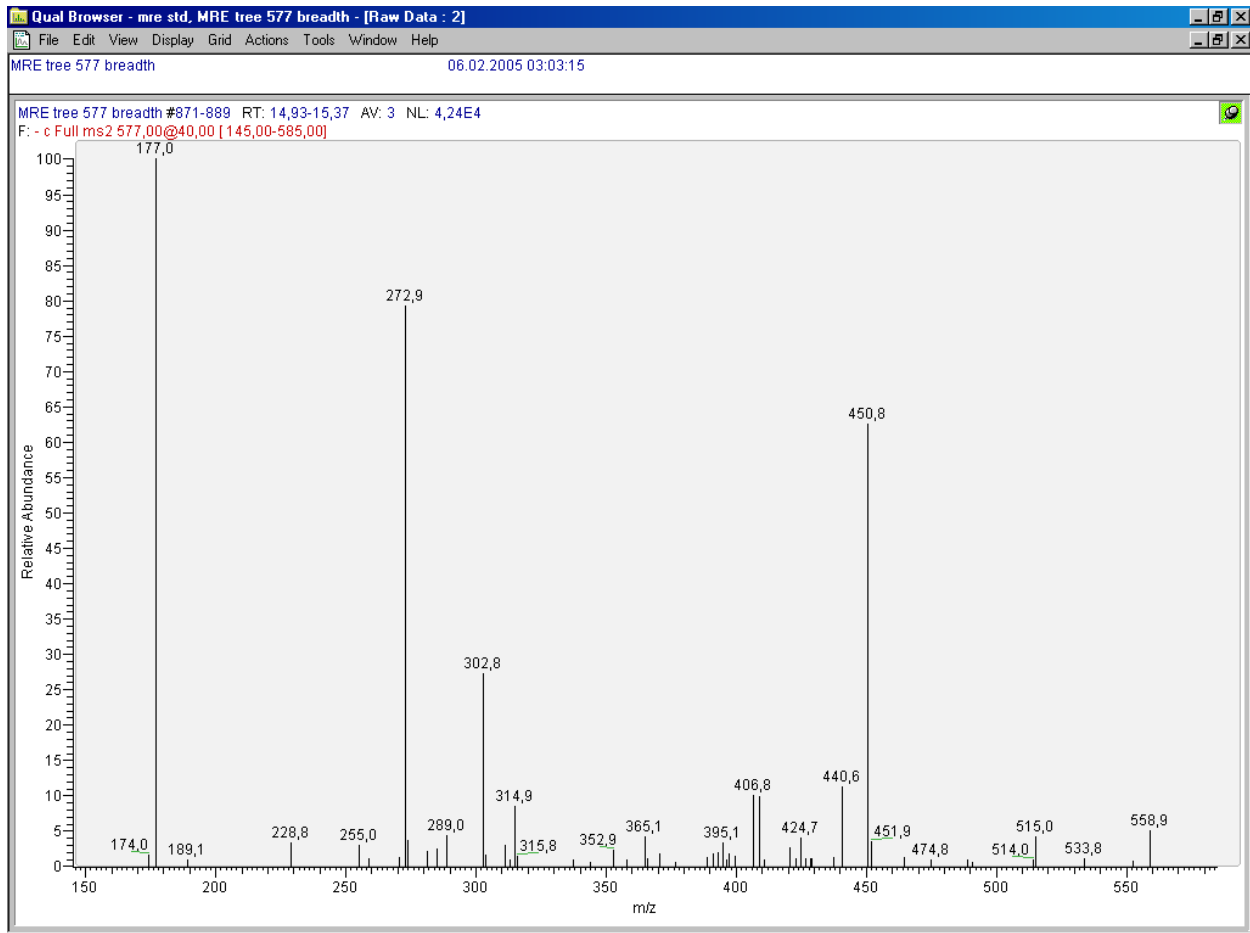


Abbildung 2.4-17: Fragmentspektren des (epi)Afzelechin-(epi)Gallocatechin-Dimers mit  $m/z$  577 bei 15,1 min

Ebenso wurde ein Trimer detektiert, dessen Sequenz durch das resultierende Fragmentspektrum als **(epi)Gallocatechin-(epi)Afzelechin-(epi)Catechin** identifiziert wurde (Abbildung 2.4-18). Bei der Identifizierung ist zu beachten, dass dieses Trimer dieselbe Masse aufweist wie das quantitativ dominierende Catechin-Catechin-Catechin-Trimer Procyanidin C2, aber mit einem wesentlich schwächeren Signal detektiert wird. Auch hier ist lediglich die Position einer OH-Gruppe im Molekül unterschiedlich. Das Fragmentspektrum zeigt aber eindeutig die aufbauenden Monomereinheiten sowie ihre Sequenz. Aus  $m/z$  289 und 303 ergeben sich (epi)Catechin als untere und (epi)Gallocatechin als obere Einheit. Die Signale bei  $m/z$  575 und 561 entsprechen dem Bruch der Interflavanbindungen unter Bildung der Fragment-Ionen des oberen und des unteren „Dimers“, entsprechend einer GA- und einer AC-Struktur.

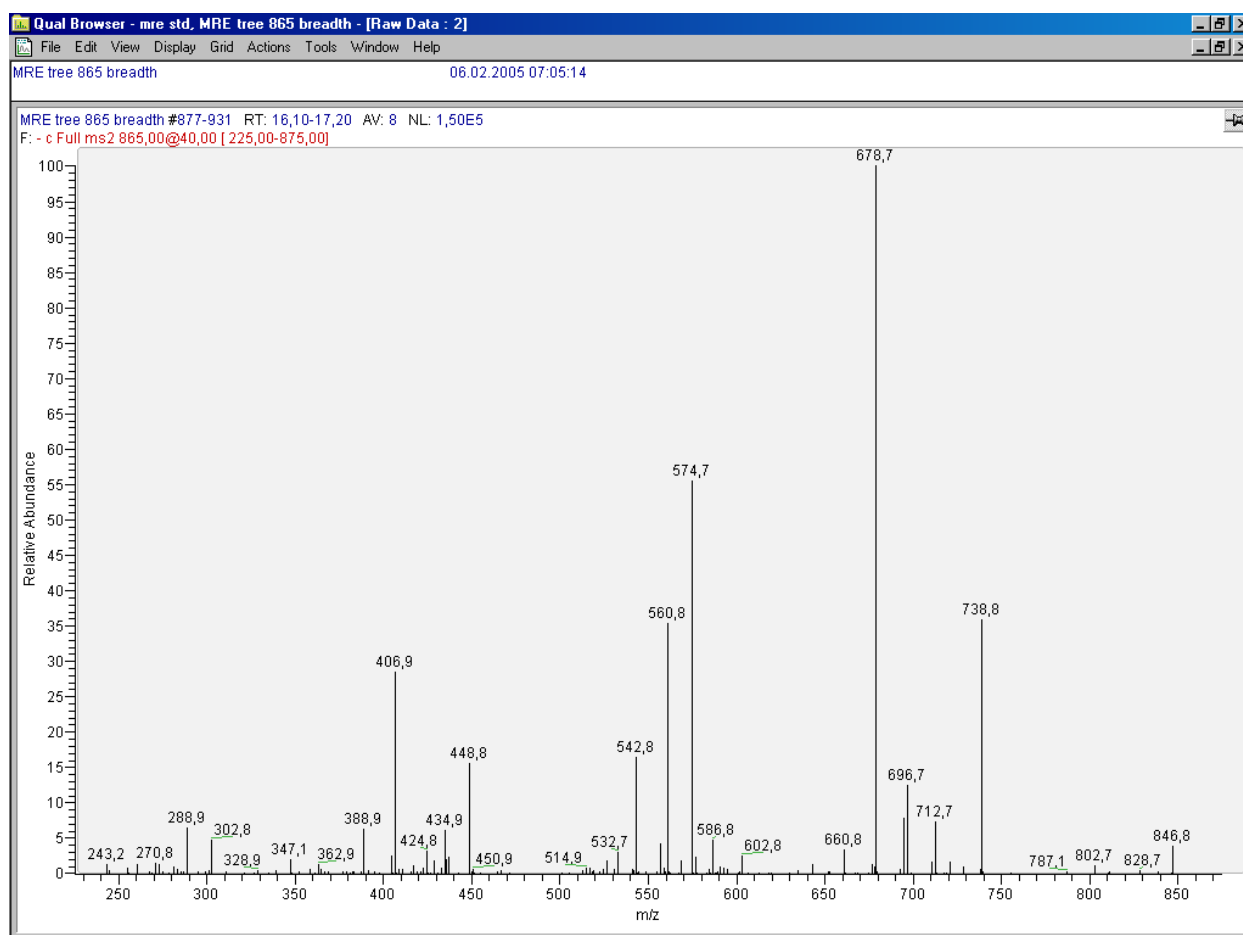


Abbildung 2.4-18: Fragmentspektren des (epi)Gallocatechin-(epi)Afzelechin-(epi)Catechin-Trimer mit m/z 865 bei 16,6 min

Beim Vergleich der Fragmentspektren von Procyanidin B3 aus Malz und Procyanidin B2 aus Kakao fällt auf, dass das Intensitätsverhältnis der Fragment-Ionen, die der HRF und der RDA-Reaktion entsprechen, verschieden ist. Dies ist ebenfalls bei einigen Proanthocyanidinen in Malz zu beobachten. Die weiter oben im Text eingefügte Abbildung 2.4-8 zeigt dafür als Beispiel die MS<sup>2</sup>-Spektren der beiden dominanten Procyanidine mit m/z 577. Damit würde es sich bei der später eluierenden Komponente vermutlich um Procyanidin B6 (Catechin-4 $\alpha$ - $\rightarrow$ -6-Catechin) handeln. Ob dies eine sichere **Unterscheidung einer 4 $\rightarrow$ 8 und einer 4 $\rightarrow$ 6 Verknüpfung** ermöglicht, ist aber ohne die Analyse einer genügenden Anzahl an Referenzverbindungen bekannter Struktur bzw. der Isolierung und NMR-Strukturabsicherung der Malz-Proanthocyanidine nicht zu sagen.

Wie weiter oben beschrieben, ist aus theoretischen Gründen eine zweifache HRF in einem linearen Proanthocyanidin unter Erhalt der Reststruktur nicht möglich. Die HRF mit ihrem dominanten Fragment-Ion und dem typischen neutral loss von 126 (Phloroglucin-Einheit) kann jeweils nur in der oberen Einheit erfolgen. Dies bietet eine Möglichkeit zur Detektion von

**Verzweigungen in einem Proanthocyanidin.** Bei Vorliegen von sowohl 4→8 als auch 4→6 Verknüpfungen gibt es mehrere obere Einheiten, in denen eine entsprechende HRF stattfinden kann. Die Analyse des MS<sup>3</sup>-Spektrums des Fragment-Ions der HRF weist dann wiederum ein Fragment auf, welches einem neutral loss von 126 entspricht.

Durch die detaillierte Analyse von Malzextrakten, die mit der in dieser Arbeit optimierten Analytik gewonnen wurden, sowie durch die systematische Untersuchung der Fragmentspektren der Proanthocyanidine wurden 58 noch nicht in Malz strukturell beschriebene Proanthocyanidine identifiziert. Dabei wurden auch neue Strukturelemente, wie die Propelargonidine mit (epi)Afzelechin als Baustein sowie verzweigte Proanthocyanidine gefunden. Dies zeigt insgesamt, dass die Proanthocyanidine in Malz eine größere Strukturvielfalt als bisher bekannt besitzen und sich wesentlich mehr Verbindungen als bisher detailliert identifizieren und charakterisieren lassen. Im Hinblick auf die kürzlich beschriebene Sorten- und Jahrgangsstabilität der Mengenverhältnisse einzelner Proanthocyanidine und der daraus abgeleiteten Möglichkeit eines Sorten- und Herkunftsnachweises (ZIMMERMANN UND GALENSA 2007) sowie der weiter oben aufgeführten Möglichkeiten zur Quantifizierung mittels der massenspektrometrischen Daten ergibt sich im Ausblick daraus eine potentielle Erweiterung auf eine wesentlich größere Anzahl an Analyten.

Die Tabelle 2.4-1 zeigt einen Überblick der im Rahmen dieser Arbeit in Gerstenmalz identifizierten Proanthocyanidine und ihrer in den Fragmentspektren auftretenden strukturrelevanten Ionen.

## 2.4 – Ergebnisse und Diskussion – Massenspektrometrie

Abbildung Anhang A	RT (min)	Molekülpeak [M-H] <sup>-</sup>	Ermittelte Struktur	Monomer oben unten	Dimer oben unten	Trimer oben unten	Tetramer oben unten	RDA	Bemerkungen
A34	20,5	561	CA	287 273				409	
A35	21,4	561	AC	271 289				407	273 (doppelte RDA) evtl. 4-6 verknüpft
A36	23,2	561	AC	271 289				407	407 (425-18)
A37	26,6	561	CA / AC	271/287 273/289				409	untypische Fragmentierung
A38	28,1	561	AC	271 289				407	273 (doppelte RDA) evtl. 4-6 verknüpft
A39	14,1	577	CC	287 289				407	vermutlich 4-6 verknüpft
A40	15,1	577	GA	303 273				441 409	Überlagerung mit Procyanidin B3
<b>A41</b>	<b>17,1</b>	<b>577</b>	<b>CC</b>	<b>287</b> <b>289</b>				<b>425</b>	<b>Procyanidin B3</b>
A42	19,3	577	CC	287 289				407	vermutlich 4-6 verknüpft
A43	23,4	577	CC	287 289				407	vermutlich 4-6 verknüpft
A44	10,4	593	GC	303 289				425	
<b>A45</b>	<b>12,1</b>	<b>593</b>	<b>GC</b>	<b>303</b> <b>289</b>				<b>425</b>	<b>Prodelphinidin B3</b>
A46	13,4	593	CG	287 305				423	Überlagerung mit Prodelphinidin B3
A47	16,1	593	GC	303 289				425	
A48	18,9	593	GC	303 289				407	vermutlich 4-6 verknüpft
A49	31,6	593							untypisch; kein Proanthocyanidin
A50	8,6	609	GG	303 305				423	vermutlich 4-6 verknüpft
A51	11,2	609	GG	303 305				441	
A52	12,4	609	GG	303 305				423	vermutlich 4-6 verknüpft
A53	28,5	609							untypisch; kein Proanthocyanidin
A54	30,6	609							untypisch; kein Proanthocyanidin
A55	21,1	849	CAC	287 289	559 561			679	vermutlich 4-6 verknüpft
A56	22,4	849	ACC	289	559 577			697	
A57	25,7	849	(AC)C	289	559 577/561			679	vermutlich 4-6 verknüpft
A58	27,1	849	(AC)C	289	559 577/561			679	vermutlich 4-6 verknüpft
A59	33,7	849	(AC)C	289	561 577			679	597 (Verzweigt)
A60	35,3	849	(AC)C	289	559 561/577			679	597 (Verzweigt)

## 2.4 – Ergebnisse und Diskussion – Massenspektrometrie

Abbildung Anhang A	RT (min)	Molekülpeak [M-H] <sup>-</sup>	Ermittelte Struktur	Monomer oben unten	Dimer oben unten	Trimer oben unten	Tetramer oben unten	RDA	Bemerkungen
A61	14,4	865	CCC	287 289	575 577			695	
A62	16,6	865	GAC	303 289	575 561			679	
<b>A63</b>	<b>18,1</b>	<b>865</b>	<b>CCC</b>	<b>287</b> <b>289</b>	<b>575</b> <b>577</b>			<b>695</b>	<b>Procyanidin C2</b>
A64	19,1	865	(GA)C	303 289/305	561/593			695	untypisch; Verzweigt?
A65	21,7	865	CCC	287 289	575 577			695	
A66	22,8	865	CCC	287 289	575 577			695	
A67	29,7	865	CCC	287 289				695	613 (Verzweigt)
A68	31,3	865	CCC	287 289				695	613 (Verzweigt)
A69	9,5	881	GCC	303 289	591 577			695	
A70	11,4	881	CGC	287/303 289	591 593			711	629 (Verzweigt)
<b>A71</b>	<b>13,9</b>	<b>881</b>	<b>GCC</b>	<b>303</b> <b>289</b>	<b>591</b> <b>577</b>			<b>695</b>	<b>Dominantes Trimer</b>
<b>A72</b>	<b>14,8</b>	<b>881</b>	<b>CGC</b>	<b>287</b> <b>289</b>	<b>591</b> <b>593</b>			<b>695</b>	<b>Dominantes Trimer</b>
A73	17,5	881	GCC	303 289	591 577			711	
A74	20,7	881	CGC	287 289	591 593			695	
A75	25,3	881	(GC)C	303 289				695	629 (Verzweigt)
A76	26,7	881	(GC)C	289				695	629 (Verzweigt)
A77	7,1	897	GGC	303 289	607 593			711	
<b>A78</b>	<b>11,1</b>	<b>897</b>	<b>GGC</b>	<b>303</b> <b>289</b>	<b>607</b> <b>593</b>			<b>711</b>	<b>Prodelfinidin C2</b>
A79	13,7	897	GGC	303 289	607 593			711	
A80	14,8	897	GGC	303 289	607 593			711	
A81	20,2	897	GGC	303 289	607 593			711	645 (Verzweigt)
A82	7,9	913	GGG	303 305	607 609			727	
A83	13,5	913	GGG	303 305	607 609			727	
A84	18,7	913	GGG	303 305				727	661 (Verzweigt)
A85	23,5	1137	CACC		559 577	847 849		967	
A86	19,1	1153	CCCC		575 577	863		967	
A87	20,9	1153	CCCC		575 577	863 865		983	
A88	25,8	1153	CCCC		575 577	863 865		983	901 (Verzweigt)

## 2.4 – Ergebnisse und Diskussion – Massenspektrometrie

Abbildung Anhang A	RT (min)	Molekülpeak [M-H] <sup>-</sup>	Ermittelte Struktur	Monomer oben unten	Dimer oben unten	Trimer oben unten	Tetramer oben unten	RDA	Bemerkungen
A89	30,3	1153	<i>CCCC</i>		575 577	863 865		983	901 (Verzweigt)
A90	16,6	1169	<i>GCCC</i>		591 577	879 865		983	
A91	17,6	1169	<i>CGCC</i>		591 577	879 881		999	
A92	18,4	1169	<i>CCGC</i>		575 593	879 881		999	
A93	23,9	1169	<i>CGCC</i>		591 577	879 881		999	
A94	24,8	1169	<i>(GCC)C</i>		575/591	879 881		983	917 (Verzweigt)
A95	25,8	1169	<i>(CGC)C</i>		591 593	879 881		983	917 (Verzweigt)
A96	28,1	1169	<i>(CG)CC</i>		591	881		999	917 (Verzweigt)
A97	13,8	1185	<i>GGCC</i>		607 577	895 881		999	
A98	15,3	1185	<i>CGGC</i>		591 593	895 897		999	
A99	18,8	1185	<i>GGCC</i>		607 577	895 881		999	
A100	21,4	1185	<i>(GG)CC</i>			881		999	933 (Verzweigt)
A101	22,4	1185	<i>CGCC</i>		591 593	895 897		999	
A102	11,2	1201	<i>GGGC</i>		607 593	911 897		1015	
A103	16,8	1473	<i>GGCCC</i>			865	1169	1287	

Tabelle 2.4-1: In Gerstenmalz identifizierte Proanthocyanidine und ihre in den MS<sup>2</sup>-Fragmentspektren auftretenden struktur-relevanten Ionen, aufsteigend nach Masse und Retentionszeit. Da bei der Fragmentierung der Massenbereich nach unten limitiert ist, werden in den Fragmentspektren der Tetrameren die resultierenden Monomer-Fragmente nicht mehr detektiert. Struktur: A=(epi)Afzelechin, C=(epi)Catechin, G=(epi)Gallocatechin. Bausteine in Klammern: Reihenfolge kann (wegen Verzweigung) nicht eindeutiger angegeben werden. Monomer/Dimer/Trimer/Tetramer oben unten: [M-H]<sup>-</sup>-Ionen der struktur-relevanten Bruchstücke nach Fragmentierung. RDA: intensivstes [M-H]<sup>-</sup>-Ion der RDA-Reaktion, evtl. nach weiterer Wasserabspaltung. Fettdruck: bereits beschriebene, strukturell abgesicherte Proanthocyanidine

## Flavanolglykoside in Gerstenmalz

Im Gegensatz zu den meisten Untergruppen der Flavonoide, die in der Regel als Glykoside vorliegen, kommen die Flavanole bevorzugt als Säureester (z.B. Epigallocatechingallat in grünem Tee) und/oder zu Proanthocyanidinen polymerisiert vor. Es sind aber auch viele Flavanolglykoside und einige glykosylierte Proanthocyanidine in der Literatur beschrieben (PORTER 1988, PORTER 1994, HARBORNE UND BAXTER 1999).

Das Vorkommen eines Flavanolglykosids, des Catechin-7-O- $\beta$ -D-glucopyranosids, in Gerste und Malz wurde zuerst von Friedrich beschrieben, der die Verbindung sowohl massenspektrometrisch nachwies als auch eine Strukturabsicherung durch chemischen Abbau und mit NMR nach chromatographischer Isolierung der Substanz aus Malz durchführte (FRIEDRICH 2000, FRIEDRICH UND GALENSA 2002). Zuvor war sowohl von Gracey und Barker als auch von Roeder massenspektrometrisch ein Ion entsprechender Masse nachgewiesen worden, ohne dass aber eine Identifizierung erfolgen konnte (GRACEY UND BARKER 1976, ROEDER ET AL. 1995). Weitere Berichte über glykosylierte Flavanole in Malz sind nicht bekannt.

In dieser Arbeit wurden Malzextrakte auf das mögliche Vorliegen weiterer Flavanolglykoside hin untersucht. Verwendet wurden sowohl ASE-Rohextrakte nach Entfernung des Acetons und Zentrifugation, als auch nach Polyamid-SPE (sowohl die ungebundene Fraktion als auch das Eluat), da die Flavonolglykoside z.T. nur sehr schlecht auf Polyamid retiniert werden. Dazu wurden die Massenspuren, die den möglichen Kombinationen von Pentosen, Desoxyhexosen und Hexosen mit monomeren, dimeren und trimeren Flavanolen entsprechen, analysiert und bei darin auftretenden Peaks die massenspektrometrische Fragmentierung überprüft. Es wurde dabei kein Indiz für das Vorliegen von Pentosen, Desoxyhexosen oder Rutinosen gefunden.

Es wurden aber 22 Verbindungen gefunden, deren massenspektrometrische Fragmentierung weiteren, bisher nicht im Malz beschriebenen, Flavanolhexosiden entspricht. Diese Verbindungen zeigen in ihren Fragmentspektren den für O-Hexoside typischen neutral- loss von 162 (Hexose – H<sub>2</sub>O der glykosidischen Bindung). Das resultierende Aglykon-Ion mit m/z 289 bzw. m/z 305 hat, wenn von genügender Intensität und weiter fragmentierbar, ein dem monomeren (epi)Catechin bzw. (epi)Gallocatechin entsprechendes Fragmentspektrum. Aus Gründen der Übersichtlichkeit findet sich hier im Text in den Abbildungen 2.4-19 bis 2.4-25 ein Überblick über die relevanten Massenspuren und als Beispiel jeweils das Fragmentspektrum des Hauptpeaks. Im Anhang B zeigen die Abbildungen B1 bis B32 die Massenspuren der Flavanolglykoside einzeln sowie die Fragmentspektren aller gefundenen signifikanten Peaks.

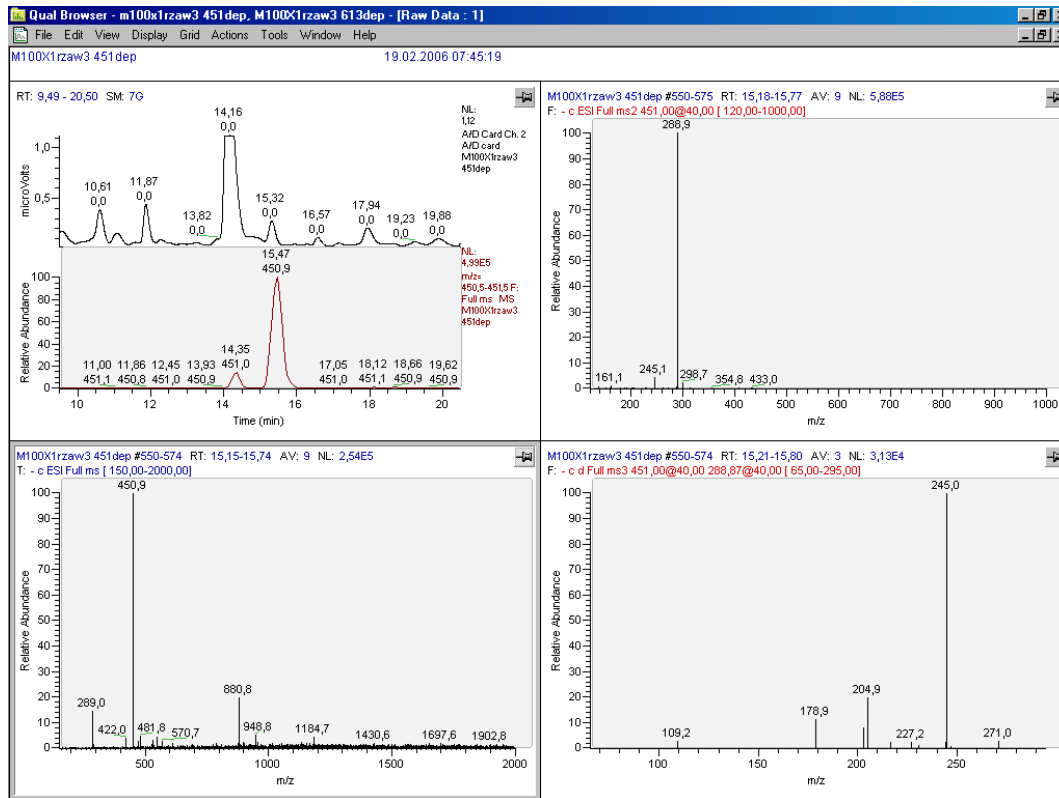


Abbildung 2.4-19: **Catechinglucosid**. Links oben: UV 280 nm und Massenspur 451. Links unten: MS-Spektrum des Peaks bei 15,5 min. Rechts oben: MS<sup>2</sup>-Spektrum von 451. Rechts unten: MS<sup>3</sup>-Spektrum 451→289

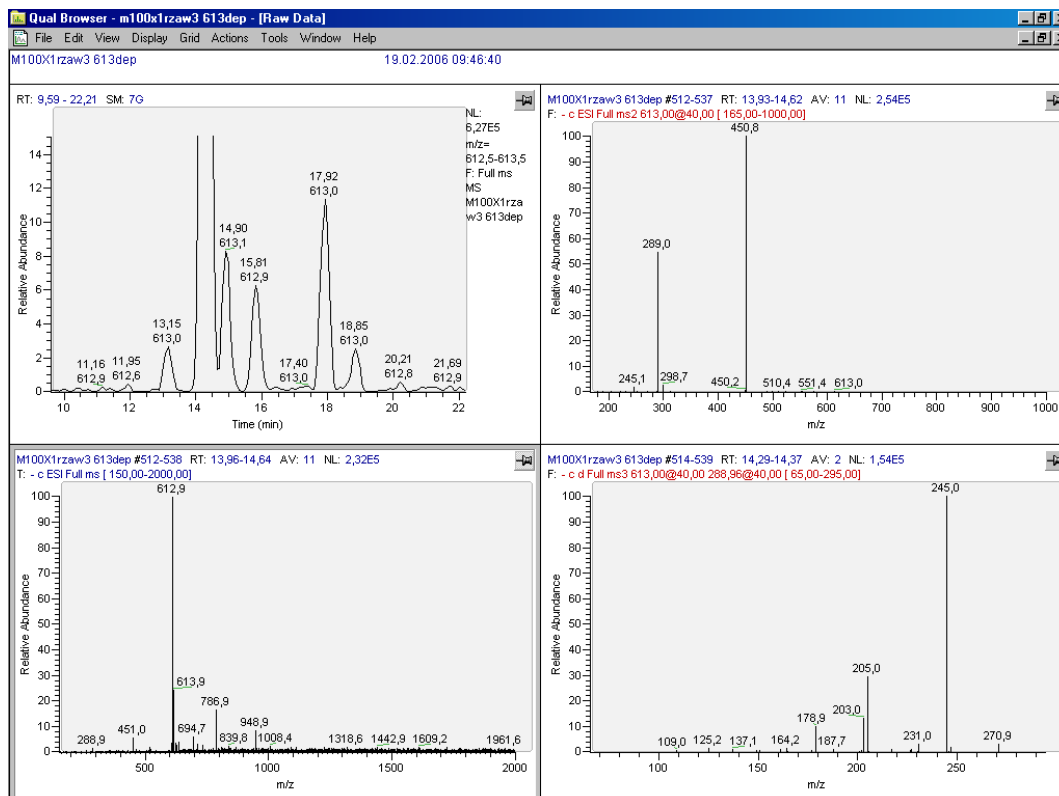


Abbildung 2.4-20: **Beispiel (epi)Catechindihexosid**. Links oben: Massenspur 613. Links unten: MS-Spektrum des Peaks bei 14,3 min. Rechts oben: MS<sup>2</sup>-Spektrum 613. Rechts unten: MS<sup>3</sup>-Spektrum 613→289



## 2.4 – Ergebnisse und Diskussion – Massenspektrometrie

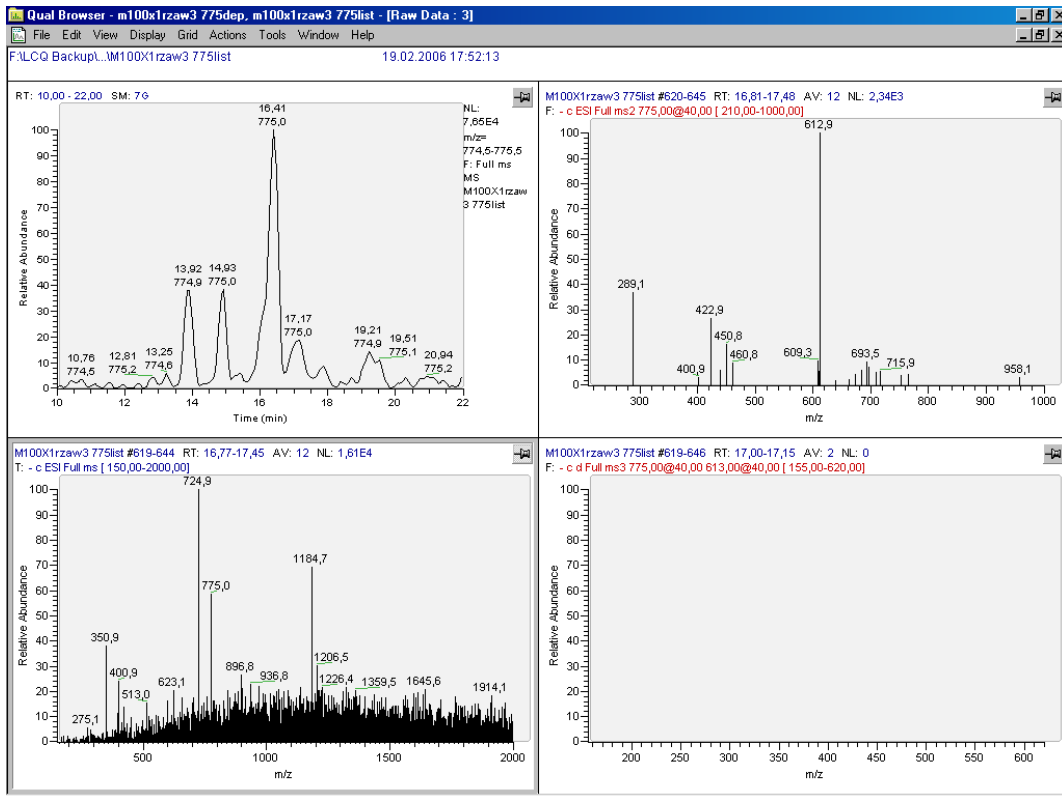


Abbildung 2.4-21: **Beispiel (epi)Catechintrihexosid.** Links oben: Massenspur 775. Links unten: MS-Spektrum des Peaks bei 17,6 min. Rechts oben: MS<sup>2</sup>-Spektrum 775. Rechts unten: MS<sup>3</sup>-Spektrum 775→613

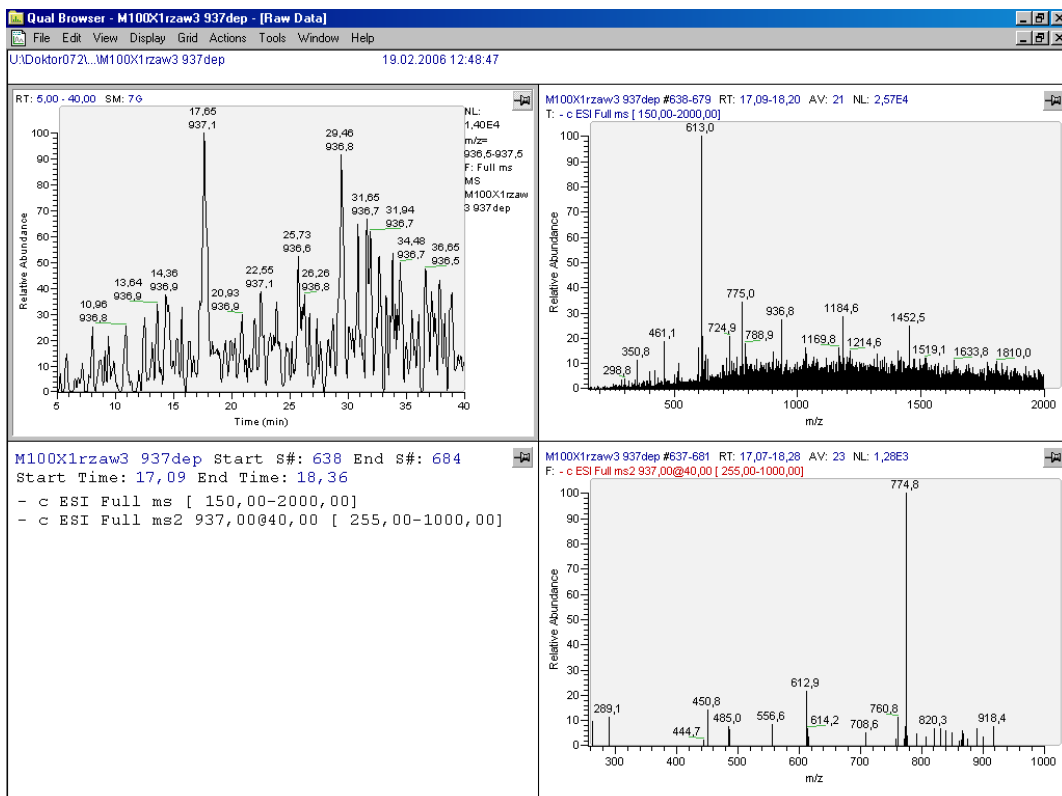


Abbildung 2.4-22: **Beispiel (epi)Catechintetrahexosid.** Links oben: Massenspur 937. Rechts oben: MS-Spektrum des Peaks bei 18,0 min. Rechts unten: MS<sup>2</sup>-Spektrum 937

Abbildung 2.4-19 zeigt zum Vergleich das schon von Friedrich nachgewiesene Catechinglucosid bei einer Retentionszeit von 15,5 min mit seiner massenspektrometrischen Fragmentierung. Der zweite Peak mit  $m/z$  451 bei 14,4 min ist ein Fragment des weiter unten beschriebenen Dihexosids mit  $m/z$  613, welches schon in geringen Mengen bei der Ionisierung entsteht. Ein weiteres Catechinmonohexosid wurde nicht gefunden.

Im Malz liegt demnach **(epi)Catechin auch als Di-, Tri- und Tetrahexosid** vor, wobei jeweils verschiedene Verbindungen detektiert werden können. Es lassen sich **sechs verschiedene Dihexoside** mit Retentionszeiten von 13,2, 14,3, 14,9, 15,8, 17,9 und 18,9 min und einem  $m/z$  von 613 nachweisen (Abbildung 2.4-20). Es lassen sich **acht verschiedene Trihexoside** mit Retentionszeiten von 13,1, 14,0, 15,0, 16,3, 16,7, 17,6, 18,3 und 19,5 min und einem  $m/z$  von 775 nachweisen, dazu eine weitere Verbindung mit einer Retentionszeit von 20,3 min, für die aber die Fragmentspektren zu geringe Intensitäten haben, um eine sichere Aussage zu treffen (Abbildung 2.4-21). Die Abspaltung zum Dihexosid ist hier aber zu beobachten. **Vier verschiedene Tetrahexoside** ließen sich identifizieren mit einer Retentionszeit von 14,4, 18,0, 22,0 und 32,2 min und einem  $m/z$  von 937 (Abbildung 2.4-22). Für die Tri- und Tetrahexoside konnten aus Intensitätsgründen keine Fragmentspektren der Aglykonmasse erhalten werden.

Es liegen also unterschiedliche glykosidische Bindungen und/oder verschiedene Zucker vor. Bei dem Aglykon handelt es sich wahrscheinlich um Catechin, da Epicatechin im Malz bisher als Monomer nur in Spuren und als Monomereinheit in den Proanthocyanidinen überhaupt nicht beschrieben wurde. Dies schließt aber natürlich nicht aus, dass hier auch Epicatechinhexoside vorliegen könnten. Die Fragmentspektren der einzelnen Hexoside unterscheiden sich insbesondere in dem Auftreten von Fragmenten, die der Abspaltung einzelner Zucker entsprechen. In Anlehnung an die bekannten Fragmentspektren der Flavonolglykoside liegt der Unterschied vermutlich in Bindungen der Zucker an unterschiedlichen Positionen des Aglykons.

Es wurde weiterhin ein bisher im Malz nicht beschriebenes **(epi)Gallocatechinhexosid** mit einer Retentionszeit von 9,3 min und einem  $m/z$  467 identifiziert (Abbildung 2.4-23). Die detektierte Masse ist kein Fragment der im MS-Spektrum des Peaks dominierenden Masse 473, wie Abbildung 2.4-24 zeigt. Diese Verbindung hat, wie im Chromatogramm ersichtlich, eine etwas spätere Retentionszeit von 10,1 min und wird ausschließlich zur schon im MS-Spektrum auftretenden 413 fragmentiert. Die Fragmentierung der 467 zur 305 mit einem neutral loss von 162 ist typisch für ein Hexosid und entspricht damit genau der Fragmentierung des schon beschriebenen Catechinglucosids. Die weitere Fragmentierung des Produkt-Ions  $m/z$  305 zeigt das typische Fragmentspektrum von (epi)Gallocatechin.

## 2.4 – Ergebnisse und Diskussion – Massenspektrometrie

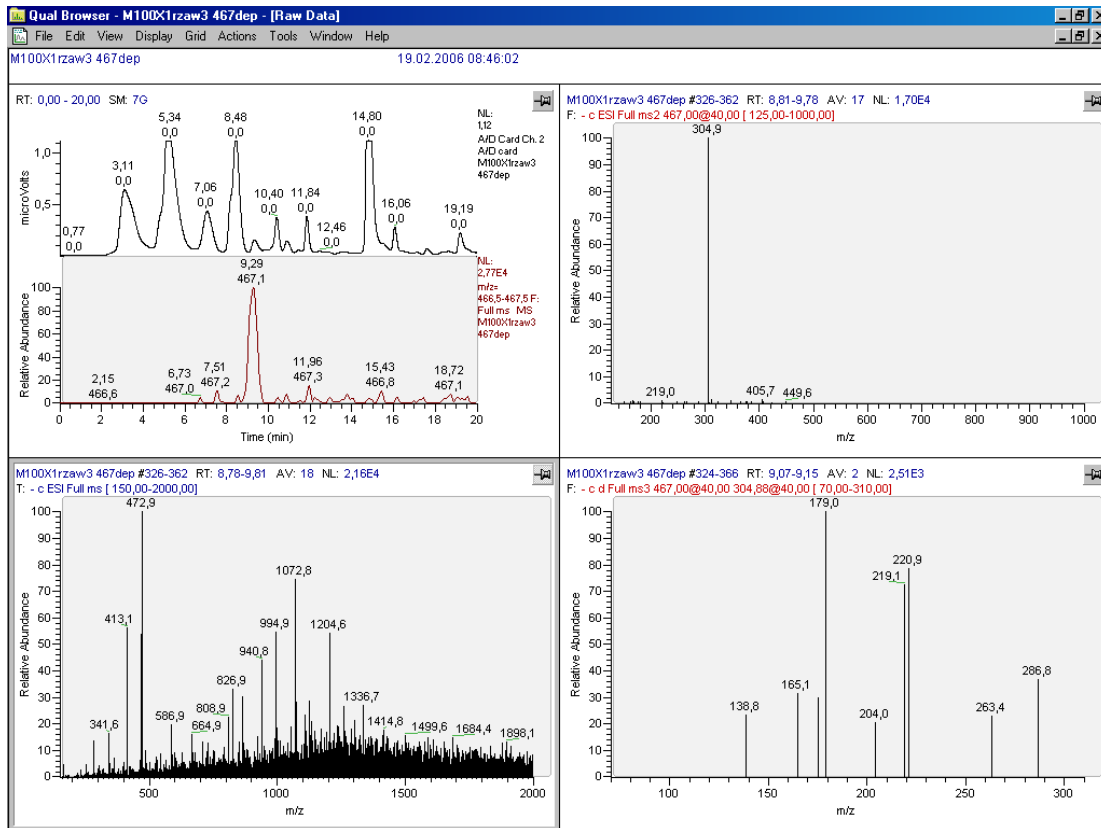


Abbildung 2.4-23: (epi)Gallocatechinhexosid. Links oben: UV 280 nm und Massenspur 467. Links unten: MS-Spektrum des Peaks bei 9,3 min. Rechts oben: MS<sup>2</sup>-Spektrum 467. Rechts unten: MS<sup>3</sup>-Spektrum 467→305

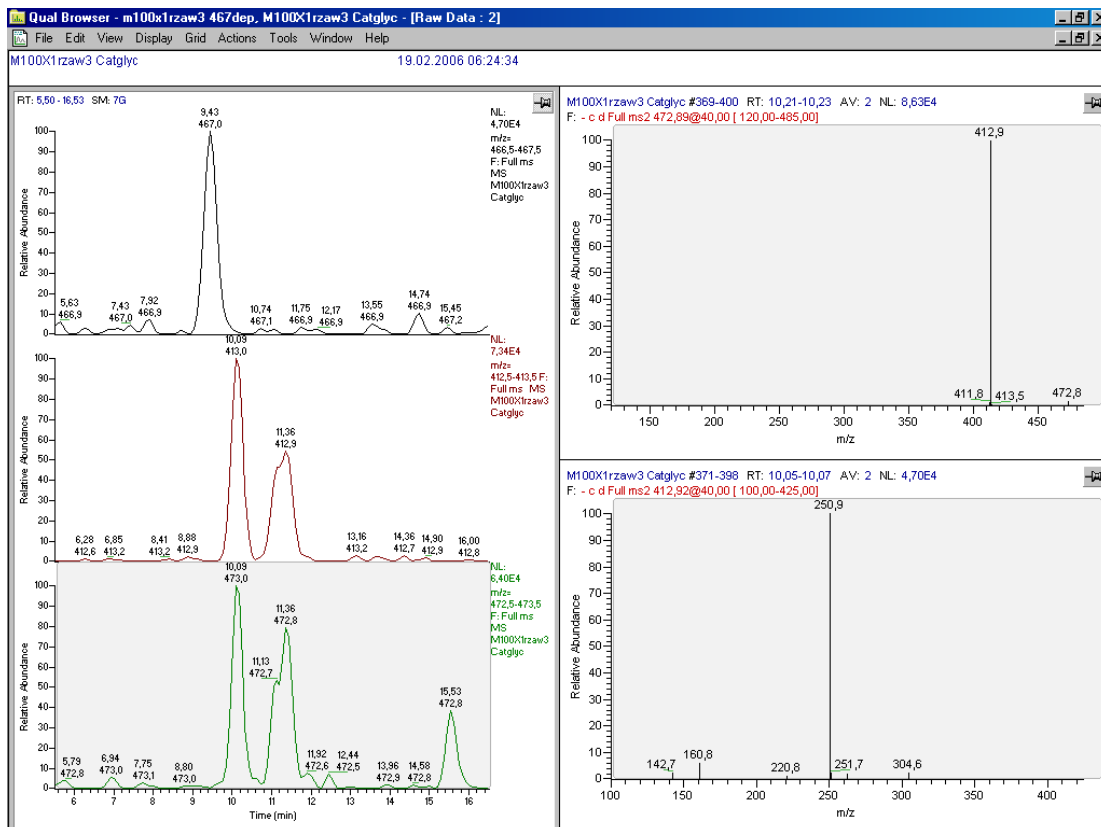


Abbildung 2.4-24: Links: Massenspuren 467, 413 und 473. Rechts oben: MS<sup>2</sup>-Spektrum 473. Rechts unten: MS<sup>2</sup>-Spektrum 413

Es wurden **zwei verschiedene (epi)Gallocatechindihexoside** mit Retentionszeiten von 9,3 und 14,7 min identifiziert (Abbildung 2.4-25). Die Fragmentspektren zeigen die zu erwartenden Ionen bei  $m/z$  467 und 305, entsprechend dem Verlust einer bzw. zweier Hexosen. Auch die nur schwer (schlechtes Signal/Rausch-Verhältnis) zu identifizierenden Peaks bei 10,0 und bei 12,5 min zeigen im Fragmentspektrum Ionen mit  $m/z$  305. Für diese Verbindungen sind Messungen mit größerer Ionen-Intensität erforderlich, um eine sichere Identifizierung vornehmen zu können.

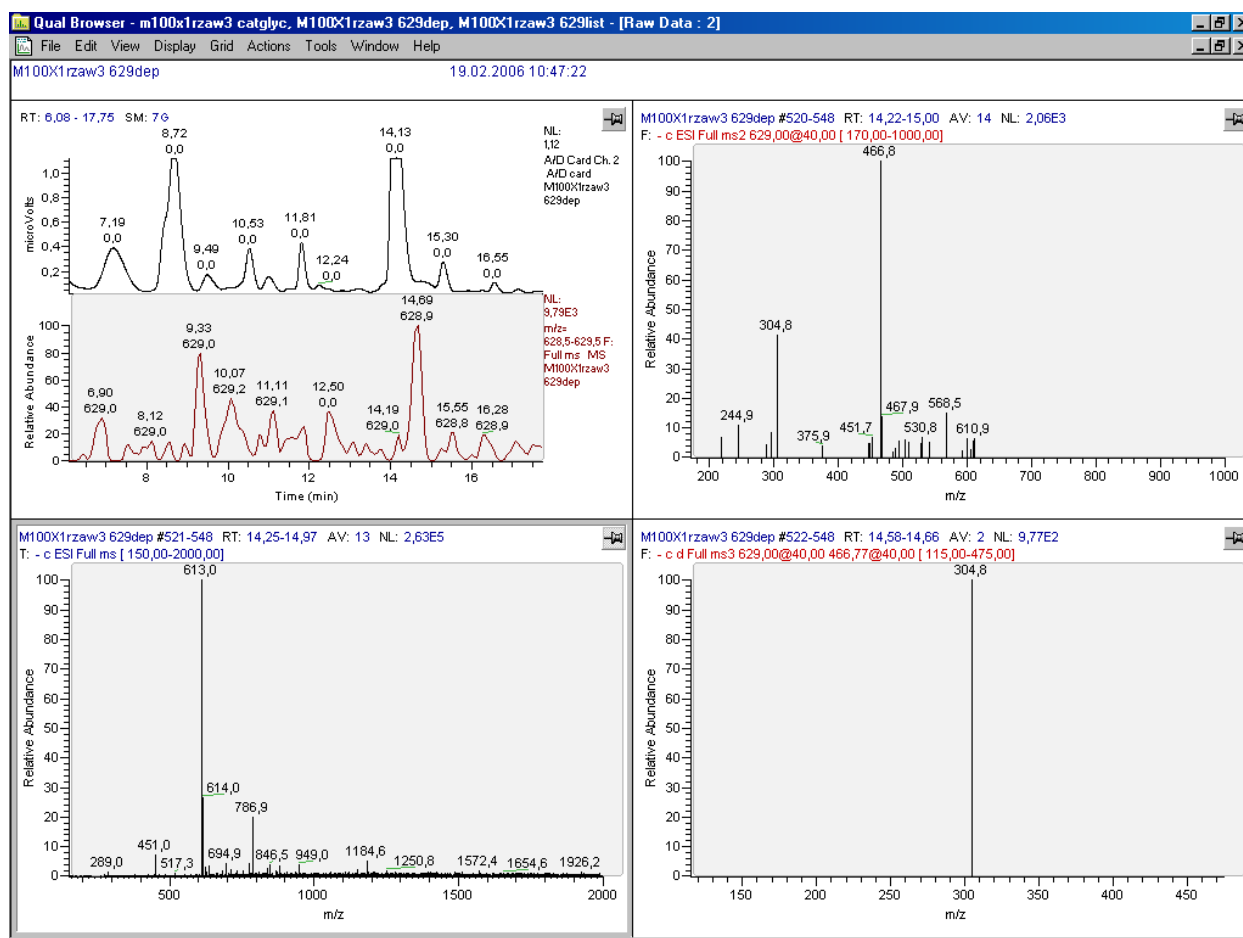


Abbildung 2.4-25: **Beispiel (epi)Gallocatechindihexosid**. Links: UV 280 nm und Massenspur 629. Links unten: MS-Spektrum des Peaks bei 14,7 min. Rechts oben: MS<sup>2</sup>-Spektrum 629. Rechts unten: MS<sup>3</sup>-Spektrum 629→467

Das Vorkommen von (epi)Gallocatechinhexosiden ist überraschend, da im Gegensatz zu Catechin, welches auch als Monomer im Malz vorliegt, Gallocatechin zwar als Monomereinheit der Proanthocyanidine auftritt, als Monomer jedoch nur von einigen wenigen Autoren nachgewiesen werden konnte. Im Rahmen dieser Arbeit konnte (epi)Gallocatechin in Malz nicht nachgewiesen werden. Auch hier kann analog vermutet werden, dass es sich beim

Aglykon um Gallocatechin und nicht um Epigallocatechin handelt. Weitere Glykoside, insbesondere Di- und Trihexoside des (epi)Gallocatechins waren bisher nicht sicher nachzuweisen, bei einer weiteren Konzentrierung und Isolierung geeigneter Malzextrakte könnten aber vermutlich analog zum (epi)Catechin auch solche gefunden werden.

Außerdem wurde im Malz ein **glykosyliertes Procyanidin-Dimer** mit einer Retentionszeit von 17,7 min nachgewiesen (Abbildung 2.4-26). Dabei handelt es sich um ein (epi)Catechin-(epi)Catechin-Dimer mit einer Hexose entsprechend  $m/z$  739. Auch hier kann vermutet werden, dass es sich beim Aglykon um Catechin handelt und beim Zucker um Glucose analog zum schon von Friedrich nachgewiesenen Catechinglucosid. Auffallend ist, dass es im Gegensatz zu den glykosylierten Monomeren im Fragmentspektrum nicht zu einer bevorzugten Abspaltung des Zuckers kommt, sondern zu einer Vielzahl von Signalen in Analogie zur Fragmentierung von Proanthocyanidin-Dimeren. Dies spricht für eine im Verhältnis zu den Bindungen innerhalb des Procyanidins starke Bindung des Zuckerrestes an das Aglykon.

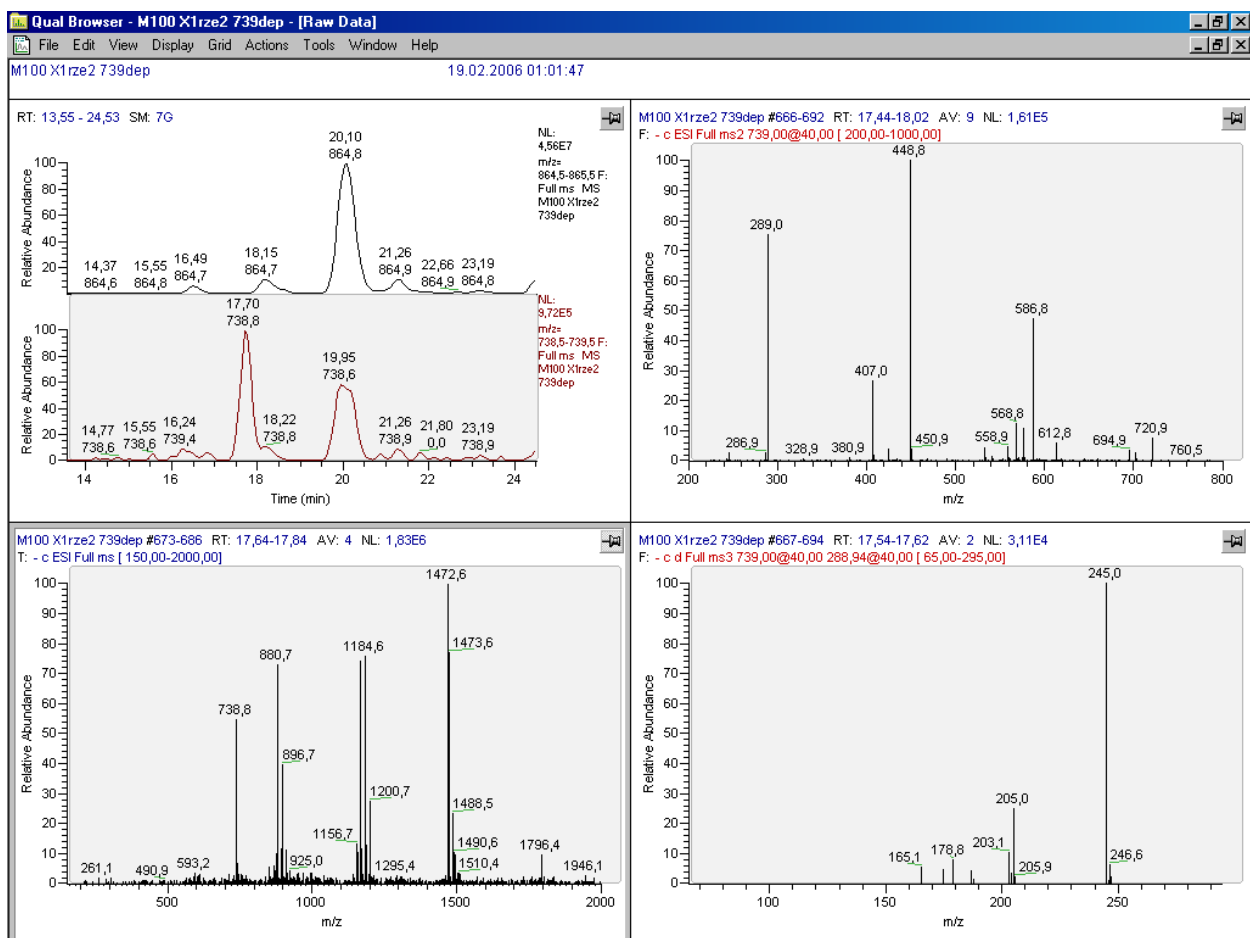


Abbildung 2.4-26: (epi)Catechin-(epi)Catechinhexosid. Links oben: Massenspuren 865 und 739. Links unten: MS-Spektrum des Peaks bei 17,7 min. Rechts oben: MS<sup>2</sup>-Spektrum 739. Rechts unten: MS<sup>3</sup>-Spektrum 739→289

Die Identifizierung des glykosylierten Dimers durch die massenspektrometrische Fragmentierung ist kompliziert, da ein Ion mit  $m/z$  739 auch als Fragment eines trimeren Procyanidins nach einem neutral loss von 126 durch HRF (865-126) resultieren kann. Da sich eine geringe Fragmentierung der Analyten bei der Ionisierung kaum vermeiden lässt, tritt das Produkt-Ion schon in den Massenspektren auch ohne Fragmentierung in der Ionenfalle auf. Die Intensität ist zwar sehr gering, aber durch die weit größeren Mengen an Trimeren gegenüber dem Hexosid kann eine Störung gegeben sein. Unglücklicherweise gibt es auch keinen großen Unterschied in den Retentionszeiten der fraglichen Verbindungen. Auch im Rahmen der Probenvorbereitung gelang eine vollständige Trennung der Proanthocyanidine vom glykosylierten Dimer an Polyamid bisher nicht, da letzteres deutlich stärker adsorbiert wird als die glykosylierten Monomere. Eine Veränderung des chromatographischen Gradienten im Rahmen der vorliegenden Arbeit brachte bisher ebenfalls keine verbesserte Trennung.

Eine klare Unterscheidung der Ionen mit  $m/z$  739 und damit eine sichere Identifizierung des Hexosids ist aber durch Vergleich der Fragmentspektren des Hexosids selber und des  $MS^3$ -Spektrums des Produkt-Ions des Trimers möglich. Abbildung 2.4-27 zeigt das  $MS^3$ -Spektrum des aus dem Trimer durch Fragmentierung entstehenden Ions mit  $m/z$  739. Ein Vergleich mit Abbildung 2.4-28 zeigt deutlich die Unterschiede zwischen den Fragmentspektren. Insbesondere fehlen die Ionen mit  $m/z$  613 und 595 entsprechend dem neutral loss von 126 respektive anschließender Eliminierung von Wasser im Bruchstück des Trimers. Eine zweifache HRF ist in linearen Trimeren gemäß der obigen Ausführungen nicht möglich, so dass ein zweimaliger neutral loss von 126 nicht möglich ist (siehe Abschnitt 2.4-Fragmentierung von Proanthocyanidinen, Seite 87). Im Fragmentspektrum des glykosylierten Dimers treten diese Ionen auf, da es sich um bevorzugte Fragmentierungsreaktionen der Proanthocyanidine handelt.

## 2.4 – Ergebnisse und Diskussion – Massenspektrometrie

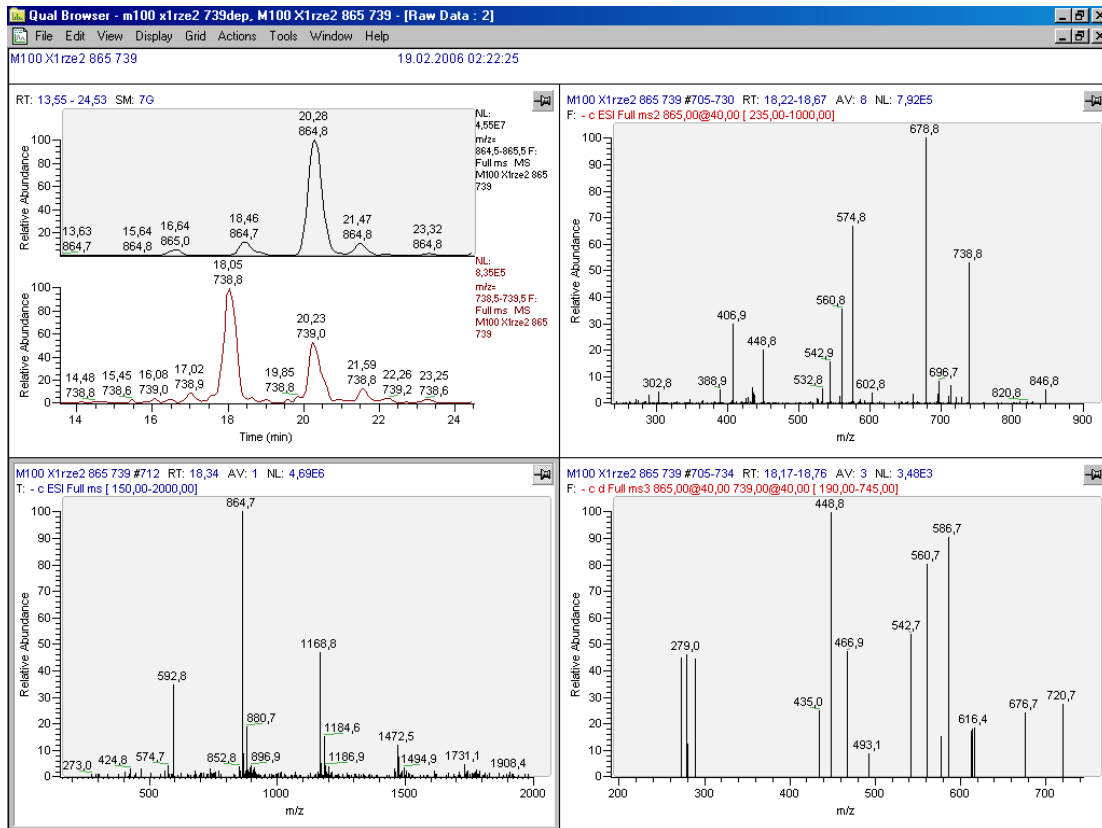


Abbildung 2.4-27: Links oben: Massenspuren 865 und 739. Links unten: MS-Spektrum des Peaks bei 18,5 min. Rechts oben: MS<sup>2</sup>-Spektrum 865. Rechts unten: MS<sup>3</sup>-Spektrum 865→739

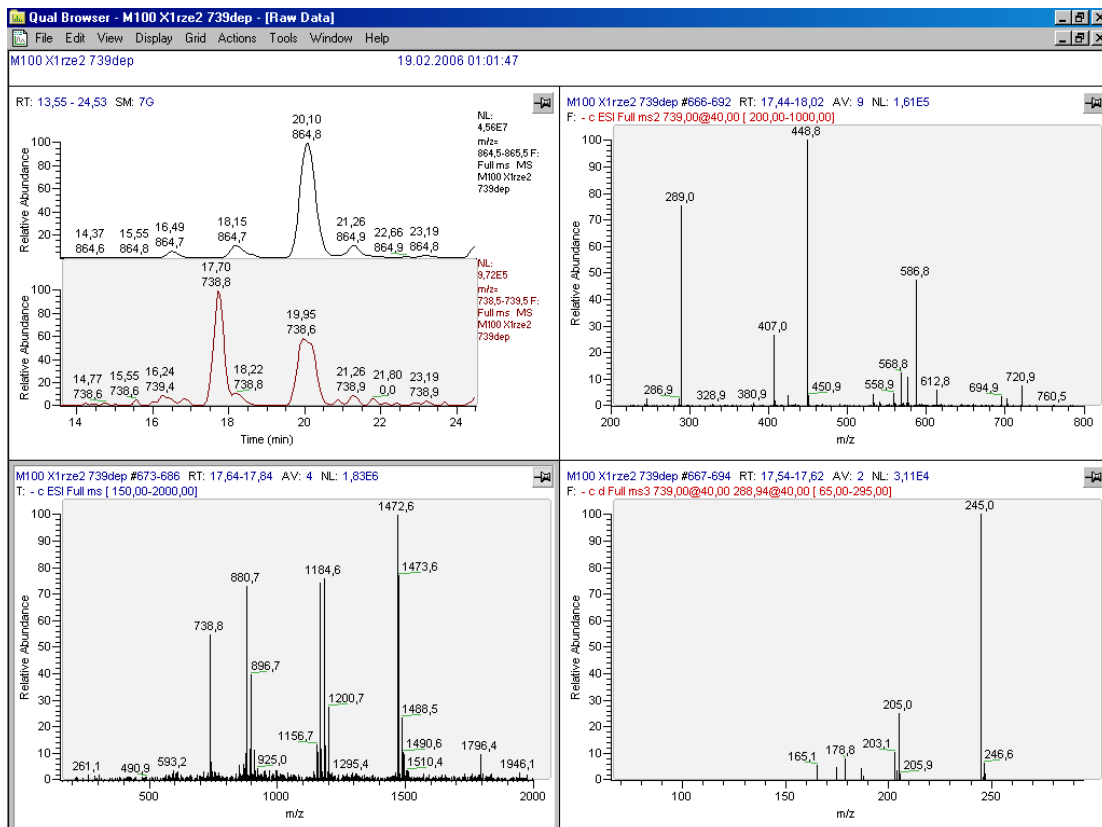


Abbildung 2.4-28: Links oben: Massenspuren 865 und 739. Links unten: MS-Spektrum des Peaks bei 17,7 min. Rechts oben: MS<sup>2</sup>-Spektrum 739. Rechts unten: MS<sup>3</sup>-Spektrum 739→289

Die Fragmentspektren weisen auch darauf hin, dass der Zucker in der oberen Einheit des Dimers gebunden ist und zwar im Bereich des B-Rings oder Heterozyklus. So ist nach dem bekannten Fragmentierungsmuster der Proanthocyanidine das Auftreten der Fragmente mit  $m/z$  613, 587, 449 und 289 sowie deren weiteren  $MS^3$ -Fragmenten zu erklären. Eindeutig lässt sich das jedoch aus den MS-Spektren nicht ableiten. Das wichtigste Indiz dafür ist das markante Ion bei  $m/z$  289 (untere (epi)Catechineinheit) und das  $MS^3$ -Spektrum des Produkt-Ions mit  $m/z$  449 (739-290, Abspaltung des unteren (epi)Catechin Monomers), welches mit einem neutral loss von 162 hauptsächlich zu  $m/z$  287 fragmentiert wird, also der oberen (epi)Catechineinheit-2H. Das Fragment mit  $m/z$  613 entspricht dem Produkt der HRF (739-126). Da der Zucker im Molekül verbleibt, kann er nicht am oberen A-Ring gebunden sein. Das Fragment mit  $m/z$  587 entspricht einem neutral loss von 152, also der RDA-Reaktion unter Verbleib des Zuckers im Molekül, die in der unteren oder oberen Einheit stattfinden kann. Friedrich leitete aus der Fragmentierung des Prodelphinidin B3 ab, dass diese Reaktion bevorzugt in der oberen Einheit stattfindet. So findet sich das Produkt-Ion der RDA-Reaktion in der unteren Einheit nur mit wesentlich geringerer Intensität. Die weitere Fragmentierung beider Produkt-Ionen ist sehr unterschiedlich: während das Produkt der RDA-Reaktion in der oberen Einheit bei der weiteren Fragmentierung praktisch nur eine Wasserabspaltung zeigt, werden nach der RDA-Reaktion in der unteren Einheit als markante Produkte sowohl die Abspaltung des gesamten Restes der unteren Einheit als auch eine HRF in der oberen Einheit gefunden. Die weitere Fragmentierung des Produkt-Ions 587 liefert drei Produkt-Ionen mit  $m/z$  569 (Wasserabspaltung), 449 (-138, Verlust der gesamten Einheit, in der die RDA-Reaktion stattfand) und 407 (Verlust des Zuckers plus anschließende Wasserabspaltung). Dies spricht dafür, dass die RDA-Reaktion in der unteren Einheit stattfindet.

Durch die massenspektrometrische Fragmentierung werden die beschriebenen Verbindungen klar als Flavanolhexoside identifiziert. Einige strukturelle Merkmale wie die Stereochemie des Aglykons, die Art der Hexose und die Position der Bindung können daraus aber nicht abgeleitet werden. Dazu wären eine Isolierung der Substanzen aus Gerste bzw. Gerstenmalz in genügender Menge und Reinheit, der chemische Abbau sowie die Aufnahme von NMR- und Circular dichroismus-Spektren nötig, was im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurde.

Die glykosylierten Monomere lassen sich von den Proanthocyanidinen im Malz durch Festphasenextraktion an Polyamid trennen. Beim Auftragen eines Malzextraktes mit 20% vol Aceton in der Auftragslösung werden die Hexoside nicht adsorbiert, während die Proanthocyanidine vollständig zurückgehalten werden. Analog können die Hexoside auch nach



rein wässrigem Auftragen mit ca. 20-30% vol Aceton in Wasser eluiert werden, allerdings werden sie auch bei rein wässrigem Auftragen nicht vollständig an Polyamid gebunden.

Bezüglich der Quantifizierung der Glykoside können noch keine genauen Angaben gemacht werden. Friedrich gibt die Mengen an Catechinglucosid mit bis zu 37,9 mg/kg für Gerste und bis zu 67,5 mg/kg für Malz an (FRIEDRICH UND GALENSA 2000). Die Mengen der neu identifizierten Substanzen sind geringer als die des von Friedrich beschriebenen Catechinglucosids, denn sie ließen sich bei den bisherigen Messungen nicht im UV nachweisen. Der im UV dominante Peak zur Retentionszeit des am meisten vorkommenden Catechindihexosids ist zum großen Teil einer anderen co-eluierenden Substanz zuzuordnen, da sein UV-Spektrum nicht dem der Flavanolle entspricht.

Die Tabelle 2.4-2 zeigt einen Überblick der 22 neu identifizierten Flavanolglykoside und ihrer massenspektrometrischen Fragmentierung.

Abbildung Anhang B	RT (min)	Molekülpeak [M-H] <sup>-</sup>	Ermittelte Struktur	Aglykon	Verlust 3 Hex	Verlust 2 Hex	Verlust 1 Hex
<b>B2</b>	<b>15,5</b>	<b>451</b>	<b>Catechin- glucosid</b>	<b>289</b>			
B5	13,2	613	<i>C-2Hex</i>	289			451
B6	14,3	613	<i>C-2Hex</i>	289			451
B7	14,9	613	<i>C-2Hex</i>	289			nd
B8	15,8	613	<i>C-2Hex</i>	289			451
B9	17,9	613	<i>C-2Hex</i>	289			nd
B10	18,9	613	<i>C-2Hex</i>	289			451
B12	13,1	775	<i>C-3Hex</i>	289		451	613
B13	14,0	775	<i>C-3Hex</i>	289		451	613
B14	15,0	775	<i>C-3Hex</i>	289		451	613
B15	16,3	775	<i>C-3Hex</i>	289		451	613
B16	16,7	775	<i>C-3Hex</i>	289		nd	613
B17	17,6	775	<i>C-3Hex</i>	289		451	613
B18	18,3	775	<i>C-3Hex</i>	289		nd	613
B19	19,5	775	<i>C-3Hex</i>	289		nd	613
B21	14,4	937	<i>C-4Hex</i>	289	451	613	775
B22	18,0	937	<i>C-4Hex</i>	289	451	613	775
B23	29,0	937	<i>C-4Hex</i>	289	nd	613	775
B24	32,3	937	<i>C-4Hex</i>	289	451	613	775
B25	9,3	467	<i>G-Hex</i>	305			
B27	9,3	629	<i>G-2Hex</i>	305			467
B28	14,7	629	<i>G-2Hex</i>	305			467
B29-32	17,7	739	<i>CC-Hex</i>	577			577

Tabelle 2.4-2: In Gerstenmalz identifizierte Flavanolglykoside und ihre in den MS<sup>2</sup>-Fragmentenspektren auftretenden struktur-relevanten Ionen, aufsteigend nach Masse und Retentionszeit. C=(epi)Catechin, Hex=Hexose, nd=nicht detektiert. Fettdruck: bereits beschriebenes Catechinglucosid

## Prenylflavonoide in Hopfen

In verschiedenen Pflanzen sind prenylierte Flavonoide (insbesondere Naringenine und Chalkone) bereits ausführlich beschrieben worden (HARBORNE UND BAXTER 1999, BOTTA ET AL 2005).

In Hopfen sind prenylierte Flavanone und die entsprechenden isomeren Chalkone nachgewiesen worden (STEVENS ET AL 1998, STEVENS UND PAGE 2004, GERHÄUSER 2005). Quantitativ dominiert Xanthohumol, welches im Brauprozess hauptsächlich durch den thermischen Einfluss beim Würzekochen durch Ringschluss zum chiralen Isoxanthohumol isomerisiert (STEVENS ET AL. 1999). In geringeren Mengen findet sich Desmethylxanthohumol, dessen Isomerisierung entsprechend zum 6- oder 8-Prenylnaringenin führt. 8-Prenylnaringenin hat von allen derzeit bekannten Pflanzeninhaltsstoffen die stärkste östrogene Wirkung (etwa ein Zehntel der Wirksamkeit von 17- $\beta$ -Östradiol) und liegt damit in seiner Wirksamkeit weit über den bekannteren Isoflavonen Genistein und Daidzein, die sich z.B. im Soja und Sojaprodukten finden (OVERK ET AL. 2005).

Abbildung 2.4-29 zeigt die Strukturformeln und UV-Spektren von Xanthohumol und Isoxanthohumol. Der Vergleich der Fragmentspektren von Xanthohumol und Isoxanthohumol ergibt, dass eine Unterscheidung zwischen dem Chalkon und dem entsprechenden isomeren Naringenin nicht möglich ist, da die Fragmentspektren keine Unterschiede zeigen. Die Isomerisierung hat aber einen deutlichen Einfluss auf das Chromophor, wie aus der starken Verschiebung der Absorptionsbande im UV-Spektrum zu sehen ist. Dies ist nicht überraschend, da die Bindung zwischen dem Sauerstoff und C-2 eine bevorzugte Bruchstelle bei der Fragmentierung des Flavan-Grundgerüsts ist. Der Bruch dieser Bindung kann dann entsprechend zur RDA-Spaltung führen.

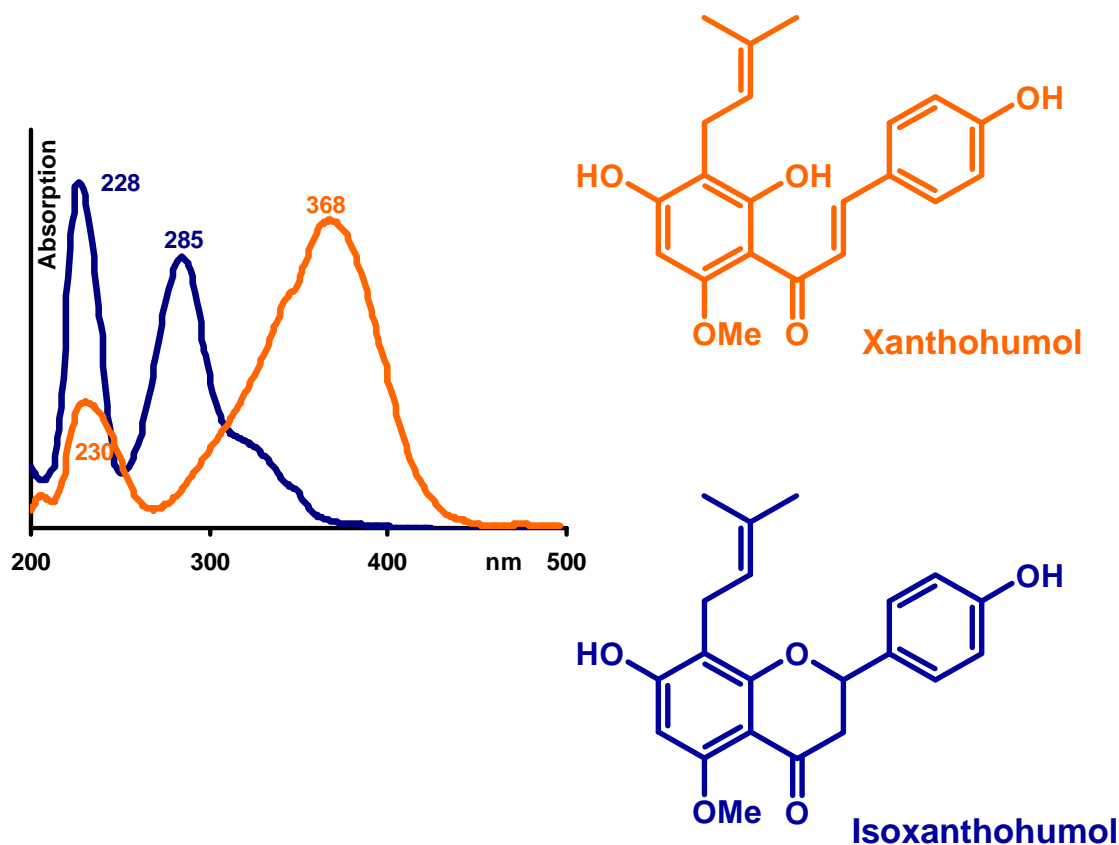


Abbildung 2.4-29: UV-Spektren und Strukturen von Xanthohumol und Isoxanthohumol

Die massenspektrometrische Analyse der Prenylflavonoide wurde von verschiedenen Autoren beschrieben (STEVENS ET AL 1998, PRASAIN ET AL 2003). Eine genaue Analyse der zugrundeliegenden Reaktionen für negativ ionisierte Prenylflavonoide wurde bisher nicht angegeben. Bei positiv ionisierten Prenylflavonoiden kommt es bei Vorliegen einer phenolischen OH-Gruppe in ortho-Stellung der Prenylseitenkette zu einer Cyclisierung unter Verlust eines  $C_4H_8$ -Körpers und zur RDA-Reaktion im Heterozyklus. Abbildung 2.4-30 zeigt die in dieser Arbeit beobachteten Fragmentspektren von Xanthohumol. Bei den hier beobachteten Fragmentierungen von Xanthohumol und Isoxanthohumol ist nur das Produkt der RDA-Reaktion zu finden, welches anschließend unter Abspaltung der Methylgruppe weiterfragmentiert werden kann, wonach sich noch weitere Produkte bilden.

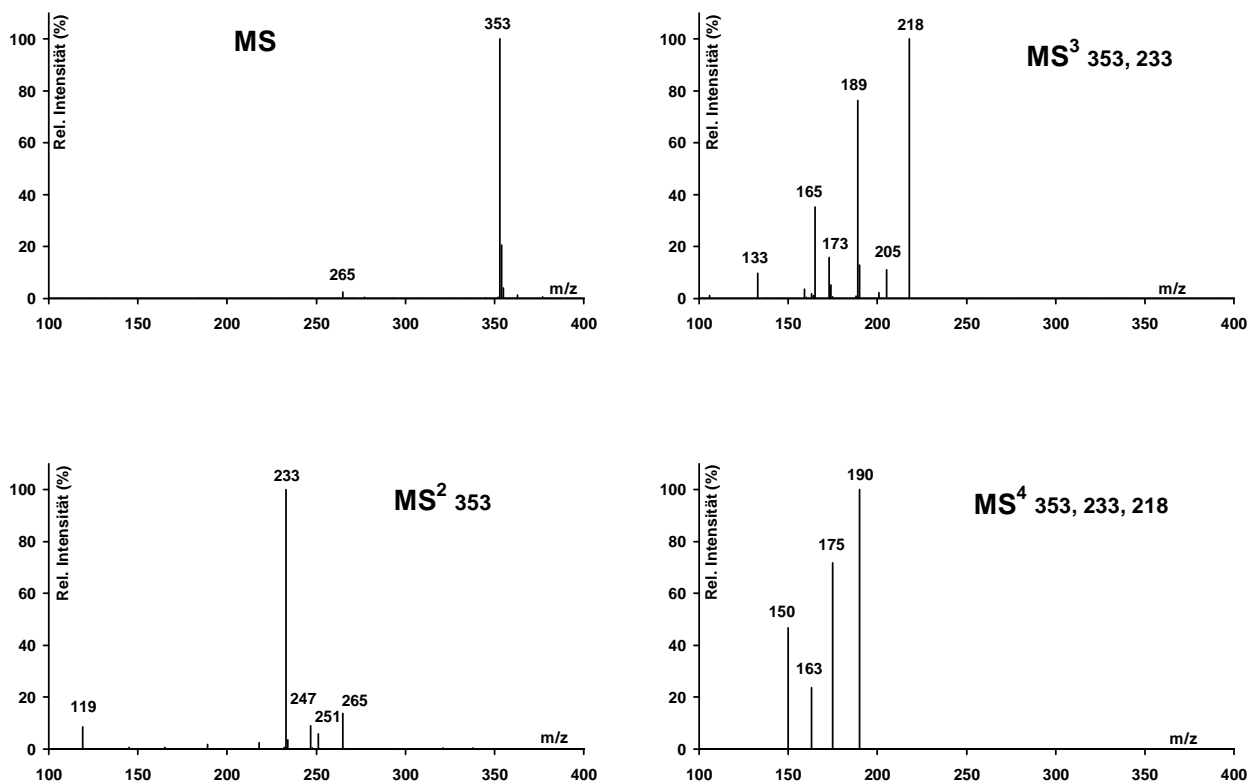


Abbildung 2.4-30: Fragmentspektren von Xanthohumol (negative Ionisierung)

In dieser Arbeit wurden Extrakte von Hopfenproben in Zusammenarbeit mit der Firma NATECO<sub>2</sub> auf das mögliche Vorliegen weiterer prenylierter Flavane mit verwandter Struktur untersucht. Dazu wurde die Fragmentierung von Peaks in den entsprechenden Massenspektren überprüft. Abbildung 2.4-31 zeigt die Massenspektren von Xanthohumol und seinem Isomer bei m/z 353, der Desmethylderivate bei m/z 339 sowie zweifach prenylierter Derivate entsprechend m/z 421 und 407. Auch bei den Massenspektren von m/z 475, 489 und 557, die Derivaten mit drei und vier Prenylgruppen entsprechen, sind deutliche Peaks zu detektieren. Die Fragmentspektren dieser Verbindungen zeigen die auch für Xanthohumol typische RDA-Spaltung und den nachfolgenden Wasserverlust. Durch die Fragmentierung wurden so 5 bisher nicht im Hopfen beschriebene höher prenylierte Naringenine identifiziert (PAPAGIANNOPOULOS UND GALENSA 2004). Auch hier ist eine detaillierte Strukturabsicherung durch spektroskopische Untersuchungen erst nach Isolierung möglich, die aufgrund der geringen Mengen dieser Inhaltsstoffe in Hopfen in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt wurde.

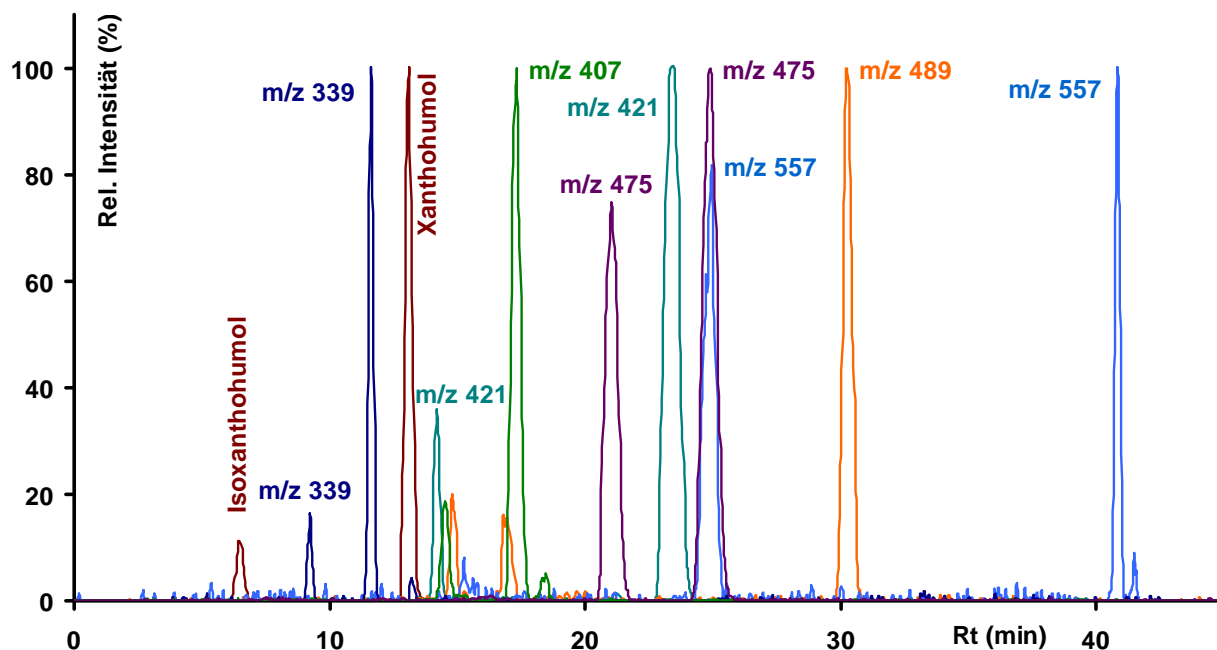


Abbildung 2.4-31: Massenspuren der Prenylflavonoide in einem Hopfenextrakt mit den Massenspuren der neuen Derivate bei  $m/z$  475, 489 und 557 (negative Ionisierung)

## Humulone und Lupulone in Hopfen

Die Humulone und Lupulone, auch als  $\alpha$ - und  $\beta$ -Säuren bezeichnet, sind die kommerziell bedeutsamen Inhaltsstoffe der Hopfendolden (*Humulus lupulus* L.). Sie sind keine Polyphenole, entstehen aber biosynthetisch ähnlich aus einer iso-Valeryl-CoA- und drei Malonyl-CoA-Einheiten über ein Phloroglucin-Zwischenprodukt. Sie wurden wegen ihrer Bedeutung für den Brauprozess im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht. Es handelt sich um lipophile Verbindungen, die im Brauprozess nach Zugabe des Hopfens oder eines Hopfenproduktes zur Würzekochung gelöst und durch den thermischen Einfluss isomerisiert werden. Die entstehenden iso- $\alpha$ -Säuren und iso- $\beta$ -Säuren geben dem Bier seinen bitteren Geschmack, tragen zur Haltbarkeit des Bieres und zur Ausbildung eines stabilen Schaumes bei (KNORR UND KREMKOW 1972, VERZELE UND DE KEUKELEIRE 1991).

Die Humulone und Lupulone haben ähnliche Strukturen und bestehen jeweils aus mehreren einzelnen Verbindungen, die sich durch die Länge und Verzweigung der Alkyl-Seitenkette unterscheiden. Abbildung 2.4-32 zeigt ihre Grundstrukturen, biochemisch bilden die Lupulone die Vorläufersubstanzen der Humulone. Es überrascht somit nicht, dass bei beiden Substanzgruppen Verbindungen mit gleichen Seitenketten gefunden werden. Mit der

Entwicklung der analytischen und präparativen Trennverfahren wurden in den vergangenen Jahrzehnten je 5 verschiedene Humulone und Lupulone beschrieben, die nach ihrem Retentionsverhalten in der Normalphasenchromatographie als Post- (Propyl), Co- (iso-Butyryl), n- (iso-Valeryl), Ad- (2-Methylbutyryl) und Prä- (Capronyl) Humulon bzw. Lupulon bezeichnet werden.

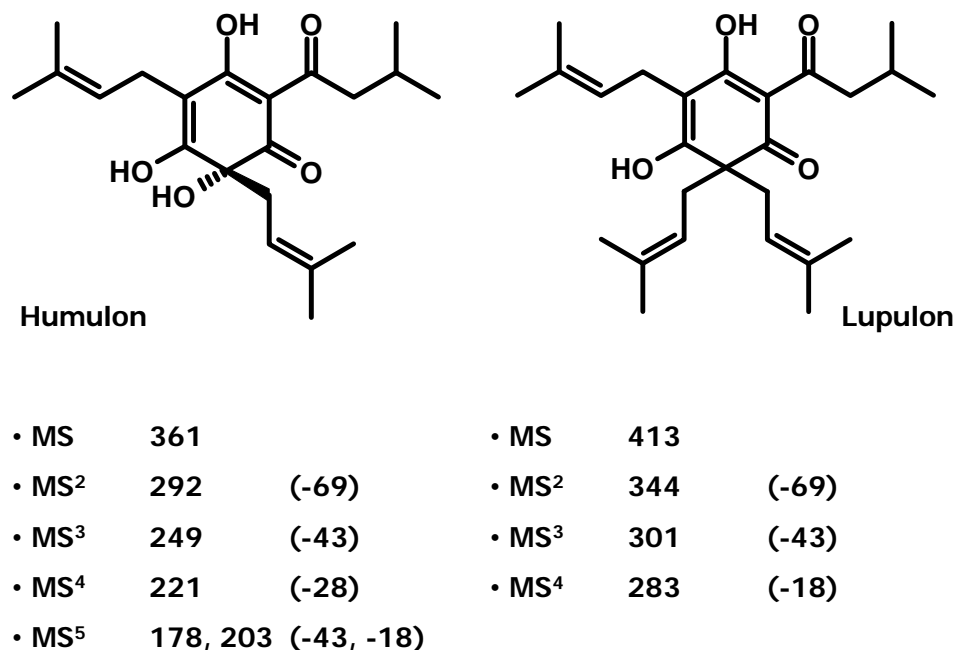


Abbildung 2.4-32: Struktur von n-Humulon und n-Lupulon sowie die in den Fragmentspektren auftretenden Massen mit dem zugehörigen neutral-loss (negative Ionisierung)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in Zusammenarbeit mit der Firma NATECO<sub>2</sub> Extrakte von Hopfenproben auf das mögliche Vorkommen weiterer Humulone und Lupulone untersucht. Dazu wurden die Hopfenproben mittels Pentan in der ASE extrahiert und mit HPLC-MS analysiert und Peaks in den entsprechenden Massenspuren auf ihre Fragmentierung in der Ionenfalle hin überprüft. Abbildung 2.4-33 zeigt als Beispiel die Fragmentierung von n-Humulon. Die Fragmentspektren zeichnen sich in jeder Stufe durch das Auftreten nur jeweils eines stark dominierenden Signals aus. Die Abbildungen 2.4-34 und 2.4-35 zeigen die einzelnen Massenspuren der Humulone und Lupulone mit den Massenspuren der neu gefundenen Derivate.

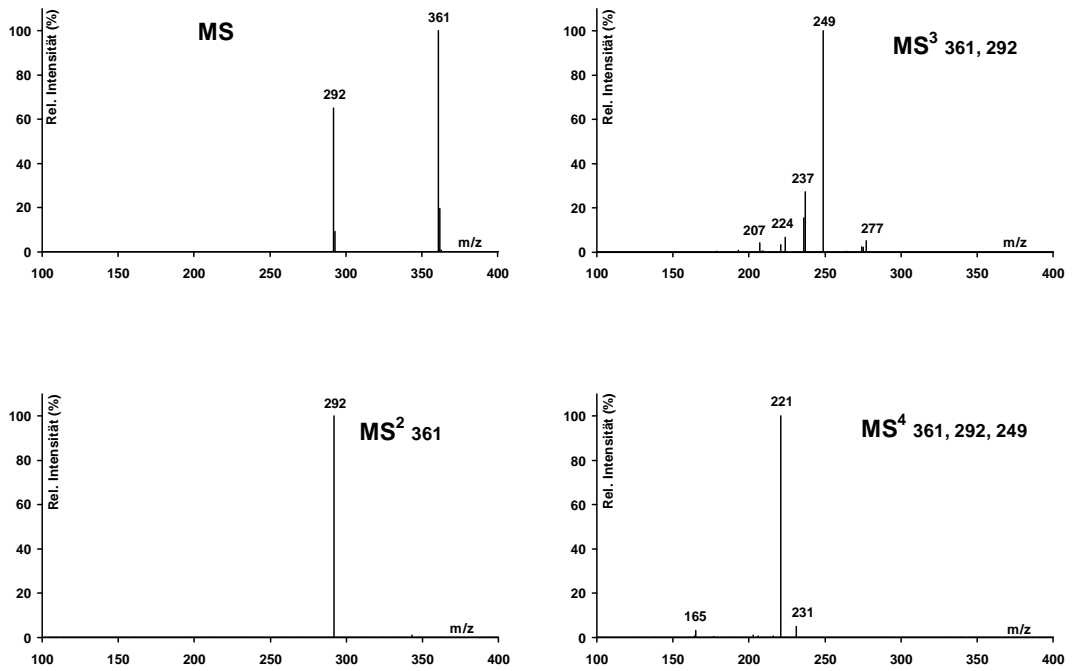


Abbildung 2.4-33: Fragmentspektren von Humulon (negative Ionisierung)

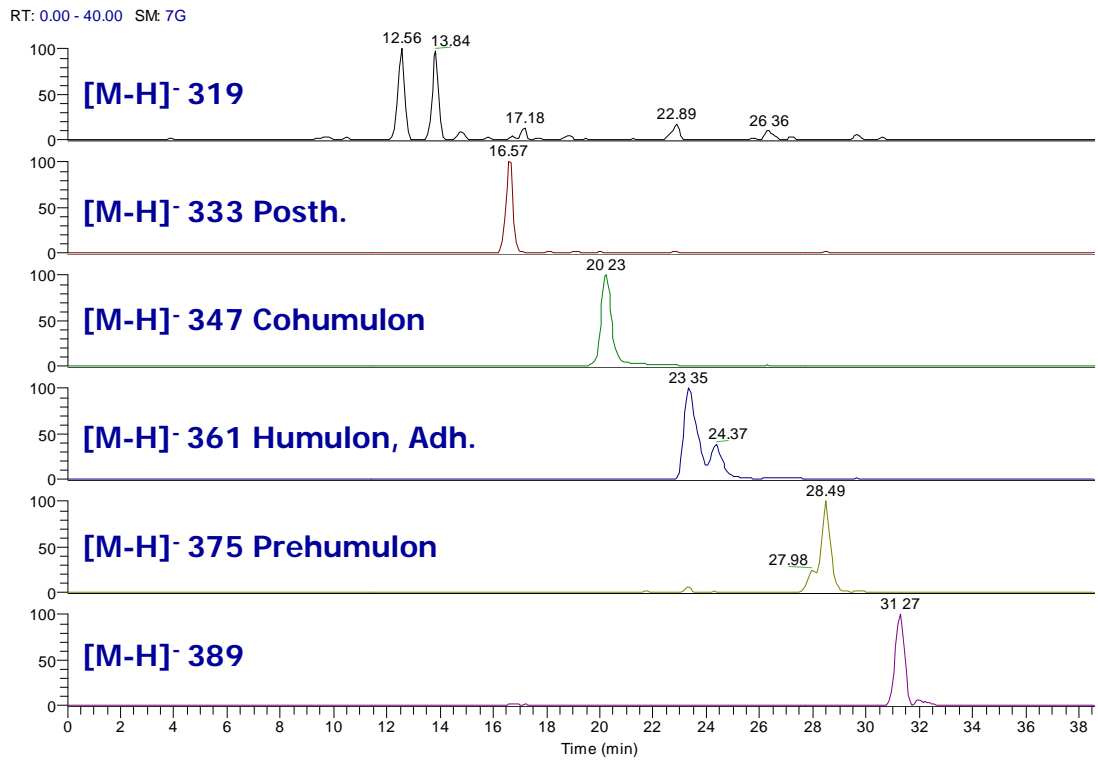


Abbildung 2.4-34: Massenspuren der Humulone in einem Hopfenextrakt mit den Massenspuren der neuen Derivate bei [M-H]<sup>-</sup> 319 und [M-H]<sup>-</sup> 389 (negative Ionisierung)

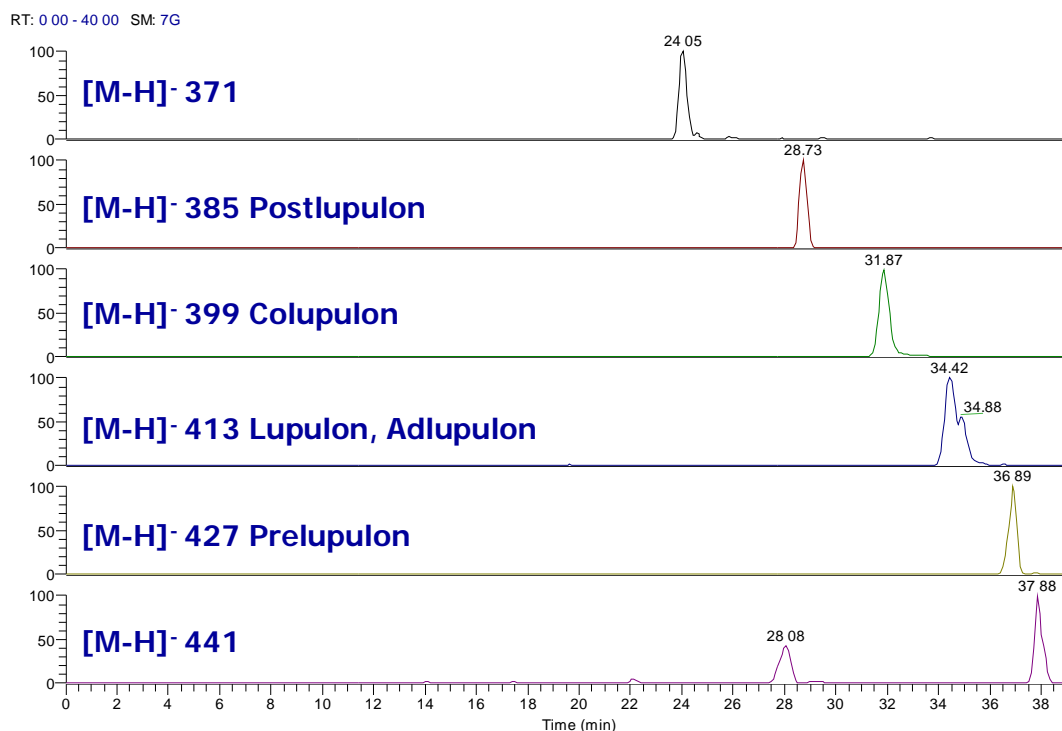


Abbildung 2.4-35: Massenspuren der Lupulone in einem Hopfenextrakt mit den Massenspuren der neuen Derivate bei [M-H]<sup>-</sup> 371 und [M-H]<sup>-</sup> 441 (negative Ionisierung)

Durch diese Untersuchungen konnten für die Humulone und die Lupulone je 2 bisher nicht beschriebene Verbindungen mit einer Massendifferenz von je 14 (entspricht einer Methylengruppe) auf das größte bzw. kleinste bisher bekannte Derivat nachgewiesen werden. Ihre massenspektrometrische Fragmentierung entspricht mit der typischen Sequenz der neutral losses wie in den Abbildungen 2.4-32 und 2.4-33 dargestellt den Humulonen bzw. den Lupulonen. Da die Seitenkette bei der massenspektrometrischen Fragmentierung im ionisierten Molekül verbleibt, lassen sich aus den Fragmentspektren keine Informationen über ihre Struktur ableiten. Eine weitere Aufklärung der Struktur erfordert hier die präparative Gewinnung dieser Substanzen und ihre strukturelle Charakterisierung mittels NMR, was im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurde. Die Mengen dieser Substanzen im Hopfen sind sehr gering (weniger als 1% der gesamten Humulone bzw. Lupulone), so dass eine Isolierung entsprechend aufwändig ist.



## **2.5 – Ergebnisse und Diskussion – Prozessanalytik und präparative Anwendungen**

Das entwickelte und optimierte automatisierte Analyseverfahren wurde zur Untersuchung der Proanthocyanidine und ihrer Veränderungen im Brauprozess sowie zur Identifizierung und Quantifizierung der Polyphenole in Johannisbrot und daraus hergestellten Produkten eingesetzt. Damit werden zwei Anwendungszwecke der entwickelten Methode vorgestellt und diese bei der Analytik praktisch erprobt. Die Ergebnisse zeigen, dass das hier vorgestellte Verfahren die erfolgreiche Identifizierung und Quantifizierung vieler individueller Polyphenole in einer großen Zahl von Prozessproben mit komplexen Matrices ermöglicht.

### **Proanthocyanidine im Brauprozess**

Aus Gerstenmalz und Hopfen gelangen die darin enthaltenen Proanthocyanidine während des Brauens ins Bier. Aufgrund der verwendeten Rohstoffmengen stammen dabei etwa 80% der im Bier enthaltenen Proanthocyanidine aus dem Gerstenmalz, obgleich die Gehalte im Hopfen selbst deutlich größer sind (DELCOUR UND TUYTENS 1984, JENDE-STRID 1988). Die Proanthocyanidine und die anderen im Malz und Hopfen enthaltenen Polyphenole werden im Brauwesen einerseits positiv bewertet, da sie entscheidend bei der Fällung der Proteine während der Würzekochung beteiligt sind und ihnen durch ihre antioxidativen Eigenschaften während des Brauprozesses, aber auch im abgefüllten Bier, ein Beitrag zur Geschmackstabilität zugeschrieben wird (ARAKI ET AL. 1999, GOUPY ET AL. 1999, BUSHNELL ET AL. 2003, WURZBACHER ET AL. 2006). Dazu kommen die seit einigen Jahren diskutierten positiven physiologischen Wirkungen der Polyphenole, insbesondere des Xanthohumols (ALT 2001). Andererseits können die Proanthocyanidine zusammen mit Proteinen zu Trübungen im abgefüllten Bier führen, was als Qualitätsminderung bei blankfiltrierten Bieren angesehen wird (LEUPOLD UND DRAWERT 1981, JERUMANIS 1985, JENDE-STRID 1988, PONTON 1988, KANEDA ET AL. 1990, BELLMER ET AL. 1995A, BELLMER ET AL. 1995B, MCMURROGH ET AL. 1996, SIEBERT ET AL. 1996, JENDE-STRID 1997, BAMFORTH CW 1999, GROMUS UND LUSTIG 1999, SIEBERT UND LYNN 2000, MADIGAN ET AL. 2000, BAMFORTH CW 2000A, BAMFORTH CW 2000B, LUSTIG ET AL. 2001, MELLENTHIN ET AL. 2001, MIKYSKA ET AK. 2002).

Aus diesen Gründen ist es interessant, die in Malz und Hopfen enthaltenen Proanthocyanidine zu analysieren, ihre Veränderungen während des Brauprozesses zu verfolgen

und den Einfluss der technologischen Schritte auf die Polyphenole zu verstehen. Die bisher vorliegenden Berichte bestimmten die Proanthocyanidine vielfach nur über Summenparameter, geben aber selten Werte für einzelne Verbindungen an (MCMURROUGH 1981). Aufgrund der Strukturvielfalt der Proanthocyanidine kann man davon ausgehen, dass nicht alle Verbindungen gleichermaßen trübungsaktiv sind. So erwiesen sich in Untersuchungen mit Proanthocyanidinfraktionen die Trimere als am stärksten trübungsaktiv, während Monomere, Dimere und die höheren Oligomere geringere Aktivitäten zeigten. Die Ergebnisse einzelner Studien sind, bedingt durch die Schwierigkeiten der Analytik, allerdings widersprüchlich (ASANO ET AL. 1984, DELCOUR ET AL. 1984, MCMURROUGH ET AL. 1992, MCMURROUGH UND BAERT 1994, SIEBERT 1999A, SIEBERT 1999B). Auch die einzelnen trimeren Proanthocyanidine können sich in ihren Eigenschaften durchaus unterscheiden.

Die meisten Untersuchungen zum Verhalten der Proanthocyanidine während des Brauprozesses machen methodisch bedingt keine differenzierten Aussagen über einzelne Verbindungen. Der Einsatz von Hochleistungstrennmethoden und selektiver Detektion für diese Fragestellung ist nur wenig beschrieben (ROEDER 1995, WHITTLE 1999, WOLLERSEN 2004). Mit der hier entwickelten automatisierten Analytik ist es möglich, in einer großen Anzahl von Brauproben die einzelnen Verbindungen mit ausreichender Genauigkeit zu analysieren und ihren Verlauf während des Brauprozesses sowie dabei signifikante Veränderungen zu verfolgen.

### **Der Brauprozess**

Im Prozess des Bierbrauens (am Beispiel eines Bieres „Pilsener Brauart“) wird zunächst in der **Maische** geschrotetes **Gerstenmalz** mit Wasser vermischt und erwärmt (NARZIß 1986). Dadurch kommt es durch die enthaltenen Amylasen zu einem enzymatischen Abbau der Stärke zu den für die Gärung erforderlichen Zuckern. Beim **Läutern** wird der wässrige Extrakt, die **Würze**, von den unlöslichen Bestandteilen der Gerstenkörner, dem **Treber**, durch Filtration getrennt. Der Treber wird mit Wasser ausgewaschen, um den Großteil der gelösten Zucker zu gewinnen. Danach erfolgt beim **Würzekochen** die Zugabe von **Hopfen** als Hopfendolden, -pellets oder -extrakt. Dabei wird die Würze sterilisiert, die Bitterstoffe des Hopfens (Humulone und Lupulone) gelöst und isomerisiert, und ein Teil der Proteine fällt als sogenannter Heißtrub aus und wird abgetrennt. Nach dem Abkühlen der Würze wird diese mit Hefe zur **Gärung** gebracht. Dabei wird ein Großteil der Zucker zu Alkohol und Kohlendioxid umgewandelt und die Hefe setzt sich beim „untergärigen“ Pilsbier (im Gegensatz zu „obergärigen Bieren“) am Boden des Gefäßes ab. Nach der anschließenden Lagerung wird die restliche Hefe abgetrennt und das Bier

kommt vor der Abfüllung in der Regel noch zur **Filtration**. Dabei wird einerseits ein Partikelfilter verwendet, um Hefereste und andere Schwebstoffe herauszufiltern. Andererseits wird meist eine Filtration über Kieselgur und/oder Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) durchgeführt, um Proteine und Proanthocyanidine vor der Abfüllung abzutrennen. Damit soll die **physikalische Stabilität** des Bieres erhöht, d.h. die Bildung von Partikeln während der Lagerung und somit die Eintrübung des abgefüllten Bieres vermindert werden. Die Trübung beruht vermutlich zumindest teilweise auf der Bindung zwischen Proanthocyanidinen und Proteinen, die mit der Zeit größere Komplexe bilden können (Literaturüberblick bei HAUSEN 2000).

### **Analyse von Proanthocyanidinen im Brauprozess**

Zur Analyse des Brauprozesses wurden in Zusammenarbeit mit den Brauereien C.&A. Veltins und Beck&Co Proben beim Maischen, Läutern, Würzekochen und während der Filtration genommen. Die Probenahme erfolgte direkt in der Brauerei, um den tatsächlichen Prozessablauf im großen Maßstab zu erfassen. Die Gärung und Lagerung wurden wegen der nicht repräsentativen Probenahme nicht untersucht. Die Prozessproben wurden bei der Probenahme luftdicht verschlossen und direkt nach Ankunft im Labor durch Zugabe von Ameisensäure und Ascorbinsäure mikrobiologisch und oxidativ stabilisiert, um Veränderungen der Analyten zu minimieren. Die Proben wurden mittels Festphasenextraktion an Polyamid gereinigt, die Polyphenole angereichert und die Eluate mittels HPLC-MS analysiert. Hier dargestellt werden die Veränderungen der Monomere und der dimeren und trimeren Proanthocyanidine während des Brauprozesses vom Maischen bis zur Abfüllung. Abbildung 2.5-1 zeigt die Konzentrationen von Catechin und Epicatechin, der zwei dominanten dimeren und der vier dominanten trimeren Proanthocyanidine im Verlaufe des Brauprozesses, vom Einmaischen bis zur Würzekochung.

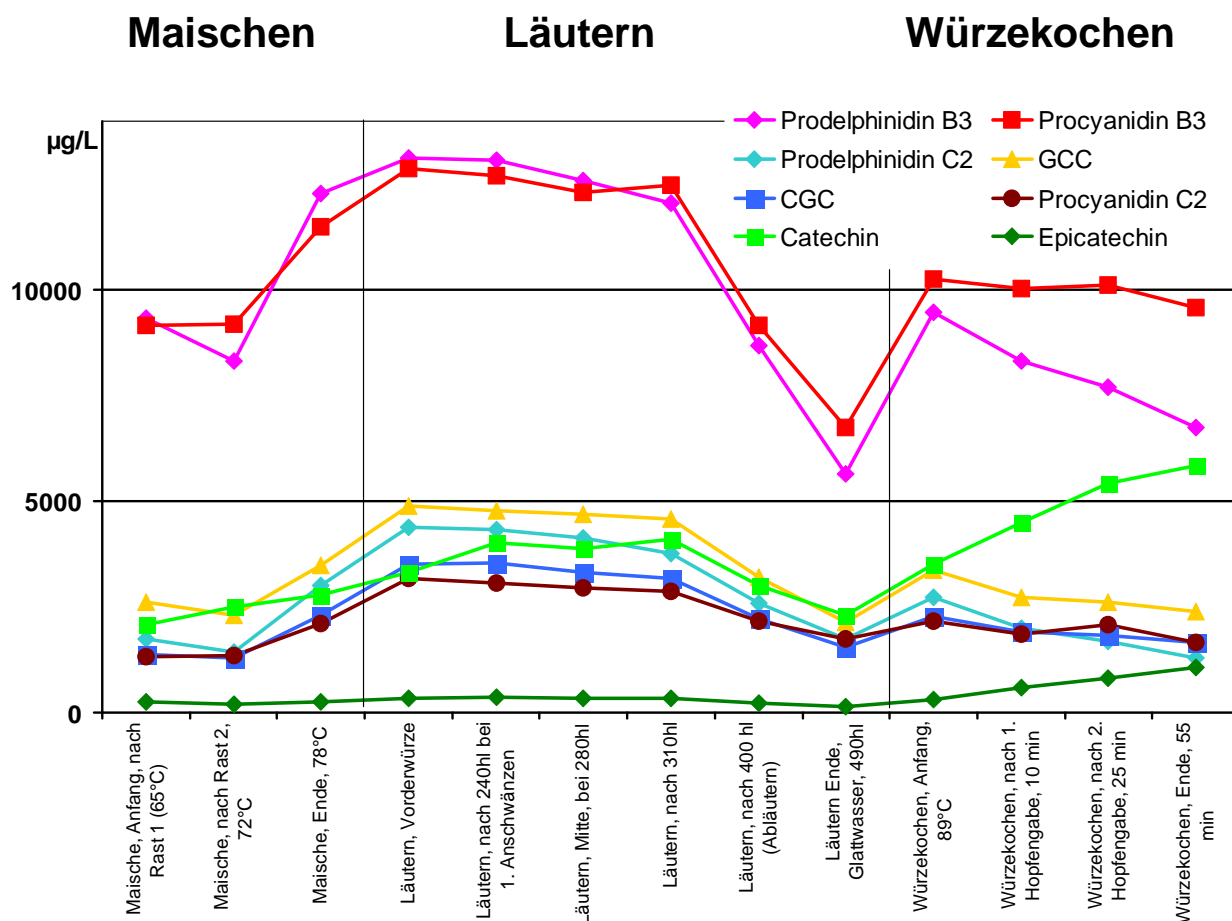


Abbildung 2.5-1: Verlauf der Konzentrationen der Proanthocyanidine während des Brauprozesses im Sudhaus

Im **Verlauf des Maischens** kommt es zu einem Anstieg der Konzentrationen, da die Verbindungen während dieses Prozesses nach und nach aus dem Gerstenmalz gelöst werden. Durch die heute verwendeten Malze, die eine bereits gut aufgeschlossene Stärke enthalten, und das Einmaischen bei höheren Temperaturen sind die Konzentrationen schon zu Beginn, d.h. bei der ersten Probenahme, relativ hoch. Das Maischen wird in der Brauerei in der Regel sauerstoffarm durchgeführt, um oxidative Effekte mit negativen Auswirkungen auf den Geschmack zu vermindern. Dies wird auch aus dem Verhalten der Proanthocyanidine ersichtlich. Wird das Maischen im kleinen Labormaßstab durchgeführt (z.B. als Kongressmaische), kommt es zu einer starken Abnahme der Konzentrationen im Verlauf des Maischens, wenn nicht antioxidative Substanzen (z.B. Sulfite oder Vitamin C) zugesetzt werden.

Beim **Läutern** nehmen die Konzentrationen erwartungsgemäß nach einer anfänglichen Plateauphase (Vorderwürze und Beginn des Läuterns) ab, da die Treber mit Wasser ausgewaschen werden. Dadurch bedingt kommt es zu einer Verdünnung. Die starke

Konzentrationssteigerung zwischen dem Ende des Maischens und der Vorderwürze ist nur zum Teil einem Lösungsvorgang im Maischeprozess zuzurechnen, da hier die Möglichkeiten der Probenahme (oxidative Einflüsse, Bindung an Treberbestandteile, Kälte trub durch Probenlagerung und Versand) einen besonders großen Einfluss haben.

Während des **Würzekochens** unterliegen die Proanthocyanidine einer starken thermischen Belastung (MCMURROUGH UND DELCOUR 1994). Bestimmte Proanthocyanidine binden an Proteine und sind damit an der Ausbildung des Heißtrubs beteiligt, wodurch ihre Konzentrationen sinken. Durch den Hopfen werden aber auch bei Verwendung von Hopfendolden oder -pellets Proanthocyanidine zugeführt. Da die im Hopfen vorkommenden Proanthocyanidine sich strukturell von denen des Malzes unterscheiden, vergrößert sich dadurch das Spektrum dieser Verbindungen. Weil die Zugabe von Hopfen meist in mehreren Gaben erfolgt, werden auch gegen Ende des Kochens Proanthocyanidine eingetragen, die entsprechend einem geringeren Temperatureinfluss unterworfen sind. Quantitativ sind die Hopfenproanthocyanidine untergeordnet, da die Konzentrationen im Hopfen zwar hoch, aber die verwendeten Hopfenmengen gering sind. Die Catechin- und Epicatechinkonzentrationen nehmen während des Würzekochens zu. Weil Epicatechin als Baustein der Gersten-Proanthocyanidine nicht beschrieben ist, kann diese Konzentrationszunahme von Epicatechin dem Hopfen zugeschrieben werden. Bei der Zunahme von Catechin ist zusätzlich die Bildung des Monomers aus dem thermischen Abbau der Proanthocyanidine möglich. Bei den Dimeren und Trimeren ist eine Abhängigkeit des Prozesseinflusses von der Struktur erkennbar: So werden Prodelphinidin B3 und C2 thermisch stärker beeinträchtigt als die anderen Verbindungen. Sie enthalten einen größeren Anteil an Gallo catechineinheiten als die anderen Verbindungen. Der Konzentrationssprung vom Ende des Läuterns zur Würzekochung ist darauf zurückzuführen, dass in der Würzepfanne das gesamte Flüssigkeitsvolumen des Läuterns wieder vereinigt wird, so dass sich ein Durchschnittswert aus den Konzentrationen der Läuterproben ergibt.

Die Untersuchung der **Gärung** stößt auf große Probleme bei der Probenahme, die kaum repräsentativ durchführbar ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proben aus der Gärung nicht untersucht. Im Verlauf der **Lagerung** verändern sich die Konzentrationen nur sehr wenig. Dies ist ersichtlich aus einem Vergleich des Bieres vom Befüllen des Lagertankes bis zum Zeitpunkt der Entleerung.

Die **Filtration** beeinflusst erwartungsgemäß die Proanthocyanidine sehr stark, da sie mit dem Schritt der PVPP-Filtration auf ein Senken der Konzentrationen abzielt. Abbildung 2.5-2 zeigt die Konzentrationen der Proanthocyanidine in den Proben des Einlaufs zum Puffertank (vor

der Filtration), dem Auslauf des Kieselgurfilters (entspricht Einlauf des PVPP-Filters) und dem Auslauf des PVPP-Filters zu Beginn sowie zum Ende der Filterstandzeit. Die Kieselgurfiltration hat zum Ziel, einen Großteil der verbliebenen (trübungsaktiven) Proteine sowie Partikel (z.B. Hefereste) zu entfernen. In diesem Schritt findet eine geringe, unspezifische Reduktion der Proanthocyanidine statt. Der Schritt der PVPP-Filtration reduziert die Konzentrationen der Proanthocyanidine dramatisch, mit dem Verlauf der Filtration ist aber eine deutliche Abnahme der Filterwirkung zu beobachten. Abbildung 2.5-3 zeigt den Verlauf der Konzentrationen der Haupt-Proanthocyanidine zu Beginn sowie zum Ende der Filterstandzeit. So finden sich zu Beginn der Filtration nur sehr geringe Konzentrationen an Proanthocyanidinen nach der PVPP-Filtration, diese steigen aber rasch an und bleiben dann über einen langen Zeitraum der Filtration auf geringem Niveau stabil. Da die Filtration aufgrund der Abnahme der Durchlässigkeit des Filters (Drucksteigerung) beendet wird, ist hier keine Aussage möglich, wie sich bei einer noch weiter fortschreitenden Filtration die Konzentrationen verändern würden. Bemerkenswert ist auch, dass die Prenylflavonoide Xanthohumol und Isoxanthohumol bei der PVPP-Filtration gebunden werden. Während Isoxanthohumol einen ähnlichen Verlauf wie die Proanthocyanidine zeigt, wird Xanthohumol mit fortschreitender Filtration sogar noch stärker gebunden.

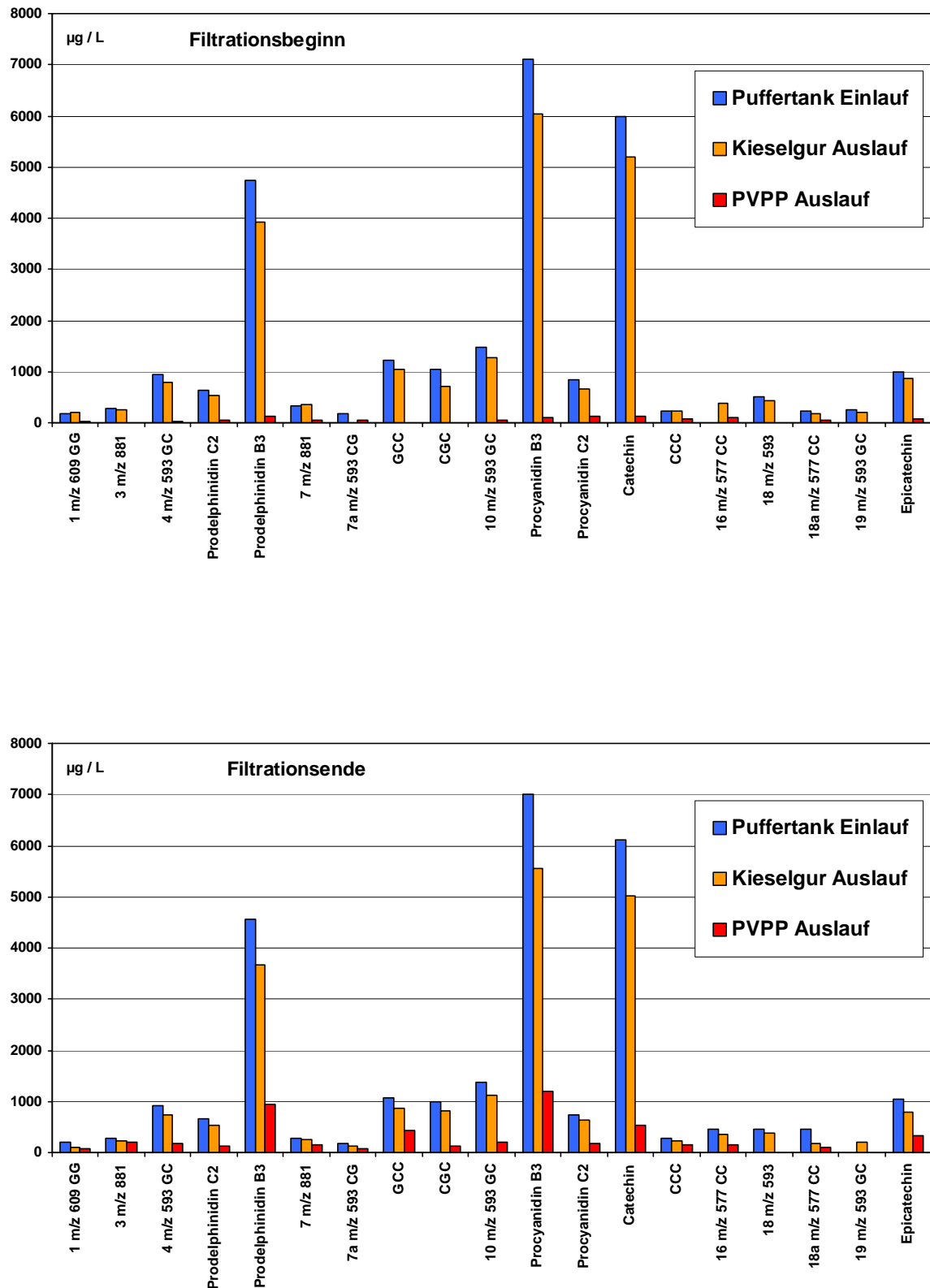


Abbildung 2.5-2: Vergleich der Konzentrationen der Proanthocyanidine vor und nach den einzelnen Schritten der Filtration, zu Beginn und zu Ende der Filterstandzeit

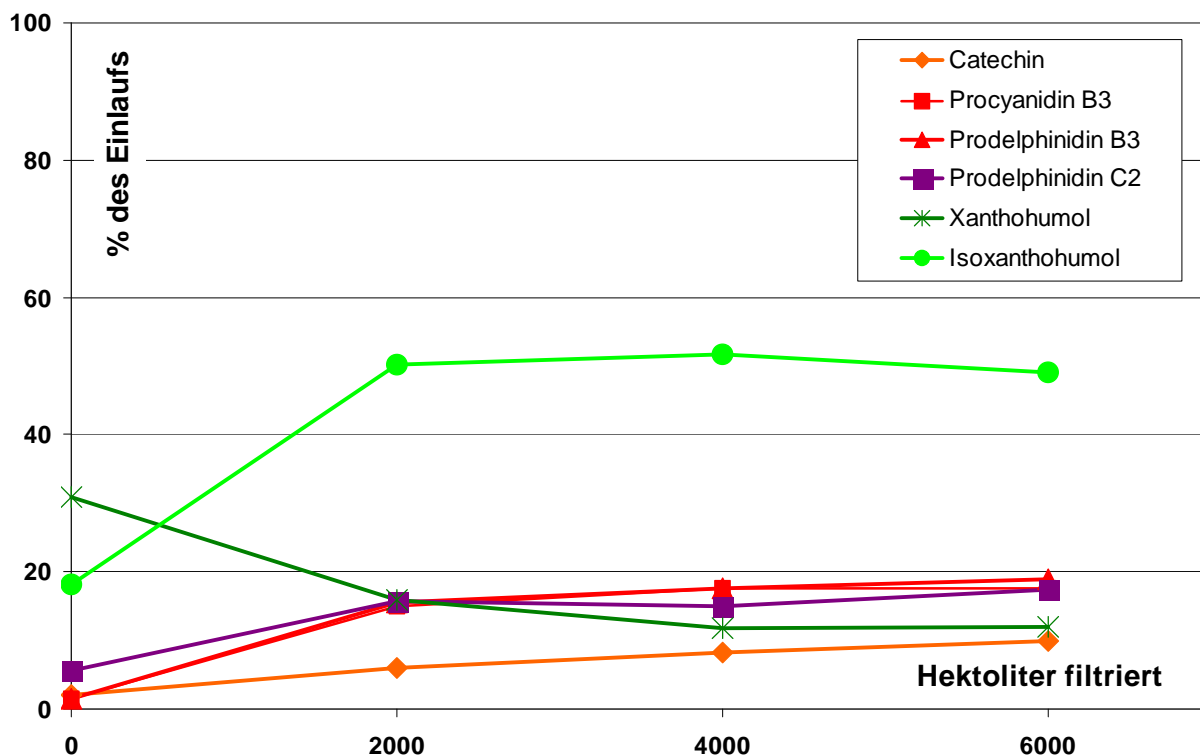


Abbildung 2.5-3: Verlauf der Konzentrationen der Proanthocyanidine und der Prenylflavonoide während der Filtration

Die **Kinetik der Bindung** von Proanthocyanidinen an PVPP wurde im Labormaßstab untersucht. In einem Batch-Ansatz wurden aus Vorderwürze (hoher Gehalt an Proanthocyanidinen) unter Zusatz von Ascorbinsäure (Verhinderung eines oxidativen Einflusses) unter Rühren die Proanthocyanidine an PVPP gebunden und nach verschiedenen Zeiten die im Überstand verbliebenen Verbindungen untersucht. Die Abbildung 2.5-4 zeigt den Verlauf der Konzentrationen der beiden quantitativ bedeutendsten Phenolcarbonsäuren sowie der sechs quantitativ dominierenden Proanthocyanidine und des monomeren Catechins. Die Phenolcarbonsäuren werden nur gering beeinflusst. Möglicherweise liegen hier enzymatische oder oxidative Einflüsse vor, oder es kommt zu einer geringen Bindung an PVPP. Die Konzentrationen der Proanthocyanidine im Überstand sinken zunächst sehr schnell ab, und werden dann im weiteren Verlauf nur noch geringfügig weiter reduziert. Der Verlauf ist für alle betrachteten Verbindungen sehr ähnlich. Bemerkenswert ist, dass das monomere Catechin zunächst sehr stark gebunden wird, aber nicht die starke Reduktion während der Dauer des



Versuches erfährt wie die Proanthocyanidine. Die Prenylflavonoide wurden in diesem Versuch nicht berücksichtigt, da sie in der verwendeten Vorderwürze nicht enthalten waren.

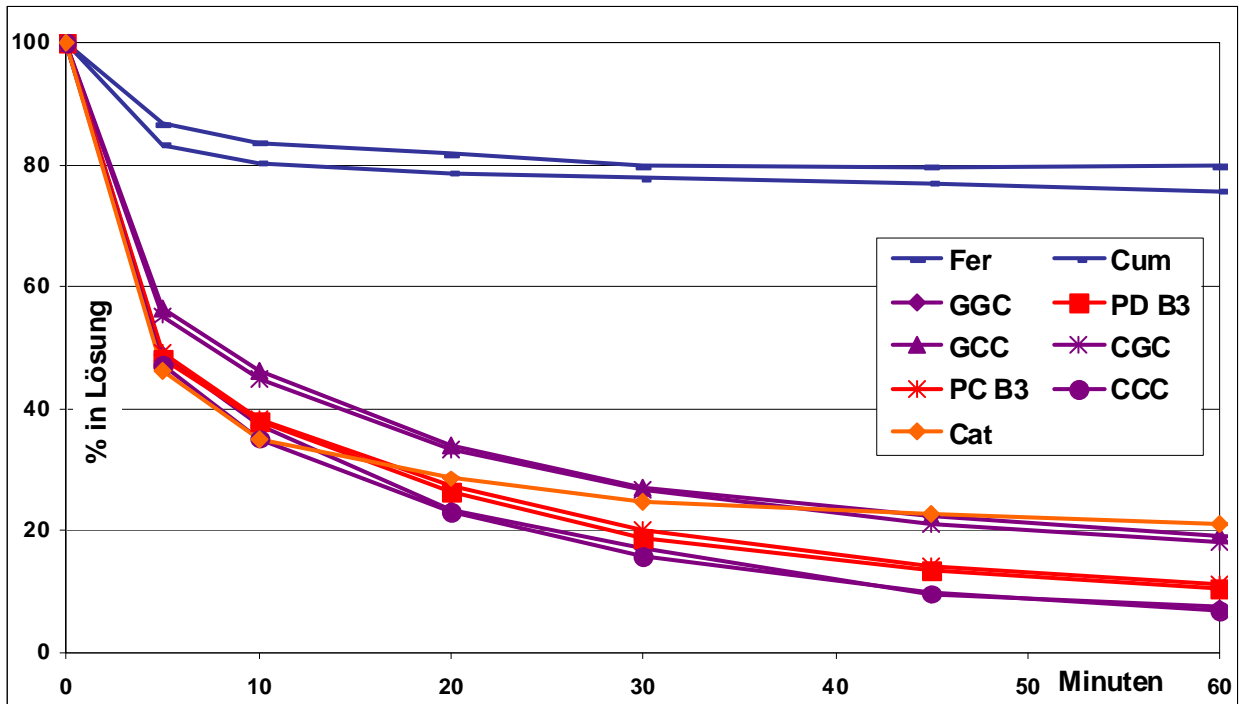


Abbildung 2.5-4: Verlauf der Konzentrationen der Proanthocyanidine in Gerstenmalz während eines Laborversuchs zur Bindung an PVPP. Cat: Catechin; PC B3: Procyanidin B3; PD B3: Prodelphinidin B3; Fer: Ferulasäure; Cum: Cumarsäure

### **Johannisbrot (*Ceratonia Siliqua* L.)**

Der Johannisbrotbaum (*Ceratonia Siliqua* L., Leguminosae) ist ein immergrüner Baum, dessen Ursprung im Mittelmeerraum liegt (BATTLE UND TOUS 1997). Heute wächst er weltweit in vielen gemäßigten und semiariden Klimaten. Die Pulpe der Fruchtschoten enthält etwa 40-50 % süße Kohlenhydrate, sowie Ballaststoffe, Tannine und Polyphenole (SAURA-CALIXTO UND CANELLAS 1982, MARAKIS 1996). Die Fruchtschoten werden industriell hauptsächlich zur Gewinnung des Kernmehls genutzt, das als stark quellfähiges Material in der Lebensmittelherstellung als Verdickungsmittel eingesetzt wird. Die umhüllende Schote wird traditionell nur lokal als Nahrungsmittelspezialität verwendet, hauptsächlich dient sie als Viehfutter (BINDER ET AL. 1959). Aus der Pulpe werden verschiedene Produkte gewonnen, so z.B. Sirupe oder Melassen, ungeröstete und geröstete Carobpulver zur Verwendung als Kakaosubstituenten oder spezielle tanninreiche Antidiarrhoika (PLOWRIGHT 1951, LOEB ET AL. 1989, MARAKIS 1996). Caromax, ein neuartiges Carobprodukt mit einem besonders hohen Anteil nicht löslicher Ballaststoffe, zeigt im Tierversuch und bei menschlichen Studien cholesterinsenkende Eigenschaften (PÉREZ-OLLEROS ET AL. 1999A, PÉREZ-OLLEROS ET AL. 1999B, ZUNFT ET AL. 2001, ZUNFT ET AL. 2003). Die Carobprodukte zeichnen sich durch ihr antioxidatives Potential aus, für welches die enthaltenen Polyphenole verantwortlich sind (HABER 2002, KUMAZAWA ET AL. 2002). Bisherige Untersuchungen beschreiben das Vorkommen von Gallussäure, Proanthocyanidinen und Quercetinglykosiden (TAMIR ET AL. 1971, BRAVO ET AL. 1982, AVALLONE ET AL. 1997, MARAKIS ET AL. 1997, CORSI ET AL. 2002, SAKAKIBARA ET AL. 2003). Eine im Anschluss an die Durchführung der hier beschriebenen Untersuchungen veröffentlichte Arbeit beschreibt die Strukturaufklärung der Haupt-Polyphenole in Carob (OWEN ET AL. 2003).

Als neuartiges polyphenolreiches und antioxidatives Produkt mit vermutlich positiven gesundheitlichen Wirkungen (functional food) bietet sich insbesondere Caromax zur Anwendung der entwickelten Analysemethoden an. Darüberhinaus kann durch die Analyse verschiedener Carobprodukte und Verarbeitungsstufen die Bedeutung einzelner Prozessschritte für die einzelnen Polyphenole untersucht werden.

### **Analyse von Polyphenolen in Johannisbrotprodukten**

In Zusammenarbeit mit der Firma Nutrinova wurden die phenolischen Inhaltsstoffe von Johannisbrot und daraus hergestellten Produkten untersucht und die Ergebnisse publiziert (WOLLSEIFEN ET AL. 2003, PAPAGIANNPOULOS ET AL. 2004). Zunächst wurde die Extraktion der Polyphenole aus Caromax, einem Verarbeitungsprodukt der Johannisbrotschote, detailliert

untersucht (siehe Abschnitt 2.1 – Extraktion eines Johannisbrotproduktes, Seite 38). Die erarbeitete optimale Probenvorbereitung wurde dann auf alle vorliegenden Probenmaterialien angewendet. Es lassen sich mit der beschriebenen optimierten automatisierten Analytik in Caromax 41 polyphenolische Verbindungen getrennt voneinander identifizieren und quantifizieren. Ihre Messung in einzelnen Proben aus dem Verarbeitungsprozess ermöglicht dann eine Bewertung des Einflusses der Prozessschritte auf die Polyphenole sowie eventuell entsprechende Maßnahmen, um bestimmte Stoffe oder Stoffgruppen gezielt zu beeinflussen.

Die in der vorliegenden Arbeit in den untersuchten Carobprodukten identifizierten und quantifizierten Verbindungen sind in den Tabellen 2.5-1 bis 2.5-4 jeweils für verschiedene Produkte bzw. Chargen, wiedergegeben. Tabelle 2.5-1 zeigt die Verbindungen in den Kibbles (zerkleinerte Schote nach Gewinnung der Kerne), dem Kernmehl und dem aus den Kohlenhydraten gewonnenen Sirup. Daraus wird die **Verteilung der extrahierbaren Polyphenole in der Frucht** ersichtlich. Die äußere Hülle der Schote enthält den Großteil der Polyphenole in der Frucht. Im Kernmehl wurden nur wenige Polyphenole in insgesamt geringerer Menge gefunden. Auffallend ist der Unterschied in der Verteilung der Flavonolglykoside: während in der Schote die Myricetinderivate dominieren, finden sich im Kernmehl hauptsächlich Quercetinderivate. Im Sirup dominieren die Phenolcarbonsäuren, allen voran Gallussäure. Die hohe Konzentration der Gallussäure könnte aus einer Hydrolyse der hydrolysierbaren Tannine während der Extraktion und der Konzentrierung des Zuckersirupes resultieren; um dies zu verifizieren, müssten einzelne Proben aus den Stufen der Sirupgewinnung analysiert werden.

Tabelle 2.5-2 und 2.5-3 zeigen die identifizierten und quantifizierten Polyphenole in **gerösteten Carobpulvern und im Carobfaserprodukt Caromax**. Der Vergleich der verschiedenen Chargen und der verschiedenen Produkte zeigt, dass insbesondere bei den Hauptkomponenten sich die Zusammensetzung der Polyphenole ähnelt. Die größten Unterschiede sind im Gehalt der Gallussäure, im Anteil der Flavonolglykoside und dem Verhältnis der Myricetin- und Quercetinderivate zu sehen.

Durch einen Vergleich mit den von Owen beschriebenen Strukturen der Hauptpolyphenole in Carob lässt sich schließen, dass es sich bei dem glykosidischen Anteil der Flavonolhexoside um Glucose, bei den Flavonolpentosiden um Rhamnose und bei der Hexose der hydrolysierbaren Tannine um  $\beta$ -D-Glucose handelt (OWEN ET AL. 2003).

RT [min]	Verbindung	Kibbles [mg/kg]	Kernmehl [mg/kg]	Sirup [mg/kg]
8,8	Gallussäure	174,1	—	1012,6
10,1	2 Hexose + 1 Gallussäure	nq	—	—
15,3	(epi)Galocatechin	nq	—	—
22,6	Hexose + 2 Gallussäuren – Wasser + Acetat	nq	—	—
22,8	Procyanidin-Dimer	nq	—	—
24,4	Hydrolisierbares Tannin	nq	—	—
25,0	3 Desoxyhexosen	nq	—	—
25,6	Hexose + 2 Gallussäuren	nq	—	—
27,2	Catechin	14,8	23,8	9,0
29,9	Kaffesäure	—	—	2,5
30,2	(epi)Galocatechin	nq	—	—
30,6	Quercetindesoxyhexosid + Wasser	24,0	—	—
31,7	Procyanidin-Dimer	nq	—	—
34,6	Coumarsäure	—	—	9,9
35,0	Quercetindesoxyhexosid	nq	—	—
36,0	Hexose + 3 Gallussäuren	nq	—	—
40,7	Ferulasäure	—	—	14,6
45,4	Myricetinhexosid	22,3	—	—
46,3	Hexose + 3 Gallussäuren + Wasser	26,3	—	—
47,8	Kämpferolhexosid + Wasser	nq	—	—
47,8	Hexose + 4 Gallussäuren	nq	—	—
47,9	Kämpferoldihexosid	—	7,0	—
48,8	Hexose + 2 Gallussäuren + Wasser	nq	—	—
50,3	Myricetindesoxyhexosid	148,8	—	11,2
52,6	Quercetinhexosid	24,6	4,8	—
57,2	Quercetindesoxyhexosid	nq	44,7	0,9
59,8	Kämpferolderivat	—	1,9	—
60,6	Kämpferoldesoxyhexosid	8,6	1,2	—
65,4	Kämpferol	nq	—	—
66,6	Quercetin	4,7	—	—
69,8	Zimtsäure	—	—	24,2
70,2	Kämpferol + Methylgruppe	nq	—	—
	Gesamtgehalt	448,2	83,4	1084,9

Tabelle 2.5-1: Identifizierte und quantifizierte Polyphenole in Kibbles (Carobschotenstücke ohne Kerne), Kernmehl und Carob Sirup

RT [min]	Retentionszeit in Minuten
Mittelwert	berechnet aus den quantifizierbaren Proben
—	Verbindung nicht detektiert
nq	Verbindung vorhanden aber nicht quantifizierbar – Co-Elution / sehr kleiner Peak

RT [min]	Verbindung	Produkt A [mg/kg]	Produkt B [mg/kg]	Produkt C [mg/kg]	Mittel [mg/kg]
8,6	Gallussäure	685,6	320,3	264,1	423,3
10,9	Procyanidin-Dimer	21,2	nq	nq	21,2
13,0	Hexose + 2 Gallussäuren	18,6	32,5	10,8	20,6
15,3	(epi)Gallocatechin	6,5	nq	10,6	8,6
16,0	Prodelfhinidin-Dimer (1*G, 1*C)	nq	nq	5,8	5,8
17,5	Hexose + 2 Gallussäuren	8,7	4,5	5,7	6,3
19,1	Prodelfhinidin-Dimer (2*G) + Hexose	6,5	nq	nq	6,5
24,3	Pentose + 3 Gallussäuren	15,2	17,7	6,5	13,2
25,6	Hexose + 2 Gallussäuren	13,3	nq	8,5	10,9
26,6	Hexose + 2 Gallussäuren	23,9	16,9	18,6	19,8
27,1	Catechin	nq	5,5	nq	5,5
28,0	Hexose + 3 Gallussäuren	8,5	14,7	6,7	9,9
29,3	2 Pentosen + 2 Gallussäuren	23,4	82,5	15,6	40,5
31,3	Hexose + 3 Gallussäuren	7,4	7,3	4,0	6,2
36,0	Hexose + 3 Gallussäuren	nq	36,8	27,4	32,1
37,2	Hexose + 3 Gallussäuren	18,4	23,3	15,5	19,1
39,0	Hexose + 3 Gallussäuren	8,1	6,6	6,7	7,2
41,2	2 Pentosen + 2 Gallussäuren	7,3	nq	nq	7,3
43,9	Desoxyhexose + 2 Gallussäuren	3,5	nq	nq	3,5
45,3	Myricetinhexosid	29,3	13,1	16,0	19,5
47,9	Hexose + 4 Gallussäuren	119,4	233,9	nq	176,7
48,0	Myricetin + 1 Desoxyhexose + 2 Hexosen	nq	nq	97,5	97,5
49,5	Hexose + 4 Gallussäuren	nq	6,7	nq	6,7
50,3	Myricetindesoxyhexosid	100,5	60,8	76,9	79,4
52,8	Quercetinhexosid	29,4	19,8	nq	24,6
55,7	Quercetinpentosid	nq	nq	17,3	17,3
56,3	Hexose + 5 Gallussäuren	nq	nq	8,2	8,2
57,2	Quercetindesoxyhexosid	125,2	64,1	87,9	92,4
60,7	Kämpferoldesoxyhexosid	nq	4,5	8,7	6,6
66,7	Quercetinderivat	nq	4,8	nq	4,8
67,0	Kämpferol	nq	nq	4,5	4,5
70,2	Kämpferol + Methylgruppe	nq	2,1	nq	2,1
Gesamtgehalt		1279,8	978,4	723,6	1207,8

Tabelle 2.5-2: Die identifizierten und quantifizierten Polyphenole in 3 verschiedenen gerösteten Carobprodukten

RT [min]	Retentionszeit in Minuten
C	Catechin oder Epicatechin
G	Gallocatechin oder Epigallocatechin
Mittelwert	berechnet aus den quantifizierbaren Proben
nq	Verbindung vorhanden aber nicht quantifizierbar – Co-Elution / sehr kleiner Peak

RT [min]	Verbindung	Lot A [mg/kg]	Lot B [mg/kg]	Lot C [mg/kg]	Lot D [mg/kg]	Mittel [mg/kg]
8,6	Gallussäure (#1)	287,7	214,6	266,6	165,8	233,7
9,6	(epi)Galocatechin + 4 Gallussäuren	2,2	2,7	nq	nq	2,5
10,8	Prodelphinidin-Dimer (2*G)	11,0	24,9	7,9	nq	14,6
12,9	Hexose + 2 Gallussäuren (#2)	48,6	59,0	44,4	nq	50,7
13,9	Prodelphinidin-Trimer (1*C, 2*G)	nq	7,1	4,3	nq	5,7
15,0	(epi)Galocatechin	42,7	41,0	nq	nq	41,9
17,5	Hexose + 2 Gallussäuren (#3)	23,7	20,0	18,0	nq	20,6
19,2	(epi)Galocatechin + 3 Gallussäuren	4,3	1,8	7,1	nq	4,4
22,4	Procyanidin-Dimer	nq	5,1	3,2	nq	4,2
24,4	Pentose + 3 Gallussäuren (#4)	34,2	49,3	37,6	46,1	41,8
25,6	Procyanidin-Trimer (#5)	166,5	62,2	nq	nq	114,3
26,4	Hexose + 2 Gallussäuren (#6)	75,5	52,9	43,2	31,3	50,7
26,5	Hexose + 2 Gallussäuren	nq	103,0	64,8	83,8	83,9
27,8	Hexose + 3 Gallussäuren	27,7	25,0	15,9	17,3	21,5
29,3	2 Pentosen + 2 Gallussäuren (#7)	74,5	127,9	83,0	163,5	112,2
31,3	Hexose + 3 Gallussäuren	20,8	29,6	22,4	23,7	24,1
33,6	(epi)Galocatechingallat	nq	nq	nq	4,3	4,3
36,2	Hexose + 3 Gallussäuren (#8)	222,4	312,8	283,2	246,6	266,3
37,2	Hexose + 3 Gallussäuren	70,9	85,0	74,4	60,8	72,8
38,9	Hexose + 3 Gallussäuren	28,2	28,0	23,3	28,1	26,9
40,2	Hexose + 3 Gallussäuren	nq	25,8	9,9	24,0	19,9
41,2	2 Pentosen + 2 Gallussäuren	13,8	15,4	13,6	12,6	13,8
43,5	Hexose + 3 Gallussäuren	6,2	nq	8,4	5,6	6,7
45,5	Myricetinhexosid (#9)	114,1	157,7	144,9	96,3	128,2
46,9	Myricetinpentosid	nq	nq	nq	77,1	77,1
48,0	Hexose + 4 Gallussäuren (#10)	573,3	557,4	543,1	596,2	567,5
49,6	Myricetinpentosid	173,3	nq	nq	164,7	169,0
50,5	Myricetin-desoxyhexosid (#11)	369,3	581,9	498,4	412,8	465,6
53,0	Quercetinhexosid (#12)	111,2	193,1	158,2	120,9	145,9
54,9	Quercetinpentosid	19,0	38,3	34,1	21,0	28,1
55,7	Quercetinhexuronid	nq	179,3	nq	nq	179,3
55,8	Quercetinpentosid	nq	nq	81,5	nq	81,5
56,4	Hexose + 5 Gallussäuren	98,2	nq	138,0	146,1	127,4
57,4	Quercetin-desoxyhexosid (#13)	435,5	848,5	765,8	549,2	649,8
58,5	Kämpferolderivat	nq	39,3	nq	48,7	44,0
60,7	Kämpferol-desoxyhexosid	23,7	43,2	35,4	33,0	33,8
65,5	Kämpferol (#14)	67,5	123,7	75,4	70,4	84,3
66,9	Quercetinderivat	18,3	39,0	32,6	nq	30,0
70,2	Kämpferol + Methylgruppe	42,5	nq	38,6	27,2	36,1
72,1	Kämpferol + 3 Methylgruppen	9,1	8,2	8,2	3,6	7,3
79,6	Methoxykämpferolderivat	39,3	nq	61,2	nq	50,2
	Gesamtgehalt	3255,2	4102,9	3646,6	3280,6	4142,4

Tabelle 2.5-3: Identifizierte und quantifizierte Polyphenole in 4 Chargen (Lot A bis D) Caromax

RT [min]	Retentionszeit in Minuten
C	Catechin oder Epicatechin
G	Galocatechin oder Epigallocatechin
Mittelwert	berechnet aus den quantifizierbaren Proben
nq	Verbindung vorhanden aber nicht quantifizierbar – Co-Elution / sehr kleiner Peak
(#)	Peaknummer für die Berechnung der Extraktionseffizienz bei der ASE

Tabelle 2.5-4 gibt einen Überblick über die Polyphenole in den einzelnen Produkten nach Verbindungsklassen. Eine Betrachtung der Werte zeigt den **Einfluss des Verarbeitungsprozesses** auf die einzelnen Substanzgruppen. Das Ausgangsprodukt, die zerkleinerten Johannisbrotschoten (Kibbles), haben den niedrigsten Gesamt-Phenolgehalt. Quantitativ überwiegen im Rohprodukt Gallussäure und Myricetinderivate. Der aus den Schoten durch wässrige Extraktion gewonnene und konzentrierte Sirup enthält hauptsächlich die hydrophile Gallussäure und geringe Mengen Proanthocyanidine. Ein Vergleich der Verhältnisse der Flavonole zwischen den Kibbles und dem Sirup zeigt, dass bei der wässrigen Extraktion erwartungsgemäß die hydrophileren Myricetinderivate bevorzugt gelöst werden. Bei den gerösteten Carobpulvern sind Unterschiede zwischen einzelnen Produkten erkennbar. Da hier leider nicht die entsprechenden Ausgangsmaterialien vorhanden waren, ist nicht eindeutig nachvollziehbar, wie die Röstung die Mengen der einzelnen Stoffe beeinflusst hat. Auffallend ist hier insbesondere das gegenüber der Schote verschobene Verhältnis zwischen Gallussäure und den hydrolysierbaren Tanninen. Auch das Verhältnis der Myricetin- und Quercetinderivate, im Rohprodukt etwa 3:1, in den gerösteten Pulvern etwa 1:1, spricht dafür, dass die oxidative und thermische Belastung des Röstens den größten Einfluss auf die Myricetinderivate hat. Die Carobfasern, weitgehend wässrig extrahierte und schonend getrocknete Schoten, zeigen weit höhere Konzentrationen an phenolischen Inhaltsstoffen als die Schoten selber. Dies ist auf den Gewichtsverlust durch die wässrige Extraktion der Kohlenhydrate sowie die damit einhergehende Konzentrierung der Phenole im Feststoff zurückzuführen. Da Gallussäure gut wässrig extrahierbar ist, ist das Verhältnis zwischen der Säure und den hydrolysierbaren Tanninen zugunsten letzterer verschoben. Die in den Sirup extrahierten Myricetinderivate sind, zusammen mit einem Verlust durch die Prozessierung, für die im Verhältnis zu den anderen Flavonolen geringeren Myricetinkonzentrationen verantwortlich. Die Chargenunterschiede sind besonders ausgeprägt bei den Konzentrationen der Proanthocyanidine.

Die Anwendung der entwickelten automatisierten und optimierten Analytik zeigt, wie verschiedene Produkte aus einem lebensmitteltechnologischen Verarbeitungsprozess sehr detailliert auf ihre phenolischen Inhaltsstoffe hin untersucht werden können. Damit lassen sich Einflüsse der Verarbeitungsschritte erkennen. Dies zeigt, wie bei intensiver und detaillierter Analyse eines einzelnen Verarbeitungsprozesses Erkenntnisse über die technologischen Einflüsse auf die Polyphenolkonzentrationen gewonnen werden können. Daraus können entsprechende Maßnahmen abgeleitet werden, die auf eine bewusste Beeinflussung der Polyphenolgehalte abzielen. Dabei sind sowohl eine gezielte Reduktion der Konzentration

bestimmter Substanzen aus technologischen Gründen als auch ein Erhalt der Polyphenole, wie bei funktionellen Lebensmitteln gewünscht, denkbar.

Proben	Gallus- säure [mg/kg]	Hydrolisier- bare Tannine [mg/kg]	Proantho- cyanidine [mg/kg]	Myricetin- derivate [mg/kg]*	Quercetin- derivate [mg/kg]*	Kämpferol- derivate [mg/kg]*	Gesamt Phenole [mg/kg]**
Rohmaterialien							
Kibbles	174,1	26,3	14,8	171,1	53,3	8,6	448,2
Sirup	1012,6	nq	9,0	11,2	0,9	nq	1084,9
Geröstete Carobprodukte							
Product A	685,6	275,7	34,2	129,7	154,6	nq	1279,8
Product B	320,3	483,4	5,5	73,9	88,7	6,6	978,4
Product C	231,7	231,7	16,4	92,9	105,2	13,2	723,6
Mittel	412,5	330,3	18,7	98,8	116,2	6,6	1207,8
Carobfaser							
Lot A	287,7	1317,9	226,7	656,7	584,1	182,1	3255,2
Lot B	214,6	1491,3	144,8	739,5	1298,2	214,5	4102,9
Lot C	266,6	1423,0	22,5	643,3	1072,3	218,8	3646,6
Lot D	165,8	1485,7	4,3	750,8	691,1	182,9	3280,6
Mittel	233,7	1506,8	191,8	839,9	1114,5	255,7	4142,4

Tabelle 2.5-4: Polyphenole in Carobprodukten nach Verbindungsklassen

nq nicht quantifizierbar

\* Die Menge der Flavonolglykoside berechnet als Glucoside

\*\* Gesamtphenole berechnet aus dem Mittelwert der einzelnen Verbindungen



## Präparative Anwendungen

Die Charakterisierung der einzelnen Schritte der Probenaufarbeitung lässt sich erfolgreich nutzen, um daraus Strategien für die präparative Gewinnung reiner Einzelverbindungen abzuleiten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit der Firma NATECO<sub>2</sub> aus einem xanthohumolreichen Hopfenextrakt durch Lösungsmittlextraktion, Säulenchromatographie und Kristallisation ein sehr reiner Xanthohumol-Standard gewonnen. Abbildung 2.5-5 zeigt ein Chromatogramm einer Lösung dieser Reinsubstanz. Sowohl im UV als auch im Signal des MS sind kaum Verunreinigungen zu erkennen. Ein Vergleich mit zwei kommerziellen Standards ergab eine etwas höhere Reinheit des hier gewonnenen Xanthohumols.

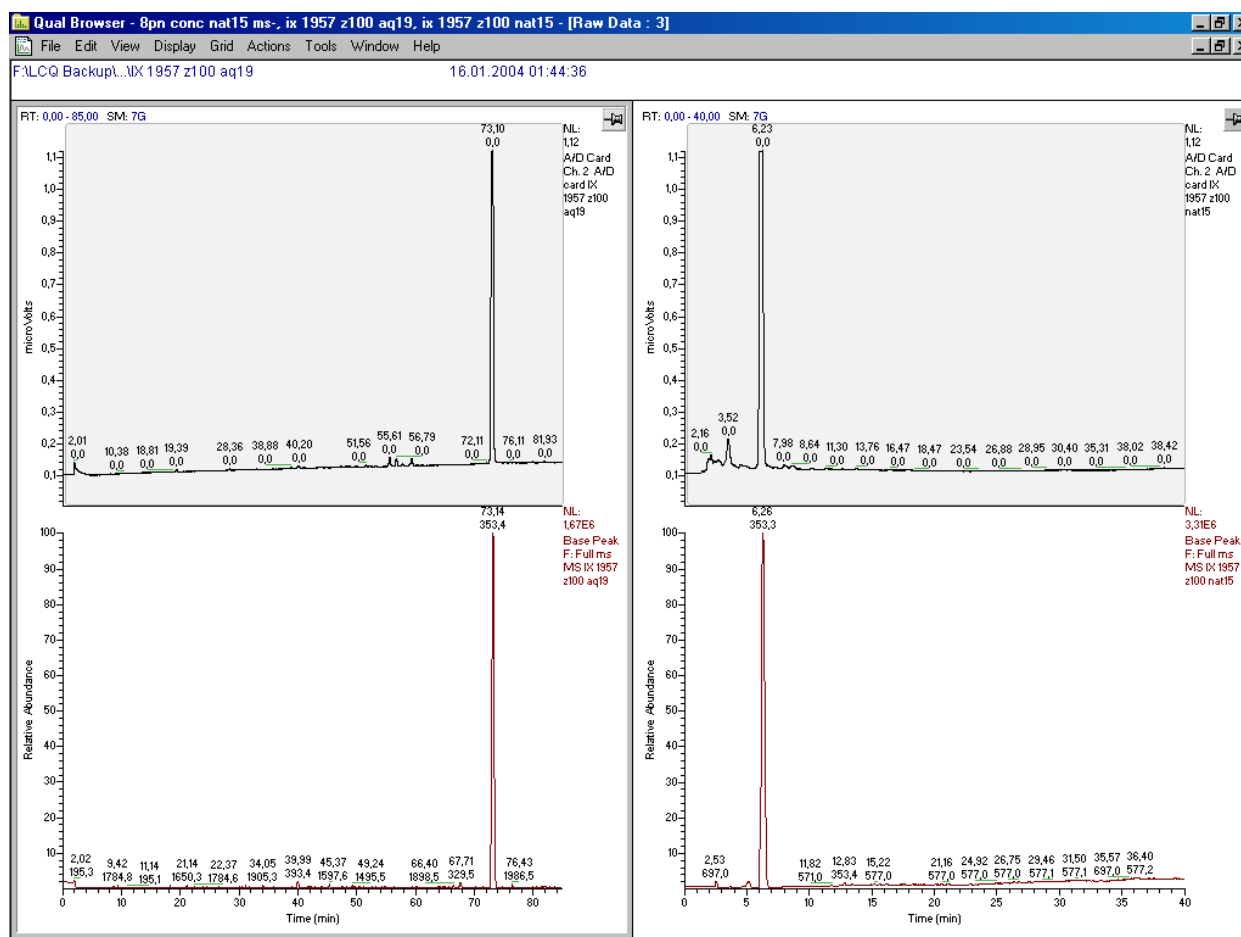


Abbildung 2.5-5: Xanthohumol aus der präparativen Aufarbeitung eines Hopfenextraktes. Oben: UV-Signal bei 280 nm. Unten: BasePeak-Darstellung des MS-Signals. Links: Gradient für Proanthocyanidine. Rechts: Gradient für Prenylflavonoide

Aus der gleichen präparativen Aufarbeitung wurde das ebenfalls in dem Extrakt enthaltene 8-Prenylnaringenin als Einzelsubstanz in Lösung gewonnen. Abbildung 2.5-6 zeigt ein Chromatogramm der Lösung. Neben 8-Prenylnaringenin ist bei 10,5 min noch das isomere Desmethylxanthohumol als Verunreinigung enthalten. Die so gewonnene Einzelsubstanz wurde anschließend zur chiralen Trennung mit Kapillarelektrophorese eingesetzt (KOFINK ET AL. 2005).

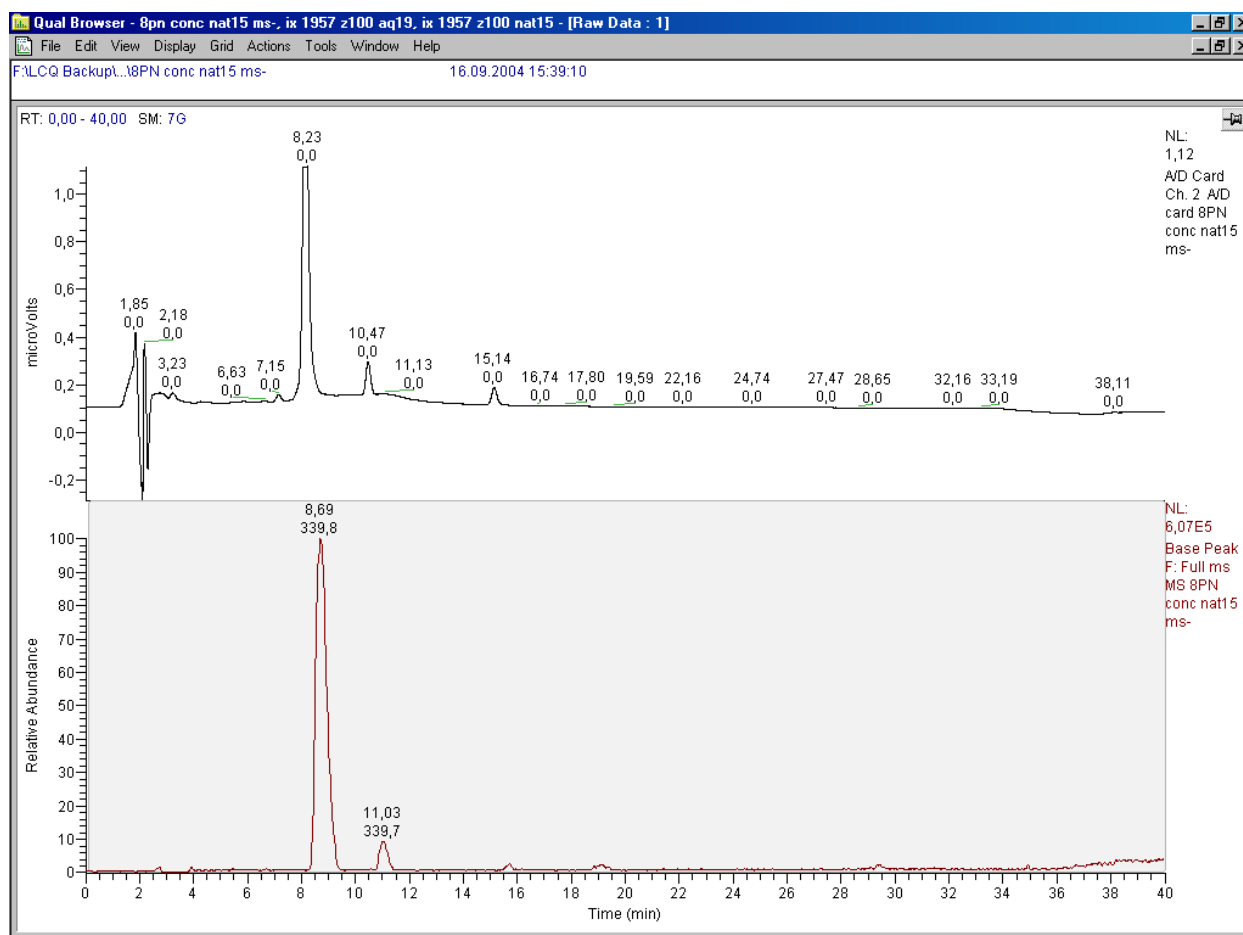


Abbildung 2.5-6: 8-Prenylnaringenin aus der präparativen Aufarbeitung eines Hopfenextraktes. Oben: UV-Signal bei 280 nm. Unten: BasePeak-Darstellung des MS-Signals (Gradient für Prenylflavonoide)

Ebenfalls konnten erste Ansätze für eine Gewinnung einzelner Proanthocyanidine im Rahmen dieser Arbeit realisiert werden. Aus Vorderwürze, einem „brautechnologisch gewonnenen Malzextrakt“ mit hohen Konzentrationen an Proanthocyanidinen, wurden durch Säulenchromatographie und fraktionierte Elution im präparativen Maßstab eine Dimeren- und eine Trimerenfraktion gewonnen, die eine schon auf dieser Stufe der Matrixabtrennung sehr gute Differenzierung des Oligomerisationsgrades erlaubt. Abbildungen 2.5-7 und 2.5-8 zeigen

Chromatogramme der genannten Fraktionen sowie die dazugehörigen MS-Spektren. Daraus ist die gute Differenzierung zwischen Dimeren und Trimeren erkennbar und damit das Potential dieser Methode für die Gewinnung von Reinsubstanzen für die Analytik, für weitergehende Tests physiologischer Aktivitäten oder für die Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehungen bei der Polyphenol-Protein-Bindung. Dieses Verfahren bietet damit einen idealen Ausgangspunkt für eine weitere Aufarbeitung dieser Fraktionen über reversed-phase Material im präparativen Maßstab.

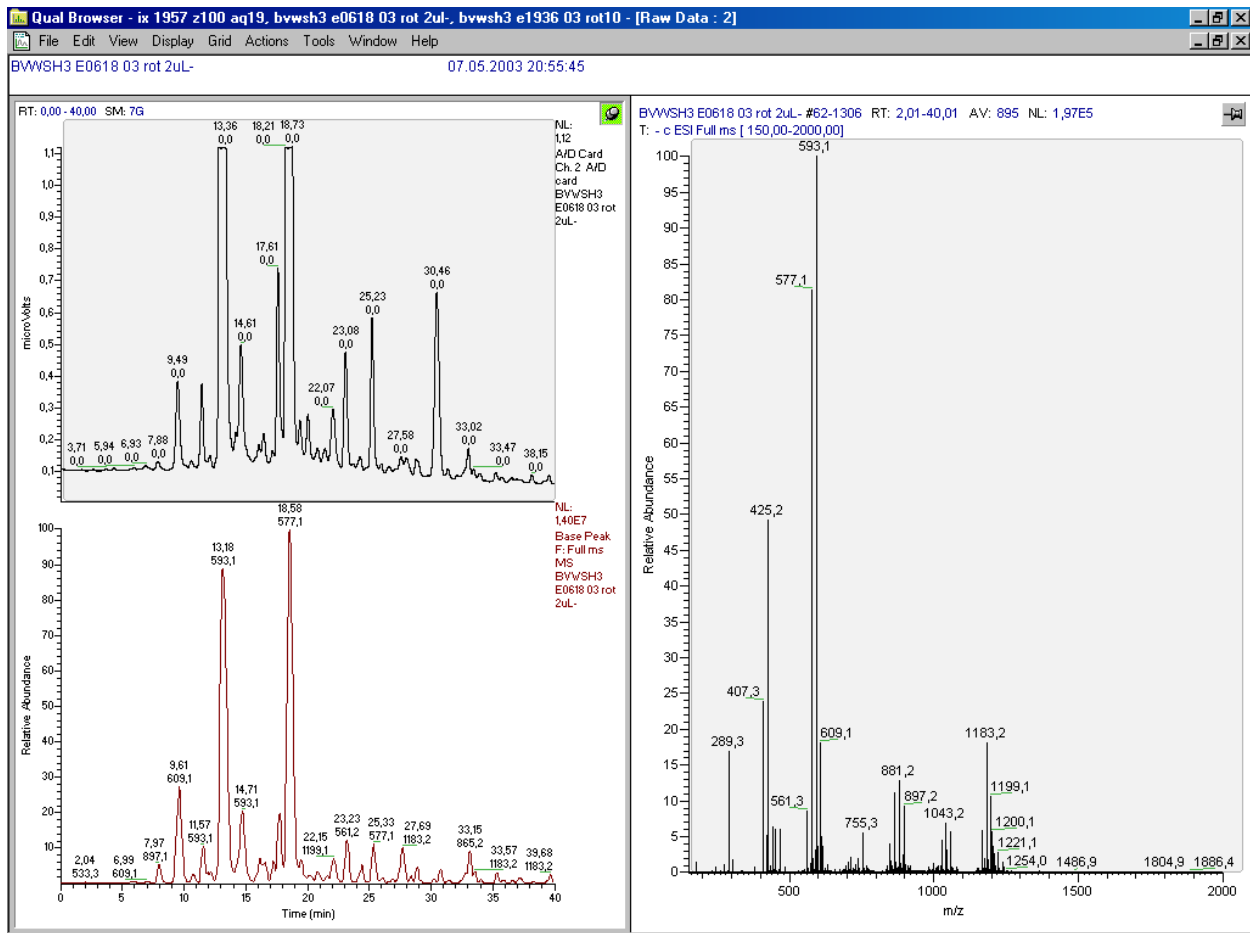


Abbildung 2.5-7: Dimere Proanthocyanidine aus der präparativen Aufarbeitung von Vorderwürze. Links oben: UV-Signal bei 280 nm. Links unten: BasePeak-Darstellung des MS-Signals. Rechts: MS-Spektrum im Bereich 2-40 min

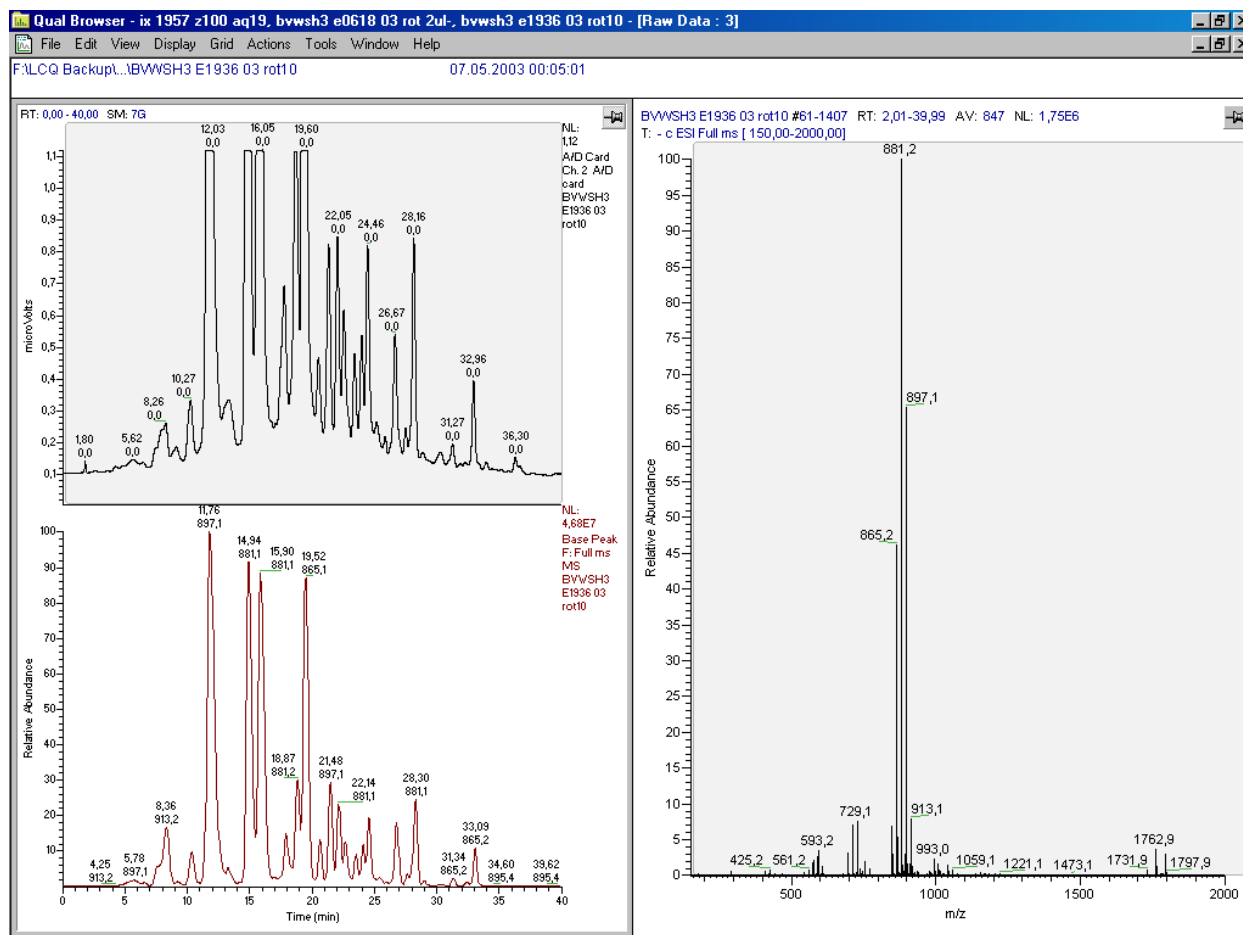


Abbildung 2.5-8: Trimere Proanthocyanidine aus der präparativen Aufarbeitung von Vorderwürze. Links oben: UV-Signal bei 280 nm. Links unten: BasePeak-Darstellung des MS-Signals. Rechts: MS-Spektrum im Bereich 2-40 min

## **3 – Material und Methoden**

### **Chemikalien und Probenmaterialien**

#### **Lösungsmittel und Reagenzien**

Im Zeitraum des Projektes wurden die Lösungsmittel von unterschiedlichen Herstellern bezogen. Acetonitril, Methanol und Essigsäure hatten HPLC-Gradienten Qualität, im späteren Verlauf des Projektes standen Acetonitril und Methanol nach Markteinführung in LCMS-Qualität der Firma Fisher Scientific zur Verfügung. Für die LCMS-Analytik wurden bei der Verwendung der LCMS- gegenüber der Gradient Grade-Qualität ein geringerer Untergrund störender Ionen in den Massenspektren sowie eine langsamere Akkumulation störender Verbindungen im Massenspektrometer beobachtet. Dies wirkt sich günstig auf das Signal/Rausch-Verhältnis aus. Auf die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse selber hatten die unterschiedlichen Qualitäten keinen Einfluss. Trifluoressigsäure zur Synthese wurde für die Anthocyananalytik verwendet. Alle anderen Lösungsmittel und eingesetzten Feststoffchemikalien entsprachen der Qualitätsstufe „zur Analyse“. Das verwendete Wasser wurde einer Reinstwasseranlage Elgastat UHQ MK-II (Elga, Bucks, Großbritannien) entnommen.

#### **Standardverbindungen**

Verwendet wurden für die vorliegende Arbeit die folgenden Referenzverbindungen:

p-Hydroxybenzoesäure (Fluka, Buchs, Schweiz)

Gallussäure (Merck, Darmstadt)

Hesperidin, Kämpferol, Myricetin, Myricitrin, Narirutin, Neohesperidin, Rutin, Sinapinsäure, Syringasäure (Roth, Karlsruhe)

Chlorogensäure (Serva, Heidelberg)

Catechin, Epicatechin, Epigallocatechingallat, Protocatechusäure, Quercetin, Vanillinsäure (Sigma, Taufkirchen)

Xanthohumol (Phytochem, Neu-Ulm und Phytolab, Vestenbergsgreuth)

## **Probenmaterialien**

**Gerstenmalz** der Sorten Prisma und Caminant (proanthocyanidinarme Sorte) wurde freundlicherweise von Weissheimer Malz (Andernach) zur Verfügung gestellt und für die Analysen mit einer Kugelmühle MM2000 (Retsch, Haan) gemahlen.

**Hopfenproben** wurden für die Analysen freundlicherweise von der Firma NATECO<sub>2</sub> (Wolnzach) zur Verfügung gestellt. Für die Versuche zur beschleunigten Festphasenextraktion wurden Hopfenpellets der Sorte HHA90 (Hallertau Hallertauer, Type 90) verwendet, die vor der Analyse in einer Reibschale zerdrückt wurden. Für die präparative Isolierung von Xanthohumol wurde ein spezieller xanthohumolreicher Extrakt in pulveriger Form (nichtkommerzieller Versuchsextrakt) direkt eingesetzt.

**Johannisbrotprodukte.** Das Johannisbrotprodukt Caromax ist ein Ballaststoff der Firma Nutrinova (Frankfurt). Er wird aus den grob zerkleinerten Schoten (Kibbles) durch Kaltwassergegenstromextraktion mit anschließender Trocknung (bis 120°C) und Zerkleinerung hergestellt. Caromax aus 4 verschiedenen Chargen, Kibbles (Rohstoff von Caromax), Zuckersirup aus der Caromaxproduktion sowie Carochoc (geröstetes Carobpulver, Euroduna, Barmstedt) wurden uns freundlicherweise von der Firma Nutrinova zur Verfügung gestellt. Zum Vergleich wurden die gerösteten Produkte „Carob Pulver“ (Flügge-Diät, Stuttgart) und „Carobpulver aus kontrolliert biologischem Anbau“ (Rapunzel Naturkost, Legau) sowie „Johannisbrotkernmehl, aus kontrolliert biologischem Anbau“ (Rapunzel Naturkost, Legau) im Handel erworben.

Die Kibbles wurden mit einer Kugelmühle MM2000 (Retsch, Haan) unter Stickstoffkühlung gemahlen und anschließend getrocknet, die anderen Proben lagen schon in Pulverform vor. Für die Methodenentwicklung der beschleunigten Lösungsmittlextraktion von Johannisbrotprodukten wurde Caromax verwendet. Für die Prozessanalytik wurden die pulverförmigen Proben mit der ASE unter den erarbeiteten optimalen Bedingungen wie weiter unten angegeben extrahiert. Die ASE-Extrakte wurden direkt mit dem ASPEC weiterverarbeitet. Dazu wurde der auf ca. 50 ml verdünnte Extrakt quantitativ auf eine 1 g / 6 ml Polyamid-Kartusche (Macherey-Nagel, Düren) aufgetragen und nacheinander mit 1 und 2,5 ml 85% vol DMF in Wasser eluiert wie für die ASPEC-Festphasenextraktion unten genauer ausgeführt.

Die **Brauprozessproben** für die in dieser Arbeit geschilderten Untersuchungen wurden freundlicherweise von der Brauerei Beck&Co (Bremen) zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden direkt nach Entnahme in übliche Bierflaschen im Werk mit Kronkorken verschlossen und nach Abschluss der Probennahme gesammelt über Nacht verschickt. Die Proben wurden

direkt nach Ankunft im Labor mit L-Ascorbinsäure (50 mg auf 100 ml) und Ameisensäure (1 ml auf 100 ml) versetzt, um eine mikrobiologische oder oxidative Veränderung zu verhindern, und anschließend zentrifugiert und filtriert. Die so erhaltenen Probelösungen wurden direkt mit dem ASPEC weiterverarbeitet. Dazu wurden 50 ml Probe auf eine 1 g / 6 ml Polyamid-Kartusche (Macherey-Nagel, Düren) aufgetragen und nacheinander mit 1 und 2,5 ml 85% vol DMF in Wasser eluiert wie für die ASPEC-Festphasenextraktion unten genauer ausgeführt. Die Prozessproben der Brauerei C.&A. Veltins (Grevenstein) wurden direkt nach der Probenahme im Werk mit dem gleichen Verfahren vorbereitet.

**Rote und schwarze Johannisbeeren** (Marktware) wurden getrennt mit einem Ultra-Turrax T45 (Janke&Kunkel, Staufen i. Breisgau) zerkleinert und die Proben unter Rühren mit dem gleichen Volumen 0,2% vol Trifluoressigsäure in Methanol versetzt. Die Lösungen wurden anschließend zentrifugiert (Entfernung der präzipitierten Kohlenhydrate), filtriert und so zur Analyse eingesetzt.

## Beschleunigte Lösungsmittelextraktion

Verwendet wurde eine ASE200 (Dionex, Idstein) mit Solvent Controller, Steuerung durch Modulareware 3.10 und Bios 30.00, mit Stahlextraktionszellen (11 ml Nennvolumen).

Zur Vorbereitung der Extraktion wurden die Extraktionszellen mit Cellulosefiltern versehen (Schleicher&Schüll, Dasseln) und zunächst 1 g Hydromatrix HM-N (Separtis, Grenzach-Wyhlen) am Boden eingefüllt. Danach wurde die Probe mit Hydromatrix vermischt eingefüllt und der Rest des Zellvolumens mit Hydromatrix aufgefüllt.

Für die Methodenentwicklung wurden die einzelnen Parameter verändert, die Inhaltsstoffe der erhaltenen Extrakte quantifiziert und bezogen auf die beste Extraktionsausbeute (als 100% definiert) die Extraktionsausbeuten berechnet.

Optimale Parameter der beschleunigten Lösungsmittelextraktion für die Extraktion von:

	Gerstenmalz	Johannisbrotpollen	Hopfenpellets
Lösungsmittel	80% vol Aceton in Wasser	50% vol Aceton in Wasser	100% Pentan*, danach 80% vol Aceton in Wasser
Einwaage Probe	4 g	1 g	1 g
Temperatur	60 °C	60 °C	60 °C
Dauer Preheat	5 min	0 min	0 min
Dauer Extraktion	10 min	5 min	10 min
Cycles	1	2	1
Flush Volume	50%	50%	50%
N <sub>2</sub> Purge	60 sec	60 sec	60 sec

\* Die Pentan-Vorextraktion wurde mit zwei Cycles unter sonst gleichen Bedingungen ausgeführt



## **Festphasenextraktion**

### **Manuelle Festphasenextraktion (Untersuchung der Festphasenextraktion)**

Verwendet wurden ein Festphasensystem SPE 12-G (J.T. Baker, Griesheim), angeschlossen an eine Wasserstrahlpumpe, und handelsübliche Kartuschen bzw. selbstgepackte PVPP (Divergan) Kartuschen.

Verwendet wurden die folgenden Phasenmaterialien:

Organische Harze	Chromabond HR-P (Macherey-Nagel, Düren) OASIS HLB (Waters, Eschborn)
Silicabasierte Phasen	Chromabond C18ec (Macherey-Nagel, Düren) Supelclean EnviChrom P (Supelco, Taufkirchen)
Polyamid	Chromabond PA (Macherey-Nagel, Düren) DPA-6S (Supelco, Taufkirchen) PVPP (Divergan) (BASF, Ludwigshafen)

Die Konditionierung erfolgte bei den Kartuschen aus Polyamid mit Wasser, bei den anderen Kartuschen mit Methanol und anschliessend Wasser.

### **Automatisierte Festphasenextraktion**

Verwendet wurde ein ASPEC XLi mit einer Spritzenpumpe 402 (bestückt mit je einer 1 ml und einer 25 ml Spritze) der Firma Gilson (vertrieben durch Abimed, Langenfeld). Dieser war mit dem ASE-ASPEC-Kit so modifiziert, dass er mit dem ASE-System der Firma Dionex gekoppelt werden konnte. Gesteuert wurde das Gerät durch die Software 735 V4.03 (Gilson, Bad Camberg).

Optimierte Methode zur Festphasenextraktion von Polyphenolen auf Polyamid Material (Chromabond PA, Macherey-Nagel, Düren, 1 g / 6 ml):

- Konditionieren mit 5 ml 85 % vol DMF in Wasser
- Waschen mit 5 ml Wasser
- Auftragen der Probe
- Waschen mit 15 ml Wasser und mit 1 ml 85 % vol DMF in Wasser (verwerfen)
- Elution der Analyten mit 2,5 ml 85 % vol DMF in Wasser

Optimierte Methode zur Festphasenextraktion von Polyphenolen auf C-18 Material (Chromabond Hydra, Macherey-Nagel, Düren, 1 g / 6 ml):

- Konditionieren mit 5 ml MeOH
- Waschen mit 5 ml Wasser
- Auftragen der Probe
- Waschen mit 10 ml Wasser
- Elution mit 2 ml MeOH

Für die Analyse von Anthocyanen werden die Probe sowie die Reagenzien mit 0,2% vol Trifluoressigsäure angesäuert.

## Hochleistungsflüssigchromatographie

### Quantifizierung der Standardlösungen für die Untersuchung der Festphasenextraktion

HPLC „System Gold“ (Beckman, Unterschleißheim) bestehend aus:

Degasser	Degasys DG-1210 (Uniflows, Tokio, Japan)
Pumpe	Programmable Solvent Module 125
Autosampler	Thriathlon
Säulenofen	BFO-04sv (W.O.Electronics, Langenzersdorf, Österreich)
Detektor	Scanning Detector Module 167
Steuerung/Daten	PC mit Software „System Gold“ (Steuerung und Datenaufnahme)

Mobile Phase A	1% vol Essigsäure in Wasser
Mobile Phase B	1% vol Essigsäure in Acetonitril
Säule	RP18, Hypersil ODS 100-5, 250 mm*4,6 mm, 5 µm
Temperatur	30 °C
Fluss	1 ml/min
Injektion	20 µl
Detektion	UV 280 nm

### Gradientenprogramm

Standardlösungen	Zeit / min	Anteil B / %	Bemerkungen
	0,0	0	Start, linearer Gradient 0-25% B in 40 min
	40,0	25	
	41,0	100	Waschschrift 100% B
	50,0	100	
	51,0	0	Reequilibrieren
	60,0	0	

**HPLC für HPLC-UV-MS-Messungen**

HPLC „Summit“ (Dionex, Idstein) bestehend aus:

Degasser	Degasys DG-1310 (Uniflows, Tokio, Japan)
Pumpe	P-580 A HPG
Autosampler	ASI-100 T
Säulenofen	STH-585
Detektor	UVD-340S mit Kapillarzelle
Steuerung/Daten	PC mit Software „Chromeleon“, letzte Version 6.80 SP1 Build 2238 (Steuerung und Datenaufnahme)

Mobile Phase A	1% vol Essigsäure in Wasser
Mobile Phase B	1% vol Essigsäure in Acetonitril

**Analytische Trennsäulen**

Standardmäßig wurden für die analytischen Trennungen Aqua 3 $\mu$  C18, 150\*2 mm Säulen (Phenomenex, Aschaffenburg) verwendet. Zur Proanthocyanidintrennung auf einer alternativen Trennsäule wurde eine Polaris Amide C18, 3  $\mu$ m, 2\*150 mm Säule (Varian, Darmstadt) mit den gleichen Bedingungen wie für die Messungen der Proanthocyanidine mit der Aqua C18 Säule verwendet.

Parameter der chromatographischen Trennung für die HPLC-MS Messung von:

	Proanthocyanidine	Prozessproben Johannisbrot	Prenylflavonoide Humulone Lupulone	Anthocyane
Mobile Phase A	1% vol Essigsäure in Wasser	1% vol Essigsäure in Wasser	1% vol Essigsäure in Wasser	0,2% TFA in H <sub>2</sub> O
Mobile Phase B	1% vol Essigsäure in Acetonitril	1% vol Essigsäure in Acetonitril	1% vol Essigsäure in Acetonitril	0,2% TFA in ACN
Fluss	300 $\mu$ l/min	200 $\mu$ l/min	267 $\mu$ l	200 $\mu$ l/min
Trennsäule	Aqua 3 $\mu$ C18, 150*2 mm (Phenomenex)	Aqua 3 $\mu$ C18, 150*2 mm (Phenomenex)	Aqua 3 $\mu$ C18, 150*2 mm (Phenomenex)	Aqua 3 $\mu$ C18, 150*2 mm (Phenomenex)
Temperatur	35 °C	25 °C	45 °C	20 °C
Injektion	5 $\mu$ l	10 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
UV- Diodenarray 200-595 nm, Spuren bei	260, 280, 310, 360 nm	260, 280, 310, 360 nm	265, 280, 335, 370 nm	520, 260, 280, 360 nm

**Gradientenprogramme**

Proanthocyanidine	Zeit (min)	Anteil Mobile Phase B (%)	Bemerkungen
	0,0	0	Start, linearer Gradient 0-40% B in 80 min
	80,0	40	
	100,0	100	linearer Gradient 40-100% B in 20 min
	110,0	100	Waschschritt 100% B
	111,0	0	Reequilibrieren
	120,0	0	

Prozessproben Johannisbrot	Zeit (min)	Anteil Mobile Phase B (%)	Bemerkungen
	0,0	5	Start, linearer Gradient 5-20% B in 45 min
	45,0	20	linearer Gradient 20-60% B in 32 min
	77,0	60	
	77,1	100	Waschschritt 100% B
	87,0	100	
	87,1	5	Reequilibrieren
	97,0	5	

Prenylflavonoide Humulone Lupulone	Zeit (min)	Anteil Mobile Phase B (%)	Bemerkungen
	0,0	40	Start, linearer Gradient 40-65% B in 9,2 min
	9,2	65	65% B isokratisch für 9,8 min
	19,0	65	linearer Gradient 65-78% B in 7,0 min
	26,0	78	78% B isokratisch für 4,0 min
	30,0	78	linearer Gradient 78-100% B in 4,0 min
	34,0	100	Waschschritt 100% B
	44,0	100	
	45,0	40	Reequilibrieren
	55,0	40	

**Quantifizierung**

Die Quantifizierung der identifizierten Verbindungen erfolgte über die Peakfläche des UV-Signals bei 280 nm. Im Rahmen der Methodenentwicklungen wurden die Peakflächen der Einzelsubstanzen miteinander verglichen und daraus Extraktionsausbeuten und Wiederfindungen berechnet. Für die absolute Quantifizierung der Polyphenole in den Prozessproben wurden die vorhandenen Standardverbindungen und das Molekulargewicht herangezogen (LEA 1978, FRIEDRICH 2000, PAPAGIANNPOULOS ET AL. 2004).

## Massenspektrometrie

Ionenfallen-Massenspektrometer LCQ Classic (Thermo Fisher Scientific, Dreieich), Steuerung durch Software Xcalibur, Version 1.2 SP1. Ionisierung durch Electrospray-Interface mit Metal Needle Kit.

Um die Ionisierung der Analyten bei sehr geringen Anteilen organischen Modifiers in der mobilen Phase zu verbessern, wurde vor dem Eintritt in das ESI-Interface dem HPLC-Fluss von 300  $\mu\text{l}/\text{min}$  über eine weitere HPLC-Pumpe (System Gold Programmable Solvent Module 116, Beckman, Unterschleißheim) MeOH mit 100  $\mu\text{l}/\text{min}$  zudosiert.

Parameter der Ionisierung und der massenspektrometrischen Detektion:

	Proanthocyanidine	Johannisbrotproben	Anthocyane
Source Voltage	-4,0 kV	-4,5 kV	+3,0 kV
Sheath Gas	90	60	90
Auxillary Gas	5	5	5
Capillary Voltage	-10 V	-45 V	+10 V
Capillary Temperature	310 °C	200 °C	200 °C
Tube Lens Offset	+20 V	-30 V	-20 V
First Octapole Offset	+4 V	+3 V	-4 V
Interoctapole Lens	+30 V	+22 V	-30 V
Second Octapole Offset	+10 V	+7 V	-10 V
Trap DC Offset	+10 V	+10 V	-10 V
Isolation width	2,8 m/z	2,8 m/z	2,8 m/z
Norm. Coll. Energy	40%	35%	50%
Fragmentation time	30 msec	30 msec	30 msec
Q	0,25	0,25	0,25

## **Präparative Trennungen**

### **Proanthocyanidine aus Malz**

Vorderwürze wurde von der Brauerei Beck&Co (Bremen) zur Verfügung gestellt. Analog zum Vorgehen für die Stabilisierung der Brauprozessproben wurde die Vorderwürze mit L-Ascorbinsäure (500 mg/l) und Ameisensäure (10 ml/l) versetzt.

10 g Polyamid (Macherey-Nagel, Düren) wurde in eine 50 ml Festphasenkartusche gepackt und mit 20 ml MeOH und 50 ml 1% vol Ameisensäure in Wasser konditioniert. Danach wurden 4 l Vorderwürze aufgetragen, und mit 500 ml 1% vol Ameisensäure in Wasser gewaschen. Die Elution wurde mit 100 ml 50% vol MeOH in Wasser, 2000 ml 95% vol MeOH in Wasser und 500 ml 5% vol DMF in MeOH durchgeführt und dabei Fraktionen von je 50 ml aufgefangen. Die Fraktionen mit den dimeren und mit den trimeren Proanthocyanidinen in gewünschter Reinheit wurden vereinigt und am Rotavapor bei 40 °C konzentriert.

### **Xanthohumol und 8-Prenylnaringenin aus Hopfen**

500 mg eines xanthohumolreichen Hopfenextrakts wurden in 40 ml MeOH gelöst und langsam 10 ml Wasser unter Rühren zugefügt. Die Lösung wurde filtriert, bei 40 °C im Rotavapor eingengt und auf einen MeOH-Gehalt von 50% vol rekonstituiert. Eine 10 g Strata X C18-Festphasenkartusche (Phenomenex, Aschaffenburg) wurde mit 10 ml MeOH und 20 ml Wasser konditioniert. Die Hälfte der Probelösung wurde aufgetragen und mit MeOH in Wasser unter steigendem MeOH-Gehalt eluiert. Die resultierenden Fraktionen (je 20 ml) wurden danach einzeln per HPLC auf ihre Inhaltsstoffe untersucht. Die Fraktionen, die Xanthohumol in gewünschter Reinheit enthielten, wurden vereinigt und durch langsames Entfernen des MeOH Xanthohumol als Präzipitat gewonnen. Die Fraktionen, die 8-Prenylnaringenin enthielten, wurden vereinigt, eingengt und durch semipräparative Isolierung im analytischen Trennsystem die Zielsubstanz gereinigt.

**4 – LITERATURVERZEICHNIS**

Die Angabe der verwendeten Literatur erfolgt im Text durch den Namen der Autoren bzw. des Erstautors (bei mehr als zwei Autoren) und die Jahreszahl der Veröffentlichung in Klammern und Kapitälchen. In einigen Fällen ist zur eindeutigen Bezeichnung ein Buchstabe der Jahreszahl angefügt. In diesem alphabetisch sortierten Literaturverzeichnis findet sich die entsprechende Veröffentlichung ebenfalls unter dem Namen des Erstautors. Die Einträge sind nach folgendem Muster aufgebaut:

AUTOR(EN) MIT INITIALEN **Erscheinungsjahr** *Titel der Veröffentlichung* Abkürzung des Zeitschriftentitels Band Seitenzahlen

AUTOR(EN) MIT INITIALEN **Erscheinungsjahr** (*Titel des Kapitels in:*) Titel des Buchs (Verlag)

ALONSO-SALCES RM, KORTA E, BARRANCO A, BERRUETA LA, GALLO B, VICENTE F **2001a** *Determination of Polyphenolic Profiles of Basque Cider Apple Varieties Using Accelerated Solvent Extraction* J Agric Food Chem 49 3761-3767

ALONSO-SALCES RM, KORTA E, BARRANCO A, BERRUETA LA, GALLO B, VICENTE F **2001b** *Pressurized liquid extraction for the determination of polyphenols in apple* J Chromatogr A 933 37-43

ALT AP **2001** *Untersuchung von Bier und seinen Inhaltsstoffen auf potentielle krebspräventive Aktivität* Dissertation, Universität Saarbrücken

ARAKI S, KIMURA T, SHIMIZU C, FURUSHO S, TAKASHIO M, SHINOTSUKA K **1999** *Estimation of Antioxidative Activity and Its Relationship to Beer Flavor Stability* J Am Soc Brew Chem 57 1 34-37

ARDREY RE **2003** *Liquid Chromatography Mass Spectrometry: An Introduction* (John Wiley&Sons)

ASANO K, OHTSU K, SHINAGAWA K, HASHIMOTO N **1984** *Affinity of proanthocyanidins for haze-forming proteins of beer and the formation of chill haze* Agric Biol Chem 48 1139-1146

AVALLONE R, PLESSI M, BARALDI M, MONZANI A **1997** *Determination of Chemical Composition of Carob (*Ceratonia siliqua*): Protein, Fat, Carbohydrates, and Tannins* J Food Compos Anal 10 166-172

BAMFORTH CW **1999** *Beer Haze* J Am Soc Brew Chem 57 81-88

BAMFORTH CW **2000a** *Beer: An Ancient Yet Modern Biotechnology* Chem Educator 5 102-112

BAMFORTH CW **2000b** *Brewing and brewing research: past, present and future* J Agric Food Chem 48 1371-1378

- BAOSHAN S, LEANDRO C, DA SILVA JMR, SPRANGER I **1998** *Separation of Grape and Wine Proanthocyanidins According to Their Degree of Polymerization* J Agric Food Chem 46 1390-1396
- BARTOLOMÉ B, PEÑA-NEIRA A, GÓMEZ-COROVÉS C **2000** *Phenolics and related substances in alcohol-free beers* Eur Food Res Technol 419-423
- BATLLE I, TOUS J **1997** *Carob tree. Ceratonia siliqua L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops 17* Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben / International Plant Genetic Resources. Institute: Rome, Italy.
- BELLMER HG, GALENSA R, GROMUS J **1995a** *Bedeutung der Polyphenole für die Bierherstellung. Analytik, Ergebnisse und Diskussion (Teil 1)* Brauwelt 135 1371-1379
- BELLMER HG, GALENSA R, GROMUS J **1995b** *Bedeutung der Polyphenole für die Bierherstellung. Ergebnisse, Diskussion und Fazit (Teil 2)* Brauwelt 135 1477-1484 and 1495-1496
- BINDER RJ, COIT JE, WILLIAMS KT, BREKKE JE **1959** *Carob varieties and composition* Food Technol 13 213-216
- BONOLI M, VERARDO V, MARCONI E, CABONI MF **2004** *Antioxidant Phenols in Barley (Hordeum vulgare L.) Flour: Comparative Spectrophotometric Study among Extraction Methods of Free and Bound Phenolic Compounds* J Agric Food Chem 52 5195-5200
- BOTTA B, VITALI A, MENENDEZ P, MISITI D, DELLE MONACHE G **2005** *Prenylated flavonoids: pharmacology and biotechnology* Curr Med Chem 12 717-739
- BRANDON MJ, FOO LY, PORTER LJ, MEREDITH P **1982** *Proanthocyanidins of barley and sorghum; composition as a function of maturity of barley* Phytochemistry 21 2953-2957
- BRAVO I, GRADOS N, SAURA-CALIXTO F **1982** *Composition and potential use of mesquite pods (Prosopis pallida L.): comparison with carob pods (Ceratonia siliqua)* J Sci Food Agric 33 1319-1323
- BRONNER M, GALENSA R **1994** *Detection of authenticity and adulterations of orange juices by HPLC-determination of flavanoids* in: Report des SGF-Symposiums: Progress in the Authenticity-Assurance for Fruit Juices (SGF)
- BRONNER M **1996** *HPLC-Bestimmung von Flavonoiden zur Überprüfung der Authentizität und zum Nachweis von Orangensaftverfälschungen* Dissertation, TU Braunschweig
- BUDDE WL **2001** *Analytical Mass Spectrometry: Strategies for Environmental and Related Applications* (ACS Publication)
- BULDINI PL, RICCI L, SHARMA JL **2002** *Recent applications of sample preparation techniques in food analysis* J Chromatogr A 975 47-70
- BUSCH KL, GKISH GL, MCLUCKEY SA **1988** *Mass Spectrometry/Mass Spectrometry. Techniques and Applications of Tandem Mass Spectrometry* (VCH Publishers)



- BUSHNELL SE, GUINARD JX, BAMFORTH CW **2003** *Effects of Sulfur Dioxide and Polyvinylpyrrolidone on the Flavor Stability of Beer as Measured by Sensory and Chemical Analysis* J Am Soc Brew Chem 61 133-141
- CASTELLARI M, SARTINI E, FABIANI A, ARFELLI G, AMATI A **2002** *Analysis of wine phenolics by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column* J Chromatogr A 973 221-227
- CHINNICI F, GAIANI A, NATALI N, RIPONI C, GALASSI S **2004** *Improved HPLC Determination of Phenolic Compounds in Cv. Golden Delicious Apples Using a Monolithic Column* J Agric Food Chem 52 3-7
- CIFUENTES A, BARTOLOMÉ B, GÓMEZ-CORDOVÉS C **2001** *Fast determination of procyanidins in food samples by micellar electrokinetic chromatography using acidic buffers* Electrophoresis 22 1561-1567
- COLE RB **1997** *Electrospray Ionization Mass Spectrometry* (Wiley Interscience)
- CORSI L, AVALLONE R, COSENZA F, FARINA F, BARALDI C, BARALDI M **2002** *Antiproliferative effects of Ceratonia Siliqua L. on mouse hepatocellular carcinoma cell line* Fitoterapia 73 674-684
- COUNET C, COLLIN S **2003** *Effect of the Number of Flavanol Units on the Antioxidant Activity of Procyanidin Fractions Isolated from Chocolate* J Agric Food Chem 51 6816-6822
- DASS C **2000** *Principles and Practice of Biological Mass Spectrometry* (Wiley Interscience)
- DE GAULEJAC NSC, VIVAS N, DE FREITAS V, BOURGEOIS G **1999** *The influence of various phenolic compounds on scavenging activity assessed by an enzymatic method* J Sci Food Agric 1081-1090
- DE PASCUAL-TERESA S, RIVAS-GONZALO JC, SANTOS-BUELGA C **2000** *Prodelfinidins and related flavanols in wine* Int J Food Sci Technol 35 33-40
- DE RIJKE E, OUT P, NIESSEN WMA, ARIESE F, GOOIJER C, BRINKMAN UAT **2006** *Analytical separation and detection methods for flavonoids* J Chromatogr A 1112 31-63
- DELCOUR JA, SCHOETERS MM, MEYSMAN EW, DONDEYNE P, MOERMAN E **1984** *The intrinsic influence of catechins and procyanidins on beer haze formation* J Inst Brew 90 381-384
- DELCOUR JA, TUYTENS GM **1984** *Structure elucidation of three trimeric proanthocyanidins isolated from a commercial belgian pilsner beer* J Inst Brew 90 153-161
- DELCOUR JA **1988** *Malt and hop flavonoids in pilsner beer* In: Linskens HF, Jackson JF Beer Analysis (Springer Verlag)
- DERDELINCKX G, JERUMANIS J **1984** *Separation of malt and hop proanthocyanidins on fractogel TSK HW-40 (S)* J Chromatogr 285 231-234
- DGE **2004** *Ernährungsbericht 2004* (Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V., Bonn)
- DWYER JT, PETERSON JJ **2002** *Measuring flavonoid intake: need for advanced tools* Public Health Nutr 5(6A) 925-930

EBERHARDT A **1992** *Bestimmung phenolischer Verbindungen in Gerste, Malz und Bier mittels HPLC* Wissenschaftliche Abschlußarbeit, TU Braunschweig

ENGELHARDT U, GALENSA R **1997** *Analytik und Bedeutung von Polyphenolen in Lebensmitteln* in: Analytiker Taschenbuch Band 15 (Springer, Berlin Heidelberg)

ESCARPA A, PÉREZ-CABRERA C, GONZÁLEZ MC **2000** *Optimization and Validation of a Fast Liquid Gradient for Determination of Prominent Flavan-3-ols and Flavanols in Fresh Vegetables* J High Resol Chromatogr 23 11 637-643

EZZEL J **2000** *Pressurized fluid extraction: non-environmental applications* Encycl Sep Sci 3993-3999

FERREIRA D, SLADE D **2002** *Oligomeric proanthocyanidins: naturally occurring O-heterocycles* Nat Prod Rep 19 517-541

FLAMINI R **2003** *Mass Spectrometry in Grape and Wine Chemistry. Part I: Polyphenols* Mass Spec Rev 22 218-250

FRIEDRICH W **2000** *Proanthocyanidine in den Braurohstoffen Gerste und Gerstenmalz: HPLC-Bestimmung mit UV- und Elektrodenarray-Detektion* Dissertation, Universität Bonn

FRIEDRICH W, EBERHARDT A, GALENSA R **2000** *Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry* Eur Food Res Technol 211 56-64

FRIEDRICH W, GALENSA R **2002** *Identification of a new flavanol glucoside from barley (*Hordeum vulgare* L.) and malt* Eur Food Res Technol 214 388-393

FULCRAND H, REMY S, SOUQUET JM, CHEYNIER V, MOUTOUNET M **1999** *Study of Wine Tannin Oligomers by On-Line Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry* J Agric Food Chem 47 1023-1028

FULEKI T, DA SILVA JMR **2003** *Effects of Cultivar and Processing Method on the Contents of Catechins and Procyanidins in Grape Juice* J Agric Food Chem 51 640-646

GALENSA R **1988** *Nachweis von Fruchtsaftverfälschungen durch die Bestimmung von Flavonoiden mittels HPLC* GIT Supplement 4 18-25

GEL-MORETÓ N **2003** *Chirale Trennung von Polyphenolen in Citrus mittels Kapillarelektrophorese (CE) und Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)* Dissertation, Universität Bonn

GERHÄUSER C **2005** *Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents (Review)* Eur J Cancer 41 1941-1954

GOUPY P, HUGUES M, BOIVIN P, AMIOT MJ **1999** *Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds* J Sci Food Agric 79 1625-1634

GRACEY DEF, BARKER RL **1976** *Studies on beer haze formation. I. Gas chromatographic profiles of beer: polyamide resin adsorbates* J Inst Brew 82 72-77

GROMUS J, LUSTIG S **1999** *Einfluß von Polyphenolen und reduzierenden Verbindungen auf die Bierqualität und ihr Verhalten im Brauprozess* Brauwelt 44 2028-2034

GU L, KELM MA, HAMMERSTONE JF, BEECHER G, HOLDEN J, HAYTOWITZ D, PRIOR RL **2003a** *Screening Foods Containing Proanthocyanidins and Their Structural Characterization Using LC-MS/MS and Thiolytic Degradation* J Agric Food Chem 51 7513-7521

GU L, KELM MA, HAMMERSTONE JF, ZHAND Z, BEECHER G, HOLDEN J, HAYTOWITZ D, PRIOR RL **2003b** *Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectromic studies of proanthocyanidins in foods* J Mass Spectrom 38 1271-1280

GU L, KELM MA, HAMMERSTONE JF, BEECHER G, HOLDEN J, HAYTOWITZ D, GEBHARDT S, PRIOR RL **2004** *Concentrations of Proanthocyanidins in Common Foods and Estimations of Normal Consumption* J Nutr 134 613-617

HABER B **2002** *Carob fiber – Benefits and applications* Cereal Foods World 47 365-369

HAMMERSTONE JF, LAZARUS SA, MITCHELL AE, RUCKER R, SCHMITZ HH **1999** *Identification of Procyanidins in Cocoa (Theobroma cacao) and Chocolate Using High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry* J Agric Food Chem 47 490-496

HARBORNE JB, MABRY TJ, MABRY H **1975** *The Flavonoids* (Academic Press)

HARBORNE JB **1988** *The Flavonoids: Advances in Research Since 1980* (Chapman and Hall)

HARBORNE JB **1994** *The Flavonoids – Advances in Research Since 1986* (Chapman and Hall/CRC Press)

HARBORNE JB, BAXTER H **1999** *The Handbook of Natural Flavonoids Vol I&II* (John Wiley & Sons)

HARBORNE JB, BAXTER H, MOSS GP **1999** *Phytochemical Dictionary* (CRC Press)

HARBORNE JB, BAXTER H **2001** *Chemical Dictionary of Economic Plants* (John Wiley & Sons)

HARBORNE JB, HARBORNE AJ **2005** *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis* (Springer)

HAUSEN T **2000** *Bedeutung phenolischer Substanzen für die Stabilität von Bier* Diplomarbeit, Landwirtschaftliche Fakultät, Universität Bonn

HEIMHUBER B **1989** *Flavanoide zur Qualitätsprüfung von Orangensaft. Benzoe-, Phenyllessig-, Phenylpropion- und Zimtsäure sowie Benzoylglucoseester in Obst und Gemüse* Dissertation, Universität Hannover

HEMINGWAY RW, FOO LY, PORTER LJ **1982** *Linkage isomerism in trimeric and polymeric 2,3-cis-procyanidins* J Chem Soc Perkin Trans I 1209-1216

HERRMANN K **1979** *Zu den Möglichkeiten eines Verfälschungsnachweises von Obst- und Gemüseprodukten über phenolische Inhaltsstoffe* Lebensmittelchemie u gerichtl Chemie 119-121

HIGDON JV, FREI B **2003** *Tea Catechins and Polyphenols: Health Effects, Metabolism, and Antioxidant Functions* Crit Rev Food Sci Nutr 43 1 89-143

- HÖFLER F **2000** *Beschleunigte Lösemittelextraktion (ASE)* (Dionex, ISBN 3-00-006626-8)
- HOLTEKJØLEN AK, KINITZ C, KNUTSEN SH **2006** *Flavanol and Bound Phenolic Acid Contents in Different Barley Varieties* J Agric Food Chem 54 2253-2260
- JENDE-STRID B **1988** *Analysis of Proanthocyanidins and phenolic acids in barley, malt, hops and beer* in: Beer Analysis (Springer)
- JENDE-STRID B **1997** *Proanthocyanidin-free malting barley – a solution of the beer haze problem* in: *Proceedings of the 26th Congress of the European Brewery Convention* 101-109 (EBC, 1997)
- JERUMANIS J **1979** *Séparation et identification de flavonoides par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)* Proc Congr Eur Brew Conv 17 309-319
- JERUMANIS J **1985** *Quantitative analysis of flavanoids in barley, hops and beer by high-performance liquid chromatography (HPLC)* J Inst Brew 91 250-252
- JU ZY, HOWARD LR **2003** *Effects of Solvent and Temperature on Pressurized Liquid Extraction of Anthocyanins and Total Phenolics from Dried Red Grape Skin* J Agric Food Chem 52 5207-5213
- KANEDA H, KANO Y, OSAWA T, KAWAKISHI S, KAMADA K **1990** *Effect of Protein-Polyphenol Ratio on the Size of Haze Particles* J Agric Food Chem 38 1909-1912
- KARCHESY JJ, HEMINGWAY RW, FOO LY, BAROFSKY E, BAROFSKY DF **1986** *Sequencing procyanidin oligomers by fast atom bombardment mass spectrometry* Anal Chem 58 2563-2567
- KARONEN M, OSSIPOV V, SINKKONEN J, LOPONEN J, HAUKIOJA E, PIHLAJA K **2006** *Quantitative analysis of polymeric proanthocyanidins in birch leaves with normal-phase HPLC* Phytochem Anal 17 149-156
- KELM MA, JOHNSON JC, ROBBINS RJ, HAMMERSTONE JF, SCHMITZ HH **2006** *High-Performance Liquid Chromatography Separation and Purification of Cacao (Theobroma cacao L.) Procyanidins According to Degree of Polymerization Using a Diol Stationary Phase* J Agric Food Chem 54 1571-1576
- KENNEDY JA, MUNRO MHG, POWELL HKJ, PORTER LJ, FOO LY 1984 *The protonation reactions of catechin, epicatechin and related compounds* Australian J Chem 37 885-892
- KINITZ C, MELLENTHIN A **2002** *Methodenentwicklung für die Polyphenol-Analytik mit LC-MS* Lebensmittelchemie 56 53-54
- KINITZ C, MELLENTHIN A **2003** *Narrow-bore HPLC-DAD-MS zur Polyphenolanalytik in Bier* Lebensmittelchemie 57 5-6
- KNORR F, KREMKOW C **1972** *Chemie und Technologie des Hopfens* (Verlag Hans Carl, Nürnberg)
- KOFINK M, GALENSA R **2005** *Enantiomerentrennung von Catechinen mittels Kapillarelektrophorese* Lebensmittelchemie 59 111-112

- KOFINK M, PAPAGIANNPOULOS M, GALENSA R **2005** *Identifizierung und chirale Trennung östrogenaktiver Substanzen aus Hopfen mittels HPLC-MS und Kapillarelektrophorese* Lebensmittelchemie 59 38
- KOFINK M, PAPAGIANNPOULOS M, GALENSA R **2007** *Enantioseparation of catechin and epicatechin in plant food by chiral capillary electrophoresis* Eur Food Res Technol Online first DOI 10.1007/s00217-006-0455-1
- KRAEMER-SCHAFHALTER A, FUCHS H, PFANNHAUSER W **1998** *Solid-Phase Extraction (SPE) - a Comparison of 16 Materials for the Purification of Anthocyanins from Aronia Melanocarpa var Nero* J Sci Food Agric 78 435-440
- KREIMEYER J, PETEREIT F, NAHRSTEDT A **1998** *Separation of flavan-3-ols and dimeric proanthocyanidins by capillary electrophoresis* Planta Med 64 63-67
- KRUEGER CG, VESTLING MM, REED JD **2003** *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-flight Mass Spectrometry of Heteropolyflavan-3-ols and Glucosylated Heteropolyflavans in Sorghum (Sorghum bicolor (L.) Moench)* J Agric Food Chem 51 538-543
- KUMAZAWA S, TANIGUCHI M, SUZUKI Y, SHIMURA M, KWON MS, NAKAYAMA T **2002** *Antioxidant activity of polyphenols in carob pods* J Agr Food Chem 50 373-377
- KUSCHE M, GEIGER E **2007** *Kinetics of haze formation in beer – turbidity and flavan-3-ols* BrewingScience Jan/Feb 38-47
- LAM TML **1995** *Qualitative und quantitative Bestimmung von Proanthocyanidinen in Gerstenmalz mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie* Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Institut für Lebensmittelchemie, TU Braunschweig
- LAZARUS SA, ADAMSON GE, HAMMERSTONE JF, SCHMITZ HH **1999** *High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis of Proanthocyanidins in Foods and Beverages* J Agric Food Chem 47 3693-3701
- LEA AGH **1978** *The phenolics of ciders: oligomeric and polymeric procyanidins* J Sci Food Agric 29 471-477
- LEUPOLD G, DRAWERT F **1981** *Zur Analytik phenolischer Verbindungen im Bier* Brauwissenschaft 34 205-210
- LICHTENTHÄLER R **2004** *Optimisation of the Total Oxidant Scavenging Capacity Assay and Application on Euterpe oleracea MART. (Açaí) Pulps and Seeds* Dissertation, Universität Bonn
- LICHTENTHÄLER R, RODRIGUES RB, MAIA JG, PAPAGIANNPOULOS M, FABRICIUS H, MARX F **2005** *Total oxidant scavenging capacities of Euterpe oleracea Mart. (Açaí) fruits* Intern J Food Sci Nutr 56 53-64
- LOEB H, VANDENPLAS Y, WÜRSCH P, GUESRY P **1989** *Tannin-rich carob pod for the treatment of acute-onset diarrhea* J Pediatr Gastroenterol Nutr 8 480-485
- LUSTIG S, EGER C, EILS HG, GROMUS J, HILL P, HOLTORF F, KOPP M **2001** *Rohstoffphilosophie, Technologie und Technik der Brauerei Beck & Co. Nutzung wissenschaftlicher Erkenntnisse in der Braupraxis* Brauwelt 22/23 830-838

- MA YL, LI QM, VAN DEN HEUVEL H, CLAEYS M **1997** *Characterization of flavone and flavonol aglycons by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry* Rapid Commun Mass Spectrom 11 1357-1364
- MABRY TJ, MARKHAM KR, THOMAS MB **1970** *The Systematic Identification of Flavonoids* (Springer Verlag)
- MADIGAN D, MCMURROUGH I, SMYTH M **1994** *Determination of proanthocyanidins and catechins in beer and barley by high-performance liquid chromatography with dual-electrode electrochemical detection* Analyst 119 863-868
- MADIGAN D, BYRNE H, MATTHEWS S, KELLY R, MCENROE C, HARMEY D **2000** *Studies on the Effects of Common Process Variables on the Colloidal Stability of Beer* J Am Soc Brew Chem 58 160-164
- MANACH C, SCALBERT A, MORAND C, RÉMÉS C, JIMÉNEZ L **2004** *Polyphenols: food sources and bioavailability* Am J Clin Nutr 79 727-747
- MARAKIS S **1996** *Carob Bean in food and feed: current status and future potentials – a critical appraisal* J Food Sci Technol 33 365-383
- MARAKIS S, MARAKIS G, LAMBRAKI M **1997** *Tannins of eight carob varieties from the island of Lefkada, Greece* Chim Chron, New Ser 26 57-66
- MARCH RE, TODD JFJ **1995** *Practical Aspects of Ion Trap Mass Spectrometry* (CRC Press)
- MCMURROUGH I **1981** *High-performance liquid chromatography of flavanoids in barley and hops* J Chromatogr A 218 683-693
- MCMURROUGH I, LOUGHREY MJ, HENNIGAN GP **1983** *Content of (+)-Catechin and Proanthocyanidins in Barley and Malt Grain* J Sci Food Agric 34 62-72
- MCMURROUGH I, KELLY R, BYRNE J **1992** *Effect of the removal of sensitive proteins and proanthocyanidins on the colloidal stability of lager beer* J Am Soc Brew Chem 50 67-76
- MCMURROUGH I, BAERT T **1994** *Identification of proanthocyanidins in beer and their direct measurement with a dual electrochemical detector* J Inst Brew 100 409-416
- MCMURROUGH I, DELCOUR JA **1994** *Wort Polyphenols* Ferment 7 175-182
- MCMURROUGH I, MADIGAN D **1996** *Semipreparative chromatographic procedure for the isolation of dimeric and trimeric proanthocyanidins from barley* J Sci Food Agric 44 1731-1735
- MCMURROUGH I, MADIGAN D, KELLY RJ, SMYTH MR **1996** *The Role of Flavonoid Polyphenols in Beer Stability* J Am Soc Brew Chem 54 141-148
- MEBAK **1997** *Brautechnische Analysemethoden* (Selbstverlag der MEBAK, Freising-Weihenstephan)
- MELLENTHIN A, PAPAGIANNPOULOS M, KINITZ C, ZIMMERMANN B, GALENSA R **2001** *Bedeutung und Analytik von Polyphenolen im Brauprozess* Lebensmittelchemie 55 143-144

- MELLON F, SELF R, STARTIN JR **2000** *Mass Spectrometry of Natural Substances in Food* (RSC Publications)
- MERKEN HM, BEECHER GR **2000** *Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review* J Agric Food Chem 48 577-599
- MIEDL M, GARCIA MA, BAMFORTH CW **2005** *Haze Formation in Model Beer Systems* J Agric Food Chem 53 10161-10165
- MIKYŠKA A, HRABÁK M, HAŠKOVÁ D, ŠROGL J **2002** *The Role of Malt and Hop Polyphenols in Beer Quality, Flavour and Haze Stability* J Inst Brew 108 78-85
- MONAGAS M, GÓMEZ-CORDOVÉS C, BARTOLOMÉ B, LAUREANO O, DA SILVA JMR **2003** *Monomeric, Oligomeric, and Polymeric Flavan-3-ol Composition of Wines and Grapes from Vitis vinifera L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon* J Agric Food Chem 51 6475-6481
- MULKAY P, TOUILLAUX R, JERUMANIS J **1981** *Proanthocyanidins of barley: separation and identification* J Chromatogr 208 419-423
- NACZK M, SHAHIDI F **2004** *Extraction and analysis of phenolics in food* J Chromatogr A 1054 95-111
- NARZIß L **1986** *Abriß der Bierbrauerei* 5. Auflage (Enke Verlag, Stuttgart)
- OSSIPOVA S, OSSIPOV V, HAUKIOJA E, LOPONEN J, PIHLAJA K **2001** *Proanthocyanidins of Mountain Birch Leaves: Quantification and Properties* Phytochem Anal 12 128-133
- OUTTRUP H, SCHAUMBERG K **1981** *Structure elucidation of some proanthocyanidins in barley by <sup>1</sup>H 270 MHz NMR spectroscopy* Carlsberg Res Commun 46 43-52
- OVERK CR, YAO P, CHADWICK LR, NIKOLIC D, SUN Y, CUENDET MA, DENG Y, HEDAYAT AS, PAULI GF, FARNSWORTH NR, VAN BREMEN RB, BOLTON JL **2005** *Comparison of the in Vitro Estrogenic Activities of Compounds from Hops (Humulus Lupulus) and Red Clover (Trifolium Pratense)* J Agric Food Chem 53 6246-6253
- OWEN RW, HAUBNER R, HULL WE, ERBEN G, SPIEGELHALDER B, BARTSCH H, HABER B **2003** *Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre* Food Chem Toxicol 41 1727-1738
- PALMA M, PINEIRO Z, BARROSO CG **2001** *Stability of phenolic compounds during extraction with superheated solvents* J Chromatogr A 921 169-174
- PALMA M, PINEIRO Z, BARROSO CG **2002** *In-line pressurized-fluid extraction-solid-phase extraction for determining phenolic compounds in grapes* J Chromatogr A 968 1-6
- PALMBACH G, PAPAGIANNOPOULOS M, GALENSA R **2004** *Flavonoids in Nutrition* Ernährung/Nutrition 28 201-210
- PAPAGIANNOPOULOS M, ZIMMERMANN B, MELLENTHIN A, KRAPPE M, MAIO G, GALENSA R **2001** *ASE-ASPEC-HPLC Kopplung – Automatisierte Bestimmung von Proanthocyanidinen in Malz* GIT Labor-Fachzeitschrift 09/2001 950-952

- PAPAGIANNPOULOS M, ZIMMERMANN B, KRAPPE M, MAIO G, MELLENTHIN A, GALENSA R **2002** *Online coupling of pressurized liquid extraction, solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for automated analysis of proanthocyanidins in malt* J Chromatogr A 958 9-16
- PAPAGIANNPOULOS M, MELLENTHIN A **2002** *Automated sample preparation by pressurized liquid extraction-solid-phase extraction for the liquid chromatographic-mass spectrometric investigation of polyphenols in the brewing process* J Chromatogr A 976 345-358
- PAPAGIANNPOULOS M, GALENSA R **2004** *Identifizierung neuer Hopfen-Inhaltsstoffe mittels HPLC-MS/MS* Lebensmittelchemie 58 19
- PAPAGIANNPOULOS M, WOLLSEIFEN HR, MELLENTHIN A, HABER B, GALENSA R **2004** *Identification and Quantification of Polyphenols in Carob Fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and Derived Products by HPLC-UV-ESI/MSn* J Agric Food Chem 52 3784-3791
- PÄTZOLD RD **1999** *Untersuchungen an Bier, Rohfrüchten und Hopfen zum „Deutschen Reinheitsgebot“ und zur Sortenunterscheidung mittels HPLC* Dissertation, TU Braunschweig
- PENG Z, HAYASAKA Y, ILAND PG, SEFTON M, HØJ P, WATERS EJ **2001** *Quantitative Analysis of Polymeric Procyranidins (Tannins) from Grape (*Vitis vinifera*) Seeds by Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography* J Agric Food Chem 49 26-31
- PÉREZ-OLLEROS L, GARCIA-CUEVAS M, RUIZ-ROSO B **1999a** *Note: Influence of pulp and natural carob fiber on some aspects of nutritional utilization and cholesterolemia in rats* Food Sci Technol Int 5 425-430
- PÉREZ-OLLEROS L, GARCIA-CUEVAS M, RUIZ-ROSO B, REQUEJO A **1999b** *Comparative study of natural carob fiber and psyllium husk in rats. Influence on some aspects of nutritional utilisation and lipidaemia* J Sci Food Agric 79 173-178
- PICINELLI A, SUÁREZ B, MANGAS JJ **1997** *Analysis of polyphenols in apple products* Z Lebensm Unters Forsch A 204 48-51
- PIERZINA D **1996** *HPLC-Bestimmung flavonoider Inhaltsstoffe zum Herkunfts- und Authentizitätsnachweis von Majoran und Gewürzpaprika* Dissertation, TU Braunschweig
- PIÑEIRO Z, PALMA M, BARROSO CG **2004** *Determination of catechins by means of extraction with pressurized liquids* J Chromatogr A 1026 19-23
- PLOWRIGHT TR **1951** *The use of carob flour (Arobon) in a controlled series of infant diarrhoea* J Pediatr 39 16
- PONTON ID **1988** *Proanthocyanidin Free Malt* Ferment 1 33-39
- PORTER LJ **1988** *Flavans and proanthocyanidins in: The Flavanoids: Advances in Research since 1980* (Chapman and Hall)
- PORTER LJ **1994** *Flavans and proanthocyanidins in: The Flavanoids: Advances in Research since 1986* (Chapman and Hall)
- PRAMANIK BN, GANGULY AK, GROSS ML **2002** *Applied Electrospray Mass Spectrometry* (CRC Press)



- PRASAIN JK, WANG CC, BARNES S **2004** *Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples* Free Rad Biol Med 37 1324-1350
- PRIOR RL, LAZARUS SA, CAO G, MUCCITELLI H, HAMMERSTONE JF **2001** *Identification of Procyanidins and Anthocyanins in Blueberries and Cranberries (Vaccinium Spp.) Using High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry* J Agric Food Chem 49 1270-1276
- RAYNIE DE **2004** *Modern Extraction Techniques* Anal Chem 76 4659-4664
- RICHTER B, JONES B, EZZELL J, PORTER N, AVDALOVIC N, POHL C **1996** *Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation* Anal Chem 68 1033-1039
- RICHTER B **1999** *The Extraction of Analytes from Solid Samples Using Accelerated Solvent Extraction* LC/GC 17 6S S22-S27
- ROBARDS K, ANTOLOVICH M **1997** *Analytical chemistry of fruit bioflavonoids – A review* Analyst 122 11R-34R
- ROBARDS K **2003** *Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables* J Chromatogr A 1000 657-691
- RODRIGUES RB, LICHTENTHÄLER R, PAPAGIANNPOULOS M, ZIMMERMANN B, FABRICIUS H, MAIA JGS, ALMEIDA O, MARX F **2005** *Evaluation of the total antioxidant scavenging capacity of (Açaí) seeds (Euterpe oleracea MART.)* Lebensmittelchemie 59 37
- RODRIGUES RB, LICHTENTHÄLER R, ZIMMERMANN BF, PAPAGIANNPOULOS M, FABRICIUS H, ALMEIDA O, MAIA JGS, MARX F **2006a** *Total Oxidant Scavenging Capacity of Euterpe oleracea Mart. (Açaí) Seeds and Identification of their Polyphenolic Compounds* J Agric Food Chem 54 4162-4167
- RODRIGUES RB, PAPAGIANNPOULOS M, MAIA JGS, YUYAMA K, MARX F **2006b** *Antioxidant capacity of camu camu (Myrciaria dubia (H.B.K.) Mc Vaugh) pulp* Ernährung/Nutrition 30 357-362
- ROEDER A, LAM TML, GALENSA R **1995** *Thermospray-LCMS-Untersuchungen über Proanthocyanidine und andere Polyphenole im Malz, Bier und Hopfen* Monatsschrift für Brauwissenschaft 390-396
- ROEDER A **1997** *Thermospray-HPLC-MS-Untersuchungen von Polyphenolen in unterschiedlichen Probenmaterialien pflanzlicher Herkunft* Dissertation, TU Braunschweig
- ROHR GE **2002** *Analysis of proanthocyanidins in: Polyphenols 2000* (edited by MARTENS S, TREUTTER D, FORKMANN G) 60-97 (2002)
- ROSSI DT, SINZ M **2001** *Mass Spectrometry in Drug Discovery* (CRC Press)
- ROSTAGNO MA, PALMA M, BARROSO CG **2004** *Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans* Anal Chim Acta 522 169-177
- SAKAKIBARA H, HONDA Y, NAKAGAWA S, ASHIDA H, KANAZAWA K **2003** *Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits and teas* J Agric Food Chem 51 571-581

SANTOS-BUELGA C, SCALBERT A **2000** *Proanthocyanidins and tannin-like compounds, nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health* J Sci Food Agric 80 1094-1117

SAURA-CALIXTO F, CANELLAS J **1982** *Components of nutritional interest in carob pods* J Sci Food Agric 33 1319-1323

SCALBERT A, WILLIAMSON G **2000** *Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols* J Nutr 130 2073S-2085S

SERAFINI M, BUGIANESI R, MAIANI G, VALTUENA S, SANTIS SD, CROZIER A **2003** *Plasma antioxidants from chocolate* Nature 424 1013

SIEBERT KJ, CARRASCO A, LYNN P **1996** *Formation of protein-polyphenol haze in beverages* J Agric Food Chem 44 1997-2005

SIEBERT KJ **1999a** *Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze. Stabilization, and analysis* J Agric Food Chem 47 353-362

SIEBERT KJ **1999b** *Protein-Polyphenol Haze in Beverages* Food Technology 53 54-57

SIEBERT KJ, LYNN PY **2000** *Effect of Protein-Polyphenol Ratio on the Size of Haze Particles* J Am Soc Brew Chem 58 117-123

SIEBERT KJ, LYNN PY **2006** *Effect of Protein-Polyphenol Ratio on the Size of Haze Particles* J Am Soc Brew Chem 64 127-134

SIEWEK F **1984** *Isolierung, Identifizierung und hochleistungsflüssigkeitschromatographische Bestimmung von Flavonoiden zur Beurteilung von Fruchtsafterzeugnissen* Dissertation, Universität Hannover

SMITH RM **2003** *Before the injection – modern methods of sample preparation for separation techniques* J Chromatogr A 1000 3-27

STAFFORD HA **1990** *Flavonoid Metabolism* (CRC Press)

STEVENS JF, TAYLOR AW, DEINZER ML **1998** *Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography-tandem mass spectrometry* J Chromatogr A 832 97-107

STEVENS JF, TAYLOR AW, CLAWSON JE, DEINZER ML **1999** *Fate of xanthohumol and related prenylflavonoids from hops to beer* J Agric Food Chem 47 2421-2428

STEVENS JF, PAGE JE **2004** *Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health!* Phytochemistry 65 1317-1330

SVEDSTRÖM U, VUORELA H, KOSTIAINEN R, HUOVINEN K, LAAKSO I, HILTUNEN R **2002** *High-performance liquid chromatography determination of oligomeric procyanidins from dimers up to the hexamer in hawthorn* J Chromatogr A 968 53-60

TAMIR M, NACHTOMI E, ALUMOT E **1971** *Degradation of tannins from carob pods (Ceratonia siliqua) by thioglycollic acid* Phytochemistry 10 2769-2774

- TANNER GJ, FRANCKI KT, ABRAHAMS S, WATSON JM, LARKIN PJ, ASHTON AR **2003** *Proanthocyanidin Biosynthesis in Plants: Purification of Legume Leucoanthocyanidin Reductase and Molecular Cloning of its cDNA* J Biol Chem 278 31647-31656
- TRALDI P, MAGNO F, LAVAGNINI I, SERAGLIA R **2006** *Quantitative Applications of Mass Spectrometry* (Wiley&Sons)
- TREUTTER D, SANTOS-BUELGA C, GUTMANN M, KOLODZIEJ H **1994** *Identification of flavan-3-ols and procyanidins by high-performance liquid chromatography and chemical reaction detection* J Chromatogr A 667 290-297
- VAN WAESBERGHE JWM **2001** *Geschmacksstabilität beginnt beim Malz und in der Sudhausarbeit: Ein Überblick über die Forschungsergebnisse* Brauwelt 42 1810-1814
- VERZELE M, DE KEUKELEIRE D **1991** *Chemistry and Analysis of Hop and Beer Bitter Acids* (Elsevier)
- VIDAL S, LEIGH F, GUYOT S, MARNET N, KWIATKOWSKI M, GAWEL R, CHEYNIER V, WATERS EJ **2003** *The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium* J Sci Food Agric 83 564-573
- WACKERBAUER K, ANGER HM **1984** *Bierstabilisierung unter besonderer Berücksichtigung der Polyphenole* Brauwissenschaft 37 153-161
- WACKERBAUER K, HARDT R **1996** *Radikalreaktionen und die Geschmacksstabilität des Bieres* Brauwelt 136 1880-1889
- WALTERS MT, HEASMAN AP, HUGHES PS **1997** *Comparison of (+)-Catechin and Ferulic Acid as Natural Antioxidants and Their Impact on Beer Flavor Stability. Part 1: Forced-Aging* J Am Soc Brew Chem 55 83-89 *Part 2: Extended Storage Trials* J Am Soc Brew Chem 55 91-98
- WATSON JT **1985** *Introduction to Mass Spectrometry*, 2nd Edition (Raven Print)
- WHITTLE N, ELDRIDGE H, BARTLEY J **1999** *Identification of the Polyphenols in Beer by HPLC/MS and HPLC/Electrochemical Detection* J Inst Brew 105 89-99
- WOLLERSEN H **2004** *Bestimmung und Identifizierung von Flavonoiden in Gerste mit HPLC-DAD-MS/MS* Dissertation, Universität Paderborn
- WOLLGAST J, PALLARONI L, AGAZZI ME, ANKLAM E **2001** *Analysis of procyanidins in chocolate by reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometric and tandem mass spectrometric detection* J Chromatogr A 926 211-220
- WOLLSEIFEN HR **2003** *Polyphenole in Johannisbrot (Ceratonia Siliqua L.) und daraus hergestellten Produkten* Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Institut für Lebensmittelwissenschaft, Universität Bonn
- WOLLSEIFEN HR, BONER M, SPRENGER C, FÖRSTEL H, GALENSA R **2006** *Herkunftsbestimmung von Aprikosen mit Polyphenol- und Stabilisotopenanalytik* Lebensmittelchemie 60 128-129
- WURZBACHER M, KINITZ C, KROTTENTHALER M, BACK W, GALENSA R **2006** *Endogene antioxidative Aktivität von Bier unter besonderer Berücksichtigung der Polyphenole* Brauwelt 33 964

YANAGIDA A, SHOJI T, SHIBUSAWA Y **2003** *Separation of proanthocyanidins by degree of polymerization by means of size-exclusion chromatography and related techniques* J Biochem Biophys Methods 56 311-322

YANG Y, CHIEN M **2000** *Characterization of Grape Proanthocyanidins Using High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Matrix-Assisted Desorption/Ionisation Time-of-flight Mass Spectrometry* J Agric Food Chem 48 3990-3996

ZIMMERMANN B, PAPAGIANNPOULOS M, MELLENTIN A, GALENSA R **2001** *Online-Kopplung von ASE, SPE und HPLC am Beispiel der Polyphenolanalytik in Malz* Lebensmittelchemie 55 66-67

ZIMMERMANN B, PAPAGIANNPOULOS M, MELLENTIN A, KRAPPE M, MAIO G, GALENSA R **2002** *Coupling of ASE, ASPEC and HPLC: Automated determination of Proanthocyanidins in malt* GIT Laboratory Journal Europe 4 175-177

ZIMMERMANN B **2005** *Proanthocyanidins in barley and malt analyzed by pressurized liquid extraction, solid-phase extraction and HPLC* Dissertation, Universität Bonn (Veröffentlicht im Shaker-Verlag, Aachen, ISBN 3-8322-4723-8)

ZIMMERMANN B, GALENSA R **2007** *One for all—all for one: proof of authenticity and tracing of foods with flavonoids. Analysis of proanthocyanidins in barley and malt* Eur Food Res Technol 224 385–393

ZUNFT HJF, LUEDER W, HARDE A, HABER B, GRAUBAUM HJ, GRUENWALD J **2001** *Carob pulp preparation for treatment of hypercholesterolemia* Adv Ther 18 230-236

ZUNFT HJF, LUEDER W, HARDE A, HABER B, GRAUBAUM HJ, KOEBNICK C, GRUENWALD J **2003** *Carob pulp preparation rich in insoluble fibre lowers total and LDL cholesterol in hypercholesterolemic patients* Eur J Nutr 42 235-242

## **Anhang A – Abbildungen Proanthocyanidine in Malz**

Die Abbildungen in diesem Anhang beziehen sich auf den Abschnitt 2.5-Proanthocyanidine in Gerstenmalz (Seite 93). Sie zeigen alle Massenspuren der dimeren, trimeren, tetrameren und pentameren Proanthocyanidine und die Fragmentspektren aller signifikanten Peaks dieser Massenspuren. Eine tabellarische Übersicht der identifizierten Proanthocyanidine und der wichtigsten in den Fragmentspektren auftretenden struktur-relevanten Ionen findet sich in Tabelle 2.4-1 (Seite 104-106).

Da zur Aufnahme der Daten die einzelnen Verbindungen gezielt fragmentiert werden mussten, wurden mehrere Chromatogramme aufgenommen und die Retentionszeiten der einzelnen Peaks auf ein Referenzchromatogramm bezogen.

Die Massenspuren  $[M-H]^-$  sind den Proanthocyanidinen wie folgt zuzuordnen:

Dimere Proantocyanidine	561, 577, 593, 609
Trimere Proantocyanidine	849, 865, 881, 897, 913
Tetramere Proantocyanidine	1137, 1153, 1169, 1185, 1201
Pentamere Proantocyanidine	1441, 1457, 1473, 1489, 1505, 1521

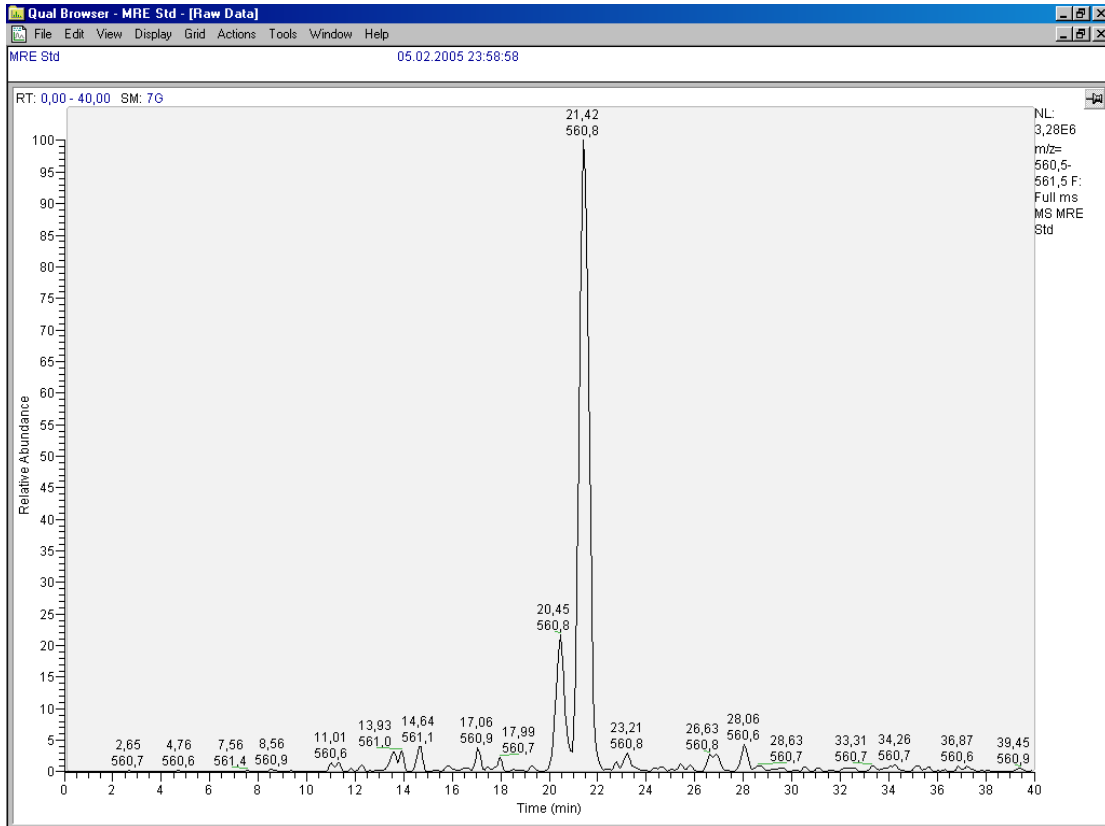


Abbildung A1: Massenspur für  $[M-H]^-$  561

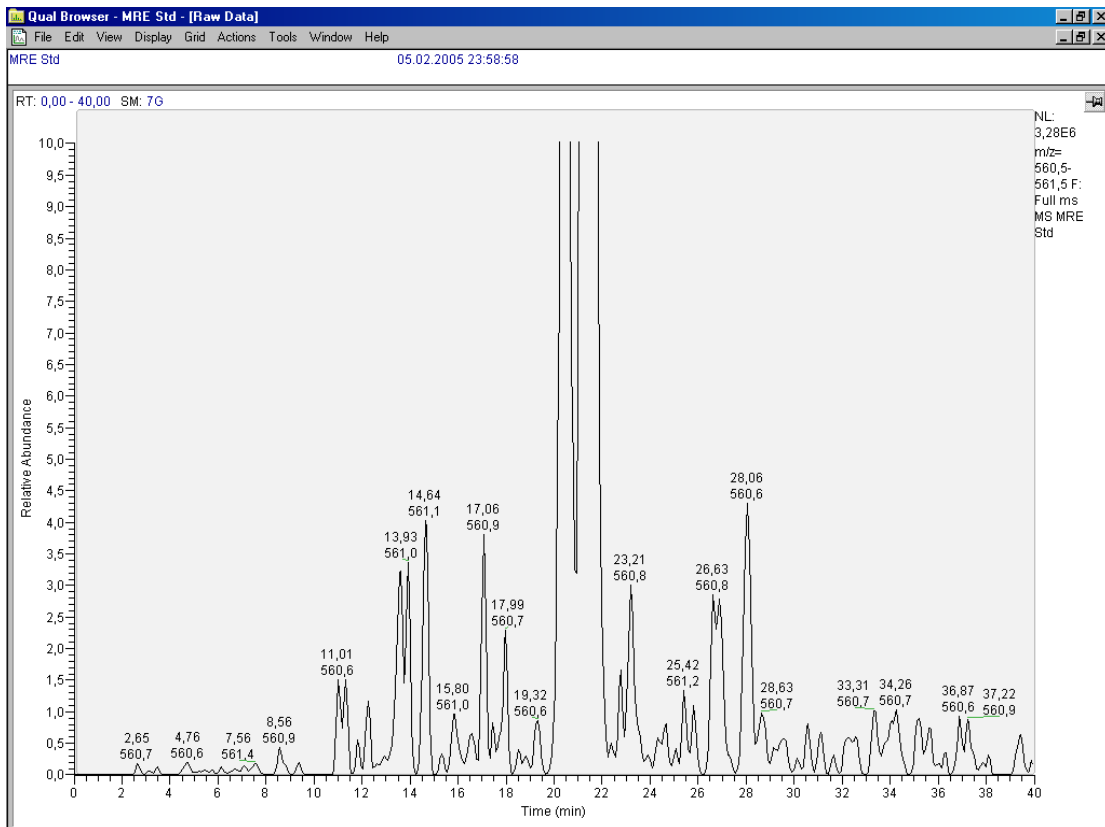


Abbildung A2: Massenspur für  $[M-H]^-$  561 (vergrößerte Darstellung der MS-Intensität)

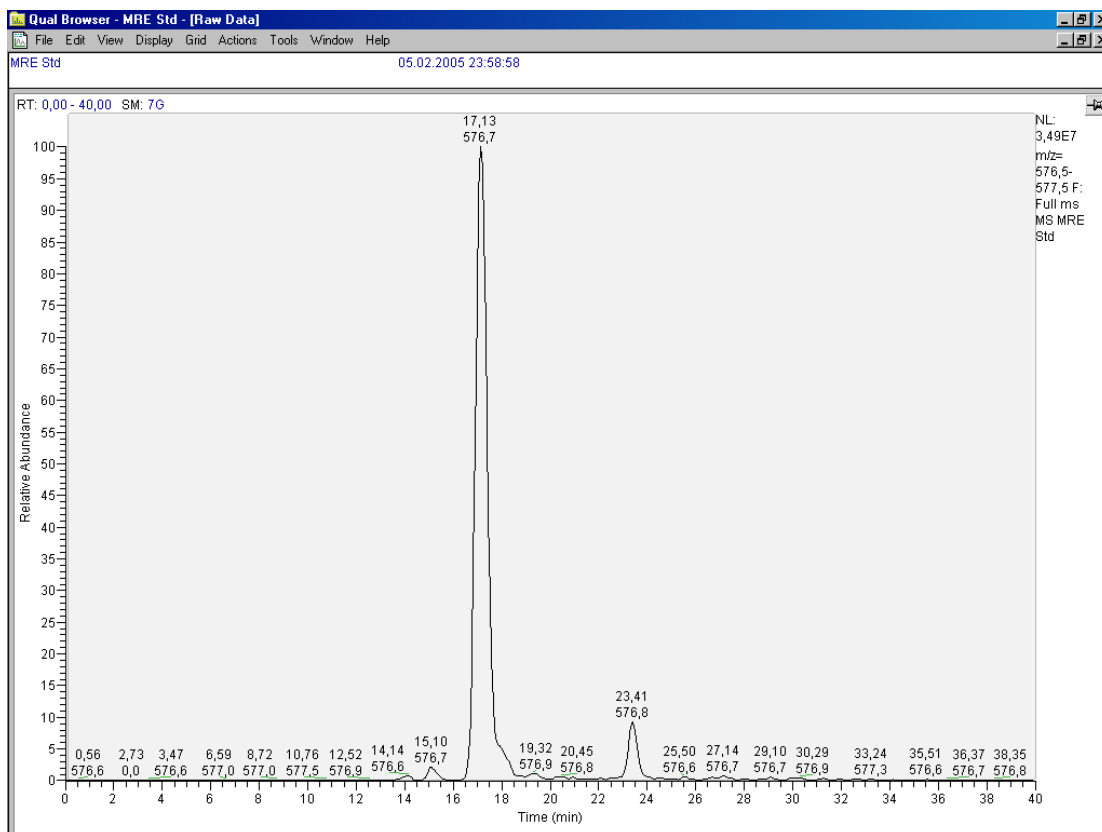


Abbildung A3: Massenspur für  $[M-H]^-$  577 (z.B. Dimer mit 2 (epi)Catechineinheiten)

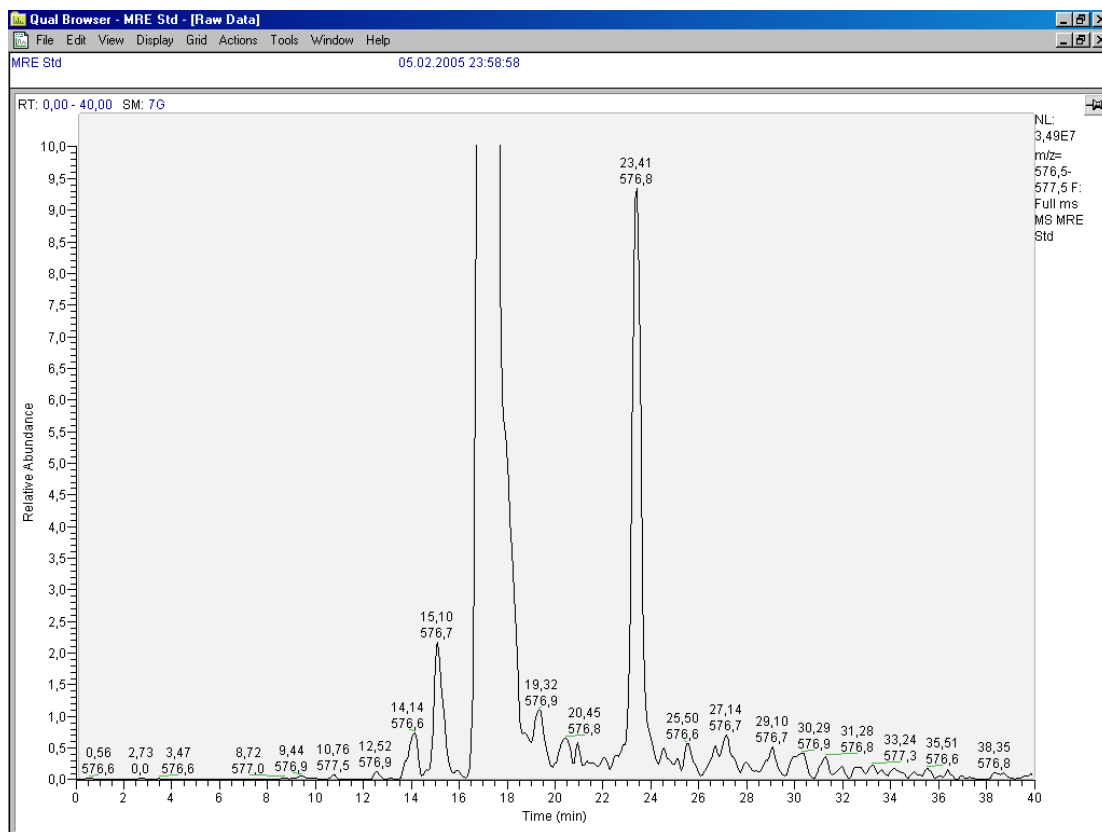


Abbildung A4: Massenspur für  $[M-H]^-$  577 (vergrößerte Darstellung der MS-Intensität)

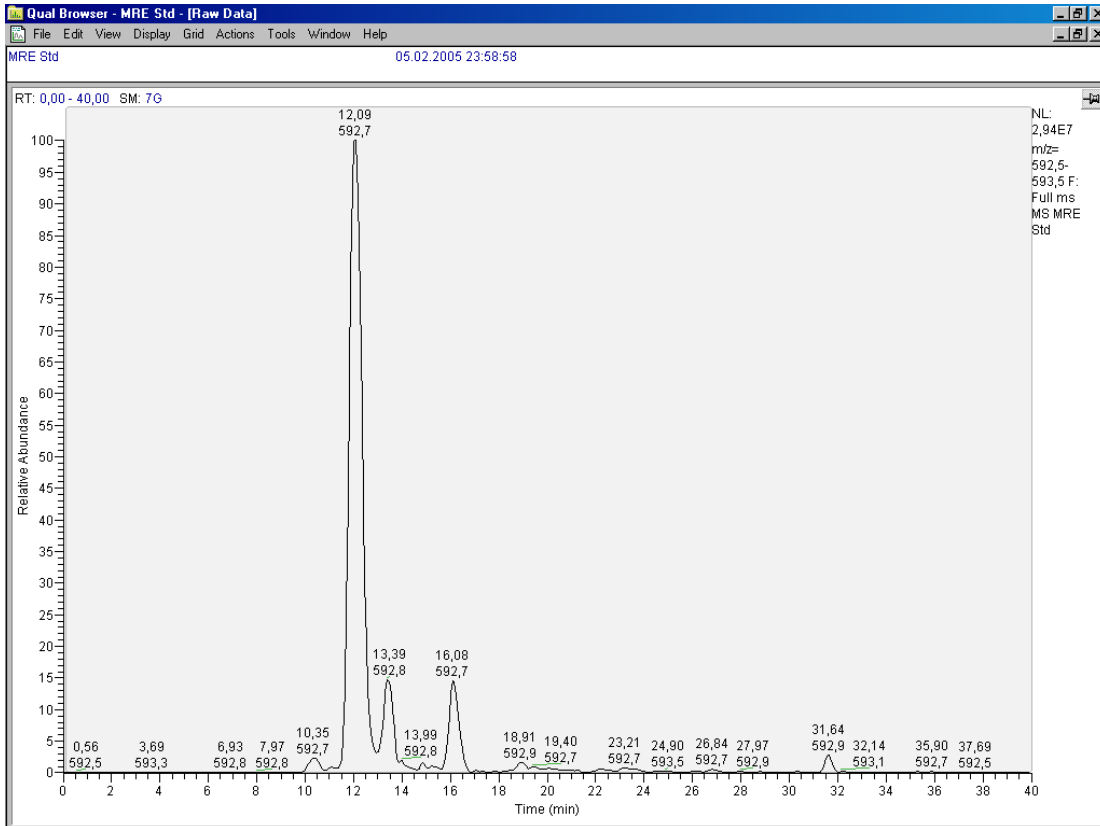


Abbildung A5: Massenspur für  $[M-H]^- 593$

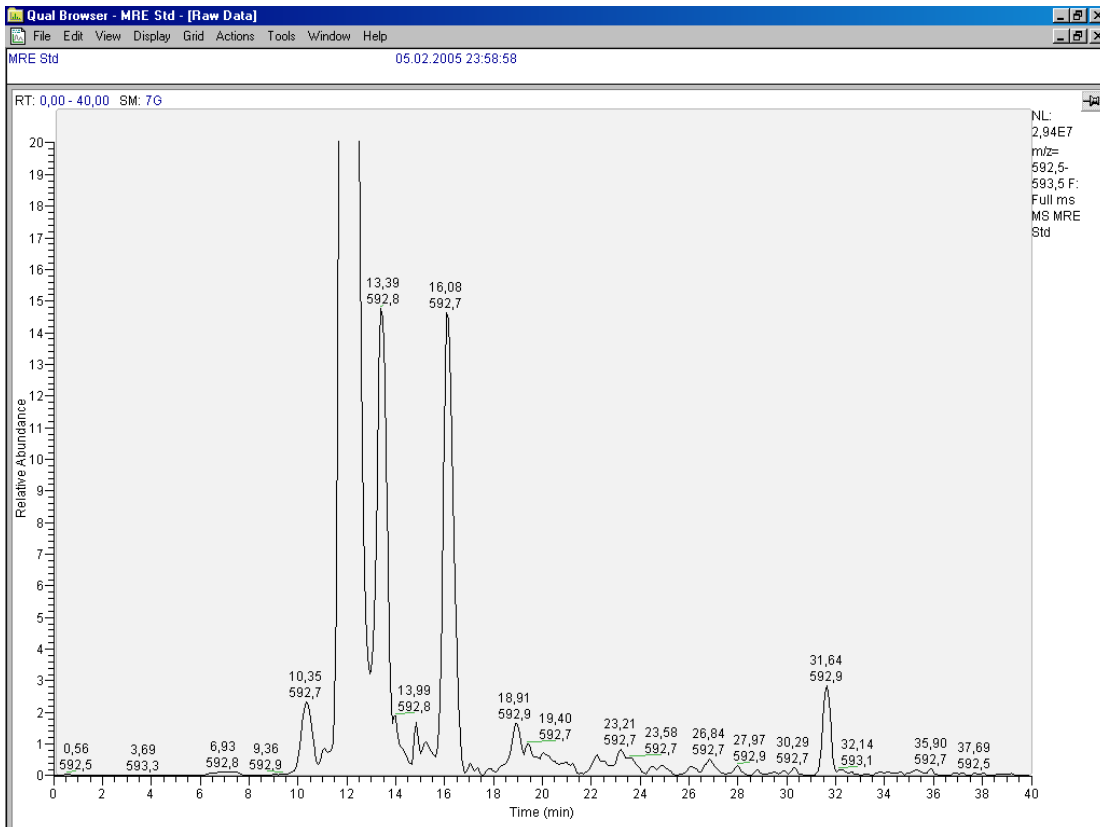


Abbildung A6: Massenspur für  $[M-H]^- 593$  (vergrößerte Darstellung der MS-Intensität)





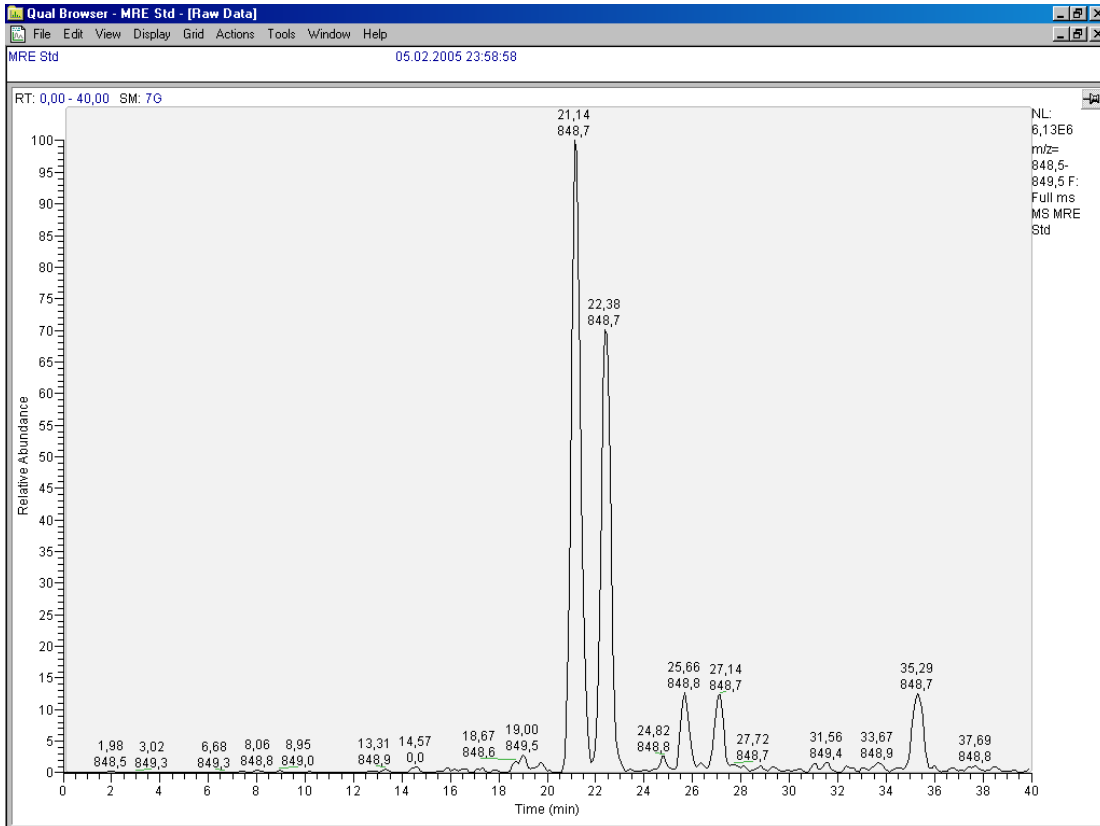


Abbildung A9: Massenspur für  $[M-H]^-$  849

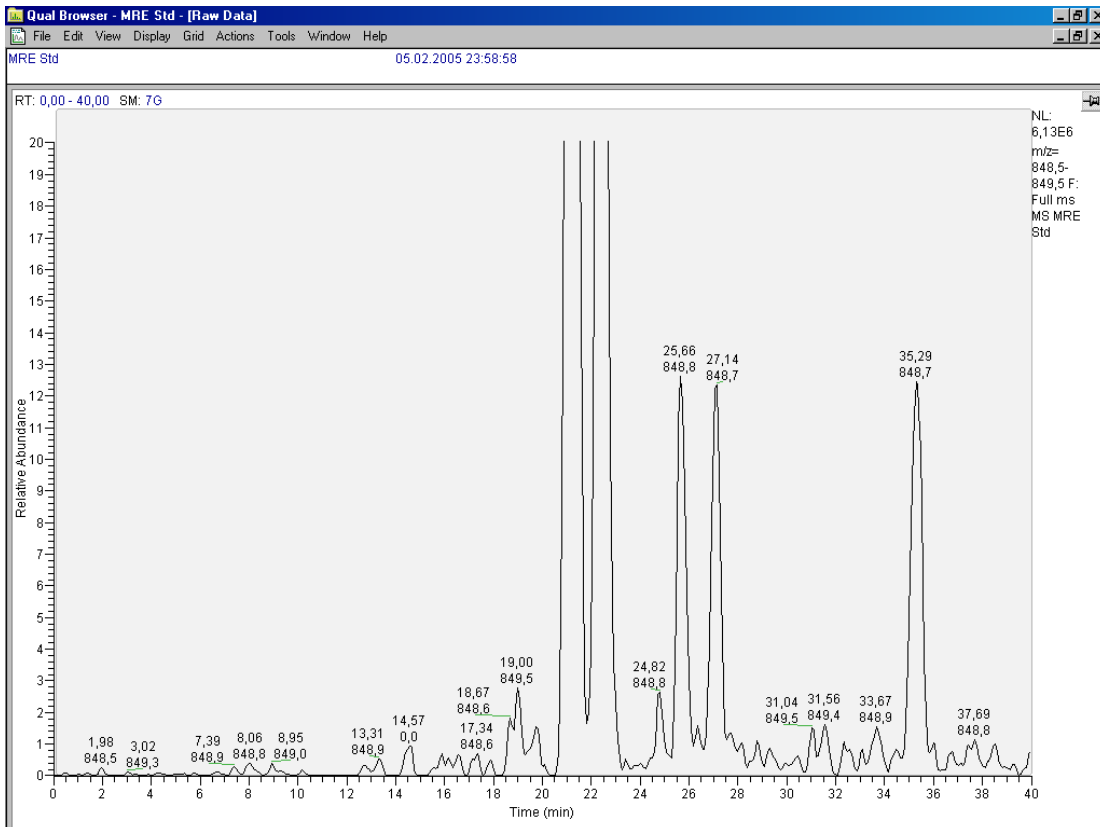


Abbildung A10: Massenspur für  $[M-H]^-$  849 (vergrößerte Darstellung der MS-Intensität)

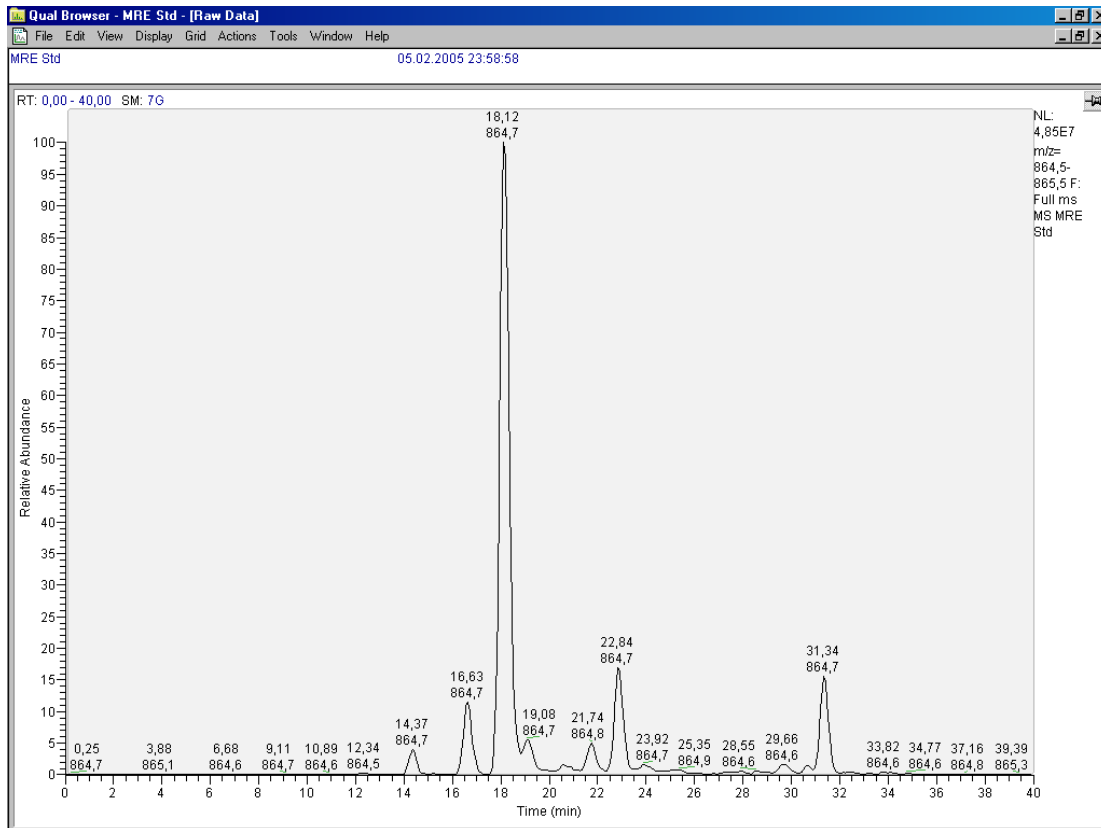


Abbildung A11: Massenspur für  $[M-H]^-$  865 (z.B. Trimer mit 3 (epi)Catechineinheiten)

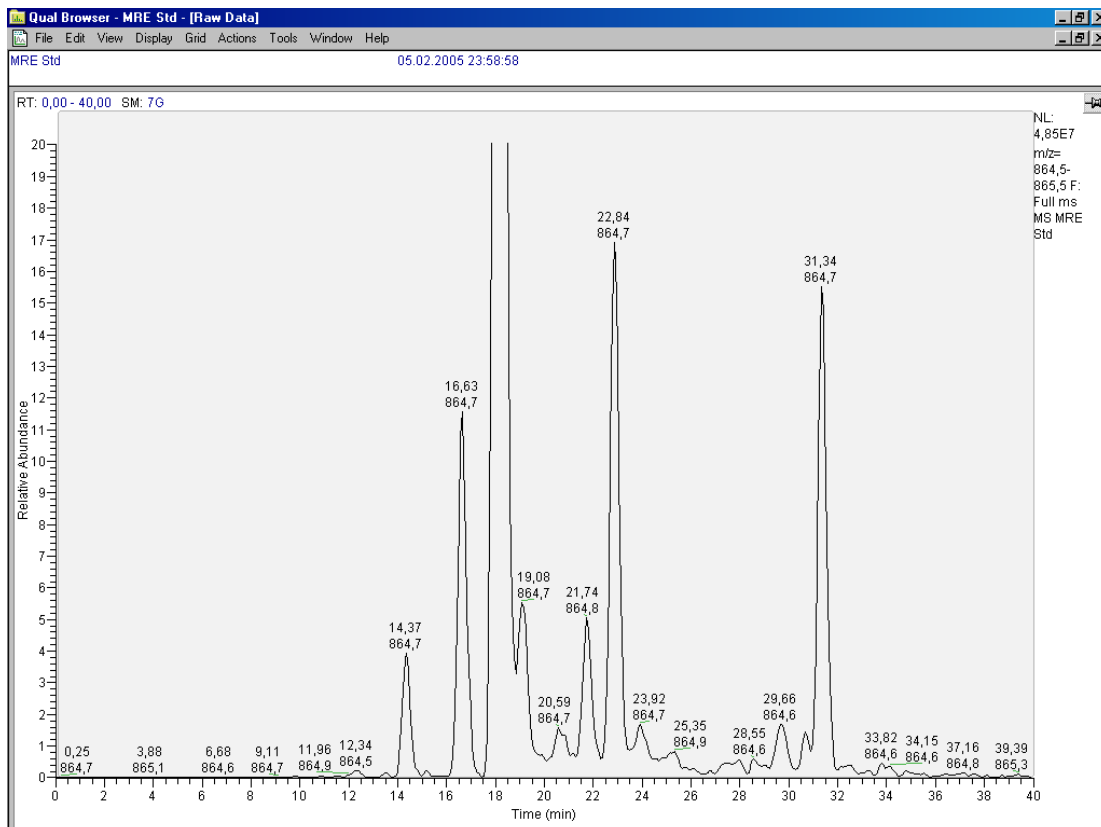


Abbildung A12: Massenspur für  $[M-H]^-$  865 (vergrößerte Darstellung der MS-Intensität)

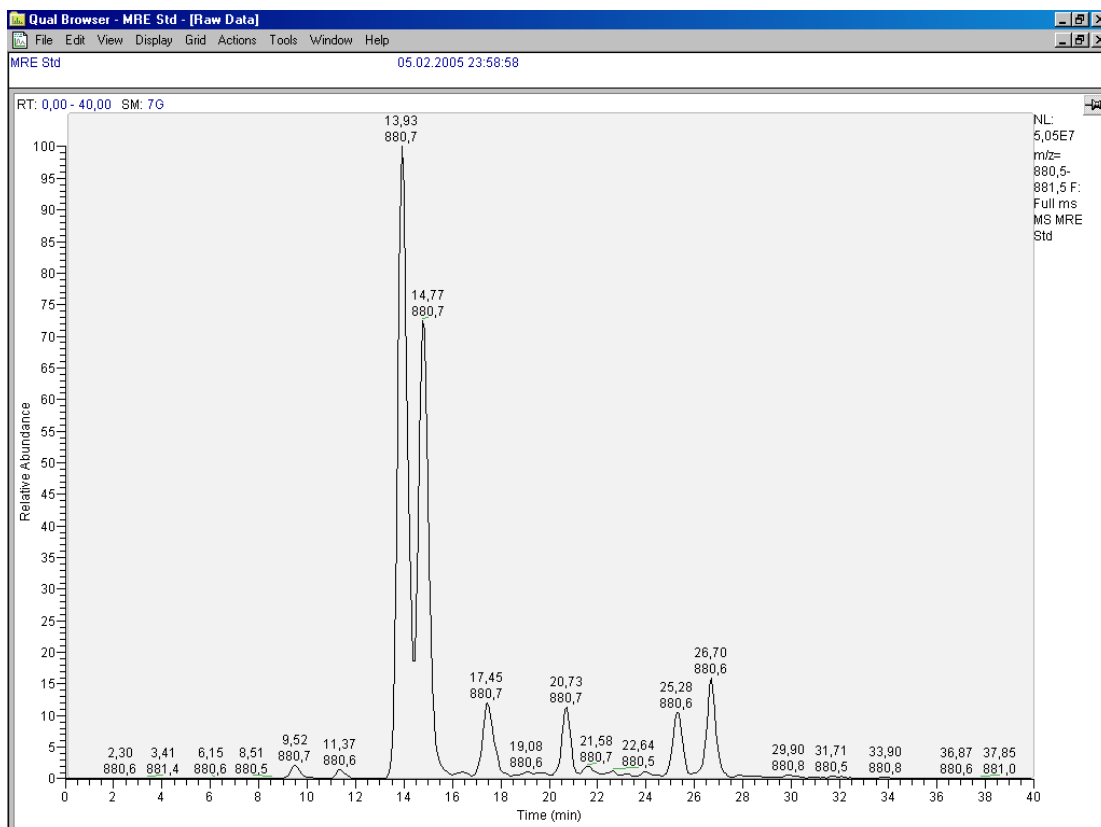


Abbildung A13: Massenspur für  $[M-H]^-$  881

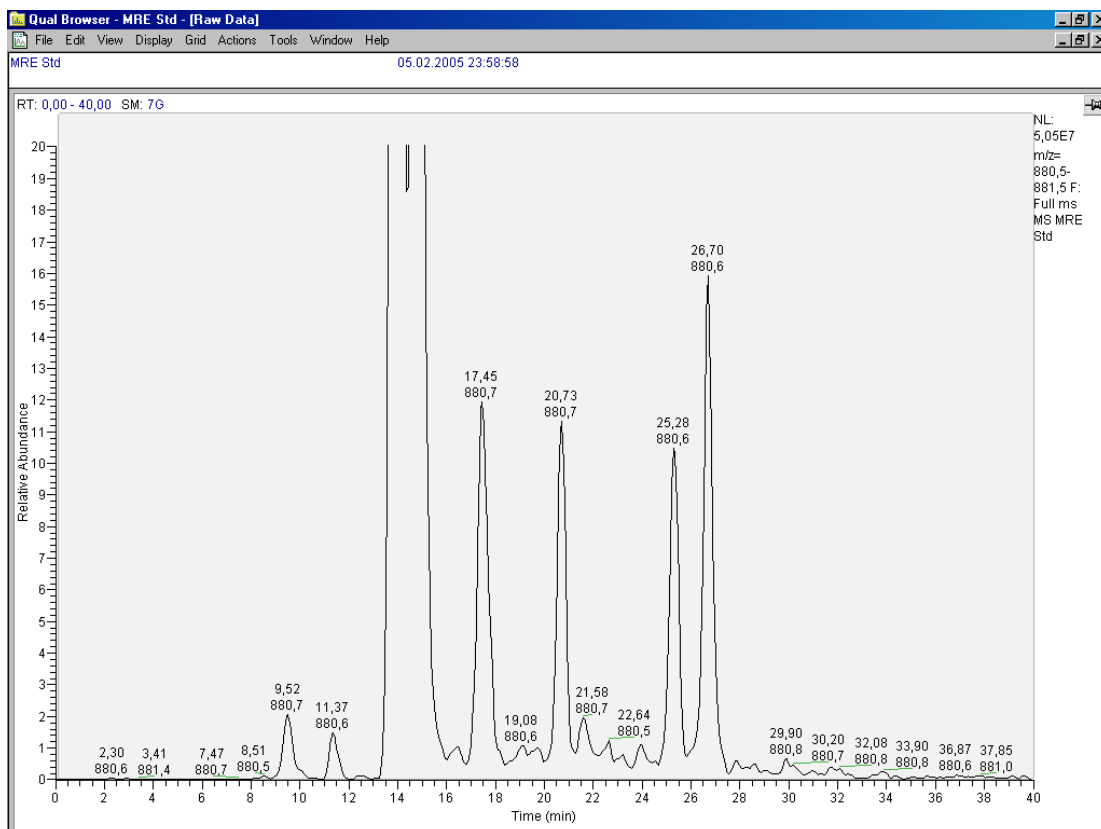


Abbildung A14: Massenspur für  $[M-H]^-$  881 (vergrößerte Darstellung der MS-Intensität)

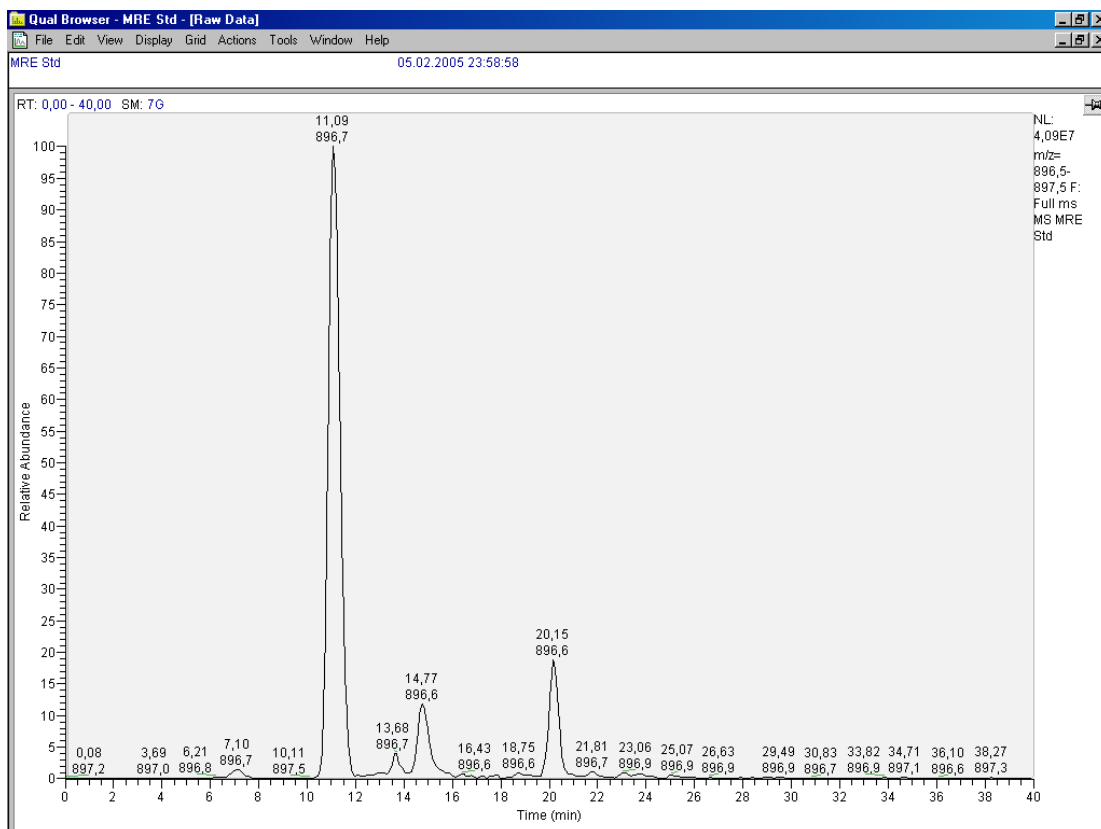


Abbildung A15: Massenspur für  $[M-H]^- 897$

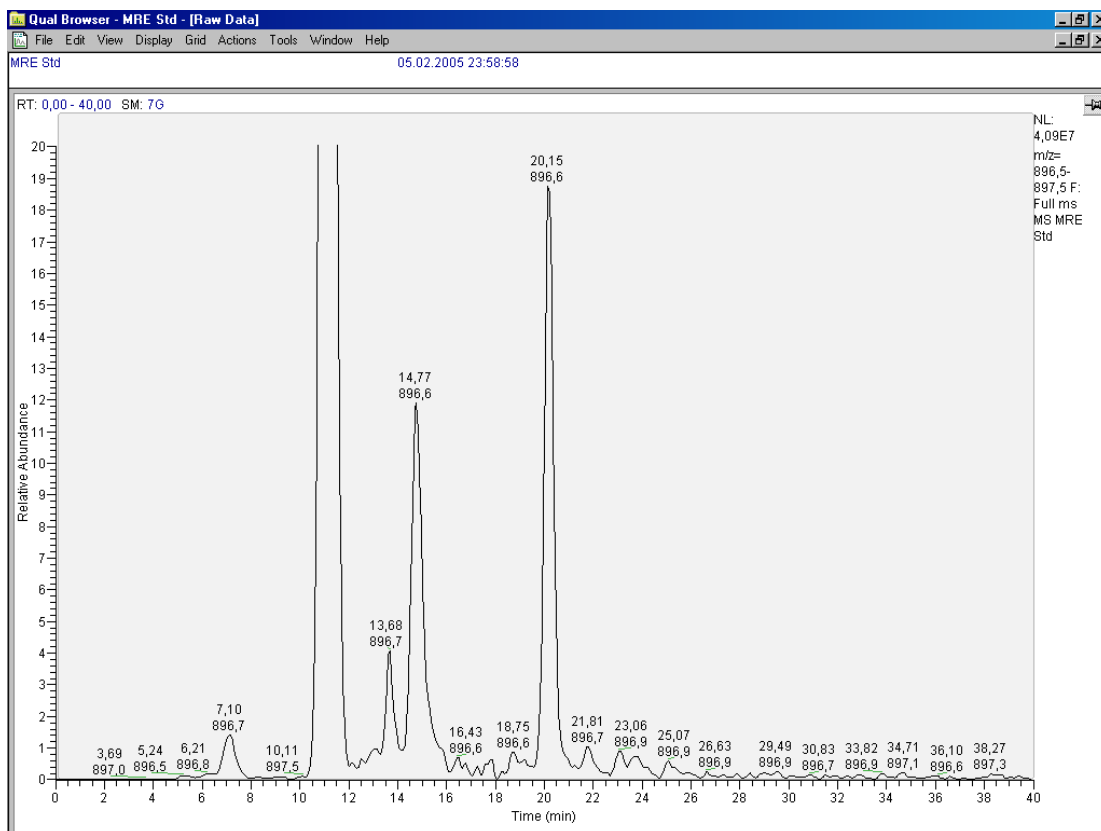


Abbildung A16: Massenspur für  $[M-H]^- 897$  (vergrößerte Darstellung der MS-Intensität)

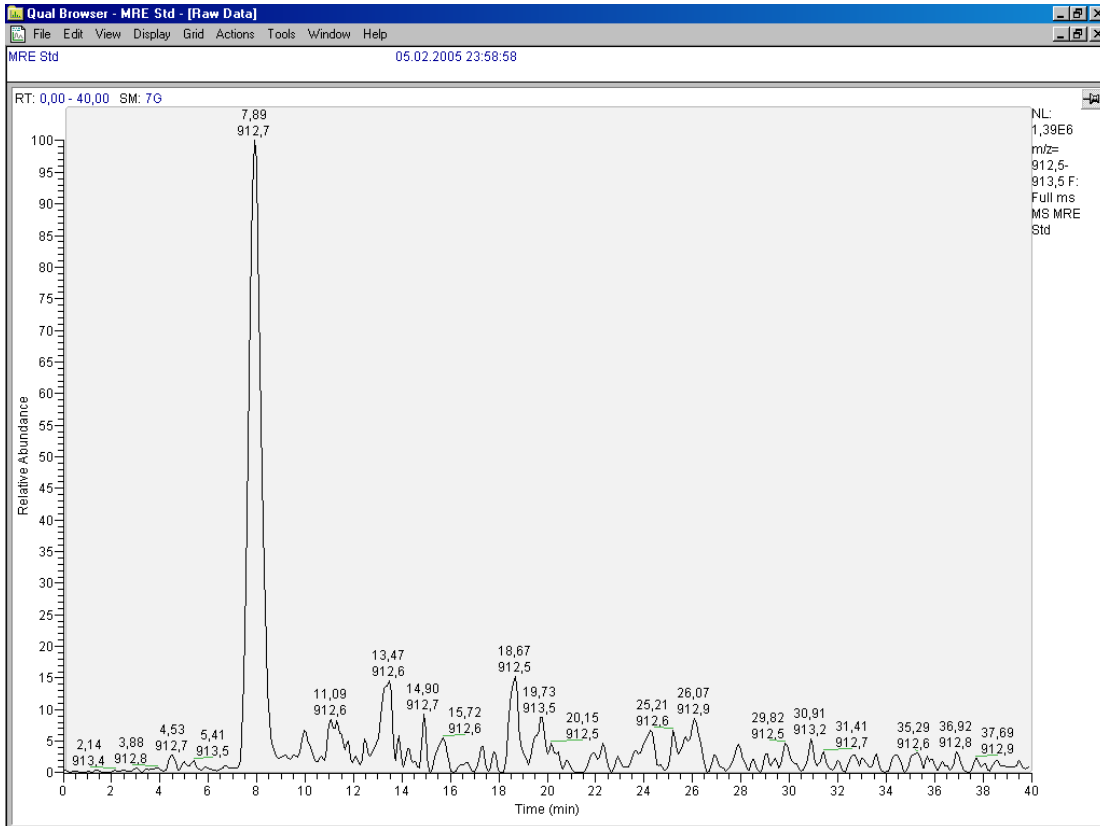


Abbildung A17: Massenspur für  $[M-H]^-$  913 (Trimer mit 3 (epi)Galliccatechineinheiten)

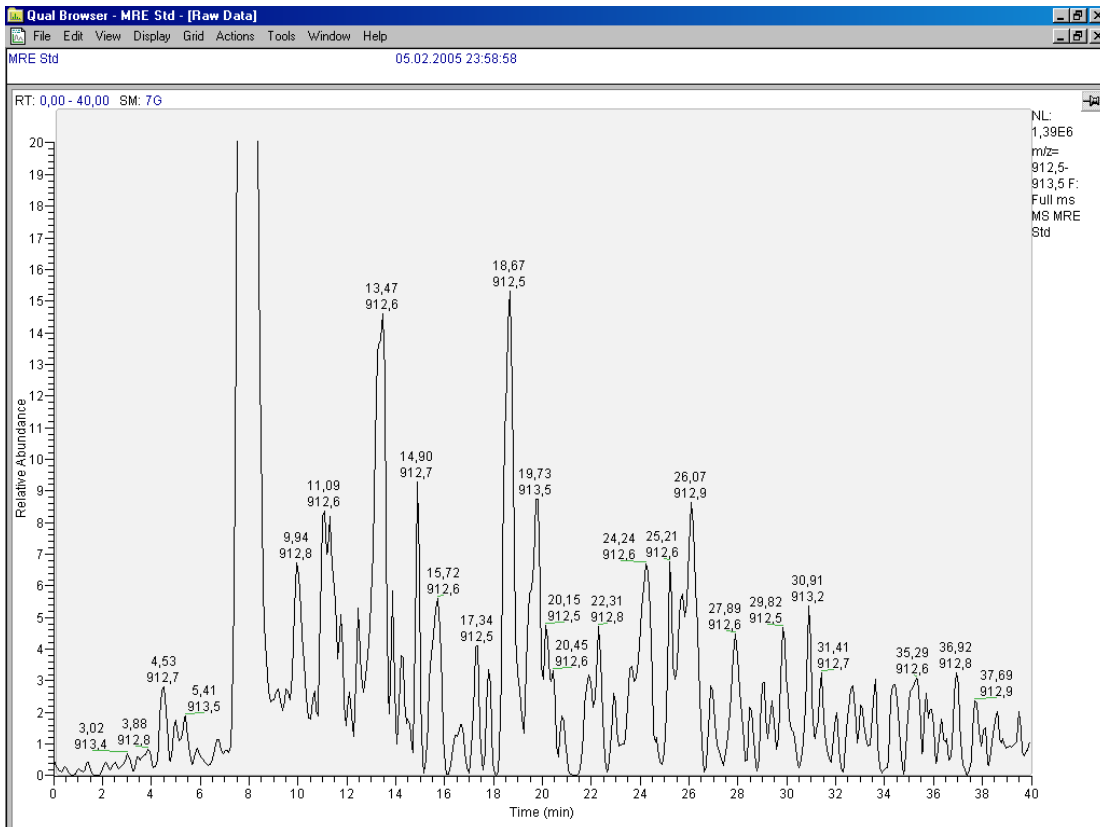


Abbildung A18: Massenspur für  $[M-H]^-$  913 (vergrößerte Darstellung der MS-Intensität)

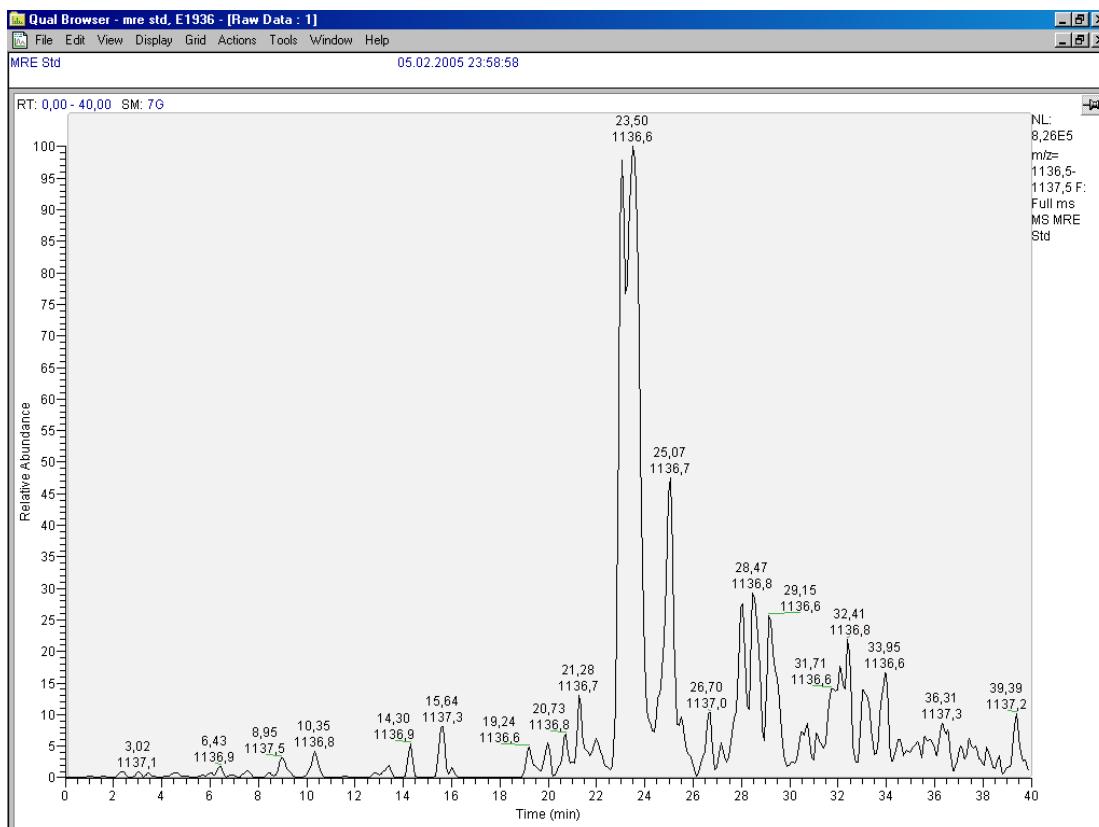


Abbildung A19: Massenspur für  $[M-H]^-$  1137

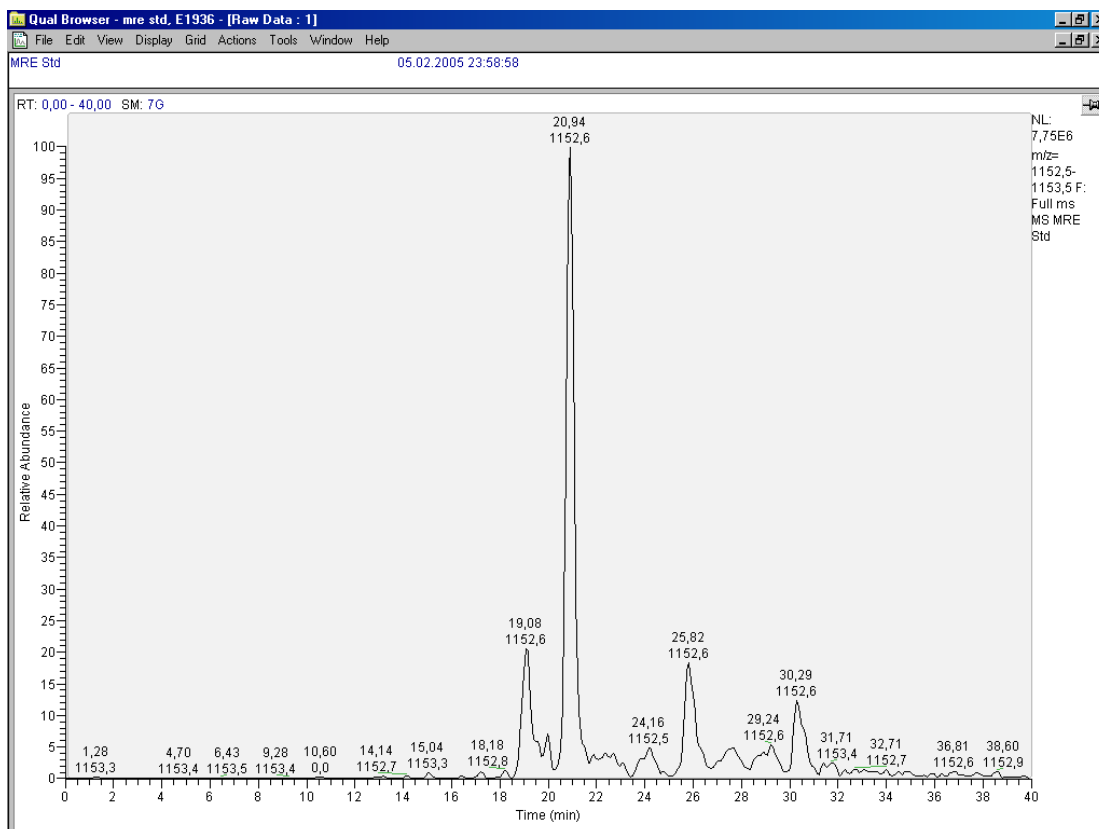


Abbildung A20: Massenspur für  $[M-H]^-$  1153 (z.B. Tetramer mit 4 (epi)Catechineinheiten)

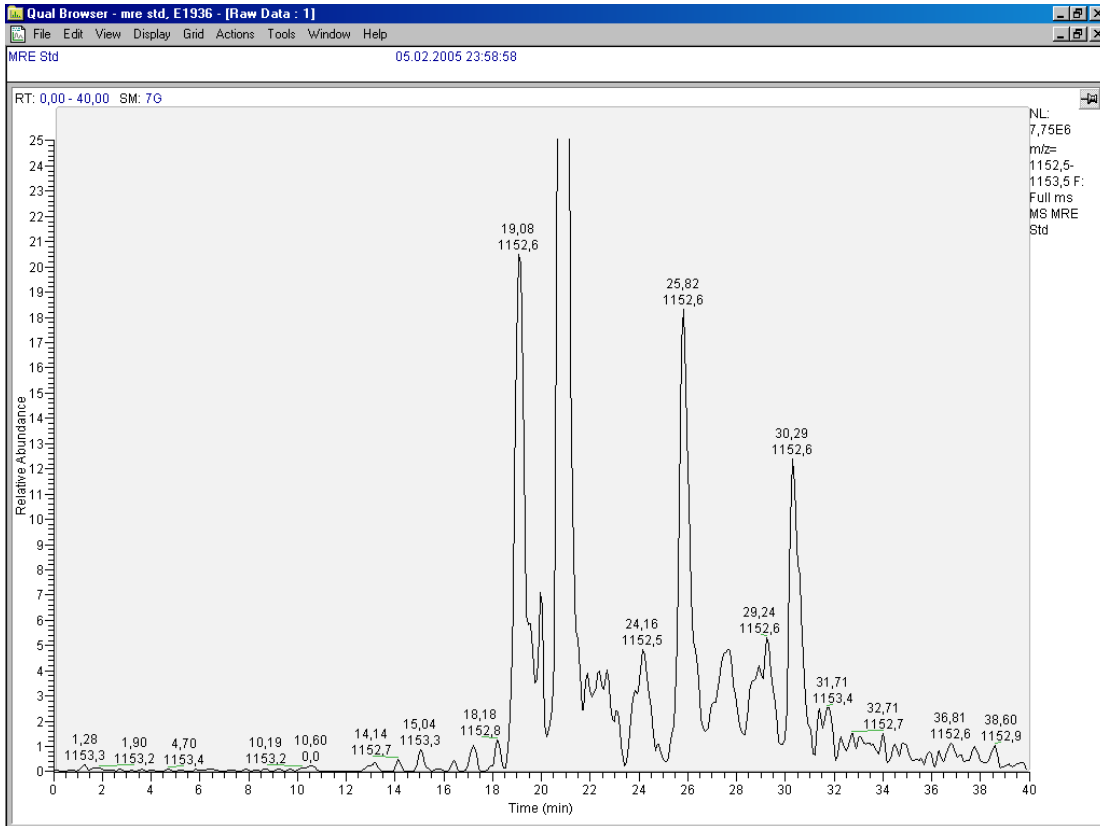


Abbildung A21: Massenspur für  $[M-H]^-$  1153 (vergrößerte Darstellung der MS-Intensität)

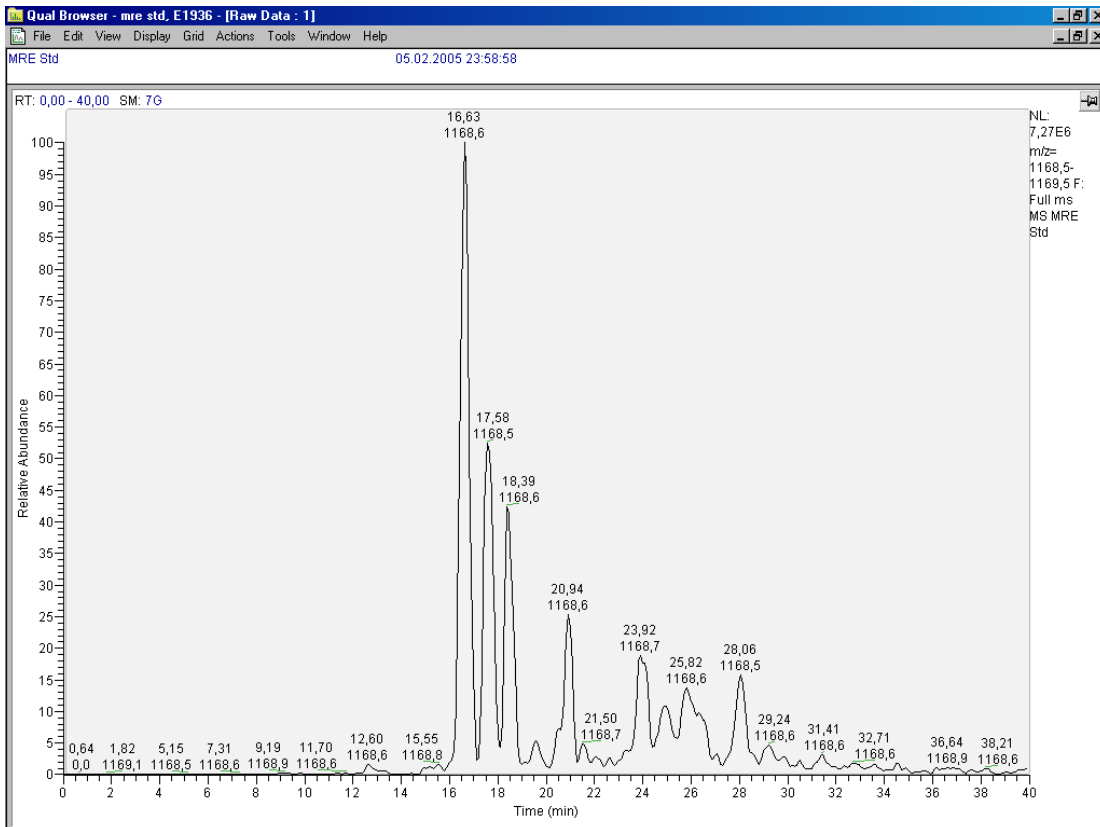


Abbildung A22: Massenspur für  $[M-H]^-$  1169



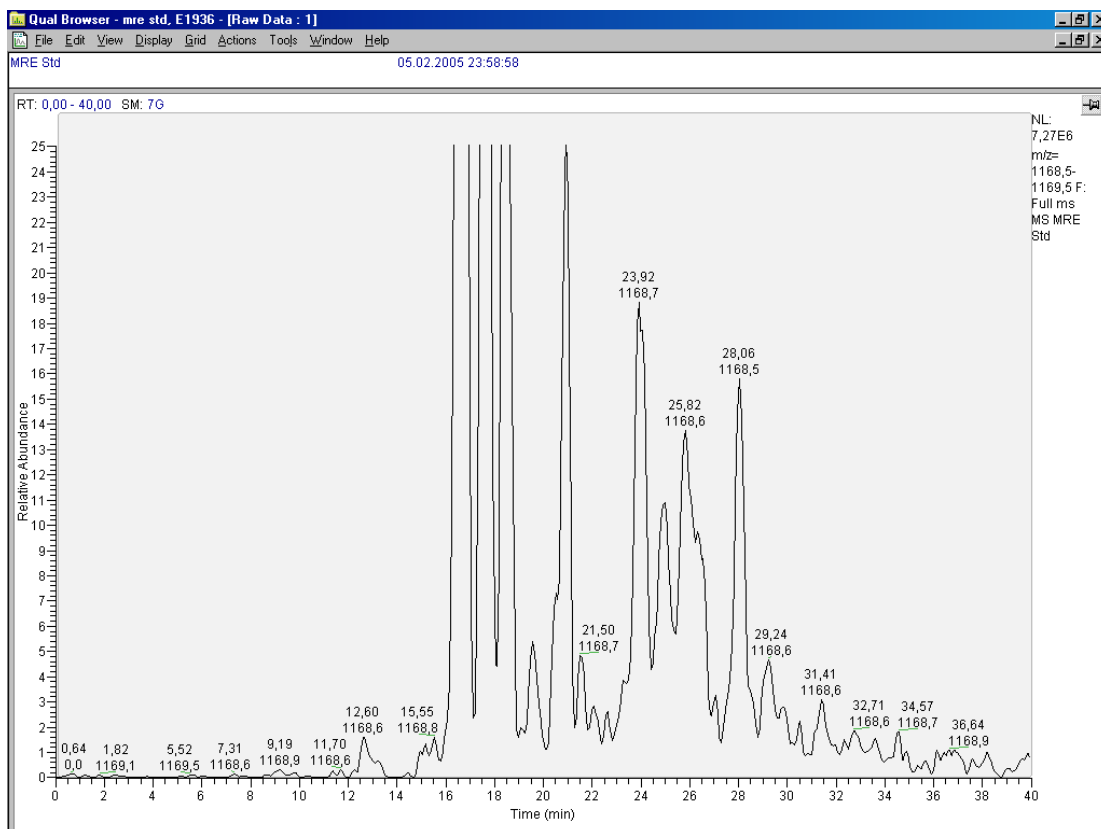


Abbildung A23: Massenspur für  $[M-H]^-$  1169 (vergrößerte Darstellung der MS-Intensität)

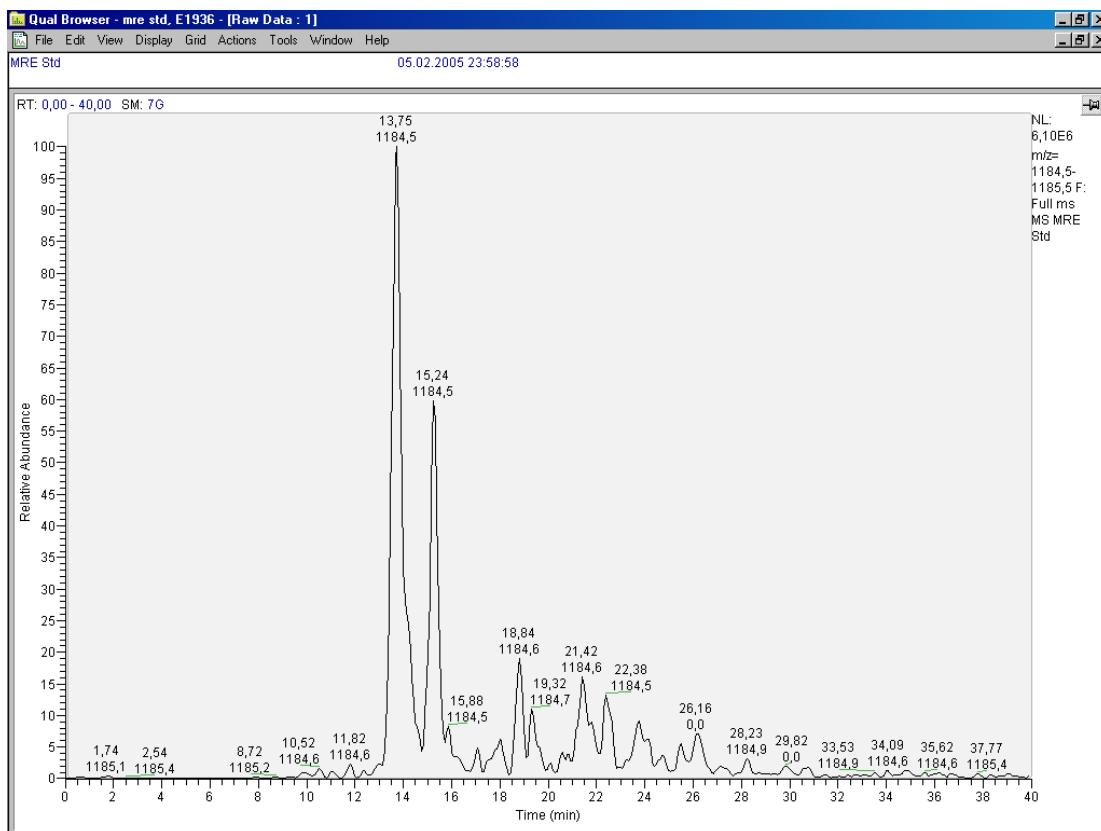


Abbildung A24: Massenspur für  $[M-H]^-$  1185

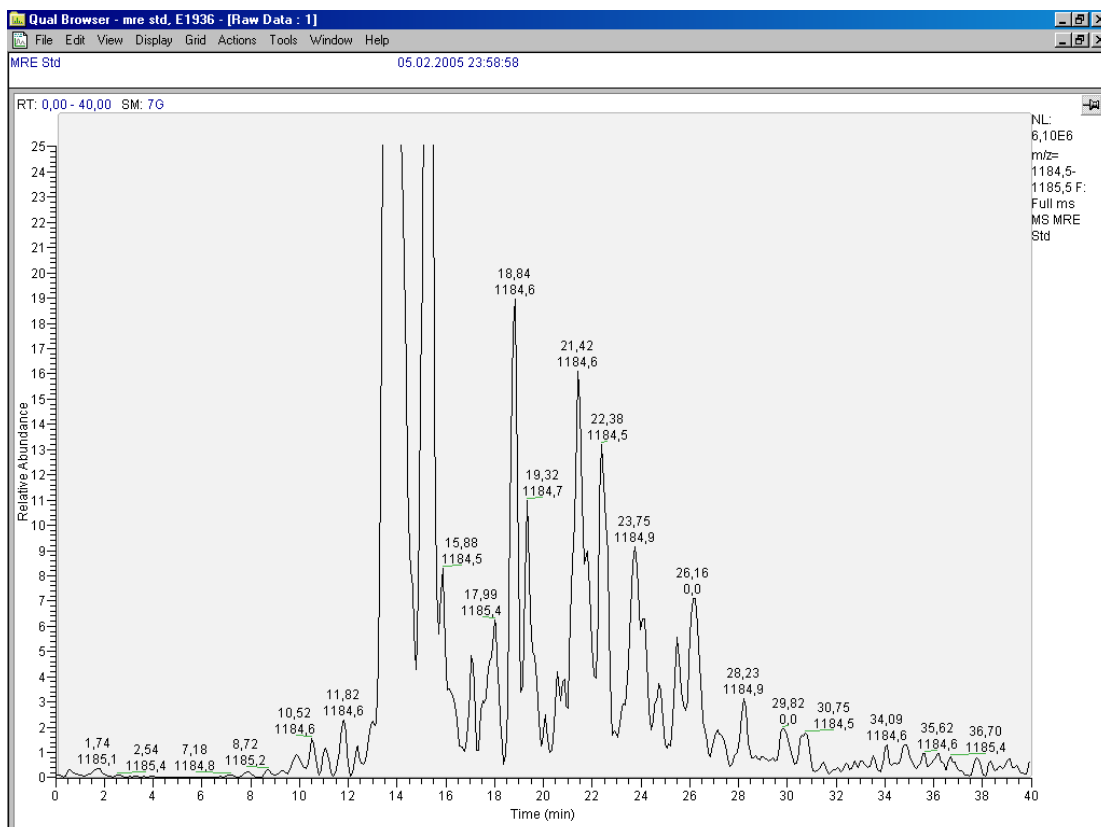


Abbildung A25: Massenspur für  $[M-H]^-$  1185 (vergrößerte Darstellung der MS-Intensität)

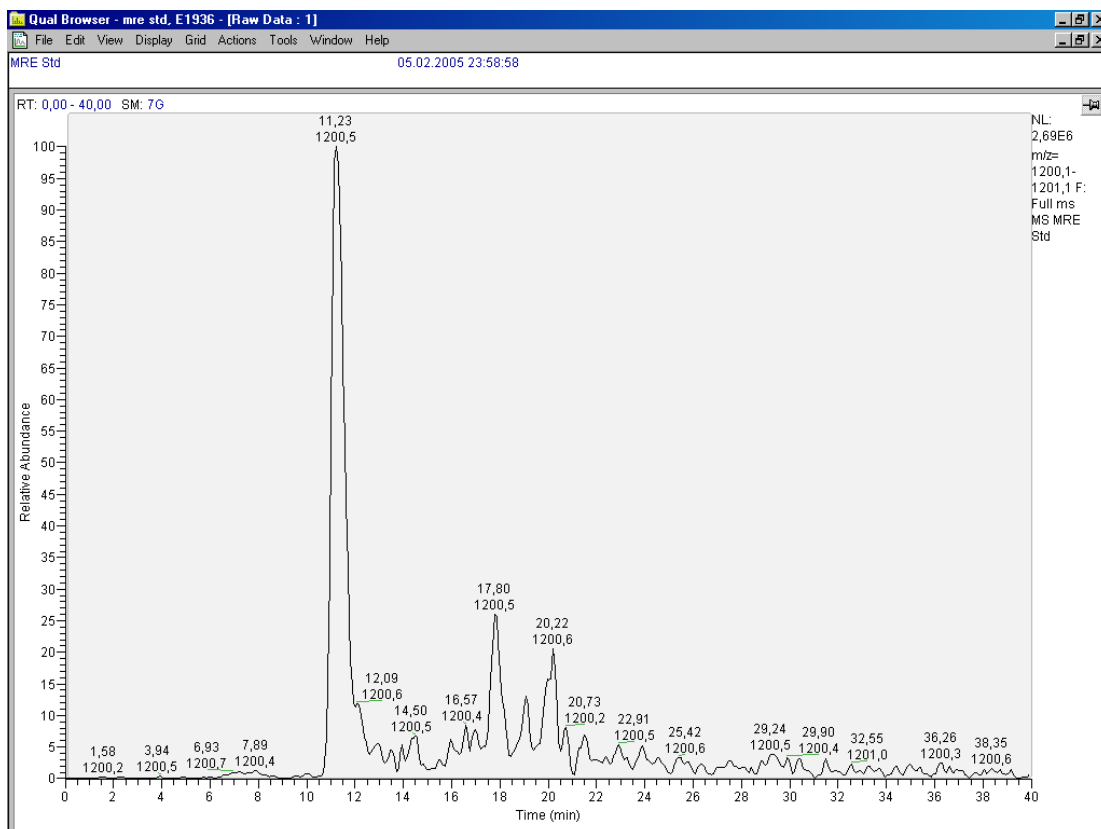


Abbildung A26: Massenspur für  $[M-H]^-$  1201

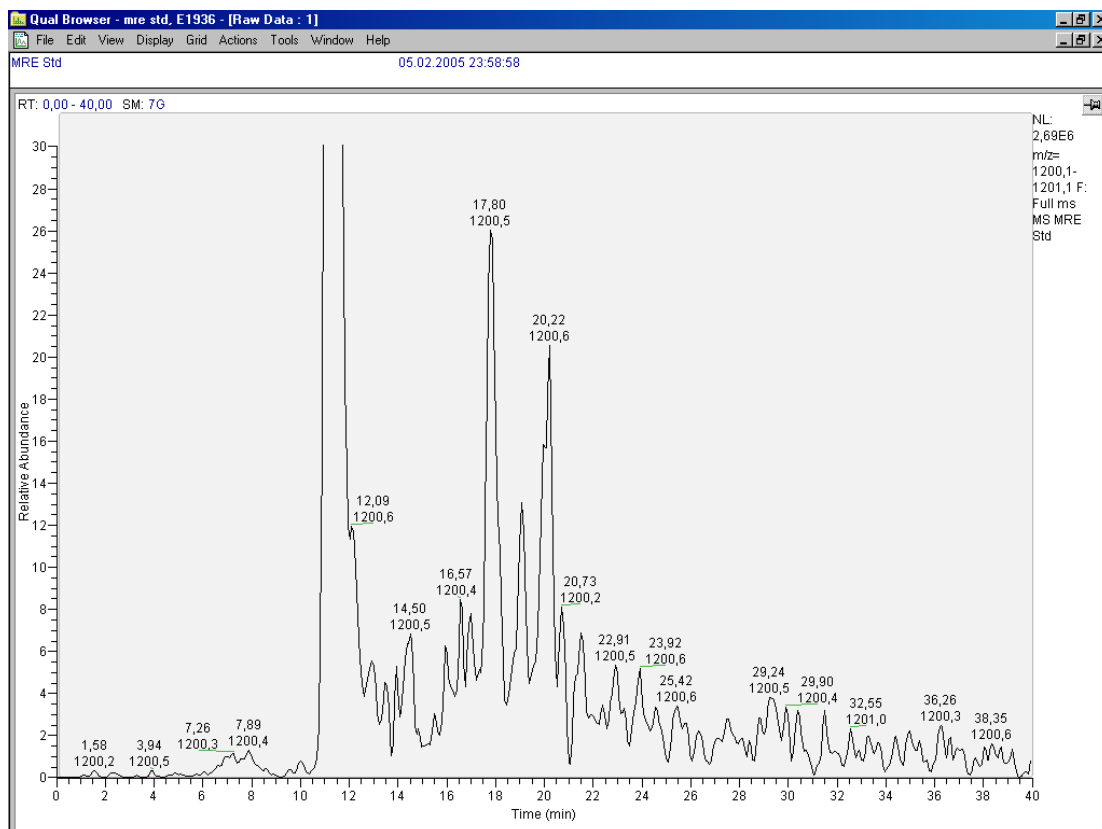


Abbildung A27: Massenspur für  $[M-H]^-$  1201 (vergrößerte Darstellung der MS-Intensität)

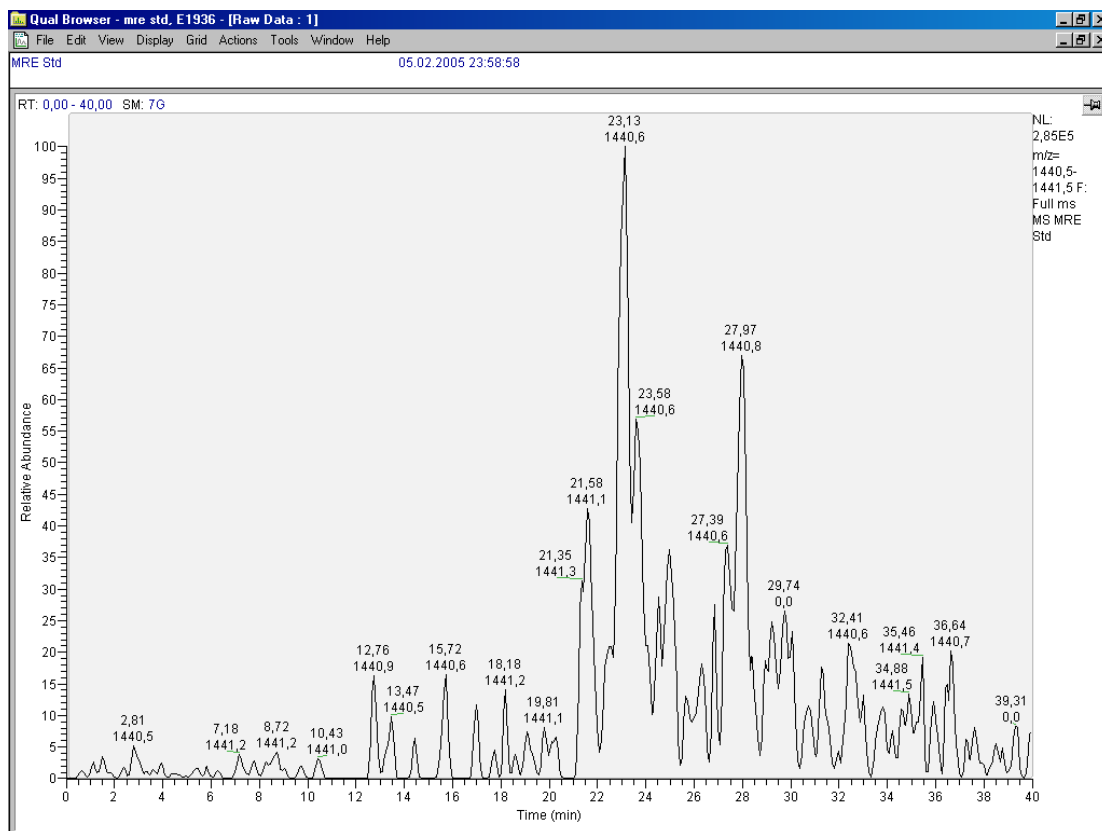


Abbildung A28: Massenspur für  $[M-H]^-$  1441 (z.B. Pentamer mit 5 (epi)Catechineinheiten)

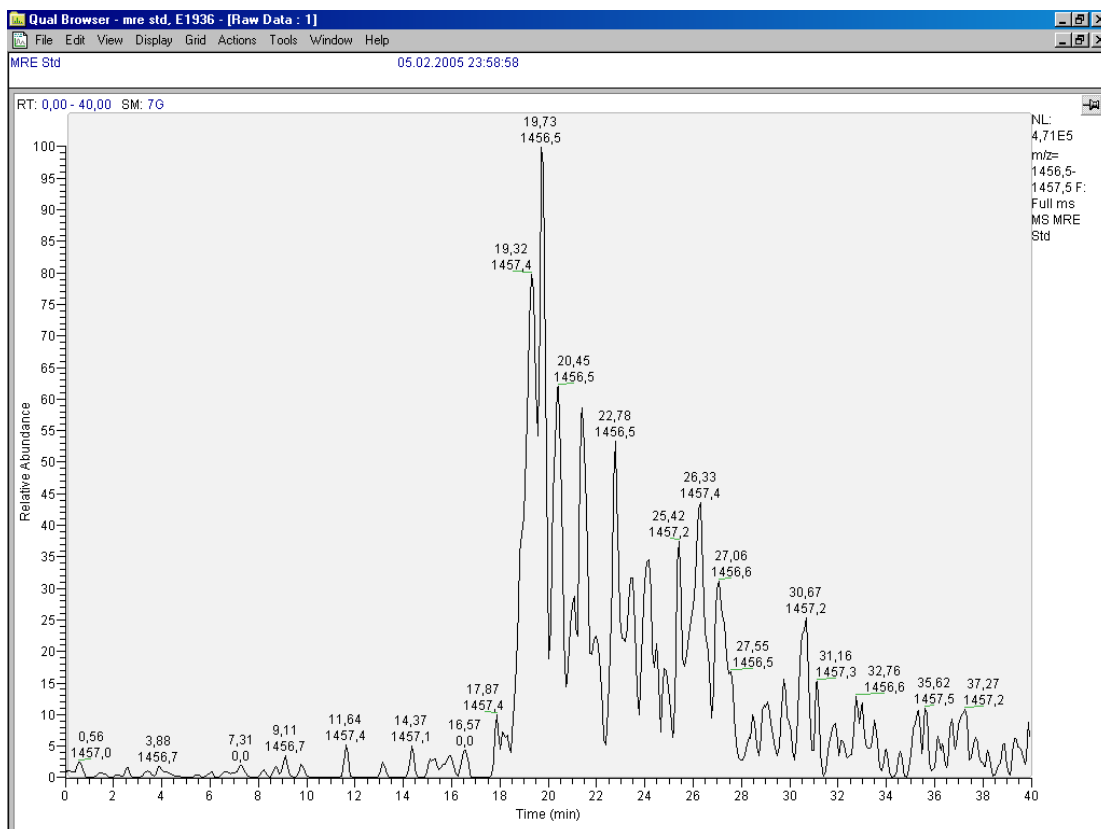


Abbildung A29: Massenspur für [M-H] 1457

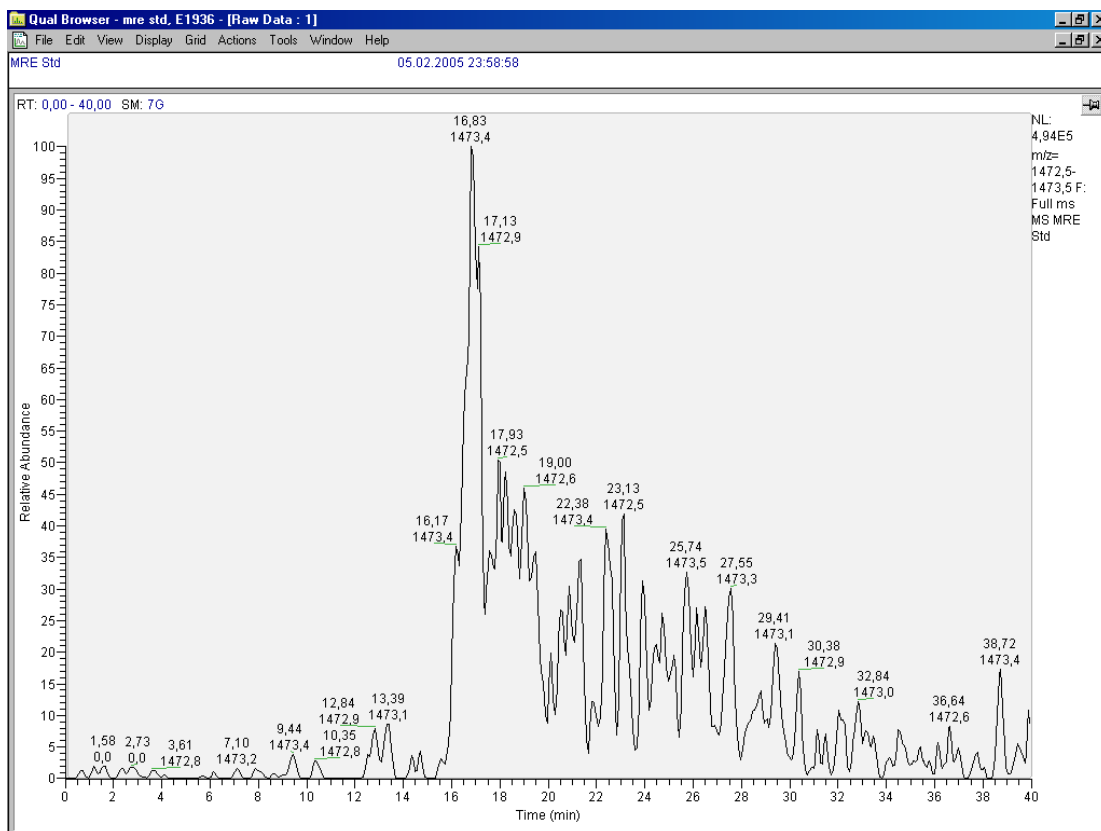


Abbildung A30: Massenspur für [M-H] 1473

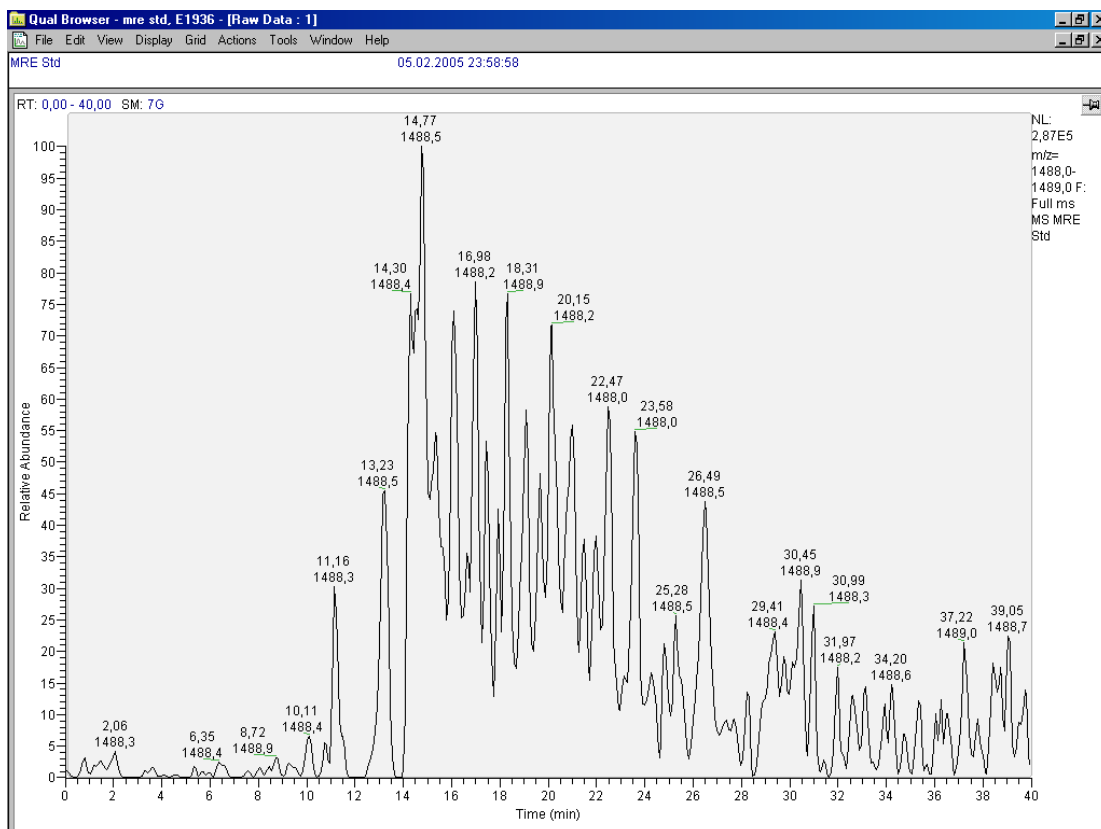


Abbildung A31: Massenspur für [M-H]<sup>-</sup> 1489

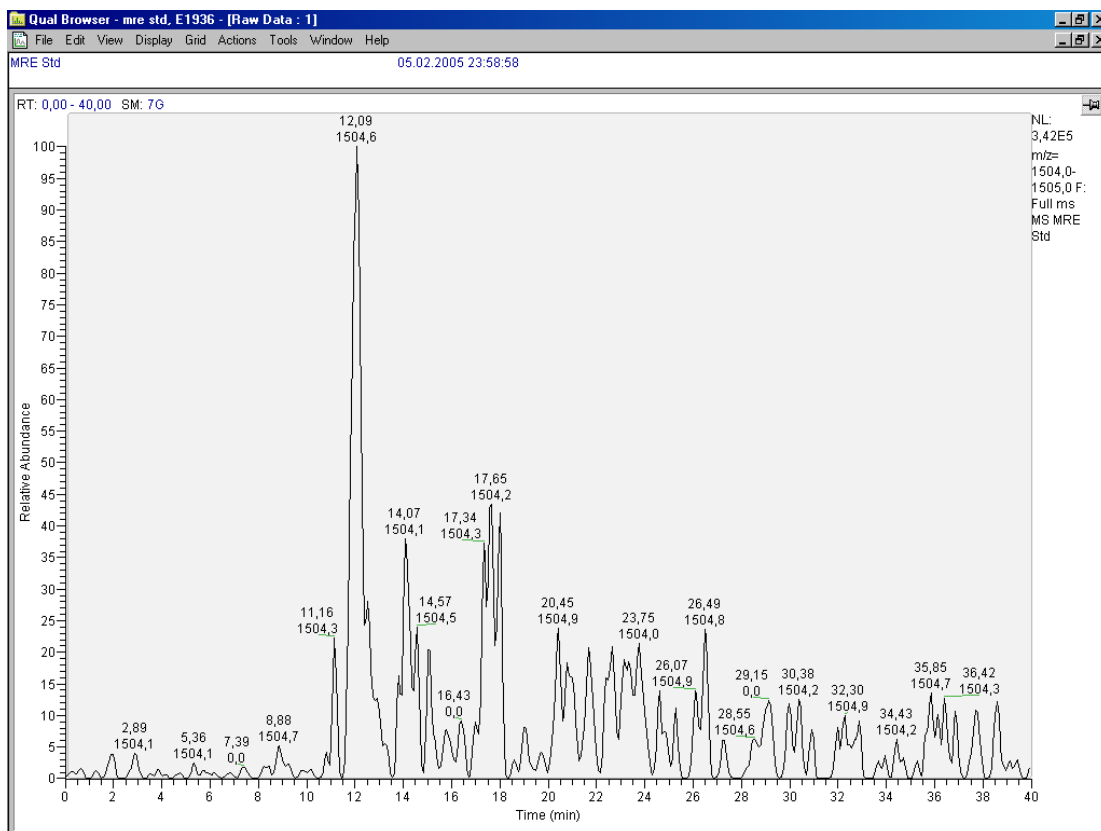


Abbildung A32: Massenspur für [M-H]<sup>-</sup> 1505

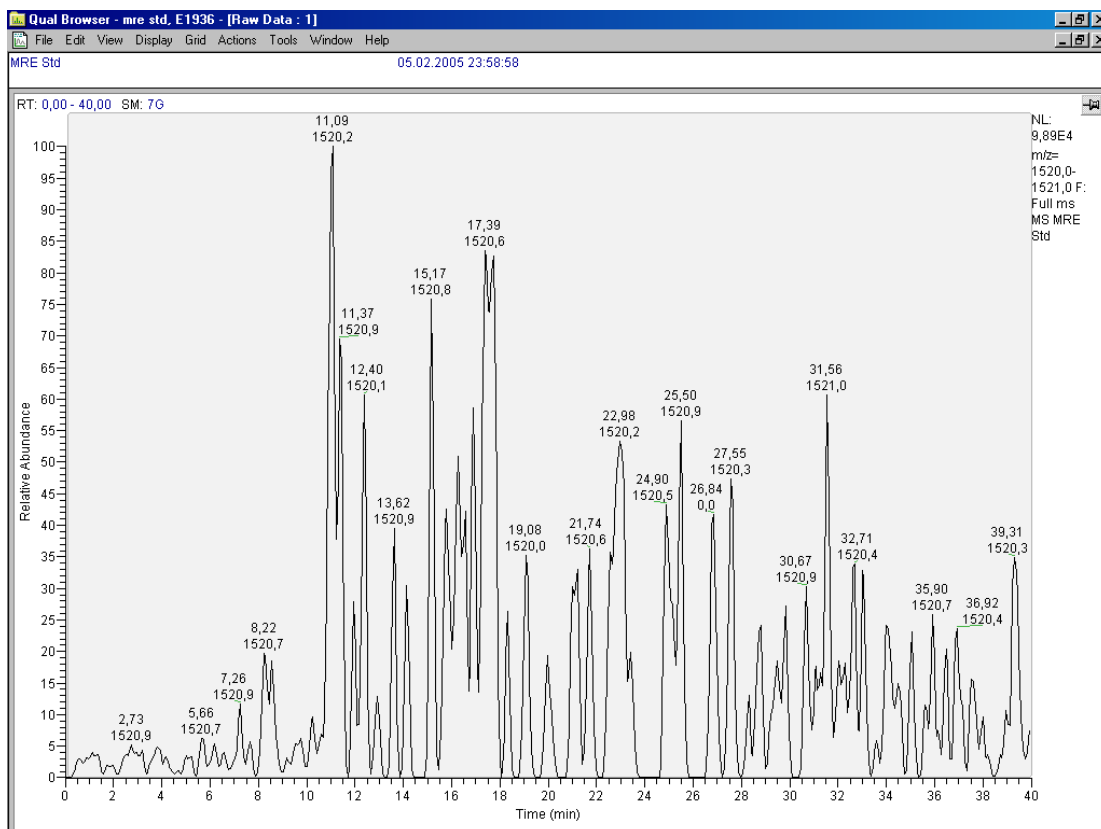


Abbildung A33: Massenspur für  $[M-H]^-$  1521 (Pentamer mit 5 (epi)Galocatechineinheiten)

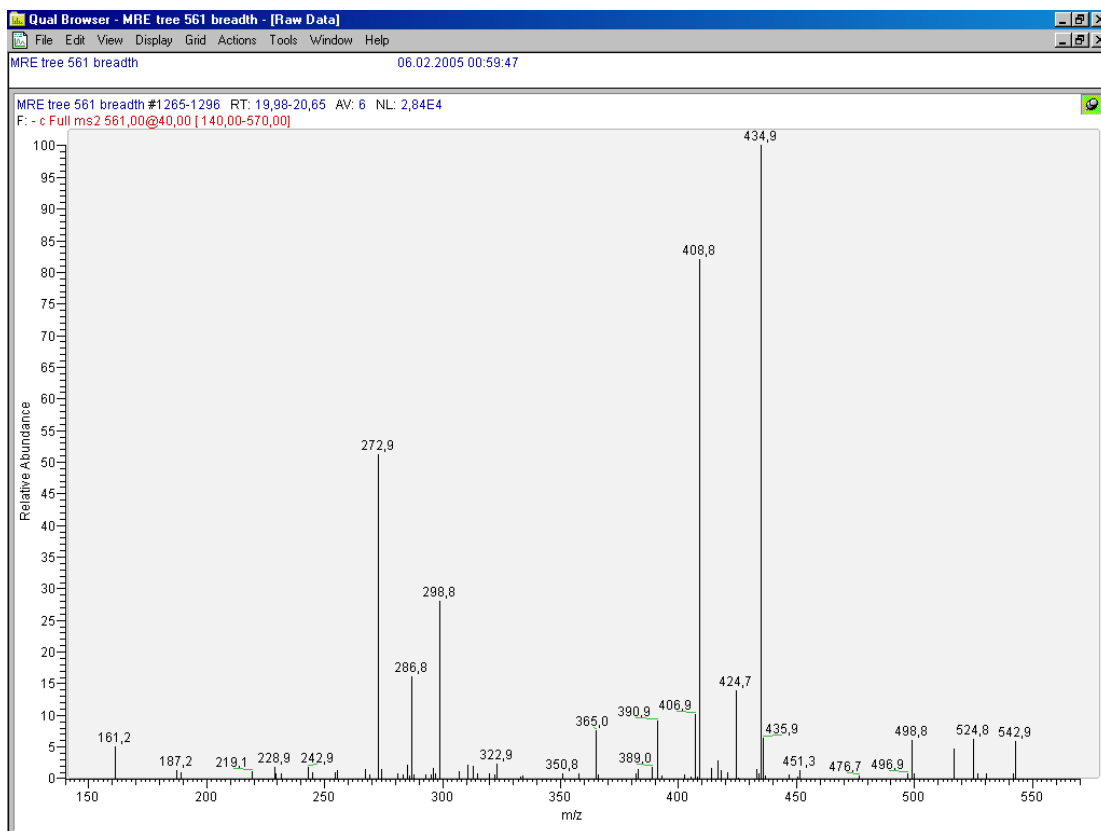


Abbildung A34:  $MS^2$ -Spektrum von m/z 561 bei 20,5 min

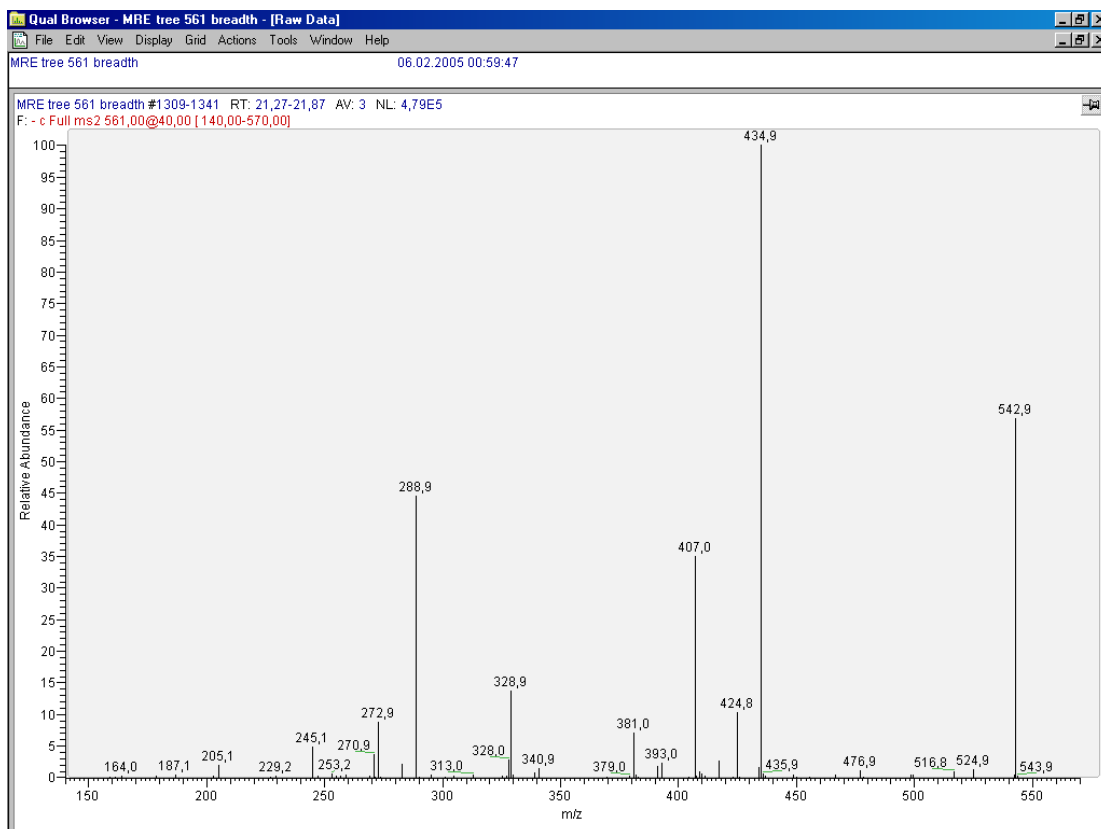


Abbildung A35: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 561 bei 21,4 min

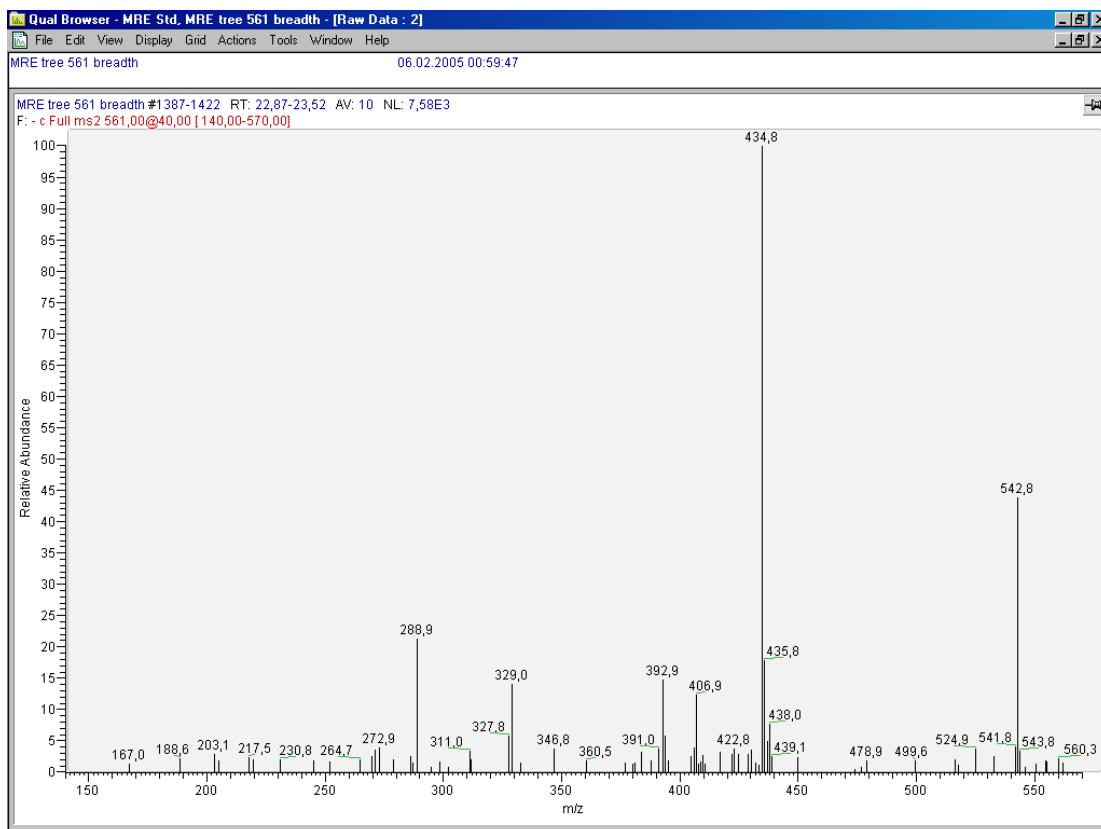


Abbildung A36: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 561 bei 23,2 min

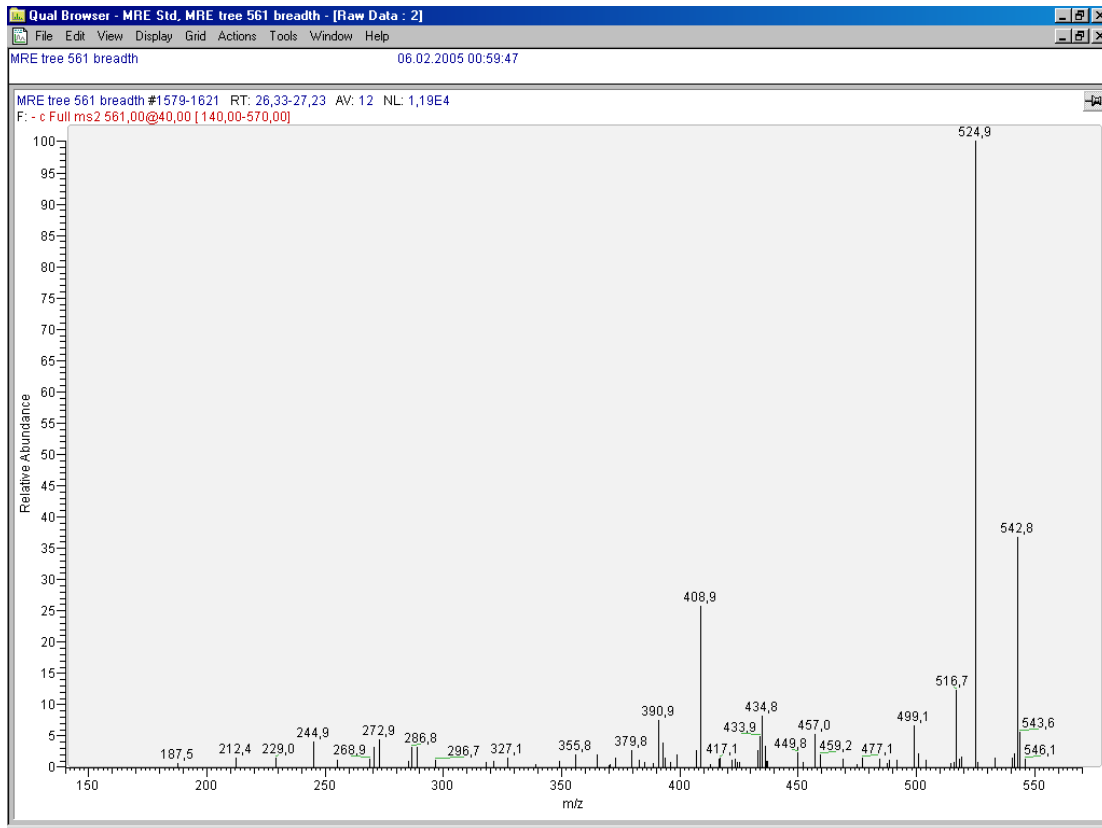


Abbildung A37: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 561 bei 26,6 min

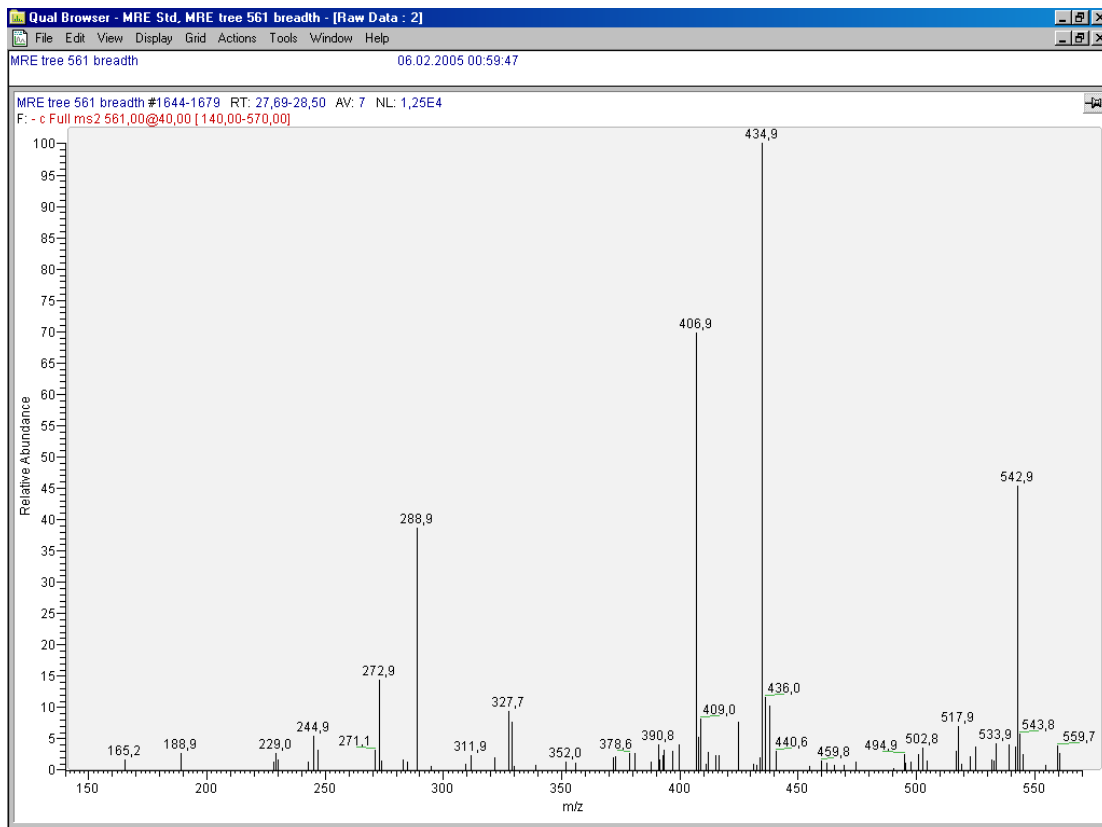


Abbildung A38: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 561 bei 28,1 min



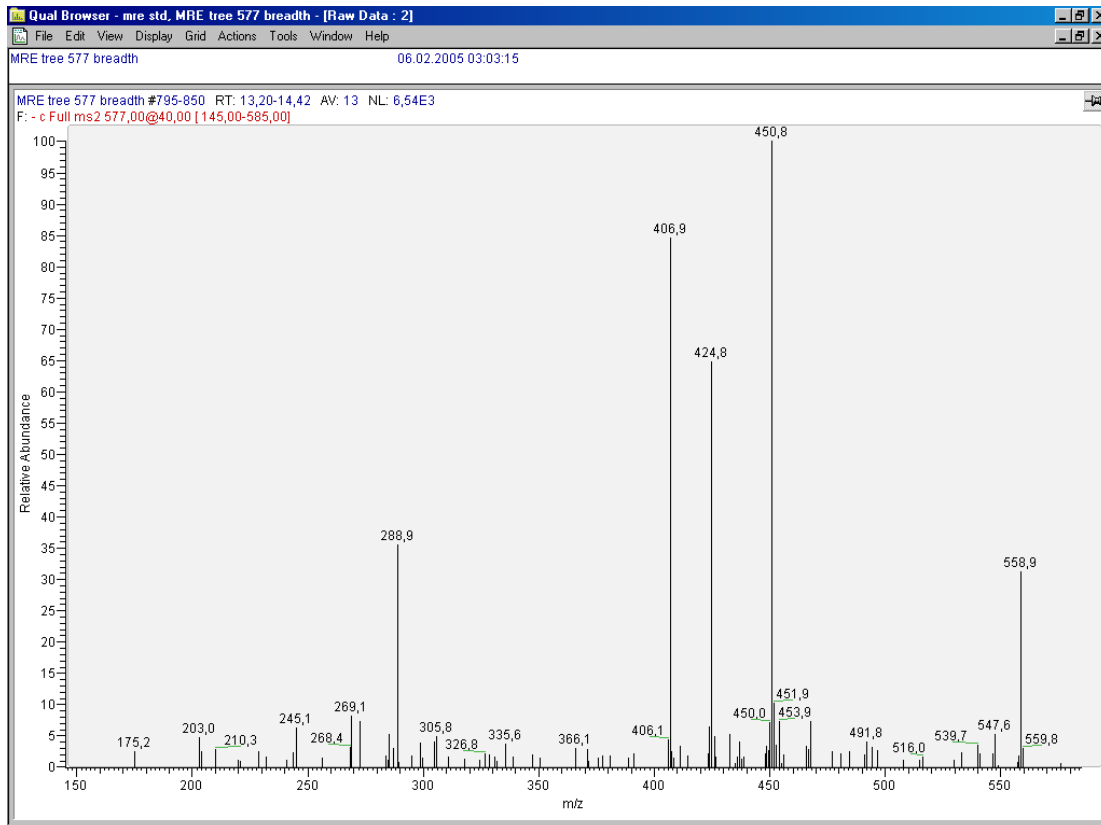


Abbildung A39: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 577 bei 14,1 min

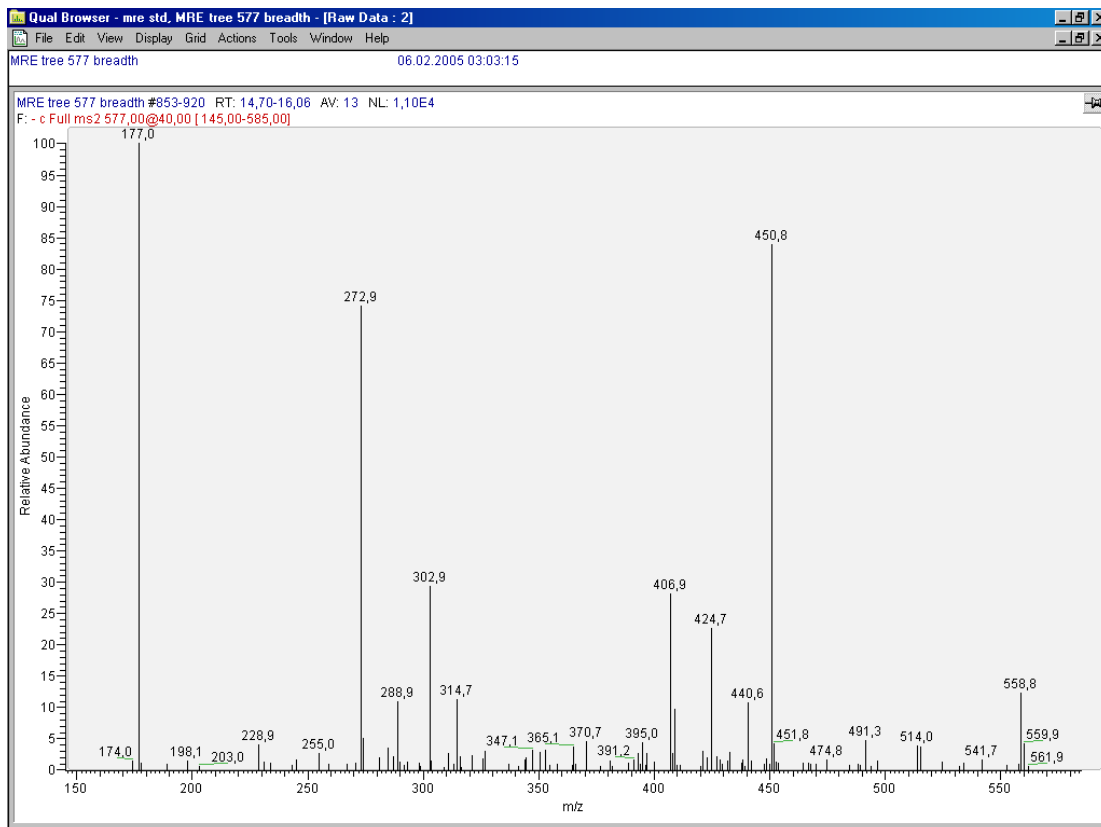


Abbildung A40: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 577 bei 15,1 min

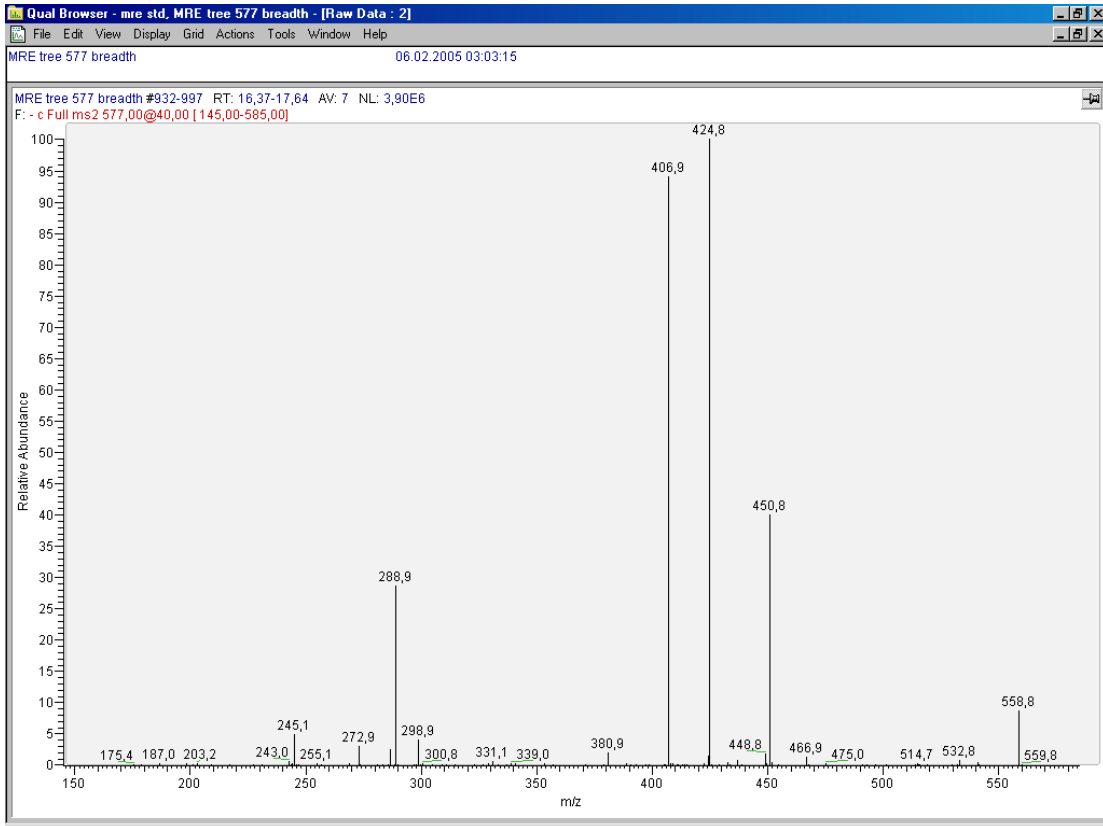


Abbildung A41: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 577 bei 17,1 min

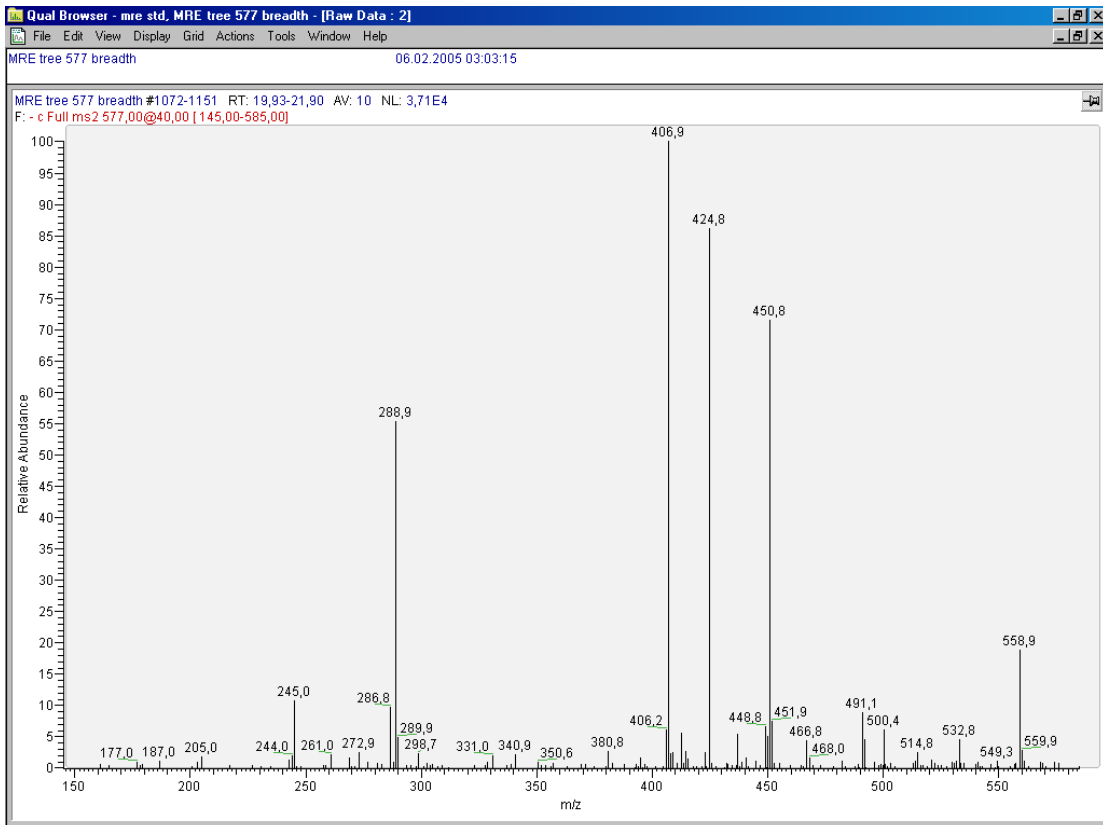


Abbildung A42: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 577 bei 19,3 min

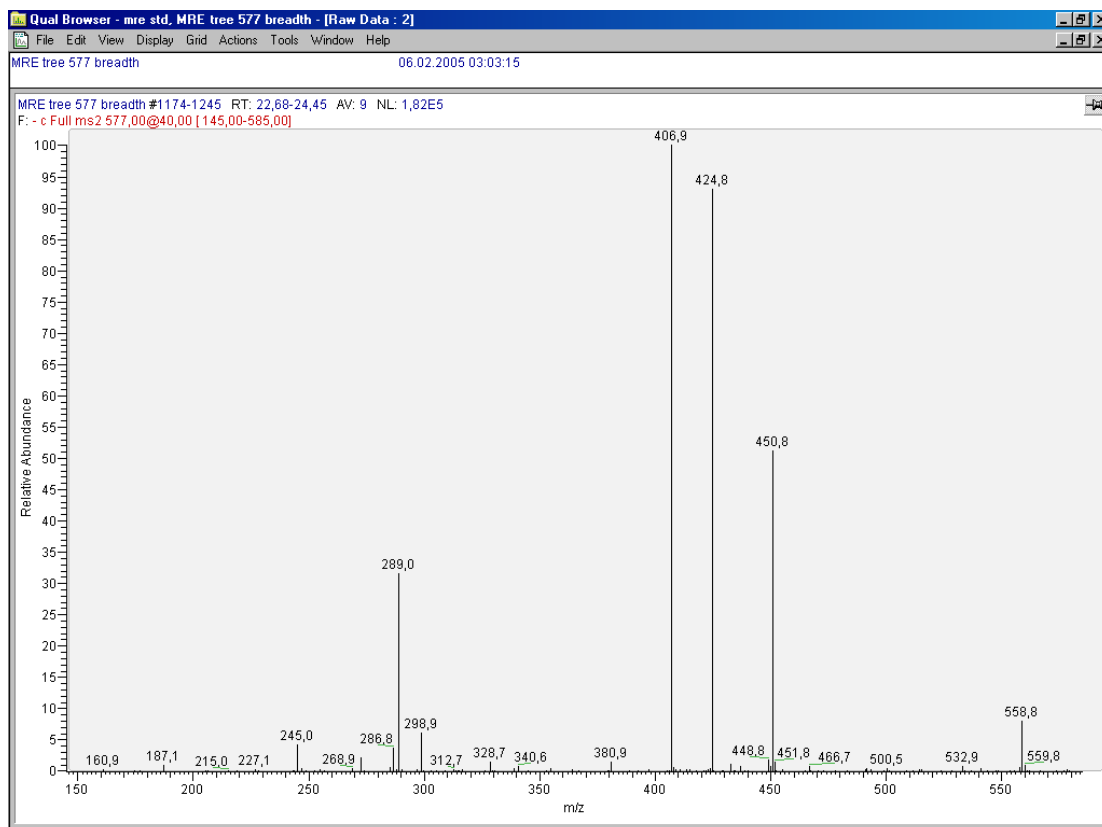


Abbildung A43: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 577 bei 23,4 min

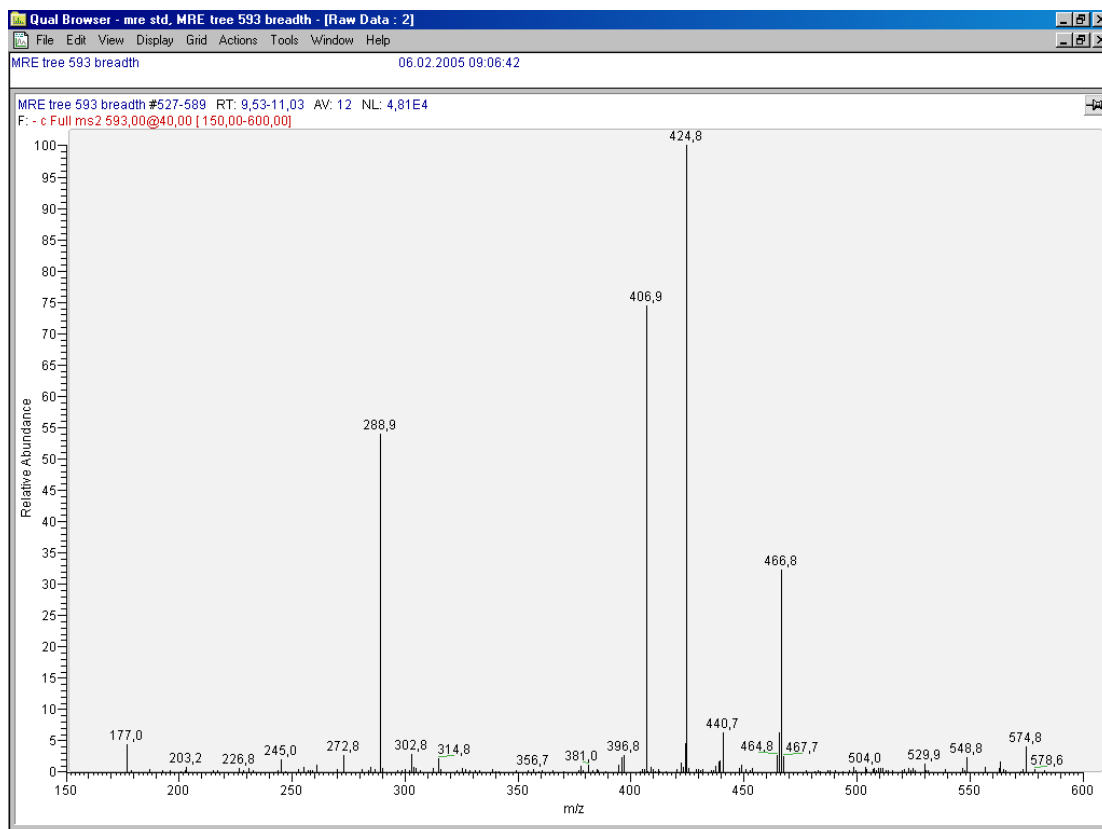


Abbildung A44: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 593 bei 10,4 min

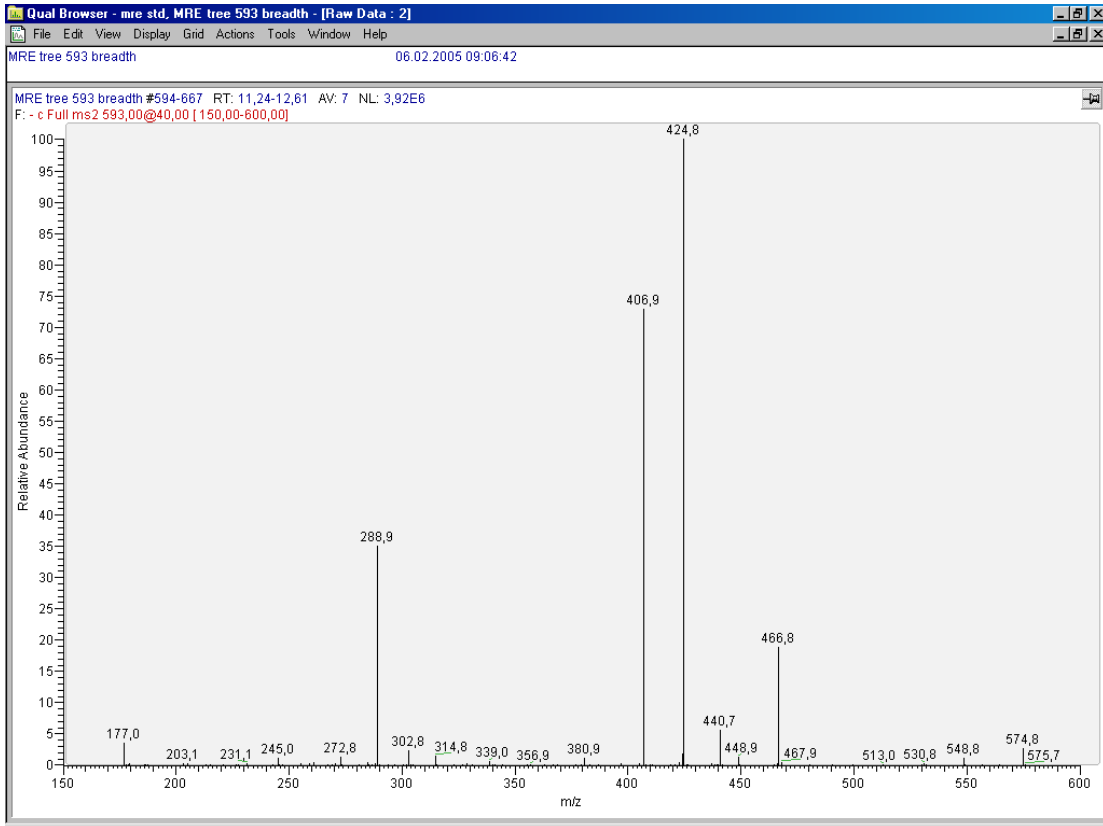


Abbildung A45: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 593 bei 12,1 min

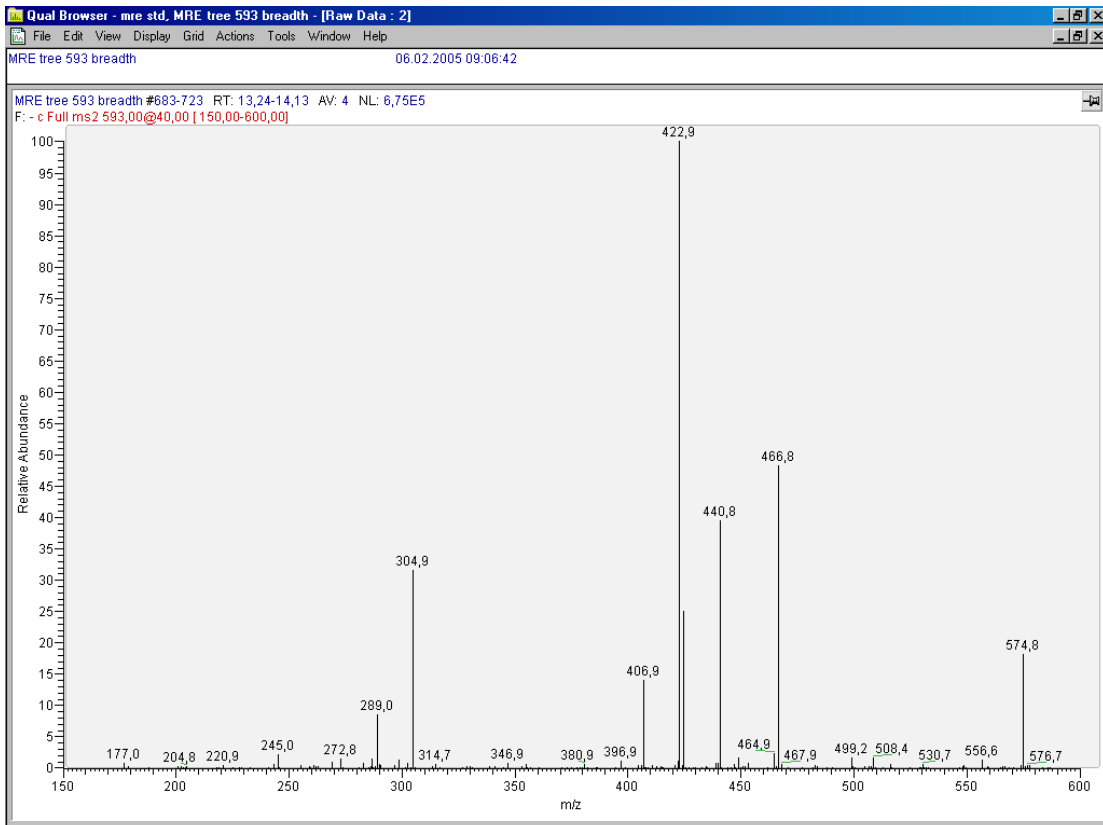


Abbildung A46: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 593 bei 13,4 min

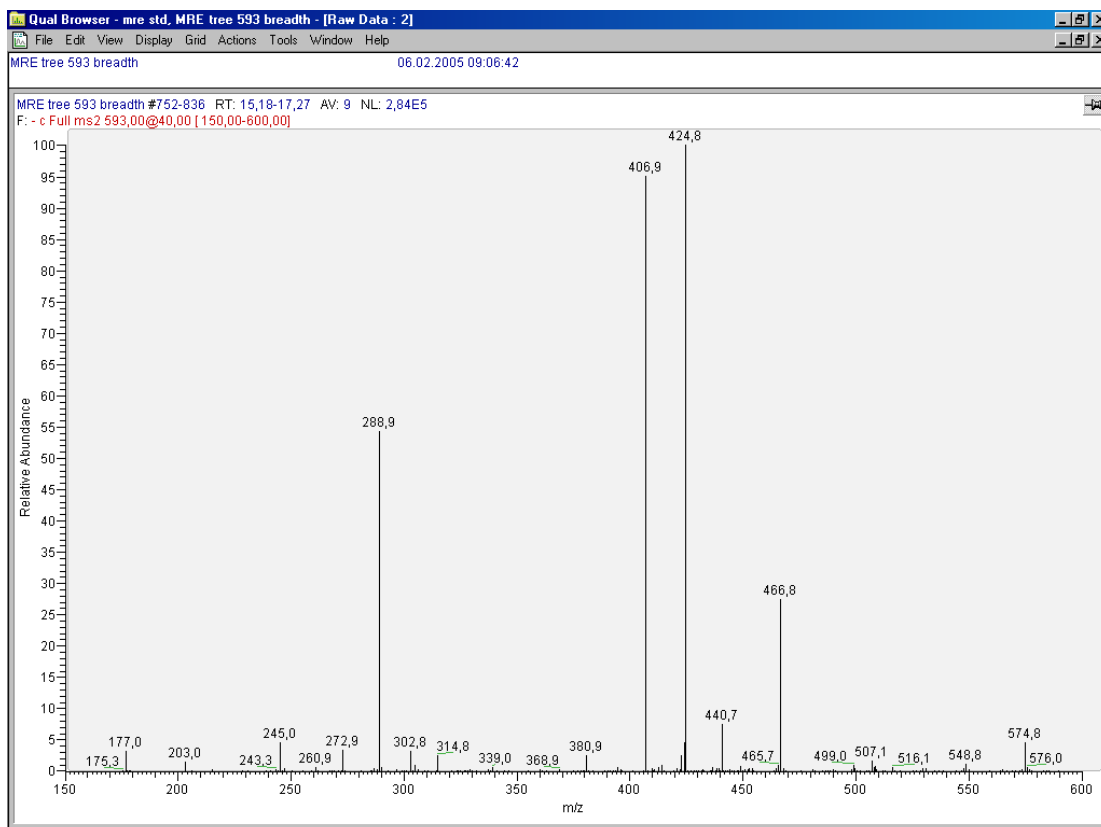


Abbildung A47: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 593 bei 16,1 min

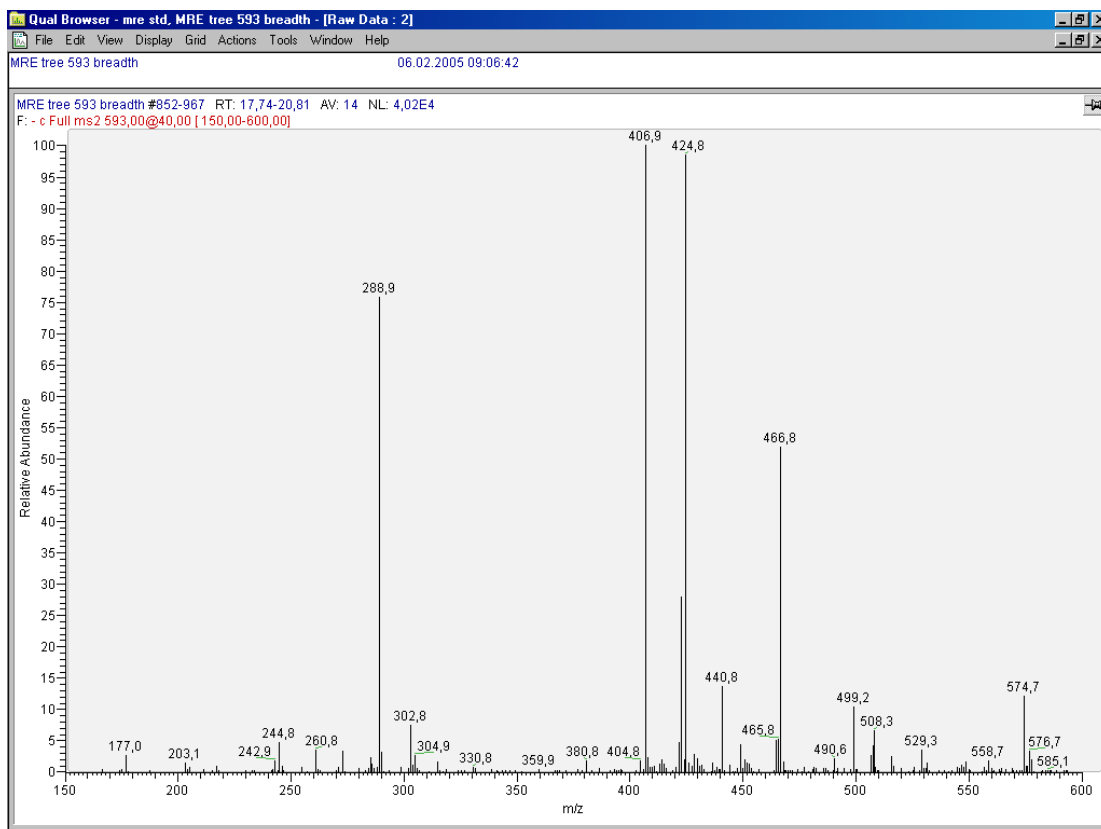


Abbildung A48: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 593 bei 18,9 min

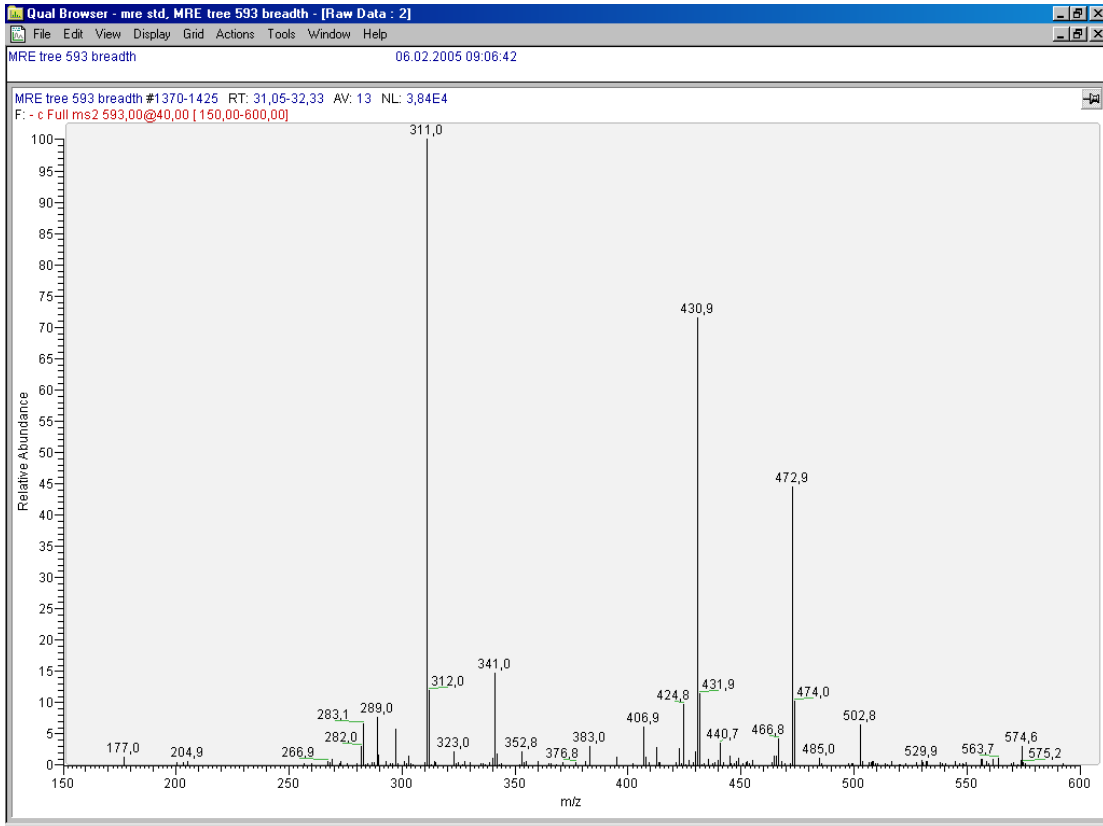


Abbildung A49: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 593 bei 31,6 min

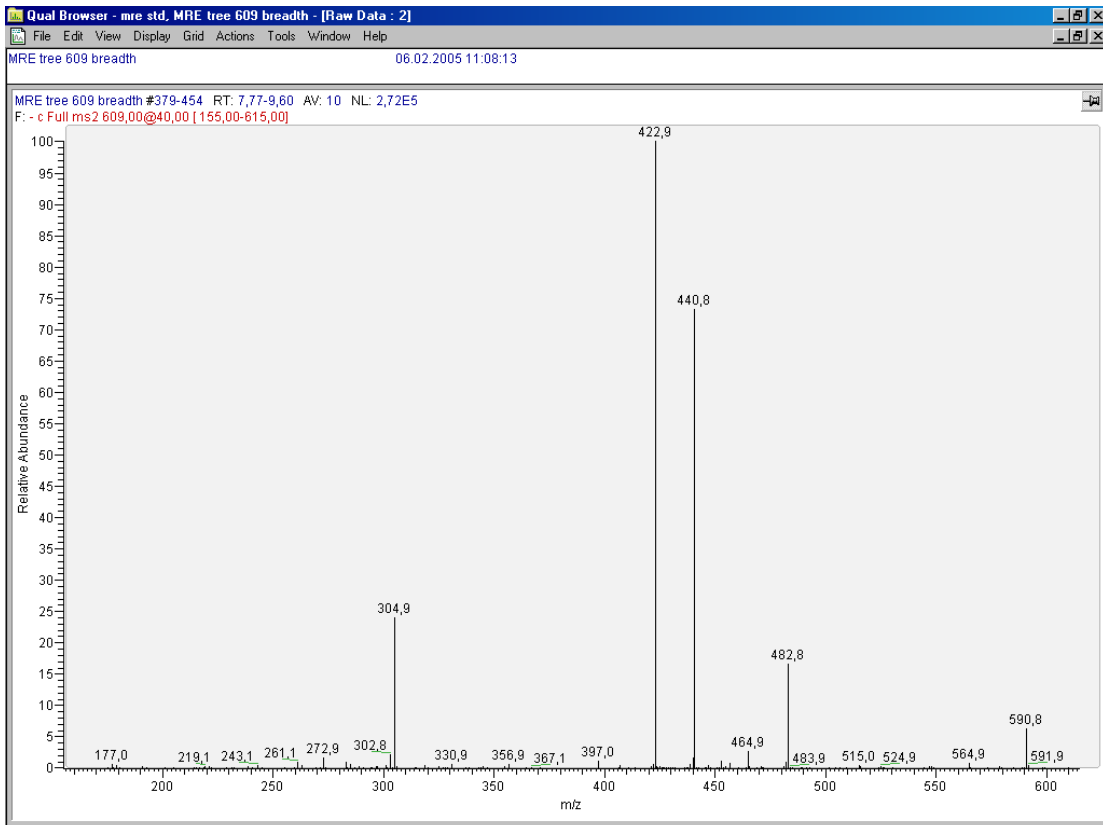


Abbildung A50: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 609 bei 8,6 min

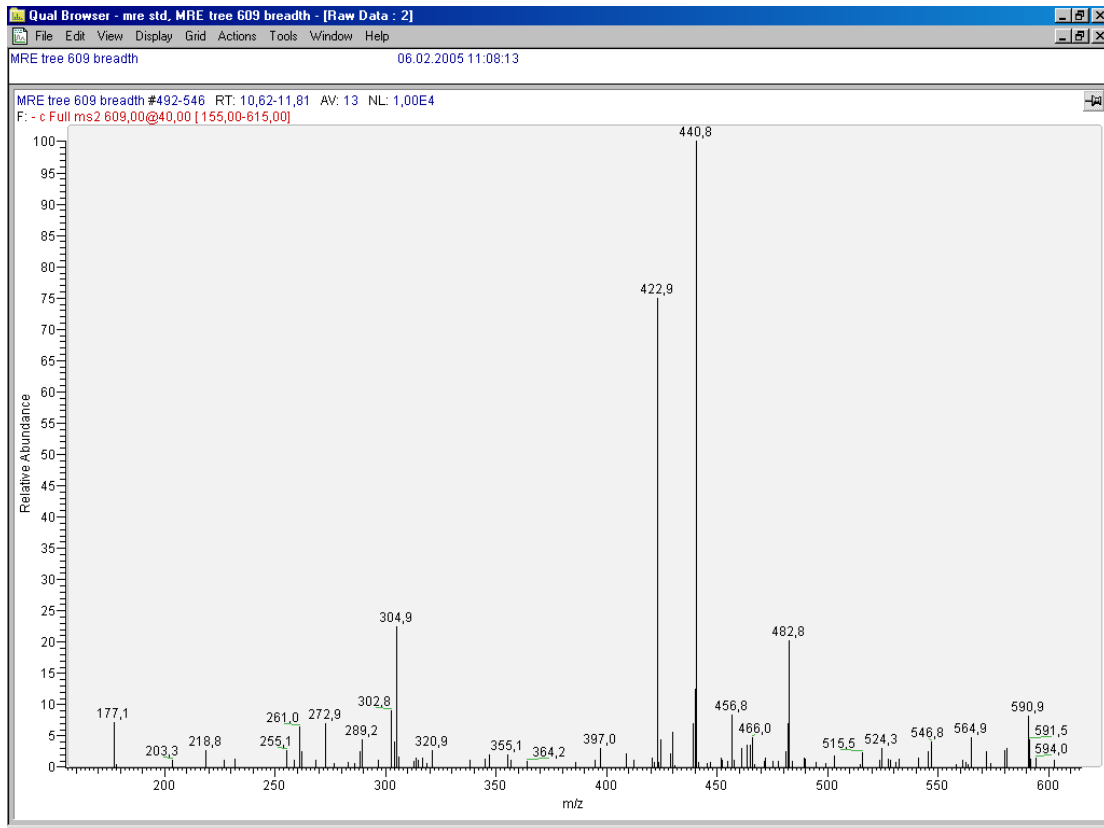


Abbildung A51: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 609 bei 11,2 min

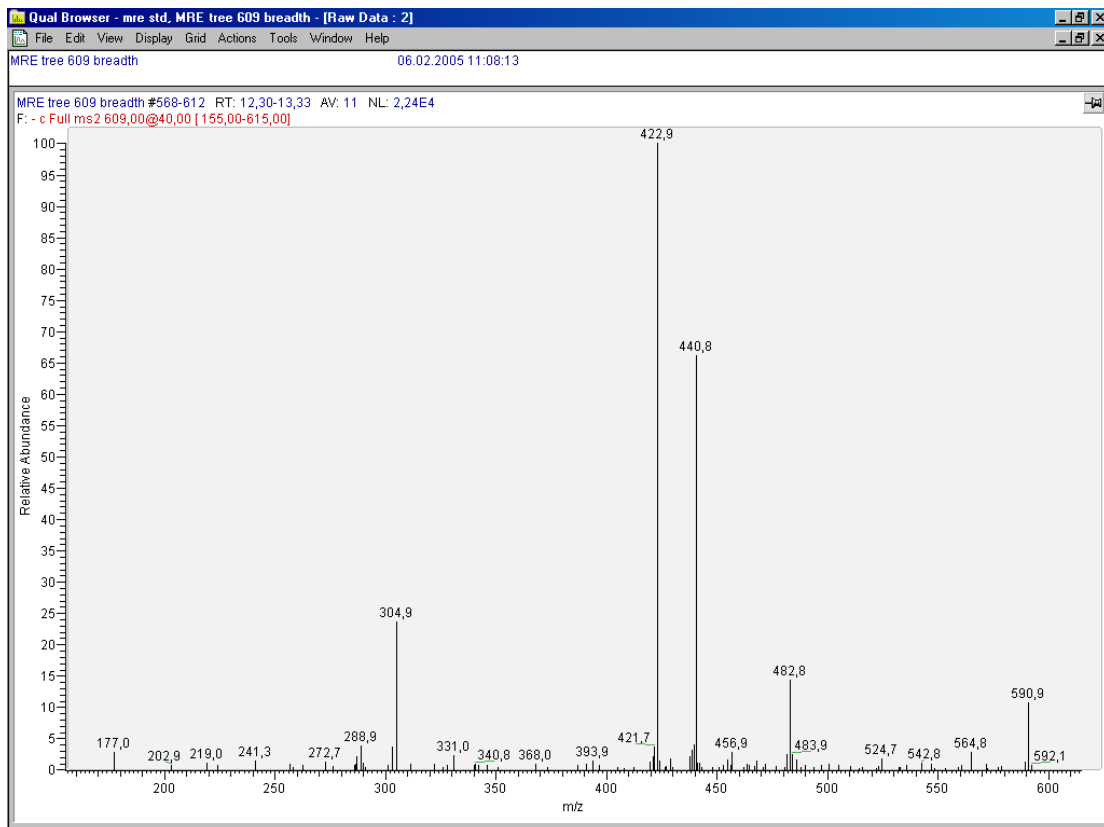


Abbildung A52: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 609 bei 12,4 min

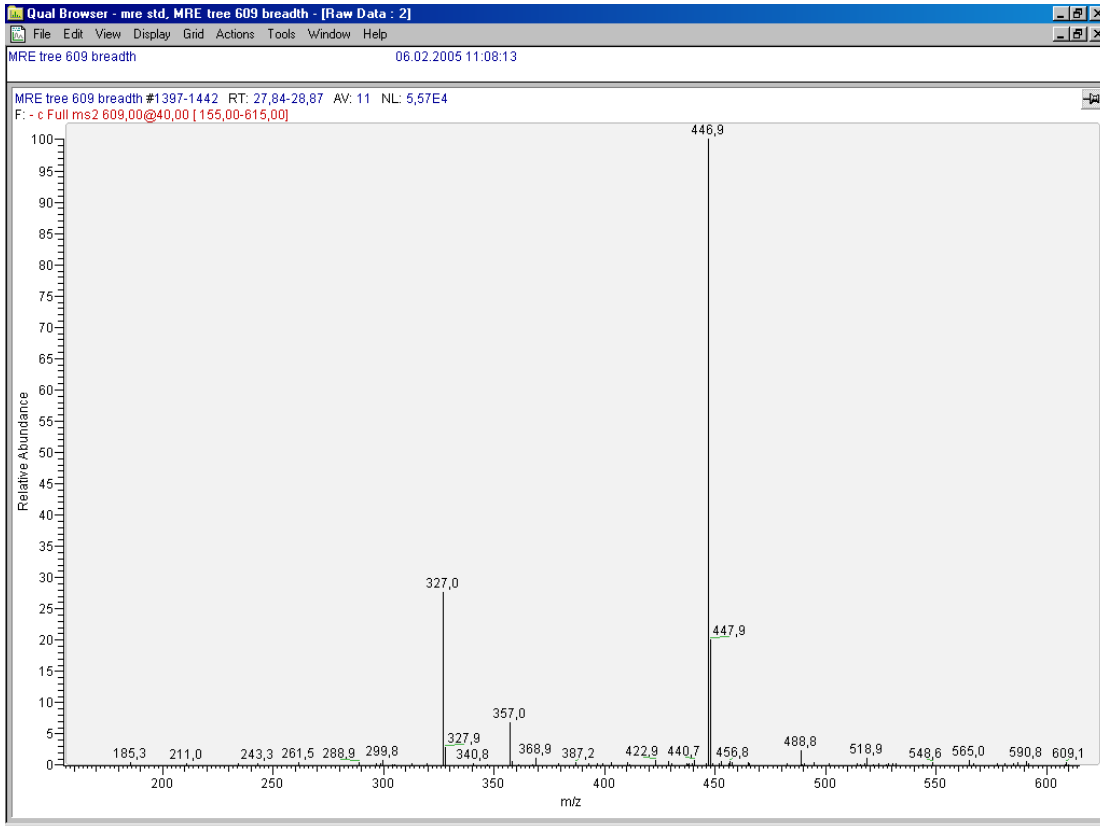


Abbildung A53: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 609 bei 28,5 min

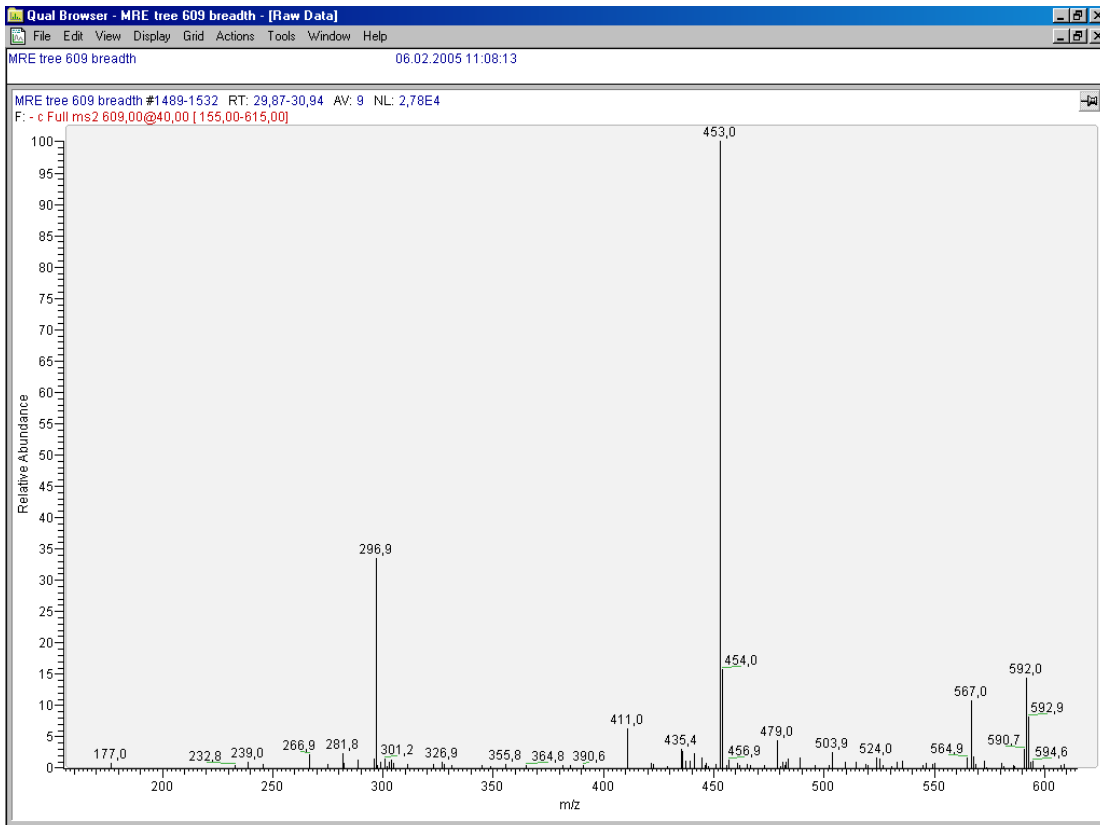


Abbildung A54: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 609 bei 30,6 min



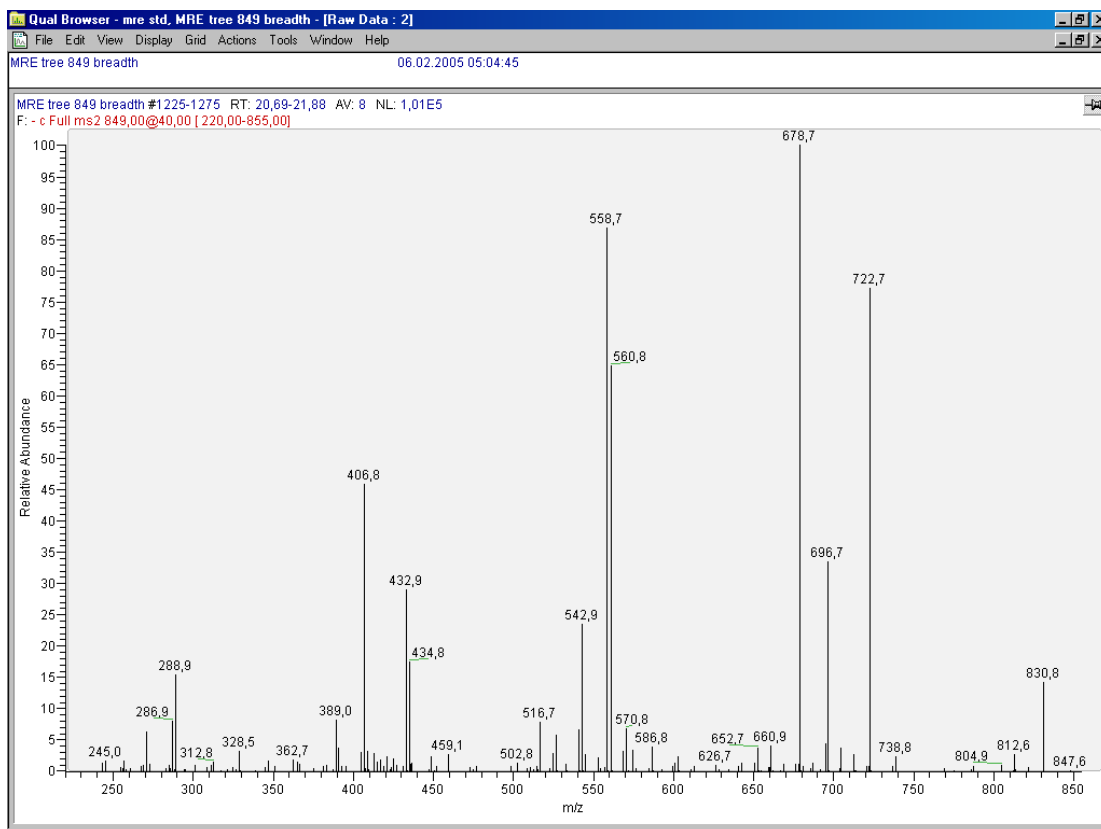


Abbildung A55: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 849 bei 21,1 min

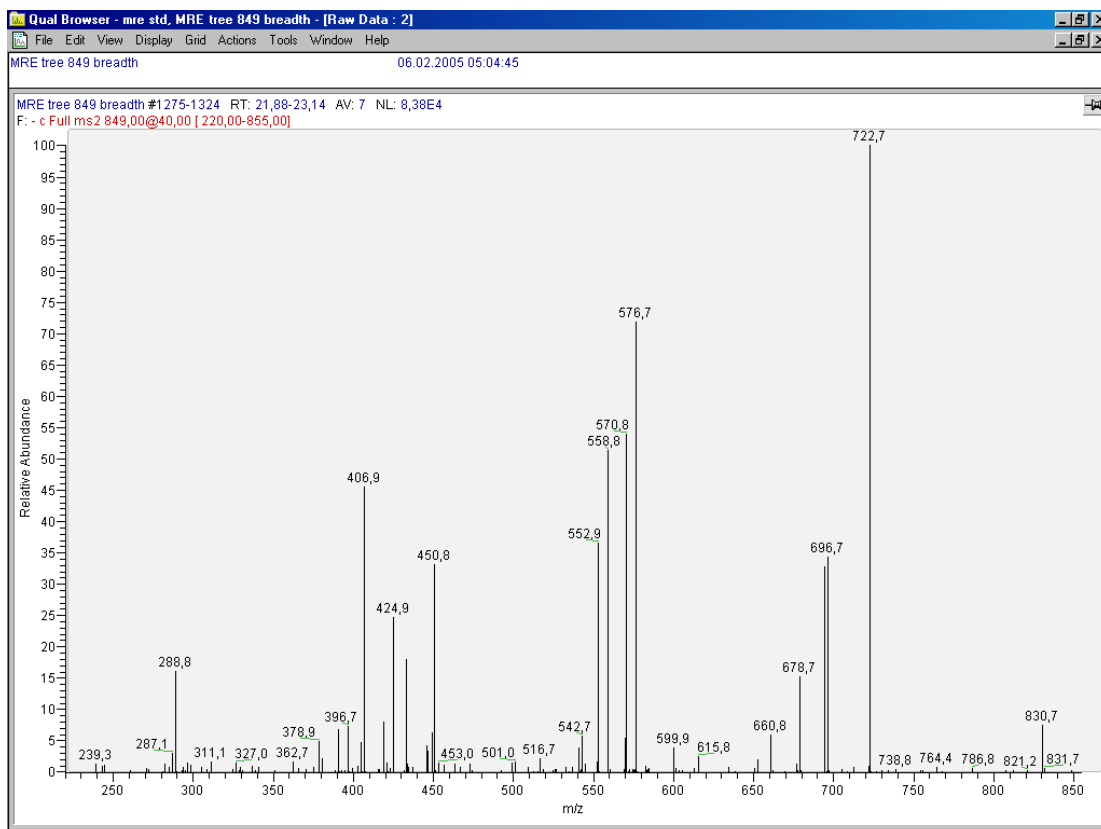


Abbildung A56: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 849 bei 22,4 min

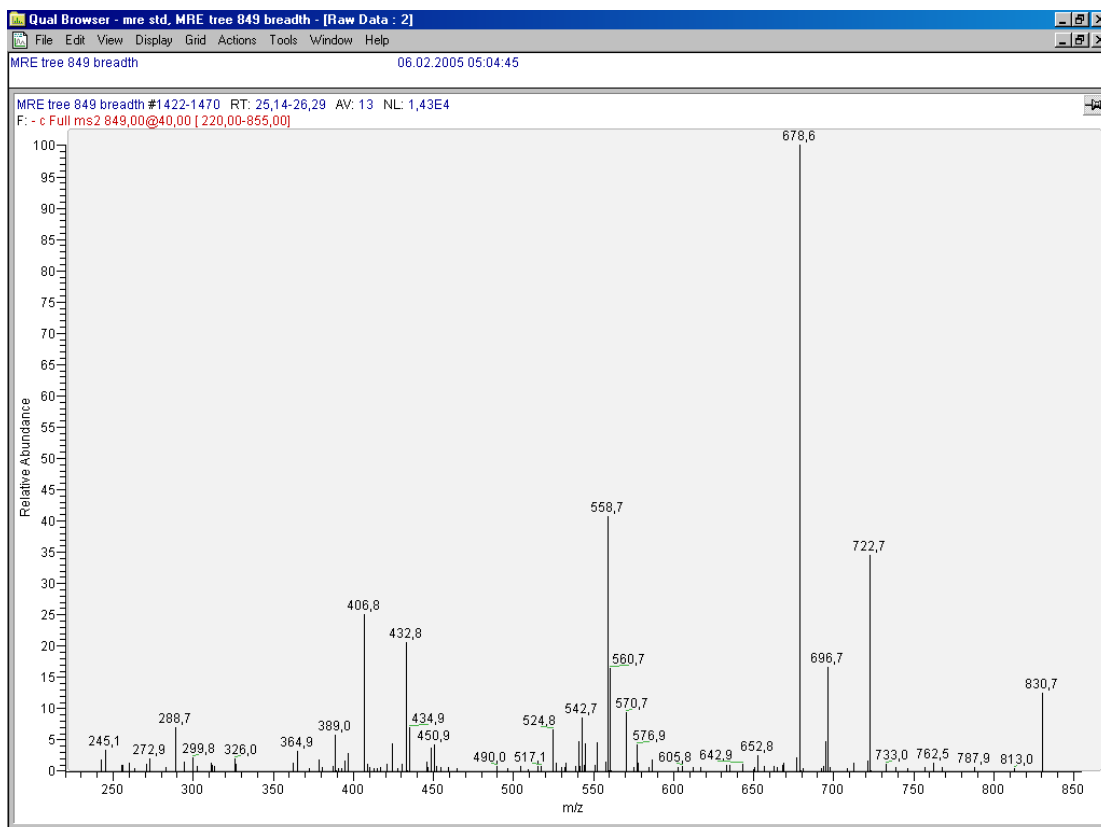


Abbildung A57: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 849 bei 25,7 min

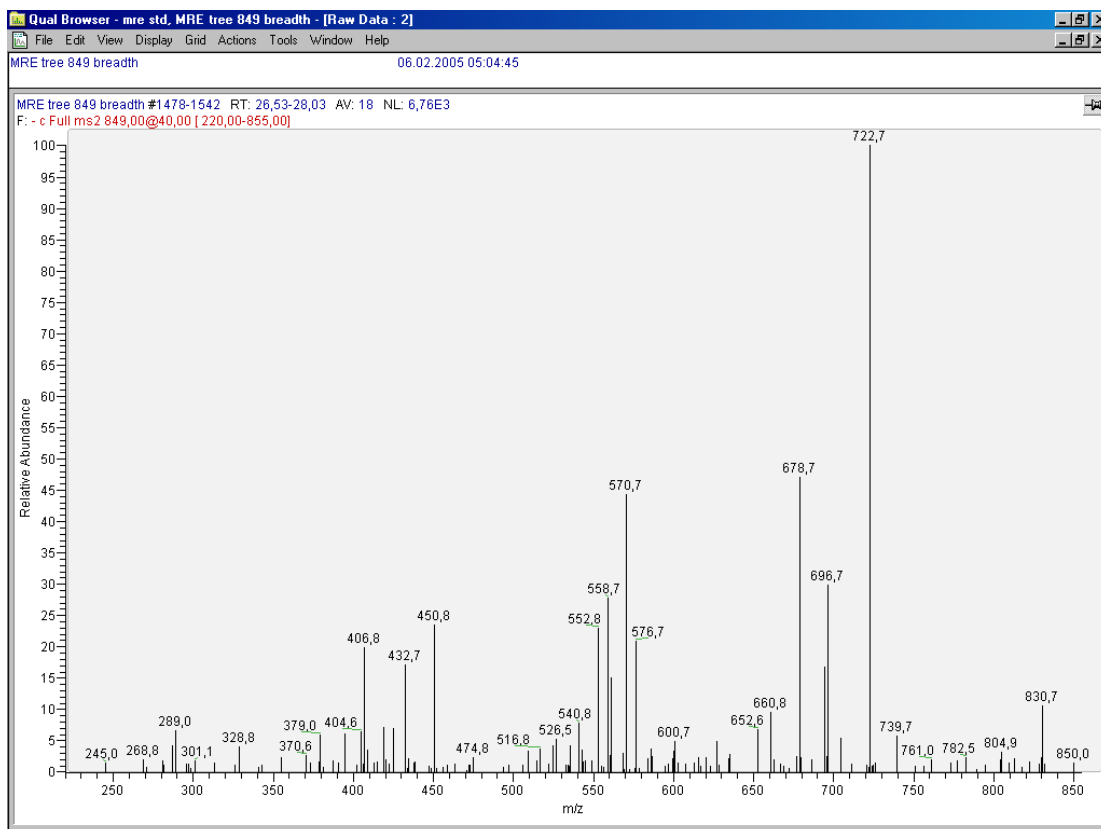


Abbildung A58: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 849 bei 27,1 min

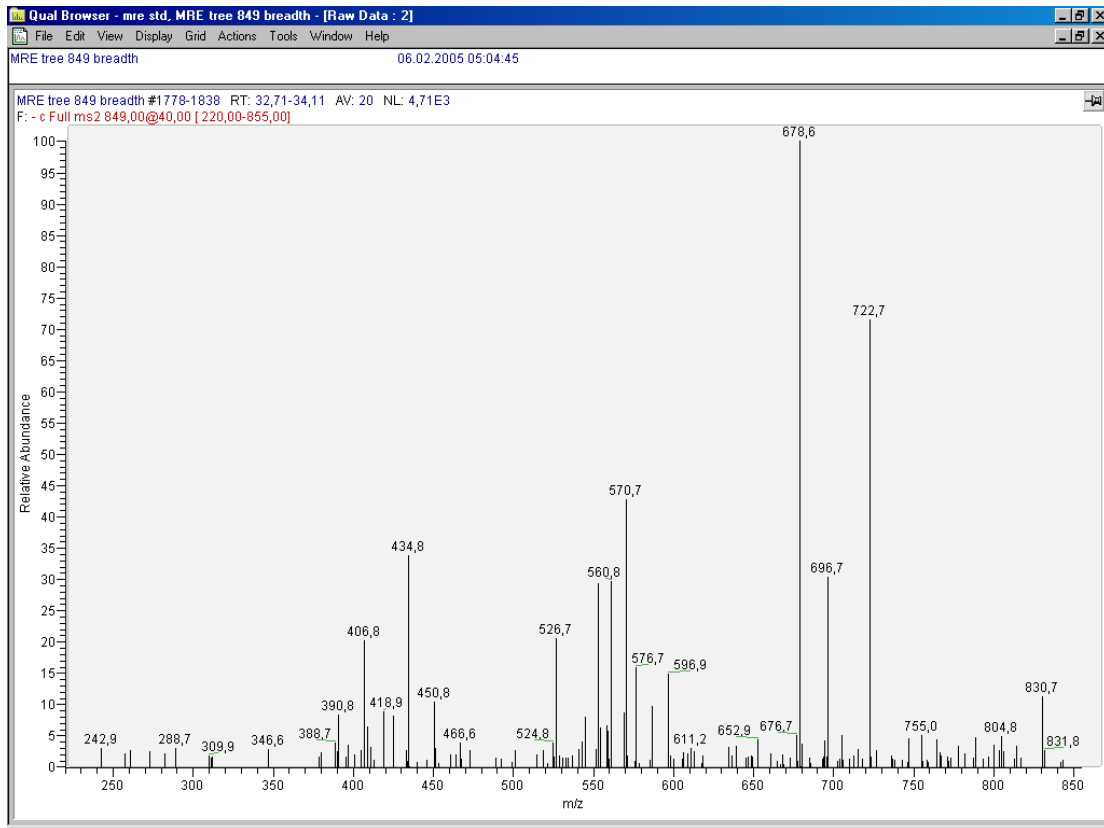


Abbildung A59: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 849 bei 33,7 min

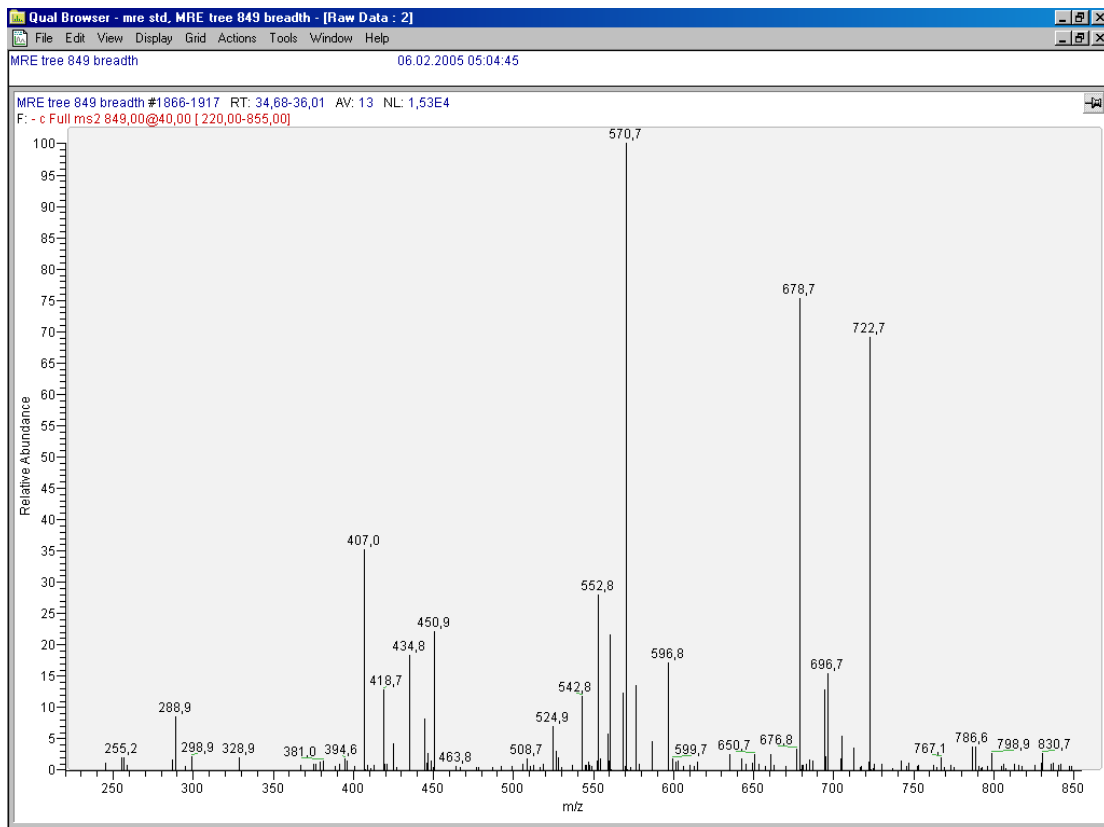


Abbildung A60: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 849 bei 35,3 min

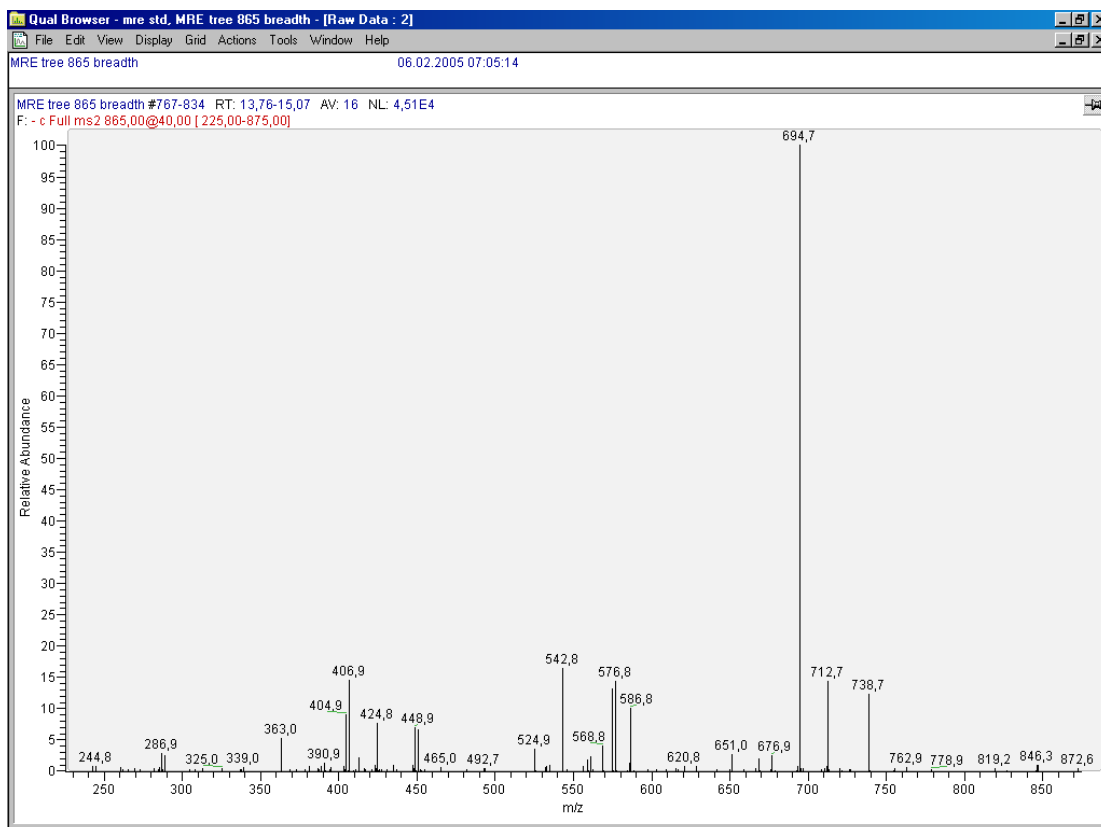


Abbildung A61: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 865 bei 14,4 min

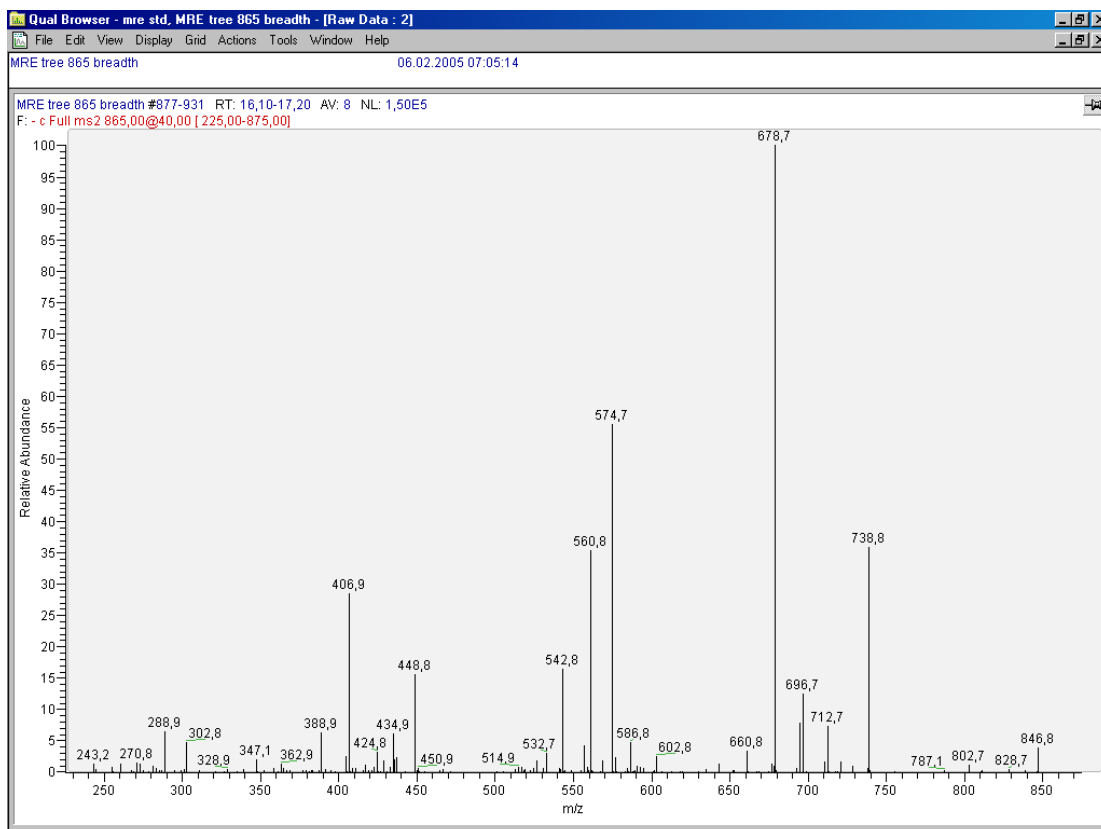


Abbildung A62: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 865 bei 16,6 min

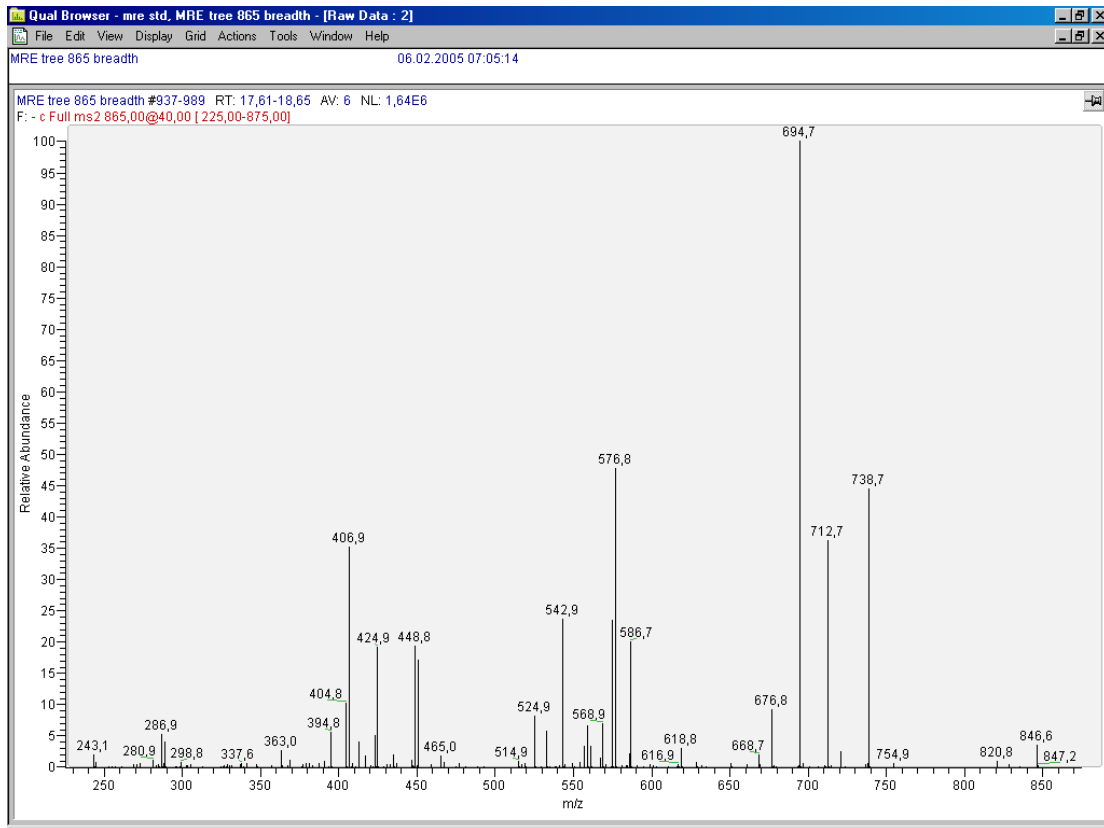


Abbildung A63: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 865 bei 18,1 min

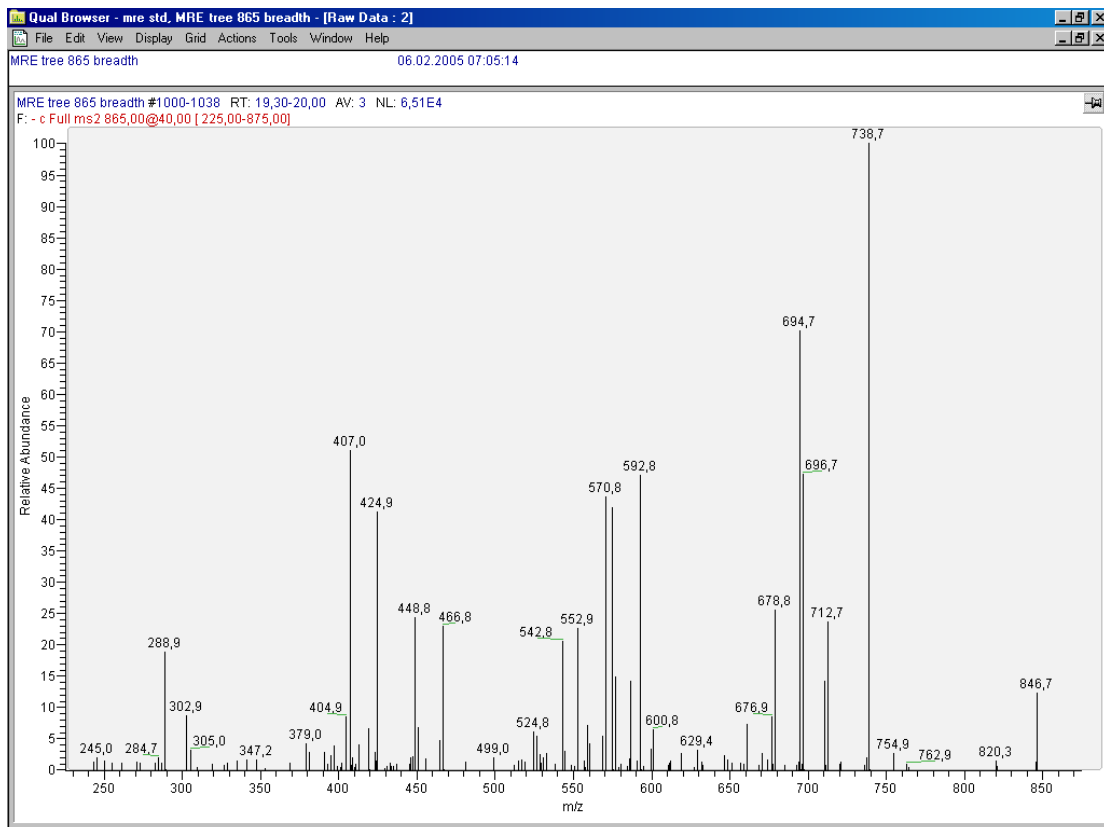


Abbildung A64: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 865 bei 19,1 min

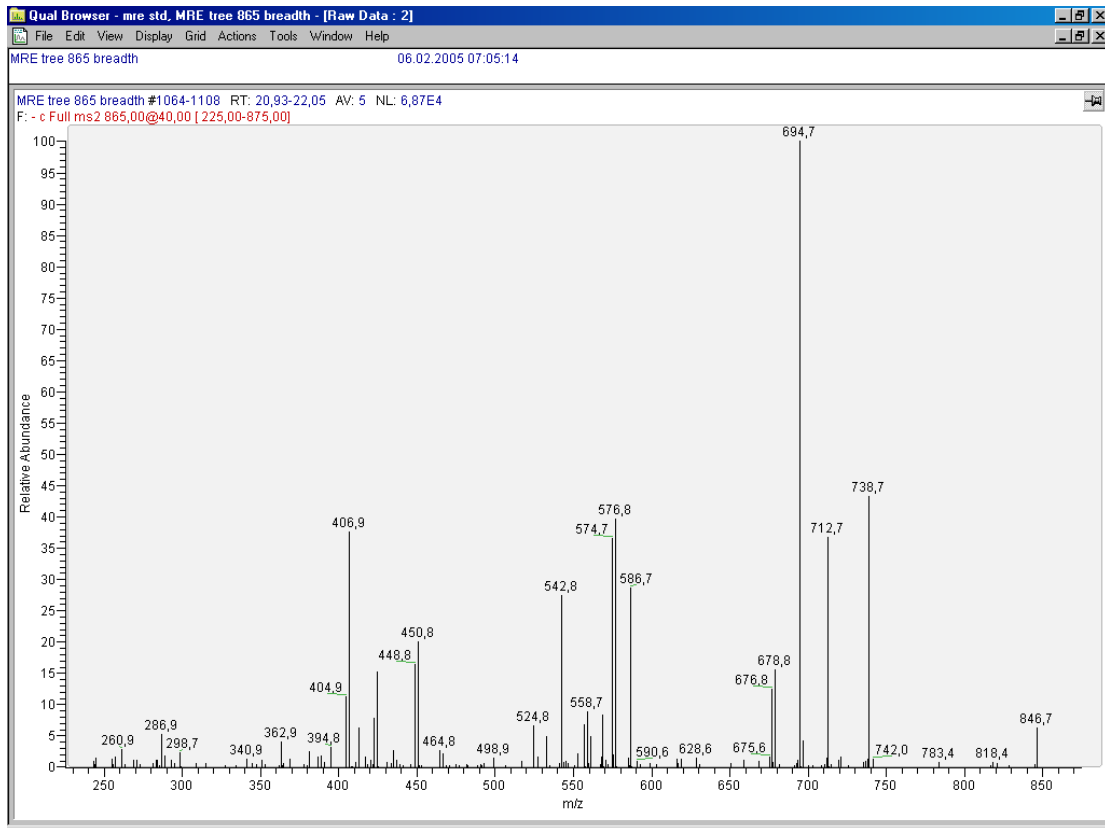


Abbildung A65: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 865 bei 21,7 min

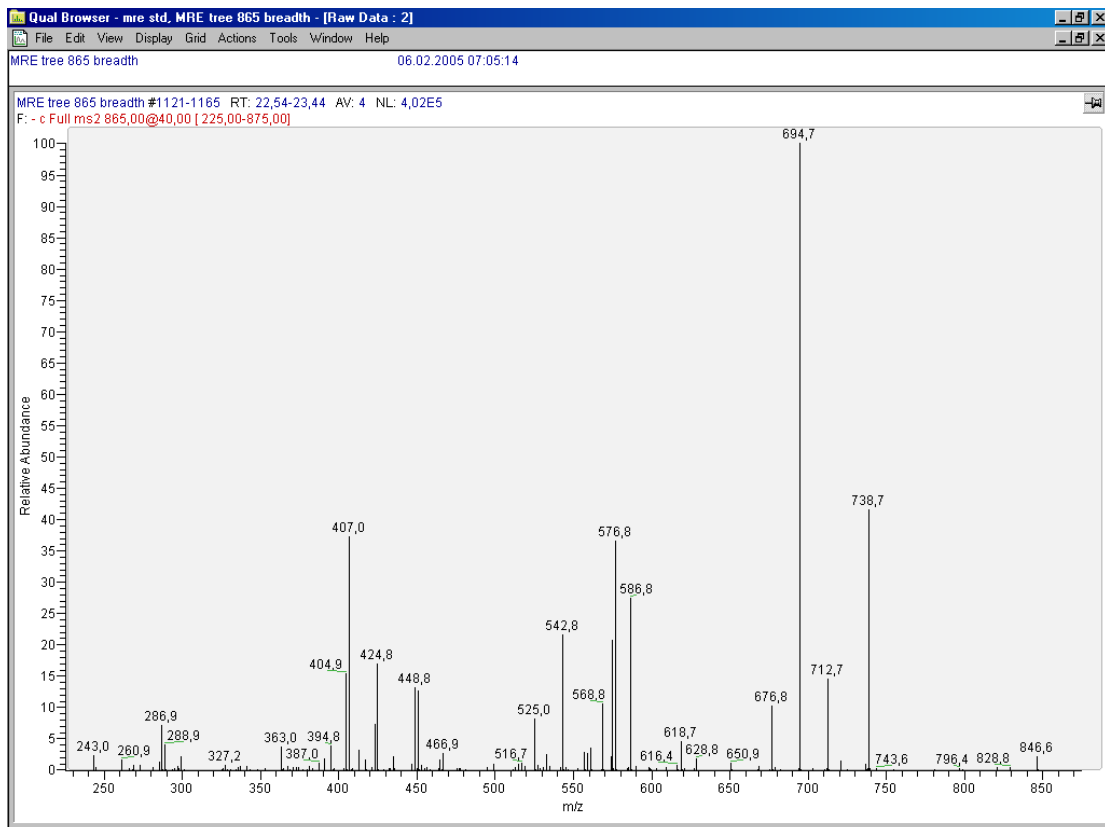


Abbildung A66: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 865 bei 22,8 min

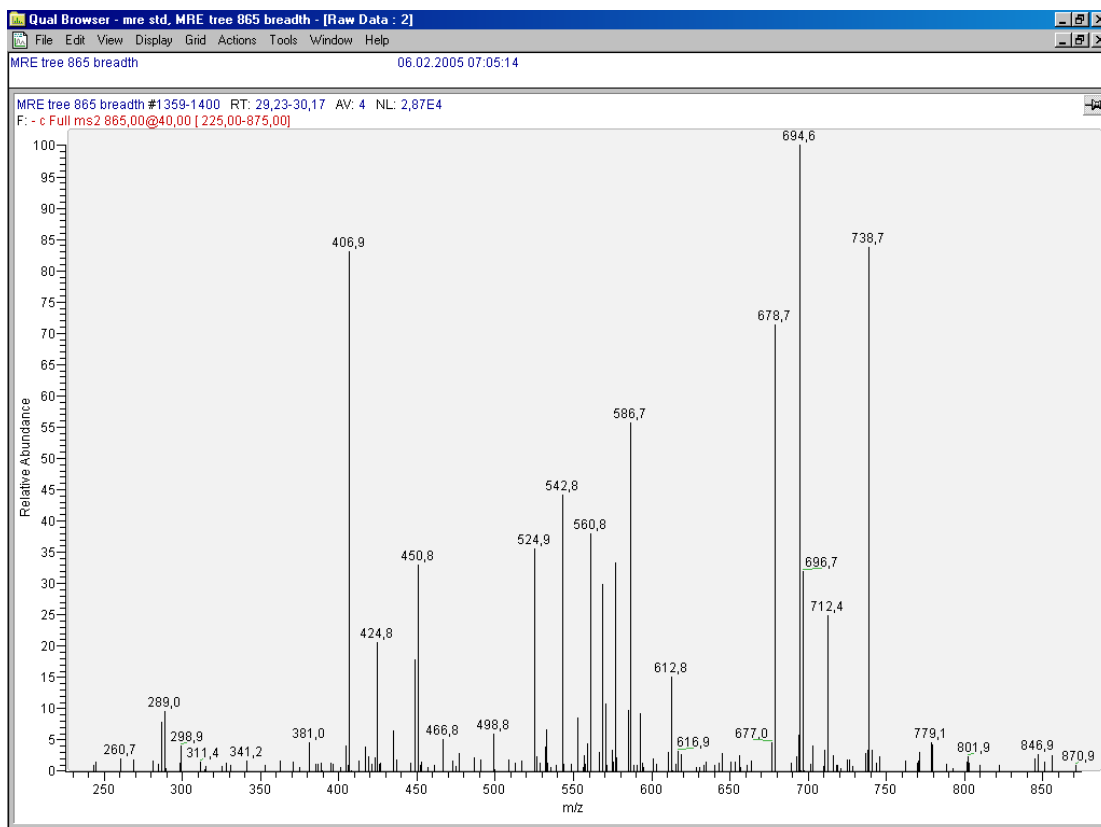


Abbildung A67: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 865 bei 29,7 min

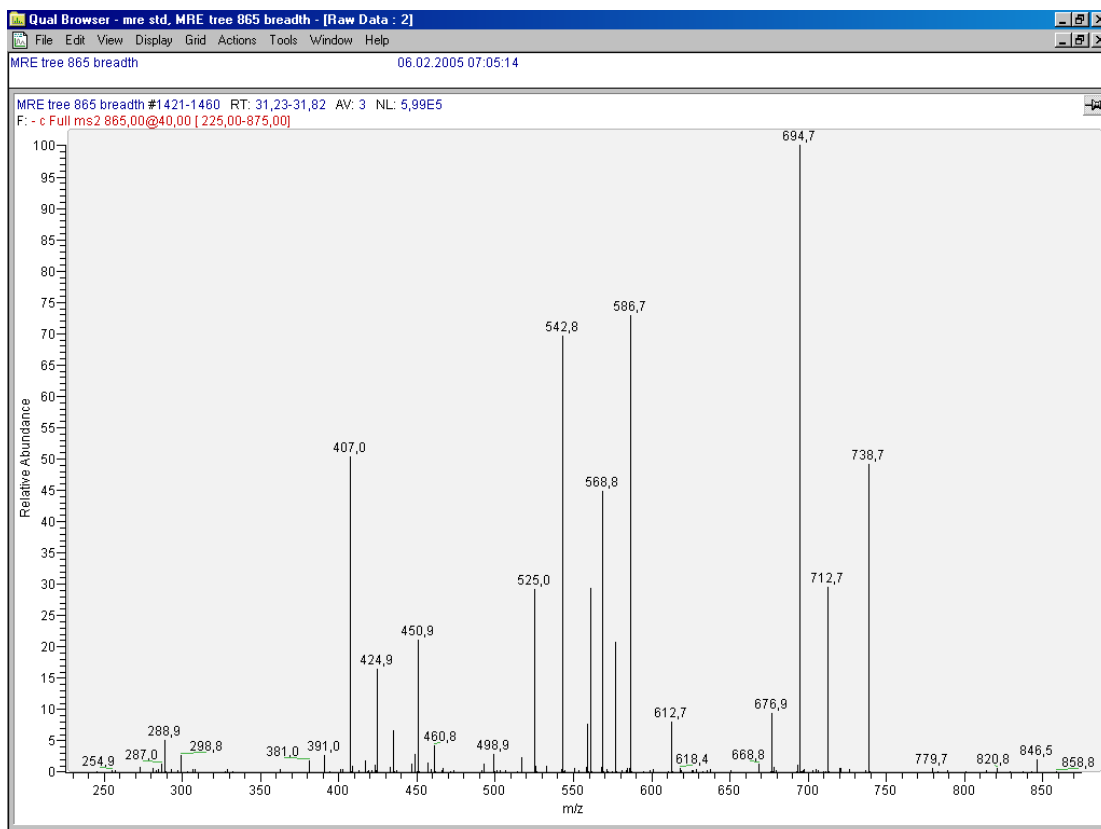


Abbildung A68: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 865 bei 31,3 min

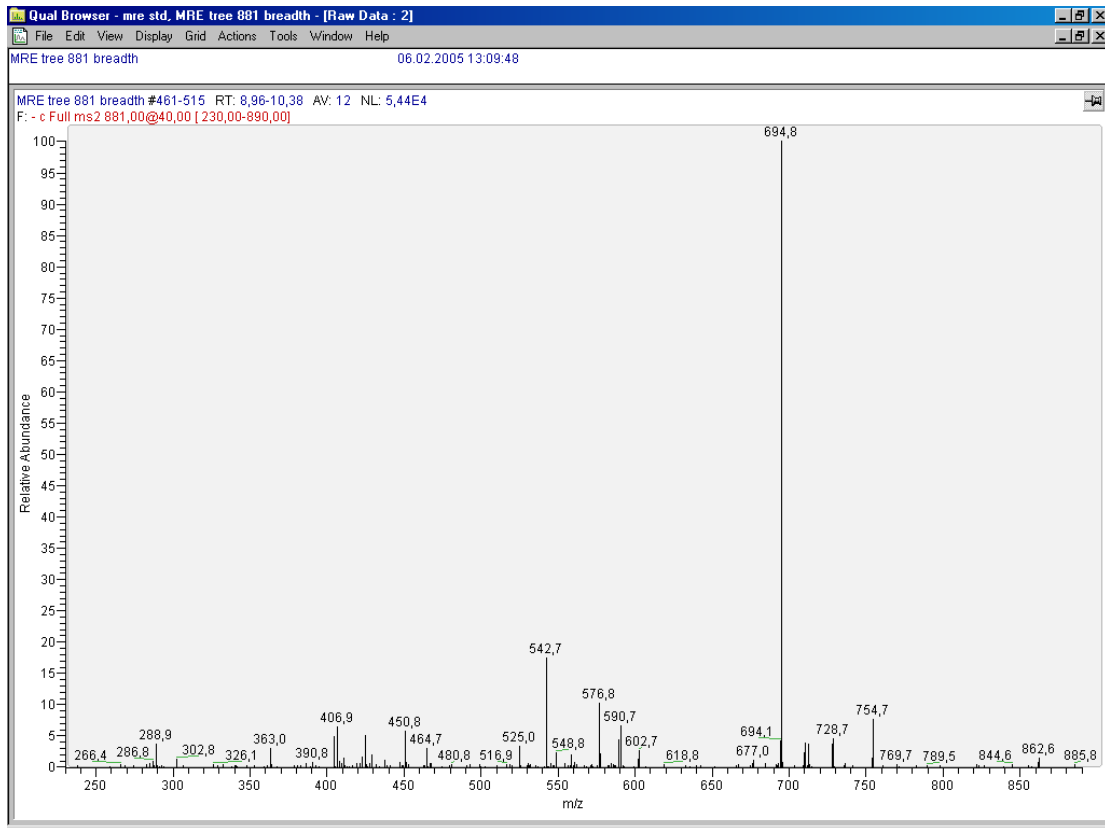


Abbildung A69: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 881 bei 9,5 min

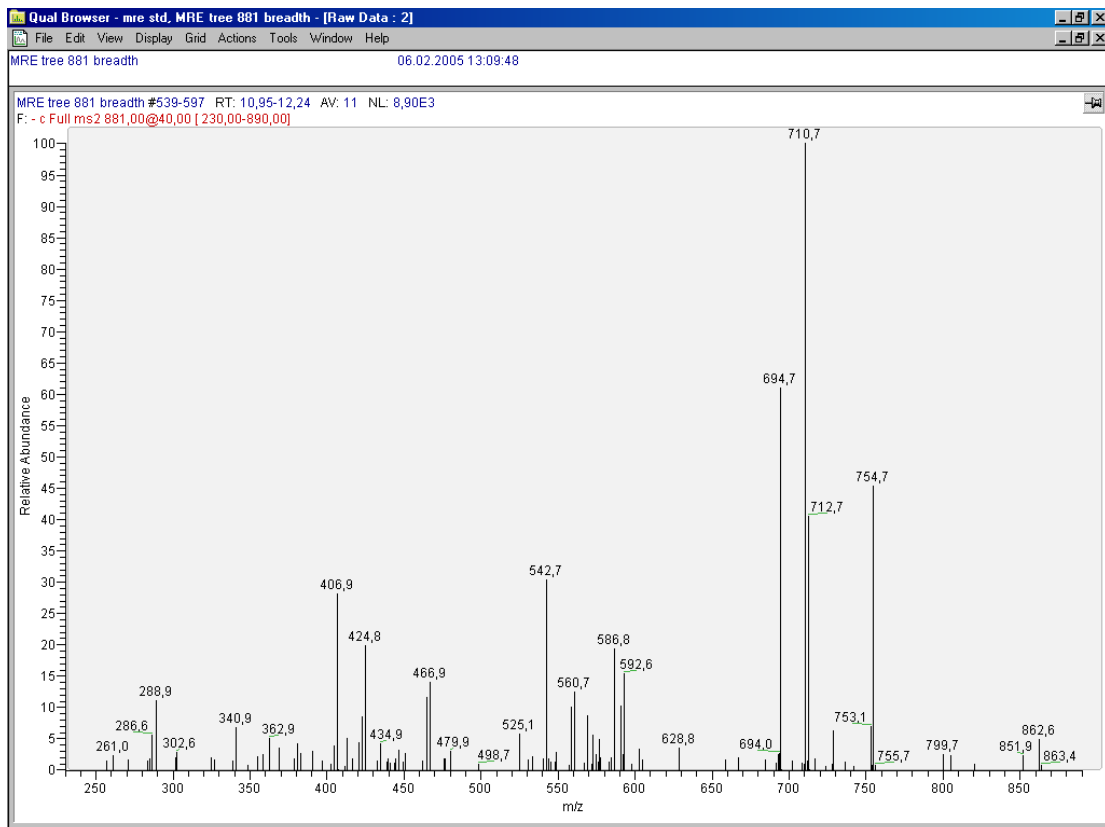


Abbildung A70: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 881 bei 11,4 min



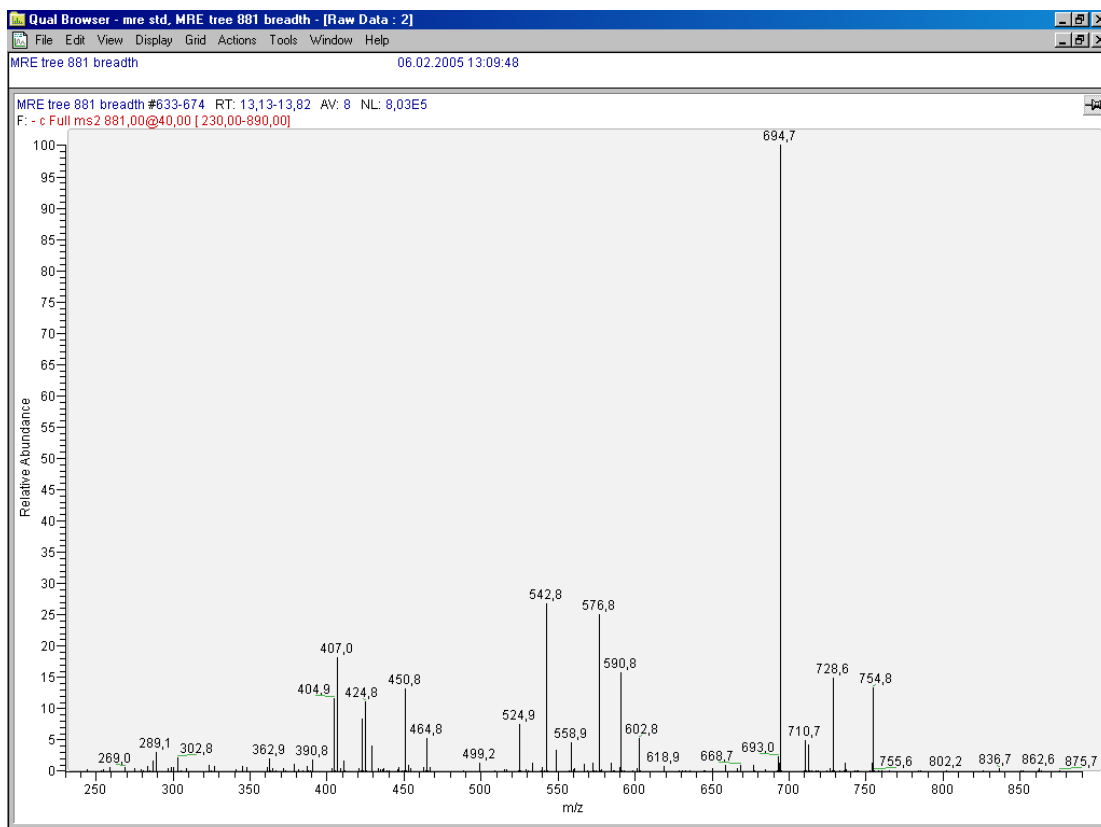


Abbildung A71: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 881 bei 13,9 min

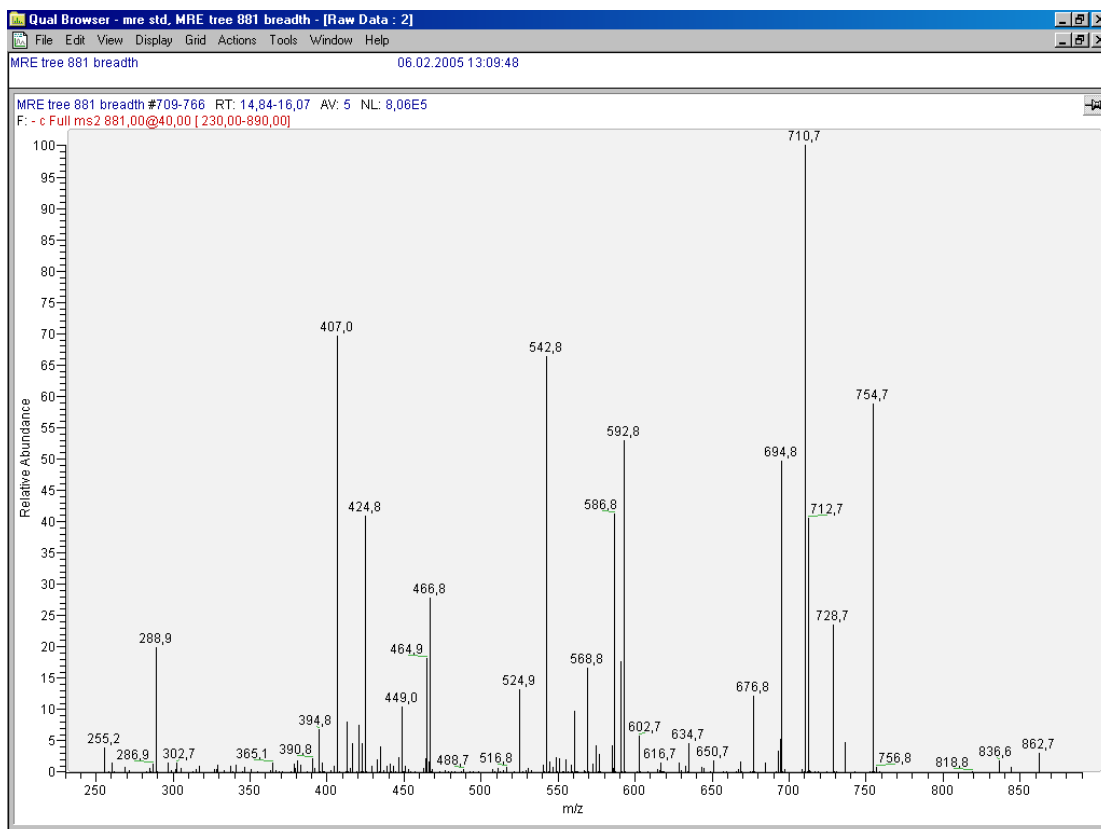


Abbildung A72: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 881 bei 14,8 min

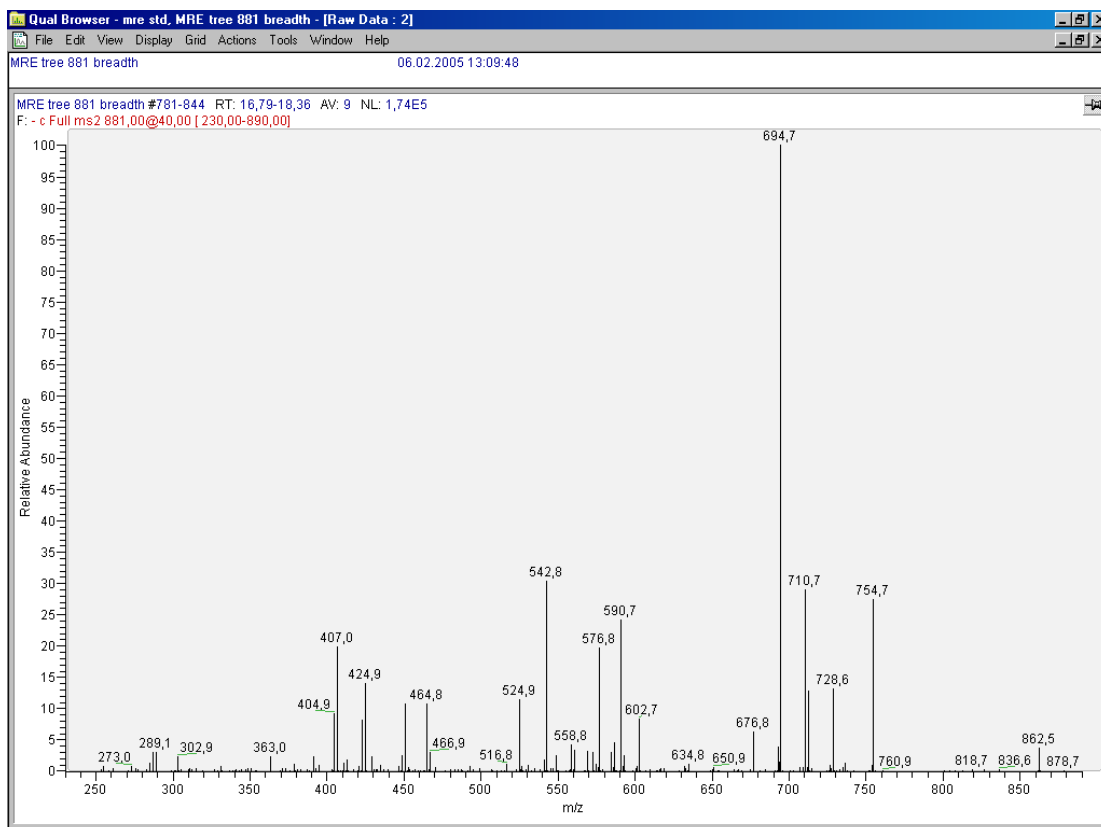


Abbildung A73: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 881 bei 17,5 min

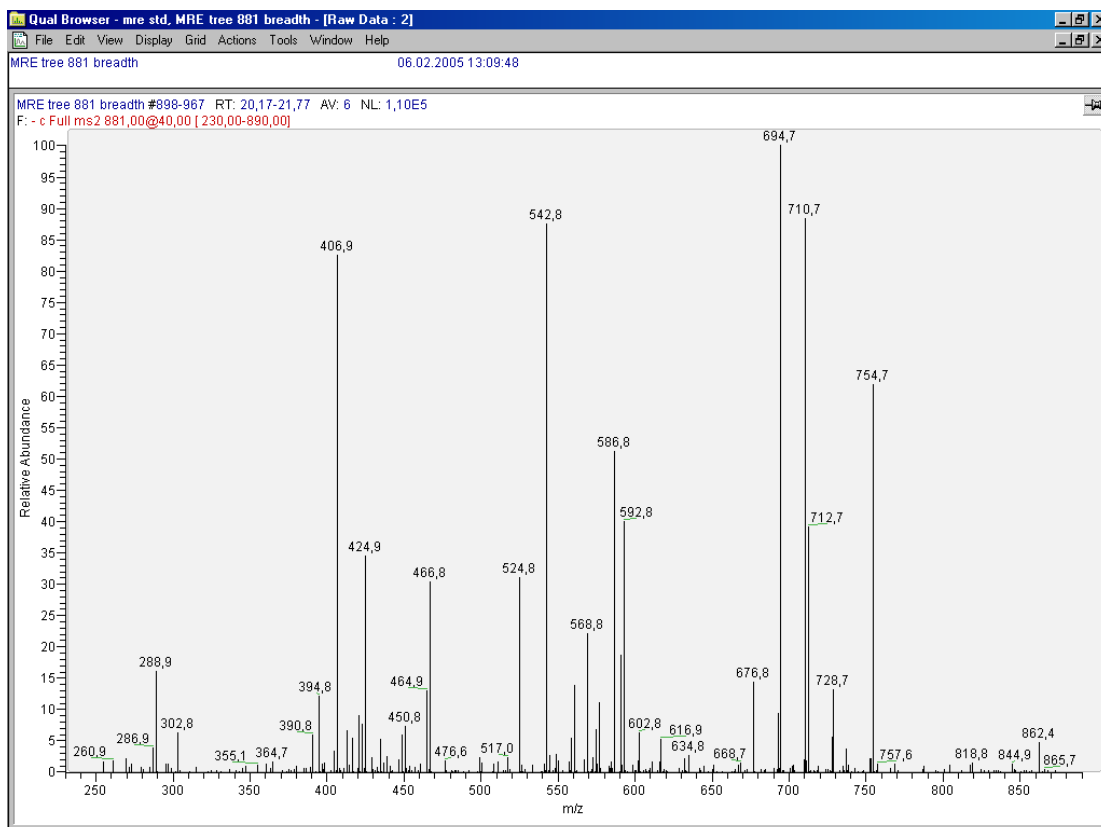


Abbildung A74: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 881 bei 20,7 min

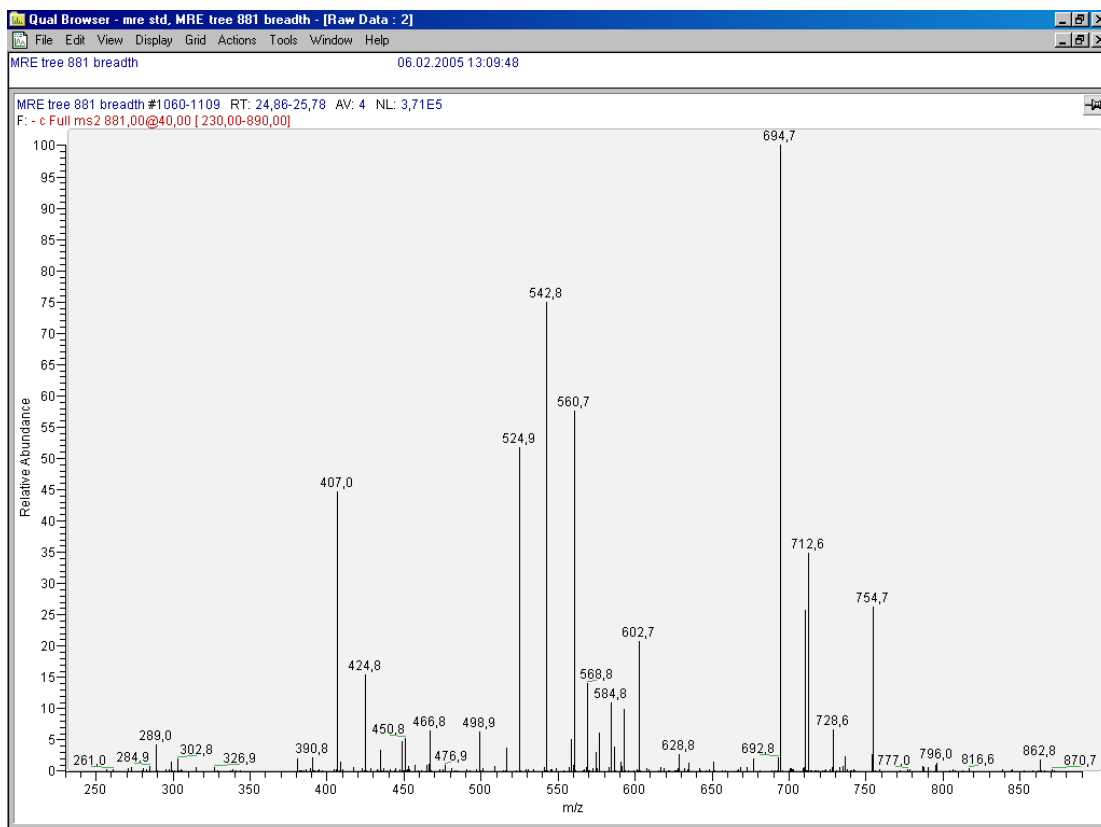


Abbildung A75: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 881 bei 25,3 min

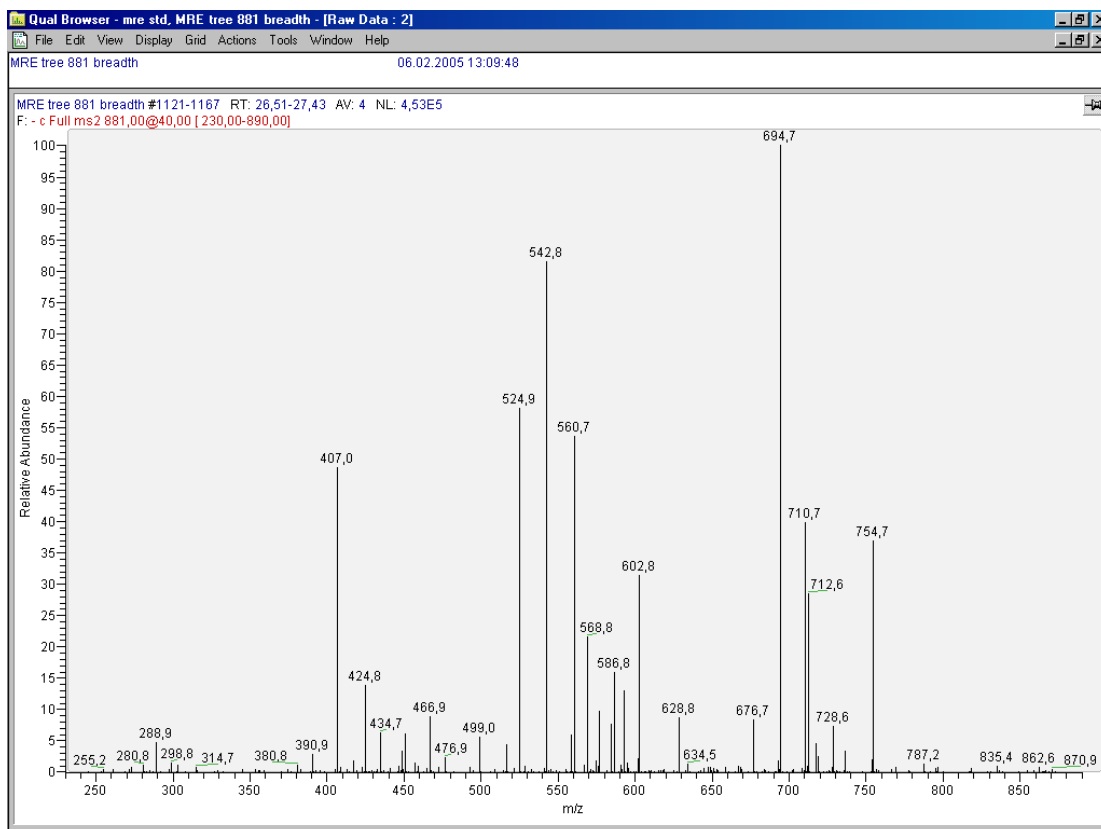


Abbildung A76: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 881 bei 26,7 min

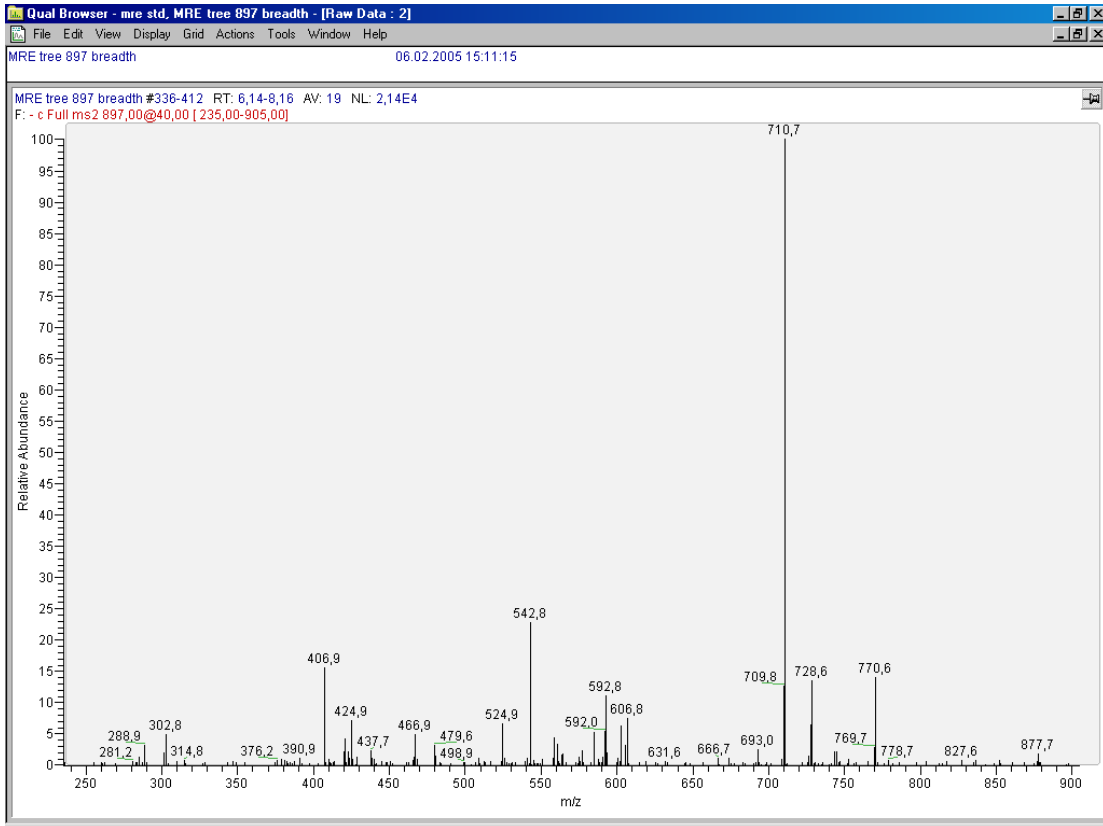


Abbildung A77: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 897 bei 7,1 min

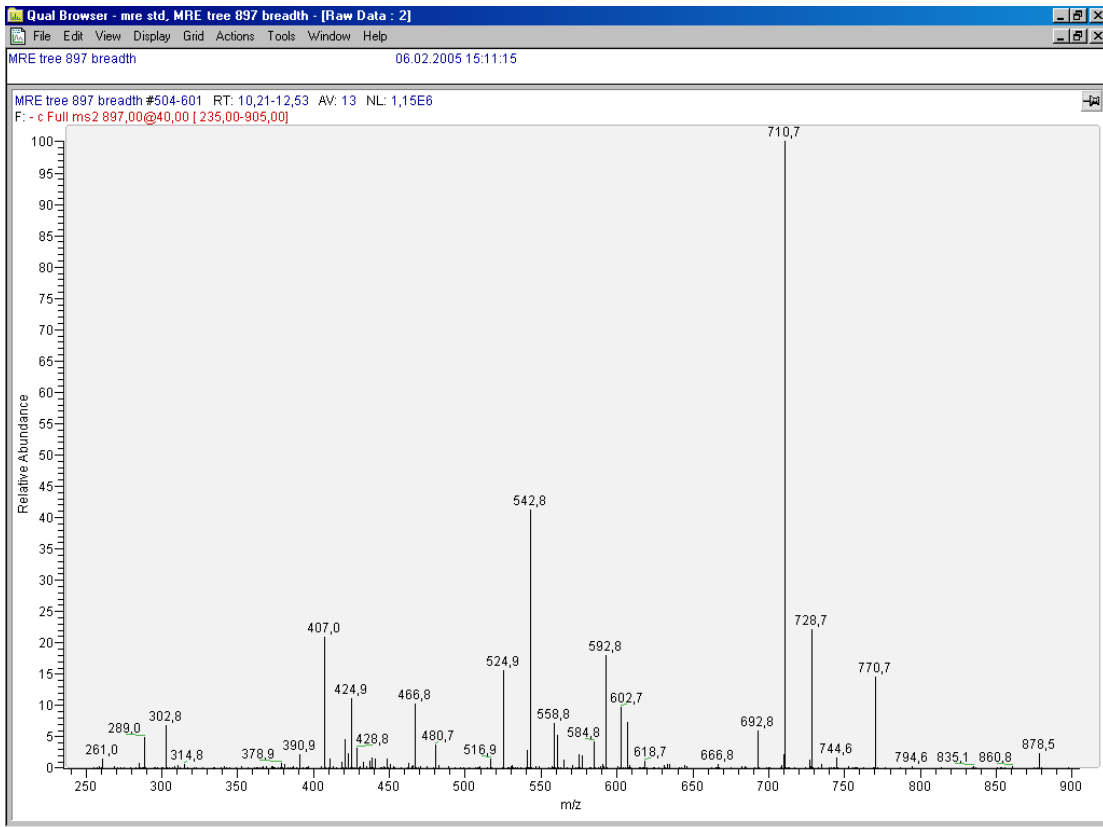


Abbildung A78: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 897 bei 11,1 min

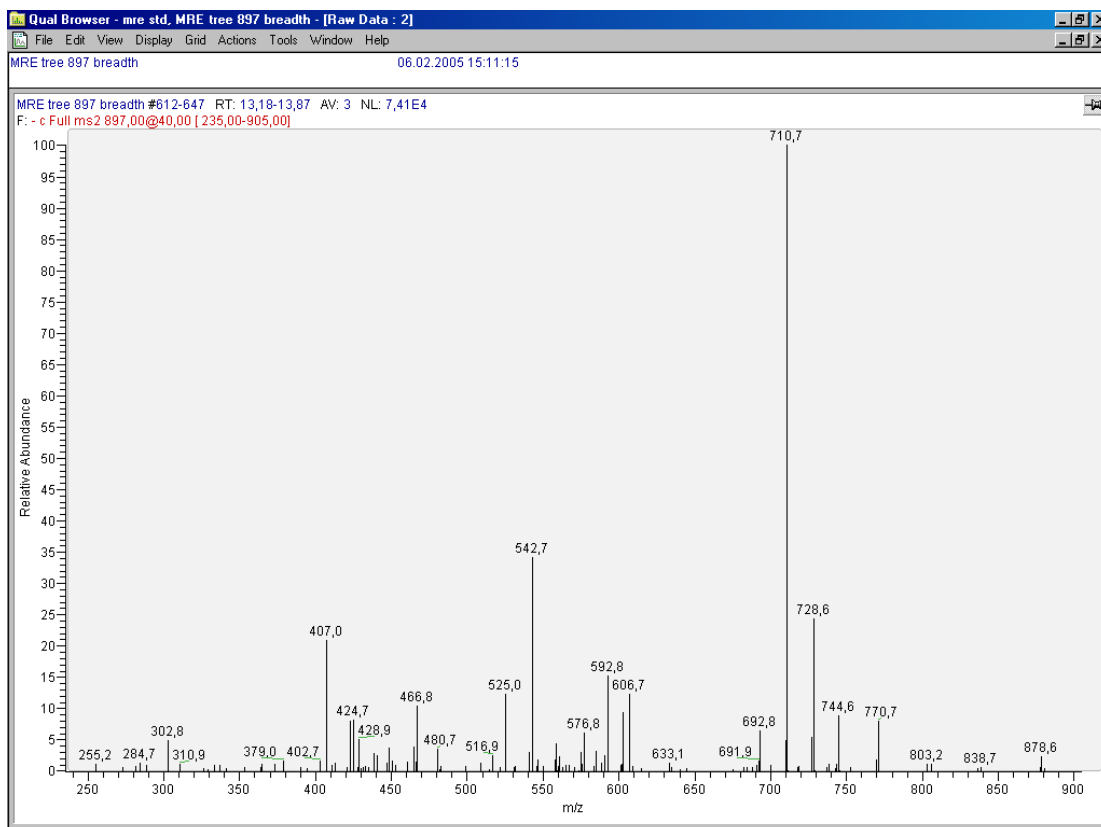


Abbildung A79: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 897 bei 13,7 min

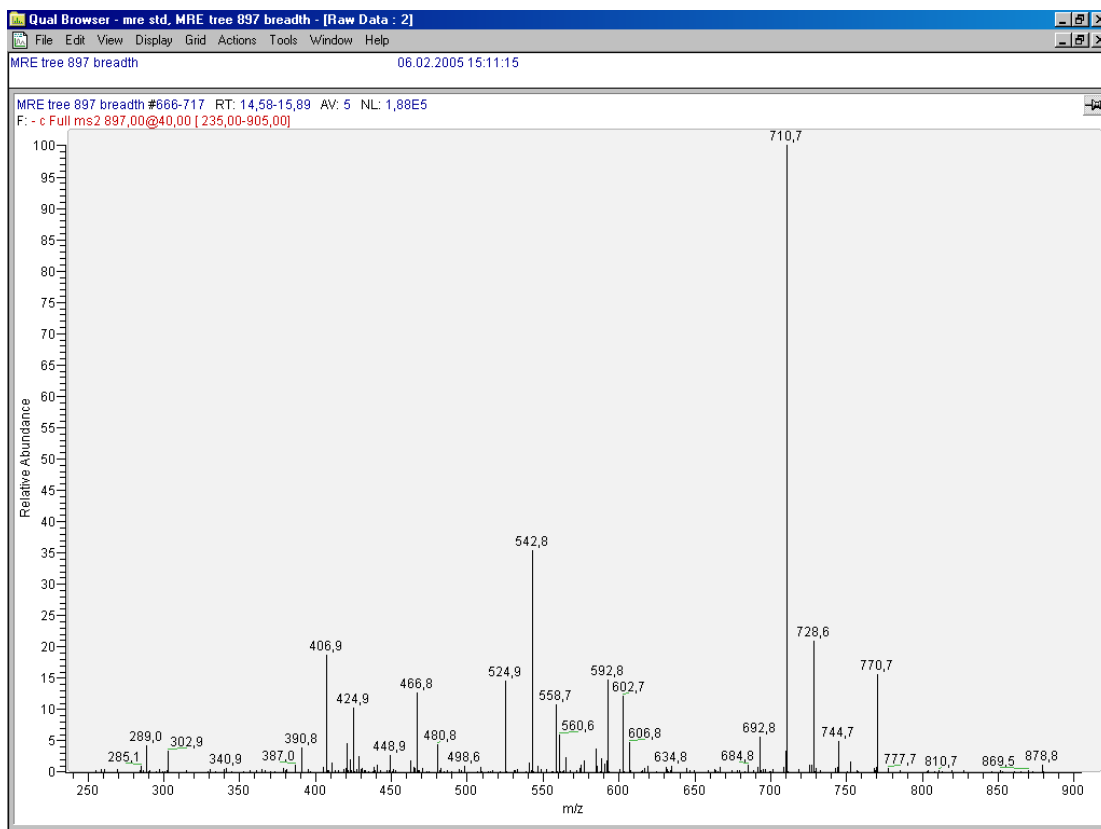


Abbildung A80: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 897 bei 14,8 min

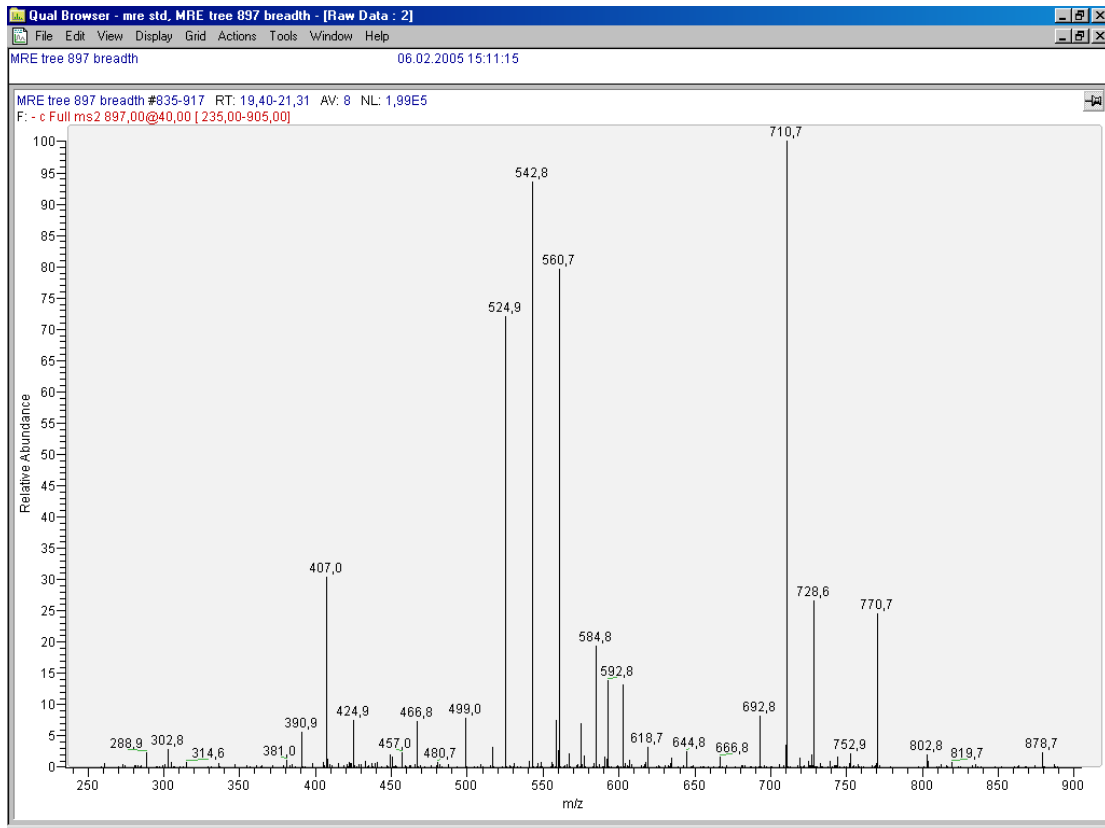


Abbildung A81: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 897 bei 20,2 min

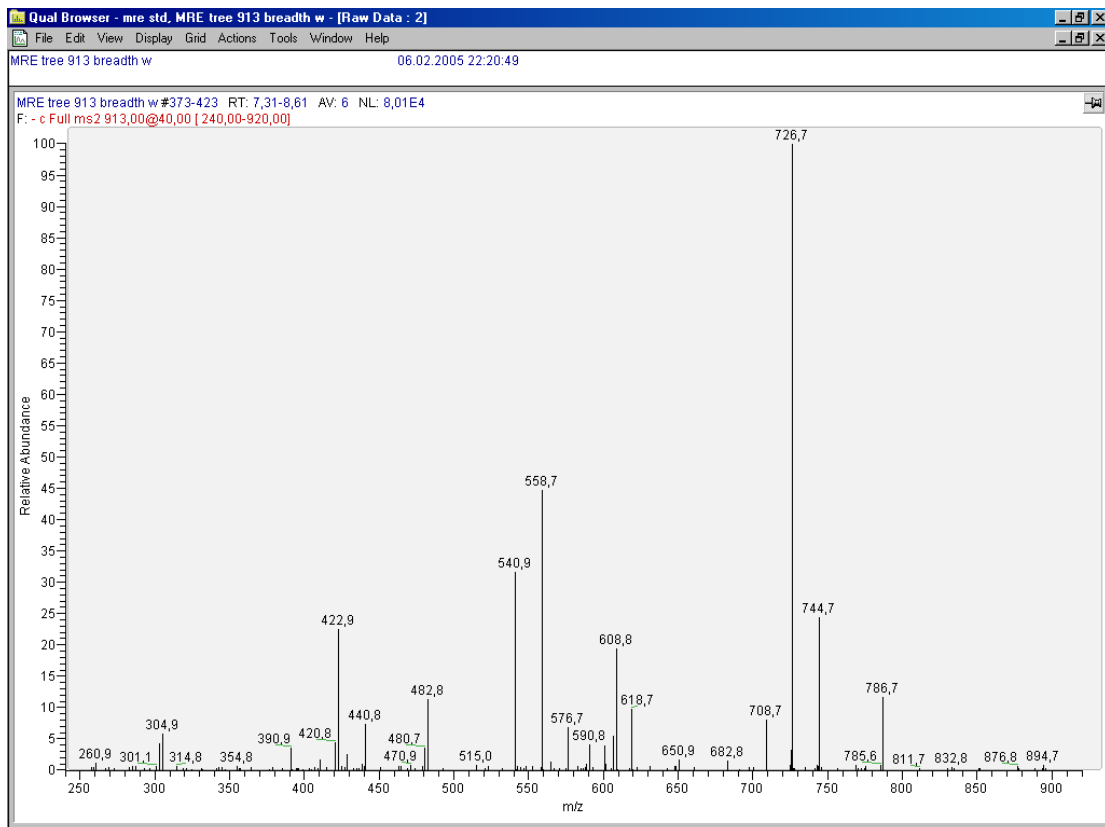


Abbildung A82: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 913 bei 7,9 min

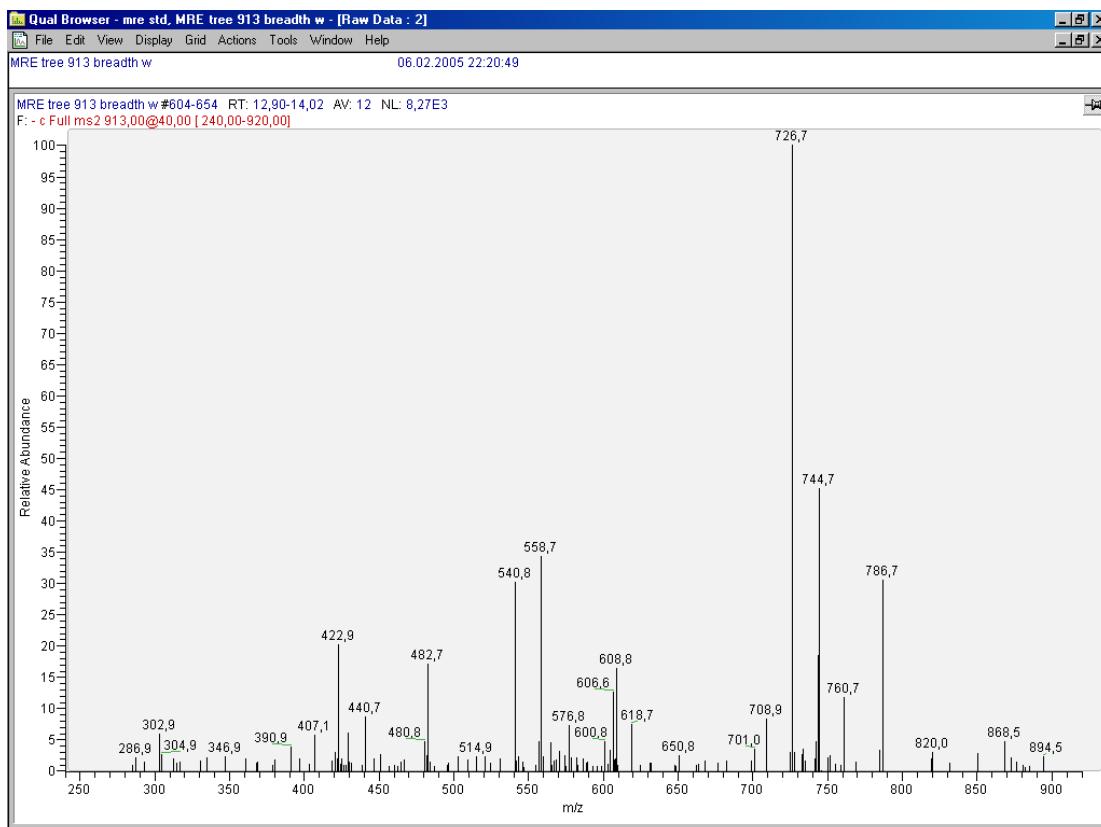


Abbildung A83: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 913 bei 13,5 min

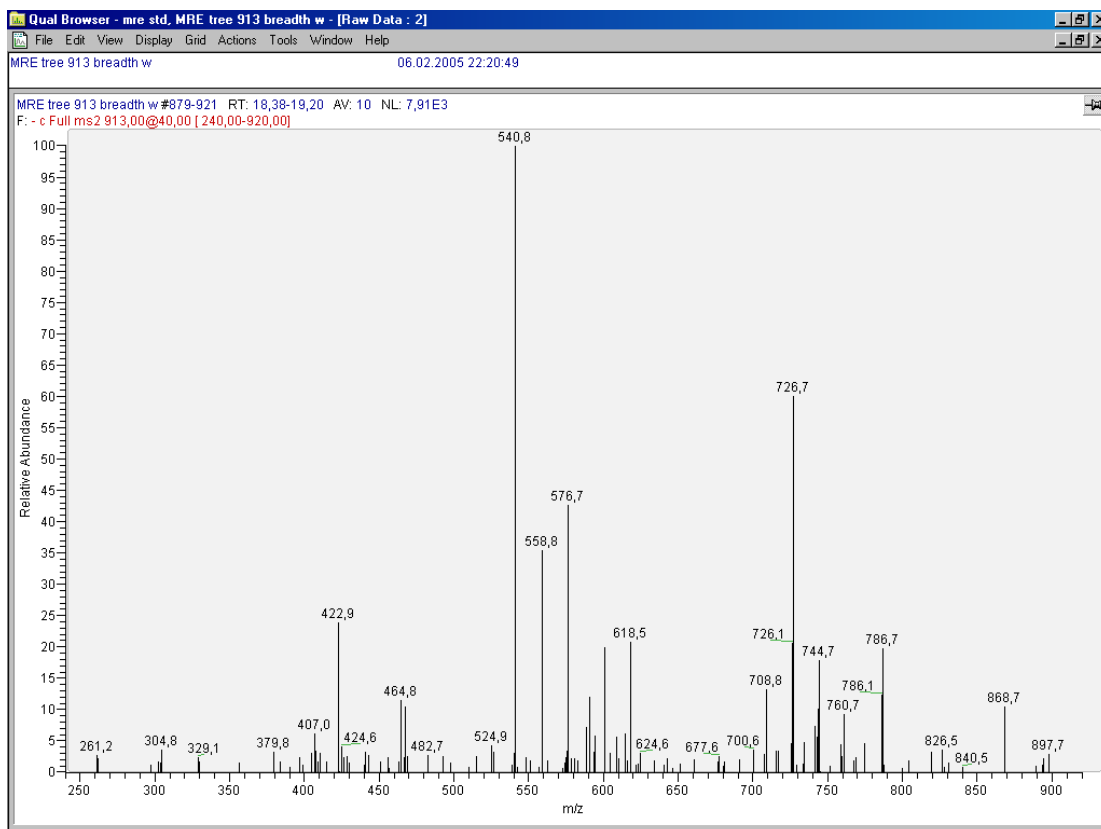


Abbildung A84: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 913 bei 18,7 min

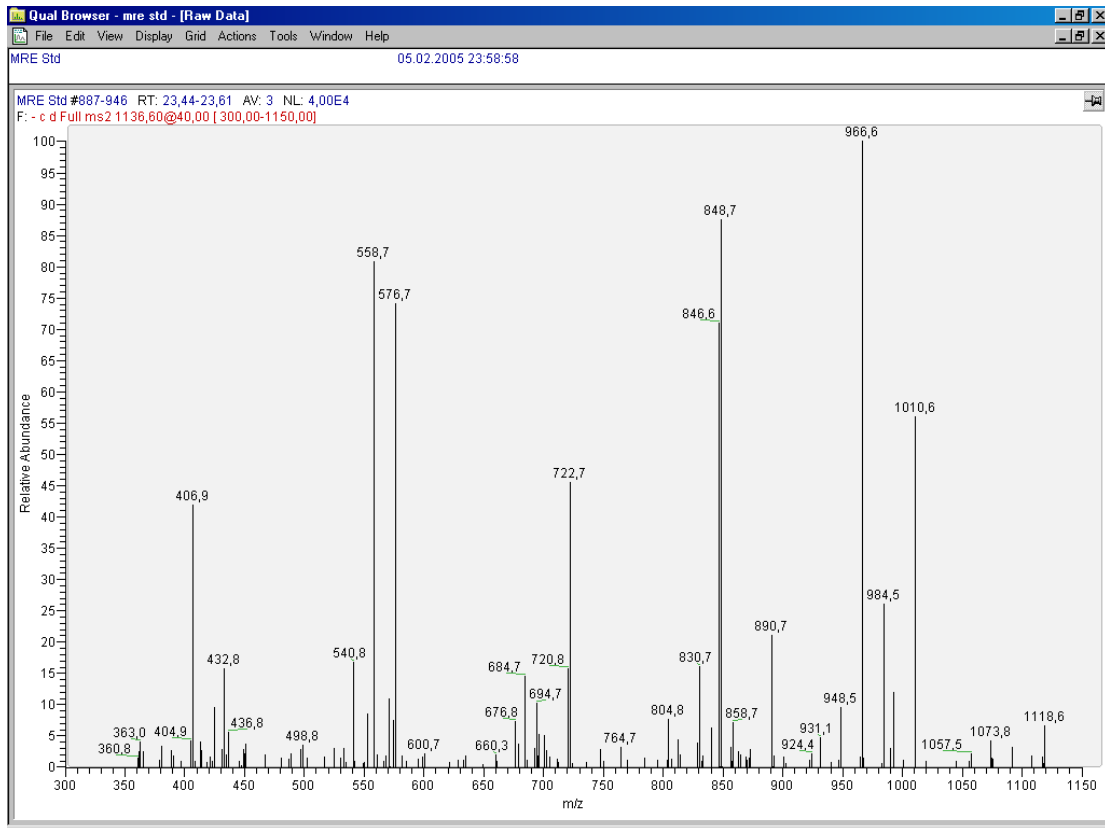


Abbildung A85: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 1137 bei 23,5 min

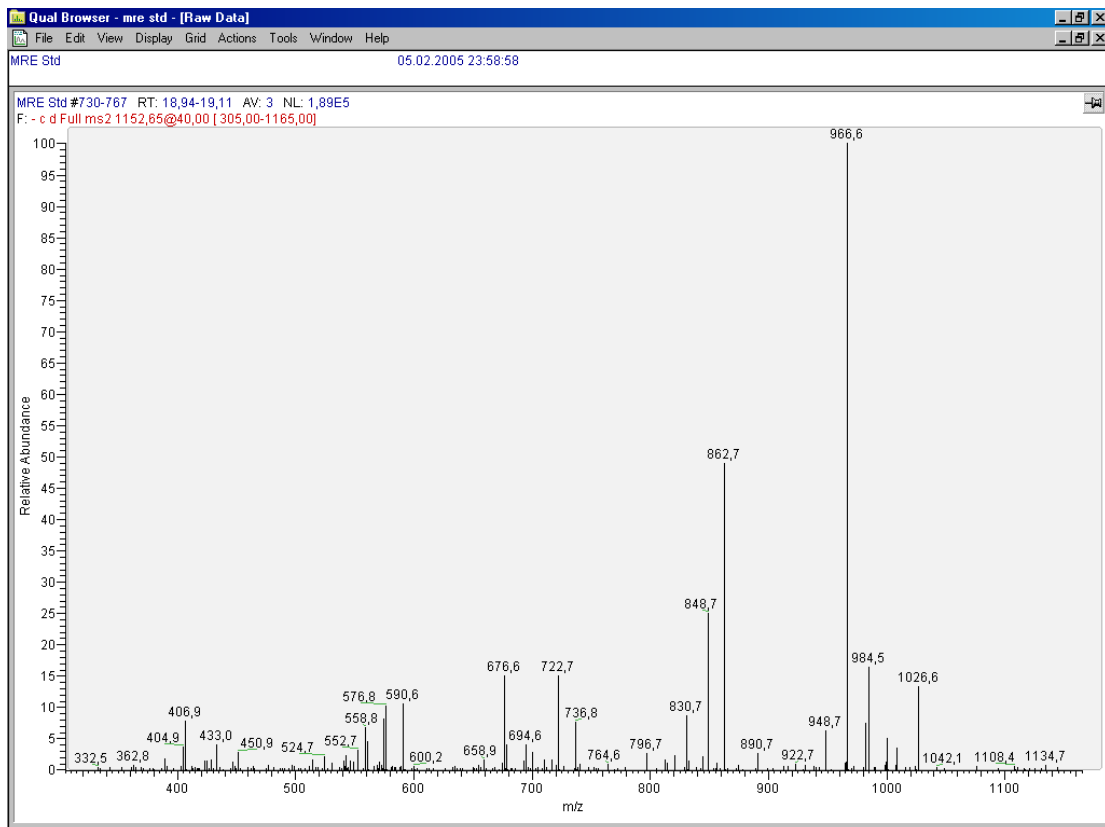


Abbildung A86: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 1153 bei 19,1 min



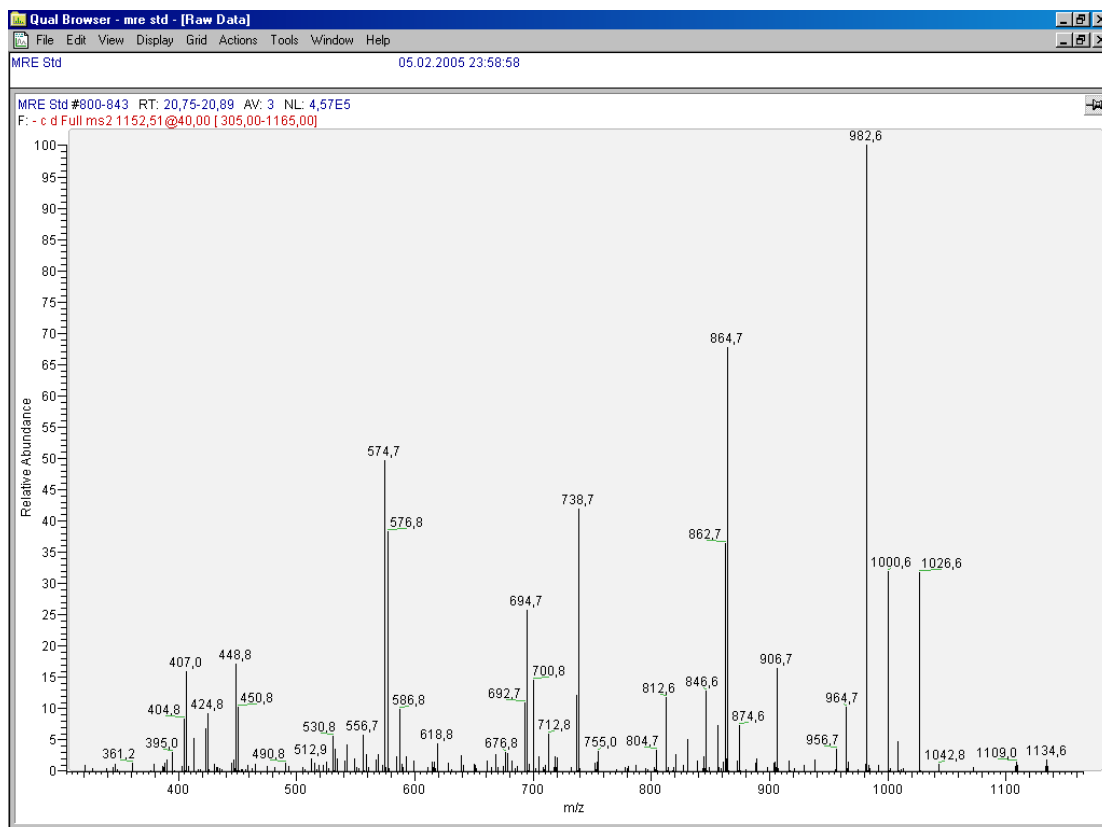


Abbildung A87: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 1153 bei 20,9 min

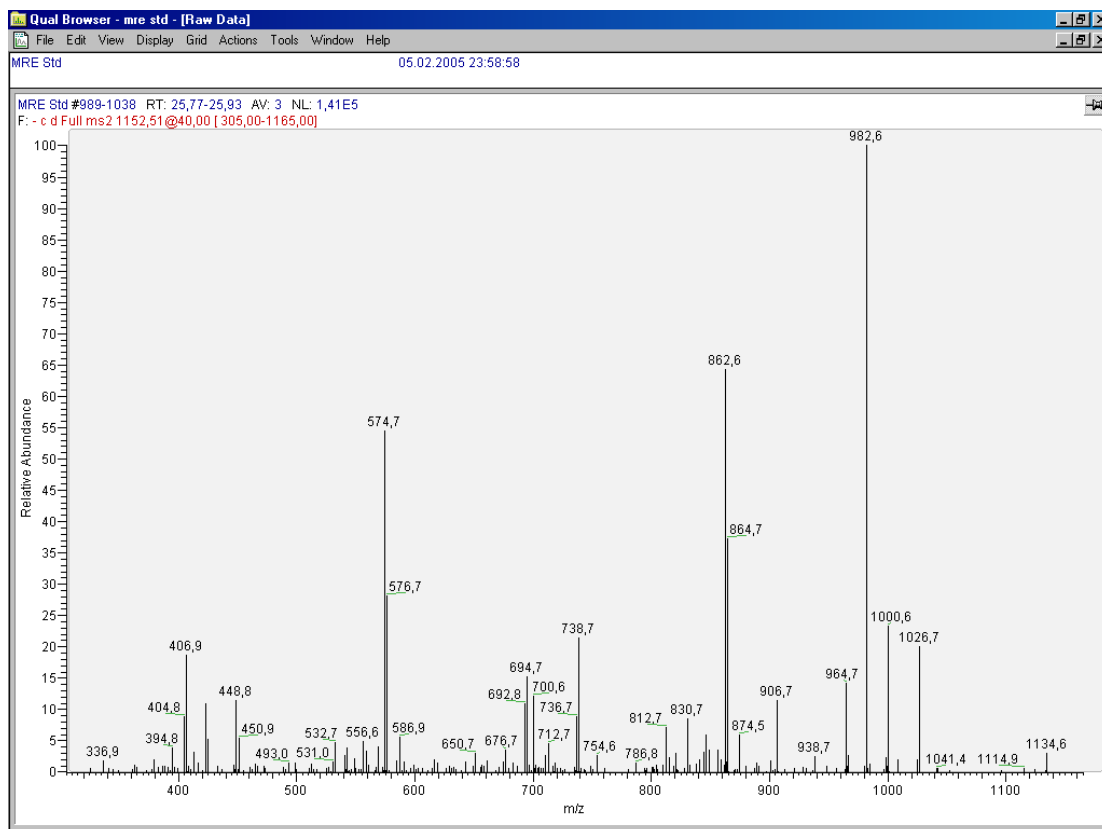


Abbildung A88: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 1153 bei 25,8 min

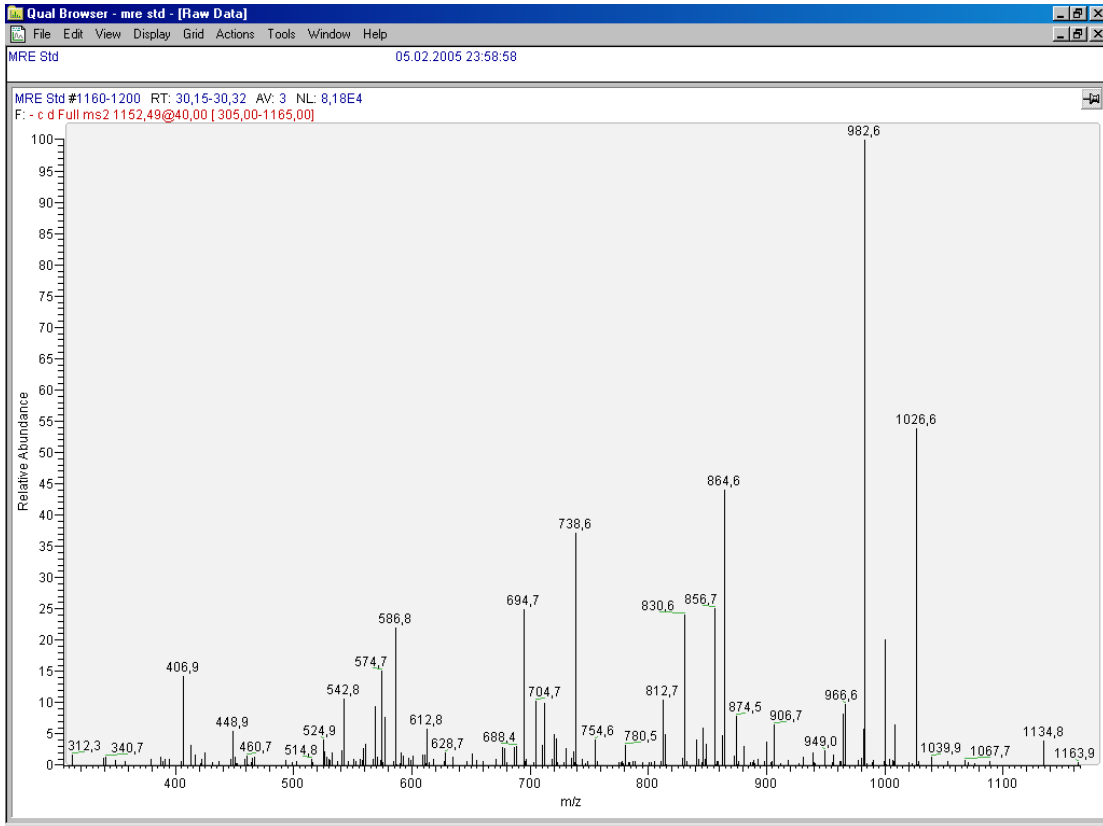


Abbildung A89: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 1153 bei 30,3 min

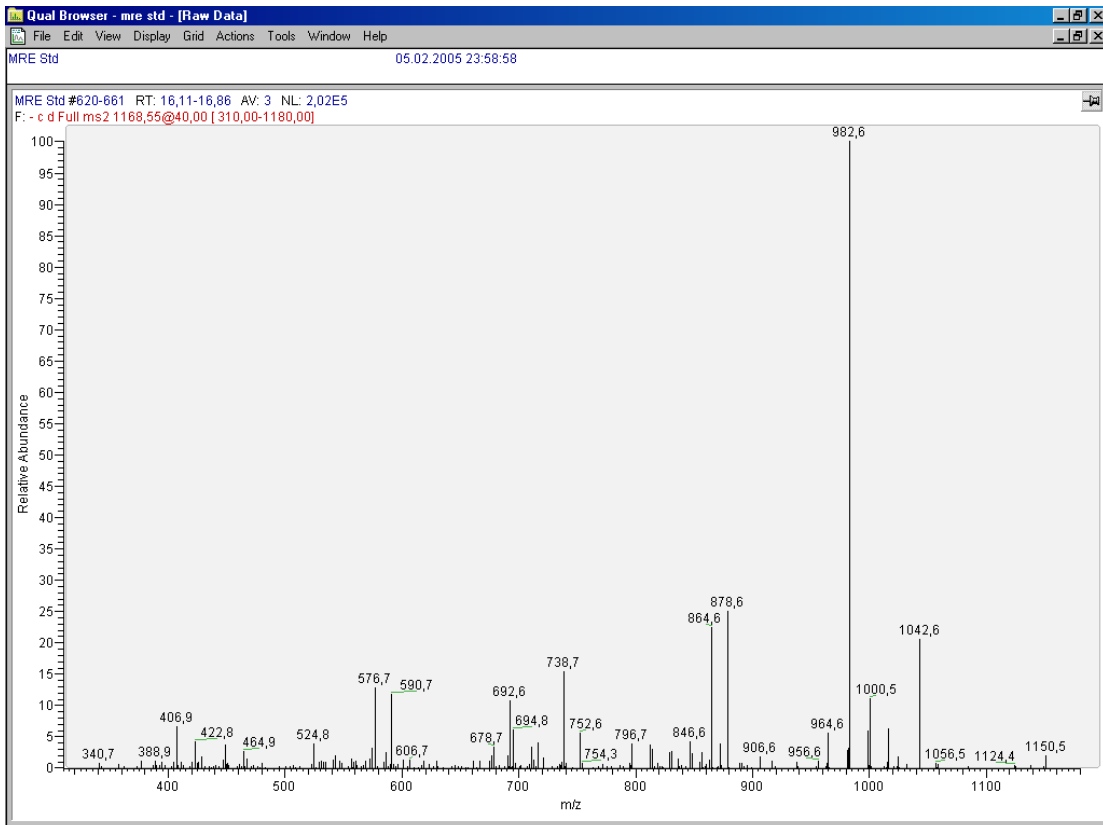


Abbildung A90: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 1169 bei 16,6 min

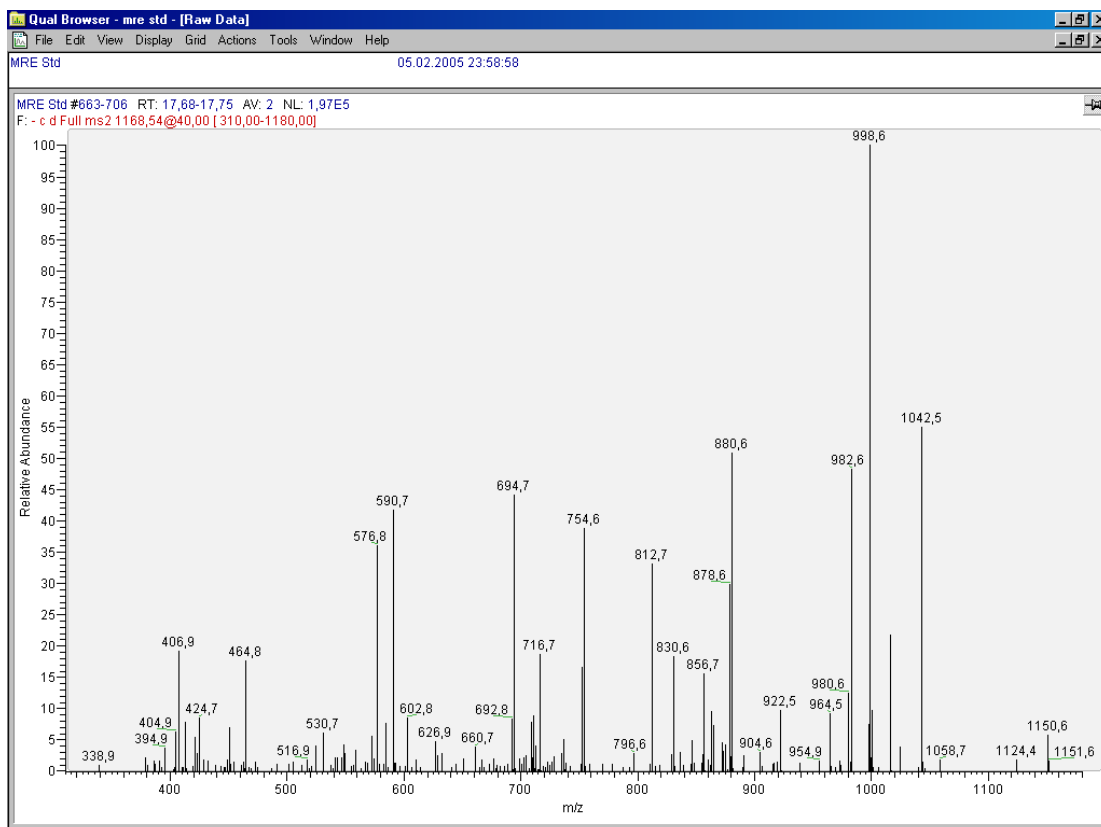


Abbildung A91: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 1169 bei 17,6 min

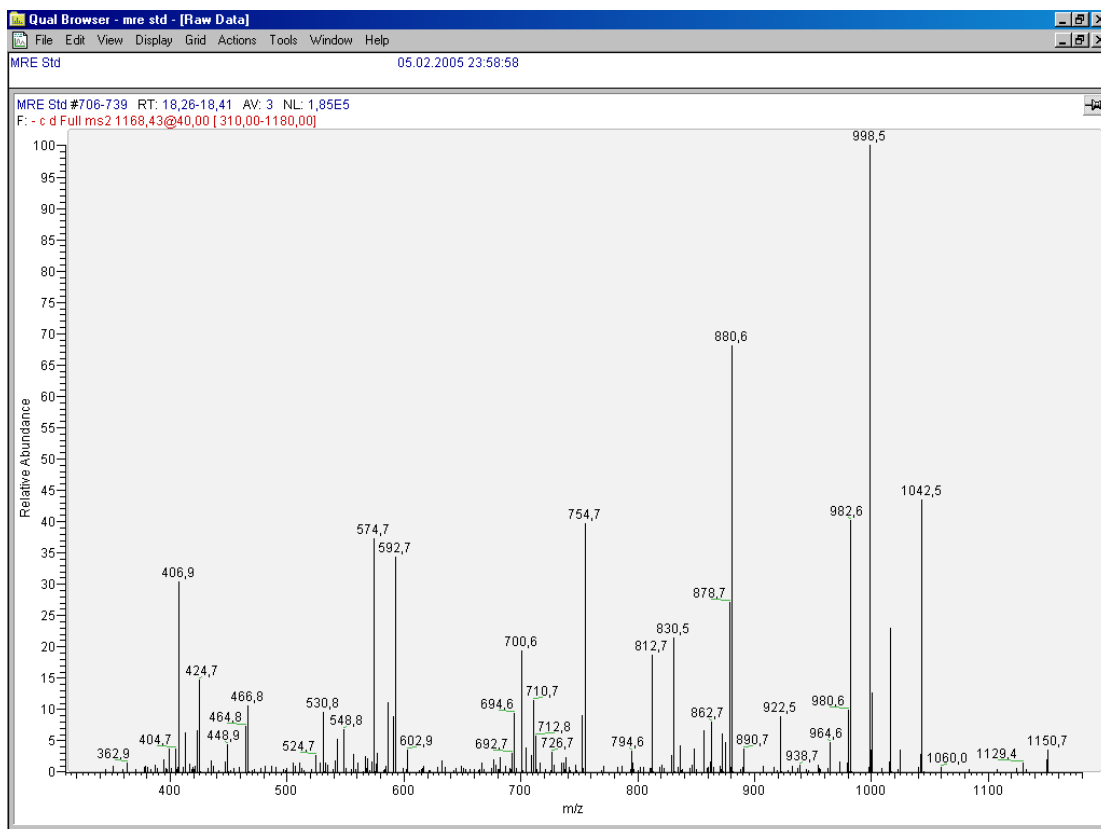


Abbildung A92: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 1169 bei 18,4 min

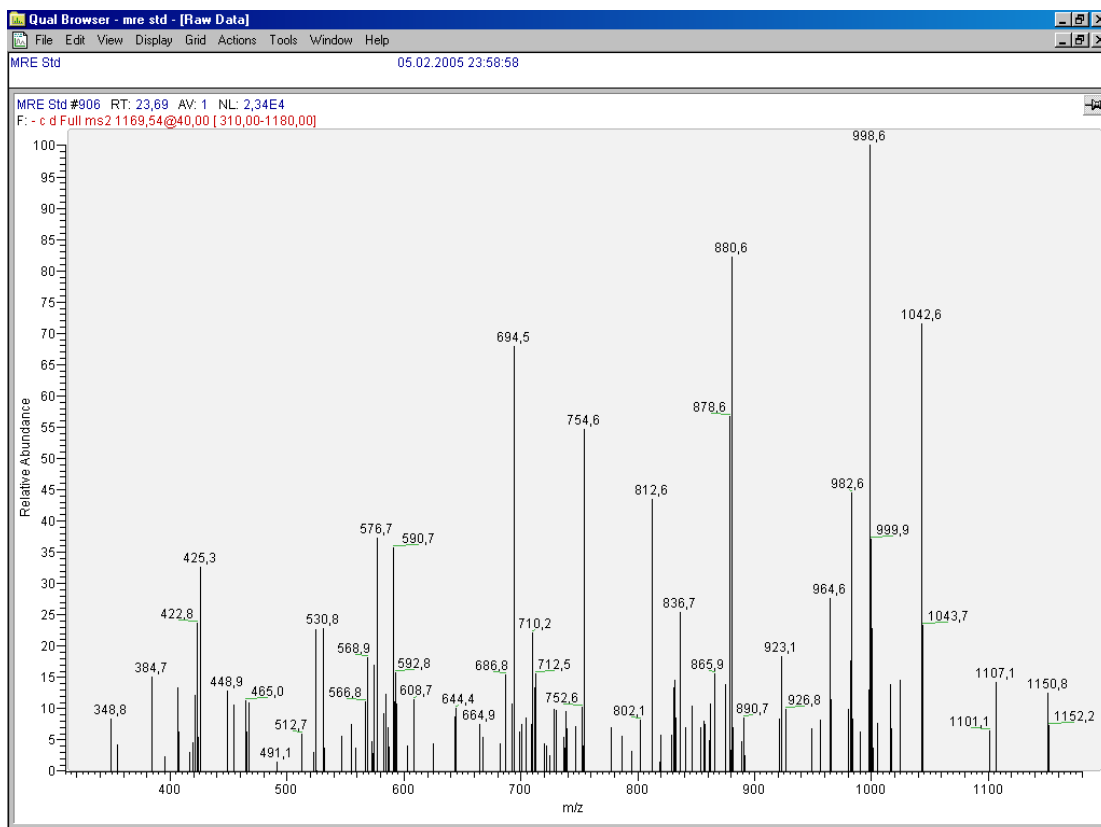


Abbildung A93: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 1169 bei 23,9 min

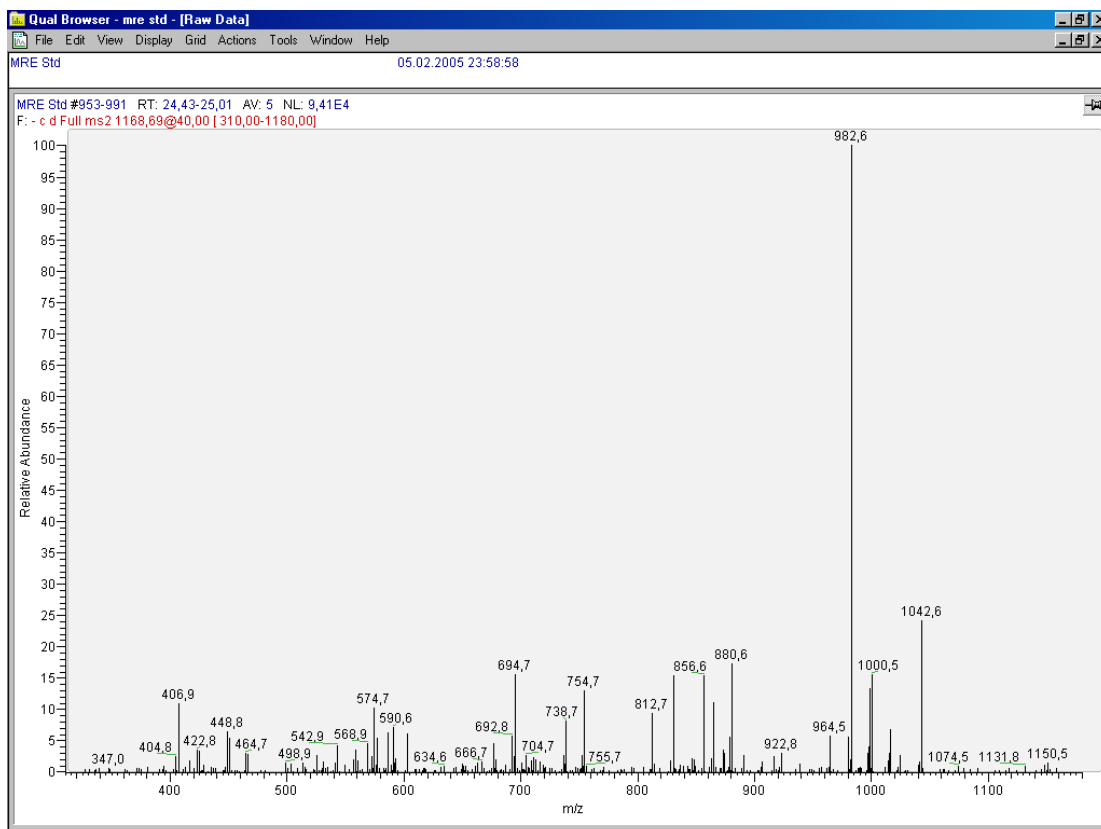


Abbildung A94: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 1169 bei 24,8 min

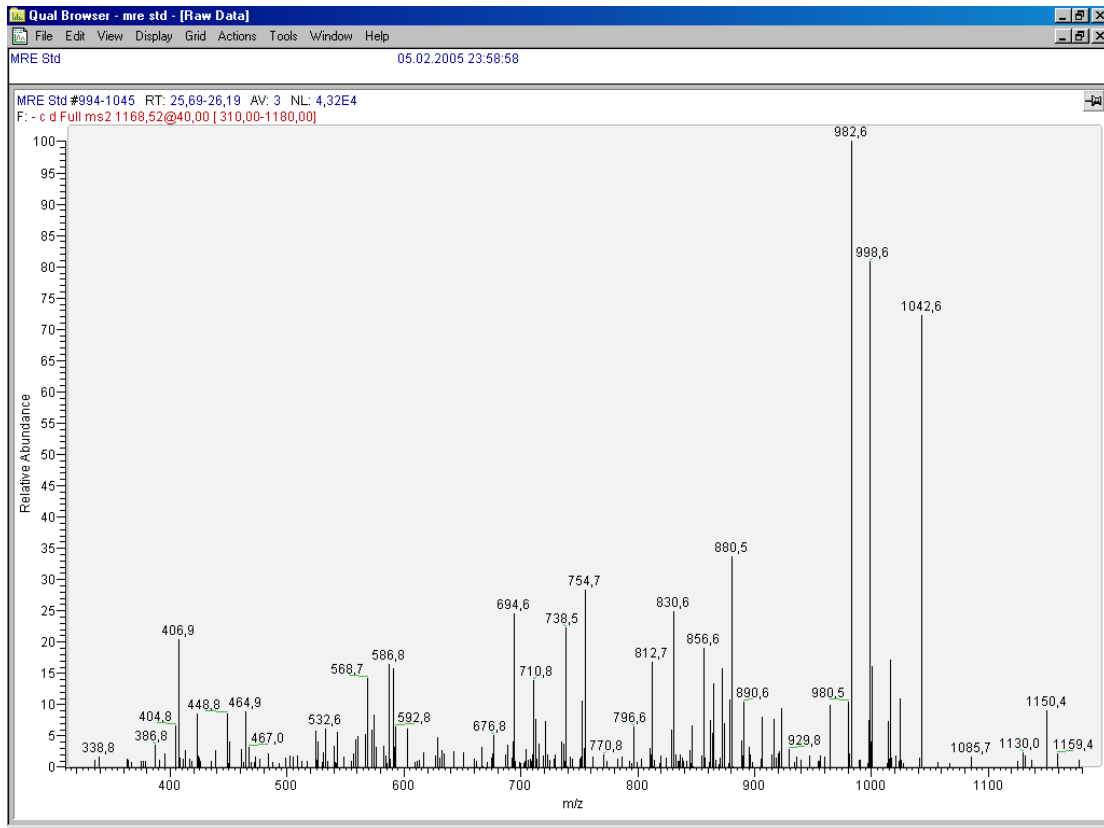


Abbildung A95: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 1169 bei 25,8 min

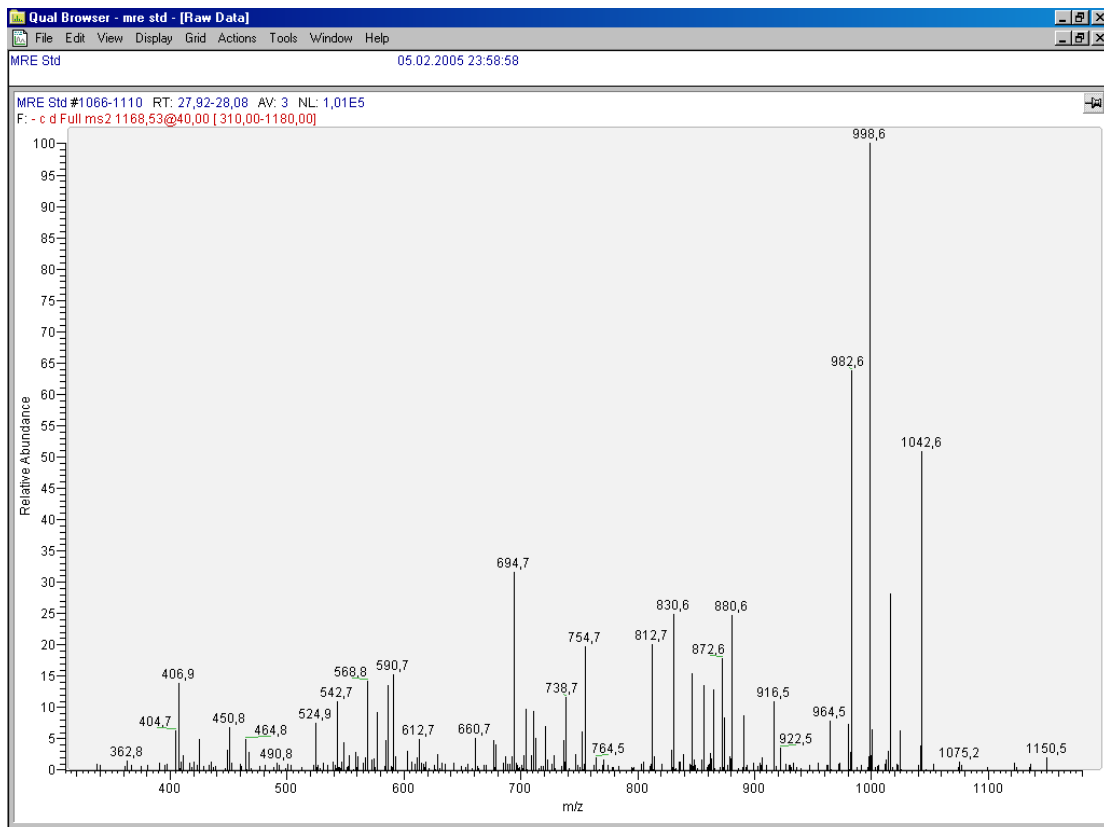


Abbildung A96: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 1169 bei 28,1 min

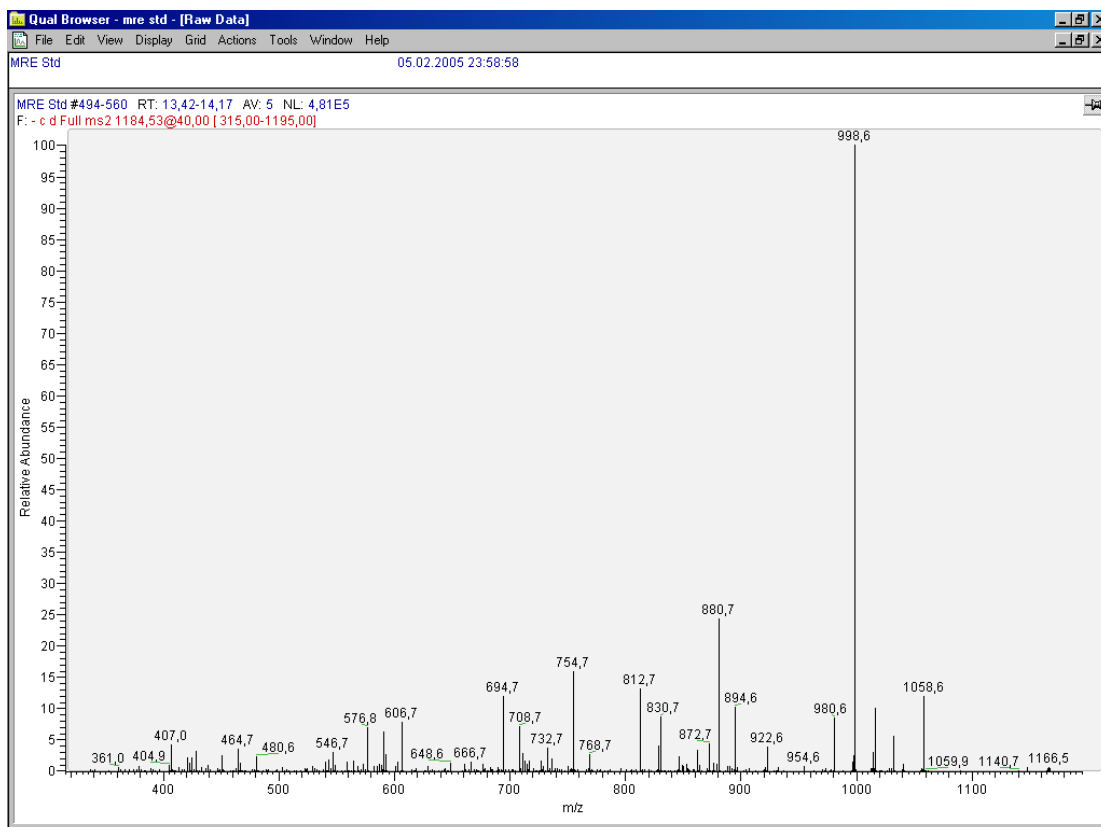


Abbildung A97: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 1185 bei 13,8 min

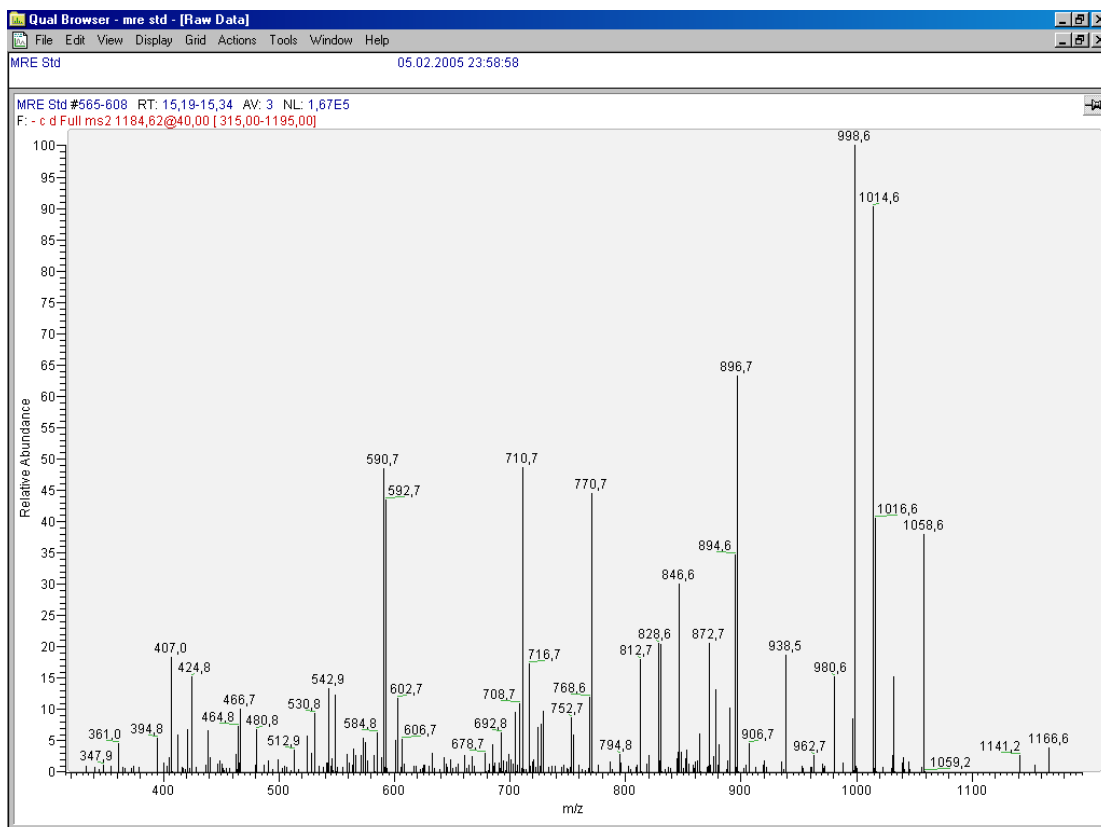


Abbildung A98: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 1185 bei 15,3 min

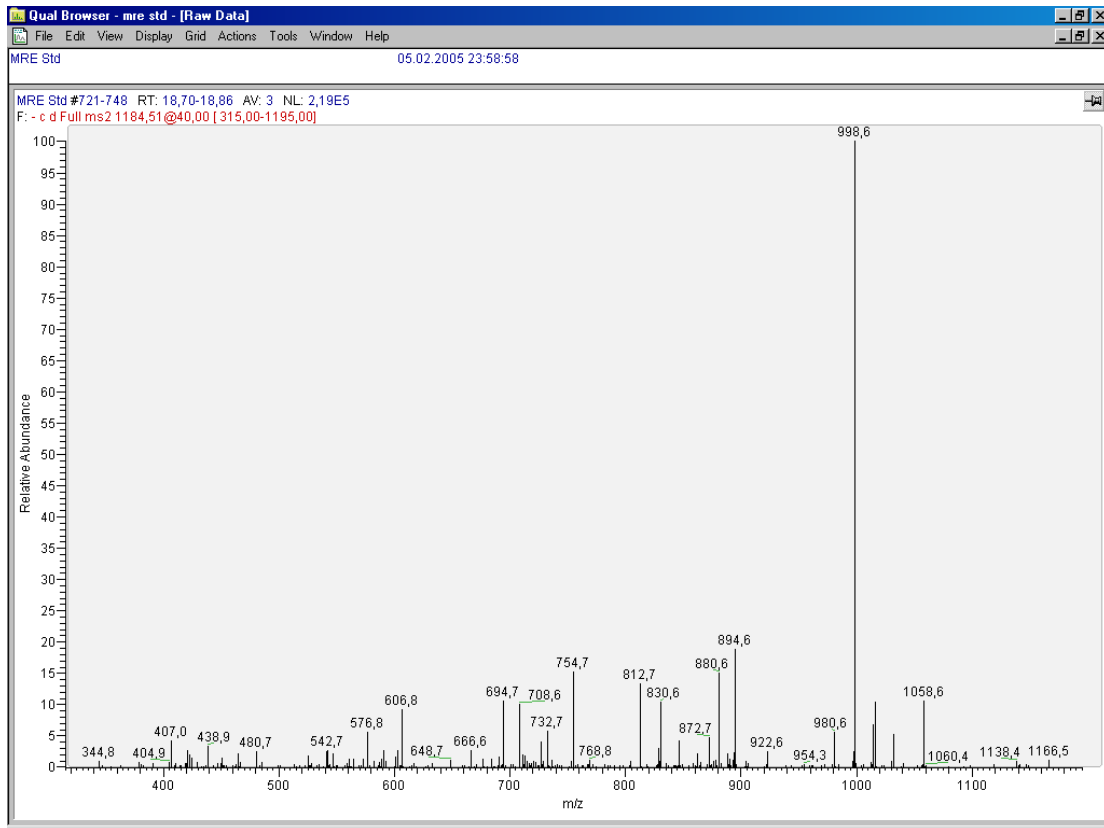


Abbildung A99: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 1185 bei 18,8 min

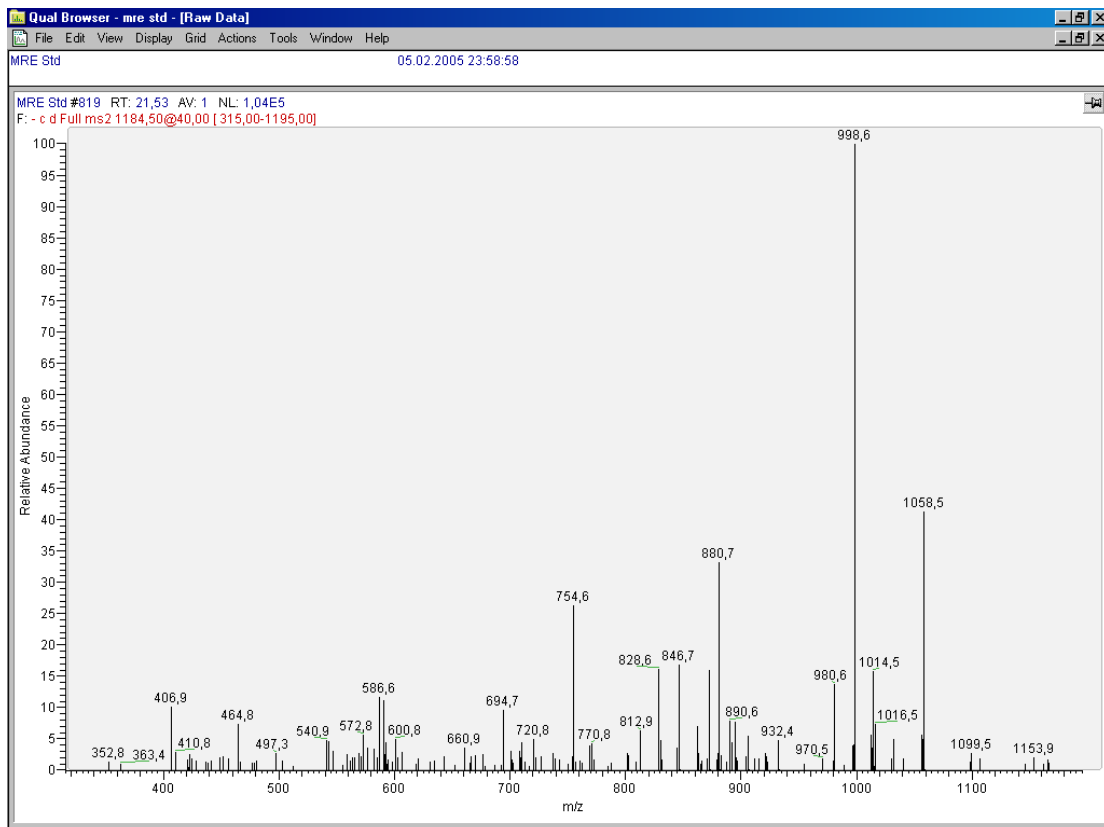


Abbildung A100: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 1185 bei 21,4 min

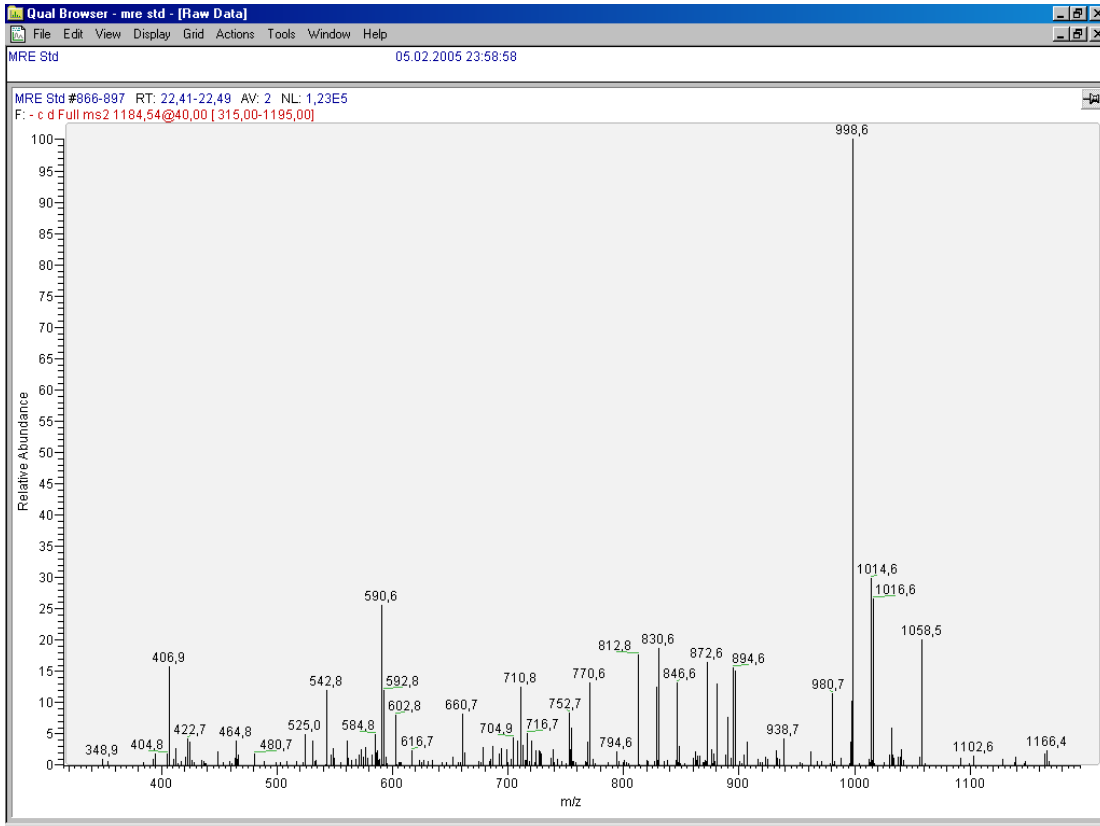


Abbildung A101: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 1185 bei 22,4 min

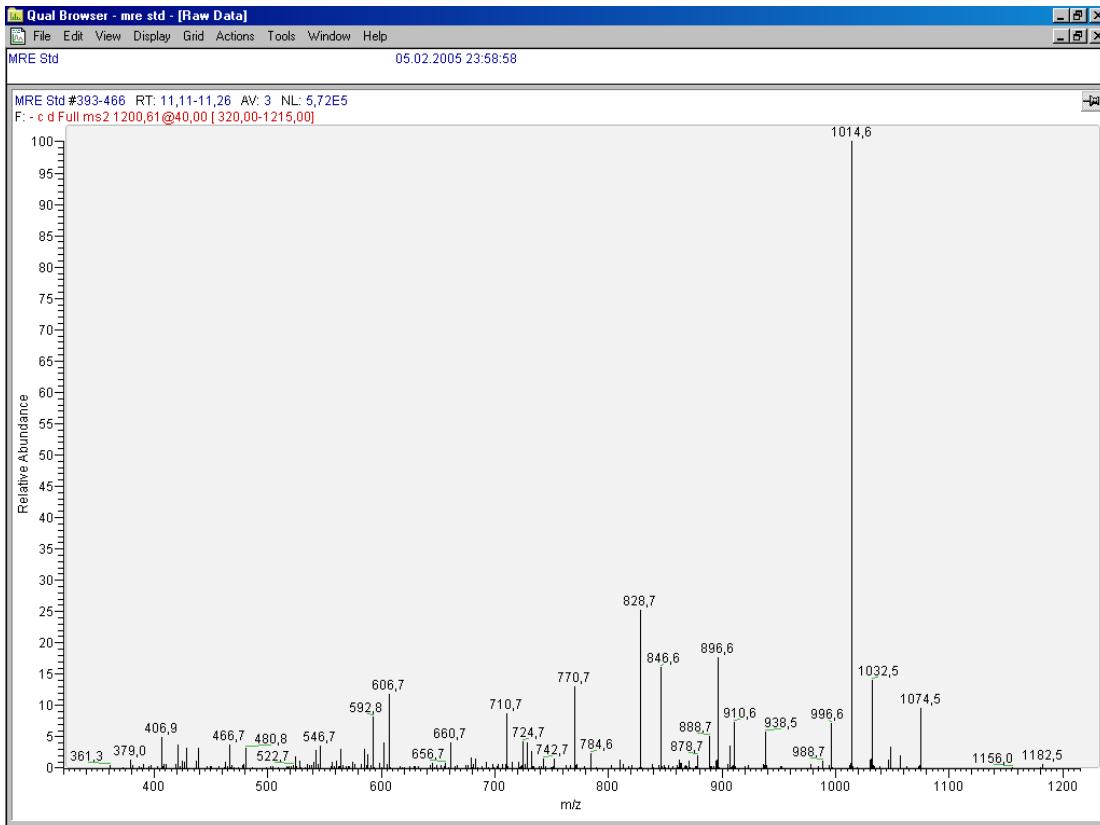


Abbildung A102: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 1201 bei 11,2 min



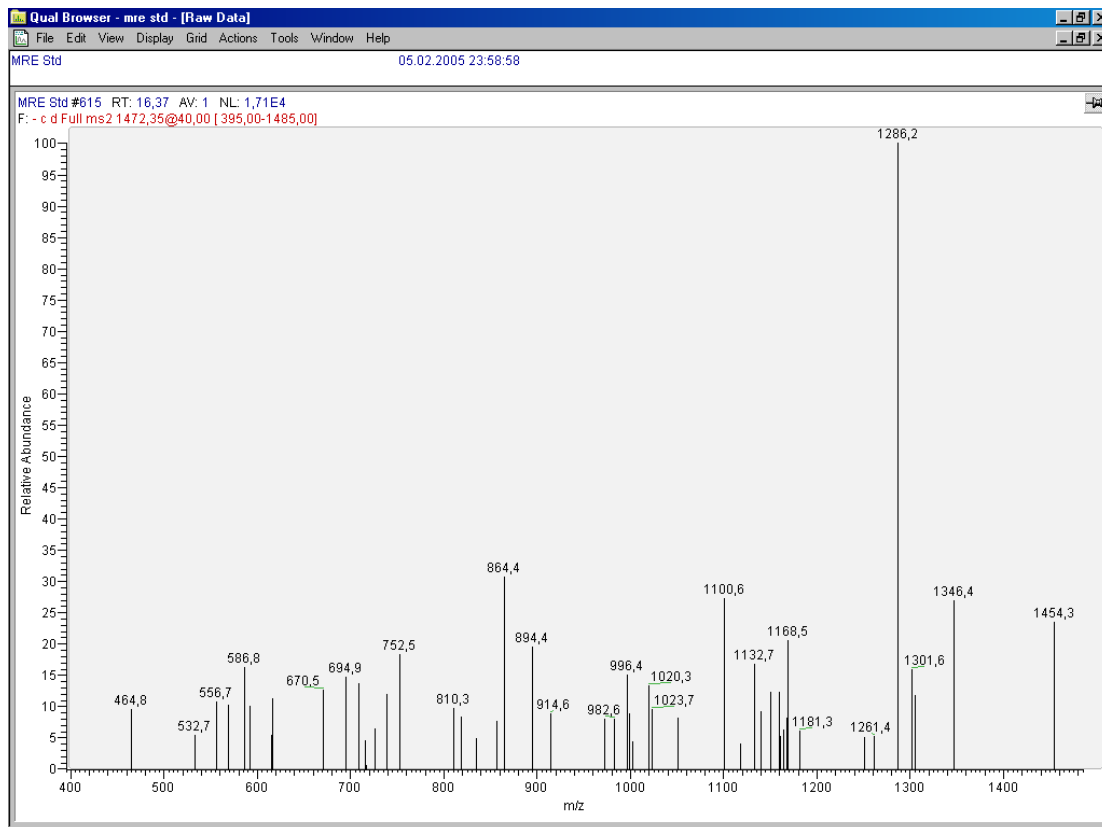


Abbildung A103: MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 1473 bei 16,8 min



## Anhang B – Abbildungen Flavanolglykoside in Malz

Die Abbildungen in diesem Anhang beziehen sich auf den Abschnitt 2.5-Flavanolglykoside in Gerstenmalz (Seite 107). Sie zeigen die Massenspuren der (epi)Catechin- und (epi)Gallocatechinhexoside und des dimeren Procyanidinhexosids sowie die Fragmentspektren aller signifikanten Peaks dieser Massenspuren. Eine tabellarische Übersicht der identifizierten Flavanolglykoside und der in den Fragmentspektren auftretenden Ionen findet sich in Tabelle 2.4-2 (Seite 117).

Da zur Aufnahme der Daten die einzelnen Verbindungen gezielt fragmentiert werden mussten, wurden mehrere Chromatogramme aufgenommen und die Retentionszeiten der einzelnen Peaks auf ein Referenzchromatogramm bezogen.

Die Massenspuren  $[M-H]^-$  sind den Flavanolglykosiden wie folgt zuzuordnen:

(epi)Catechinhexosid	451
(epi)Catechindihexosid	613
(epi)Catechintrihexosid	775
(epi)Catechintetrahexosid	937
(epi)Gallocatechinhexosid	467
(epi)Gallocatechindihexosid	629
Dimeres Procyanidinhexosid	739

## Anhang B – Abbildungen Flavanolglykoside in Malz

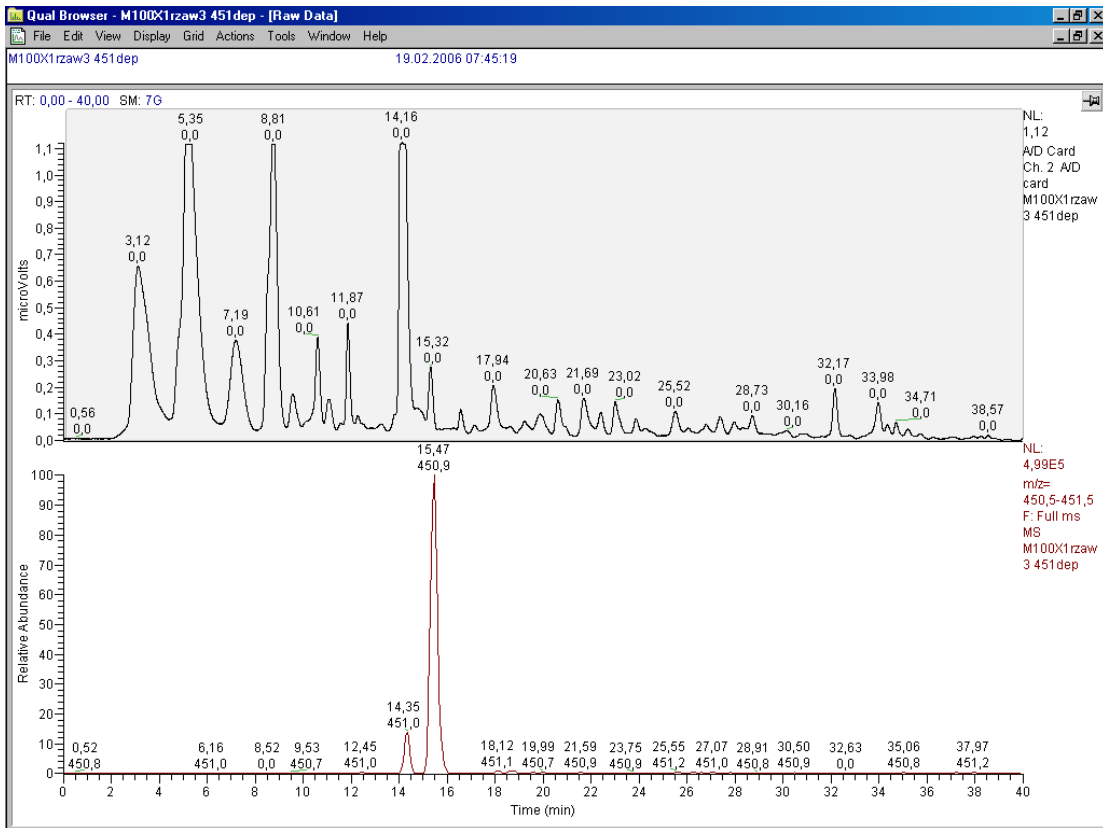


Abbildung B1: Oben: UV 280 nm. Unten: Massenspur 451

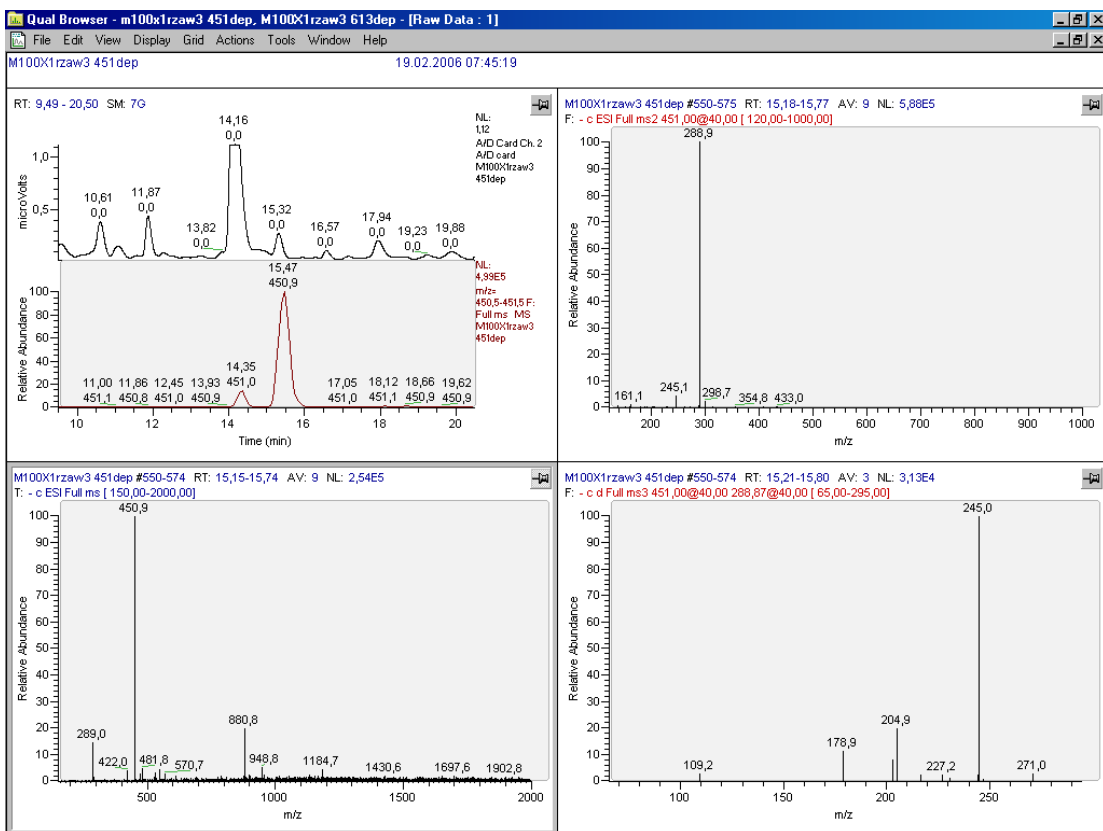


Abbildung B2: Links oben: UV 280 nm und Massenspur 451. Links unten: MS-Spektrum des Peaks bei 15,5 min. Rechts oben: MS2-Spektrum von 451. Rechts unten: MS3-Spektrum 451→289

## Anhang B – Abbildungen Flavanolglykoside in Malz

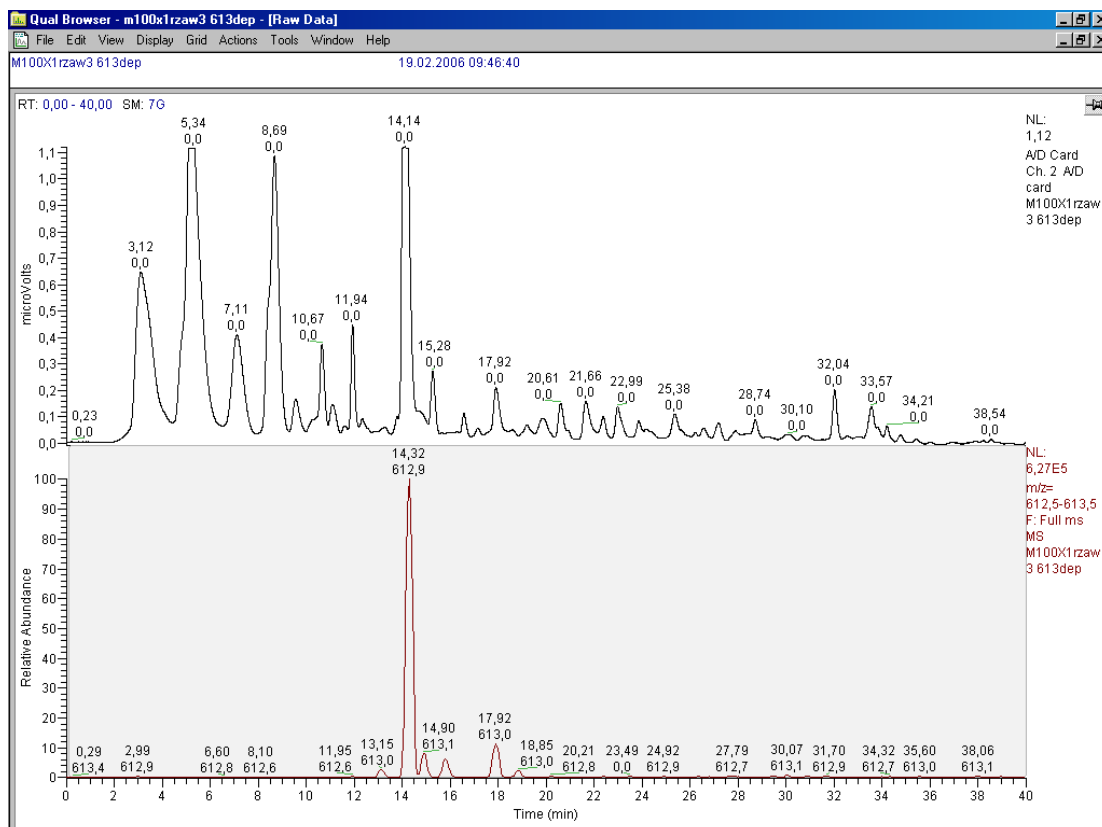


Abbildung B3: Oben: UV 280 nm. Unten: Massenspur 613

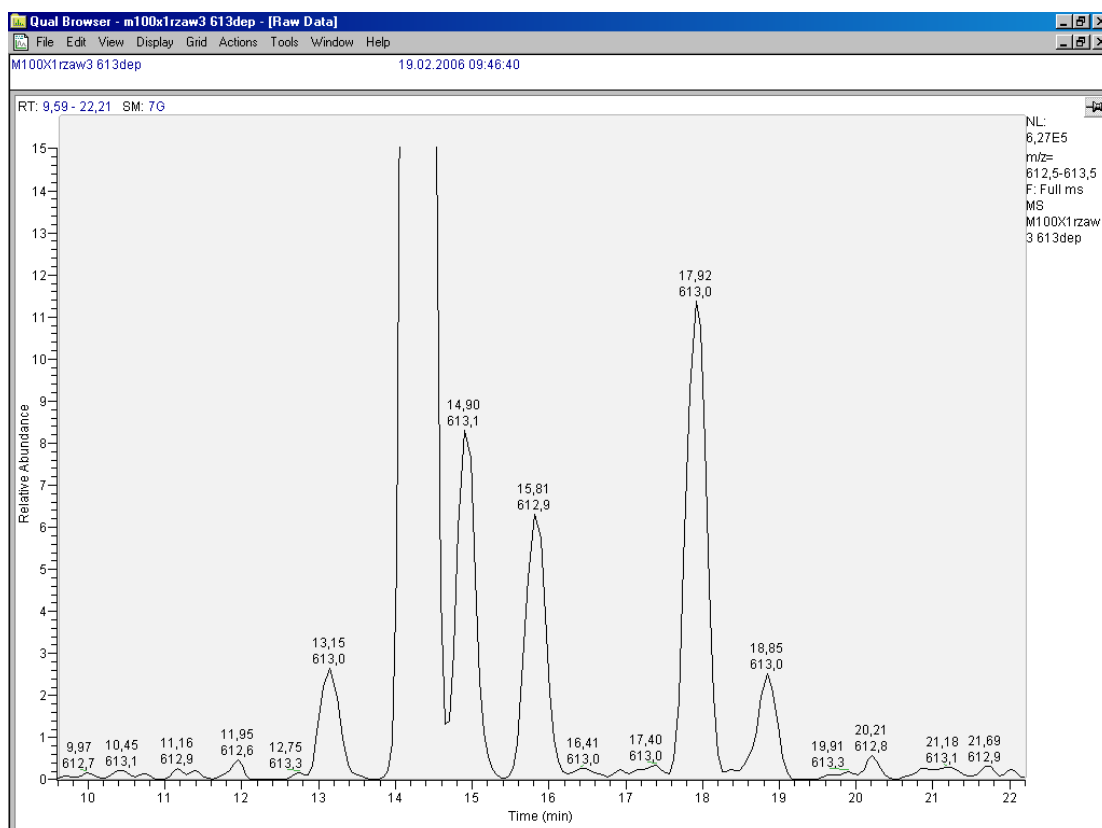


Abbildung B4: Ausschnitt Massenspur 613 vergrößert (15% der Maximalintensität)

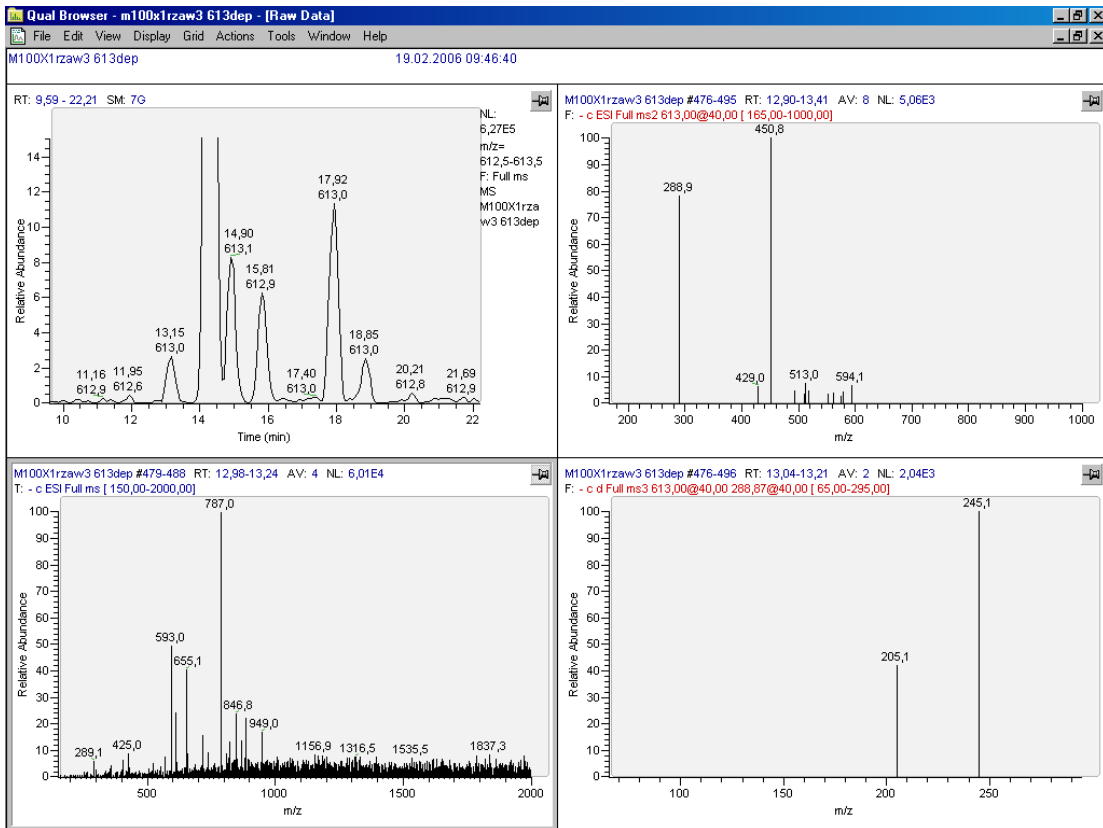


Abbildung B5: Links oben: Massenspur 613. Links unten: MS-Spektrum des Peaks bei 13,2 min. Rechts oben: MS<sup>2</sup>-Spektrum 613. Rechts unten: MS<sup>3</sup>-Spektrum 613→289

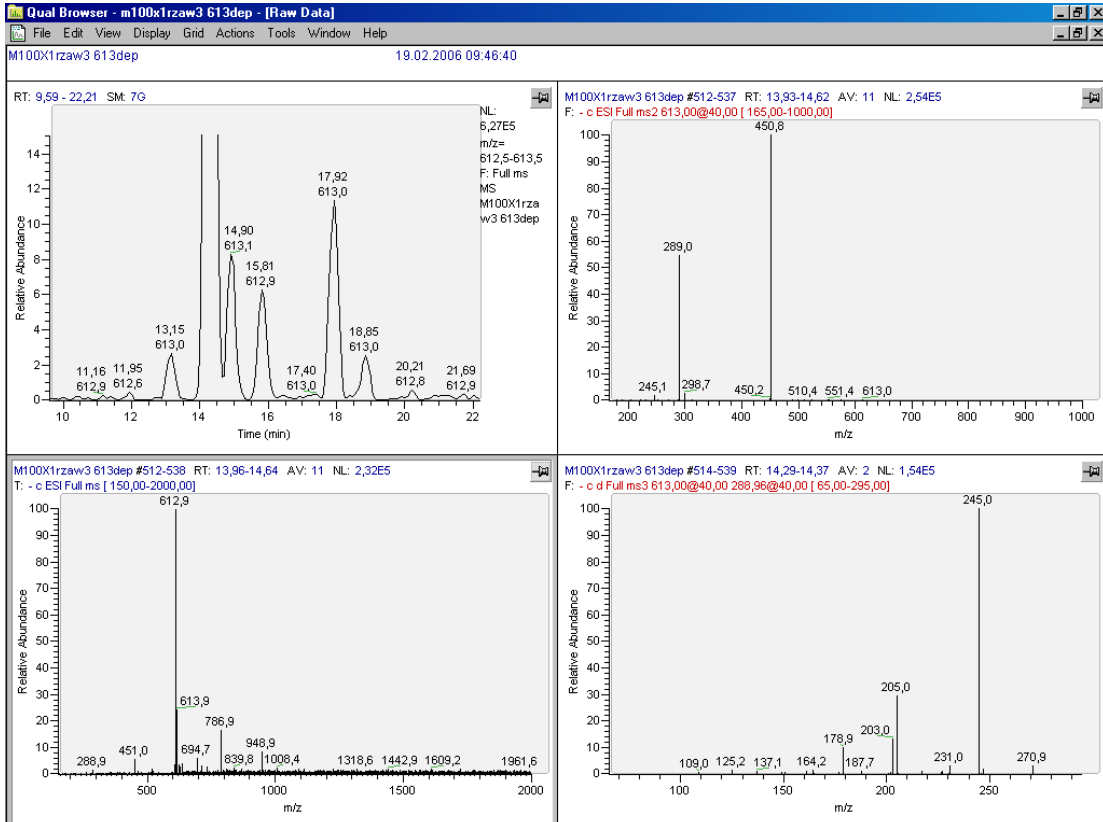


Abbildung B6: Links oben: Massenspur 613. Links unten: MS-Spektrum des Peaks bei 14,3 min. Rechts oben: MS<sup>2</sup>-Spektrum 613. Rechts unten: MS<sup>3</sup>-Spektrum 613→289

## Anhang B – Abbildungen Flavanolglykoside in Malz

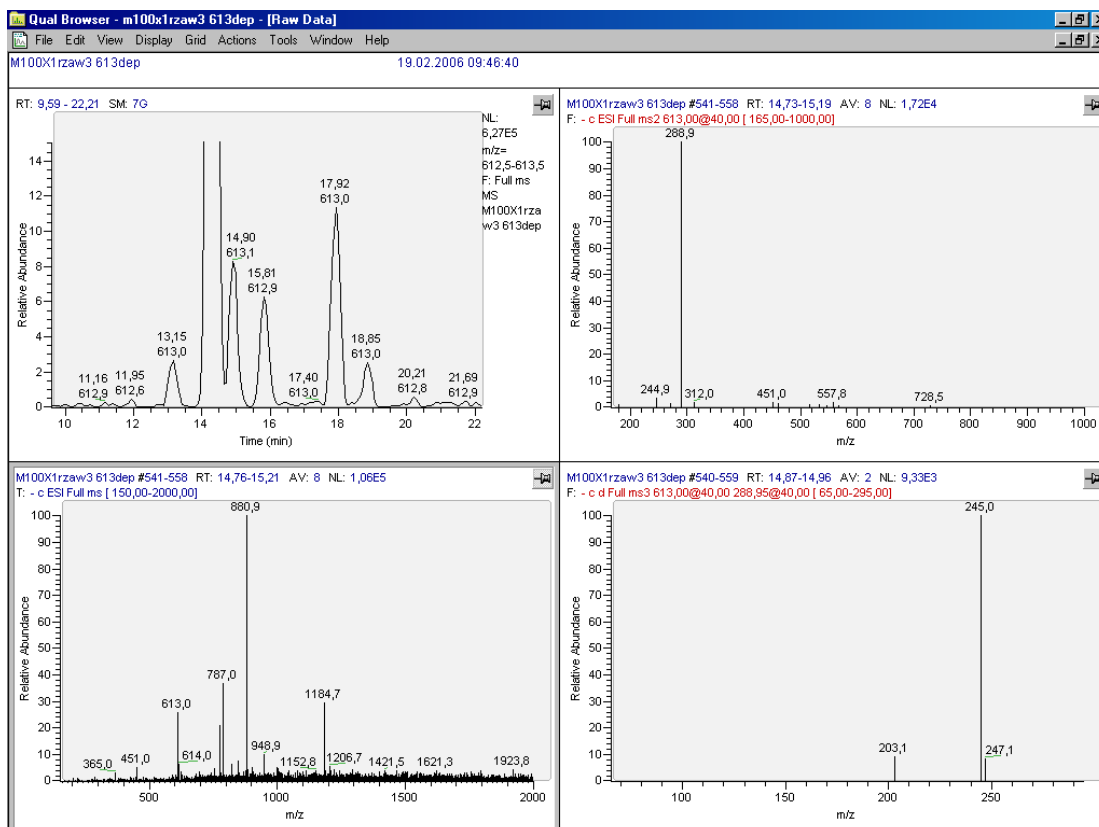


Abbildung B7: Links oben: Massenspur 613. Links unten: MS-Spektrum des Peaks bei 14,9 min. Rechts oben: MS<sup>2</sup>-Spektrum 613. Rechts unten: MS<sup>3</sup>-Spektrum 613→289

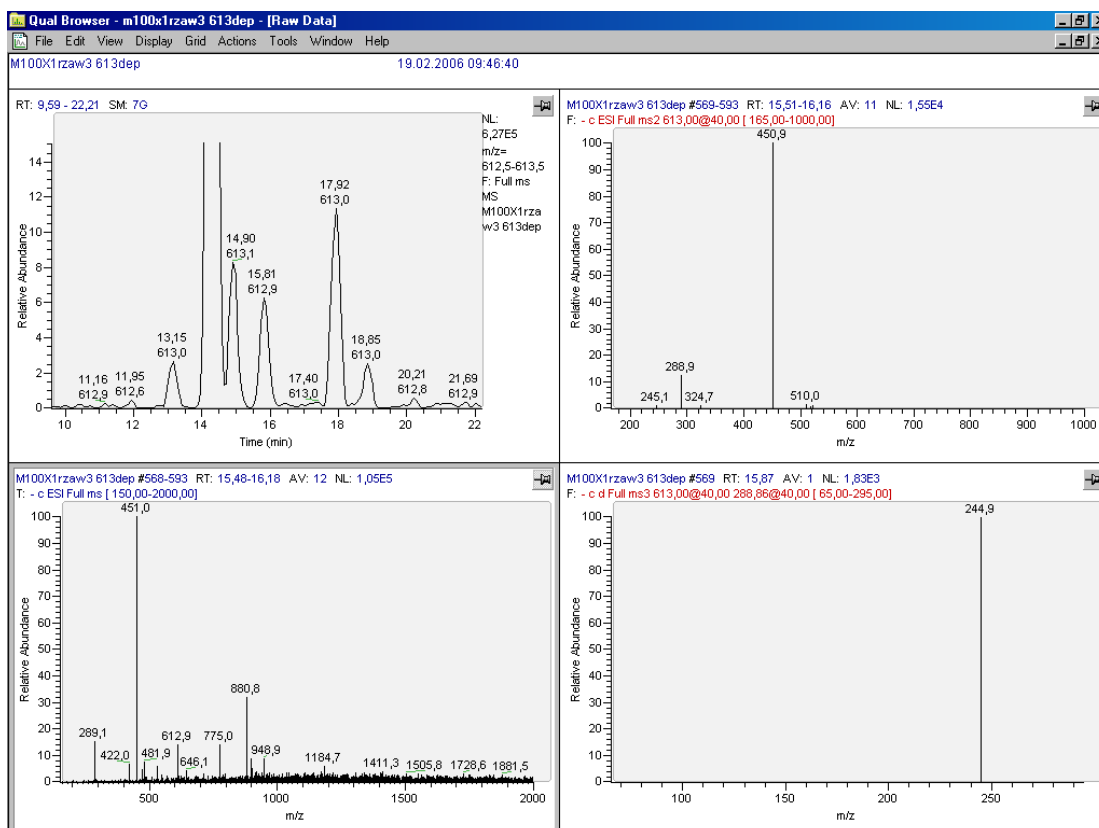


Abbildung B8: Links oben: Massenspur 613. Links unten: MS-Spektrum des Peaks bei 15,8 min. Rechts oben: MS<sup>2</sup>-Spektrum 613. Rechts unten: MS<sup>3</sup>-Spektrum 613→289

## Anhang B – Abbildungen Flavanolglykoside in Malz

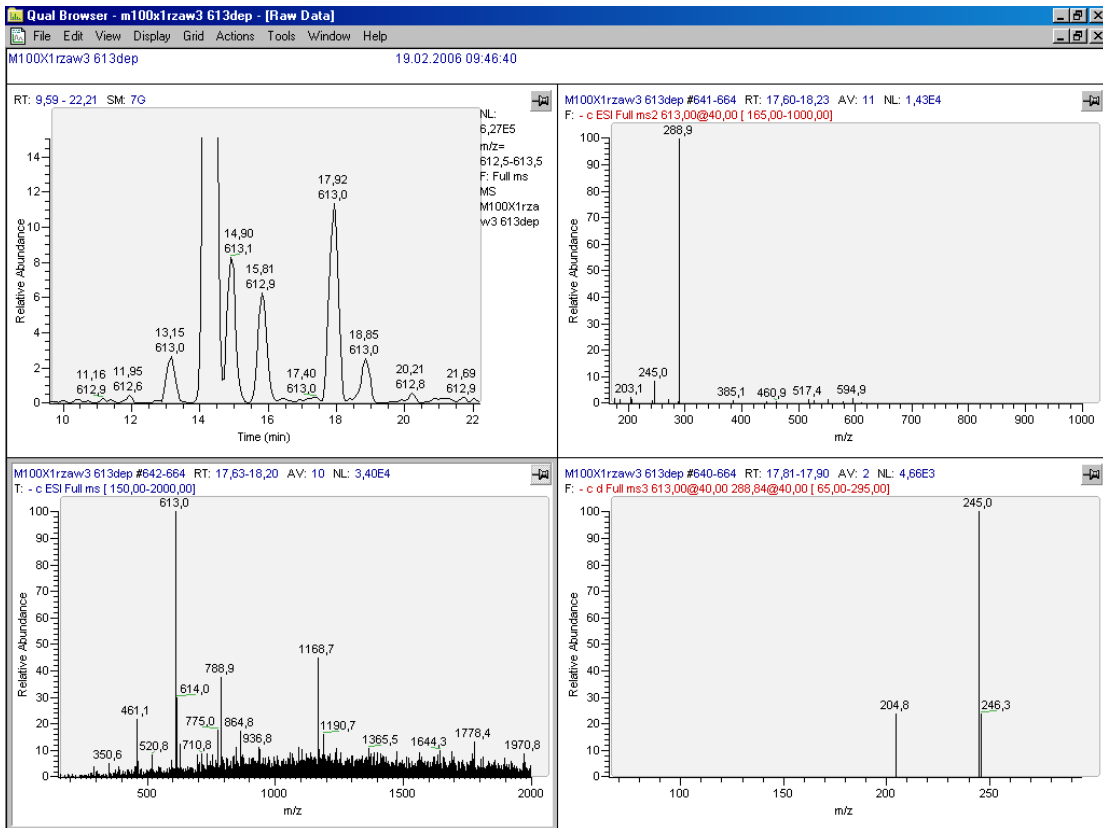


Abbildung B9: Links oben: Massenspur 613. Links unten: MS-Spektrum des Peaks bei 17,9 min. Rechts oben: MS<sup>2</sup>-Spektrum 613. Rechts unten: MS<sup>3</sup>-Spektrum 613→289

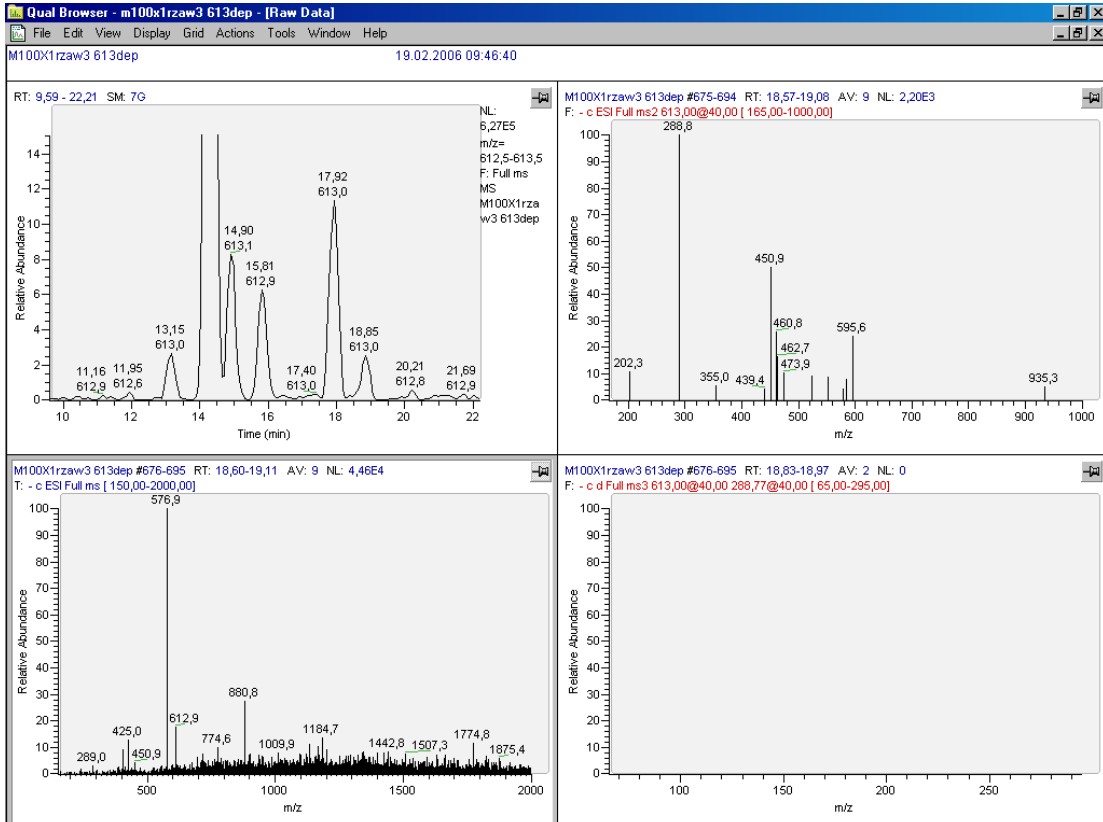


Abbildung B10: Links oben: Massenspur 613. Links unten: MS-Spektrum des Peaks bei 18,9 min. Rechts oben: MS<sup>2</sup>-Spektrum 613. Rechts unten: MS<sup>3</sup>-Spektrum 613→289



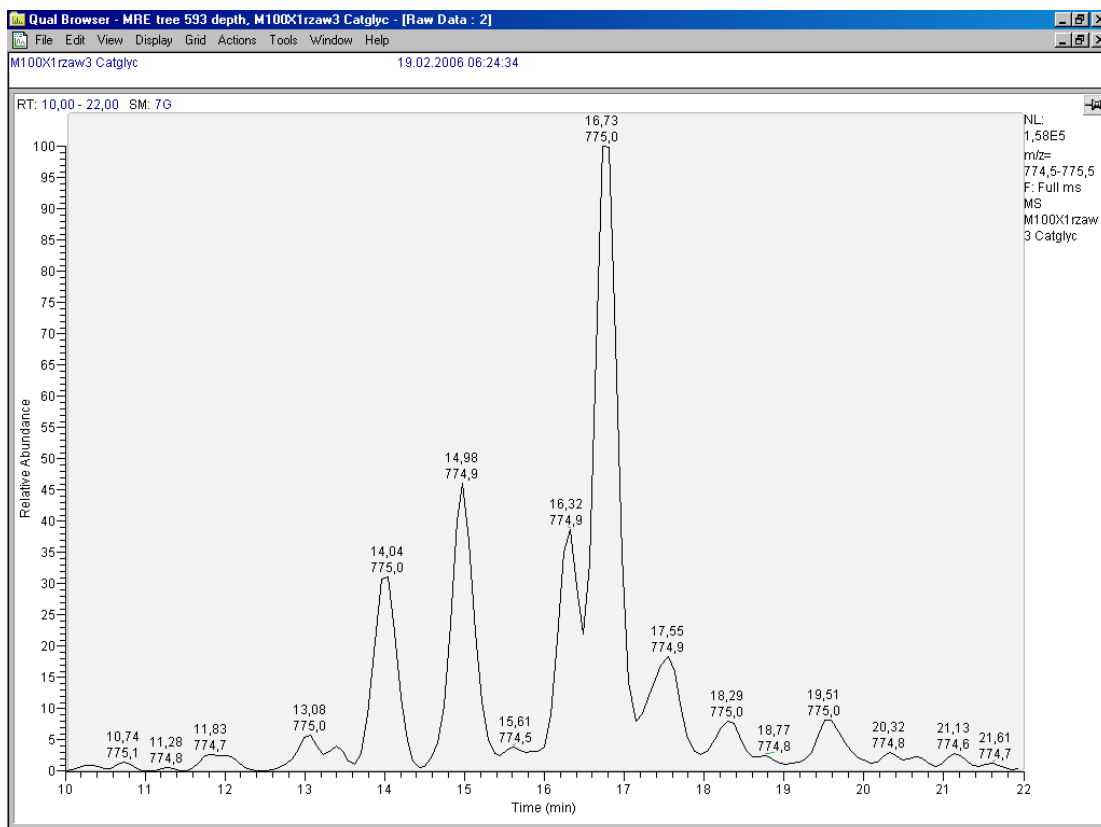


Abbildung B11: Ausschnitt Massenspur 775

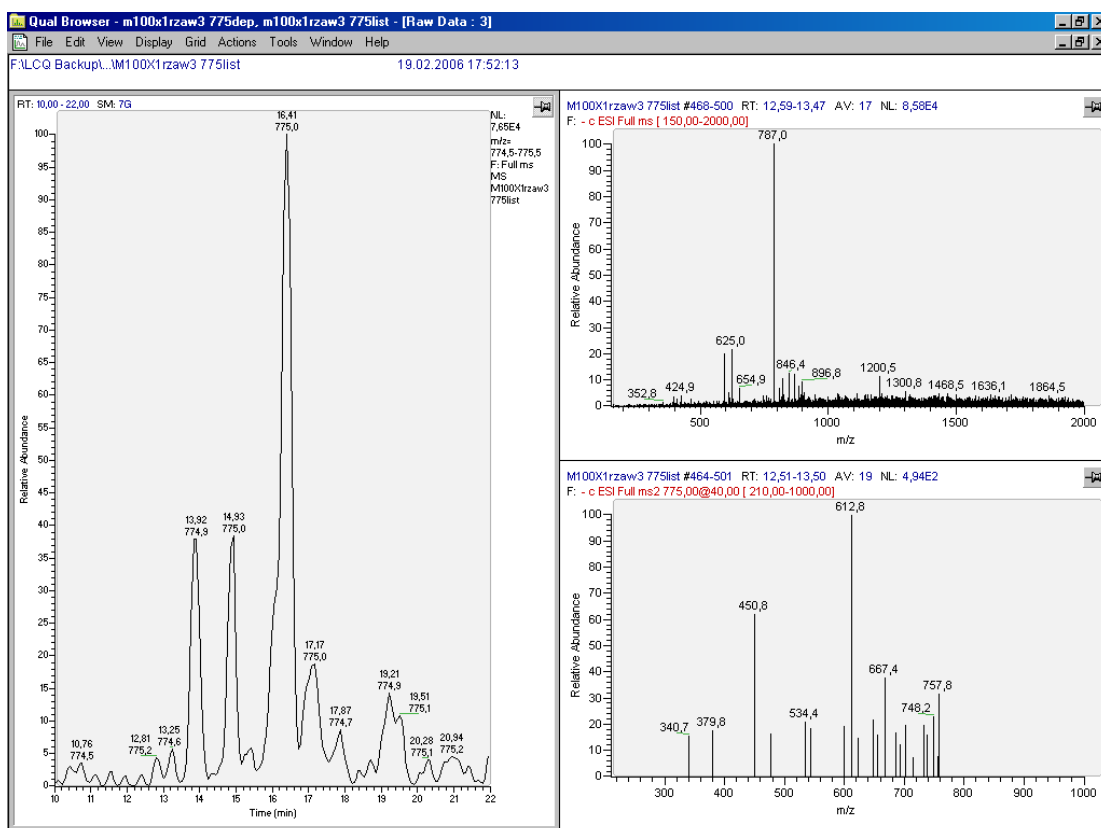


Abbildung B12: Links: Massenspur 775. Rechts oben: MS-Spektrum des Peaks bei 13,1 min. Rechts unten: MS<sup>2</sup>-Spektrum 775

## Anhang B – Abbildungen Flavanolglykoside in Malz

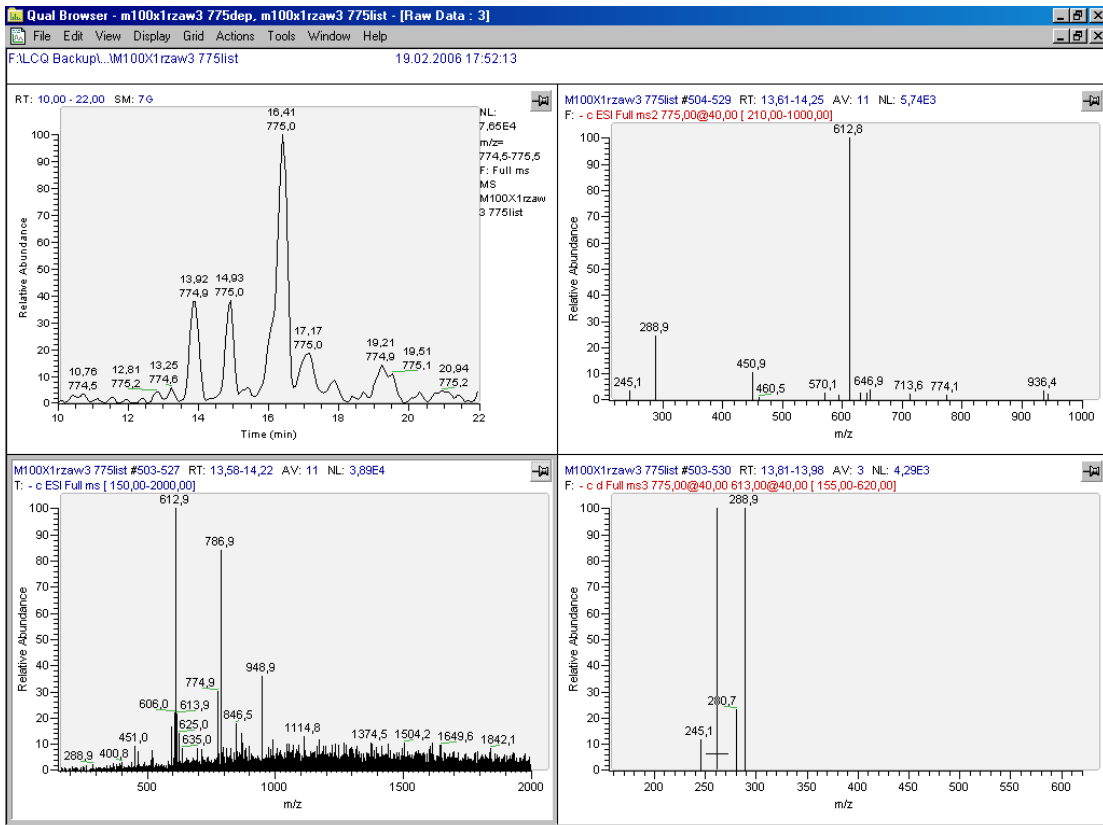


Abbildung B13: Links oben: Massenspur 775. Links unten: MS-Spektrum des Peaks bei 14,0 min. Rechts oben: MS<sup>2</sup>-Spektrum 775. Rechts unten: MS<sup>3</sup>-Spektrum 775→613

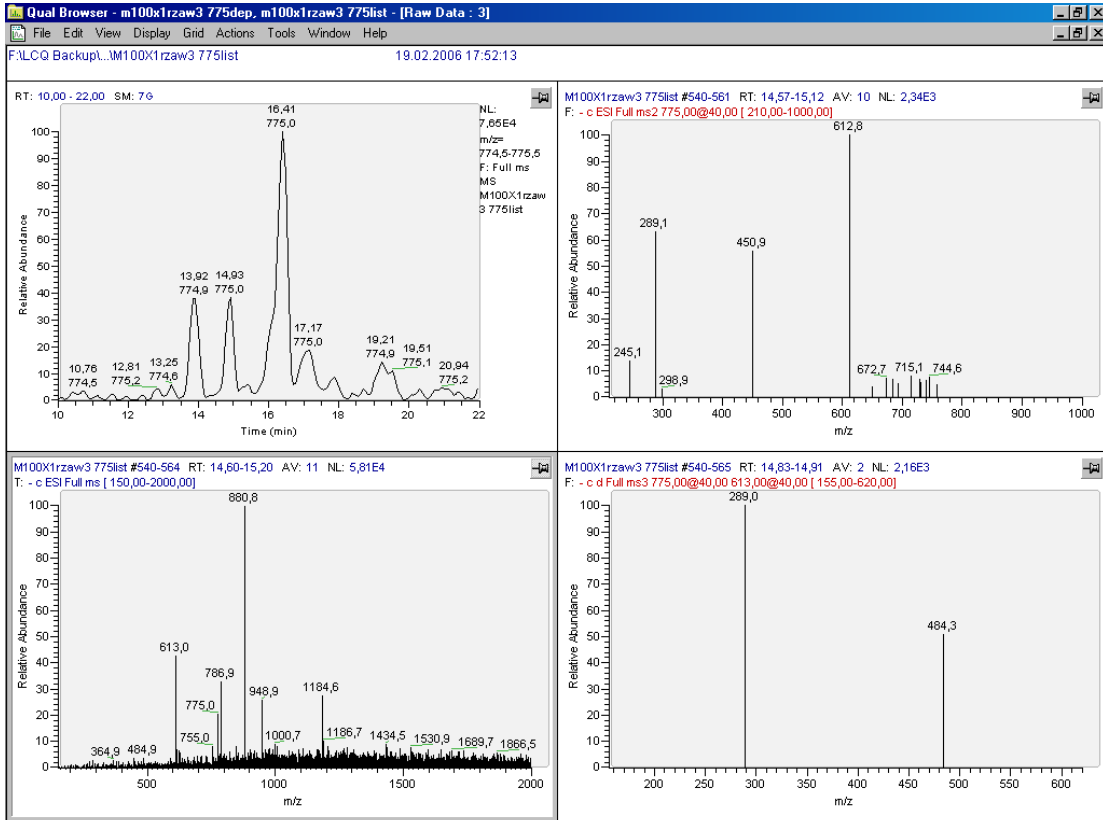


Abbildung B14: Links oben: Massenspur 775. Links unten: MS-Spektrum des Peaks bei 15,0 min. Rechts oben: MS<sup>2</sup>-Spektrum 775. Rechts unten: MS<sup>3</sup>-Spektrum 775→613

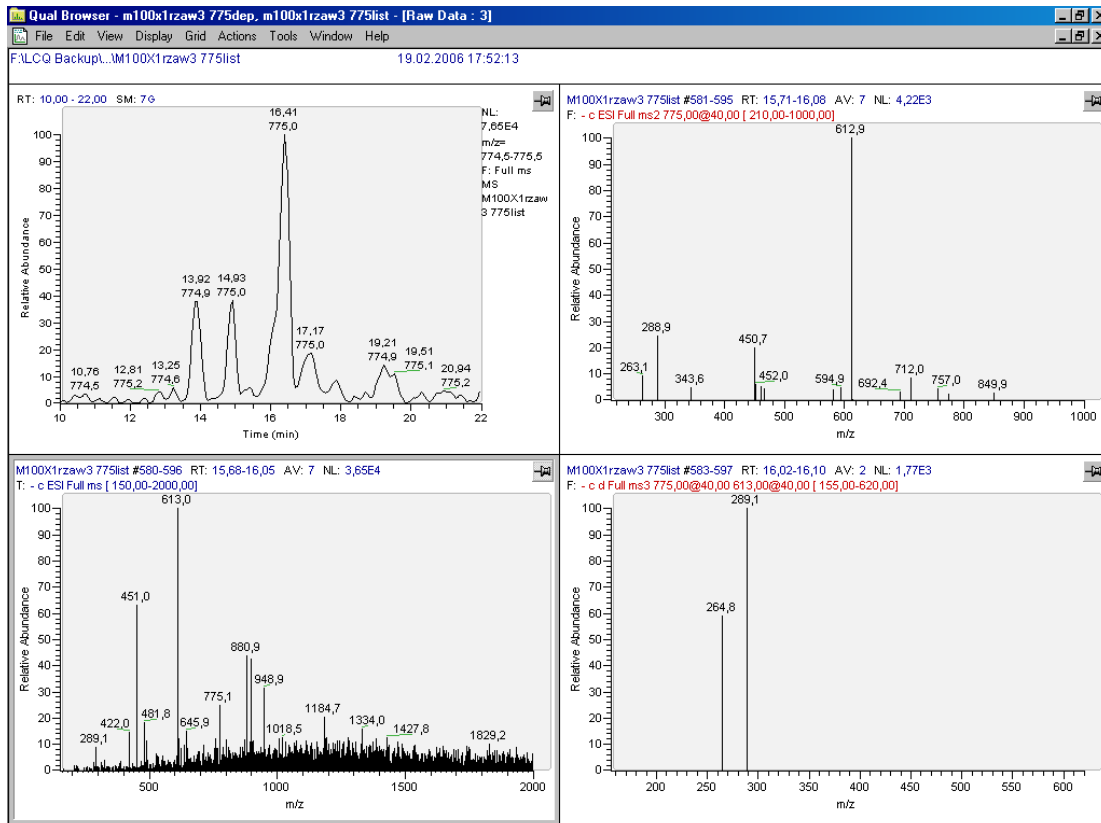


Abbildung B15: Links oben: Massenspur 775. Links unten: MS-Spektrum des Peaks bei 16,3 min. Rechts oben: MS<sup>2</sup>-Spektrum 775. Rechts unten: MS<sup>3</sup>-Spektrum 775→613

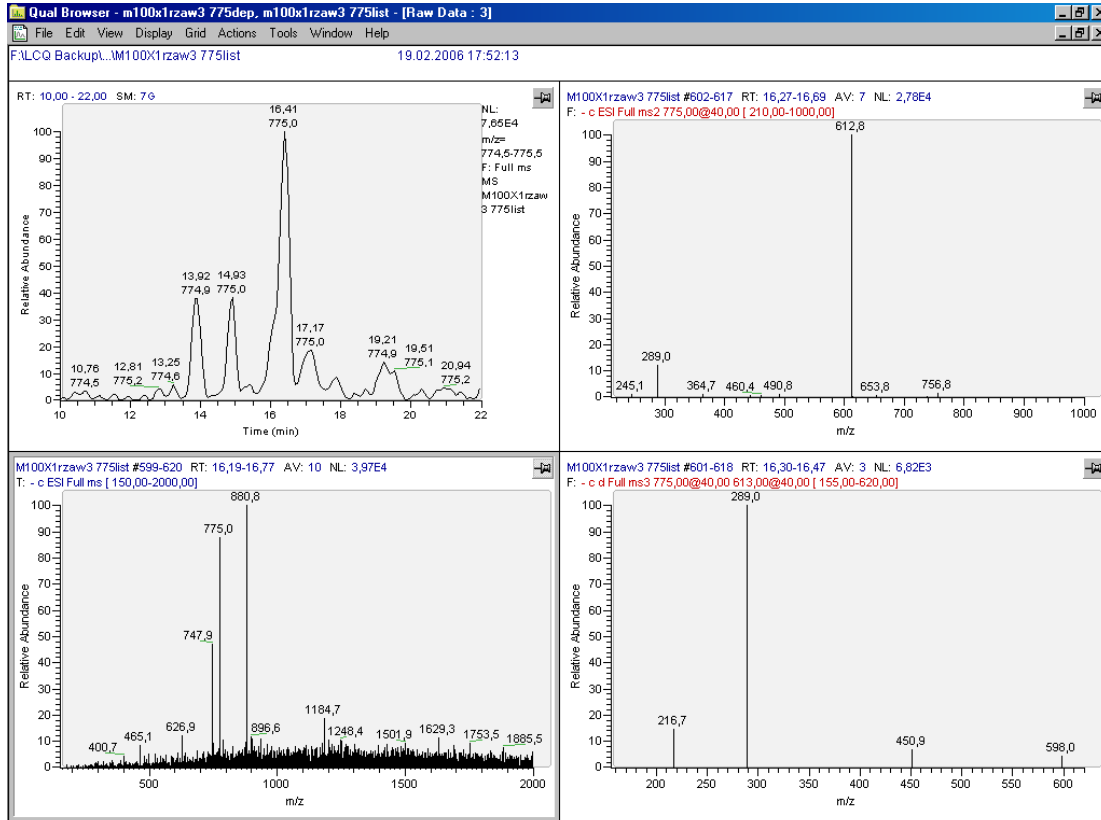


Abbildung B16: Links oben: Massenspur 775. Links unten: MS-Spektrum des Peaks bei 16,7 min. Rechts oben: MS<sup>2</sup>-Spektrum 775. Rechts unten: MS<sup>3</sup>-Spektrum 775→613

## Anhang B – Abbildungen Flavanolglykoside in Malz

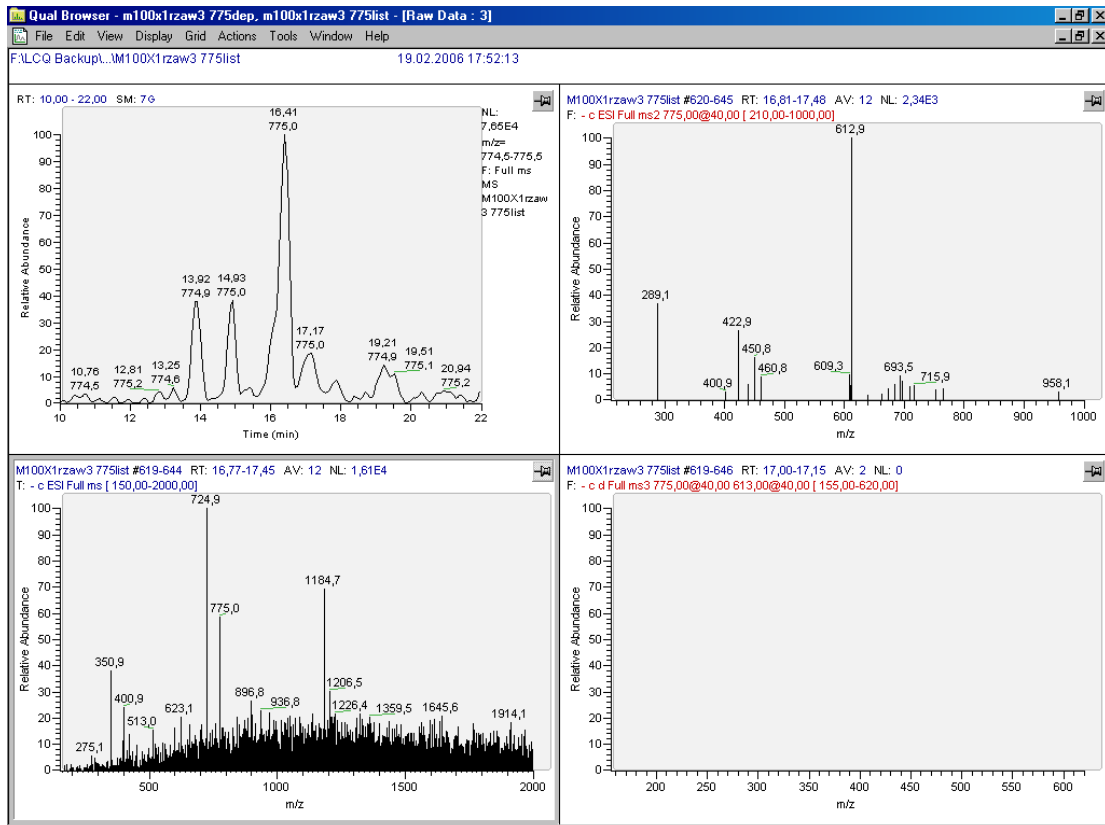


Abbildung B17: Links oben: Massenspur 775. Links unten: MS-Spektrum des Peaks bei 17,6 min. Rechts oben: MS<sup>2</sup>-Spektrum 775. Rechts unten: MS<sup>3</sup>-Spektrum 775→613

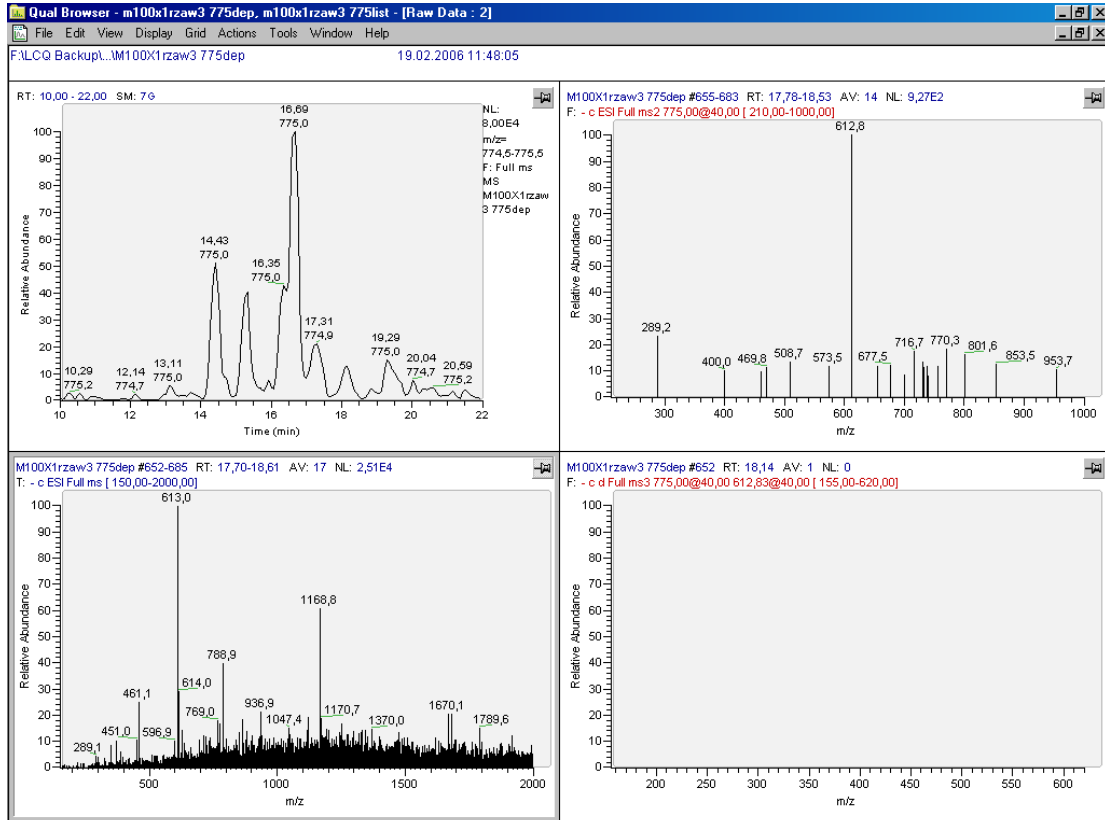


Abbildung B18: Links oben: Massenspur 775. Links unten: MS-Spektrum des Peaks bei 18,3 min. Rechts oben: MS<sup>2</sup>-Spektrum 775. Rechts unten: MS<sup>3</sup>-Spektrum 775→613

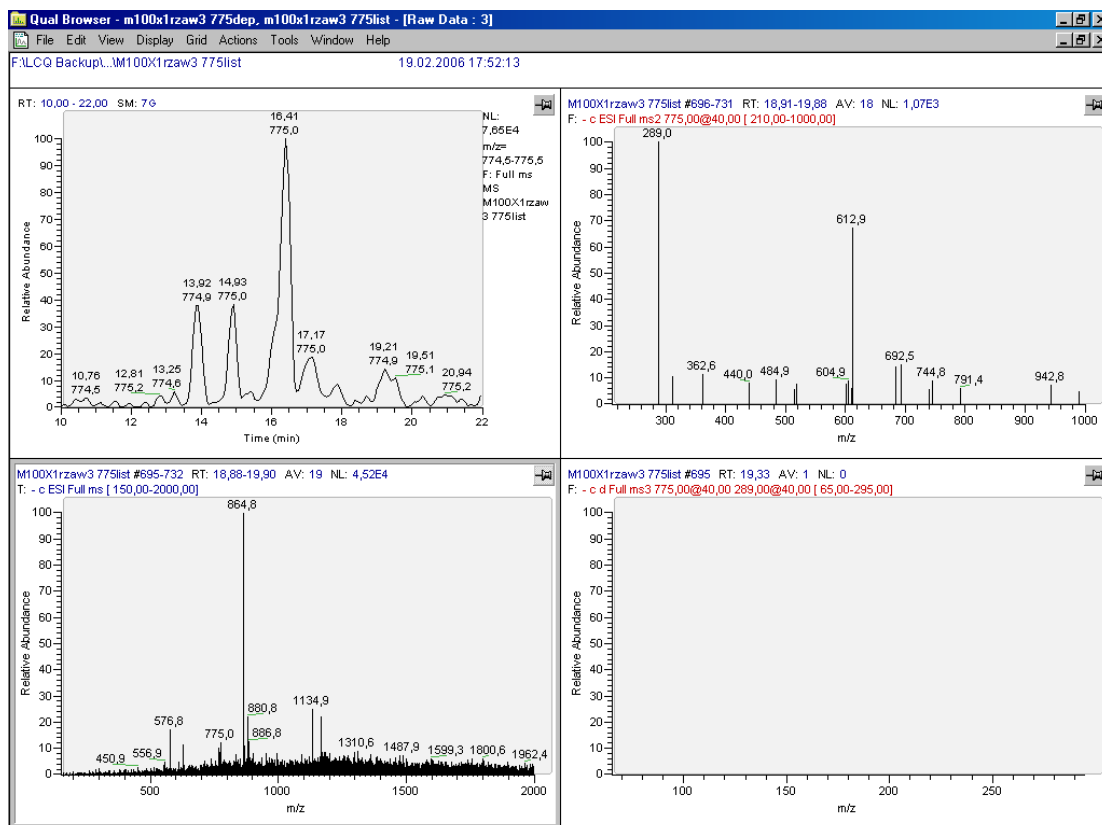


Abbildung B19: Links oben: Massenspur 775. Links unten: MS-Spektrum des Peaks bei 19,5 min. Rechts oben: MS<sup>2</sup>-Spektrum 775. Rechts unten: MS<sup>3</sup>-Spektrum 775→613

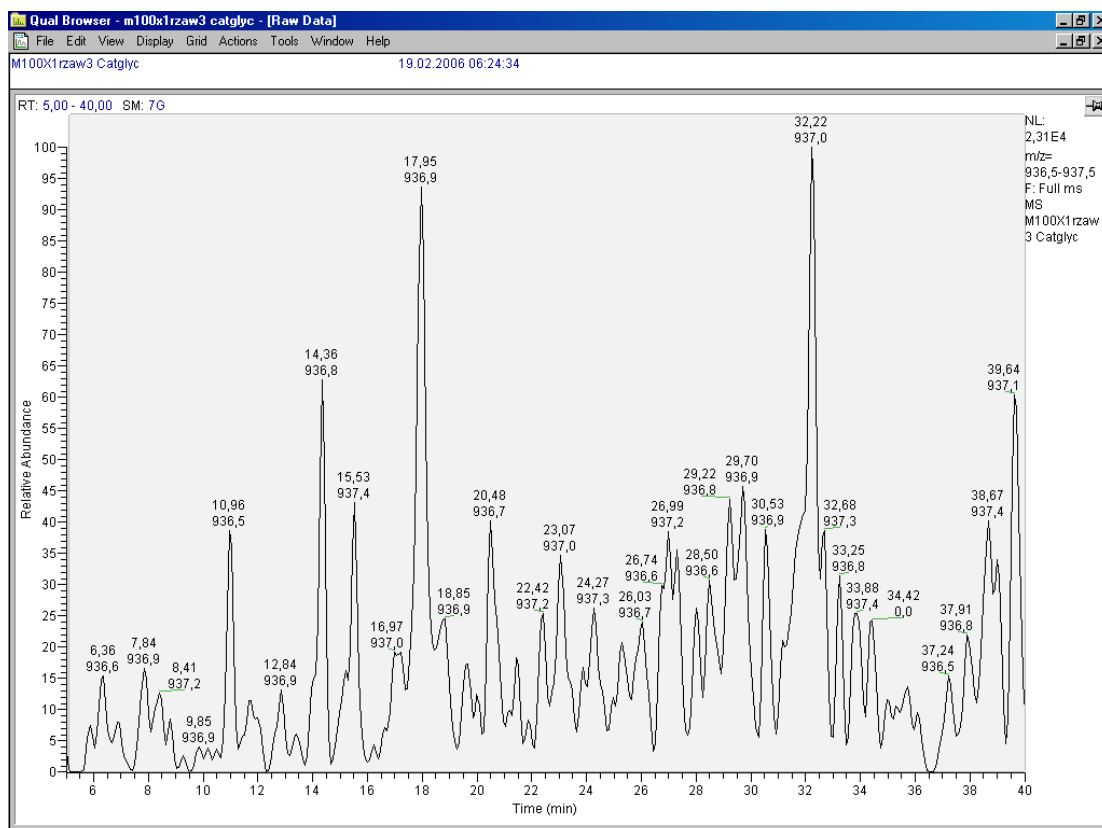


Abbildung B20: Ausschnitt Massenspur 937

## Anhang B – Abbildungen Flavanolglykoside in Malz

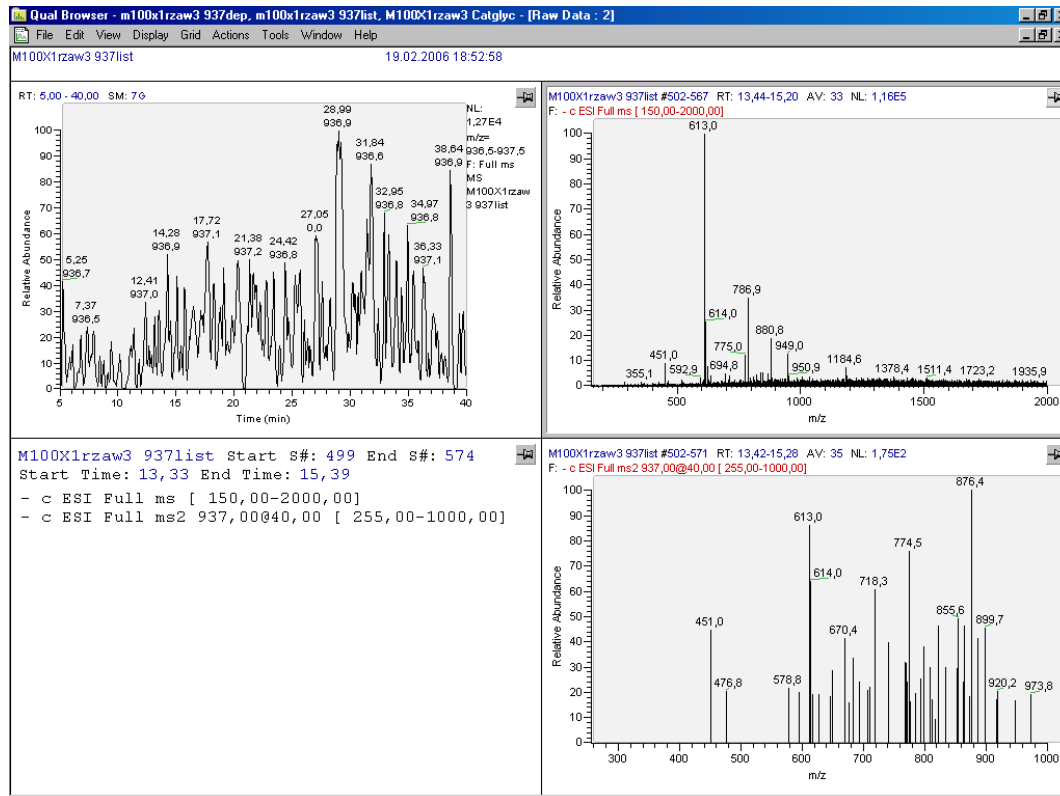


Abbildung B21: Links oben: Massenspur 937. Rechts oben: MS-Spektrum des Peaks bei 14,4 min. Rechts unten: MS<sup>2</sup>-Spektrum 937

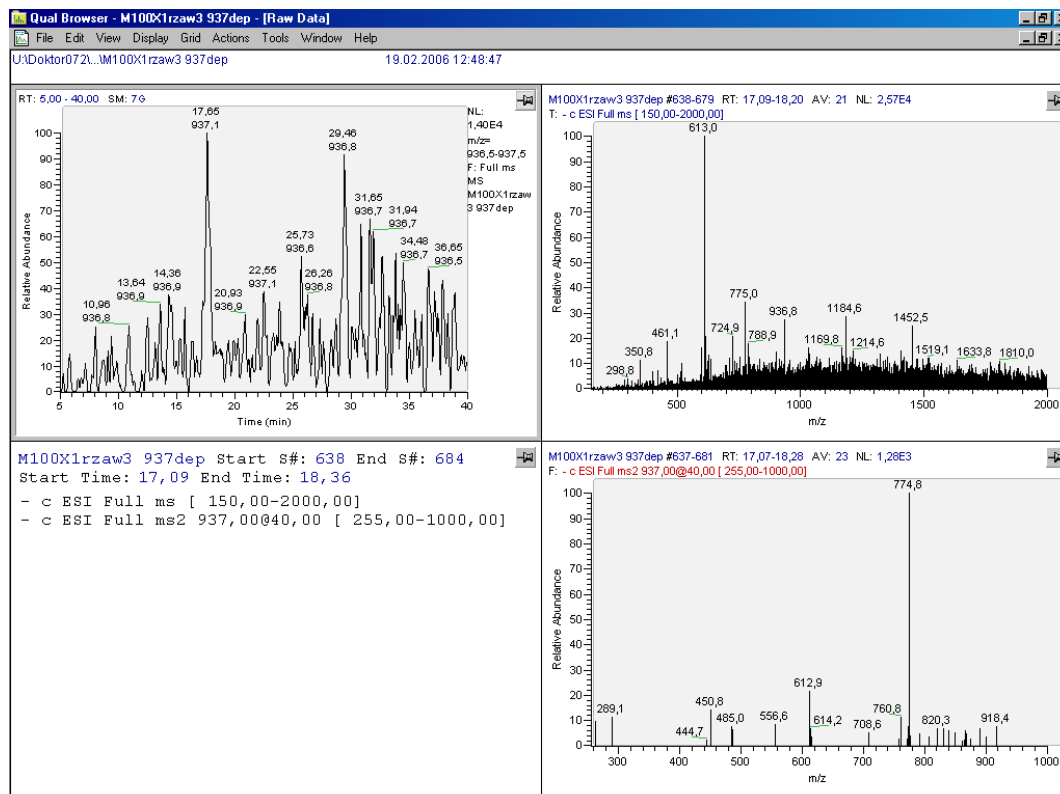


Abbildung B22: Links oben: Massenspur 937. Rechts oben: MS-Spektrum des Peaks bei 18,0 min. Rechts unten: MS<sup>2</sup>-Spektrum 937

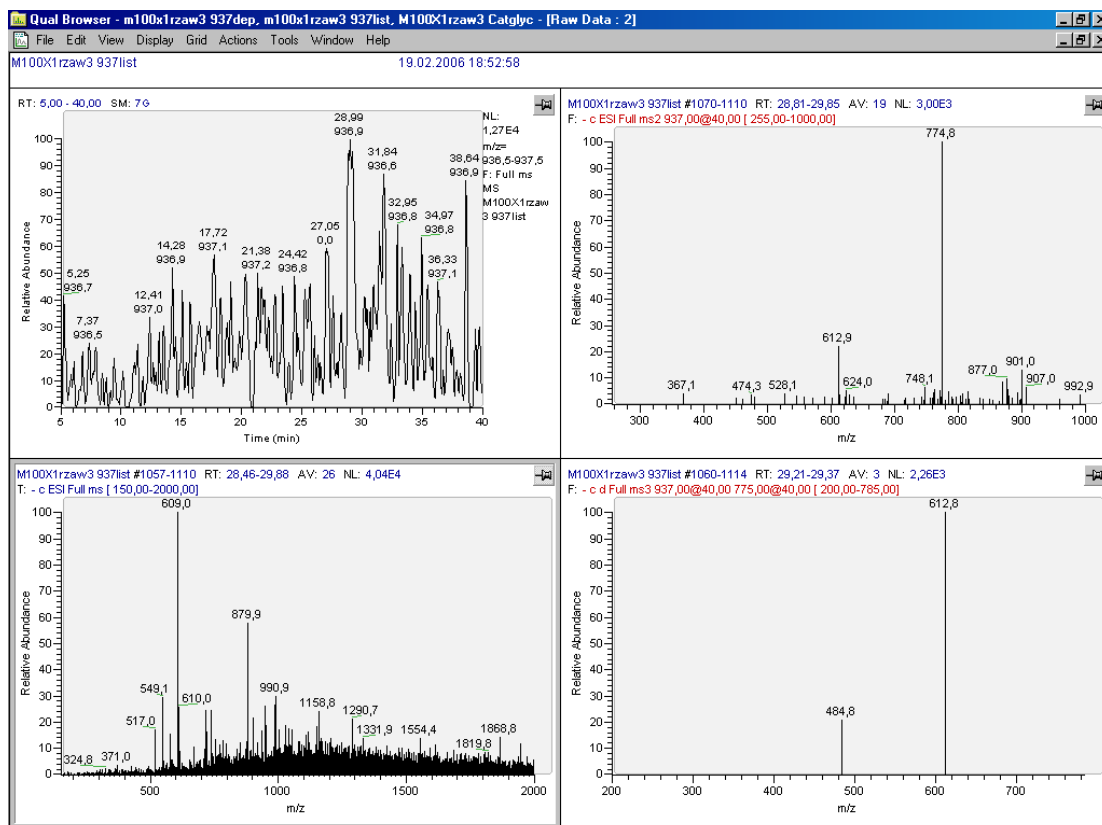


Abbildung B23: Links oben: Massenspur 937. Links unten: MS-Spektrum des Peaks bei 29,0 min. Rechts oben: MS<sup>2</sup>-Spektrum 937. Rechts unten: MS<sup>3</sup>-Spektrum 937→775

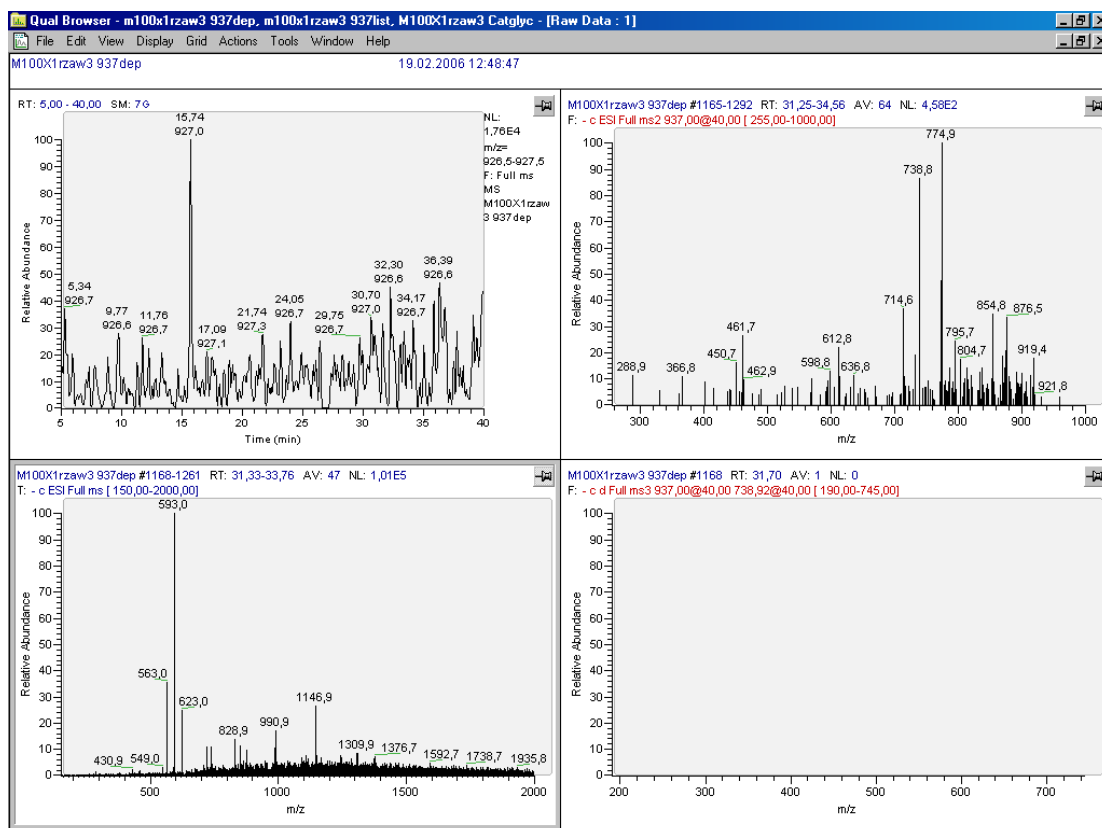


Abbildung B24: Links oben: Massenspur 937. Links unten: MS-Spektrum des Peaks bei 32,2 min. Rechts oben: MS<sup>2</sup>-Spektrum 937. Rechts unten: MS<sup>3</sup>-Spektrum 937→739

## Anhang B – Abbildungen Flavanolglykoside in Malz

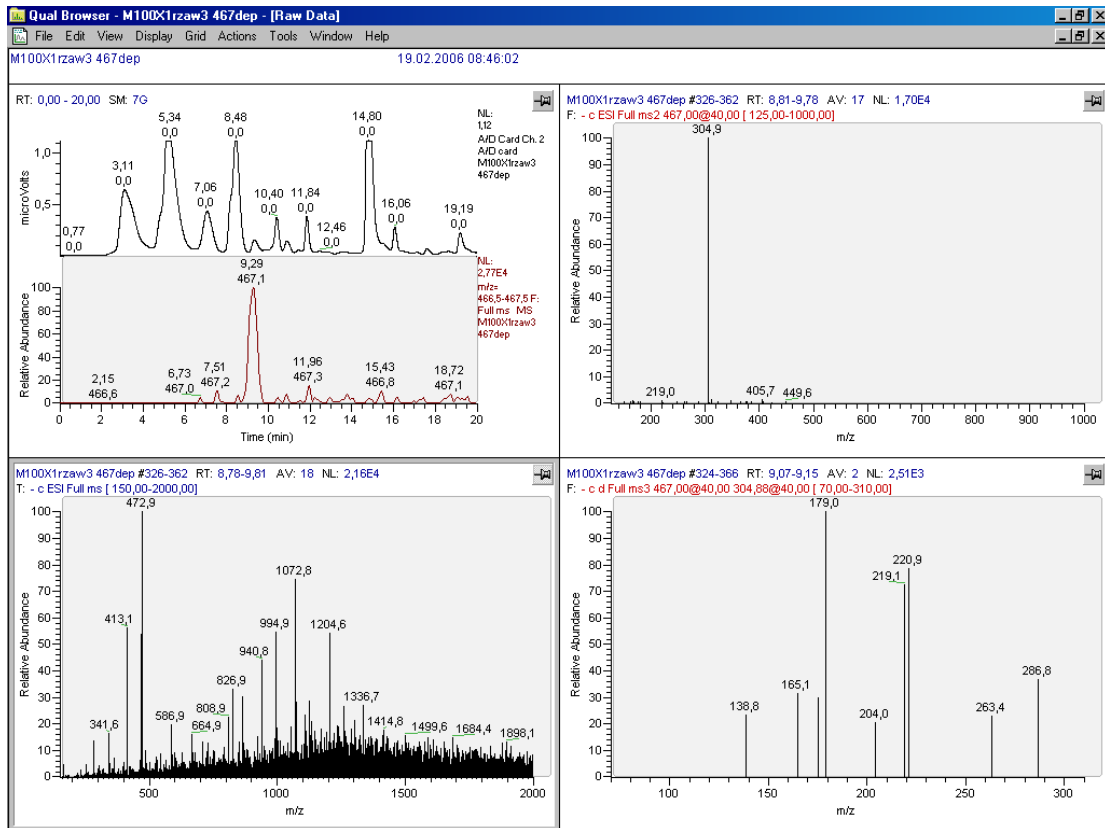


Abbildung B25: Links oben: UV 280 nm und Massenspur 467. Links unten: MS-Spektrum des Peaks bei 9,3 min. Rechts oben: MS<sup>2</sup>-Spektrum 467. Rechts unten: MS<sup>3</sup>-Spektrum 467→305

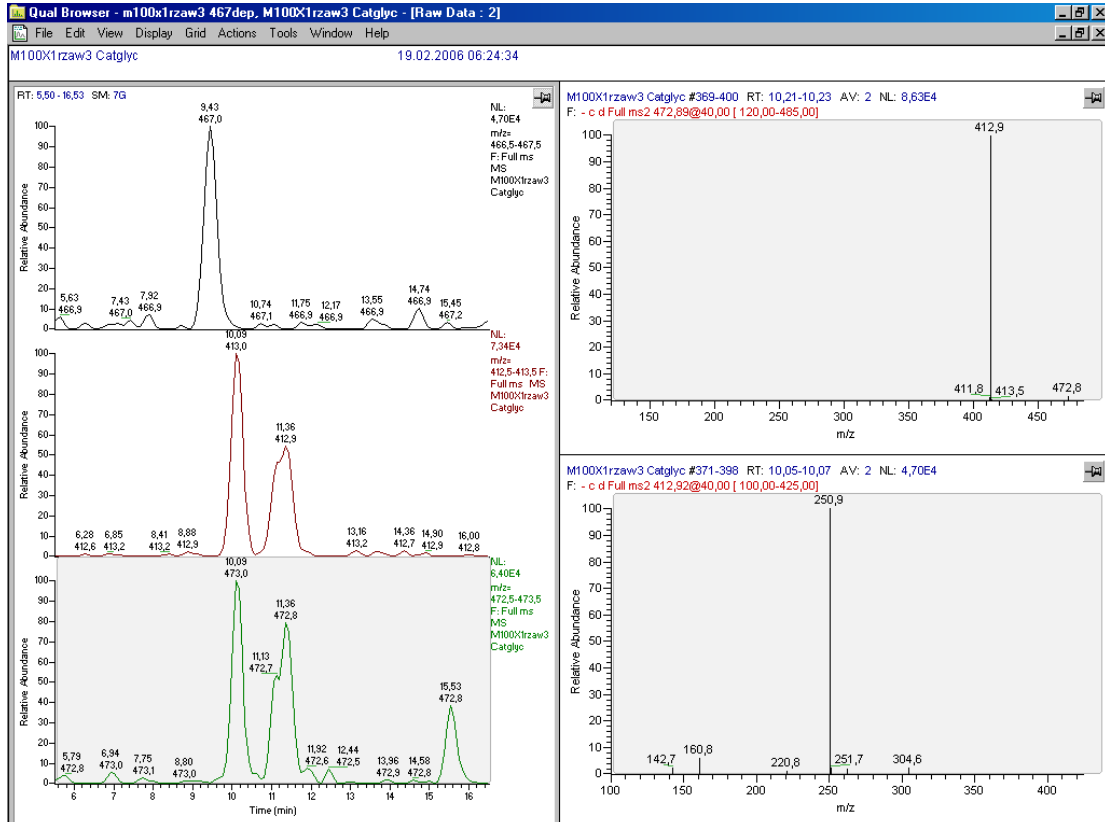


Abbildung B26: Links: Massenspuren 467, 413 und 473. Rechts oben: MS<sup>2</sup>-Spektrum 473. Rechts unten: MS<sup>2</sup>-Spektrum 413



## Anhang B – Abbildungen Flavanolglykoside in Malz

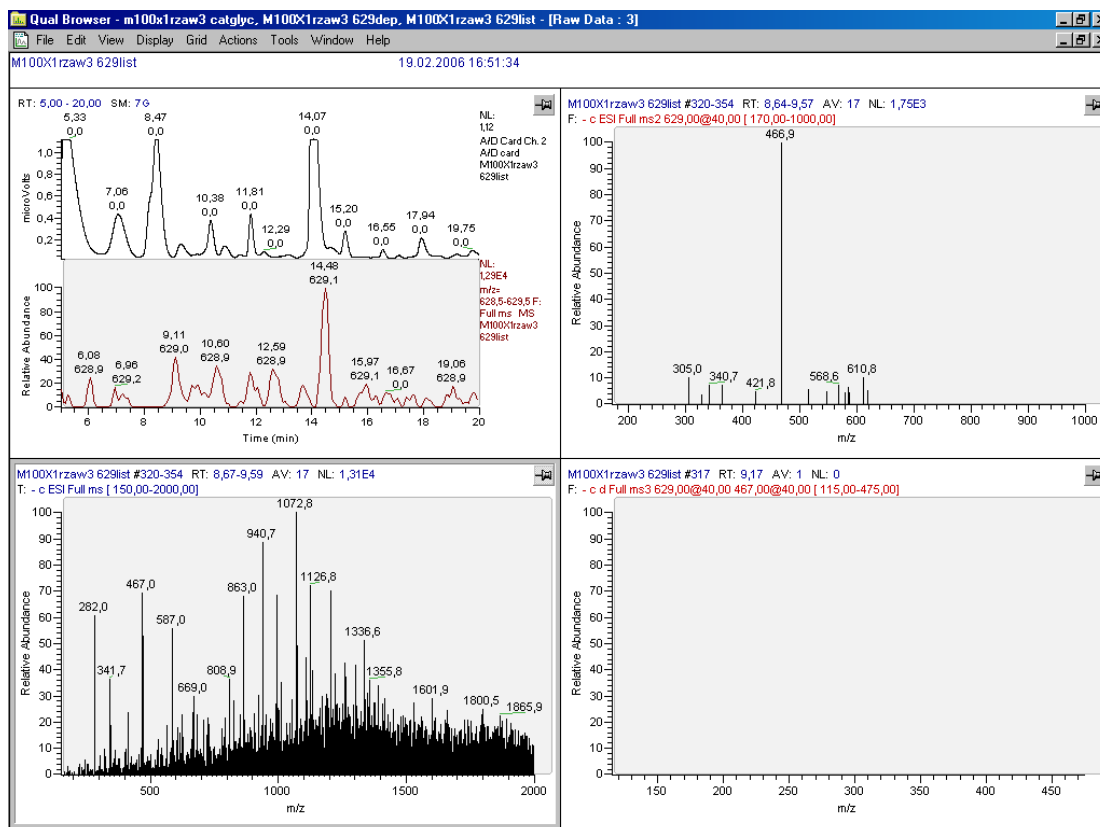


Abbildung B27: Links oben: UV 280 nm und Massenspur 629. Links unten: MS-Spektrum des Peaks bei 9,3 min. Rechts oben: MS<sup>2</sup>-Spektrum 629. Rechts unten: MS<sup>3</sup>-Spektrum 629→467

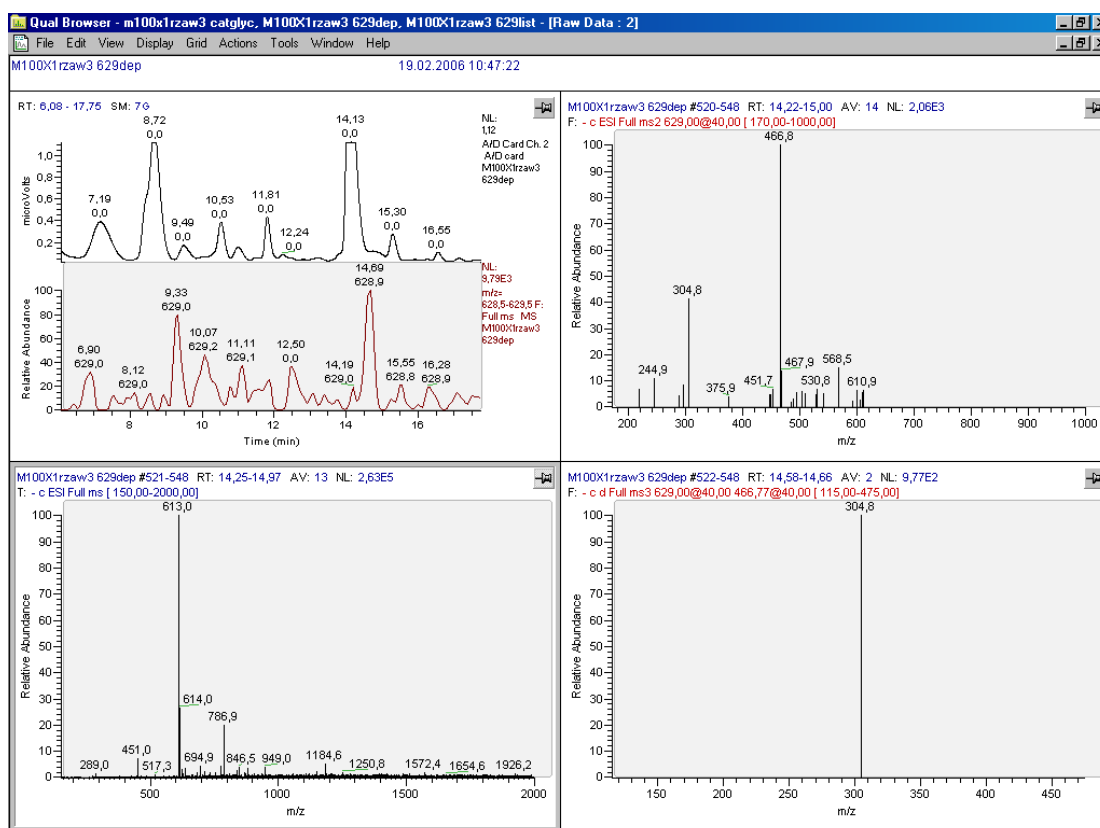


Abbildung B28: Links: UV 280 nm und Massenspur 629. Links unten: MS-Spektrum des Peaks bei 14,7 min. Rechts oben: MS<sup>2</sup>-Spektrum 629. Rechts unten: MS<sup>3</sup>-Spektrum 629→467

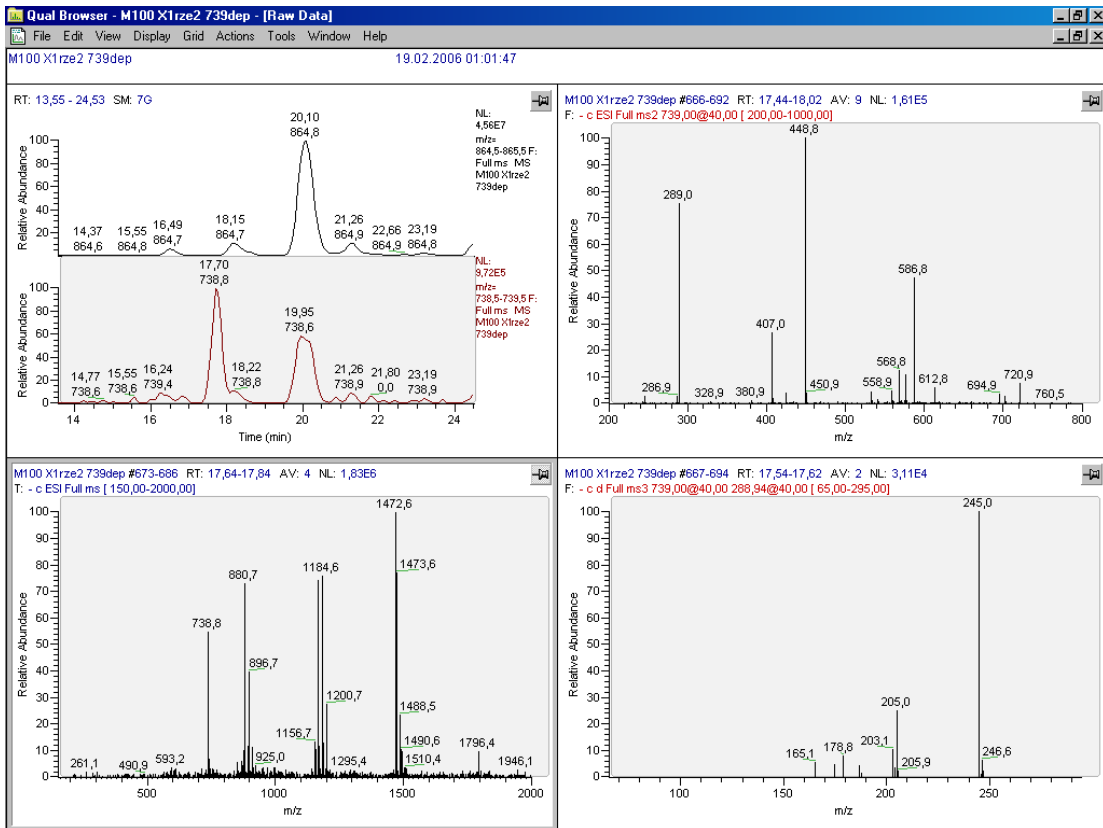


Abbildung B29: Links oben: Massenspuren 865 und 739. Links unten: MS-Spektrum des Peaks bei 17,7 min. Rechts oben: MS<sup>2</sup>-Spektrum 739. Rechts unten: MS<sup>3</sup>-Spektrum 739→289

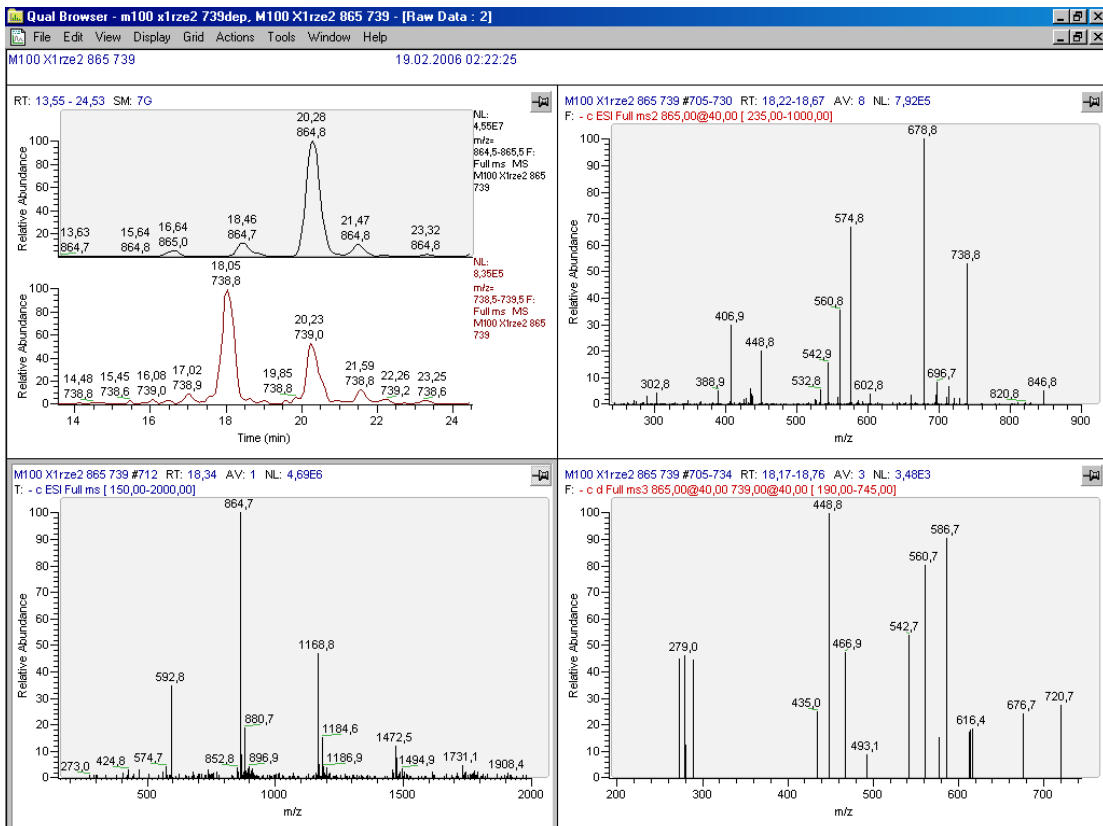


Abbildung B30: Links oben: Massenspuren 865 und 739. Links unten: MS-Spektrum des Peaks bei 18,5 min. Rechts oben: MS<sup>2</sup>-Spektrum 865. Rechts unten: MS<sup>3</sup>-Spektrum 865→739

## Anhang B – Abbildungen Flavanolglykoside in Malz

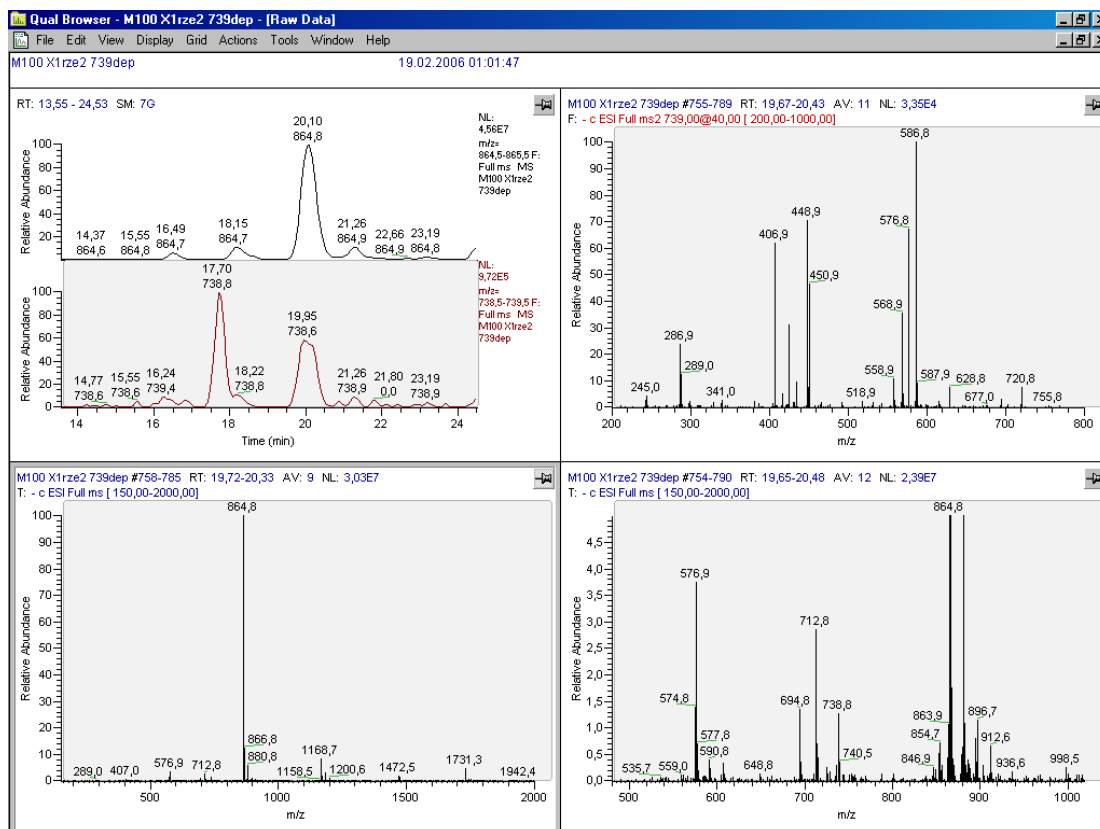


Abbildung B31: Links oben: Massenspuren 865 und 739. Links unten: MS-Spektrum des Peaks bei 20,1 min. Rechts oben: MS<sup>2</sup>-Spektrum 739. Rechts unten: MS-Spektrum (vergrößerte Darstellung der MS-Intensität)

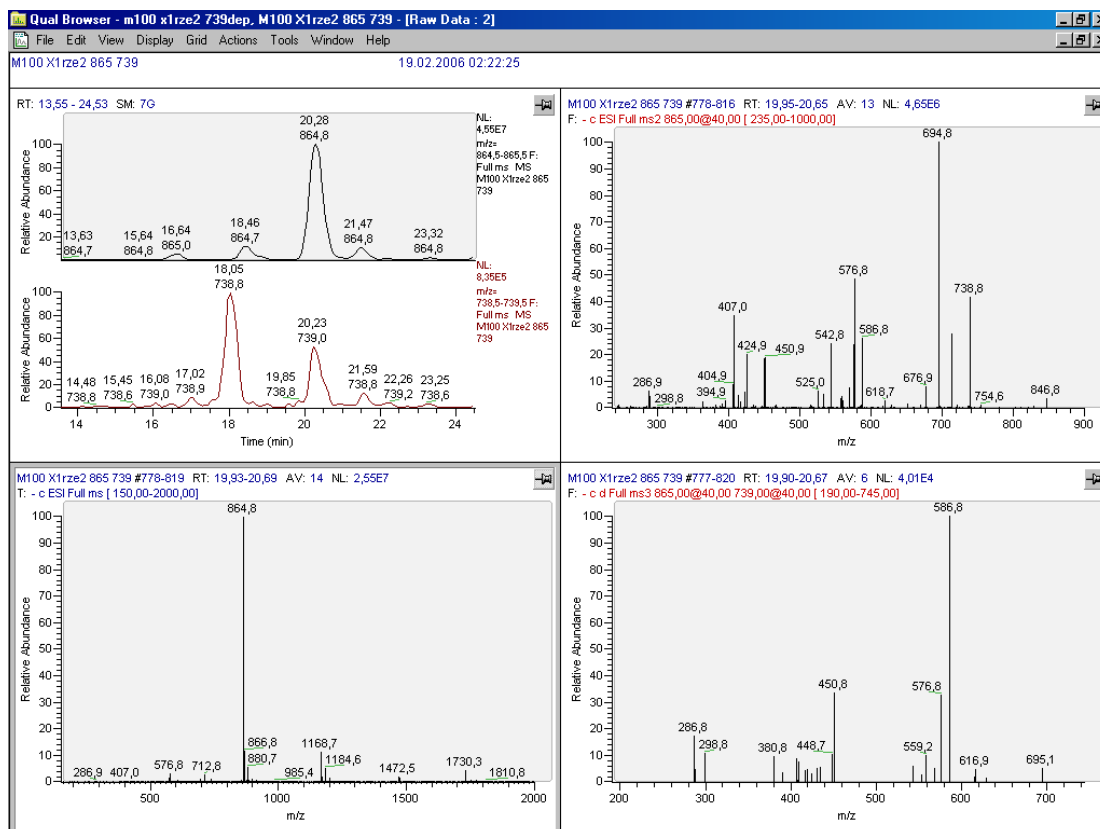


Abbildung B32: Links oben: Massenspuren 865 und 739. Links unten: MS-Spektrum des Peaks bei 20,3 min. Rechts oben: MS<sup>2</sup>-Spektrum 865. Rechts unten: MS<sup>3</sup>-Spektrum 865→739