

Enantiomerentrennung von Polyphenolen mittels Kapillarelektrophorese

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Michael Kofink

aus

Esslingen am Neckar

Bonn 2009

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

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

1. Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Galensa
2. Gutachter: Prof. Dr. Gabriele König
Tag der Promotion: 25. Juni 2009

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	xi
Abstract	xiii
Veröffentlichungen	xv
Ziel der Arbeit	xvii
I. Grundlagen	1
1. Flavan-3-ole	3
1.1. Catechin und Epicatechin	3
1.2. Vorkommen von (+)-Catechin und (-)-Epicatechin	3
1.3. Vorkommen der atypischen Flavan-3-ol-Enantiomere	4
1.4. Epimerisierung der Flavan-3-ole	5
1.5. Funktionen der Flavonoide in der Pflanze	6
1.6. Physiologische Wirkungen der Flavan-3-ole	8
1.6.1. Bioverfügbarkeit von (+)-Catechin und (-)-Epicatechin	8
1.6.2. Physiologische Wirkungen der atypischen Flavan-3-ol-Enantiomere	10
2. Biosynthese der Flavan-3-ole	11
2.1. Biosynthese von (+)-Catechin	11
2.2. Biosynthese von (-)-Epicatechin	13
2.3. Biosynthese der atypischen Flavan-3-ol-Enantiomere	14

II.	Proben	15
3.	Guaraná	17
3.1.	Botanik	17
3.2.	Verarbeitung und Verwendung	17
3.3.	Inhaltsstoffe	19
3.4.	Physiologische Wirkungen	20
4.	Kakao und Kakaoerzeugnisse	21
4.1.	Kakao	21
4.2.	Kakaoverarbeitung	23
4.2.1.	Ernte und Fermentation	23
4.2.2.	Röstung	23
4.2.3.	Kakaomasse und Schokolade	24
4.2.4.	Aufgeschlossene Kakaomasse, Alkalisierung	24
4.2.5.	Abpressen der Kakaobutter	25
5.	Fruchtsaftgewinnung	27
6.	Bier und Hopfen	29
III.	Analytik	33
7.	Kapillarelektrophorese	35
7.1.	Zur Theorie der Kapillarelektrophorese	35
7.2.	Trennkräfte innerhalb der Kapillare	37
7.2.1.	Systemspezifische Trennkräfte - Elektroosmotischer Fluss	37
7.2.2.	Analytspezifische Trennkräfte - Eigenmobilität	39
7.2.3.	Vor- und Nachteile in der CE	39
7.3.	Chirale Trennung mittels CE	41
7.3.1.	Wahl des chiralen Selektors	42
7.3.2.	Native Cyclodextrine	43
7.3.3.	Modifizierte Cyclodextrine	44
7.3.4.	Chirale Trennung mit CDs	45

IV. Material und Methoden	47
8. Material	49
8.1. Probenmaterial	49
8.2. Chemikalien	50
8.2.1. Standardsubstanzen	50
8.2.2. Cyclodextrine	50
9. Methoden	51
9.1. CE-Analysen	51
9.1.1. Kapillarelektrophorese	51
9.1.2. Hintergrundelektrolyt	51
9.1.3. Optimierte Trennparameter für die Enantiomerentrennung der mono- meren Flavan-3-ole	52
9.1.4. Optimierte Trennparameter für die Enantiomerentrennung der Prenyl- flavonoide	52
9.1.5. Konditionierungs- und Spülschritte	52
9.1.6. Reproduzierbarkeit der Methode	53
9.2. Weitere Analysemethoden	54
9.2.1. Chirale HPLC	54
9.2.2. Nicht-chirale HPLC Flavan-3-ole	55
9.2.3. Massenspektrometer	57
9.3. Probenaufarbeitung	58
9.3.1. Laborequipment	58
9.3.2. ASPEC-Apfelsaft	58
9.3.3. Guaraná	59
9.3.4. Isolierung der Flavan-3-ole aus Guaranáextrakt	59
9.3.5. Probenaufarbeitung von Kakao und Kakaoerzeugnissen	60
9.3.6. Isolierung der Flavan-3-ole aus Kakaoextrakt	61
9.3.7. Identifizierung der Flavan-3-ole mittels LC-MS	61
9.3.8. Isolierung der Prenylflavonoide	63
9.3.9. CD-Spektren der Flavan-3-ole	64
9.4. Formeln und Kenngrößen	66
9.4.1. Kenngrößen in der CE	66

V.	Ergebnisse und Diskussion	69
10.	Methodenentwicklung zur enantioselektiven Trennung	71
10.1.	Allgemeine Vorgehensweise	71
10.2.	Wahl des geeigneten Cyclodextrins	72
10.3.	Wahl der geeigneten CD-Konzentration	73
10.4.	Migrationsreihenfolge	74
10.5.	Verwendung von alternativen Cyclodextrinen	76
10.5.1.	Maltosyl- β -CD und Glucosyl- β -CD	76
10.5.2.	SBE- β -CD	78
10.5.3.	Kombination von Cyclodextrinen	82
10.6.	Optimierung weiterer Parameter	83
10.6.1.	Wahl der Kapillare	83
10.6.2.	Wahl des Injektionsvolumens	84
10.6.3.	Wahl des pH-Wertes	85
10.6.4.	Wahl des Puffers	86
10.6.5.	Konzentration des Hintergrundelektrolyten	88
10.6.6.	Einfluss der Temperatur	89
10.6.7.	Wahl der Spannung	89
10.6.8.	Zusatz von organischen Lösungsmitteln	90
10.6.9.	Zusatz von Cyclohexanol	90
10.7.	Vorteile der Methode	91
11.	Untersuchte Lebensmittel	93
11.1.	Guaraná und Guaranáprodukte	93
11.1.1.	Chirale Untersuchung von Guaranásamen	94
11.1.2.	Authentizitätsprüfung von Guaraná und guaranáhaltigen Produkten . . .	100
11.1.3.	Ergebnis	104
11.2.	Kakao und Kakaoerzeugnisse	105
11.2.1.	Analyse von Kakao und Kakaoerzeugnissen	105
11.2.2.	Einfluss der Temperatur und des pH-Wertes	110
11.2.3.	Epimerisierung	112
11.2.4.	Ausschluss der Epimerisierung während der Analyse	116
11.3.	Untersuchung von Apfelsaft	118

12. Vergleich der Peakflächenverhältnisse	121
12.1. Indikatoren für Verfälschungsnachweise und technologische Beeinflussung von Lebensmitteln	121
12.2. Unterscheidung von Kakao- und Kakaoprodukten anhand der Flavan-3-ole	123
12.2.1. Rohe und geröstete Kakaobohnen	123
12.2.2. Kakaomassen und Schokoladen	125
12.2.3. Kakaopulver	127
12.2.4. Kakaoerzeugnisse	129
12.2.5. Röst- und Alkalisierungsversuche	130
12.2.6. Isolierte Flavan-3-ole	131
12.3. Ergebnis	131
13. Referenzanalytik für Kakao- und Kakaoprodukte mittels HPLC	133
13.1. Chirale HPLC	133
13.1.1. Quantitative Abschätzung	135
14. Atypische Procyanidine	141
14.1. Enantiomere Procyanidine in Guaraná	141
14.2. Enantiomere Procyanidine in Kakao	142
15. Prenylflavonoide in Hopfen	145
15.1. Chirale Untersuchung von Isoxanthohumol	145
15.2. Chirale Untersuchung von 8-Prenylnaringenin	148
16. Ausblick	151
Abkürzungsverzeichnis	153
Abbildungsverzeichnis	157
Tabellenverzeichnis	163
Literaturverzeichnis	167
Danksagung	179

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden Ergebnisse zur Untersuchung von phenolischen Pflanzeninhaltsstoffen (enantiomere Polyphenole) mittels enantioselektiver Kapillarelektrophorese vorgestellt. Die untersuchten Analyten stammen alle aus der Klasse der Flavonoide. Für diese wurden entsprechende Methoden entwickelt, die eine Trennung in die einzelnen Enantiomere ermöglichen. Als Methode der Wahl wurde die Kapillarelektrophorese eingesetzt. Sie zeichnet sich unter anderem durch ihre hervorragende Trennleistung aus und ermöglicht eine zügige Methodenentwicklung und -optimierung.

Untersucht wurden die monomeren Flavan-3-ole Catechin und Epicatechin. Es gelang, eine Trennmethode zu entwickeln, die es ermöglicht, innerhalb kurzer Zeit in rein wässrigem Milieu Catechin und Epicatechin in ihre Enantiomere zu trennen. Als chirale Selektoren wurden dabei modifizierte Cyclodextrine eingesetzt. Diese Methode wurde auf verschiedene catechin- und epicatechinhaltige Lebensmittel (Fruchtsäfte, Kakao etc.) angewendet.

Bei der Analyse diverser Lebensmittel konnte die in der Literatur vorherrschende Meinung bestätigt werden, dass aufgrund der Biosynthese in der Pflanze überwiegend (-)-Epicatechin und (+)-Catechin gebildet werden.

In Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* KUNTH) ließ sich jedoch erstmalig das natürliche Vorkommen aller Enantiomere von Catechin und Epicatechin nachweisen. Guaraná enthält neben (+)-Catechin und (-)-Epicatechin somit auch die atypischen Enantiomere (-)-Catechin und (+)-Epicatechin. So konnte über die qualitative Analyse aller Catechin- und Epicatechin-Enantiomere teilweise ein Zusatz von Guaraná in Lebensmitteln nachgewiesen werden.

Ein weiterer Schwerpunkt der enantioselektiven Analyse von Catechin und Epicatechin lag bei der Untersuchung dieser Substanzen in verarbeiteten Lebensmitteln. Catechin und Epicatechin beginnen durch die zeitabhängige Einwirkung von Temperatur und/oder alkalischem pH-Wert zu epimerisieren. Diese Reaktion konnte bei der Untersuchung von Kakao und Kakaoerzeugnissen nachgewiesen werden. Die Bildung der Epimere wird dabei durch die technologischen Bedingungen während der Kakaoverarbeitung (Röstung der Kakaobohnen, Alkalisierung der Kakaomasse) induziert. Über die Berechnung und den Vergleich der Peakflächenverhältnisse der Flavan-3-ole gelang eine Abgrenzung der unterschiedlich technologisch behandelten Kakaoerzeugnisse.

In frischem Apfelsaft wurden die natürlich vorkommenden Flavan-3-ol-Enantiomeren (+)-Catechin und (-)-Epicatechin nachgewiesen. Da Apfelsaft bei der Herstellung verschiedenen thermischen Behandlungsverfahren ausgesetzt wird, wurden Apfelsäfte ebenfalls wie Kakao auf die atypischen Enantiomere von Catechin und Epicatechin untersucht. Diese konnten mit der entwickelten Methode jedoch nicht nachgewiesen werden. Eine Differenzierung von Säften aufgrund der verschiedenen Behandlungsverfahren konnte somit nicht erzielt werden.

Als weitere enantiomere Polyphenole wurden die in Hopfen- und Hopfenprodukten vorkommenden Prenylflavonoide Isoxanthohumol und 8-Prenylnaringenin mittels enantioselektiver Kapillarelektrophorese untersucht.

Hierbei gelang erstmalig für 8-Prenylnaringenin und Isoxanthohumol die Trennung in die einzelnen Enantiomere.

Abstract

Different methods for the chiral separation of various flavonoids by capillary electrophoresis were developed. A separation was achieved for the monomeric flavan-3-ol-enantiomers of catechin and epicatechin. The method was applied to a variety of food samples. As shown in literature, the most food samples contain (–)-Epicatechin and (+)-Catechin.

For the first time it was proven that the seed of guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* KUNTH) contain all four flavan-3-ol-enantiomers, (+)- and (–)-catechin and (+)- and (–)-epicatechin. The natural occurrence of all flavan-3-ol-enantiomers was partially applied for the proof of authenticity of guaraná containing products.

Another aim of this work was to determine the alteration of the flavan-3-ol-enantiomers in processed food. Raw cocoa beans contain (–)-epicatechin and (+)-catechin as natural substances. During the cocoa processing, an alteration was observed in the flavan-3-ol-enantiomeric profile. As a result of the roasting and alkalizing process, (–)-catechin is generated from (–)-epicatechin by an epimerization reaction. Peak ratios were calculated to distinguish the various cocoa products. By comparison of the peak ratio of different cocoa products, a differentiation in raw and roasted cocoa beans, alkalized and non-alkalized cocoa powder, respectively was achieved.

In addition different samples of apple juice were analysed to assess epimerisation of flavan-3-ols caused by different kind of juice processing. Unfortunately, there was no proof of the atypical flavan-3-ol-enantiomers.

Also, prenylated hop flavonoids were separated using enantioselective CE. For the first time, a baseline separation was achieved for isoxanthohumol and 8-prenylnaringenin.

Abstract

Veröffentlichungen

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen veröffentlicht:

Publikationen

Kofink M, Papagiannopoulos M, Galensa R *(-)-Catechin in cocoa and chocolate: Occurrence and analysis of an atypical flavan-3-ol-entantiomer* *Molecules* 2007, 12, 1274-1288

Kofink M, Papagiannopoulos M, Galensa R *Enantioseparation of catechin and epicatechin in plant food by chiral capillary electrophoresis* *Eur. Food. Res. Technol.* 2007, 225, 569 - 577

Tagungsbeiträge

Kofink M, Papagiannopoulos M, Galensa R *Catechin und Epicatechin in Lebensmitteln: Vorkommen und Analytik von atypischen Flavan-3-ol-Enantiomeren* (Poster)
36. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Erlangen-Nürnberg; 10. - 12. September 2007;
Lebensmittelchemie 2008, 62, 64 - 65

Veröffentlichungen

Kofink M, Papagiannopoulos M, Galensa R *Chirale Untersuchung von Catechin und Epicatechin in Kakao und Kakaoprodukten mittels Kapillarelektrophorese* (Poster)
35. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Dresden; 18. - 21. September 2006; Lebensmittelchemie 2007, 61, 78

Kofink M, Galensa R *Enantiomerentrennung von Catechinen mittels Kapillarelektrophorese* (Vortrag) Regionaltagung NRW der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Wuppertal; 09. März 2005; Lebensmittelchemie 2005, 59, 111 - 112

Kofink M, Papagiannopoulos M, Galensa R *Identifizierung und chirale Trennung östrogenaktiver Substanzen aus Hopfen mittels HPLC-MS und Kapillarelektrophorese* (Poster)
33. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Bonn; 13. - 15. September 2004; Lebensmittelchemie 2005, 59, 38

Ziel der Arbeit

Ziel der vorgelegten Arbeit war die chirale Untersuchung von Flavonoiden mittels Kapillarelektrophorese (CE). Es konnte dabei an frühere Studien aus dem eigenen Arbeitskreis angeknüpft werden, die sich bereits mit der enantioselektiven Analytik von chiralen Flavonoiden, besonders der Flavanoglykoside beschäftigt haben [36, 37].

Für die meisten der in dieser Arbeit zu untersuchenden Substanzen gab es bisher keine in der Literatur bekannte chirale Trennmethode mittels CE. Somit sollte hier auch ein Beitrag zur Grundlagenforschung geleistet werden.

Die untersuchten enantiomeren Flavonoide besitzen ein oder mehrere Stereozentren, d.h. es existiert das dazugehörige enantiomere und im Falle der Flavan-3-ole das epimer Molekül. Es ist bekannt, dass diese Substanzen in Lebensmitteln im Zuge der Verarbeitung abgebaut werden. Kaum berücksichtigt wurde bisher, dass die enantiomeren Flavonoide aufgrund von pH- und Temperaturveränderungen beim Verarbeitungsprozess racemisieren bzw. epimerisieren.

Zur Untersuchung dieser Veränderungen sollte eine geeignete enantioselektive CE-Trennmethode entwickelt und angewendet werden. Darüberhinaus sollte gezeigt werden, dass diese Veränderung zur Überprüfung der Authentizität bzw. des Verarbeitungsgrads des untersuchten Lebensmittels herangezogen werden kann. Diese Veränderung könnte auch die positiven physiologischen Wirkungen dieser Substanzen, die in zahlreichen Studien belegt sind, beeinflussen. Durch die vorliegende Arbeit sollte gerade auf dem Gebiet der chiralen Analytik der Flavonoide neue Erkenntnisse gewonnen werden, die auch zum besseren Verständnis der Bioverfügbarkeit beitragen können.

Ziel der Arbeit

Teil I.

Grundlagen

1. Flavan-3-ole

1.1. Catechin und Epicatechin

Die Flavan-3-ole Catechin und Epicatechin sind aus zwei Benzen-Ringen (A und B-Ring) und einem Pyran-Ring (C-Ring) aufgebaut. Aufgrund des Fehlens einer Doppelbindung am C-2/C-3 des C-Rings besitzen Flavan-3-ole zwei nebeneinanderliegende Stereozentren. Die Stellung des Phenylrings am C-2 und der Hydroxygruppe am C-3 ist bei Catechin trans-konfiguriert. Bei Epicatechin liegt eine cis-Konfiguration vor (s. Abb. 1.1). Daraus lässt sich ableiten, dass von Catechin und Epicatechin die jeweiligen enantiomeren Verbindungen existieren. Durch Änderung der Konfiguration am C-2 kommt es zur Bildung des jeweiligen Epimers. (+)-Catechin epimerisiert zu (+)-Epicatechin und (–)-Epicatechin epimerisiert zu (–)-Catechin [15, 28].

1.2. Vorkommen von (+)-Catechin und (–)-Epicatechin

Catechin und Epicatechin kommen in sehr vielen pflanzlichen Lebensmitteln vor. Diese werden aufgrund der Biosynthese in der Pflanze fast ausschließlich als (+)-Catechin und (–)-Epicatechin gebildet (s. Kap. 2). Catechin und Epicatechin finden sich in größeren Mengen vor allem in Kakao, Tee und Weintrauben, aber auch in Guaraná. Außerdem kommen sie in heimischen Stein- und Kernobstfrüchten vor [7, 14, 44]. Betrachtet man die Gehalte in verschiedenen Lebensmitteln, so fällt auf, dass (–)-Epicatechin das vorherrschende Flavan-3-ol-Enantiomer ist (s. Tab. 1.1). Flavan-3-ole stellen darüberhinaus die Grundeinheiten der oligomeren Proanthocyanidine und der Tannine dar (s. Kap. 14). Außerdem findet man sie oft mit Gallussäure verestert vor

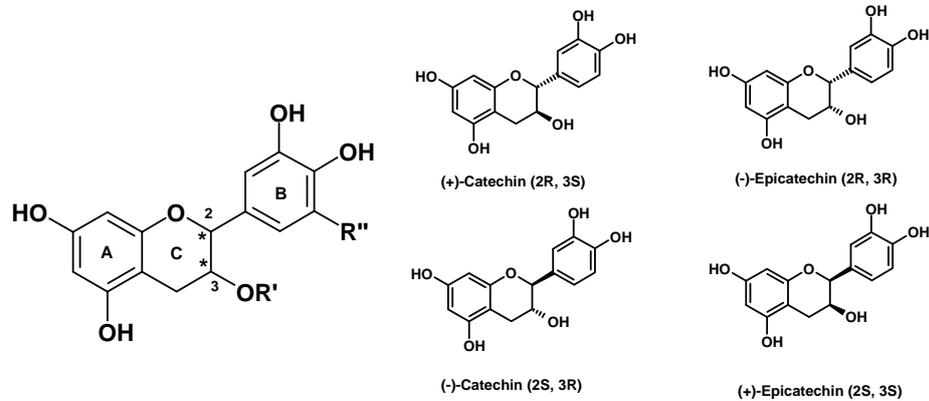


Abbildung 1.1: Grundstruktur der Flavan-3-ole und monomeren Enantiomere von Catechin und Epicatechin

(z.B. Epigallocatechingallat in Tee) [45].

1.3. Vorkommen der atypischen Flavan-3-ol-Enantiomere

Im Gegensatz zu (+)-Catechin und (-)-Epicatechin kommen ihre 2S-konfigurierten Enantiomere (-)-Catechin (2,3 -trans) und (+)-Epicatechin (2,3 -cis) (s. Abb. 1.1) in der Natur sehr selten vor. Bisher konnten sie in einigen Palmenspezies (z.B. *Phoenix canariensis* L. *Arecaceae*) nachgewiesen werden [23]. Man findet sie dabei entweder frei vorliegend oder auch als Untereinheiten der Proanthocyanidine. Als Proanthocyanidin-Untereinheiten konnten sie u.a. in Pflanzenteilen der *Typhaceae*, *Musaceae* und *Strelitziaceae* identifiziert werden. Auch hier zeigte sich, wie schon bei den Palmen nachgewiesen, dass die Proanthocyanindin-Untereinheiten aus Epicatechin bestanden, bei denen überwiegend die 2S- Konfiguration vorlag. Wie noch in Kap. 11 erläutert wird, enthält auch Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* KUNTH, *Sapindaceae*) neben (+)-Catechin und (-)-Epicatechin, die atypischen Enantiomeren (-)-Catechin und (+)-Epicatechin [58].

1.4. Epimerisierung der Flavan-3-ole

	(+)-Catechin	(-)-Epicatechin	Gesamtflavanole
Schokolade (60 % Kakao)	132,4	327,4	459,8
Milkschokolade (30 % Kakao)	38,3	124,9	163,2
Schokoriegel	21,7	62,5	82,2
schwarzer Tee Earl Grey	6,2	15,1	139,1
blaue Trauben	89,4	86,4	203,9
Äpfel Jona Gold (mit Schale)	4,0	67,1	71,1
Apfel Jona Gold (ohne Schale)	2,8	48,3	51,2
Erdbeeren	44,7	n.b.	44,7

Tabelle 1.1: Flavan-3-ol-Gehalte (in mg/kg) in Lebensmitteln [7]

1.4. Epimerisierung der Flavan-3-ole

Flavan-3-ole zeigen unter Einwirkung von alkalischem pH-Wert und/oder Hitze die Tendenz zu epimerisieren. Wie die Abb. 1.2 und 1.3 zeigen, epimerisiert (+)-Catechin zu (+)-Epicatechin und (-)-Epicatechin zu (-)-Catechin [45]. Es handelt sich dabei um eine Gleichgewichtsreaktion.

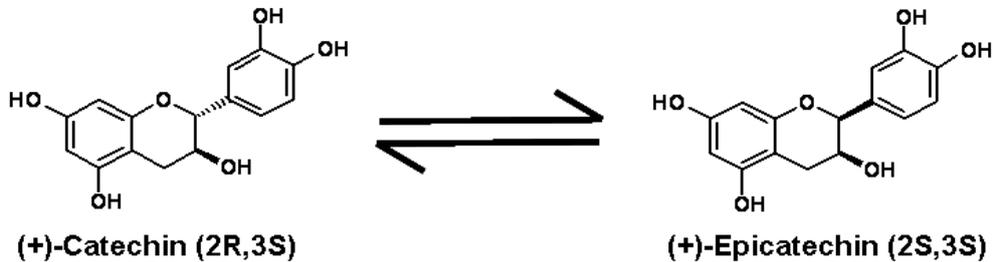


Abbildung 1.2: Epimerisierungsreaktion von (+)-Catechin

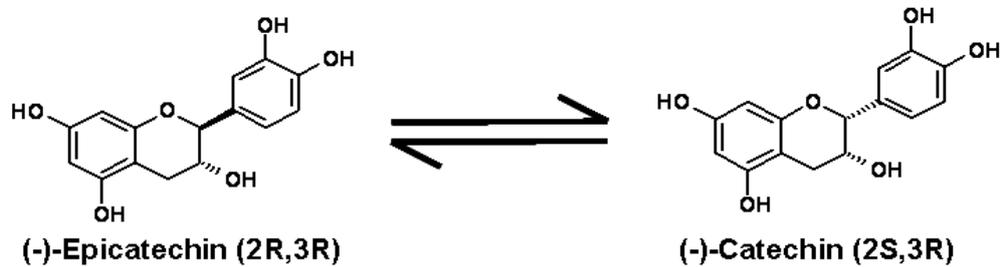


Abbildung 1.3: Epimerisierungsreaktion von (-)-Epicatechin

1.5. Funktionen der Flavonoide in der Pflanze

Flavonoide können in der Pflanze verschiedene Aufgaben übernehmen. Sie fungieren als Signalmoleküle bei Pflanzen, die in Symbiose mit Mikroorganismen leben oder tragen aktiv zum Schutz der Pflanze vor umweltbedingten Stressfaktoren bei, wie z.B. gegen UV-Strahlung [92].

Die atypischen Flavan-3-ol-Enantiomeren (-)-Catechin und (+)-Epicatechin sind in der Natur sehr selten zu finden. Folglich ist ihre Bedeutung und Funktion in Pflanzen im Gegensatz zu anderen Flavonoiden kaum erforscht [92].

Eine Ausnahme bildet die Flockenblume (*Centaurea maculosa* L., *Lamiaceae*).

Diese Kornblumenart, die Mitte des 18. Jahrhunderts von Europa nach Amerika eingeschleppt wurde, zeigt ein ausgesprochen invasives Verhalten. Da die Pflanze von Tieren nicht gefressen wird, fehlen die natürlichen Feinde. 1988 waren in Nordamerika 2,8 Millionen Hektar von *C. maculosa* bedeckt. Heimische Pflanzenarten, wie z.B. Gräser wurden vollkommen verdrängt.

Vivanco et al. untersuchten in den letzten Jahren die Gründe für diese starke Ausbreitung von *C. maculosa*. Es gelang, die dafür verantwortlichen Substanzen zu identifizieren und das phytoxische Verhalten weitgehend aufzuklären [9]. Es konnte beobachtet werden, dass sich im Erdreich um die Pflanze ein Bereich bildet, in dem es anderen Pflanzen nicht möglich ist zu überleben. Die Pflanze muss also eine Substanz abgeben, die eine phytoxische Wirkung auf die umgebenden Pflanzen hat. Dieses Verhalten wird auch als Alleopathie bezeichnet. Durch entsprechende Isolierung aus den Wurzeln und Bodenproben konnte durch Fraktionierung mittels HPLC und

strukturaufklärenden Methoden ermittelt werden, dass *C. maculosa* in ihren Wurzeln racemisches (+/-)-Catechin bildet, das in den Boden abgegeben wird [11, 98]. Weitere Tests zeigten, dass die Phytotoxizität allein von (-)-Catechin ausgeht. (-)-Catechin dringt dabei über die Wurzelspitze in die andere Pflanze ein und fungiert dort als Auslöser für die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. Es folgt ein Anstieg der Ca^{2+} -Ionen-Konzentration im Cytoplasma der Pflanzenzellen, was zu einer Übersäuerung und schließlich zum Zelltod führt. Es konnte hierbei erstmalig die Bioaktivität von (-)-Catechin beschrieben werden. Die Untersuchung des ebenfalls von *C. maculosa* gebildeten (+)-Catechin zeigte keine der beschriebenen phytotoxischen Reaktionen. (+)-Catechin konnte nur eine antimikrobielle Wirkung nachgewiesen werden. Zusätzlich zu (+)- und (-)-Catechin wurden auch andere Flavonoide auf ihr allelopathisches Potential untersucht. (-)-Epicatechin, das fast ubiquitär im Pflanzenreich anzutreffen ist, konnte dabei keinerlei schädigende Wirkung nachgewiesen werden. (+)-Epicatechin zeigte hingegen eine starke phytotoxische Wirkung auf alle getesteten Keimlinge. Obwohl *C. maculosa* resistent gegen das eigene gebildete (-)-Catechin ist, konnte bei der Gabe von (+)-Epicatechin ebenfalls ein phytotoxischer Effekt beobachtet werden.

Diese Experimente mit den einzelnen Flavan-3-ol-Enantiomeren zeigen, wie unterschiedlich die Wirkung von Enantiomeren bzw. Epimeren sein kann. Die phytotoxische Wirkung scheint dabei auf die 2S-Konfiguration zurückzuführen zu sein. Es ist nicht geklärt, wie die Biosynthese des racemischen Catechins in *C. maculosa* abläuft. Zum einen könnte hierfür eine Abweichung im Biosyntheseweg der Flavan-3-ole der Grund sein (s. Kap. 2.3), zum Anderen ist nicht auszuschließen, dass in *C. maculosa* auf üblichem biosynthetischen Wege (+)-Catechin gebildet wird, welches dann während des Exudierungsvorganges durch noch unbekannte Faktoren (Enzyme, pH-Wert-Veränderung) racemisiert oder aus (-)-Epicatechin epimerisiert [10].

1.6. Physiologische Wirkungen der Flavan-3-ole

Die monomeren Flavan-3-ole Catechin und Epicatechin werden in zahlreichen Publikationen positiv diskutiert. Ihnen werden positive physiologische Eigenschaften nachgesagt. Diese konnten vor allem in *in vitro* Experimenten nachgewiesen werden. Ob sich diese Ergebnisse auch auf den menschlichen Organismus übertragen lassen, muss größtenteils noch geklärt werden. Der Trend der Forschung geht hier eindeutig in Richtung der Untersuchung ihrer protektiven Eigenschaften gegenüber den sogenannten Volkskrankheiten, wie kardiovaskulären Erkrankungen und Krebs [34, 62, 95]. Dazu zählen alle krankhaften Veränderungen des Herzens, der Blutgefäße, Venenerkrankungen und Blutdruckveränderungen. Hierbei konnte *in vitro* eine Verbesserung der Endothelfunktion, antioxidative, antiinflammatorische, antithrombotische sowie blutdruckregulierende und lipoproteinmodulierende Eigenschaften festgestellt werden. Hinsichtlich der protektiven Eigenschaften von Catechin und Epicatechin auf Krebsentstehung und Krankheitsverlauf wurden antimutagene und antiproliferative Wirkungen nachgewiesen [8, 22, 29, 30, 32, 41]. Die flavan-3-ol-reichen Lebensmittel, wie Tee, Wein und Kakao stehen hier vor allem gerade in der Diskussion. Neuere Untersuchungen zur Bestimmung der molekularen Eigenschaften von (+)-Catechin und (–)-Epicatechin zeigen ein fast gleiches antioxidatives Potential, aber einen Unterschied in der antioxidativen Kapazität. So werden in beiden Molekülen bei nucleophiler, elektrophiler und radikalischer Reaktion unterschiedliche C-Atome angegriffen. Dieses Phänomen wird auf die Stellung der OH-Gruppe am C-3 des C-Rings zurückgeführt [39].

1.6.1. Bioverfügbarkeit von (+)-Catechin und (–)-Epicatechin

Der erste und wohl entscheidende Schritt, eine klare Aussage über die physiologische Wirkung der Flavan-3-ole zu erhalten, ist die Bestimmung der Bioverfügbarkeit. (+)-Catechin und (–)-Epicatechin werden durch die Darmwand resorbiert. Bei ihrer Absorption werden sie in transportfähige Metabolite umgewandelt. Bisher konnte vor allem im Tierexperiment nachgewiesen werden, dass die Flavan-3-ole im Organismus sulfatiert, glucuronidiert oder sulfoglucuronidiert werden. Zusätzlich kann auch eine Methylierung erfolgen. Diese Metabolite werden nach einer bestimmten Verweildauer

1.6. Physiologische Wirkungen der Flavan-3-ole

im Körper durch den Urin teilweise wieder ausgeschieden [73, 74, 96].

1.6.2. Physiologische Wirkungen der atypischen Flavan-3-ol-Enantiomere

Über die physiologischen Eigenschaften der monomeren atypischen Flavan-3-ol-Enantiomeren wurden bisher nur wenige Studien durchgeführt. Man nahm lange Zeit an, dass sie aufgrund ihres geringen Vorkommens für den menschlichen Organismus nicht von Bedeutung wären [19].

Beim Vergleich der Wirkung von (+)- und (-)-Catechin auf den Glykogenmetabolismus von Rattenleberzellen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass (+)-Catechin die Glykogenproduktion anregt, während (-)-Catechin diese inhibiert [75]. Wie bereits in Tab. 1.1 aufgeführt, enthält gerade Kakao einen hohen Anteil an monomeren Flavan-3-olen. Seitens der Industrie besteht ein großes Interesse, Schokoladenerzeugnisse mit einer gesundheitsfördernden Wirkung auszuloben, da Kakaoprodukte bisher aufgrund ihres nicht unerheblichen Fett- und Kohlenhydratgehaltes nicht als „Wellness-Produkte“ verkauft wurden. In einer Studie, bei der die Bioverfügbarkeit von (+)-Catechin und (-)-Catechin mittels Perfusionstests an einem Rattenmodell untersucht wurde, konnte gezeigt werden, dass (-)-Catechin, im Gegensatz zu (+)-Catechin, zehnmal schlechter resorbiert wird [25]. Eine andere Studie zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Bioverfügbarkeit der Flavan-3-ol-Enantiomere bzw. der Epimere. Dies wird mit der Instabilität der Flavan-3-ole im basischen Milieu des Gastrointestinaltraktes begründet [105]. Diese Untersuchungen standen vor dem Hintergrund der nachgewiesenen Bildung von (-)-Catechin während des Kakaoprozesses [25]. Über die Bioverfügbarkeit von (+)-Epicatechin im Vergleich zu (-)-Epicatechin sind bisher noch keine Studien veröffentlicht [63, 20].

Es besteht aber aufgrund der nachgewiesenen positiven physiologischen Wirkungen von (-)-Epicatechin ein großes Interesse, so viel wie möglich der natürlichen Flavan-3-ole in der Schokolade zu erhalten. Der Verlust an Flavonoiden während der Kakaoverarbeitung soll durch entsprechende Massnahmen kontrolliert werden. Es wurden mittlerweile sogar bestimmte Prozessparameter (Temperatur/pH-Wert) patentiert, die die Epimerisierung der Flavan-3-ole weitgehend verhindern sollen [43, 99].

Auf dem amerikanischen Markt ist bereits eine ganze Produktlinie von Kakaoerzeugnissen erhältlich, die mit positiven Wirkungen gegenüber kardiovaskulären Erkrankungen wirbt [3]. In Deutschland ist eine solche krankheitsbezogene Werbung bisher verboten.

2. Biosynthese der Flavan-3-ole

Der entscheidende Schritt in der Biosynthese aller Flavonoide ist die Reaktion von 4-Cumaroyl-CoA mit drei Einheiten Malonyl-CoA. Dabei wird durch das Enzym Chalkonsynthase (CHS) Naringenin-Chalkon gebildet (s. Abb. 2.1). Katalysiert durch die Chalkonisomerase (CHI) entsteht durch Ringschluss am C-2 des C-Rings Naringenin. Dieses weist die typische Grundstruktur der Flavonoide auf. Außerdem entsteht durch diesen Ringschluss am C-2 des C-Rings ein chirales Zentrum. Naringenin stellt demnach *das* zentrale Substrat für die Biosynthese aller Flavonoide dar.

Naringenin reagiert - katalysiert durch die Flavonoid-3'-Hydroxylase (F3'H)- zu Eriodictyol. In einem weiteren Schritt entsteht nun durch die Flavanon-3- β -Hydroxylase (F3H) Dihydroquercetin. Bei diesem Schritt wird am C-3 des C-Rings ein weiteres chirales Zentrum gebildet. Dihydroquercetin weist schon die 2,3-trans Konfiguration auf, die später auch (+)-Catechin besitzt. Durch das Enzym Dihydroflavonol 4-Reductase (DFR) reagiert Dihydroquercetin zum 2,3-trans-3,4-cis-Leucocyanidin. Hierbei wird noch übergangsweise ein drittes chirales Zentrum am C-4 des C-Rings gebildet [91].

2.1. Biosynthese von (+)-Catechin

Zur Synthese von (+)-Catechin wird ausgehend von 2,3-trans-3,4-cis-Leucocyanidin - katalysiert durch die Leucocyanidin-Reductase (LAR)-das Flavan-3-ol (+)-Catechin gebildet. Dies weist die erwähnte 2,3-trans-Konfiguration auf.

2. Biosynthese der Flavan-3-ole

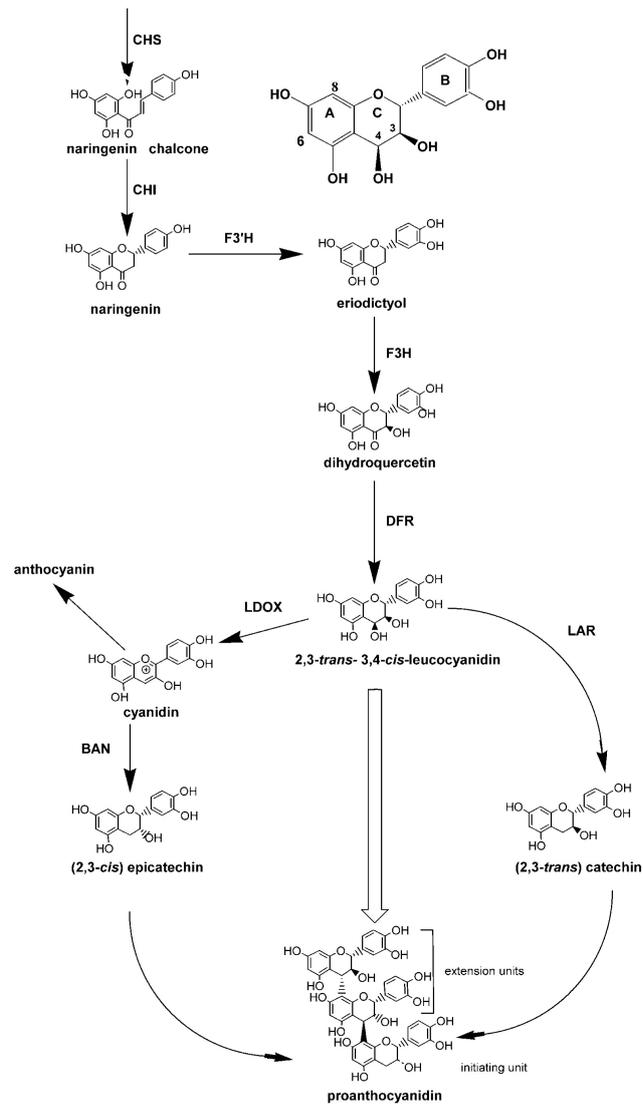


Abbildung 2.1: Biosynthese der Flavan-3-ole; CHS: Chalkon-Synthase; CHI: Chalkon-Iso-merase; F3'H: Flavanoid-3'-Hydroxylase; F3H: Flavanon-3 β -Hydroxylase, DFR: Dihydroflavonol-Reduktase; LDOX: Leukocyanidin-Dioxygenase (Antho-cyanidin-Synthase); BAN: BANYULS-Protein oder Anthocyanidin-Reduktase; LAR: Leucoanthocyanidin-Reduktase [91]

2.2. Biosynthese von (-)-Epicatechin

Die Biosynthese von (-)-Epicatechin verläuft ausgehend von 2,3-trans-3,4-cis-Leucocyanidin nicht wie bei (+)-Catechin über einen, sondern über mehrere Reaktionsschritte. Diese sind notwendig, da zur Bildung von (-)-Epicatechin eine Änderung der Konfiguration am C-3 des C-Rings erfolgen muss. Aus 3-trans-3,4-cis-Leucocyanidin wird-katalysiert durch die Leucocyanidin-Dioxygenase (LDOX)-Cyanidin gebildet.

Bei dieser Reaktion werden alle drei chiralen Zentren eliminiert. Katalysiert durch das BANYULS-Protein (BAN), einer Anthocyanidin-Reduktase, welche zwei Äquivalente Wasserstoff liefert, wird sowohl am C-2 als auch am C-3 des C-Rings ein Stereozentrum gebildet. Aus Cyanidin bildet sich (-)-Epicatechin, welches im Gegensatz zu seinem Epimer (+)-Catechin 2,3-cis konfiguriert ist. Die cis-Konfiguration ist aufgrund der Stellung des Phenylrestes und der Hydroxyl-Gruppe eine sterisch und thermodynamisch ungünstige. Trotzdem ist (-)-Epicatechin das am häufigsten vorkommende Flavan-3-ol-Enantiomer. Es lässt sich deshalb vermuten, dass zu dessen Bildung mehrere enzymatische Schritte notwendig sind, um diese höhere Bildungsenergie aufzubringen.

Genauere Untersuchungen der jeweiligen Enzyme zeigten die stereospezifischen Mechanismen auf [12, 104]. So ist die Leucoanthocyanidinreductase (LAR) nur in der Lage, Leukopelargonidin zu Afzelechin und Leukodelphinidin zu Gallocatechin reagieren zu lassen. Das BANYULS Protein ist nur in der Lage 2,3-cis konfigurierte Moleküle zu bilden und keine 2,3-trans Konfiguration. Durch Suppressionsversuche mit den einzelnen Flavan-3-ol-Enantiomeren konnte gezeigt werden, dass LAR ausschließlich auf (+)-Catechin reagiert, nicht aber auf (-)-Epicatechin, (-)-Catechin oder (+)-Epicatechin [77].

2.3. Biosynthese der atypischen Flavan-3-ol-Enantiomere

Die Biosynthese von (-)-Catechin und (+)-Epicatechin ist bisher kaum untersucht worden. Da in Palmen neben (+)-Epicatechin auch dessen Epimer (+)-Catechin nachgewiesen wurde, muss eine Epimerisierung erfolgen. Es wird angenommen, dass dieser Reaktionsschritt über eine enzymatisch gesteuerte Reaktion am C-2 des Pyran-Rings erfolgt, bei der sich dieser öffnet und aus einer 2R 2,3-cis Konfiguration (z.B. (+)-Catechin) eine 2S 2,3-trans Konfiguration (z.B. (+)-Epicatechin) resultiert. Diese Reaktion soll über einen C-2-Epimerase-Enzymkomplex katalysiert werden (s. Abb. 2.2) [26, 45].

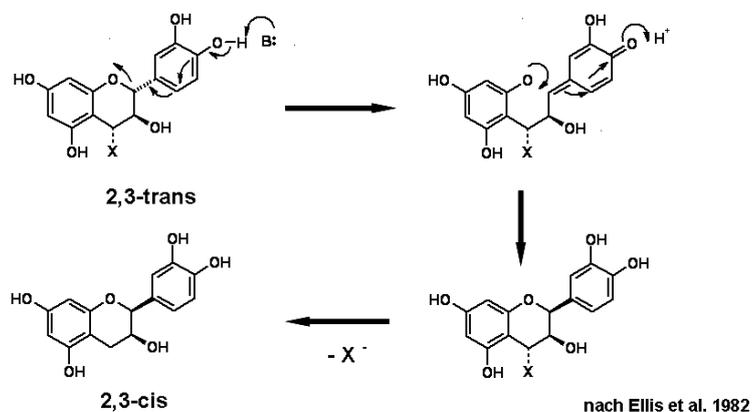


Abbildung 2.2: Vorgeschlagener Mechanismus der Biosynthese der atypischen Flavan-3-ol-Enantiomere; X: unbekanntes Enzym; B: Elektronendonator

Der vorgeschlagene Epimerase-Enzymkomplex wurde noch nicht identifiziert. Hierbei soll aber darauf hingewiesen werden, dass das Vorkommen von (-)-Catechin und (+)-Epicatechin nicht typisch für eine bestimmte Pflanzenfamilie ist. So konnten in der Bethel Nuss (*Areca catechu* L. *Areaceae*), die auch zur Familie der Palmen gehört, keine frei vorliegenden atypischen monomeren Flavan-3-ol-Enantiomere nachgewiesen werden. Es wurden dabei auch keine Proanthocyanidine mit Untereinheiten identifiziert, die aus atypischen Flavan-3-ol-Enantiomer-Untereinheiten bestanden. Für diese Pflanzenfamilie fehlen bisher Untersuchungen der beteiligten Gene, die diese bestimmten Enzyme exprimieren [26].

Teil II.

Proben

3. Guaraná

3.1. Botanik

Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* KUNTH) gehört zur Familie der *Sapindaceae* (Seifenbaumgewächse). Diese Lianenart ist im südamerikanischen Regenwald beheimatet. Der hier aufgeführte botanische Name entspricht der kultivierten Art, die in Brasilien angebaut wird. Im Gegensatz dazu existieren noch bestimmte Wildformen, wie die *P. yoco*, DUCKE. Für die hier durchgeführten Untersuchungen wurde ausschließlich die kultivierte Form *P. cupana* var. *sorbilis* KUNTH verwendet. Sie wird ca. 1,20 m hoch und besitzt etwa 30 cm lange, fünfteilige Fiederblätter mit kleinen weißen Blüten.

In den haselnußgroßen orange-roten Kapsel Früchten befinden sich, umschlossen von einem weißen Arillus, in der Regel ein bis drei dunkelbraune Samen (s. Abb. 3.1). Die Pflanze wächst sehr langsam und beginnt erst nach dem dritten Jahr Früchte zu tragen [64].

3.2. Verarbeitung und Verwendung

Guaraná wurde traditionell von den Indianern Südamerikas als anregende Droge verwendet. Mit ihrer Entdeckung durch Missionare wurde sie im 18. und 19. Jahrhundert auch in Europa bekannt. Populär wurde sie jedoch in Europa Anfang der 90er Jahre des 20. Jahrhunderts. Bei der Verarbeitung der Guaranáfrüchte ist nur der coffeinhaltige Samen von Bedeutung. Zu dessen Gewinnung werden die Guaranáfrüchte als erstes einer Fermentation unterzogen, bis sich die Samen aus der Kapsel und dem umgeben-



Abbildung 3.1: Guaranáfrüchte

den Arillus lösen.

Die nachfolgende Trocknung zur Gewinnung der Samen kann auf drei verschiedene Arten erfolgen:

1. Traditionelle Trocknung: Bei der traditionellen Trocknung werden die Samen über offenem Feuer mehrere Stunden getrocknet und gleichzeitig geröstet.
2. Lufttrocknung: Beim Lufttrocknen werden die Samen über vier Tage in der Sonne getrocknet.
3. Heißlufttrocknung: Die schnellste Art ist die Heißlufttrocknung, bei der die Samen 15 Minuten lang heißer Luft ausgesetzt werden. Dies hat den Vorteil, dass hier die Guaranásamen schnell und gleichmäßig getrocknet werden.

Danach wird die Samenschale entfernt und die so erhaltenen Samen zu einem Pulver zermahlen. Bei der ursprünglichen Form der Weiterverarbeitung wird das Samenpulver mit Wasser versetzt und zu einer Paste verarbeitet, die zu kleinen Stangen geformt wird. Diese werden wiederum über Feuer langsam getrocknet. Von diesen Guaranástangen werden Stücke abgeschnitten und mit heißem Wasser zu einem Getränk

verarbeitet. Zur industriellen Weiterverarbeitung wird das Pulver meistens direkt eingesetzt oder zu einem Sirup gekocht. Außerdem kann daraus ein Extrakt hergestellt werden, der vor allem in der Getränkeindustrie Verwendung findet. Dabei möchte man vor allem einen hohen Coffeinanteil erzielen. Zur Extraktgewinnung werden die üblichen Methoden der Coffeinextraktion eingesetzt. Hierbei sind unter anderem die Extraktion mit Ethanol-Wasser (95:5, v+v), überkritischem Kohlendioxid, Ethylacetat und Methylenchlorid zu erwähnen [64, 97]. Aufgrund des hohen Coffeingehalts von 4-6%, ist die Guaranánachfrage in den letzten 10-15 Jahren enorm gestiegen. Guaraná findet heute vor allem in Nahrungsergänzungsmitteln und Erfrischungsgetränken Verwendung. In Nahrungsergänzungsmitteln wird Guaraná in Pulverform, für Erfrischungsgetränke wird Guaraná-Extrakt eingesetzt [97].

3.3. Inhaltsstoffe

Guaraná ist für die Lebensmittel- und Pharmaindustrie deshalb so interessant, weil es drei bis viermal so viel Coffein enthält wie Kaffee. Der Coffeingehalt variiert hierbei je nach der Verarbeitung der Guaranásamen.

Weiterhin finden sich in Guaranásamen die Purinalkaloide Theobromin und Theophyllin sowie Saponine und Mineralstoffe [97]. Von den 12% Gerbstoffen sind über 10% Proanthocyanidine. Catechin ist dabei mit 5-7%, Epicatechin mit 3-4% vertreten. Der genaueren Zusammensetzung der Flavonoidfraktion wurde bisher wenig Beachtung geschenkt. In einer neueren Untersuchung konnten die Procyanidine B_1 , B_2 , B_3 , B_4 , A_2 und C_1 identifiziert werden [6, 106]. Außerdem fanden sich eine Reihe von Terpenen im Öl der Samen [69, 97]. Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über die Hauptinhaltsstoffe.

3. Guaraná

	Gehalt in %
Wasser	6,6
Protein	14,1
Fett	2,0
Asche	1,61
Ballaststoffe	34,3
Kohlenhydrate	48,0
Coffein	4,1
Tannin gesamt	12,1
Proanthocyanidine	10,7
Catechin	6,0
Epicatechin	3,8

Tabelle 3.1: Inhaltsstoffe von Guaranásamen

3.4. Physiologische Wirkungen

Neben der stimulierenden Wirkung des Coffeins, das bei längerer Gabe auch anti depressive Eigenschaften aufweist, wurde vor allem die antioxidative und antimikrobielle Wirkung von Guaraná untersucht [76]. Neuere Studien bezüglich der antimikrobiellen Eigenschaften von Guaranáextrakten zeigen teilweise widersprüchliche Ergebnisse.

Einerseits konnte eine antimikrobielle Wirkung unter anderem auf *Escherichia coli* und *Bacillus cereus* sowie auf *Aspergillus niger* beobachtet werden [66]. Andererseits wurde in einer Studie Coffein, Catechin, Epicatechin und Procyanidin B_2 , B_3 und B_4 aus Guaranásamen isoliert und jeweils auf ihre antimikrobielle Wirkung gegen *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* untersucht. Hierbei konnte jedoch bis zu einer Konzentration von 1000 μg Flavonoid/ml keinerlei antimikrobielle Aktivität beobachtet werden [6]. Weiterhin wurde eine präventive Wirkung der Tanninfraktion gegenüber *Streptococcus mutans* nachgewiesen, der als Hauptverursacher für Karies verantwortlich ist [106].

4. Kakao und Kakaoerzeugnisse

4.1. Kakao

Als Kakaobohnen bezeichnet man die vom Fruchtfleisch befreiten, unfermentierten oder fermentierten rohen Samen des Kakaobaumes (*Theobroma cacao* L.). Dieser zählt zur Familie der *Sterculiaceae*, stammt ursprünglich aus Südamerika, wird aber heute in den gesamten feuchtheißen Tropen angebaut. Man unterscheidet bei Kakao zwei Hauptsorten. Diese sind der Criollo- und der Forastero-Kakao. Criollo ist dabei die aromatischere, aber auch die empfindlichere Sorte, wohingegen Forastero weniger aromatisch, aber robuster und somit ertragreicher ist. Diese beiden Hauptsorten sind beliebig kreuzbar. Generell wird Kakao nach seiner geographischen Herkunft, dem Reinheitsgrad und nach der Stufe der Zubereitung eingeteilt. Man unterscheidet „Edelsorten“ (z.B. aus Ecuador und Trinidad) und sogenannte „Konsumsorten“ (z.B. aus Elfenbeinküste und Brasilien). Der Kakaobaum trägt 15-25 cm lange und 7-10 cm breite gurkenförmige Früchte (botanisch gesehen sind es Beeren). Diese enthalten in ihrem Inneren 25-50 Samen, die von einer weißen Fruchtpulpe umschlossen werden. Unter der Samenschale der Kakaobohnen liegt der Keimling, der aus zwei Keimblättern und einem Würzelchen besteht. Die Produktion von Kakao und Kakaoerzeugnissen ist heute ein nicht zu unterschätzender Wirtschaftsfaktor. Allein im Erntejahr 2005/2006 wurden 3,6 Millionen Tonnen Kakaobohnen geerntet. Die Hauptanbauländer sind Elfenbeinküste, Ghana, Indonesien, Nigeria, Kamerun, Brasilien und Ecuador. Deutschland gehört mit 409 000 Tonnen (2004/2005) neben den Niederlanden und den USA zum drittgrößten Hersteller für Kakao und Kakaoerzeugnisse. Mit einem Pro-Kopf-Verbrauch von 9,1 kg Schokolade (2004) liegt Deutschland hinter der Schweiz an der Spitze [5].

4. Kakao und Kakaoerzeugnisse

Im Gegensatz zu Kaffee und Tee wird Kakao nicht als wässriger Auszug, sondern als Substanz verzehrt [14]. Wie Tab. 4.1 zeigt, enthalten alle Kakaoerzeugnisse neben den anregenden Alkaloiden (v.a. Theobromin) große Mengen an Nährstoffen wie Fett, Kohlenhydrate und Eiweiß.

Betrachtet man die Minorkomponenten so sind in Kakaobohnen verglichen mit anderen Lebensmitteln (Äpfeln, Rotwein) erhebliche Mengen an Flavonoiden enthalten (s. Tab. 1.1). Wie in Tab. 4.1 aufgeführt, sind dies vor allem die Flavan-3-ole und die Procyanidine. Neben geringen Anteilen an (+)-Catechin, (+)-Gallocatechin und (-)-Epigallocatechin stellt (-)-Epicatechin das Hauptflavan-3-ol dar.

	Inhaltsstoffe in %
Wasser	5
Protein	11
Fett	54
Kohlenhydrate	30
Flavan-3-ole	37
Procyanidine	58
Anthocyane	4
Theobromin	14
Coffein	0,5

Tabelle 4.1: Inhaltsstoffe von luftgetrockneten Kakaokernen [14]

4.2. Kakaoverarbeitung

4.2.1. Ernte und Fermentation

Die reifen Früchte werden vom Baum geschnitten und die Samen mit der Pulpa aus den Früchten gelöst. Für den anschließenden Fermentationsprozess werden die Früchte in Gruben, Körben und Gärböden geschichtet und dort 2-8 Tage einer Fermentation (Rotten) unterzogen. Dabei kommt es zu einem Gärungsvorgang, bei dem Temperaturen von 45-50 °C herrschen. Die Keimfähigkeit geht dabei verloren. Bei der ablaufenden Reaktion senkt sich der pH-Wert von 6,5 auf 4,5. Es erfolgt die Bildung von Geschmacks-, Geruchs- und Farbkomponenten. Ein Teil der adstringierend schmeckenden Gerbstoffe wird ebenfalls abgebaut. Zusätzlich erfolgt der enzymatische Abbau und die Pulpa beginnt sich zu verflüssigen. Außerdem kommt es zwischen Kakaokern und Pulpa zu Austauschreaktionen. Die fermentierten Bohnen werden nun gewaschen und auf einen Wassergehalt von 6-8 % getrocknet, der zu einer Unterbrechung der ablaufenden oxidativen Reaktionen führt [5, 94].

4.2.2. Röstung

Im Anschluss an den Fermentationsprozess der Kakaobohnen schließt sich der Röstvorgang an.

Dabei werden die Kakaobohnen über einen definierten Zeitraum bei 100-120 °C geröstet. Es kommt zu zahlreichen aromabildenden Reaktionen in deren weiteren Verlauf unerwünschte Aromakomponenten ausgetrieben werden. Schädlingseier und Larven werden abgetötet und die Samenschale beginnt sich vom Kern zu lösen. Die Kakaokerne stellen 78-80 % der Kakaobohne dar. Der Rest sind Schalen und Abfall. Die Röstapparaturen arbeiten kontinuierlich. Die Wärme wird dabei mittels beheizter Platten, Heißluft oder IR-Strahlung übertragen. Vor der Röstung können die Kakaobohnen zu sogenannten Kakaonibs zerkleinert werden. Dieser Verfahrensschritt wird häufig gewählt, da Kakaobohnen keine einheitliche Größe besitzen und die unterschiedlich großen Kakaobohnen unterschiedlich lange geröstet werden müssten. Deshalb werden sie in eine einheitliche Größe gebrochen. Die Dauer und die richtige Temperaturfüh-

Die Röstung bestimmen in hohem Maße die Qualität der gerösteten Bohnen. Edelsorten werden aus Gründen der Aromaentwicklung milder geröstet als Konsumsorten. Sorten für die Schokoladenherstellung werden stärker geröstet als Sorten für Kakaopulver. Dies hängt damit zusammen, dass die Kakaobohnen zur Herstellung von Kakaopulver noch alkalisch behandelt werden (s. Kap. 4.2.4). Es ist aber auch möglich, dass die Kakaobohnen zu Kakaomasse vermahlen werden und dann erst die Röstung stattfindet.

4.2.3. Kakaomasse und Schokolade

Zur Herstellung der Kakaomasse werden die Kakaobohnen bzw. die Kakaonibs zermahlen. Unter Kakaomasse versteht man die zermahlene geröstete Kakaobohnen, die eine homogene Masse bilden. Diese Masse wird direkt zu Schokolade weiterverarbeitet, das heißt, sie wird mit Zucker, Kakaobutter, Aromastoffen und anderen Zutaten vermischt, zerrieben, anschließend endveredelt und geformt. Für Schokolade muss die Schokoladenmasse conchiert werden. Dabei wird in einem beheizten Behälter unter milden Temperaturen über mehrere Stunden (6-12 Stunden bei 45-50 °C) die Schokoladenmasse so lange bewegt, bis die gewünschte Qualität erreicht ist. Zum einen bilden sich dabei sehr viele Aromastoffe und zum anderen werden dabei die zermahlene Kakaobohnen so fein zerrieben, dass diese beim späteren Verzehr nicht mehr als Partikel wahrgenommen werden. Zur Abkürzung des Conchierprozesses können die Kakaokerne bereits durch entsprechende Behandlung (Alkalisieren, Dämpfen) vorveredelt werden.

4.2.4. Aufgeschlossene Kakaomasse, Alkalisierung

Zur Herstellung von kakaohaltigen Lebensmitteln wird Kakaopulver eingesetzt. Dieses enthält, bedingt durch die mildere Röstung der Kakaobohnen, noch unerwünschte Stoffe, wie z.B. Säuren, die den Geschmack des Endprodukts beeinträchtigen können. Oft wird für viele Erzeugnisse eine bestimmte Farbe der Schokolade gewünscht. Diese kann von tiefschwarz bis rötlich reichen [2]. Zu diesen Zwecken wird das Kakaopulver einer alkalischen Behandlung unterzogen. Das Kakaopulver wird dabei unter definierten Bedingungen (Art des Alkalisierungsmittels, Zeit, Temperatur) alkalisiert.

Hierfür wird z.B. Magnesiumoxid oder Natriumhydroxid verwendet. Dabei herrscht ein pH-Wert von 8,0-9,0. Die Alkalisierungsort und Dauer ist abhängig von den gewünschten Produkteigenschaften. Sehr oft eingesetzt wird das klassische alkalische Aufschlussverfahren mit Wasserdampf. Beim sogenannten *van Houten* -Verfahren werden die Kakaokerne mit 2-2,5 % alkalischer Lösung bei 75-100 °C behandelt, bei Bedarf mit Weinsäure abgestumpft und auf einen Wassergehalt von 2 % durch Vakuum, Heißluft oder längeres Kneten bei Temperaturen über 100 °C getrocknet. Dadurch werden unerwünschte Stoffe neutralisiert, und die gewünschte farbliche Vertiefung bzw. Anpassung kann stattfinden. Alkalisiertes Kakaopulver besitzt eine bessere Benetzbarkeit, was vorteilhaft für die Herstellung von Kakaotränken ist [94, 13]. Die Alkalisierung kann aber auch früher im Kakaoverarbeitungsprozess stattfinden. So ist es durchaus üblich, dass die Kakaonibs vor, während oder nach dem Röstprozess bereits alkalisiert werden. [4]

4.2.5. Abpressen der Kakaobutter

Zur Verarbeitung der Kakaomasse zu Kakaopulver muss aus technologischen Gründen ein Teil des Fettes abgepresst werden. Es erfolgt eine Auftrennung der Kakaomasse in Kakaopulver und Kakaobutter. Die Masse wird dazu auf 90-100 °C erwärmt und einem Druck von 900 kp/cm² ausgesetzt. Die Hauptmenge der Kakaobutter wird für die Schokoladenherstellung eingesetzt. Der Preßkuchen enthält noch 10-24 % Fett. Dieser wird zu Kakaopulver zermahlen. Man unterscheidet schwach entöltes Kakaopulver (20-22 % Fett) und stark entöltes Kakaopulver (10-20 % Fett). Letzteres ist meist dunkler und wird bei der Herstellung von Glasuren, Puddingpulver, Eiscreme und Getränken verwendet [13, 14].

4. Kakao und Kakaoerzeugnisse

5. Fruchtsaftgewinnung

Bei der Herstellung von Fruchtsäften wird der Saft einer Pasteurisierung unterworfen. Die Pasteurisierung dient der Abtötung von Mikroorganismen und der Inaktivierung von Enzymen. Da längere Heißhaltezeiten die Qualität der Säfte mindern, ist eine Hochtemperatur-Kurzzeit-Erhitzung im Plattenwärmeaustauscher (z. B. bei 82-90 °C über 15-150 sec) mit anschließender schneller Abkühlung zu bevorzugen. Die Dauer der Erhitzung richtet sich nach dem Anfangskeimgehalt des Saftes bei der Pasteurisation. Allgemein gilt, dass hohe Temperaturen und kurze Einwirkzeiten zu geringerer Produktschädigung führen als lange Einwirkzeiten bei niedrigeren Temperaturen. Man unterscheidet bei der Herstellung von Fruchtsäften zwischen zwei verschiedenen Arten von Saft, die kommerziell erhältlich sind:

1. Direktsaft

Direktsaft ist ein Produkt, bei dem der Saft nach dem Pressvorgang pasteurisiert und direkt abgefüllt wird. Es findet keine weitere Behandlung statt. Die eingesetzten Temperaturen liegen bei 82-90 °C über einen Zeitraum von 15-150 Sekunden [14]. Durch diese kurze Erhitzung des Saftes kommt es zu unwesentlichen Aromaverlusten.

2. Saft aus Konzentrat

Bei der Herstellung von Konzentratsaft wird dem Saft nach dem Pressvorgang durch Erhitzung ein Großteil des Wassers entzogen. Dabei wird der Saft 3-8 Minuten bei 100 °C in einem Fallstromverdampfer aufkonzentriert. Das so erhaltene Konzentrat wird abgefüllt und kann aufgrund des geringeren Gewichts besser und kostengünstiger transportiert werden. Am Verarbeitungsort wird das Saftkonzentrat mit der entsprechenden Menge an Wasser auf das Ursprungsvolumen rückverdünnt.

5. Fruchtsaftgewinnung

Neben der Verdampfungsmethode ist auch eine Konzentrierung durch Gefrieren oder Druckfiltration möglich. Bei der Aufkonzentrierung findet aber immer ein Verlust von Aromastoffen statt. Diese werden ebenfalls aufgefangen und bei der Rückverdünnung dem Saft wieder zugegeben [14].

Die kommerziell erhältlichen Direktsäfte sind aufgrund der höheren Transportkosten teurer als Konzentratsäfte. Dafür weisen Direktsäfte im Vergleich zum Saft aus Konzentrat bessere sensorische Eigenschaften auf. Aufgrund des kommerziellen Aspektes ist es in der Vergangenheit immer wieder zu Betrugsfällen gekommen, bei dem Konzentratsaft als Direktsaft verkauft wurde. Der Nachweis solcher Verfälschungen ist äußerst schwierig.

6. Bier und Hopfen

Hopfen (*Humulus lupulus* L., *Cannabaceae*) wird überwiegend als Zutat für die Herstellung von Bier genutzt. Seine phenolischen Inhaltsstoffe gehen während des Brauprozesses in das Bier über. Die Identifizierung der Hopfenflavonoide und ihr Verhalten während der Bierherstellung wurden im eigenen Arbeitskreis sehr intensiv untersucht. Dabei konnten vor allem bei den Prenylflavonoiden (Xanthohumole) und den Bittersäuren (Humulone und Lupulone) neue Substanzen in Hopfen und Hopfenprodukten mittels LC-MS nachgewiesen werden [78].

Vor allem die Substanzen aus der Gruppe der Prenylflavonoide sind von besonderer Bedeutung, da ihnen positive physiologische Eigenschaften nachgewiesen werden konnten. Dazu zählen vor allem Xanthohumol, Isoxanthohumol und 8-Prenylnaringenin. Xanthohumol, ein prenyliertes Chalkon und 8-Prenylnaringenin, ein Prenylflavonoid sind natürliche Bestandteile des Hopfens (s. Abb. 6.1).

Demgegenüber entsteht Isoxanthohumol erst während des Brauprozesses aus Xanthohumol. In *in vitro*-Experimenten wurden für Xanthohumol und Isoxanthohumol vor allem antioxidative, anticancerogene, blutglucose-, triglycerid-, und leberlipid senkende Wirkungen nachgewiesen [24, 31, 38, 84, 108]. 8-Prenylnaringenin hingegen gilt als das potenteste Phytoöstrogen, dessen Wirkung um das 20fache höher liegt, als von Genistein aus Soja. Die anderen im Hopfen vorkommenden östrogenaktiven Substanzen, wie 6,8-Diprenylnaringenin und 8-Geranylnaringenin weisen nur ca. ein Prozent der Östrogenaktivität im Vergleich zu 8-Prenylnaringenin auf [71]. Es konnte nachgewiesen werden, dass 8-Prenylnaringenin racemisch vorliegt. Beide Enantiomeren besitzen die gleiche Östrogenaktivität. Neuere Studien zum Metabolismus konnten zeigen, dass Xanthohumol im Magen-Darm-Trakt zu Isoxanthohumol umgewandelt wird. Isoxanthohumol wiederum wird größtenteils durch die Darmflora und in der Leber zu 8-Prenylnaringenin umgewandelt [83, 84].

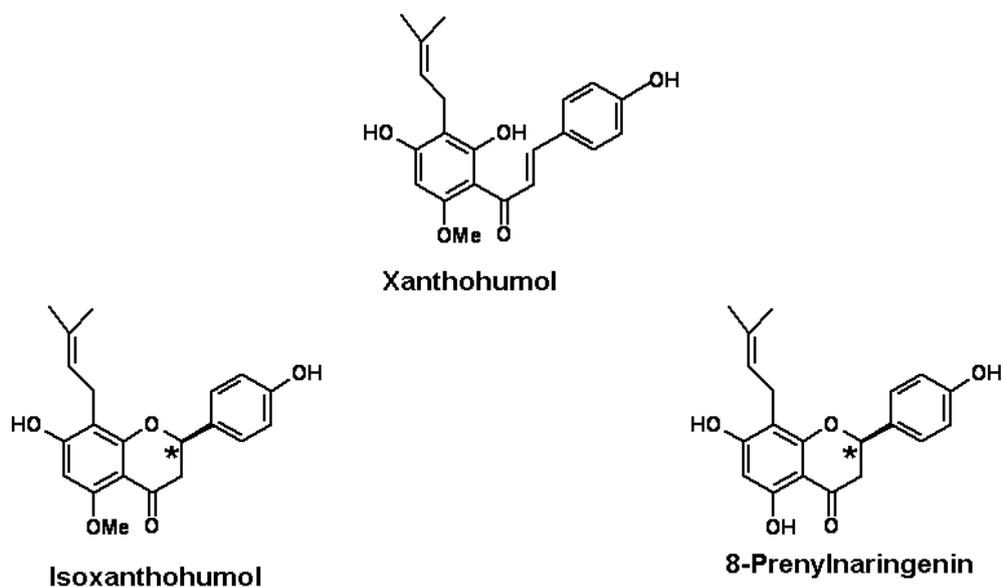


Abbildung 6.1: Strukturformeln von Xanthohumol, Isoxanthohumol und 8-Prenylnaringenin

Xanthohumol wird während des Brauprozesses größtenteil durch die Einwirkung von Hitze beim Würzekochen in Isoxanthohumol umgewandelt. Außerdem wird Isoxanthohumol bei der Verstoffwechslung durch die Hefezellen abgebaut und beim Filtrierungsvorgang adsorbiert. In kommerziell erhältlichen Bieren finden sich weniger als 0,2 mg/l Xanthohumol, dagegen 30-240 $\mu\text{g/l}$ Isoxanthohumol. Wie in Abb. 6.1 dargestellt, findet bei der Umwandlung von Xanthohumol in Isoxanthohumol ein Ringschluss am C-2 des C-Rings statt (Michael-Cycloaddition). Am C-2 ist ein chirales Zentrum entstanden. Von Isoxanthohumol existieren deshalb die entsprechenden Enantiomeren.

Vor einiger Zeit war auch ein mit Xanthohumol angereichertes Bier auf dem Markt, das mit den gesundheitsfördernden Eigenschaften des Xanthohumols warb. Hierbei wurde ein spezielles Verfahren angewendet, bei dem ein Großteil des Xanthohumols erhalten blieb. Dies gelang durch den Einsatz von mit Xanthohumol angereichertem Hopfenextrakt, verbunden mit einer späten Zugabe des Hopfens beim Würzekochen [86, 103].

Für die Bildung von 8-Prenylnaringenin gibt es unterschiedliche Erklärungen. Hopfen

enthält keine Chalkonisomerase. Es ist davon auszugehen, dass 8-Prenylnaringenin auf nicht enzymatischem Weg aus Xanthohumol und/oder Desmethylxanthohumol gebildet wird. Es ist aber auch davon auszugehen, dass es während des Brauprozesses gebildet wird.

Teil III.

Analytik

7. Kapillarelektrophorese

Die Kapillarelektrophorese (CE) ist verglichen mit anderen Trenntechniken, wie z.B. der HPLC und der GC eine relativ junge Methode. In den letzten 10 Jahren wurden die Geräte dafür erheblich verbessert und konnten somit für die Routineanalytik eingesetzt werden. Im Pharmabereich wird die CE zur Reinheitskontrolle von synthetisch hergestellten Medikamenten und zur Proteinanalytik angewendet [17]. Aber auch im Lebensmittelbereich kommt sie sehr erfolgreich als alternative Analysentechnik zur Anwendung [107]. Die Untersuchungen aus dem eigenen Arbeitskreis zeigen dabei, wie die CE zur erfolgreichen Qualitätskontrolle von Lebensmitteln herangezogen werden kann [37, 56, 70].

7.1. Zur Theorie der Kapillarelektrophorese

Die CE ist ein analytisches Trennverfahren, bei dem die Analyten aufgrund von unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Dabei migrieren die Analyten durch eine mit Puffer gefüllte Glaskapillare (Innendurchmesser 50-100 μm), an deren Enden eine Spannung angelegt ist.

Wie in Abb. 7.1 dargestellt, tauchen die Enden der Glaskapillare und der Elektroden dabei in die mit Trennpuffer gefüllte Puffergefäße ein. Der Analyt wird an einem Ende in die mit Puffer gefüllte Kapillare injiziert. Eine Möglichkeit ist die hydrodynamische Injektion, bei der der Analyt durch das Anlegen eines Drucks von außen in die Kapillare injiziert wird. Durch das Anlegen einer definierten Spannung wandert der Trennpuffer mit dem Probenpfropfen durch die Kapillare. Die verschiedenen Analyten wandern dabei unterschiedlich schnell. Die Auftrennung wird also aufgrund unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilitäten der einzelnen Analyten erreicht. Die

7. Kapillarelektrophorese

auf diese Weise voneinander getrennten Analyten werden dann mittels UV/DAD am Kapillarende detektiert. Das Trennergebnis wird dabei entscheidend durch die gewählten Parameter, wie die Konzentration und der pH Wert des Hintergrundelektrolyten, die angelegte Spannung, die Temperatur, die Art und Länge der Kapillare sowie die Polung, bestimmt [27, 33].

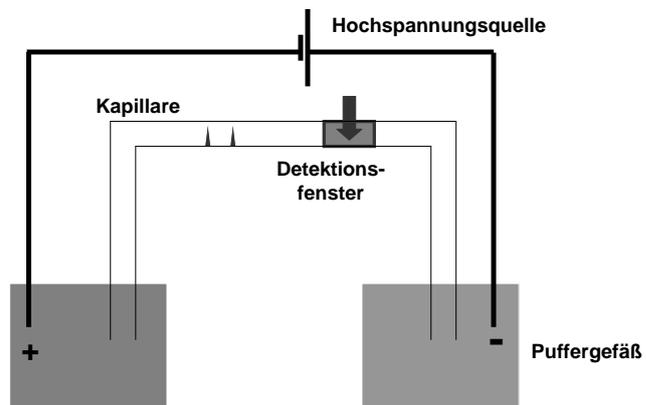


Abbildung 7.1: Aufbau eines kapillarelektrophoretischen Trennsystems

7.2. Trennkräfte innerhalb der Kapillare

Im Folgenden sollen die unterschiedlichen Kräfte, die innerhalb eines kapillarelektrophoretischen Trennsystems wirken, erläutert werden. Dabei unterscheidet man zwischen systemspezifischen und analytspezifischen Trennkräften.

7.2.1. Systemspezifische Trennkräfte - Elektroosmotischer Fluss

Als systemspezifische Kraft wird der elektroosmotische Fluss (EOF) angesehen. Dieser stellt ein typisches Phänomen in einem kapillarelektrophoretischen Trennsystem dar. Die Innenwand einer Glaskapillare ist mit Si-OH Gruppen belegt. Wird nun die Kapillare mit Puffer gefüllt, dissoziieren die Si-OH-Gruppen in Abhängigkeit des pH-Wertes der Pufferlösung. Dies führt dazu, dass sich die Kapillarwand negativ auflädt. An die negativ geladene Kapillarwand lagern sich nun entsprechend positiv geladene Ionen an und bilden eine starre Schicht aus („Stern-Schicht“) (s. Abb. 7.2). An diese Schicht lagern sich wieder negative Ionen an. Da diese durch die Puffermoleküle solvatisiert sind, werden diese Ionenschichten zum Kapillarmittelpunkt hin immer diffuser und es kommt zur Ausbildung eines Potentialgefälles (Zeta-Potential) aufgrund der unterschiedlichen Ladungsverteilung.

Da die Kapillare nach außen hin elektrisch neutral geladen ist, herrscht bei einem basischen pH-Wert in der mit Puffer gefüllten Kapillare ein Überschuss an beweglichen Kationen. Wird nun an die Enden der Kapillare eine Spannung angelegt, werden die positiv geladenen Ionen in Richtung der Kathode gezogen. Da diese von Gegenionen solvatisiert sind, werden diese ebenfalls mitgezogen und es kommt zu einer Bewegung der gesamten Flüssigkeit in Richtung der Kathode. Dieses Phänomen wird als EOF bezeichnet.

Da der EOF durch die Bewegung der Ionenschichten innerhalb der Kapillare entsteht, kommt es zur Ausbildung eines stempelförmigen Flussprofils (s. Abb. 7.3). Dieses Flussprofil steht im Gegensatz zum hyperbolischen Flussprofil in der HPLC, bei der von außen angelegte Druck die treibende Kraft darstellt [18, 27].

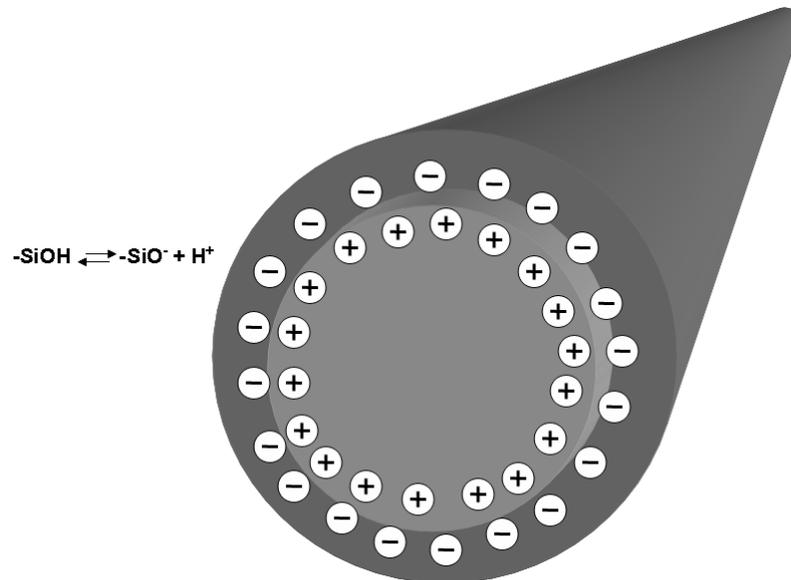


Abbildung 7.2: Querschnitt durch eine fused-silica Kapillare

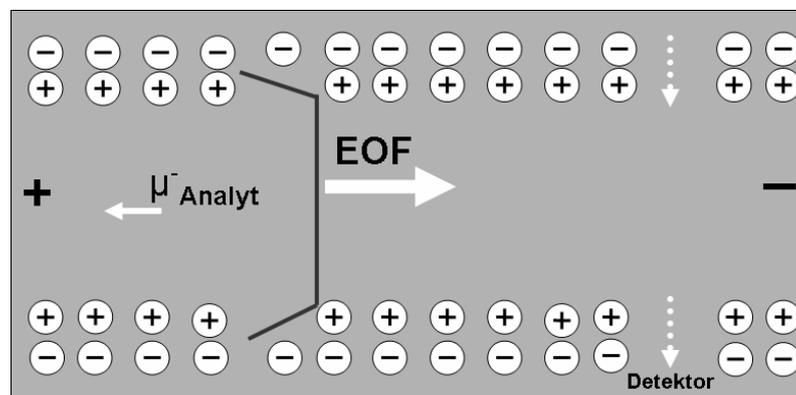


Abbildung 7.3: Strömungsprofil des EOF bei kathodischer Polung; μ_{Analyt} : Eigenmobilität des Analyten

7.2.2. Analytspezifische Trennkräfte - Eigenmobilität

Eine analytspezifische Trennkraft stellt die sogenannte Eigenmobilität des Analyten (μ_{Analyt}) dar, die durch dessen Molekülmasse, Ladung und Größe bestimmt wird. Im Gegensatz zur HPLC, bei der die Probenmoleküle mit annähernd gleicher Geschwindigkeit bewegt werden, wird in der CE durch die unterschiedlichen Eigenmobilitäten der Analyten ein selektiver Transport und damit die gewollte Trennung erreicht [27]. Die Grundvoraussetzung für eine Trennung in der CE ist ein Mobilitätsunterschied zwischen den Analytmolekülen ($\Delta\mu \neq 0$).

7.2.3. Vor- und Nachteile in der CE

Zu den großen Vorteilen der CE gehört ihre sehr gute Trennleistung. Dabei können zwischen 200 000 und 900 000 theoretische Böden erreicht werden. Es ist eine schnelle Methodenentwicklung möglich, bei der die einzelnen Trennparameter (Art, Konzentration und pH-Wert des Hintergrundelektrolyten, Temperatur etc.) problemlos modifiziert werden können. Im Gegensatz zur Fließmitteländerung bei der HPLC erlaubt die CE bei Änderung der Pufferzusammensetzung einen schnellen und einfachen Austausch des Hintergrundelektrolyten. Die Volumina an eingesetztem Trennpuffer für eine Trennung sind verglichen mit der HPLC viel geringer. Ein weiterer Vorteil in der CE ist die große Oberfläche der Kapillare, bezogen auf das Lösemittelvolumen, die einen raschen Abtransport der Wärme erlaubt. Somit ist eine Verwendung von hohen Spannungen möglich. Dadurch kommt es letztlich zu einer hohen Analysengeschwindigkeit und folglich zu einer verkürzten Analysenzeit. Dies macht die CE zu einer kostengünstigen Methode [33]. Durch den Aufbau des CE-Systems ist aufgrund der optischen Durchlässigkeit der Kapillare eine direkte Detektion des Analyten möglich. Zudem lassen sich viele Analyten in rein wässrigem Medium trennen. Es kann also oft auf den Einsatz von organischen Lösungsmitteln als Modifier verzichtet werden (s. Kap. 10).

Ein Nachteil der CE besteht in der eingeschränkten Nachweisempfindlichkeit aufgrund des geringen Innendurchmessers der Trennkapillare. Diese liegt etwa um eine Zehnerpotenz niedriger als bei der HPLC. Der Einsatz von Bubble- oder Z-Zellen sowie die Aufkonzentrierung der Probe vor der eigentlichen Messung (Stacking-Methoden)

7. Kapillarelektrophorese

tragen dazu bei, die Nachweisempfindlichkeit der CE in gewissem Umfang zu verbessern.

7.3. Chirale Trennung mittels CE

Enantiomere sind chemische Verbindungen, die sich wie Bild und Spiegelbild verhalten. Sie sind aufgrund ihrer Struktur und Molekülmasse in ihren physiko-chemischen Eigenschaften bis auf die räumliche Anordnung völlig gleich. Sie besitzen also auch die gleiche Ladungsdichte und damit auch die gleiche elektrophoretische Mobilität.

Die elementare Grundvoraussetzung für die Trennung verschiedener Analyten in der CE ist jedoch eine entsprechende Differenz in den elektrophoretischen Mobilitäten der beiden Enantiomere: $\mu_R \neq \mu_S$. Dabei sind μ_R und μ_S die Mobilitäten der Enantiomere. Diese Mobilitätsdifferenz ist bei enantiomer vorliegenden Analyten nicht gegeben. Somit ist eine Trennung im elektrischen Feld mittels CE nicht ohne Weiteres möglich. Erst eine entsprechende Mobilitätsdifferenz kann zu einer Trennung führen. Tritt jedoch ein Enantiomer mit einem anderen chiralen Molekül in Wechselwirkung, entsteht ein Diastereomer. Diastereomere besitzen im Gegensatz zu Enantiomeren unterschiedliche physiko-chemische Eigenschaften. Eine Enantiomerentrennung gelingt in der CE durch den Einsatz eines chiralen Selektors. Die einzelnen Enantiomere treten aufgrund ihrer sterischen Anordnung mit dem chiralen Selektor unterschiedlich stark in Wechselwirkung. Da diese Selektoren selbst chirale Moleküle sind, kommt es zu einer vorübergehenden Ausbildung von Diastereomerenkomplexen. Wie aus unten stehender Gleichung ersichtlich, gibt es zwei Möglichkeiten, die schließlich zu einer Enantiomerentrennung führen können:

1. Die beiden Diastereomerenkomplexe weisen unterschiedliche Bindungskonstanten auf $K_R \neq K_S$. Die Diastereomerenkomplexe können dabei die gleiche Mobilität besitzen.
2. Die beiden Diastereomerenkomplexe haben beide die gleichen Bindungskonstanten, besitzen aber unterschiedliche Mobilitäten in den Diastereomerenkomplexen $\mu_{cR} \neq \mu_{cS}$.

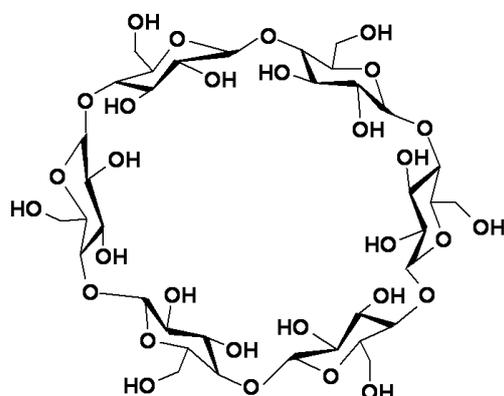
$$\Delta\mu = \mu_R - \mu_S = \frac{\mu_f + \mu_{cR}K_R[C]}{1 + K_R[C]} - \frac{\mu_f + \mu_{cS}K_S[C]}{1 + K_S[C]}$$

Dabei sind $\Delta\mu$ die Mobilitätsdifferenz der beiden Enantiomeren und μ_R und μ_S die Mobilitäten der einzelnen Enantiomeren. μ_f stellt die Mobilität der unkomplexierten Enantiomeren dar und μ_{cR} und μ_{cS} die Mobilitäten der Enantiomeren-Selektor-Komplexe. $K_R[C]$ und $K_S[C]$ sind die jeweiligen Komplexbildungskonstanten der Enantiomeren und $[C]$ die Konzentration des chiralen Selektors. Diese beiden Trennmechanismen können gleichzeitig auftreten oder sich gegenseitig überlagern [17].

7.3.1. Wahl des chiralen Selektors

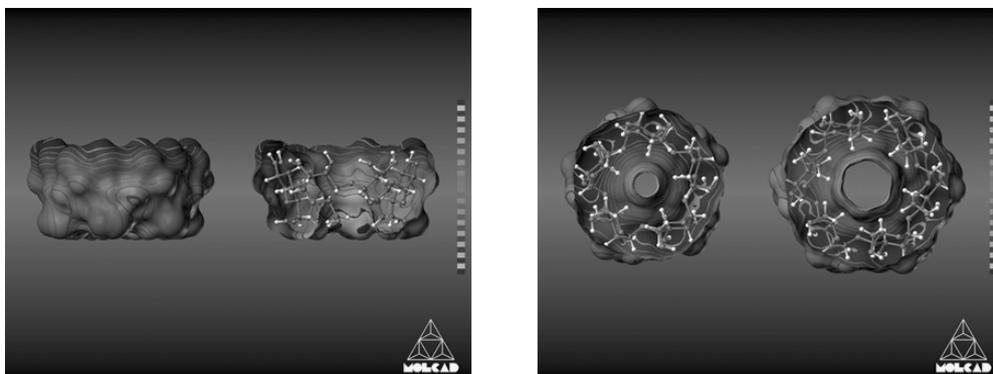
Unter den vielen chiralen Selektoren, die in einem kapillarelektrophoretischen Trennsystem eingesetzt werden können, sind Cyclodextrine (CD) oft die Selektoren der Wahl. Es lassen sich schon durch den Einsatz geringer Konzentrationen gute Trennungen für enantiomere Analyten erzielen. Viele sind ungiftig und gut wasserlöslich. Für die in der vorliegenden Arbeit entwickelten Methoden zur Enantiomerentrennung von Flavonoiden wurden ausschließlich Cyclodextrine als chirale Selektoren verwendet. Andere chirale Selektoren, wie makrocyclische Antibiotika, Kronenether, Gallensalze oder chirale Ionenpaar-Reagenzien kamen nicht zum Einsatz.

Cyclodextrine sind cyclische Oligosaccharide, die aus mehreren D-Glucose-Einheiten zusammengesetzt sind, die α -(1,4)-glykosidisch verknüpft sind. Man gewinnt sie durch den enzymatischen Abbau von Stärke [89]. Die so gewonnenen Cyclodextrine, die auch als native Cyclodextrine bezeichnet werden, sind das α -, β - und γ -Cyclodextrin. Sie bestehen aus sechs (α -CD), sieben (β -CD) bzw. acht (γ -CD) Glucoseuntereinheiten (s. Abb. 7.4).

Abbildung 7.4: Struktur von α -Cyclodextrin

7.3.2. Native Cyclodextrine

Cyclodextrine bilden formal gesehen die Form eines Kegelstumpfes, der innen einen Hohlraum aufweist. Dieser Hohlraum im Cyclodextrin ist auf beiden Molekülseiten nach außen hin offen. Beide Öffnungen unterscheiden sich in ihrer Struktur aber auch in ihrer Größe.

Abbildung 7.5: Struktur von α -CD

Aufgrund der Verknüpfung und der sterische Ausrichtung der Glucose-Untereinheiten ergeben sich unterschiedliche Eigenschaften der Moleküloberfläche und der Kavität.

Das Molekül ist nach außen hin hydrophil. Dies wird durch die OH-Gruppen am C-2, C-3 und C-6 bestimmt. Die OH-Gruppe des C-6 zeigt dabei aus der schmalen Öffnung des CDs, wohingegen die OH-Gruppen des C-2 und C-3 aus der breiten Öffnung des CDs zeigen. Diese können mit dem Analytmolekül ebenfalls in Wechselwirkung treten. Das Innere des CDs ist dagegen hydrophob. Dies wird durch die glykosidisch gebundenen Sauerstoffatome und die Methin-Protonen am C-3 und C-5 bestimmt Abb. 7.5 zeigt α -Cyclodextrin dargestellt mittels Molecular Modelling ¹.

Aufgrund der beschriebenen Hohlraumstruktur besitzen die CDs die Möglichkeit mit verschiedenen Molekülen in Wechselwirkung zu treten und diese in Form eines Wirt-Gast-Komplexes an sich zu binden. Dabei kommt es zur Ausbildung von H-Brücken-Bindungen und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen. Die Bindungsfähigkeit der CDs hängt vor allem von der Größe des Hohlraums ab. Die Wechselwirkung der Gastmoleküle mit dem CD wird dabei nicht ausschließlich durch die Größe und apolare Struktur des CD-Inneren bestimmt, sondern auch durch die nach außen zeigenden OH-Gruppen [61, 85, 88].

7.3.3. Modifizierte Cyclodextrine

Ein großes Potential der CDs liegt in der Möglichkeit der Derivatisierung. Durch entsprechende Reaktion mit den OH-Gruppen der Glucosemoleküle lassen sich bestimmte funktionelle Gruppen einführen. Dies können beispielsweise Sulfat-, Amino-, Hydroxyether- oder Carboxyl-Gruppen sein. Dabei ergeben sich Moleküle mit völlig neuen Eigenschaften. Das CD-Grundgerüst bleibt erhalten, es kommt jedoch durch die Derivatisierung zu einer Vergrößerung der beschriebenen Hohlraumstruktur. Dadurch können zum Beispiel Moleküle, die aufgrund ihrer Größe nicht mit einem nativen CD wechselwirken, jedoch mit diesem komplexieren. Außerdem können bestimmte Moleküle noch stärker an das CD gebunden werden. Zusätzlich resultiert durch die Derivatisierung eine verbesserte Wasserlöslichkeit. Durch die Einführung neuer funktioneller Gruppen lässt sich auch die Ladung der CDs verändern. Die CDs migrieren dann beispielsweise gegen den EOF, wodurch sich auch neutrale Analytmoleküle auftrennen lassen [18, 85].

¹Die Abbildung wurde mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dr. Stefan Immel, Institut für Zuckerchemie, TU-Darmstadt zur Verfügung gestellt

7.3.4. Chirale Trennung mit CDs

Für eine entsprechende Enantiomertrennung in einem kapillarelektrophoretischen Trennsystem wird das CD in definierter Konzentration zum Hintergrundelektrolyten gegeben. Es migriert dabei, beeinflusst durch den EOF, durch die Kapillare. Hierbei kann es nun mit beiden enantiomeren Analyten komplexieren. Ergibt sich durch die Wechselwirkung zwischen Analyt und CD eine entsprechend große Mobilitätsdifferenz kommt es zur Trennung der beiden Enantiomeren (s. Abb. 7.6). Eine Enantiomertrennung in einem CE-System kann dabei bereits durch den Einsatz von sehr geringen CD-Konzentrationen erfolgen. Dies verdeutlicht die hohe Selektivität dieser Substanzen bei der chiralen Analytik mittels CE (s. Kap. 15).

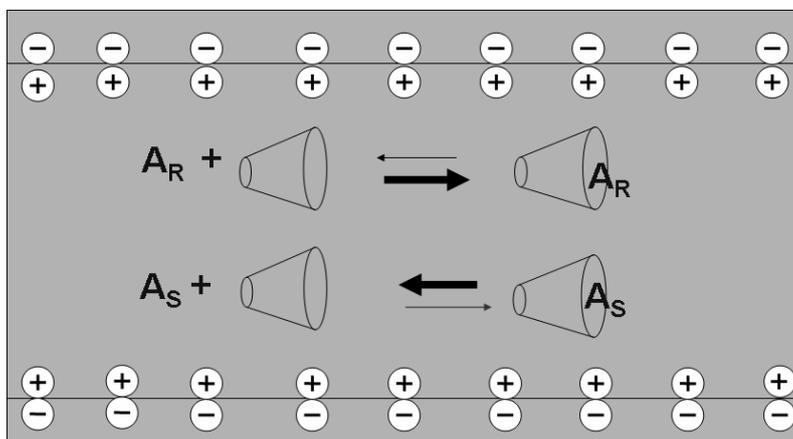


Abbildung 7.6: Prinzip der chiralen CE-Trennung; A_R , A_S : Enantiomere Analyten, Cyclodextrine schematisch als Kegelstümpfe dargestellt

Ein wichtiger Schritt zum Verständnis der Cyclodextrine ist die Art des Komplexbildungsmechanismus mit dem Analytmolekül. In den letzten Jahren konnte in vielen Fällen durch strukturaufklärende Methoden und Berechnungen mittels Molecular-Modelling die Komplexbildung von CD und Analytmolekül beschrieben werden [18]. Als Beispiel sei hier die mögliche Komplexbildung von (+)-Catechin und β -CD aufgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass der B-Ring des (+)-Catechin innerhalb des CDs liegt, wohingegen der A-Ring aus dem CD herausragt. Abb. 7.7 zeigt einen von fünf möglichen berechneten thermodynamisch-stabilen Komplexen [61]. Weitere Unter-

7. Kapillarelektrophorese

suchungen konnten zeigen, dass es sich bei der Komplexbildung von (+)-Catechin und β -CD um einen Komplex im Verhältnis 1:1 handelt. Dabei tritt (+)-Catechin über die größere Öffnung des CDs mit diesem in Wechselwirkung [50].

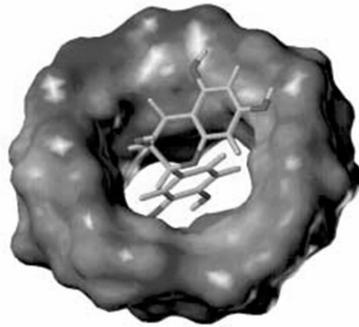


Abbildung 7.7: Thermodynamisch günstige Struktur des Inklusionskomplexes von (+)-Catechin und β -CD [61]

Teil IV.

Material und Methoden

8. Material

8.1. Probenmaterial

Probe	Herkunft
Guaranásamen (Ungeröstet und sonnengetrocknet)	Embrapa/CPATU (Belém, Brasilien)
Guaranáextraktpulver	Denk Feinchemie GmbH (München, Deutschland)
Apfelsäfte, frische Litchi, Dosenfrüchte, Kakaoprodukte, Orangensäfte	Bonner Supermarkt
Äpfel (Sorte: Braeburn)	Bonner Wochenmarkt
Kakaofrucht (Sorte: unbekannt)	Brasilien, Sao Paolo
Kakaohalbfabrikate	Lindt Sprüngli Chocoladenfabriken GmbH (Aachen, Deutschland)

Tabelle 8.1: Eingesetztes Probenmaterial

Alle Proben wurden bei 8 °C im Kühlschrank gelagert.

8.2. Chemikalien

8.2.1. Standardsubstanzen

Einzelstandards der Flavan-3-ol-Enantiomeren ((+)-Catechin, (-)-Catechin, (+)-Epicatechin und (-)-Epicatechin wurden von Sigma (St.Louis, MO, USA) bezogen. Isoxanthohumol, 8-Prenylnaringenin wurden aus Hopfenextrakt isoliert (s. Kap. 9.3.8). Alle Standardsubstanzen wurden in DMSO gelöst (Konzentration 0,5 – 0,2 mg/ml) und bei 8°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Natrium-Tetraborat, wasserfrei, p.a.	Fluka Chemie (Buchs, Schweiz)
Borsäure, p.a.	Fluka Chemie, (Buchs, Schweiz)
Natriumhydroxid, p.a.	Fluka Chemie (Buchs, Schweiz)
Dimethylsulfoxid (DMSO), HPLC,	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Methanol, HPLC-grade,	Fisher Scientific (Loughborough, Großbritannien)
Cyclohexanol, p.a.,	KMF Laborchemie (Lohmar, Deutschland)
Acetonitril, HPLC-grade	Fisher Scientific (Loughborough, Großbritannien)
Natriumhydrogenphosphat, p.a.	Fluka Chemie, (Buchs, Schweiz)
Salzsäure, p.a.	Fluka Chemie, (Buchs, Schweiz)

8.2.2. Cyclodextrine

6-O- α -Maltosyl- β -Cyclodextrin	Sigma (St.Louis, MO, USA)
(2-Hydroxypropyl)- γ -Cyclodextrin	Fluka Chemie (Buchs, Schweiz)
Sulfobutylether- β -CD	Cydex (Lenexa, KS, USA)
Glucosyl- β -CD	Wako Chemicals GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
Carboxymethyl- β -CD	Fluka Chemie (Buchs, Schweiz)
γ -CD	Fluka Chemie (Buchs, Schweiz)

9. Methoden

9.1. CE-Analysen

9.1.1. Kapillarelektrophorese

CE-Gerät	Beckman P/ACE MDQ capillary electrophoretic system
Detektor	Photodiodenarraydetektor
Auswertesoftware	Beckman 32 Karat Software Version 7.0.
PC	IBM personal computer
Kapillaren	fused-silica Kapillaren, mit 375 μm O.D. und 75 μm I.D.
Firma	Beckman-Coulter (Fullerton, CA, USA)

9.1.2. Hintergrundelektrolyt

Für die Herstellung des Trennpuffers wurden entsprechende Mengen an Borsäure und Natriumtetraborat in bidestilliertem Wasser gelöst, mit Natronlauge bzw. Salzsäure auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt und direkt vor dem Gebrauch membranfiltriert [102].

9.1.3. Optimierte Trennparameter für die Enantiomerentrennung der monomeren Flavan-3-ole

Puffer:	100 mM Borat; pH 8,5
Chiraler Selektor:	HP- γ -CD 12 mM
Spannung:	18 kV
Polung:	kathodischer Modus
Temperatur:	20 °C
Kapillare:	50/40cm fused-silica Kapillare; I.D. 75 μ m
Injektion:	hydrodynamisch; 3s (0,3 p.s.i.)
Detektionswellenlänge:	Scanbereich 190-350nm, 280nm

9.1.4. Optimierte Trennparameter für die Enantiomerentrennung der Prenylflavonoide

Puffer:	100 mM Borat; pH 8,3
Chiraler Selektor:	SBE- β -CD 30 μ M
Spannung:	20 kV
Polung:	kathodischer Modus
Temperatur:	20 °C
Kapillare:	50/40cm fused-silica Kapillare; I.D. 75 μ m
Injektion:	hydrodynamisch; 3s (0,3 p.s.i.)
Detektionswellenlänge:	Scanbereich 190-350nm, 324nm

9.1.5. Konditionierungs- und Spülschritte

Bevor die Probe gemessen werden konnte, wurde die Kapillare mit Natronlauge (0,25 M für 3 min bei 20 p.s.i.) gespült. Dies hat den Zweck, dass eventuelle Probenbestandteile aus vorangegangenen Messungen, die eventuell an der Kapillarwand absorbiert sind, abgelöst werden. Danach wird mit bidestilliertem Wasser

(3 min bei 20 p.s.i.) neutral gespült und die Kapillare mit dem jeweiligen Trennpuffer (5 min, 20 p.s.i.) konditioniert. Anschließend wird die Probe mittels hydrodynamischer Injektion in die Kapillare aufgegeben.

Als Zwischenschritt hat sich erfahrungsgemäß vor und nach der Probenaufgabe die Injektion von bidestilliertem Wasser (2s bei 0,3 p.s.i.) als vorteilhaft erwiesen. Die untersuchten Flavonoide zeigten ein empfindliches Verhalten gegenüber basischem pH-Wert. Durch die Injektion von Wasser vor der Probenaufgabe wird so ein Verschleppen von geringen Mengen an Puffer in das Probengefäß vermieden. Die Injektion von bidestilliertem Wasser nach der Probenaufgabe hat den Vorteil, dass die Probe in die Kapillare eingebracht wird und nicht direkt am Kapillarenende verweilt. Damit kommt es zu einer Aufkonzentrierung der Probe.

9.1.6. Reproduzierbarkeit der Methode

Die Linearität der Methode liegt in einem Konzentrationsbereich von 20-200 $\mu\text{g/ml}$ ($r^2 > 0,999$). Hierbei ist zu erwähnen, dass sich das Konzentrationsmaximum von 200 $\mu\text{g/ml}$ noch aus folgendem weiteren Grund ergibt. Für die Entwicklung einer chiralen CE-Methode darf eine Peakhöhe von 5 mAU je Enantiomer nicht überschritten werden, um die entsprechende Trenneffizienz zwischen zwei Peaks zu gewährleisten. Die Reproduzierbarkeit der Migrationszeit wurde für (+)-Catechin (RSD = 0,8 intra-day (n=3), RSD = 0.97% inter-day (n=9)) und für (-)-Epicatechin (RSD = 0.77 intra-day (n=3), RSD = 0.99% inter-day (n=9)) gemessen. Die Nachweisgrenze, bestimmt über das Signal/Rausch-Verhältnis von 3, betrug 5 $\mu\text{g/ml}$ für die genannten Analyten. Die Bestimmungsgrenze, ermittelt über ein Signal/Rausch-Verhältnis von 6, betrug 10 $\mu\text{g/ml}$ für die genannten Analyten.

9.2. Weitere Analysenmethoden

9.2.1. Chirale HPLC

Autosampler:	Triathlon Autosampler (Bischoff Chromatography, Leonberg)
Pumpe:	System Gold 127 Solvent Module (Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA)
Degasser:	ERC-3523 (ERC GmbH, Riemerling, Deutschland)
FLD-Detektor:	RF-535 (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Säule:	Cyclobond I-2000 RSP 250 x 4.6 mm (astec, Whippany, NJ, USA)
Steuerung/Daten:	PC mit Software Peak Simple, Version 3.54 SRI Inc.
Temperatur:	20 °C
Injektion:	5 μ l
Detektionswellenlänge:	$\lambda_{ex} = 280\text{nm}$; $\lambda_{em} = 310\text{nm}$
Mobile Phase A:	50mM NaH ₂ PO ₄ at pH 3,0
Mobile Phase B:	80 % Acetonitril in 30 mM Natriumdihydrogenphosphat; pH 3,0
Flussrate:	1ml/min

Zeit (min)	Anteil Mobile Phase B (%)	Verlauf
0,0	5	Start, 5 min
1,0	30	linearer Gradient in 35 min
30	30	halten für 6 min
41	45	linearer Gradient 30-45 % B in 5 min
46	5	linearer Gradient auf 5 % B in 2 min
48	5	reequilibrieren für 2 min
50	5	

Tabelle 9.1: Gradientenprogramm chirale HPLC für Flavan-3-ole

9.2.2. Nicht-chirale HPLC Flavan-3-ole

Gerät:	Summit HPLC Dionex (Idstein, Deutschland)
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:	PC mit Software "Chromeleon", letzte Version 6.80 SP1 Build 2238
Mobile Phase A:	1 % vol Essigsäure in Wasser
Mobile Phase B:	1 % vol Essigsäure in Acetonitril
Fluss:	300 μ l/min
Trennsäule:	Aqua 3 μ C18, 150*2 mm (Phenomenex)
Temperatur:	35 °C
Injektion:	5 μ l
UV-Diodenarray:	260, 280, 310, 360 nm

Zeit (min)	Anteil Mobile Phase B (%)	Verlauf
0	0	Start, linearer Gradient
80	40	0-40 % B in 80 min
100	100	linearer Gradient 40-100 % B in 20 min
110	100	Waschschritt 100 % B
111	0	reequilibrieren für eine Minute
120	0	

Tabelle 9.2: Gradientenprogramm Flavan-3-ole

9. Methoden

Nicht-chirale HPLC Prenylflavonoide

Mobile Phase A:	0,2 % TFA in Wasser
Mobile Phase B:	0,2 % TFA in Acetonitril
Fluss:	200 μ l/min
Trennsäule:	Aqua 3 μ m C18, 150*2 mm (Phenomenex)
Temperatur:	20 °C
Injektion:	5 μ l
UV-Diodenarray:	520, 260, 280, 360 nm

Zeit (min)	Anteil Mobile (%) Phase B	Verlauf
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 min
26,0	78	78% B isokratisch für 4,0 min Waschschrift mit 100% B
30,0	78	linearer Gradient 78-100 % B in 4,0 min
34,0	100	Waschschrift 100 %B
44,0	100	
45,0	40	reequilibrieren
55,0	40	

Tabelle 9.3: Gradientenprogramm Prenylflavonoide

9.2.3. Massenspektrometer

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 der Proanthocyanidine

Source Voltage:	-4.0 kV
Sheath Gas:	90
Auxillary Gas:	5
Capillary Voltage:	-10 V
Capillary Temperature:	310 °C
Tube Lens Offset:	+20 V
First Octapole Offset:	+4 V
Interoctapole Lens:	+30
Second Octapole Offset:	+10 V
Trap DC Offset:	+10 V
Isolation width:	2,8 m/z
Norm. Coll. Energy:	40
Fragmentation time:	30 msec
Q:	0,25

9.3. Probenaufarbeitung

9.3.1. Laborequipment

Bidestilliertes Wasser: ElgastatUHQII (Elga Ltd., Buds, Großbritannien)
Membranfilter: regenerierte Cellulose, Porenweite 0.45 μm (IVA, Meerbusch)
Zentrifuge: Biofuge Stratos (Heraeus Holding GmbH, Dassel, Deutschland)

9.3.2. ASPEC-Apfelsaft

Modifizierte Methode nach [80, 110].

SPE-Kartusche: Chromabond PA Kartusche (Machery-Nagel, Düren)
Material und Größe: Polyamid 3 ml, 500 mg
ASPEC: ASPEC XLi system Fa. Gilson (Abimed, Langenfeld)

Konditionierung	2 ml DMSO - Ameisensäure (99+1, v+v)	10 min
Waschschritt	5 ml bidestilliertes Wasser	
Probenaufgabe	20 ml Apfelsaft	
Waschschritt 1	5 ml bidestilliertes Wasser	
Waschschritt 2	0,5 ml DMSO-Ameisensäure (99+1, v+v)	
Elutionsschritt	1,0 ml DMSO-Ameisensäure (99+1, v+v)	

Tabelle 9.4: ASPEC-Sequenz zur Probenaufarbeitung von Fruchtsäften

9.3.3. Guaraná

Die Guaranásamen wurden in einem Porzellanmörser verrieben. Guaranásamen und Guaranásamenextrakt in Pulverform wurden direkt eingesetzt. Nahrungsergänzungsmittel mit Guaraná konnten nach Zerkleinerung im Mörser ebenfalls direkt aufgearbeitet werden. 50 μ g Guaranásamen wurden mit 5 ml bidestilliertem Wasser versetzt und 5 Minuten gerührt. Der Extrakt wurde membranfiltriert und konnte direkt in die CE eingesetzt werden.

9.3.4. Isolierung der Flavan-3-ole aus Guaranáextrakt

Die Flavan-3-ole wurden mittels SPE an Polyamid isoliert [110].

Chromabond PA Kartusche: Machery-Nagel (Düren, Deutschland)
 Größe: 3 ml, 500 mg Polyamid
 ASPEC XLi system: Gilson (Abimed (Langenfeld, Deutschland))

Konditionierung	2 ml DMSO - Ameisensäure (99+1,v+v) 10 min
Waschschritt	5 ml bidestilliertes Wasser
Probenaufgabe	20 ml wässriger Guaranáextrakt
Waschschritt 1	10 ml bidestilliertes Wasser
Waschschritt 2	5 ml Methanol/Wasser (50+50, v+v)
Fraktionierte Elution	5 x 1,0 ml Methanol

Tabelle 9.5: ASPEC-Sequenz zur Isolierung der Flavan-3-ole aus Guaranáextrakt

9.3.5. Probenaufarbeitung von Kakao und Kakaoerzeugnissen

Die Kakaobohnen wurden im Mörser verrieben bzw. die Kakaoerzeugnisse fein geraspelt. Die Kakaopulver bzw. Schokoladensossen wurden direkt verwendet. Von den Proben wurden jeweils 500 mg eingewogen und mit 30 ml MeOH/Wasser (80/20; v+v) übergossen. Bei Raumtemperatur wurde die Mischung zwei Stunden mittels Magnetrührer gemischt. Das eingesetzte Methanol wurde solange der Raumtemperatur und Atmosphärendruck ausgesetzt bis dieser verdunstet war. Der Rückstand wurde mit 30 ml bidestilliertem Wasser verdünnt und bei 10 000 U/min für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen Faltenfilter filtriert und das Filtrat für die SPE eingesetzt. Dafür wurde eine bereits entwickelte Methode eingesetzt [79]. Die Extraktion wurde an einer 6 ml Chromabond PA (1000 mg) Kartusche (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) durchgeführt. Vor dem eigentlichen Elutionsschritt wurde die Kartusche mit 1,5 ml DMSO - Ameisensäure (99+1,v+v) gewaschen. Die Analyten eluieren erst zwischen 1,5 ml und 3,5 ml DMSO-Ameisensäure (99+1,v+v). In Tab. 9.6 ist der Ablauf der SPE dargestellt.

Konditionierung 1	2 ml DMSO-Ameisensäure (99+1,v+v); 10 min
Konditionierung 2	10 ml bidestilliertes Wasser
Probenaufgabe	30 ml Filtrat
Waschschritt 1	20 ml bidestilliertes Wasser
Waschschritt 2	1,5 ml DMSO - Ameisensäure (99+1,v+v)
Elutionsschritt	2 ml DMSO - Ameisensäure (99+1,v+v)

Tabelle 9.6: Schema der SPE zur Extraktion der Flavan-3-ole aus Kakao und Kakaoerzeugnissen

9.3.6. Isolierung der Flavan-3-ole aus Kakaoextrakt

Hierfür kam eine bereits entwickelte Methode zum Einsatz [58, 110]. Für die SPE diente eine 3 ml Chromabond PA (500 mg) Kartusche (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Vor der eigentlichen Elution der monomeren Flavan-3-ole wurde die Kartusche mit 2 ml Methanol gewaschen. Innerhalb dieses Waschschrilles eluiert keiner der Analyten. Diese eluieren erst ab dem dritten Milliliter Methanol (3-5 ml).

Konditionierung 1	2 ml DMSO - Ameisensäure (99+1,v+v) 10 min
Konditionierung 2	5 ml bidestilliertes Wasser
Probenaufgabe	500 μ l Kakaoextrakt in 9,5 ml bidest. Wasser
Waschschritt 1	10 ml bidestilliertes Wasser
Waschschritt 2	2 ml Methanol
Elutionsschritt	3 ml Methanol

Tabelle 9.7: SPE-Schema zur Isolierung der Flavan-3-ole aus Kakaoextrakt

Das Lösungsmittel des Eluats wurde durch Anlegen eines Vakuums verdampft. Der Rückstand wurde in 500 μ l DMSO - Ameisensäure (99+1,v+v) aufgenommen und mittels HPLC-UV-Ionenfallen-MS zur Identifizierung der monomeren Flavan-3-ole und zur Reinheitsüberprüfung des Extrakts analysiert. Dieser Extrakt wurde auch für die CE eingesetzt.

9.3.7. Identifizierung der Flavan-3-ole mittels LC-MS

Abb. 9.1 a) zeigt die MS-Spektren eines Extrakts aus rohen Kakaobohnen. Die Signale der Flavan-3-ole korrespondieren hierbei mit Signalen von Procyanidinen. Abb. 9.1 b) stellt die MS-Spektren des aufgereinigten Extrakts dar, aus dem Catechin und Epicatechin isoliert wurden. Hier konnten ausschließlich die gewünschten Flavan-3-ole identifiziert werden.

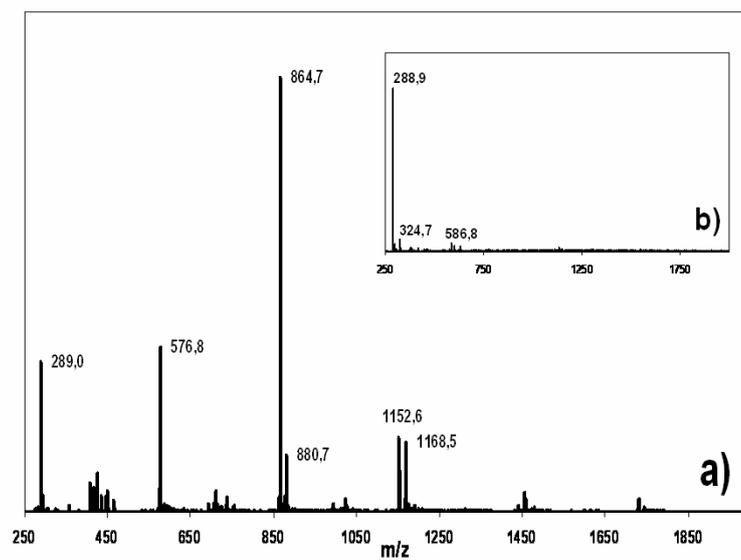


Abbildung 9.1: MS Spektren (innerhalb des Retentionszeitfenster: 20-35 Min) eines a) Extrakts aus rohen Kakaobohnen und b) aus dem Extrakt isolierte und aufgereinigte Flavan-3-ole

9.3.8. Isolierung der Prenylflavonoide

Zur Extraktion und Isolierung der untersuchten Prenylflavonoide wurde auf eine im eigenen Arbeitskreis entwickelte und optimierte Methode zurückgegriffen [78]. 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[®] eingeeengt 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 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 und eingeeengt und die Zielsubstanz anschließend durch semipräparative HPLC-Isolierung gereinigt.

9.3.9. CD-Spektren der Flavan-3-ole

Die folgenden Abbildungen 9.2–9.4 zeigen die CD-Spektren der zum damaligen Zeitpunkt (Juni 2005) erwerblichen Flavan-3-ol-Enantiomeren-Standards, gemessen mit einem Jasco J600 Spektropolarimeter (Hachioji, Japan).

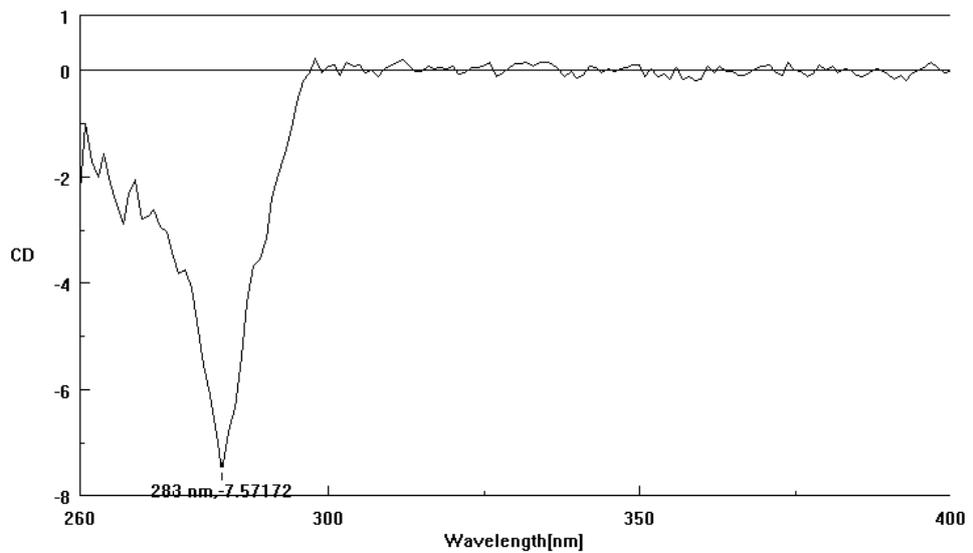


Abbildung 9.2: CD-Spektrum von (-)-Epicatechin

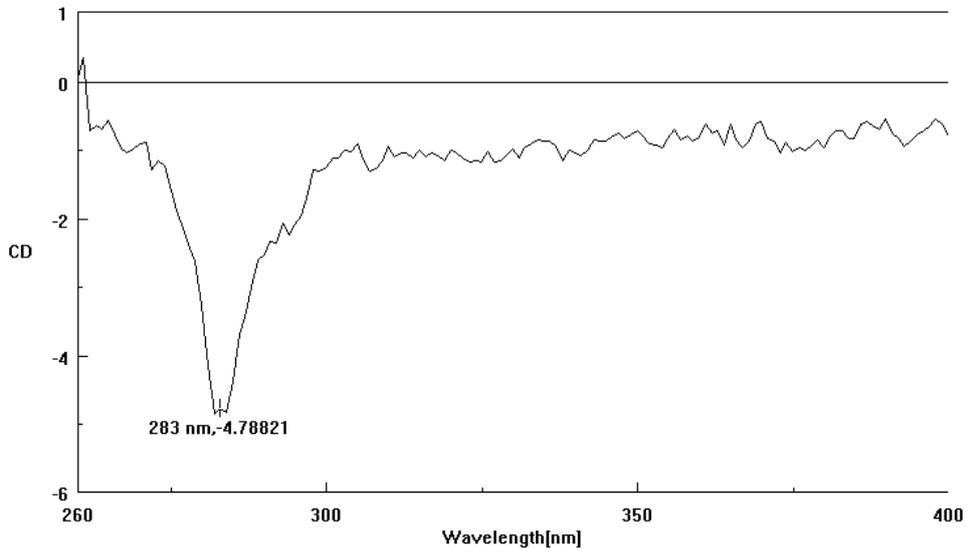


Abbildung 9.3: CD-Spektrum von (+)-Catechin

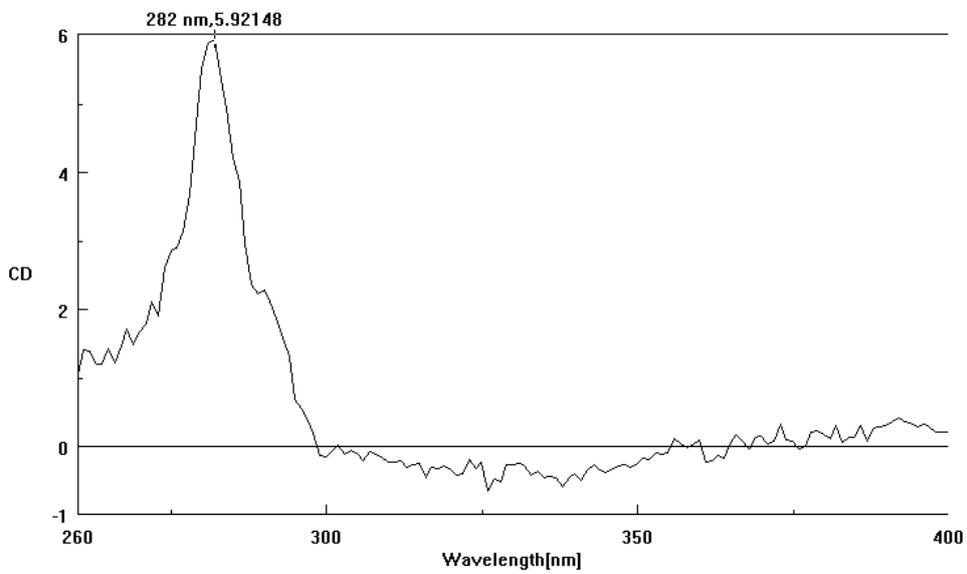


Abbildung 9.4: CD-Spektrum von (-)-Catechin

9.4. Formeln und Kenngrößen

9.4.1. Kenngrößen in der CE

Folgende Kenngrößen wurden berechnet, um Aussagen über die Trennqualität der angewendeten Methoden zu machen:

Peak-Resolution R_S : Der R_S -Wert beschreibt, wie gut zwei Peaksignale voneinander getrennt wurden.

$$R_S = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_1 + W_2}$$

Dabei bezeichnen t_1 und t_2 die Migrations- bzw. die Retentionszeiten der beiden Peaksignale. W_1 und W_2 sind die Peakbreiten an der Basislinie.

Trennfaktor α : Eine weitere Kenngröße, die eine Trennung zweier Substanzsignale charakterisiert, ist der apparente Trennfaktor α_{app} . Dabei bezeichnen t_1 und t_2 die Migrations- bzw. die Retentionszeiten der beiden Peaksignale und α_{app1} und α_{app2} die Trennfaktoren der einzelnen Peaksignale.

$$\alpha_{app} = \frac{\alpha_{app1}}{\alpha_{app2}} = \frac{t_2}{t_1}$$

Korrigierte Fläche A_{corr} : Im Gegensatz zur HPLC bewegen sich die Analyten mit unterschiedlicher Geschwindigkeit am Detektionsfenster vorbei. Um diesen Effekt zu korrigieren, wird anstatt der Signalfläche die korrigierte Fläche A_{corr} berechnet. Dabei wird die Peakfläche A durch die Migrationszeit t dividiert.

$$A_{corr} = \frac{A}{t_A}$$

e.e.-Wert (enantiomeric excess): Ein Enantiomer ist im Überschuß zum anderen vorhanden. Geht der e.e.-Wert gegen Null, ist er also sehr klein, nähern sich beide Enantiomeren im gleichen Verhältnis an. Ist der e.e.-Wert = 0 handelt es sich um ein Racemat. E_1 und E_2 stellen dabei die einzelnen Peakflächenverhältnisse der Enantiomeren dar.

$$e.e. [\%] = \frac{(E_1 - E_2)}{(E_1 + E_2)} \times 100\%$$

Analog dazu wurde für Epimere der ep.e.-Wert (epimeric excess) und für Diastereomere der d.e.-Wert (diastereomeric excess) berechnet. Der ep.e.-Wert ist ein Maß für die Reinheit von Epimeren, wohingegen der d.e.-Wert ein Maß für die Reinheit von Diastereomeren darstellt [17, 102].

Teil V.

Ergebnisse und Diskussion

10. Methodenentwicklung zur enantioselektiven Trennung

10.1. Allgemeine Vorgehensweise

Wie bereits in Kap. 7.2.3 beschrieben, zeichnet sich die CE durch ihre schnelle, einfache und kostengünstige Art der Methodenentwicklung aus. Durch die Variation der einzelnen Trennparameter kann die Methode entsprechend optimiert werden, um eine erfolgreiche Trennung der Analyten zu erreichen. Für ein kapillarelektrophoretisches Trennsystem sind dies: Art, Konzentration und pH-Wert des Hintergrundelektrolyten, die gewählte Temperatur, die angelegte Spannung, die Art und Länge der Kapillare, das Injektionsvolumen der Probe und der Zusatz von Pufferadditiven wie z.B. organischen Lösungsmitteln.

Entscheidend für die Trennung chiraler Analyten ist jedoch die Wahl eines geeigneten chiralen Selektors. Dies ist die eigentliche Grundvoraussetzung, an der sich die übrigen Trennparameter orientieren. Nur wenn eine ausreichend starke Wechselwirkung zwischen Analyt und chiralem Selektor erkennbar ist, lohnt sich eine weitere Optimierung der Parameter [27].

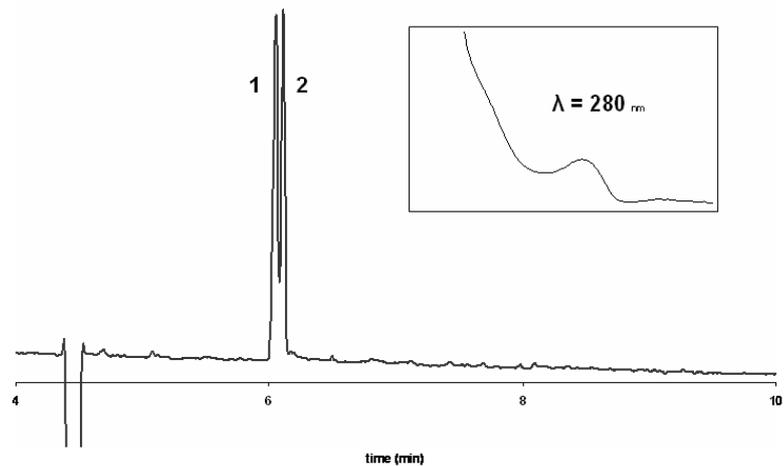


Abbildung 10.1: Kapillarelektrophoretische Messung von Catechin und Epicatechin ohne chiralen Selektor und UV-Spektrum der monomeren Flavan-3-ole (190-400 nm, $\lambda_{max} = 280 \text{ nm}$); 1: Epicatechin, 2: Catechin

10.2. Wahl des geeigneten Cyclodextrins

Wie Abb. 10.1 zeigt, besitzen Catechin und Epicatechin ähnliche Migrationszeiten. Bei früheren Untersuchungen im eigenen Arbeitskreis zeigte sich, dass Cyclodextrine sehr gut für die chirale Trennung von Flavonoiden geeignet sind. Hierfür wurde zur chiralen Trennung von Catechin und Epicatechin ein Screening-Test durchgeführt. Wie andere Optimierungsversuche bereits gezeigt haben, eignet sich hierfür eine Cyclodextrinkonzentration von 5-15 mM. Hierbei gelang für einige der verwendeten Cyclodextrine eine Antrennung der Catechin und Epicatechin-Enantiomeren [35].

Auf Grundlage dieses Screeningversuchs wurden mit den einzelnen CDs weitere Trennversuche durchgeführt. Die Cyclodextrine mit erfolgreichen Trennansätzen waren: HP- γ -CD, CM- β -CD und SBE- β -CD. Außerdem kamen auch die bis dahin noch nicht angewendeten M- β -CD und G- β -CD zum Einsatz. HP- γ -CD lieferte dabei die besten Ergebnisse, so dass hierdurch die Trennmethode optimiert wurde. Mit CM- β -CD, SBE- β -CD, M- β -CD und G- β -CD konnten ebenfalls gute Ergebnisse erzielt werden.

HP- γ -CD ist ein modifiziertes ungeladenes γ -CD, das aus acht Glucose-Untereinheiten besteht. Die Hydroxyl-Gruppen sind dabei mit Propylenoxid modifiziert, was zur

Bildung von Hydroxypropyl-Ether-Gruppen führt.

10.3. Wahl der geeigneten CD-Konzentration

Zur Ermittlung der optimalen CD-Konzentration für die chirale Trennung von Catechin und Epicatechin wurden Trennpufferlösungen hergestellt, in denen unterschiedliche Konzentrationen an HP- γ -CD gelöst wurden (0-15 mM). Angelehnt an die im eigenen Arbeitskreis durchgeführten Vorversuche wurden die Konzentrationen von 0,5 mM-Intervallen hergestellt [35]. Hierbei ließ sich schon eine erste Tendenz in bezug auf die optimale Konzentration an CD ableiten. In einem zweiten Schritt wurden die Konzentrationsintervalle enger gewählt. Wie Abb. 10.2 zeigt, wurde mit einer Konzentration von 12 mM HP- γ -CD die beste Trennung der Catechin- und Epicatechin-Enantiomeren erreicht ((+/-)-Catechin $R_s > 1,13$, (+/ -)-Epicatechin $R_s > 1,10$; $\alpha_{app} = 1,01$).

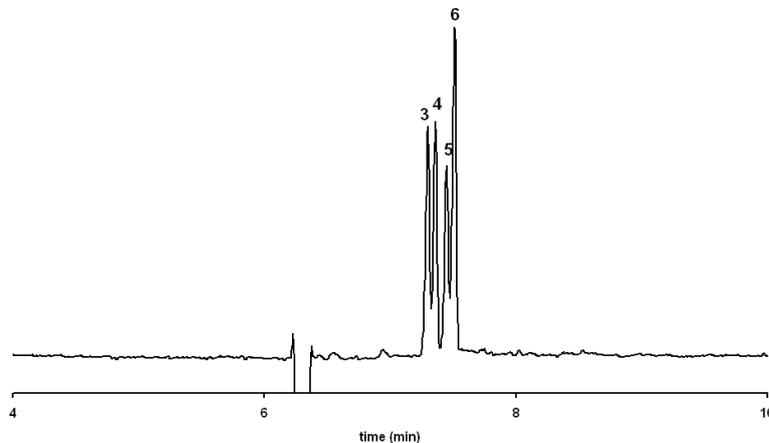


Abbildung 10.2: Enantiomertrennung von Catechin und Epicatechin mit $c(\text{CD}) = 12 \text{ mM}$ HP- γ -CD; 3: (-)-Catechin, 4: (+)-Catechin, 5: (+)-Epicatechin, 6: (-)-Epicatechin

10.4. Migrationsreihenfolge

Abb. 10.1 und 10.2 zeigen die Elektropherogramme von Catechin und Epicatechin ohne und mit chiralem Selektor. Betrachtet man die Migrationsreihenfolge so fällt auf, dass ohne chiralen Selektor Epicatechin vor Catechin migriert. Catechin und Epicatechin sind in dem vorliegenden Trennsystem durch die im Puffer vorkommenden Borat-Ionen komplexiert [72]. Diese Komplexe sind negativ geladen (s. Abb. 10.10). Sie migrieren in Richtung der positiv geladenen Anode, also entgegen dem EOF, der kathodisch gerichtet ist. Der EOF überlagert jedoch ihre Eigenmobilität und sie migrieren in Richtung der Kathode. Aus der Migrationsreihenfolge lässt sich ableiten, dass der Epicatechin-Borat-Komplex eine geringere Eigenmobilität gegenüber dem EOF aufweist, als der Catechin-Borat-Komplex. Epicatechin migriert deshalb schneller zur Kathode als Catechin.

Durch den Zusatz des chiralen Selektors konnte die enantioselektive Trennung von Catechin und Epicatechin erreicht werden. Dabei kommt es zur Änderung der Migrationsreihenfolge. Hierbei migriert (-)-Catechin vor (+)-Catechin, dann folgen (+)-Epicatechin und (-)-Epicatechin (s. Abb. 10.2). Diese Migrationsreihenfolge lässt sich folgendermaßen erklären: Das eingesetzte HP- γ -CD ist neutral geladen. Es wandert mit dem EOF in Richtung Kathode. Catechin und Epicatechin migrieren, wie eben schon beschrieben, entgegengesetzt in anodische Richtung. Komplextiert nun ein Analytmolekül mit dem CD, so migriert der ganze Komplex in kathodischer Richtung, da der EOF aufgrund seiner Stärke die Eigenmobilitäten der Analyten überlagert (s. Abb. 10.3).

Der enantiomere Analyt, der nun aufgrund seines sterischen Aufbaus am stärksten mit dem CD in Wechselwirkung tritt, migriert somit am schnellsten in Richtung Detektor. Bei den Flavan-3-ol-Enantiomeren ist dies das (-)-Catechin und dann sein Enantiomer, das (+)-Catechin. Erst darauf folgt (+)-Epicatechin. (-)-Epicatechin migriert dagegen am langsamsten von allen Flavan-3-ol-Enantiomeren. Es komplexiert am schwächsten mit dem chiralen Selektor (s. auch Abb. 7.6). Die beobachtete Migrationsreihenfolge wurde mittels Standardaddition und Migrationszeitvergleich abgesichert. Die absolute Konfiguration der Standardsubstanzen konnte durch Messungen mittels Circular dichroismus-Spektroskopie und Vergleich mit den dazugehörigen Referenzspektren abgesichert werden (s. Kap. 9.3.9) [60]. Der genaue Komplextierungsme-

chanismus der Flavan-3-ol-Enantiomeren mit HP- γ -CD ist bisher nicht geklärt.

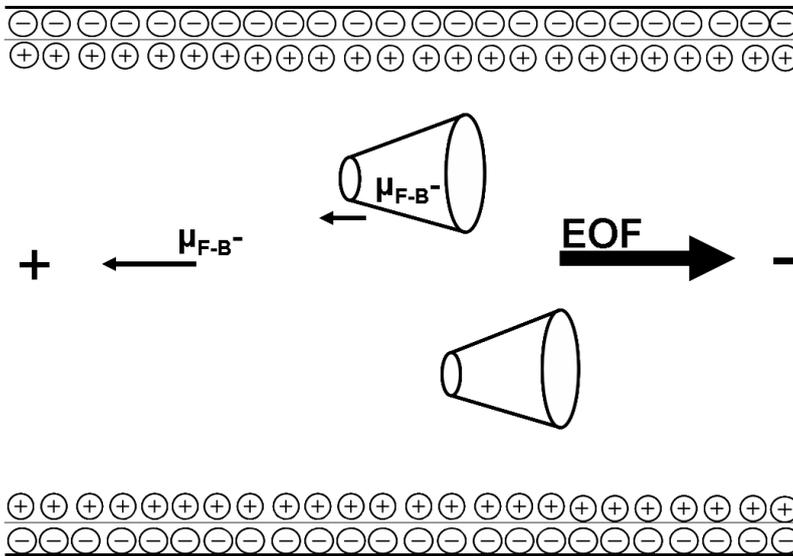


Abbildung 10.3: Schema der chiralen Trennung von Flavan-3-olen mit Cyclodextrinen als chirale Selektoren; μ_{F-B^-} : Mobilität Flavanol-Borat-Komplex, EOF: elektroosmotischer Fluss, Cyclodextrine dargestellt als Kegelstümpfe

10.5. Verwendung von alternativen Cyclodextrinen

10.5.1. Maltosyl- β -CD und Glucosyl- β -CD

Durch den Einsatz von anderen Cyclodextrinen konnte ebenfalls eine Trennung der Flavan-3-ol-Enantiomeren erreicht werden. Hierbei erwiesen sich M- β -CD und G- β -CD als weitere geeignete chirale Selektoren. Bei diesen Cyclodextrinen sind die OH-Gruppen teilweise mit Maltose bzw. Glucose derivatisiert. Es sind also verglichen mit HP- γ -CD viel größere Moleküle. Die Kavität dieser CDs ist erweitert und eine potentielle stärkere Wechselwirkung des Analyten durch die hinzukommenden OH-Gruppen möglich. Es wurden ebenfalls unterschiedliche Konzentrationen an CD dem Hintergrundelektrolyten zugesetzt, um eine optimale Trennung zu erreichen. Peakresolution und Trennfaktor von (+/-)-Catechin $R_s > 1,12$ und (+/-)-Epicatechin $R_s > 1,51$; $\alpha_{app} = 1,01$ bei beiden Enantiomerenpaaren. Die optimale Cyclodextrinkonzentration für die chirale Trennung von Catechin und Epicatechin konnte dabei mit 1,0 mM M- β -CD ermittelt werden (s. Abb. 10.4).

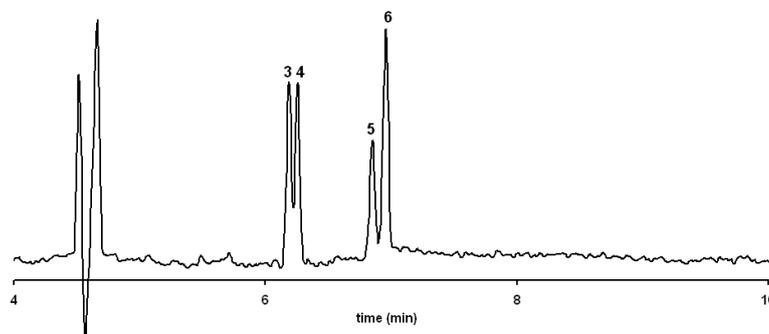


Abbildung 10.4: Chirale Trennung von Catechin und Epicatechin mit M- β -CD ($c(\text{CD})=1,0 \text{ mM}$);
3: (-)-Catechin, 4: (+)-Catechin, 5: (+)-Epicatechin, 6: (-)-Epicatechin

Hierbei konnte die gleiche Migrationsreihenfolge der einzelnen Flavan-3-ol-Enantio-

meren beobachtet werden, wie sie bei HP- γ -CD der Fall war. Dies wurde durch Migrationszeitvergleich und Standardaddition abgesichert. M- β -CD konnte damit als alternativer chiraler Selektor für die Trennung der Flavan-3-ol-Enantiomeren eingesetzt werden.

Wie in Abb. 10.4 gezeigt, wird bei der chiralen Trennung von Catechin und Epicatechin die Peakauflösung zwischen (+)-Catechin und (+)-Epicatechin vergrößert, was zu einer besseren Trennung zwischen Catechin und Epicatechin führt (Peakresolution und Trennfaktor $R_s > 9,07$, $\alpha_{app} = 1,06$). Dies ist auf die räumliche Struktur des M- β -CD zurückzuführen, das die Epicatechin-Enantiomere schwächer komplexiert als die Catechin-Enantiomere. Die Ergebnisse zeigen, dass M- β -CD neben HP- γ -CD alternativ und ergänzend als chiraler Selektor zur enantioselektiven Trennung von Catechin und Epicatechin eingesetzt werden kann.

G- β -CD ist ein aus der Literatur bekannter chiraler Selektor, mit dem bereits mittels mikellar elektrokinetischer Chromatographie (MEKC) eine Trennung von Catechin und Epicatechin erzielt werden konnte. Wie in Abb. 10.5 gezeigt, ließ sich mit G- β -CD ebenfalls eine Trennung der Catechin-Enantiomeren erzielen. Die Epicatechin-Enantiomere konnten damit lediglich nur angetrennt werden ((+/-)-Catechin $R_s > 1,23$, $\alpha_{app} = 1,01$; (+/-)-Epicatechin $R_s > 0,7$).

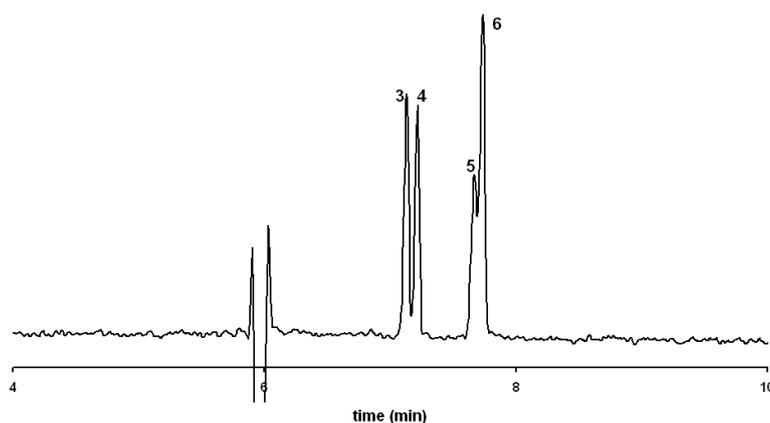


Abbildung 10.5: Chirale Trennung von Catechin und Epicatechin mit G- β -CD ($c(\text{CD}) = 1,0 \text{ mM}$);
3: (-)-Catechin, 4: (+)-Catechin, 5: (+)-Epicatechin, 6: (-)-Epicatechin

10.5.2. SBE- β -CD

Mit SBE- β -CD konnte ein erfolgreicher Trennansatz für die chirale Trennung der Flavan-3-ol-Enantiomere erreicht werden. Hiermit wurden auch Substanzen aus der Gruppe der Prenylflavonoide erfolgreich enantioselektiv getrennt (s. Kap. 15). Dabei konnten schon mit sehr niedrigen Einsatzkonzentrationen effiziente Trennungen erzielt werden [37, 56]. Nach entsprechenden Vorversuchen zur Optimierung der Cyclodextrinkonzentration wurde in einem Konzentrationsbereich von 0-2,5 mM experimentiert. Es zeigte sich jedoch eine von den bisherigen erhaltenen Ergebnissen vollkommen andere Trennung. In dem gewählten Konzentrationsbereich konnte zwar eine sehr gute Trennung von Catechin und Epicatechin erzielt werden ($R_s = 7,06 - 8,90$) (s. Abb. 10.6), die gleichzeitige Auftrennung in die einzelnen Enantiomeren wurde jedoch nicht erreicht. In einem Konzentrationsbereich bis 0,75 mM SBE- β -CD konnte Catechin, jedoch nicht Epicatechin enantiomer getrennt werden (R_s (Catechin) = < 1,01). Ab einer Konzentration von 0,75 mM - 2,25 mM SBE- β -CD kam es zu einer Verschlechterung bzw. zu keiner Enantiomerentrennung des Catechins. Demgegenüber ließ sich in diesem Konzentrationsbereich für die Enantiomeren des Epicatechins eine Trennung erreichen (R_s (Epicatechin) < 1,06).

Außerdem zeigte sich eine Änderung im Migrationsverhalten der Analyten. Wie in den Abbildungen 10.6 und 10.7 dargestellt, ist eine Änderung der Migrationsreihenfolge zu erkennen. Epicatechin migriert schneller als Catechin (vgl. Kap. 10.4). (+)-Epicatechin migriert vor (-)-Epicatechin, während (+)-Catechin vor (-)-Catechin migriert. Dies lässt sich durch den Einsatz des verwendeten Cyclodextrins erklären. SBE- β -CD ist im Gegensatz zu den oben genannten Cyclodextrinen (HP- γ -CD und M- β -CD) negativ geladen. Es wandert im gewählten Trennsystem gegen den EOF. Die Flavan-3-ol-Enantiomere liegen ebenfalls als negativ geladene Borat-Komplexe vor. Die Bewegung der Analyten werden vom EOF überlagert und sie migrieren dadurch in Richtung Detektor. Der Trennmechanismus lässt sich über die Ladungen der gebildeten Komplexe erklären. Die Flavan-3-ol-Enantiomere sind durch die Komplexbildung mit dem Borat einfach negativ geladen. Das SBE- β -CD hingegen ist aufgrund der Sulfobutylether-Gruppen mehrfach negativ geladen. Komplextiert das Cyclodextrin nun mit dem Analyten weist dieser eine stärkere negative Ladung auf als der einfach negativ geladene Flavan-3-ol-Borat-Komplex. Der Analyt-CD-Komplex migriert al-

so stärker in Richtung der Anode. Das Molekül, das am schwächsten mit dem Cyclodextrin komplexiert, migriert folglich am schnellsten zur Kathode und damit zum Detektor. Im vorliegenden Fall ist dies (+)-Epicatechin (s. Abb. 10.7). (-)-Catechin dagegen bildet den stärksten Komplex mit dem Cyclodextrin aus, da es am langsamsten zur kathodischen Seite migriert. Die Verbesserung bzw. die Verschlechterung der chiralen Trennung von Catechin und Epicatechin aufgrund der verschiedenen Cyclodextrinkonzentrationen lässt sich über die Bindungskonstanten beschreiben (s. Kap. 7.3.4). Bei der in Abb. 10.6 dargestellten Trennung kommt es aufgrund der gewählten Cyclodextrinkonzentration zur enantioselektiven Trennung von Catechin, nicht aber von Epicatechin. Es liegt eine Differenz in den Bindungskonstanten der Catechin-Enantiomeren vor. Zur chiralen Trennung von Epicatechin reicht hingegen die Konzentration an chiraalem Selektor nicht aus, um eine Differenz in den Bindungskonstanten der Epicatechin-Enantiomeren zu erreichen, so dass eine ausreichende chirale Erkennung nicht stattfinden kann.

10. Methodenentwicklung zur enantioselektiven Trennung

Mit steigender Cyclodextrinkonzentration (s. Abb. 10.7) lassen sich jedoch die Catechin-Enantiomeren nicht mehr trennen. Die optimale Konzentration an chiralem Selektor ist überschritten. Es liegt kein Unterschied in den Bindungskonstanten vor. Im Gegensatz dazu ist eine Cyclodextrinkonzentration im Puffer erreicht, die zu einem entsprechend großen Unterschied in den Bindungskonstanten führt und eine ausreichende Trennung der Epicatechin-Enantiomeren ermöglicht.

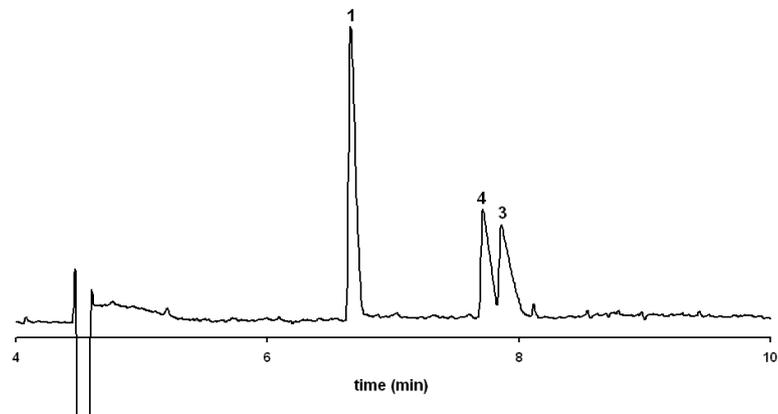


Abbildung 10.6: Chirale Trennung von Catechin und Epicatechin mittels SBE- β -CD ($c(\text{CD})=0,5 \text{ mM}$); 1: Epicatechin (ungetrennt), 3: (-)-Catechin, 4: (+)-Catechin

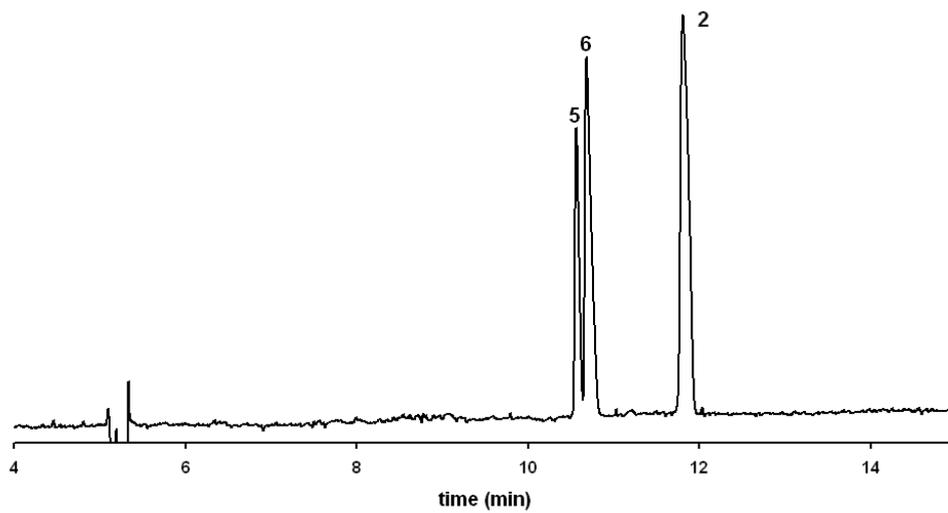


Abbildung 10.7: Chirale Trennung von Catechin und Epicatechin mittels SBE- β -CD
(c(CD)= 2,25 mM); 2: Catechin (ungetrennt), 5: (+)-Epicatechin,
6: (-)-Epicatechin

10.5.3. Kombination von Cyclodextrinen

Eine weitere Möglichkeit der Lösung chiraler Trennprobleme in der CE ist die Kombination von mehreren CDs in einem Trennpuffer. Hierbei geht man bei der Wahl der Cyclodextrine nach zwei Kriterien vor. Zum einen müssen die zu kombinierenden CDs auch einzeln zu einem erkennbaren Trennergebnis führen. Zum anderen ist es von großem Vorteil, wenn sich die CDs in ihrer Migration gegenläufig verhalten. Hierbei werden neutrale und geladene CDs eingesetzt. Das ungeladene CD wandert mit dem EOF in Richtung Kathode, während das andere aufgrund seiner positiven Ladung entgegen dem EOF in Richtung Anode migriert.

Komplexiert ein enantiomerer Analyt mit diesen beiden CDs, so kann aus dem entgegengesetzten Migrationsverhalten der beiden CDs eine verbesserte Trennung erreicht werden. Hat man also in einem Analysenlauf durch den singulären Einsatz der CDs eine Antrennung erreicht, kann man die CDs in definierter Konzentration gemeinsam dem Hintergrundelektrolyten zusetzen. Eine theoretische Abschätzung des Trennmechanismus lässt sich kaum vorhersagen, da sich der Analyt zwischen den beiden CDs und dem Hintergrundelektrolyten verteilt. Man spricht auch von drei pseudo-stationären Phasen [18]. So kann es bei der Kombination von zwei CDs auch zu keinerlei Trennung der Enantiomere kommen, da sich zu geringe elektrophoretische Mobilitätsdifferenzen ergeben. Genau dieser Fall wurde bei der Kombination von SBE- β -CD und HP- γ -CD beobachtet.

Bei der Kombination von SBE- β -CD und HP- γ -CD zeigte sich, dass diese Kombination zu keinerlei Verbesserung der Trennungseffizienz führte. So konnte nur Epicatechin ($R_s > 1,5$) chiral getrennt werden, nicht aber Catechin. Auch ein Zusatz von Methanol in verschiedenen Konzentrationen führte zu keinerlei Verbesserung. Desweiteren wurde eine Kombination von HP- γ -CD und CM- β -CD getestet, da sich CM- β -CD bei Vorversuchen auch als potentieller Selektor zur Trennung der Flavan-3-ole erwiesen hatte. Außerdem ist es negativ geladen. Catechin und Epicatechin wurden sehr gut getrennt, aber eine Trennung der Enantiomeren fand nicht statt (s. Abb. 10.8). Die Kombination dieser beiden Cyclodextrine, die einzeln eine chirale Trennung bewirken, führen in Kombination zu einer Aufhebung der chiralen Erkennung der Analytmoleküle. Aus dem vorgestellten Beispiel lässt sich ableiten, dass die Differenzen in den Bindungskonstanten der einzelnen Enantiomere zu klein sind und es damit zu keiner

chiralen Trennung kommt.

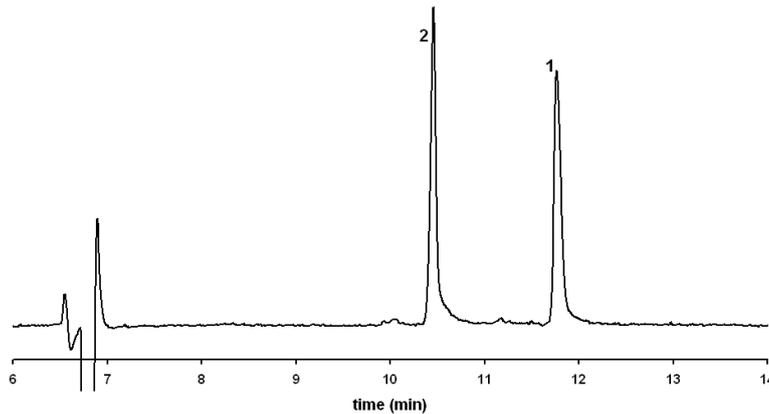


Abbildung 10.8: Versuch der chiralen Trennung von Catechin und Epicatechin durch die Kombination von HP- γ -CD und CM- β -CD; 1: Epicatechin, 2: Catechin

10.6. Optimierung weiterer Parameter

10.6.1. Wahl der Kapillare

Alle durchgeführten Trennungen mittels CE wurden mit fused-silica Kapillaren durchgeführt. Enantiomertrennungen können in der CE auch mit sogenannten belegten Kapillaren durchgeführt werden. Dabei können die Silanolgruppen der Kapillare mit verschiedenen Gruppen belegt sein. Dies hat zur Folge, dass es zu keinerlei Ausbildung des EOF kommt und die Trennungen sich nur über die Eigenmobilitäten der Analyten vollziehen. In der Literatur wird aber darauf hingewiesen, dass der EOF in erster Linie keinerlei direkten Einfluss auf die chirale Trennung von Enantiomeren hat, da eine enantioselektive Trennung aufgrund der schon erläuterten Mobilitätsdifferenzen zwischen Analyt und chiraalem Selektor stattfindet. Dennoch trägt der EOF indirekt zu einem positiven Ergebnis der Trennung bei [18].

Ein weiterer Punkt ist die Wahl der Kapillarlänge. Mit Erhöhung der Länge der Kapillare kann es zu einer Verbesserung der Trennung kommen. Dabei kommt es aber auch zu einer Verlängerung der Analysenzeit, da die Analyten länger migrieren. Für die Trennung der Flavan-3-ole konnte mit einer 50/40 cm Kapillare eine sehr gute Trennung in weniger als acht Minuten erzielt werden. Entscheidend für die Empfindlichkeit der Methode ist hierbei der Kapillardurchmesser. Die Nachweisgrenze der CE hängt vom Innendurchmesser der Kapillare ab. Herkömmliche Kapillaren besitzen einen Innendurchmesser von 50-100 μm . Die Trennleistung der Methode nimmt mit sinkendem Kapillardurchmesser aufgrund der Effizienzerhöhung zwar zu, die Empfindlichkeit hingegen aufgrund des geringeren Lichtweges nimmt ab. Deswegen wurden Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 75 μm gewählt.

10.6.2. Wahl des Injektionsvolumens

Die Probenaufgabe erfolgte bei allen durchgeführten Messungen mittels der hydrodynamischen Injektionstechnik. Dabei wird die Probe durch das Anlegen eines Vakuums am Probengefäß in die Kapillare gesaugt. Dieses Injektionsvolumen läßt sich dabei zeitabhängig und druckabhängig steuern. Die Wahl des richtigen Probenvolumens ist in der CE nicht unerheblich, da einerseits bei der Injektion eines zu kleinen Probenvolumens aufgrund der eingeschränkten Nachweisgrenze der CE der Analyt nicht detektiert wird. Andererseits kommt es bei einem zu großen Probenvolumen zur Überladung der Kapillare, was zu unförmigen Peaks und Adsorption des Analyten an der Kapillarwand führt. Die verwendeten Flavan-3-ol-Standardlösungen hatten eine Konzentration von 200 mg/l. Dabei erwies sich eine Injektion von 3s bei einem angelegten Druck von 0,3 p.s.i. (20,7 mbar) als optimal. Unter diesen Bedingungen wird ein Probenvolumen von 10,2 nl injiziert, was bei der verwendeten Einsatzkonzentration einer Analytmenge von 0,9 pmol entspricht¹.

¹Diese Werte wurden mit dem Programm CE-EXPERT von Beckman-Coulter (Fullerton, CA, USA) berechnet

10.6.3. Wahl des pH-Wertes

Die Wahl des pH-Wertes beeinflusst in hohem Maße die kapillarelektrophoretische Trennung. Die Wahl eines geeigneten Puffers richtet sich dabei nach dem jeweiligen gewünschten pH-Wert. Außerdem wird durch den pH-Wert sowohl die Geschwindigkeit des EOF als auch die Eigenmobilität des Analyten bestimmt. Mit steigendem pH-Wert kommt es aufgrund der Dissoziation der Silanol-Gruppen an der Innenseite der Kapillarwand zu einer Erhöhung der Geschwindigkeit des EOF. Dies führt zu einer schnellen Migration des Analyten und zu einer kurzen Analysenzeit. Für die Analytik der zu untersuchenden Flavan-3-ole wurde ein basischer pH-Bereich gewählt, um kurze Analysenzeiten zu erreichen [37]. Zur Optimierung wurde für die chirale Trennung von Catechin und Epicatechin in einem pH-Bereich von 7-10 (Pufferbereich von Borat) gearbeitet. Abb. 10.9, zeigt wie stark der pH-Wert die Trennung der Analyten in einem kapillarelektrophoretischen Trennsystem beeinflusst.

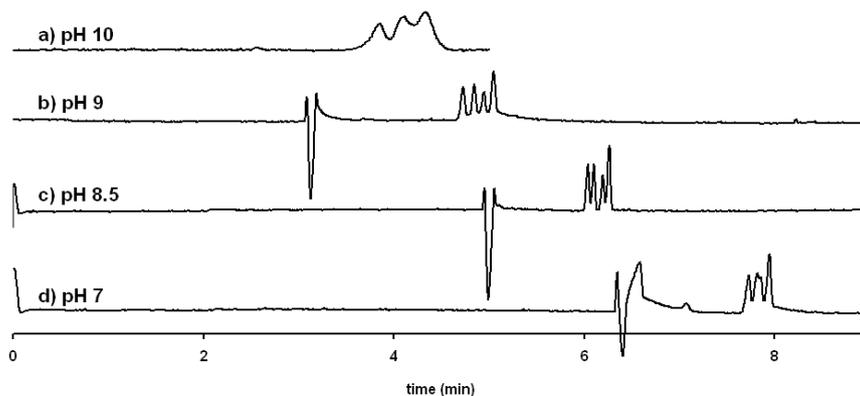


Abbildung 10.9: Optimierung der chiralen Trennung von Catechin und Epicatechin mittels CE unter Veränderung des pH-Wertes a) – d)

Hieran lässt sich sehr gut erkennen, wie die unterschiedlichen Trennkräfte (EOF und chiraler Selektor) vom pH-Wert beeinflusst werden. Bei einem pH-Wert von 7,0 kann es

zu keiner vernünftigen Trennung der Flavan-3-ol-Enantiomeren kommen. Der Unterschied in den Komplexbildungskonstanten der einzelnen Enantiomere ist noch nicht groß genug, um eine ausreichend hohe Differenz in den elektrophoretischen Mobilitäten zu erreichen. Der EOF ist zusätzlich noch nicht schnell genug, um die Enantiomeren stärker voneinander zu trennen. Mit steigendem pH-Wert steigt die Geschwindigkeit des EOF. Es wird ein Optimum bei pH 8,5 erreicht, bei dem eine schnelle Trennung mit sehr scharfen Peaks gelingt. Bei pH 10 ist jedoch eine ausreichende Trennung der Analyten aufgrund ihrer Mobilitätsunterschiede nicht mehr möglich. Der EOF überlagert durch seine hohe Geschwindigkeit jetzt die Mobilitäten der zu trennenden Analyten. Eine Wechselwirkung zwischen dem chiralen Selektor und den Analyten kann erst gar nicht stattfinden. Die Zunahme der Geschwindigkeit des EOF führt schon ab pH 9 zusätzlich auch zu einer starken Bandenverbreiterung. Für die chirale Trennung der Catechin und Epicatechin-Enantiomere wurden bei einem pH-Wert von 8,5 R_s -Werte für (+/-)-Catechin von $> 1,27$ und für (+/-)-Epicatechin von $> 1,40$ ermittelt. Der Trennfaktor lag für beide Analyten bei $\alpha_{app} = 1,01$.

10.6.4. Wahl des Puffers

Die Art des richtigen Trennpuffers richtet sich nach dem zu wählenden pH-Wert. Der gewählte Puffer muss also innerhalb des gewählten pH-Bereiches eine Pufferkapazität aufweisen. Für die Methodenentwicklung und Optimierung der chiralen Analytik der Flavan-3-ole wurde ein basischer pH-Bereich ausgewählt. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass sich dafür ein Borat-Puffer sehr gut eignet. Auch für den oben beschriebenen Versuch zur Wahl des richtigen chiralen Selektors, wurde ein Borat-Puffer mit definierter Konzentration eingesetzt. Borat hat eine Pufferwirkung im Bereich zwischen pH 7-10. Zudem hat es die Fähigkeit, mit vicinal-ständigen OH-Gruppen Komplexe zu bilden. Flavan-3-ole wie Catechin und Epicatechin, besitzen am B-Ring vicinal-ständige OH-Gruppen und können mit Borat-Ionen komplexieren (s. Abb. 10.10). Dadurch bilden sich negativ geladene Komplexe. Da in dem vorliegenden CE-Trennsystem im kathodischen Modus gemessen wurde, der EOF also in Richtung zur Kathode gerichtet ist, migrieren die negativ geladenen Borat-Flavan-3-ol-Komplexe entgegen dem EOF in Richtung zur Anode. Dies hat einen positiven Einfluss auf die Selektivität der Trennung, da der Analyt entgegen dem EOF, der chirale Selektor jedoch

mit dem EOF migiert [27, 72].

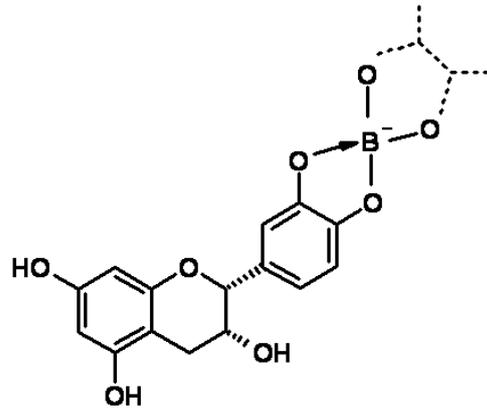


Abbildung 10.10: (-)-Epicatechin-Borat-Komplex

10.6.5. Konzentration des Hintergrundelektrolyten

Genau wie der pH-Wert und die Art des Hintergrundelektrolyten, beeinflusst auch dessen Konzentration die kapillarelektrophoretische Trennung maßgeblich. Dies äußert sich vor allem in der Peakform. Um eine gleichmäßige Peakform zu erreichen, muss die Mobilität des Analyten gleich der Mobilität des Hintergrundelektrolyten sein, da es sonst zu fronting und tailing der Peaks kommt. Wie Abb. 10.11 zeigt, wurde die chirale Trennung von Catechin und Epicatechin mit unterschiedlichen Konzentrationen an Borat-Puffer untersucht. Hierbei zeigte sich, dass mit der Erhöhung der Konzentration an Borat-Puffer die Migrationszeit der Analyten aufgrund des langsamer werdenden EOF zunimmt. Gleichzeitig kommt es zu einer Peakverbreiterung, was auf die entstehende Joulesche Wärme zurückzuführen ist.

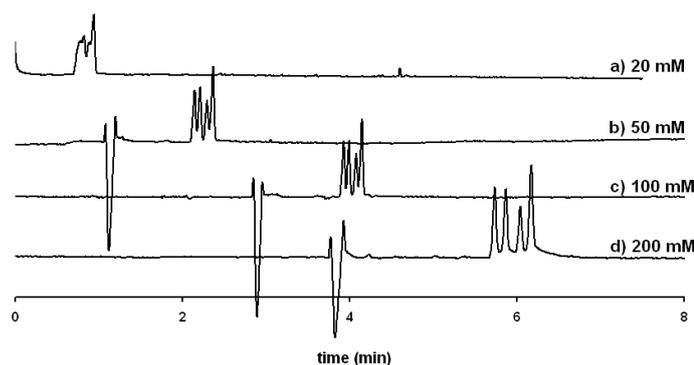


Abbildung 10.11: Optimierung der chiralen Trennung von Catechin und Epicatechin unter Veränderung der Konzentration des Hintergrundelektrolyten a)–d)

Die optimale Konzentration des Boratpuffers für die chirale Trennung der Catechin und Epicatechin-Enantiomeren lag bei 100 mM. Es wurden R_s -Werte für (+/-)-Catechin von $> 1,32$ und für (+/-)-Epicatechin von $> 1,35$ ermittelt. Der Trennfaktor lag bei beiden Enantiomerenpaaren bei $\alpha_{app} = 1.01$.

10.6.6. Einfluss der Temperatur

Aufgrund der angelegten Spannung und des hohen Widerstands kommt es innerhalb der Kapillare zu einer Temperaturentwicklung (Joulesche Wärme), die abgeführt werden muss. Dies geschieht, indem die Kapillare von einer Kühlflüssigkeit umspült wird, die die entstehende Wärme abführt. Diese Kühlung verhindert auch die Entgasung des Puffers. Die Wahl der Temperatur beeinflusst zudem die Viskosität des Puffers. Mit steigender Temperatur nimmt die Viskosität des Puffers ab. Daraus folgt eine schnellere Migrationszeit der Analyten in der Kapillare. Zusätzlich beeinflusst die Temperatur auch die Bindungskonstanten zwischen Analyt und chiralem Selektor. Mit steigender Temperatur nehmen aufgrund der höheren diffusen Bewegung die Bindungskonstanten zwischen Analyt und CD ab. Dies kann je nach Analyse auch zu einem verschlechterten Trennergebnis führen. Es sollte also eine Temperatur gewählt werden, bei der eine gute Trennung mit einer nicht zu langen Analysenzeit korrespondiert. Für die chirale Trennung der Flavan-3-ol-Enantiomeren wurde ein Temperaturbereich zwischen 15-25 °C getestet. Bei einer Temperatur von 15-18 °C kam es im Gegensatz zu 20°C zu einer leichten Verbesserung in der Peakauflösung. Es wurde aber auch eine Verlängerung der Analysenzeit beobachtet. Bei der Erhöhung der Kapillartemperatur auf über 25 °C konnte eine Verschlechterung der Auflösung beobachtet werden. Dies ist auf die schwächere Komplexbildung zwischen Analyt und CD zurückzuführen. Es wurde eine Kapillartemperatur von 20 °C gewählt.

10.6.7. Wahl der Spannung

Die angelegte Spannung beeinflusst das gesamte CE-Trennsystem, also die Mobilitäten von EOF und Analyten. Für die chirale Trennung der Flavan-3-ol-Enantiomeren wurde ein Spannungsbereich zwischen 15-22 kV getestet. Mit einer Spannung von 18 kV konnte eine gute Peakauflösung in schneller Analysenzeit erzielt werden. Bei einer Spannung über 18 kV kam es zu einer Verschlechterung der Peakeffizienz, da es in Folge der Zunahme des EOF zu einer Peakverbreiterung kam.

10.6.8. Zusatz von organischen Lösungsmitteln

Mit dem Zusatz von organischen Lösungsmitteln zum Hintergrundelektrolyten kann eine Verbesserung der Peakauflösung erreicht werden. Als typischer organischer Modifier wurde Methanol eingesetzt. Es kommt dabei zu einer Veränderung der Viskosität des Puffers. Aufgrund der Volumenkontraktion steigt die Viskosität des Hintergrundelektrolyten. Außerdem konkurrieren die Methanolkoleküle mit den Wassermolekülen bei der Solvatisierung der Analyten. Dies kann zu einer Verzögerung der Komplexierung des Analyten mit dem Cyclodextrin führen, was eine verbesserte enantioselektive Trennung zur Folge haben kann. Der Trennmechanismus an sich wird dabei aber nicht behindert. Für die chirale Trennung der Flavan-3-ole wurde dem Hintergrundelektrolyten Methanol in den Konzentrationen von 0-15 % hinzugefügt. Es konnte im vorliegenden Fall nur eine minimale Verbesserung der Peakeffizienzen beobachtet werden. Außerdem führte der Zusatz von Methanol aufgrund der Viskositäts-erhöhung des Puffers zu einer Verlängerung der Analysenzeit. Mit dem Zusatz anderer Lösungsmittel zum Hintergrundelektrolyten, wie Propanol oder Acetonitril konnte ebenfalls keine Verbesserung der Trennung beobachtet werden.

10.6.9. Zusatz von Cyclohexanol

Als weiterer organischer Lösungsmittelzusatz wurde dem Hintergrundelektrolyten Cyclohexanol hinzugefügt. Im Gegensatz zu den oben erwähnten organischen Lösungsmitteln bewirkte Cyclohexanol kaum eine Veränderung der Viskosität des Hintergrundelektrolyten. Es hatte keinen Einfluss auf die Solvatisierung der Analytmoleküle. Vielmehr verzögerte es die Komplexierung zwischen dem Analyt und dem chiralen Selektor, da es direkt mit dem Analyten um den chiralen Selektor konkurriert. Dadurch kann es zu einer Verbesserung der Peakeffizienz kommen [17]. Im Gegensatz zu Methanol und anderen organischen Lösungsmitteln kann Cyclohexanol in viel geringeren Konzentrationen eingesetzt werden. Für die Untersuchung wurden Hintergrundelektrolyten mit aus der Literatur üblichen Konzentrationen (0 - 0,5 %) an Cyclohexanol hergestellt. Es konnte jedoch keine wesentliche Verbesserung für die chirale Trennung von Catechin und Epicatechin gemessen werden.

10.7. Vorteile der Methode

Mit der entwickelten Methode lassen sich die monomeren Flavan-3-ole Catechin und Epicatechin schnell (unter acht Minuten) und effizient in ihre einzelnen Enantiomeren trennen (s. Abb.10.12). Es wurden R_s -Werte für (+/-)-Catechin von $> 1,32$ und für (+/-)-Epicatechin von $> 1,35$ ermittelt. Der Trennfaktor lag für beide Substanzen bei $\alpha_{app} = 1.01$. Im Gegensatz zu den Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe gelingt die Trennung ohne weitere Zusätze wie organische Modifier oder mizellbildende Reagenzien zum Hintergrundelektrolyten, was zu einer Vereinfachung der Handhabung führte [54].

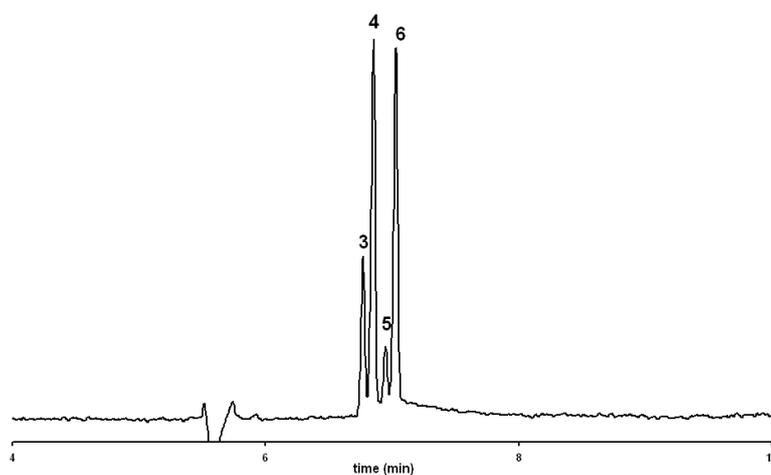


Abbildung 10.12: Optimierte Enantiomerentrennung von Catechin und Epicatechin
3: (-)-Catechin, 4: (+)-Catechin, 5: (+)-Epicatechin, 6: (-)-Epicatechin
(s. Kap. 9.1.3)

10. Methodenentwicklung zur enantioselektiven Trennung

11. Untersuchte Lebensmittel

11.1. Guaraná und Guaranáprodukte

Die entwickelte Methode zur Trennung der Enantiomere von Catechin und Epicatechin wurde auf verschiedene flavan-3-ol-haltige Lebensmittel angewendet. Dabei stand die Umsetzung der entwickelten Methode auf entsprechende Lebensmittelmatrices im Vordergrund. Da die Flavan-3-ol-Enantiomeren bis dahin nicht enantioselektiv mittels CE untersucht worden waren, sollten Untersuchungen an Lebensmitteln gemacht werden, um die in der Literatur gemachten Angaben über das Vorkommen der Flavan-3-ole zu bestätigen. Es wurde ein breites Spektrum an flavan-3-ol-haltigen Lebensmitteln untersucht. Diese waren unter anderem Tee, Kakao und Schokolade, Traubensaft, Kirschsaf, Aprikosenfrüchte, Apfelsaft, Guaraná, Kolanuss, Litschi und Bier. Hierbei wurden unterschiedlich hohe Anteile der Flavan-3-ole nachgewiesen. Es konnte die in der Literatur vorherrschende Meinung bestätigt werden, dass aufgrund der Biosynthese in der Pflanze hauptsächlich (+)-Catechin und (-)-Epicatechin gebildet werden.

11.1.1. Chirale Untersuchung von Guaranásamen

Aufgrund ihres hohen Anteils an Flavan-3-olen wurden Guaranásamen mit der entwickelten CE-Methode zur enantioselektiven Trennung untersucht (s. Abb. 11.1)

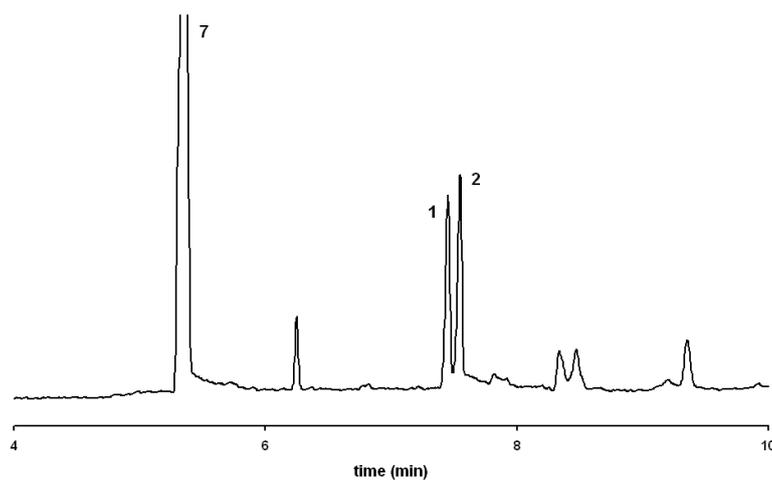


Abbildung 11.1: Untersuchung von wässrigem Guaranásamenextrakt mittels CE ohne chiralen Selektor; 1: Epicatechin, 2: Catechin, 7: Coffein

Wie in Abb. 11.2 gezeigt, wurden neben den natürlich vorkommenden Flavan-3-ol-Enantiomeren (+)-Catechin und (-)-Epicatechin auch die atypischen Enantiomeren (-)-Catechin und (+)-Epicatechin nachgewiesen. Das natürliche Vorkommen der beiden atypischen Enantiomeren (-)-Catechin und (+)-Epicatechin konnte bei den durchgeführten Untersuchungen für Guaraná erstmals beschrieben werden. Wie bereits in Kap. 1.3 erwähnt, wurden die atypischen Flavan-3-ol-Enantiomeren bisher nur in einigen wenigen Palmenarten identifiziert [26]. Abgesichert wurden die Befunde mittels Migrationszeitvergleich und Standardaddition. Zusätzlich wurde der Guaraná samenextrakt auch noch mit einem alternativen chiralen Selektor untersucht (*M*- β -CD). Auch hier ließ sich Catechin und Epicatechin sowohl in (+)-und (-)-Catechin als auch in (+)-und (-)-Epicatechin trennen.

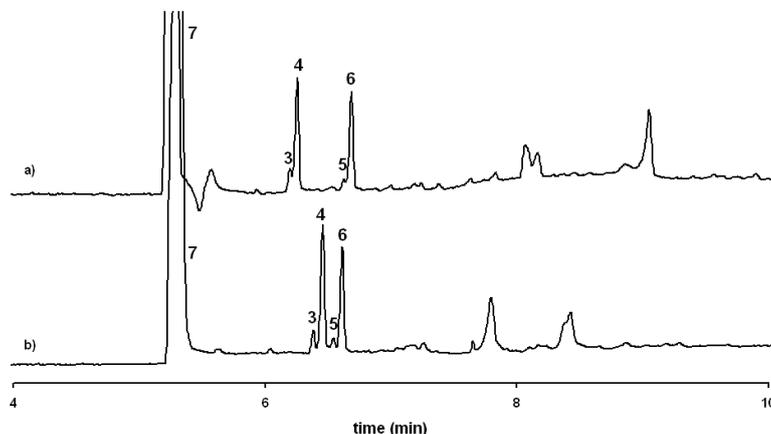


Abbildung 11.2: Enantiomertrennung von Catechin und Epicatechin in wässrigem Guaranásamenextrakt mit a) M- β -CD und b) HP- γ -CD als chirale Selektoren;
 3: (-)-Catechin, 4: (+)-Catechin, 5: (+)-Epicatechin, 6: (-)-Epicatechin,
 7: Coffein

Ausschluss einer Epimerisierungsreaktion nach der Ernte

Die Guaranásamen werden verschiedenen Prozeduren zur Haltbarmachung unterzogen [97]. Wie später noch ausführlicher zu erläutern sein wird, kommt es bei der starken thermischen Behandlung von flavan-3-ol-haltigen Pflanzenteilen zu einer Epimerisierungsreaktion von (+)-Catechin und (-)-Epicatechin (s. Kap. 11.2). Dies konnte auch beim Dämpfen von grünem Tee beobachtet werden [48]. Somit könnten die atypischen Flavan-3-ol-Enantiomeren (-)-Catechin und (+)-Epicatechin im untersuchten Guaranásamenextrakt durch den bereits beschriebenen Röstvorgang der Samen entstanden sein. Da bei den untersuchten Guaranásamen der Trocknungsprozess nicht bekannt war, wurden ungeröstete Guaranásamen analysiert, die ausschließlich an der Luft getrocknet wurden. Die Samen wurden von der Samenschale befreit und gemahlen. Ein weiterer Punkt, der eine Epimerisierung der Flavan-3-ol-Enantiomeren schon während des Trocknungsvorgangs begünstigen würde, wäre ein hoher Wassergehalt der Früchte und Samen. Frische Guaranásamen enthalten aber nur ca. 8-10 % Wasser. Durch die Lufttrocknung wird der Wasseranteil auf ca. 6 % gesenkt. Aufgrund

dieses anfänglich schon geringen Wassergehalts kann die Wahrscheinlichkeit einer Epimerisierung der Flavan-3-ole während der Lufttrocknung als äußerst gering angesehen werden (s. Kap. 11.2.2). Außerdem kommt es durch den Trocknungsvorgang zu einer Inaktivierung der Polyphenoloxidase, die zum Abbau bzw. zur Spaltung der Flavan-3-ole/Procyanidine führen könnte. Der Ausschluss einer Epimerisierungsreaktion während der Trocknung stimmt auch mit den Untersuchungen von getrockneten Kakaobohnen überein (s. Kap.11.2.1). Bei der enantioselektiven Analyse des wässrigen Guaranáextrakts aus den luftgetrockneten Samen mittels CE, wurden ebenfalls alle Enantiomeren von Catechin und Epicatechin nachgewiesen. [58].

Ausschluss einer Epimerisierungsreaktion während der Probenaufarbeitung

Bisher wurde das Auftreten und der Nachweis der atypischen Flavan-3-ol-Enantiomeren in Pflanzenextrakten auf Artefaktbildung während der Probenaufarbeitung zurückgeführt. (-)-Catechin und (+)-Epicatechin könnten durch eine entsprechende Epimerisierungsreaktion aus (-)-Epicatechin bzw. (+)-Catechin entstanden sein. Diese wird durch erhöhte Temperatur und alkalischen pH-Wert begünstigt [51, 52]. Um eine entsprechende Artefaktbildung ausschließen zu können, wurde zur Analyse der rein wässrige Auszug aus Guaranásamen verwendet, da dieser weder erhitzt noch anderen Einflüssen wie z.B. organischen Lösungsmitteln, Druck- oder pH-Wert-Änderungen ausgesetzt war. Die Probenaufarbeitung fand bei Zimmertemperatur statt (s. Teil IV). Der untersuchte wässrige Extrakt hatte dabei einen pH-Wert von 6,3. Es lag also kein basischer pH-Wert vor, der eine Epimerisierung hätte bewirken können. Eine Epimerisierung der Flavan-3-ol-Enantiomeren während der gesamten Probenaufarbeitung kann ausgeschlossen werden.

Analyse der Flavan-3-ole bei basischem pH-Wert

Flavan-3-ole verhalten sich im Alkalischen instabil und epimerisieren. Bei sehr hohen pH-Werten ($\text{pH} > 10$) findet eine Ringöffnung am C-2 des C-Rings statt und es entstehen gelb gefärbte Verbindungen [15, 21]. Dennoch wurde die Methode zur Enantiomerentrennung der monomeren Flavan-3-ole bei leicht basischem pH-Wert ($\text{pH} = 8.5$) durchgeführt (s. Kap. 10). Die Epimerisierungsreaktion ist temperatur- und zeitabhängig. Komatsu et al. untersuchten ausführlich das temperatur- und pH-abhängige Verhalten der Flavan-3-ole [48, 59]. Basierend auf diesen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass es aufgrund der ausgewählten Analysenparameter für die Enantiomerentrennung (Temperatur $20\text{ }^{\circ}\text{C}$; pH-Wert des Puffers 8.5) innerhalb der kurzen Analysenzeit von unter 8 Minuten zu keinerlei Veränderung der Analyten kommt. Für eine entsprechende Epimerisierung müsste für eine Analyse bei einem pH-Wert von 8,5 eine höhere Temperatur ($> 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) verbunden mit einer längeren Analysenzeit gewählt werden. Außerdem hätte man bei der Analyse der Standardsubstanzen auch eine Epimerisierung in die entsprechenden Enantiomeren beobachten müssen. Dabei hätte man aufgrund der sehr guten Trennleistung des kapillarelektrophoretischen Systems ebenfalls die atypischen Flavan-3-ol-Enantiomeren nachweisen müssen. Somit konnte eine Epimerisierung während der CE-Analyse ausgeschlossen werden [58].

	Abb. 11.2 a)	Abb. 11.2b)
(+/-)-Catechin	84:16	86:14
(+/-)-Epicatechin	9:91	13:87
e.e. (+)-Catechin	68	70
e.e. (+)-Epicatechin	82	74

Tabelle 11.1: Peakflächenverhältnisse und e.e.-Werte von (+/-)-Catechin und (+/-)-Epicatechin bei der enantioselektiven Trennung von Catechin und Epicatechin aus Guaranásamenextrakt

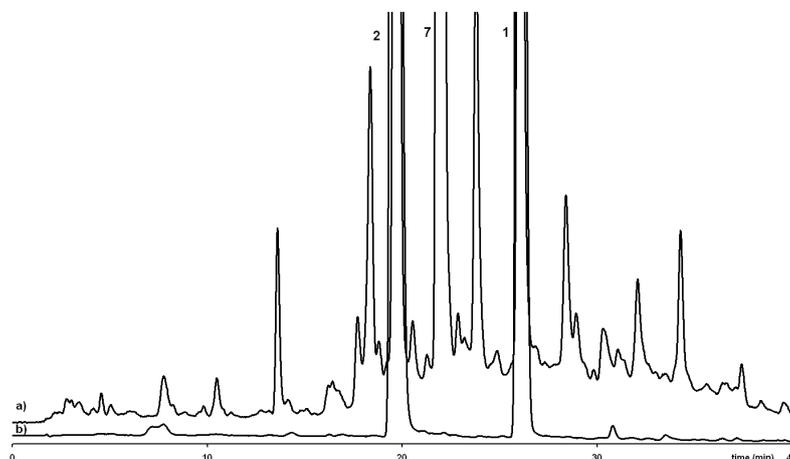


Abbildung 11.3: Chromatogramme von Guaranámenextrakt a) vor und b) nach der Isolierung der monomeren Flavan-3-ole aufgenommen bei 280nm;
1: Epicatechin, 2: Catechin, 7: Coffein

Ausschluss von Comigration

Die Berechnung des enantiomeric excess (e.e.), der ein Mass für die Reinheit einer chiralen Verbindung, ist zeigt beim Vergleich der beiden Messungen keinen signifikanten Unterschied in den Peakflächenverhältnisse der Enantiomeren von Catechin und Epicatechin (s. Tab. 11.1). Es könnte jedoch möglich sein, dass Substanzen mit der gleichen elektrophoretischen Mobilität und dem gleichen UV-Spektrum zur gleichen Zeit migrieren und so die Flavan-3-ole-Enantiomere vortäuschen. Um dies auszuschließen, wurde der wässrige Guaranámenextrakt an Polyamid aufgereinigt und die Flavan-3-ole isoliert. Die Analyse dieser Isolate wurde mittels nicht-chiraler HPLC-UV-MS durchgeführt. Aus der reinsten Fraktion wurden Catechin und Epicatechin erneut isoliert (s. Abb. 11.3). Dieses Isolat wurde anschließend kapillarelektrophoretisch analysiert. Diese Analyse wurde auch mit zwei verschiedenen chiralen Selektoren durchgeführt (s. Abb. 11.4). Es konnten alle vier Flavan-3-ol-Enantiomere identifiziert werden [58]. Auch hier wurden die Peakflächenverhältnisse der einzelnen Messungen mit und ohne chirale Selektoren sowie der e.e.-Wert (enantiomeric excess) berechnet. Es zeigten sich keinerlei signifikanten Unterschiede in den einzelnen Messungen mit und ohne chiralen Selektor (s. Tab. 11.2).

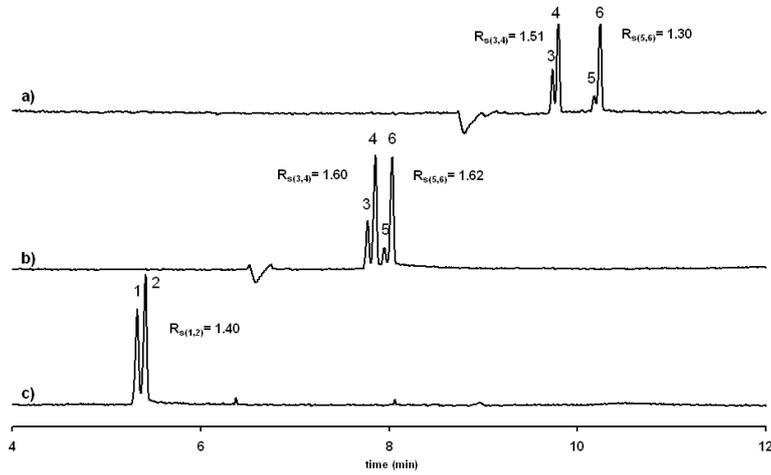


Abbildung 11.4: Chirale Trennung von Catechin und Epicatechin in isoliertem Guaranásamenextrakt; a) Ohne chiralen Selektor, b) mit HP- γ -CD und c) mit M- β -CD als chirale Selektoren; 1: Epicatechin, 2: Catechin, 3: (-)-Catechin, 4: (+)-Catechin, 5: (+)-Epicatechin, 6: (-)-Epicatechin

	C/EC	(+/-)-C	(+/-)- EC	e.e.(+)-C	e.e.(+)-EC
Abb. 11.4 a)	58:44	–	–	–	–
Abb. 11.4 b)	56:44	71:29	14:86	42	72
Abb. 11.4 c)	56:44	72:28	13:87	44	74

Tabelle 11.2: Peakflächenverhältnisse und e.e.-Werte von (+/-)-Catechin und (+/-)-Epicatechin bei der enantioselektiven Trennung von isoliertem Catechin und Epicatechin aus Guaranásamenextrakt

11.1.2. Authentizitätsprüfung von Guaraná und guaranáhaltigen Produkten

Guaraná wird wegen seines hohen Coffeingehaltes in der Lebensmittelindustrie für Nahrungsergänzungsmittel, für Süßwaren und vor allem für Erfrischungsgetränke eingesetzt. Es wird als alternative Coffeinquelle im Gegensatz zu synthetischem Coffein verwendet und auch in der Werbung für die jeweiligen Produkte entsprechend ausgelobt. Anfang 1990 kamen eine Reihe von sogenannten „Energy Drinks“ in Mode, die einen erhöhten Coffeingehalt enthielten. Viele davon warben damit, dass das Coffein aus Guaraná stammte. Es wurde nach einer Methode verlangt, die es erlaubte, einen Zusatz an Guaraná nachzuweisen. Diese Authentizitätsprüfung gelang mittels nicht-chiraler HPLC durch den Vergleich der Peakflächenverhältnisse von Coffein, Theobromin und Theophyllin. Zusätzlich sprach ein qualitativer Nachweis von Catechin und Epicatechin für die Verwendung von Guaraná als Zutat, wenn dem Produkt nicht andere flavan-3-ol-haltige Zutaten zugefügt wurden [68, 69]. Für den Nachweis zur Verwendung von Guaraná in Nahrungsergänzungsmitteln und Getränken wurden ebenfalls HPLC bzw. CE-Methoden entwickelt, um die oben erwähnten Analyten zu quantifizieren. Hierbei wurden aber keine enantioselektiven Analysen angewendet [16, 87].

Durch den Nachweis des natürlichen Vorkommens der atypischen Flavan-3-ol-Enantiomeren in Guaraná mittels chiraler CE, könnte eine Authentizitätsprüfung von Guaranápulver oder Guaranázusätzen in Lebensmitteln gelingen. Enthält ein Lebensmittel Guaraná, so müssten sich neben (+)-Catechin und (-)-Epicatechin sowohl (-)-Catechin als auch (+)-Epicatechin nachweisen lassen.

Dafür wurden außer verschiedenen Guaranásamenpulvern und Guaranáextrakten auch kommerziell erhältliche Nahrungsergänzungsmittel, Erfrischungsgetränke auf Limonaden- und Bierbasis sowie Süßwaren untersucht. Diese Lebensmittel enthielten alle Guaraná im Zutatenverzeichnis. Außerdem war Guaraná auch explizit aufgrund seiner anregenden Wirkung ausgelobt.

Guaranásamenpulver und Nahrungsergänzungsmittel

Die Analyse der verschiedenen kommerziell erhältlichen Guaranásamenpulver und Nahrungsergänzungsmittel zeigte, dass in allen Proben sowohl (+)- und (-)-Catechin als auch (+)- und (-)-Epicatechin nachweisbar waren. Auch in den Samenschalen von ganzen Guaranásamen ließen sich diese nachweisen. Die Ergebnisse belegten, dass in allen untersuchten Proben Guaraná enthalten war. Die entwickelte Methode zur chiralen Untersuchung der Flavan-3-ol-Enantiomere von Catechin und Epicatechin mittels Kapillarelektrophorese ermöglicht es so, die Authentizität von Guaranáprodukten zu bestätigen. Allerdings war nicht bekannt, inwieweit die Guaranásamen für die jeweiligen Produkte verarbeitet wurden. Die einzelnen Behandlungsarten wie Rösten oder Heißluftbehandlung konnten nicht in Erfahrung gebracht werden.

Probe	(+)/(-)-C	e.e.((+)-C)	(+)/(-)-EC	e.e.((+)-EC)
Guaranásamen geröstet	72:28	44	13:87	74
Guaranásamen 1	65:35	30	8:92	84
Guaraná Tabletten	83:17	66	4:96	92
Guaranásamenextrakt	79:21	58	6:94	88
Guaranásamen 2	86;14	72	8:92	82
Guaranásamen 3	77:23	54	11:89	78
Samenschale 1	83:17	66	5:95	90
Samenschale 2	75:25	50	21:79	58

Tabelle 11.3: Peakflächenverhältnisse und e.e.-Werte von (+/-)-Catechin und (+/-)-Epicatechin bei der enantioselektiven Trennung von Catechin und Epicatechin aus diversen Guaranáproben

Guaranásamenextrakte, Limonaden und Biermischgetränke

Bei der Untersuchung von Guaranásamenextrakten, Limonaden und auch guaranáhaltigen Biermischgetränken konnten weder Catechin noch Epicatechin mit der entwickelten chiralen CE-Methode nachgewiesen werden. Dies kann folgenden Grund haben: In der Getränkeindustrie werden Guaranáextrakte verwendet, um einem Getränk eine bestimmte Menge an Coffein zuzusetzen (s. Kap. 3.2). Dafür wird statt synthetischem Coffein, Guaranáextrakt eingesetzt. Dieser aufgereinigte Extrakt enthält zu einem hohen Anteil Coffein (bis 90%). Durch den Einsatz von Guaranásamenextrakt wird zum einen die Löslichkeit im Getränk verbessert, zum anderen werden durch das Extraktionsverfahren störende Geschmackskomponenten aus dem Guaranásamenpulver eliminiert. Darunter fallen auch die adstringierend schmeckenden Flavan-3-ole Catechin und Epicatechin. In diesen Extrakten und den damit hergestellten Getränken waren weder Catechin noch Epicatechin nachweisbar. Hinzu kommt die starke Verdünnung dieser Extrakte im fertigen Lebensmittel. Auch eine stärkere Aufkonzentrierung im Zuge der Probenaufarbeitung führte zu keinem Nachweis.

Süßwaren

Bei der Analyse von Kaubonbons, bei denen als Zutat Guaranápulver angegeben war, konnten alle Enantiomeren des Catechins und des Epicatechins nachgewiesen werden (s. Abb. 11.5). Die Herkunft des eingesetzten Guaranápulvers war nicht bekannt.

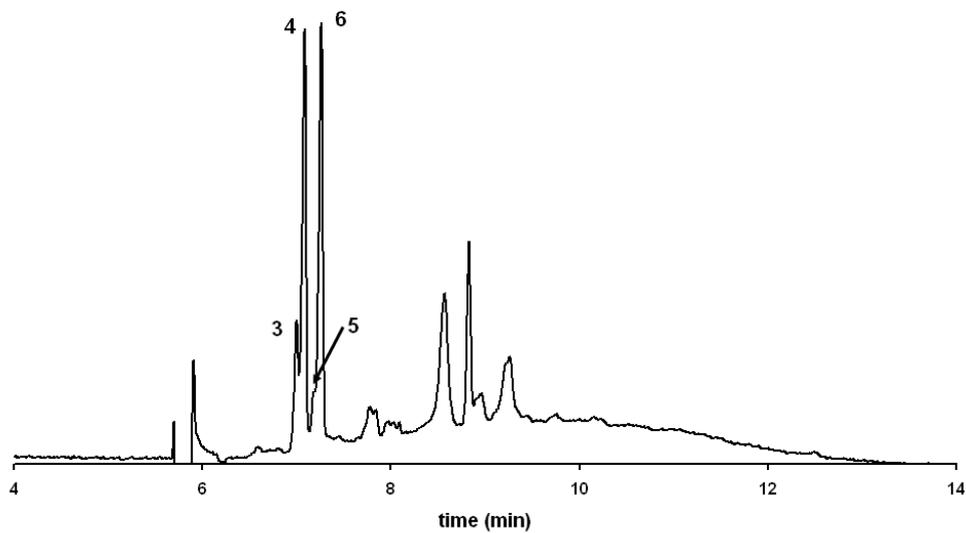


Abbildung 11.5: Chirale Untersuchung eines SPE-Eluats aus einem guaranáhaltigen Kaubonbon; 3: (-)-Catechin, 4: (+)-Catechin, 5: (+)-Epicatechin, 6: (-)-Epicatechin

11.1.3. Ergebnis

Die atypischen Flavan-3-ol-Enantiomere (-)-Catechin und (+)-Epicatechin konnten erstmalig in Guaranásamen nachgewiesen werden. Sie wurden neben den natürlich vorkommenden Enantiomeren (+)-Catechin und (-)-Epicatechin identifiziert. Eine mögliche Epimerisierungsreaktion konnte durch Vermeidung von entsprechenden Einflüssen wie Temperatur und/oder pH-Wert während der Ernte, im Rahmen der Probenaufarbeitung und während der CE-Analyse ausgeschlossen werden. Es kann also mit großer Sicherheit davon ausgegangen werden, dass alle Flavan-3-ol-Enantiomere in Guaranásamen vorkommen und damit natürlichen Ursprungs sind. Diese Ergebnisse konnten mittlerweile durch Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt werden [6].

Untersuchung anderer Pflanzen der *Sapindaceae*

Die Ergebnisse aus der Untersuchung von Guaraná legen nahe, dass auch andere Pflanzen aus der Familie der *Sapindaceae* die atypischen Flavan-3-ol-Enantiomeren aufweisen. Deswegen wurden weitere Vertreter aus dieser Pflanzenfamilie untersucht. Hierbei konzentrierte man sich auf Pflanzen bzw. Früchte, die ebenfalls als Lebensmittel Verwendung finden. Dazu gehörten die Litschi (*Litchi chinensis* SONN.) und die Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.). Diese sind im Gegensatz zu Guaraná in Asien beheimatet. Die Samen sind bei beiden Früchten von einem essbaren Arrilus umgeben. Es wurden sowohl frische Litschi, als auch Konserven untersucht. Die Rambutanfrüchte lagen nur als Konserve vor. Die Flavan-3-ole wurden an Polyamid angereichert und mittels chiraler CE analysiert. Hierbei konnte mit der entwickelten CE-Methode nur die natürlich vorkommenden (-)-Epicatechin und (+)-Catechin in geringen Anteilen nachgewiesen werden [109].

11.2. Kakao und Kakaoerzeugnisse

11.2.1. Analyse von Kakao und Kakaoerzeugnissen

Die entwickelte CE-Methode zur chiralen Trennung von Catechin und Epicatechin wurde auf diverse Kakaobohnen und Kakaoerzeugnisse angewendet. Zusätzlich konnten auch einzelne Halbfabrikate (z.B. Kakaomasse, Kakaonibs) untersucht werden. Um eine Veränderung der temperatur- und pH-empfindlichen Flavan-3-ol-Enantiomeren auszuschließen, wurde eine möglichst schonende Probenaufarbeitung gewählt. Abgesichert wurden die erhaltenen Ergebnisse durch Migrationszeitvergleich und Standardaddition. Desweiteren wurden Catechin und Epicatechin aus den Probenextrakten isoliert, aufgereinigt und mittels nicht-chiraler HPLC-UV-Ionenfallen Massenspektrometrie identifiziert. Die reinsten Fraktionen wurden wiederum isoliert und erneut zum Vergleich mit den Messungen der Rohextrakte in die CE injiziert. Mit der Analyse der isolierten Flavan-3-ole konnte eine eventuelle Comigration von ähnlichen Substanzen (z.B. von dimeren Procyanidinen) ausgeschlossen werden (s. Kap. 9.3.5 bis 9.3.7).

Rohe und fermentierte Kakaobohnen

Für die Analyse von rohen Kakaobohnen wurden die Kakaobohnen direkt aus einer Kakaofrucht gelöst, gefriergetrocknet und entsprechend aufgearbeitet. Durch die Gefriertrocknung wurde eine sofortige Inaktivierung der Polyphenoloxidase erreicht, die zum Abbau der Flavan-3-ole hätte führen können. Bei der Analyse dieser unfermentierten, getrockneten, ungerösteten Kakaobohnen mittels chiraler CE konnten (+)-Catechin und (-)-Epicatechin nachgewiesen werden.

Wie Abb. 11.6 zeigt, wurde neben sehr geringen Anteilen an (+)-Catechin, vor allem (-)-Epicatechin gefunden. Damit konnte die in der Literatur vorherrschende Meinung bestätigt werden, dass aufgrund der Biosynthese in der Pflanze (+)-Catechin und (-)-Epicatechin die vorherrschenden Enantiomere sind [14, 45, 91]. Im Gegensatz zu Guaraná konnten in unfermentierten, getrockneten, ungerösteten Kakaobohnen keine atypischen Flavan-3-ol-Enantiomeren als natürliche Bestandteile nachgewiesen werden.

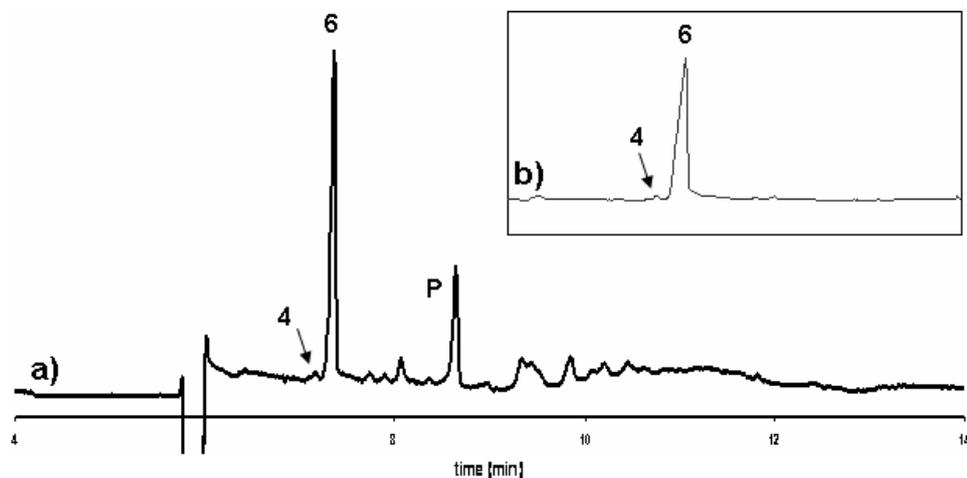


Abbildung 11.6: Enantioselektive Untersuchung von Catechin und Epicatechin a) in einem Extrakt aus unfermentierten, getrockneten, ungerösteten Kakaobohnen und b) aus dem Extrakt isoliert. 4: (+)-Catechin, 6: (-)-Epicatechin, P: Procyanidin B₂

Bei der Untersuchung von fermentierten, sonnengetrockneten, ungerösteten Kakaobohnen konnten ebenfalls nur (+)-Catechin und (-)-Epicatechin identifiziert werden. Dies lässt sich auch durch die herrschenden Bedingungen während des Fermentationsprozesses erklären. Bei der Fermentation der Kakaobohnen herrscht aufgrund der Gärung ein saures Milieu, so dass die entstehenden Temperaturen (40-50 °C) keinen Einfluss auf die Veränderung der Flavan-3-ol-Epimere haben können. Diese bleiben aufgrund des vorherrschenden sauren Milieus und des geringen Sauerstoffanteils stabil. Auch der Trocknungsvorgang kann für die Entstehung von (-)-Catechin keine Rolle

spielen. Dies ist auf den ohnehin schon geringen Wassergehalt der Kakaobohnen vor der Trocknung (6 bis 8 %) und 3,5 % nach der Trocknung zurückzuführen (s. Tab. 4.1).

Geröstete Kakaobohnen

Bei der Untersuchung von gerösteten Kakaobohnen und Kakaonibs konnte im Gegensatz zu den rohen Kakaobohnen neben (+)-Catechin und (-)-Epicatechin auch das atypische Enantiomer (-)-Catechin nachgewiesen werden (s. Abb. 11.7). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Röstung einen Einfluss auf die Flavan-3-ol-Enantiomerenbildung haben muss (s. Kap. 4.2.2 und 11.2.2).

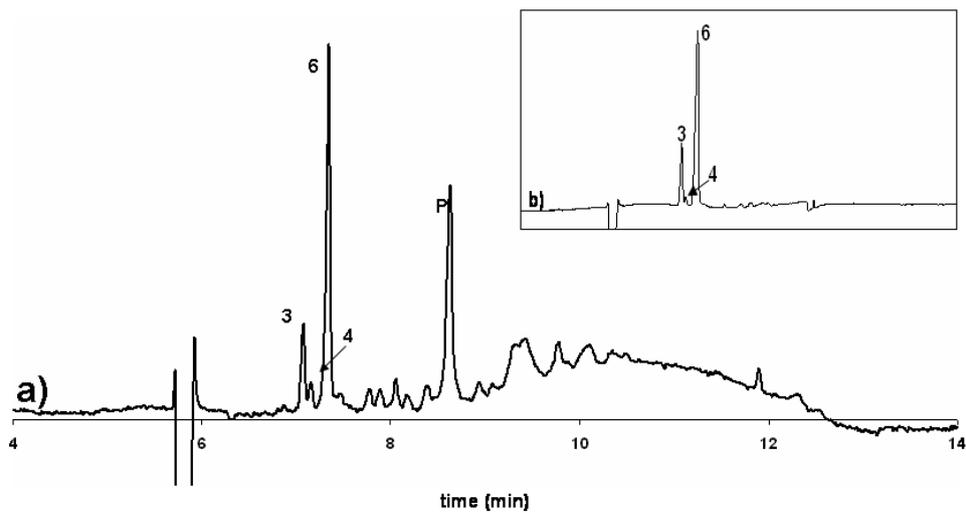


Abbildung 11.7: Enantioselektive Untersuchung von Catechin und Epicatechin a) in einem Extrakt aus gerösteten Kakaobohnen und b) aus dem Extrakt isoliert.
3: (-)-Catechin, 4: (+)-Catechin, 6: (-)-Epicatechin, P: Procyanidin B₂

Kakaomassen und Schokoladen

Wie Abb. 11.8 zeigt, konnte bei der Untersuchung von Kakaomassen und Schokoladen mit unterschiedlichem Kakaogehalt neben (-)-Epicatechin und (+)-Catechin ebenfalls (-)-Catechin identifiziert werden. Eine Erhöhung des (-)-Catechin-Anteils konnte im Vergleich zu den gerösteten Kakaobohnen jedoch nicht nachgewiesen werden. Dies bestätigte auch die Berechnung und der Vergleich der Peakflächenverhältnisse (s. Kap. 12.2.2).

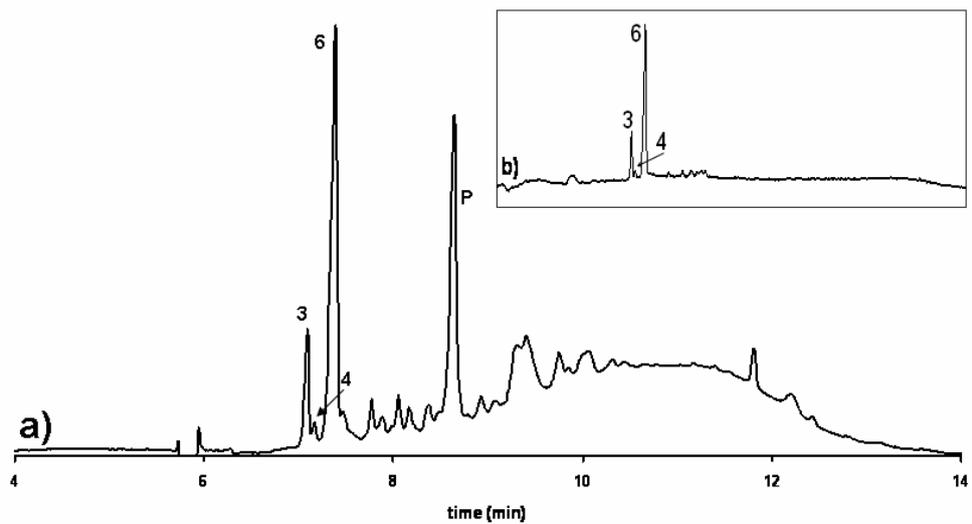


Abbildung 11.8: Enantioselektive Untersuchung von Catechin und Epicatechin a) in einem Extrakt aus Bitterschokolade und b) aus dem Extrakt isoliert.
3: (-)-Catechin, 4: (+)-Catechin, 6: (-)-Epicatechin, P: Procyanidin B₂

Kakaopulver

Wie Abb. 11.9 zeigt, konnte bei der Analyse von Kakaopulver neben (-)-Epicatechin und (+)-Catechin eine Veränderung der Flavan-3-ol-Enantiomeren beobachtet werden. Im Vergleich zu Kakaomasse und Schokolade wurde eine erhebliche Erhöhung des (-)-Catechin-Anteils nachgewiesen. Die Verarbeitung der Kakaomasse zu Kakaopulver hat also einen deutlichen Einfluss.

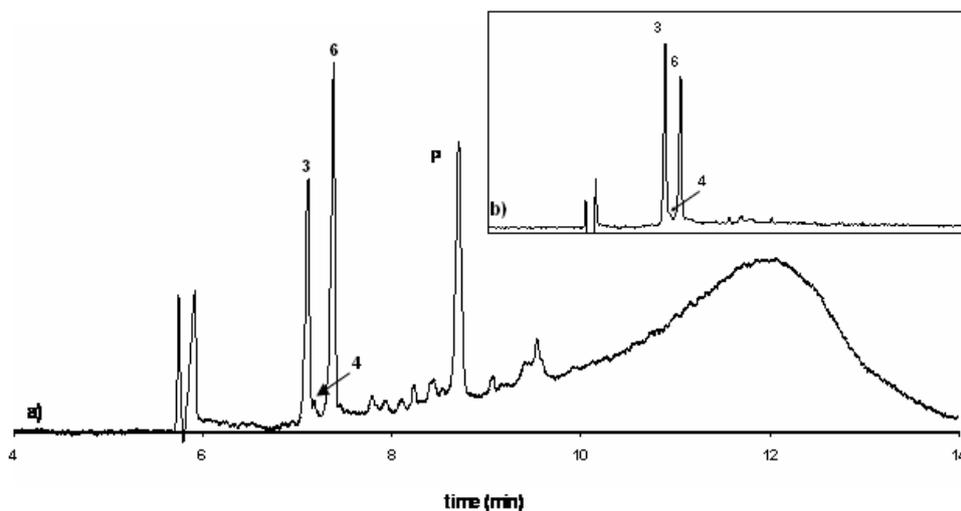


Abbildung 11.9: Enantioselektive Untersuchung von Catechin und Epicatechin a) in einem Extrakt aus Kakaopulver und b) aus dem Extrakt isoliert. 3: (-)-Catechin, 4: (+)-Catechin, 6: (-)-Epicatechin, P: Procyanidin B₂

11.2.2. Einfluss der Temperatur und des pH-Wertes

Die durchgeführten Messungen der verschiedenen Kakao- und Kakaoerzeugnisse haben gezeigt, dass es während der Kakaoverarbeitung zu einer Veränderung der Flavan-3-ol-Enantiomeren kommt. Das Vorkommen von (-)-Catechin in Kakao wurde bisher nur von zwei Arbeitsgruppen beschrieben. Dabei wurde aber nur auf das Vorkommen von (-)-Catechin in gerösteten Kakaobohnen und dunkler Schokolade hingewiesen. Genauere Untersuchungen über die auslösenden Faktoren, die zur Bildung von (-)-Catechin führen, wurden hierbei jedoch nicht weiter ausgeführt [25, 40]. Wie schon in Kap. 1 erläutert, epimerisieren Catechin und Epicatechin in alkalischer Lösung und/oder bei erhöhter Temperatur, das heißt, dass die Enantiomeren zu ihrem jeweiligen Epimer reagieren. (-)-Epicatechin epimerisiert dabei zu (-)-Catechin und (+)-Catechin zu (+)-Epicatechin [45, 52].

Wie Abb. 11.7 zeigt, konnte (-)-Catechin in gerösteten Kakaobohnen nachgewiesen werden. Deshalb kann die Röstung als der erste Prozessschritt angesehen werden, bei dem sich (-)-Catechin bildet. Induziert wird die Bildung von (-)-Catechin aufgrund der eingesetzten Rösttemperatur (120 - 130 °C für 10 - 30 Min). Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass ein Teil des gebildeten (-)-Catechin ein monomeres und/oder epimerisiertes Spaltprodukt aus den oligomeren Procyanidinen ist. Es ist nicht bekannt, ob die untersuchten gerösteten Kakaobohnen vor dem eigentlichen Röstvorgang einer thermischen Vorbehandlung (Infrarot, Heißluft) unterzogen wurden, um eventuelle Mikroorganismen und/oder Schimmelpilze abzutöten. Bei einer solchen thermischen Vorbehandlung wäre die Bildung von (-)-Catechin ebenfalls möglich [13, 94].

Des Weiteren wurde eine Erhöhung des (-)-Catechin-Anteils bei der CE-Analyse von aufgeschlossenem Kakaopulver festgestellt. Die Alkalisierung kann somit als der zweite Prozessschritt angesehen werden, der zur Bildung bzw. zum Anstieg des (-)-Catechin-Anteils führt. Die pH-Wert-Verschiebung in den basischen Bereich (pH 8-9) und der zusätzliche Einsatz erhöhter Temperaturen (bis 100 °C) begünstigt die Epimerisierung der Flavan-3-ol-Enantiomeren (vgl. Kap. 4.2.4).

Zur Verifizierung der dargestellten Ergebnisse, wurden deshalb eigene Röst- und Alkalisierungsversuche durchgeführt. Hierzu wurden unfermentierte, rohe, ungeröstete Kakaobohnen unter Laborbedingungen geröstet bzw. unter Temperatureinwirkung alkalisch behandelt und die Flavan-3-ole nach der üblichen Probenaufarbeitung mittels chiraler CE analysiert. Wie Abb. 11.10 und Abb. 11.11 zeigen, konnte in beiden Proben (-)-Catechin nachgewiesen werden. Diese Versuche bestätigten, dass sowohl das Rösten, als auch der Alkalisierungsprozess die Haupteinflussfaktoren während der Kakaoverarbeitung sind, die die Epimerisierung der Flavan-3-ol-Enantiomeren induzieren.

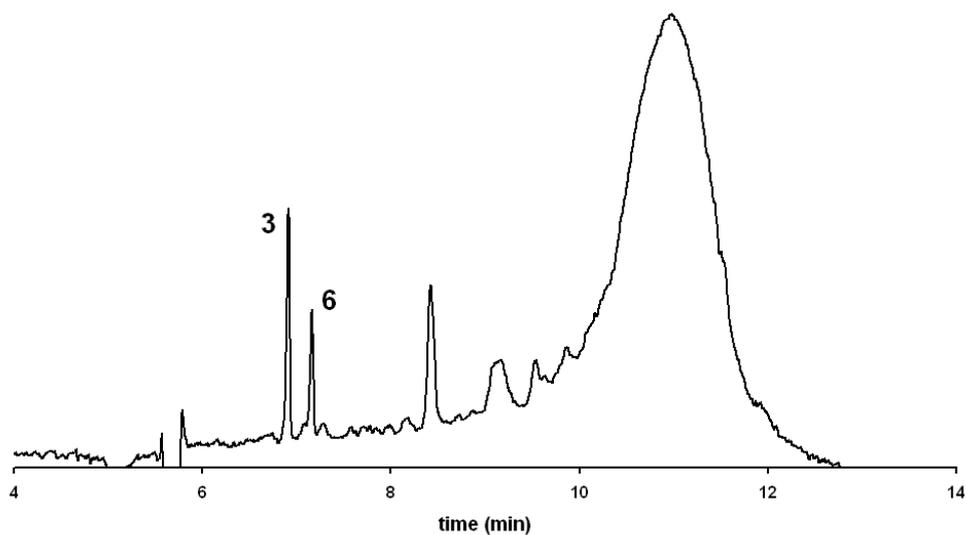


Abbildung 11.10: Chirale Untersuchung von Catechin und Epicatechin nach dem Rösten von rohen Kakaobohnen (2,5 Stunden bei 160 °C); 3: (-)-Catechin, 6: (-)-Epicatechin

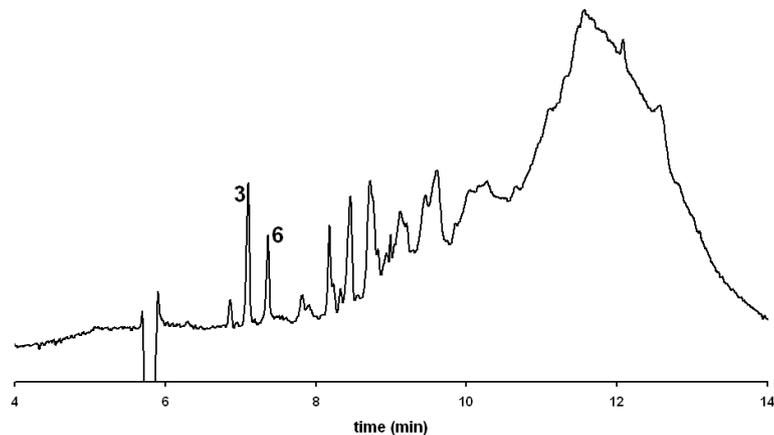


Abbildung 11.11: Chirale Untersuchung von Catechin und Epicatechin nach der Alkalisierung von rohen Kakaobohnen (pH 8,6, 75 °C, 1 Stunde). 3: (–)-Catechin, 6: (–)-Epicatechin

11.2.3. Epimerisierung

(–)-Catechin entsteht bei der Röstung der Kakaobohnen und der Alkalisierung der Kakaomasse. Es bildet sich aufgrund einer Epimerisierungsreaktion aus dem enthaltenen (–)-Epicatechin. In rohen Kakaobohnen wurden neben (–)-Epicatechin auch geringe Anteile an (+)-Catechin nachgewiesen. Folglich müsste es im Zuge der Kakaoverarbeitung nicht nur zur Epimerisierung von (–)-Epicatechin, sondern auch von (+)-Catechin kommen. Dabei entsteht aus (+)-Catechin (+)-Epicatechin.

Bei beiden Epimerisierungsreaktionen kommt es zu einer Ringöffnung am C-2 des C-Rings. Daraus resultiert eine planar gebaute Chinonmethid-Struktur. Anschließend folgt ein erneuter Ringschluss mit gleichzeitiger Änderung der Konfiguration am C-2 des C-Rings. (+)-Epicatechin konnte jedoch mittels CE in den untersuchten Kakao bohnen und Kakaoerzeugnissen nicht nachgewiesen werden. Dies lässt sich unter anderem über die Konfiguration des (+)-Epicatechin begründen.

In Catechin und Epicatechin liegen beide chiralen Zentren nebeneinander. (+)-Catechin ist trans-konfiguriert. Der Phenylrest am C-2 und die Hydroxyl-Gruppe des C-3 des C-Ringes sind energetisch günstig angeordnet, da durch die trans-Konfiguration kei-

ne sterische Hinderung der beiden Gruppen stattfindet. Bei der Epimerisierung des natürlich vorkommenden (+)-Catechin zu (+)-Epicatechin kommt es zur Änderung der Konfiguration im Molekül (s. Abb. 11.12). Nach dem Ringschluss sind die beiden chiralen Zentren nun cis-konfiguriert. Diese Konfiguration ist jedoch thermodynamisch ungünstiger, da der Phenylrest und die benachbarte Hydroxyl-Gruppe sterisch näher zusammen stehen, als in der trans-Konfiguration. Für diese Epimerisierungsreaktion ist also eine höhere Aktivierungsenergie nötig, damit die sterisch ungünstigere cis-Konfiguration überhaupt gebildet werden kann. Im Gegensatz dazu ist das natürlich vorkommende (-)-Epicatechin cis-konfiguriert.

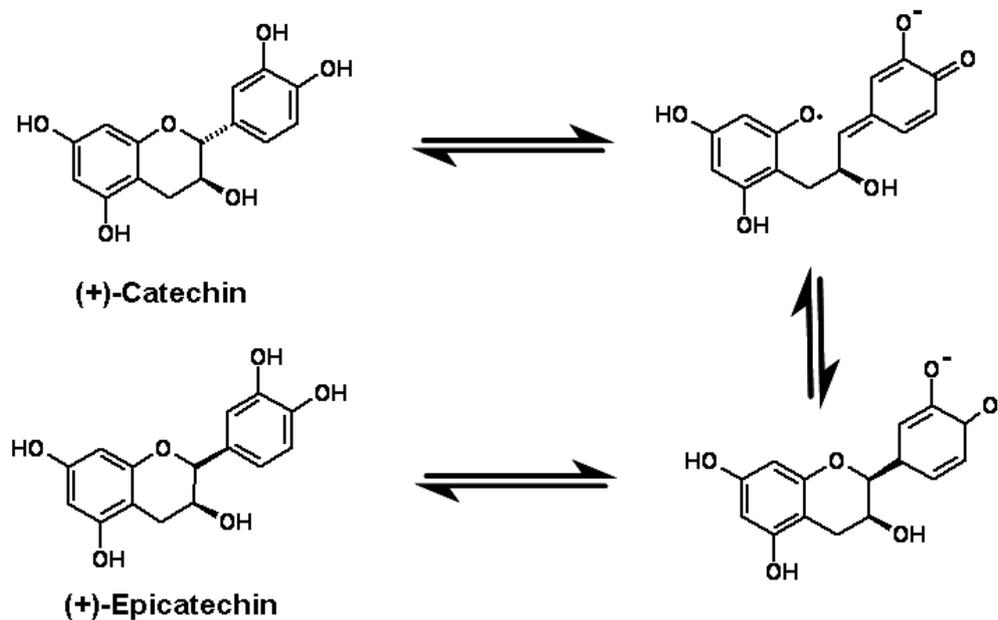


Abbildung 11.12: Mechanismus der Epimerisierungsreaktion am Beispiel von (+)-Catechin in (+)-Epicatechin [26]

Bei der Epimerisierung von (-)-Epicatechin zu (-)-Catechin wird aus der cis-Konfiguration eine trans-Konfiguration. Diese ist energetisch günstiger, da hier der Phenylrest und die Hydroxyl-Gruppe weiter entfernt liegen. Für die Epimerisierung von (-)-Epicatechin zu (-)-Catechin wird demnach eine geringere Aktivierungsenergie benötigt. Im Vergleich zur Epimerisierung von (+)-Catechin ist diese Reaktion also bevorzugt. Bei Versuchen mit Standardsubstanzen konnte gezeigt werden, dass (+)-Catechin im Basischen 2-3-mal langsamer zu (+)-Epicatechin epimerisiert, als (-)-Epicatechin zu (-)-Catechin [51, 52].

Übertragen auf die Bedingungen während der Kakaoverarbeitung bildet sich (+)-Epicatechin also viel langsamer als (-)-Catechin. Dies erklärt, warum in gerösteten Kakaobohnen, in nicht-alkalisierter Kakaomasse und in Schokoladen trotz der eingesetzten Temperaturen nur (-)-Catechin nachgewiesen wurde.

Zusätzlich spielt auch die Zusammensetzung bzw. die Inhaltsstoffe der Kakaobohnen eine wichtige Rolle, die die Epimerisierungsreaktionen sicherlich in gewissem Umfang während der Röstung beeinflussen. Der pH-Wert der fermentierten Kakaobohnen liegt im sauren Bereich und wirkt stabilisierend auf die Flavan-3-ole, was die beschriebenen chemischen Reaktionen verlangsamt. Außerdem wird die ablaufende Epimerisierung durch den Wassergehalt beeinflusst. Zudem ist das enthaltene Fett, das über die Hälfte der Kakaobohnenmasse ausmacht, ein schlechter Wärmeleiter.

Demgegenüber herrschen bei der Alkalisierung der Kakaomasse andere Bedingungen vor. Hierbei sind die Kakaobohnen zu Kakaomasse zermahlen und die Kakaobutter wurde abgepresst, so dass das Kakaopulver nur noch 10-24% Fett enthält (s. Kap. 4.2.5). Hieraus ergibt sich eine verbesserte Wärmeleitfähigkeit des Kakao pulvers. Zusätzlich wird in Folge der vergrößerten Oberfläche die Benetzbarkeit durch das gewählte Alkalisierungsmittel verbessert.

Bestätigt wurden die ermittelten Ergebnisse durch ein Patent von Hammerstone et al., die im Modellversuch den Einfluss von Temperatur und pH-Wert-Veränderung untersuchten, um die Verluste der Epimerisierung der Flavan-3-ole während der Kakaoverarbeitung zu minimieren. Die Analysen wurden mittels chiraler HPLC durchgeführt. Hierbei wurde (+)-Epicatechin weder in gerösteten Kakaobohnen noch in Kakaomas-se gefunden. Es konnte erst in geringen Anteilen in aufgeschlossenem Kakaopulver extrakt nachgewiesen werden [43]. Dies zeigt, dass es erst einer Veränderung der Kakaomatrix und eines erhöhten Energieaufwands bedarf, damit es zu einer Epimerisie-

Die Umwandlung von (+)-Catechin zu (+)-Epicatechin kommen kann. Demgegenüber stehen die Ergebnisse von Williamson et al., die (+)-Epicatechin in geringen Anteilen in verschiedenen Schokoladenproben nachweisen konnten [25]. Zu diesen beiden widersprüchlichen Ergebnissen lässt sich sagen, dass es bei der industriellen Herstellung von Schokoladen mit hohem Kakaoanteil durchaus üblich ist, aus Gründen der Farbvertiefung einen gewissen Anteil an Kakaopulver hinzuzufügen, was den eben genannten Nachweis von (+)-Epicatechin erklären würde. In der genannten Studie wurden keinerlei Angaben über den Kakaoanteil bzw. die Herstellungsart der untersuchten Schokoladen gemacht (s. Kap. 1.6.2).

Bei den durchgeführten Analysen von alkalisiertem Kakaopulver konnte jedoch mittels chiraler CE kein (+)-Epicatechin nachgewiesen werden. Der Grund dafür liegt bei den durchgeführten Messungen am hohen (-)-Epicatechin Anteil der Kakao proben. Das (-)-Epicatechin-Signal überdeckt in seiner Intensität einen viel geringeren (+)-Epicatechin-Anteil (s. Kap. 10). Dadurch konnte auch bei der Vermessung der isolierten Flavan-3-ole aus alkalisiertem Kakaopulver kein (+)-Epicatechin nachgewiesen werden [57].

Ein weiterer Grund ist sicherlich die eingeschränkte Nachweisgrenze des kapillarelektrophoretischen Trennsystems, die aus dem geringen Innendurchmesser der Kapillare und dem damit verbundenen kurzen Lichtweg resultiert (s. Kap. 7) [27].

11.2.4. Ausschluss der Epimerisierung während der Analyse

Wie bereits in Kap. 11.1.1 erläutert, musste zur Verifizierung der Analyse von Kakao und Kakaoerzeugnissen die Epimerisierung der Flavan-3-ole während der Probenaufarbeitung und der CE-Analyse ausgeschlossen werden. Die Analyse der Flavan-3-ole mittels CE wurde bei einem pH-Wert von 8,5 durchgeführt (s. Kap. 10). Die Trennung erfolgte dabei in einer Zeit unter 8 Minuten bei einer Temperatur von 20 °C. Es kommt bei diesen gewählten Trennparametern zu keinerlei Epimerisierung der untersuchten Substanzen.

Probenaufarbeitung

Die Probenaufarbeitung wurde bei Zimmertemperatur durchgeführt. Auf eine Erhöhung der Temperatur konnte aufgrund der gewählten Extraktionsbedingungen verzichtet werden. Ein basischer pH-Wert konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. Die Extraktionslösungen (Methanol/Wasser) und die Proben selber zeigten einen pH-Wert zwischen 5,3 - 7,1. Sie wiesen also einen sauren bis neutralen pH-Wert auf, was die Epimerisierung der Flavan-3-ole verhinderte.

Zusätzlich wurde untersucht, ob es bei der Probenaufarbeitung zu einer Epimerisierung der Flavan-3-ole aufgrund der Einflüsse von Luftsauerstoff und Tageslicht kommt. Um dies zu bestätigen, wurden Versuchsreihen mit Standardlösungen durchgeführt. Diese wurden zur Absicherung teilweise „extremen“ Sauerstoff- und Lichtbedingungen ausgesetzt. (-)-Epicatechin wurde in DMSO gelöst (100 mg/l) und 24 Stunden bei Zimmertemperatur im offenen Becherglas gerührt. Danach wurde die Lösung mittels CE analysiert. Es ließen sich keine Epimerisierungsprodukte nachweisen. Um den Einfluss von Tageslicht ausschließen zu können, wurde eine (-)-Epicatechin-Standardlösung unter normalen Analysenbedingungen dem Laborlicht (Tageslicht und Neonlicht) ausgesetzt und danach mittels CE untersucht. Auch hier fanden sich keine Epimerisierungsprodukte. Zur Absicherung wurde eine zweite (-)-Epicatechin-Standardlösung 24 Stunden lang mit UV-Licht bestrahlt. In dieser Probe ließen sich kleine Anteile von (-)-Catechin nachweisen. Dies zeigt, dass die eingesetzte UV-Strahlung bei längerer Exposition in gewissem Umfang eine Epimerisierung der Flavan-3-ole induziert. Aus diesen Experimenten konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass eine

Epimerisierung der Flavan-3-ol-Enantiomere während der Probenaufbereitung ausgeschlossen werden kann.

11.3. Untersuchung von Apfelsaft

In Apfelsaft ist ebenfalls Catechin und Epicatechin enthalten. Wie Abb. 11.13 zeigt, konnten bei der Untersuchung eines frisch hergestellten Saftes die natürlich vorkommenden Enantiomere (+)-Catechin und (-)-Epicatechin nachgewiesen werden. Abgesichert wurden diese Befunde durch Migrationszeitvergleich und Standardaddition.

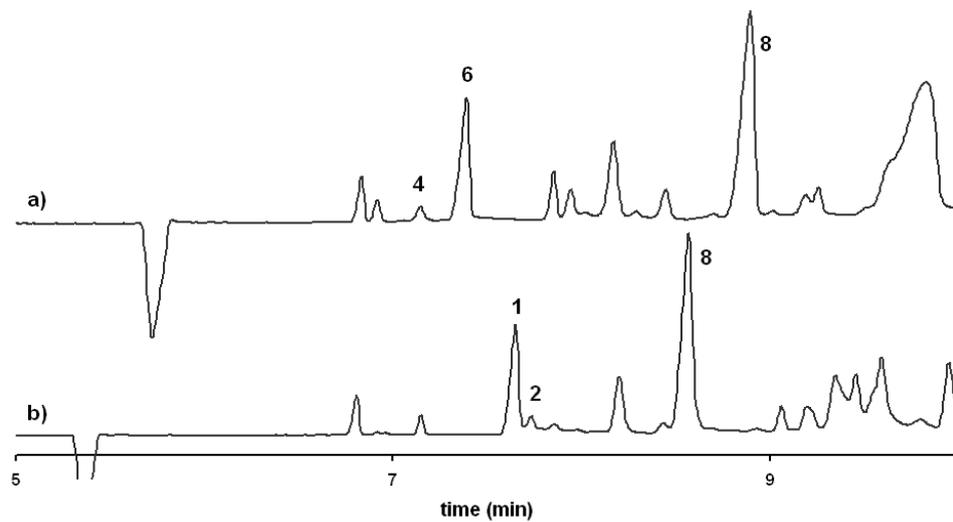


Abbildung 11.13: Untersuchung von Catechin und Epicatechin in frisch hergestelltem Apfelsaft; a) mit und b) ohne chiralen Selektor, 1: Epicatechin, 2: Catechin, 4: (+)-Catechin, 6: (-)-Epicatechin, 8: Chlorogensäure

Aufgrund der Ergebnisse aus der chiralen Untersuchung von Kakao und Kakaoerzeugnissen sollte weiterhin untersucht werden, ob sich auch in flavan-3-ol-haltigen Fruchtsäften die atypischen Flavan-3-ol-Enantiomeren nachweisen lassen. Aus diesem Grund wurden verschiedene Apfelsäfte aus unterschiedlichen Herstellungsverfahren mittels chiraler CE untersucht.

Dabei handelte es sich um Direktsaft, naturtrüben Konzentratsaft und klaren Konzentratsaft. Zum besseren Vergleich wurde auch ein Apfelsaft aus frischen Äpfeln herge-

stellt. Die Proben wurden einer Festphasenextraktion an Polyamid unterzogen und dann mittels der chiralen CE analysiert. Wie Abb. 11.14 zeigt, enthielten alle untersuchten Säfte unterschiedlich hohe Anteile an (+)-Catechin und (-)-Epicatechin. Die Konzentratsäfte zeigten einen geringeren Gehalt als der Direktsaft und der frisch gekelterte Saft. Im trüben Konzentratsaft konnte nicht geklärt werden, ob der Trub aus dem Konzentrat stammt oder erst nach der Rückverdünnung hinzugefügt wurde. Im klaren Konzentratsaft waren die untersuchten Analyten kaum noch nachweisbar, da diese bei der Filtrierung in Folge des Herstellungsprozesses dem Saft entzogen werden. In keinem der untersuchten Säfte waren die atypische Flavan-3-ol-Enantiomere (-)-Catechin und (+)-Epicatechin mittels der enantioselektiven CE nachweisbar. Zur Absicherung wurden die Flavan-3-ol-Enantiomere des trüben Konzentratsaftes stärker an Polyamid angereichert. Auch danach waren mit der entwickelten CE-Methode keine atypischen Enantiomere nachweisbar.

Eine Epimerisierung in unterschiedlich thermisch behandelten Apfelsäften konnte mit der entwickelten CE-Methode trotzdem nicht nachgewiesen werden, da für die Epimerisierung eine vermutlich höhere Energiezufuhr nötig ist. Wie schon bei der Untersuchung von Kakao erläutert (s. Kap. 11.2.2), spielt auch die Lebensmittelmatrix eine wichtige Rolle. Die Flavan-3-ole werden im Apfelsaft durch den sauren pH-Wert stabilisiert, was eine „schnelle“ Epimerisierung verhindert [14].

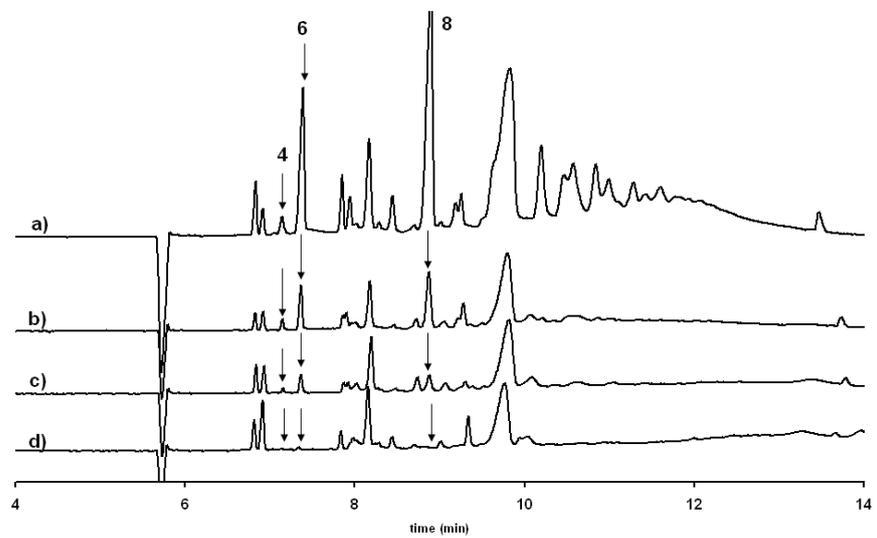


Abbildung 11.14: Untersuchung von Catechin und Epicatechin in Apfelsäften unterschiedlicher Herstellungsverfahren; a) frisch gepresster Apfelsaft, b) Apfeldirektsaft, c) naturtrüber Apfelsaft aus Konzentrat, d) klarer Apfelsaft aus Konzentrat, 4: (+)-Catechin, 6: (-)-Epicatechin, 8: Chlorogensäure

12. Vergleich der Peakflächenverhältnisse

12.1. Indikatoren für Verfälschungsnachweise und technologische Beeinflussung von Lebensmitteln

Eine der Aufgaben in der Lebensmittelchemie ist es, neben dem vorbeugenden Gesundheitsschutz, den Verbraucher beim Kauf von Lebensmitteln vor Betrug und Täuschung zu schützen. Um Verfälschungen von Lebensmitteln nachzuweisen, kann auch die Gruppe der Flavonoide als Bioindikatoren zur Prüfung der Authentizität und der Rückverfolgbarkeit genutzt werden. Hierbei kommen verschiedene Möglichkeiten in Frage:

1. Authentizitätsnachweis über eine Einzelsubstanz

Ist eine Substanz für ein bestimmtes Lebensmittel spezifisch, so kann diese für deren Identifizierung genutzt werden. Beispiele: Die Bestimmung des Flavanon-7-O-glykosids Naringin in Orangensaft dient als Verfälschungsindikator, um einen Zusatz von Grapefruitsaft nachzuweisen [42]. Isoflavone dienen als Indikatorsubstanzen zum Nachweis eines Sojazusatzes in Fleischwaren [70].

2. Authentizitätsnachweis über das ganze Flavonoidspektrum

Die Echtheitsprüfung eines Lebensmittels kann auch über die Bestimmung des Flavonoidspektrums erfolgen, da dieses sehr spezifisch für das jeweilige Lebensmittel sein kann. Man spricht vom sogenannten Flavonoid-Fingerprint [28].

12. Vergleich der Peakflächenverhältnisse

3. Quantitative Bestimmung der Flavonoide

Zusätzlich kann die quantitative Bestimmung eines oder mehrerer Flavonoide zur Echtheitsprüfung eines Lebensmittels herangezogen werden [28].

4. Authentizitätsnachweis über die Peakflächenverhältnisse

Ein vielversprechender und aktueller Ansatz auf diesem Gebiet ist der Authentizitätsnachweis über die Berechnung und den Vergleich der Peakflächenverhältnisse von einzelnen Flavonoiden.

Ein pflanzliches Lebensmittel besitzt ein charakteristisches Flavonoidmuster. Da die Biosynthese der Flavonoide von äußeren Faktoren, wie den herrschenden Witterungs- und Standortbedingungen (Licht, Wasser etc.) abhängt, findet man von Jahr zu Jahr unterschiedlich hohe Gehalte an Flavonoiden. Berechnet man jedoch die Peakflächenverhältnisse der einzelnen Flavonoide zueinander und vergleicht sie von Jahrgang zu Jahrgang, so zeigt sich, dass diese Verhältnisse immer gleich sind. Sie bilden ein konstantes Verhältnis. Auf diese Weise lassen sich pflanzliche Lebensmittel sorten- und sogar herkunftsspezifisch unterscheiden.

Diese Nachweismöglichkeit wurde bereits erfolgreich zur Unterscheidung von ungarischem und spanischem Paprika (*Capsicum annum* L.) genutzt. Weiterhin lassen sich auch verschiedene Provenienzen von Majoran (*Majoranum hortensis* L.) unterscheiden [82]. Durch den Vergleich der Peakflächenverhältnisse von Proanthocyanidinen konnte eine Differenzierung einzelner Gerstensorten unabhängig von Ernte und Jahrgang erreicht werden [111]. In neuen Arbeiten aus dem eigenen Arbeitskreis war es möglich, durch den Vergleich der Peakflächenverhältnisse, Sorten- und Herkunftsunterschiede von Aprikosen nachzuweisen. Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurde auch die Stabilisotopenanalyse herangezogen. Daraus ergeben sich neue Möglichkeiten für die Rohwarenkontrolle bei der industriellen Verarbeitung von Lebensmitteln [101].

5. Nachweis einer technologischen Beeinflussung

Über die Berechnung und den Vergleich der Peakflächenverhältnisse von Flavonoiden ist auch der Nachweis einer technologischen Verarbeitung eines Lebensmittels möglich. Lebensmittel werden, je nach ihrem Verwendungszweck, unterschiedlich stark verarbeitet. Sie werden dabei verschiedenen technologischen Einflüssen, wie beispielsweise Temperatur, Druck oder pH-Wert-Veränder-

12.2. Unterscheidung von Kakao- und Kakaoprodukten anhand der Flavan-3-ole

ung ausgesetzt. Wie die Untersuchungen der Flavan-3-ole in Kakao und Kakaoprodukten zeigten, ist die Kakaobohne bis zum eigentlichen Verzehr, einer Vielzahl von technologischen Einflüssen ausgesetzt.

Es sollte gezeigt werden, ob sich Kakao und Kakaoprodukte aufgrund ihrer Verarbeitung voneinander differenzieren lassen. Dafür wurden die Flavan-3-ol-Enantiomeren in verschiedenen Kakao- und Kakaoproben untersucht, sowie die Peakflächenverhältnisse berechnet und miteinander verglichen.

12.2. Unterscheidung von Kakao- und Kakaoprodukten anhand der Flavan-3-ole

12.2.1. Rohe und geröstete Kakaobohnen

Beim Vergleich der Peakflächenverhältnisse der Flavan-3-ole in rohen, unfermentierten, ungerösteten Kakaobohnen und in gerösteten Kakaobohnen/Nibs wurde aufgrund der Bildung von (-)-Catechin eine Veränderung der Peakflächenverhältnisse festgestellt (s. Tab. 12.1). In rohen, unfermentierten, ungerösteten Kakaobohnen war (-)-Catechin mit der angewendeten CE-Methode nicht nachweisbar. Es lagen ausschließlich (+)-Catechin und (-)-Epicatechin vor (s. Kap.11.2.1). Bei der Analyse der gerösteten Kakaobohnen und der Kakaonibs wurde (-)-Catechin nachgewiesen. Die Peakflächenverhältnisse der Flavan-3-ol-Epimeren zeigten den Einfluss der Rösttemperatur, die die Epimerisierung auslösten. Obwohl die Kakaobohnen von unterschiedlicher

Herkunft und Sorte sind, nehmen die (-)-C/(-)-EC-Verhältnisse ähnliche Werte an. Bei der Untersuchung von Kakaosplittern wurde eine Abweichung beobachtet. Hier konnte ein Verhältnis (-)-C/(-)-EC von 37:63 bestimmt werden. Dieses Verhältnis entspricht eher dem eines Kakaopulvers. Auch der ep.e.-Wert lag bei den Kakaosplittern deutlich niedriger als bei den gerösteten Kakaobohnen (s. Kap. 12.2.3).

12. Vergleich der Peakflächenverhältnisse

Dafür kommen zwei Erklärungen in Frage:

1. Die verwendeten Kakaobohnen wurden stärker geröstet als die anderen untersuchten Kakaobohnen.
2. Die Kakaobohnen oder die daraus hergestellten Splitter wurden noch einer weiteren Behandlung unterzogen. Dies ist sehr wahrscheinlich, da schon Kakaonibs zur Geschmacksverbesserung direkt oder nach der Röstung alkalisch behandelt werden können [4].

Probe	C/EC	(-)-C/(-)-EC	ep.e.-Wert(%)
rohe, unfermentierte	6:94	*	–
Kakaobohnen (Brasilien)			
geröstete Kakaobohnen (Brasilien)	14:86	18:82	64
geröstete Kakaobohnen 1	17:83	18:82	64
geröstete Kakaobohnen 2	14:86	12:88	76
geröstete Kakaobohnen (Nibs)	26:74	19:81	62
Kakaosplitter (Ecuador)	36:63	37:63	26

Tabelle 12.1: Peakflächenverhältnisse von Catechin/Epicatechin, (+/-)-Catechin und (+/-)-Epicatechin und ep.e.-Werte für die enantioselektive Trennung von Catechin und Epicatechin in rohen und gerösteten Kakaobohnen;
*(-)-Catechin nicht nachweisbar

12.2.2. Kakaomassen und Schokoladen

Für die Bestimmung der Flavan-3-ol-Enantiomeren in Kakaomassen und Schokoladen wurden sowohl Kakao-Halbfabrikate (Kakaomassen) als auch kommerziell erhältliche Schokoladenerzeugnisse mit unterschiedlichem Kakaoanteil untersucht (s. Tab. 12.2). Für die meisten Schokoladen wurden im Vergleich zu den gerösteten Kakaobohnen ähnliche Peakflächenverhältnisse ermittelt. Aus den Ergebnissen lässt sich ableiten, dass es durch die bei der Schokoladenherstellung eingesetzten Temperaturen (45-50 °C im Zeitraum 6-72 h) nur zu einer geringen Epimerisierung der Flavan-3-ol-Enantiomeren kommt (s. Kap. 4.2.3). Bei der Untersuchung bestimmter Schokoladensorten konnte jedoch im Vergleich eine Veränderung im Peakflächenverhältnis beobachtet werden. Hierbei wurde eine Verschiebung in Richtung (-)-Catechin beobachtet. Vor allem die Schokoladen mit sehr hohem Kakaoanteil wiesen ein verändertes Peakflächenverhältnis auf. Bei einer Plantagenschokolade mit 100 % Kakaoanteil wurde sogar ein niedriger ep.e.-Wert von 6 ermittelt. Die Epimere (-)-Catechin und (-)-Epicatechin liegen fast in gleichen Anteilen vor. Verglichen mit den anderen untersuchten Schokoladen ist dies sehr ungewöhnlich. Bei der Plantagenschokolade entspricht das Peakflächenverhältnis eher dem eines alkalisierten Kakaopulvers (s. Tab. 12.3). Es ist nicht auszuschließen, dass für deren Herstellung eine stärkere Röstung der Kakaobohnen bzw. eine Röstung der Kakaomasse durchgeführt wurde [4, 13].

Ob eine stärkere Röstung aber wirklich zu einer solchen Verschiebung des Peakflächenverhältnisses von (-)-Catechin/(-)-Epicatechin führt, ist fraglich. Wie schon in Kap. 11.2.3 erwähnt, ist es bei der Produktion von dunkler Schokolade durchaus üblich, aus Gründen der Farbvertiefung, bestimmte Anteile von aufgeschlossenem, also alkalisiertem Kakaopulver, zuzusetzen. Der eingesetzte Anteil von aufgeschlossenem Kakaopulver zur Kakaomasse wäre eine Erklärung für die Verschiebung des (-)-Catechin/(-)-Epicatechin-Verhältnisses in diesen Schokoladen. Bestätigen lässt sich dies, wenn man die Peakflächenverhältnisse dieser Schokoladen mit denen der Schokolade ohne alkalisierte Bestandteile vergleicht. Hier ist ein deutlicher Unterschied zu erkennen. Es kann daher mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass hier ein Zusatz von aufgeschlossenem (alkalisiertem) Kakaopulver zur Kakaomasse erfolgte.

12. Vergleich der Peakflächenverhältnisse

Probe	C/EC	(-)-C/(-)-EC	ep.e.- Wert(%)
Kakaomasse 1 (nicht alkalisiert)	29:71	20:80	60
Kakaomasse 2 (nicht alkalisiert)	22:78	18:82	64
Schokolade (85 % Kakao)	22:78	18:82	64
Schokolade Trinidad (75 % Kakao)	24:76	21:79	58
Schokolade Wilder Kakao (75 % Kakao), Ecuador	26:73	26:74	48
Schokolade (70 % Kakao) ohne alk. Bestandteile	22:78	18:82	64
Schokolade (70 % Kakao) Bitterschokolade	27:73	20:80	60
Schokolade Ecuador (70 % Kakao)	27:73	24:76	52
Schokolade (65 % Kakao)	27:72	27:73	46
Schokolade (60 % Kakao) Bitterschokolade	28:72	21:79	58
Schokolade (60 % Kakao) mit 6 % Kakaokernen	29:71	22:78	56
Vollmilchschokolade 1 (30 % Kakao)	22:78	27:83	66
Vollmilchschokolade 2 (30 % Kakao)	28:72	27:73	46
Plantagenschokolade (62 % Kakao)	28:96	29:71	42
Plantagenschokolade (72 % Kakao)	35:64	35:65	30
Plantagenschokolade (100 % Kakao)	45:52	47:53	6
Schokolade mit Extrakt aus rohen Kakaobohnen (78 % Kakao)	11:86	12:88	76

Tabelle 12.2: Peakflächenverhältnisse von Catechin/Epicatechin, (+/-)-Catechin und (+/-)-Epicatechin und ep.e.-Werte für die enantioselektive Trennung von Catechin und Epicatechin in Kakaomassen und Schokoladen

12.2. Unterscheidung von Kakao- und Kakaoprodukten anhand der Flavan-3-ole

In Deutschland war eine Schokolade erhältlich, die mit einem erhöhten Gehalt an gesundheitsfördernden Substanzen wirbt („reich an Antioxidantien“). Diese Schokolade wird mit einem bestimmten Verfahren hergestellt, bei der ein Großteil der ursprünglich enthaltenen Flavonoide erhalten bleibt. Liegt der Verlust an Polyphenolen bei der üblichen Schokoladenproduktion durch Fermentation und Röstung bei ca. 70-90 %, so konnte hier durch die besondere Wahl der Produktionsbedingungen, von der Ernte der Kakaobohnen bis zur fertigen Schokolade, ein Verlust von nur 20 % erreicht werden [1, 53, 100].

Bei der Untersuchung dieser Schokolade fiel auf, dass ein deutlich erhöhter Anteil an (-)-Epicatechin vorliegt als in anderen Bitterschokoladen mit gleichem Kakaoanteil. Aus dem Zutatenverzeichnis war ersichtlich, dass dieser Schokolade ein Extrakt aus rohen Kakaobohnen zugesetzt wurde. Dies erklärt den hohen Anteil an (-)-Epicatechin. In welchem Prozessschritt dieser Extrakt zugesetzt wird, konnte nicht in Erfahrung gebracht werden. Trotz des hohen Anteils an (-)-Epicatechin wurde in dieser Schokolade auch (-)-Catechin nachgewiesen. Eine Epimerisierung der Flavan-3-ol-Enantiomeren kann also nicht ganz vermieden werden.

Durch diesen erhöhten Anteil ist der berechnete ep.e.-Wert mit dem von gerösteten Kakaobohnen vergleichbar.

12.2.3. Kakaopulver

Die Untersuchung von verschiedenen Kakaopulvern zeigte eine deutliche Erhöhung des (-)-Catechin-Anteils (s. Kap. 11.2.1). Aus den Peakflächenverhältnissen ist ersichtlich, dass sich das Epimerisierungsgleichgewicht mehr auf die Seite des (-)-Catechins verschoben hat (s. Tab. 12.3). Der Vergleich der nicht alkalisierten mit den alkalisierten Kakaopulvern zeigte jedoch eine weitere Veränderung in Richtung (-)-Catechin. Dies ist auf die Einwirkung des basischen pH-Wertes und der erhöhten Temperatur zurückzuführen. In den meisten Fällen liegt (-)-Catechin im Verhältnis über (-)-Epicatechin. Auch in den schwach entölkten Kakaopulverproben konnte so deutlich gezeigt werden, dass sie alkalisiert wurden. Im Vergleich dazu zeigte die chirale Untersuchung eines Bio-Kakaopulvers ein atypisches (-)-C/(-)-EC-Peakflächenverhältnis von 17:83. Dieses Verhältnis zeigt, dass hier das Epimerisierungsgleichgewicht noch stark auf der Seite des (-)-Epicatechins liegt. Aufgrund des Peakflächenverhältnisses könnte man

12. Vergleich der Peakflächenverhältnisse

auf geröstete Kakaobohnen (s. Tab. 12.1) schließen. Daraus lässt sich ableiten, dass dieses Kakaopulver nicht alkalisiert wurde. Es ist vermutlich nur durch das Zermahlen der Kakaobohnen mit anschließendem schonendem Abpressen der Kakaobutter hergestellt worden. Vergleicht man die in Tab. 12.2 und 12.3 aufgeführten Verhältnisse von (-)-Catechin und (-)-Epicatechin zwischen den Schokoladen und den nicht alkalisierten Kakaopulvern, so fällt kaum ein Unterschied auf (s. Kap. 4.2.5). Dies lässt vermuten, dass beim Abpressen der Kakaobutter kaum eine Veränderung der Flavan-3-ol-Enantiomeren stattfindet.

Probe	C/EC	(-)-C/(-)-EC	ep.e.- Wert(%)
Kakaopulver 1 (nicht alkalisiert)	29:71	24:76	52
Kakaopulver 2 (nicht alkalisiert)	35:65	24:76	52
Kakaopulver 3 (nicht alkalisiert)	38:62	25:75	50
Kakaopulver 4 (alkalisiert)	43:57	42:58	16
Kakaopulver 5 (alkalisiert)	61:39	65:35	30
Kakaopulver 6 (schwach entölt)	64:42	61:39	22
Kakaopulver 7 (schwach entölt)	52:48	52:48	4
Bio Kakaopulver	30:70	17:83	66

Tabelle 12.3: Peakflächenverhältnisse von Catechin/Epicatechin, (+/-)-Catechin und (+/-)-Epicatechin und ep.e.-Werte für die enantioselektive Trennung von Catechin und Epicatechin in Kakaopulver

12.2.4. Kakaerzeugnisse

Zusätzlich zu den oben aufgeführten Proben wurden auch Kakaerzeugnisse und Lebensmittel mit einem bestimmten Kakaoanteil analysiert. Hierbei wurden reine Schokoladenerzeugnisse, aber auch Lebensmittel, die Kakaopulver enthielten, untersucht. Wie in Tab. 12.4 aufgeführt, wurden auch hier die Enantiomeren Flavan-3-ole mittels chiraler CE untersucht und die Peakflächenverhältnisse berechnet und verglichen. Dabei konnten die Produkte, wie Blockschokolade und Kakaoglasur aufgrund ihrer Peakflächenverhältnisse den Kakaomassen und Schokoladen zugeordnet werden (vgl. Tab. 12.2). In den anderen Produkten (Schokodessertsosse, Mousse au chocolat-Pulver, lösliches Schokoladenpulver) wurden (-)-C/(-)-EC-Peakflächenverhältnisse bestimmt, die sich alkalisiertem Kakaopulver zuordnen lassen (s. Tab. 12.3).

In diesen Produkten wird aufgeschlossenes, also alkalisiertes Kakaopulver verwendet, da auf diese Weise eine verbesserte Solubilisierbarkeit, eine dunklere Färbung des Produktes und ein entsprechend positives Geschmacksprofil erzielt wird.

Probe	C/EC	(-)-C/(-)-EC	ep.e.-Wert(%)
Blockschokolade (40 % fettarmer Kakao)	18:82	13:87	74
Kakaoglasur (20 % Kakao)	18:82	13:87	74
Mousse au chocolat-Pulver (19 % fettarmer Kakao)	49:51	48:52	4
Schokodessertsosse (7,5 % fettarmer Kakao)	68:32	63:37	26
lösliches Schokoladenpulver (20 % Kakao)	62:38	63:37	26

Tabelle 12.4: Peakflächenverhältnisse von Catechin/Epicatechin, (+/-)-Catechin und (+/-)-Epicatechin und ep.e.-Werte für die enantioselektive Trennung von Catechin und Epicatechin in Kakaerzeugnissen

12.2.5. Röst- und Alkalisierungsversuche

Wie Tab. 12.5 im Vergleich mit Tab. 12.1 zeigt, konnte bei den im Labor durchgeführten Röst- und Alkalisierungsversuchen von unfermentierten, rohen, ungerösteten Kakaobohnen eine deutliche Veränderung der Catechin und Epicatechin-Enantiomeren beobachtet werden. Durch die Einwirkung der Temperatur und der pH-Wert-Verschiebung konnte die Epimerisierung der Flavan-3-ol-Enantiomeren nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass durch die starke Röstung im Laborversuch sich ähnliche Verhältnisse wie bei der Alkalisierung ergaben.

Probe	C/EC	(-)-C/(-)-EC	ep.e.-Wert(%)
rohe, unfermentierte Kakaobohnen (Brasilien)	6:94	–	–
Alkalisierungsversuch	68:32	66:34	32
Röstversuch	62:38	63:36	27

Tabelle 12.5: Peakflächenverhältnisse von Catechin/Epicatechin, (+/-)-Catechin und (+/-)-Epicatechin und ep.e.-Werte für die enantioselektive Trennung von Catechin und Epicatechin der durchgeführten Röst- und Alkalisierungsversuche

Hammerstone et al. konnten in Laborversuchen mit Standardsubstanzen ebenfalls feststellen, dass sich bei der Epimerisierungsreaktion von Catechin und Epicatechin ein Gleichgewicht von ca. 65:35 einstellt [43]. Bei den durchgeführten Röst- und Alkalisierungsversuchen mit rohen Kakaobohnen wurde ein ähnliches Verhältnis nachgewiesen.

12.2.6. Isolierte Flavan-3-ole

Wie schon die Abbildungen in Kap. 11.2 zeigen, wurden in einigen Proben Catechin und Epicatechin isoliert und zur Absicherung der Befunde mittels chiraler CE analysiert. Damit konnte die Comigration von anderen ähnlich migrierenden Substanzen ausgeschlossen werden. Durch den Vergleich der berechneten Peakflächenverhältnisse der Flavan-3-ol-Isolate mit den CE-Messungen der Rohextrakte konnten die ermittelten Ergebnisse abgesichert und bestätigt werden (s. Tab. 13.4).

12.3. Ergebnis

Mit der chiralen Analyse mittels CE ist es möglich, die Flavan-3-ol-Enantiomeren in Kakao und Kakaoerzeugnissen nachzuweisen. Es konnte gezeigt werden, dass diese aufgrund der einzelnen Verarbeitungsschritte epimerisieren. Das Hauptreaktionsprodukt ist dabei (-)-Catechin, das vor allem durch Temperatur- und pH-Wert-Veränderungen entsteht. Zur besseren Interpretation der Ergebnisse wurden anstatt der absoluten Gehalte die Peakflächenverhältnisse der Flavan-3-ol-Enantiomeren berechnet und verglichen. Auch wenn (+)-Epicatechin sich nicht nachweisen ließ, ist durch den Vergleich der Peakflächenverhältnisse von (-)-Catechin/(-)-Epicatechin eine Differenzierung von verschiedenen Zwischen- und Endprodukten, Halbfabrikaten, Schokoladen und kakaohaltigen Erzeugnissen mit einigen Einschränkungen möglich.

12. Vergleich der Peakflächenverhältnisse

Probenisolat	C/EC	(-)-C/(-)-EC	ep.e.-Wert(%)
rohe, unfermentierte Kakaobohnen (Brasilien)	8:92	2:98	96
geröstete Kakaobohnen (Nibs)	25:75	20:80	60
Kakaomasse 1 (nicht alkalisiert)	24:76	21:79	58
Kakaomasse 2 (nicht alkalisiert)	24:76	20:80	60
Schokolade (70 %) ohne alkal. Bestandteile	23:77	18:82	64
Schokolade (78 % Kakao) mit Kakaobohnenextrakt	19:81	13:87	74
Kakaopulver 1 (nicht alkalisiert)	24:76	21:79	58
Kakaopulver 2 (nicht alkalisiert)	32:68	27:73	46
Kakaopulver 3 (nicht alkalisiert)	32:68	29:71	42
Kakaopulver 4 (alkalisiert)	45:55	43:57	14
Kakaopulver 5 (alkalisiert)	69:31	68:32	36
Kakaopulver 6 (schwach entölt)	56:44	56:44	12
Bio Kakao	25:75	19:81	62

Tabelle 12.6: Peakflächenverhältnisse von Catechin/Epicatechin, (+/-)-Catechin und (+/-)-Epicatechin und ep.e.-Werte für die enantioselektive Trennung von Catechin und Epicatechin in den Isolaten aus Kakao und Kakaoerzeugnissen

13. Referenzanalytik für Kakao- und Kakaoprodukte mittels HPLC

13.1. Chirale HPLC

Über die Berechnung und den Vergleich der Peakflächenverhältnisse einzelner Flavan-3-ol-Enantiomeren ist eine Differenzierung verschiedener Kakaoerzeugnisse möglich. Die Absicherung dieser Ergebnisse erfolgte dabei durch die Isolierung aus den einzelnen Extrakten. Zur weiteren Überprüfung der Ergebnisse wurden die Kakaoextrakte sowie deren Isolate mittels HPLC-FLD gemessen. Dafür wurde eine mit HP- β -CD belegte Trennsäule verwendet. Mit dieser Trennsäule gelang zwar eine Trennung der Catechin- jedoch nicht der Epicatechin-Enantiomeren (s. Abb. 13.1. Zur besseren Abschätzung wurden die Peakflächenverhältnisse beider Catechin-Enantiomeren addiert und mit Epicatechin ins Verhältnis gesetzt. Catechin und Epicatechin wurden mittels CE ohne chiralen Selektor in den Proben gemessen, die Peakflächenverhältnisse berechnet und mit den HPLC-Ergebnissen verglichen.

Durch diesen Vergleich konnten die Ergebnisse aus dem vorherigen Kapitel abgesichert werden. Dies zeigte sich sowohl beim Vergleich der rohen, unfermentierten mit den gerösteten Kakaobohnen als auch bei den Kakaomassen und den Schokoladen. So konnte auch hier eine Verschiebung der Peakflächenverhältnisse in Richtung des Catechin beobachtet werden. Innerhalb dieser Einteilung konnten einige Produkte identifiziert werden, die gegenüber den anderen Proben Abweichungen in den Peakflächenverhältnissen zeigten. Hierzu gehörten die Proben Kakaosplitter (Ecuador) (s.Tab. 13.1) und der Plantagenschokolade (100% Kakao) (s.Tab. 13.2). Hier lässt sich über den Vergleich der berechneten Peakflächenverhältnisse erkennen, dass bei der Verarbei-

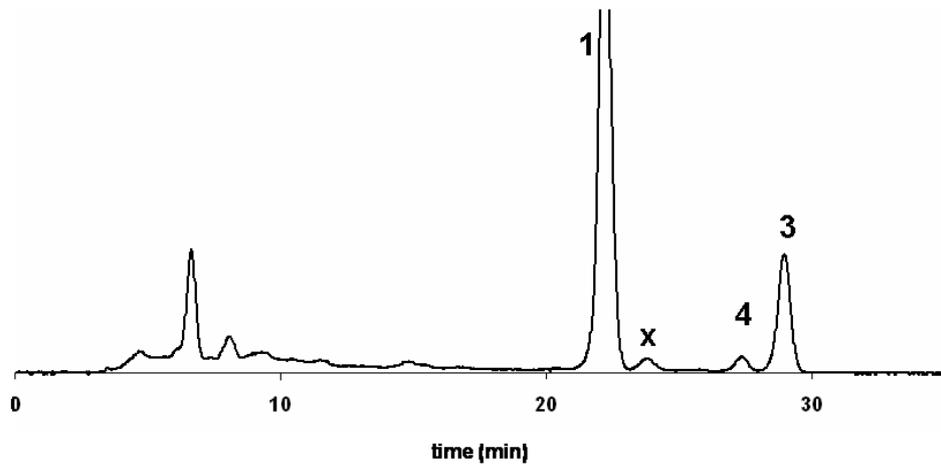


Abbildung 13.1: Enantiomertrennung von Catechin und Epicatechin in einem Extrakt aus Schokolade mittels chiraler HPLC; 1: Epicatechin (nicht-chiral getrennt), 3: (-)-Catechin, 4:(+)-Catechin, x: unbekannte Substanz

tung der Produkte Kakaosplitter und die Plantagenschokolade eine weitere Behandlung der Rohstoffe mit Alkali und/oder Hitze stattgefunden haben muss. Beide Proben haben ein deutlich in Richtung Catechin verschobenes Peakflächenverhältnis. Anders verhält es sich bei den Proben Schokolade mit Kakaobohnenextrakt (78 % Kakao) (s. Tab. 13.2) und Biokakao (s. Tab. 13.3). Hier zeigte der Vergleich der berechneten Peakflächenverhältnisse, dass die Produkte bei der Verarbeitung Bedingungen ausgesetzt waren, die zu keiner starken Epimerisierung der Flavan-3-ole führten. In einigen Proben wurden die monomeren Flavan-3-ole isoliert. Diese Proben wurden ebenfalls mit HPLC vermessen. Damit konnte die Comigration bzw. Coelution ähnlicher Substanzen ausgeschlossen werden. Durch den Vergleich der berechneten Peakflächenverhältnisse der Flavan-3-ol-Isolate mit den CE-Messungen der Rohextrakte konnten die Ergebnisse aus den chiralen CE-Messungen bestätigt werden (s. Tab. 13.5).

13.1.1. Quantitative Abschätzung

Eine Differenzierung der Kakaoerzeugnisse aufgrund der absoluten Gehalte der einzelnen Flavan-3-ol-Enantiomeren war nicht möglich, da weder die Kakaosorte noch die einzelnen Prozessparameter bekannt waren. Dennoch wurde eine semi-quantitative Abschätzung über die chirale HPLC durchgeführt. Es war nicht möglich, Epicatechin, in seine Enantiomeren zu trennen. Da (+)-Epicatechin sich jedoch nur in sehr geringen Anteilen bildete, wurde Epicatechin quantifiziert. Die in Tab. 13.6 dargestellten Durchschnittswerte zeigen wie groß die Schwankungen der Gehalte an Flavan-3-ol-Enantiomeren sind. Die ermittelten Gehalte stimmen jedoch größenordnungsmäßig mit den bisher aus der Literatur bekannten Daten überein [25, 40, 100].

Probe	C/EC (CE)	C/EC (HPLC)
rohe, unfermentierte Kakaobohnen (Brasilien)	6:94	4:96
geröstete Kakaobohnen (Brasilien)	14:86	12:88
geröstete Kakaobohnen 1	17:78	20:80
geröstete Kakaobohnen 2	12:86	15:85
geröstete Kakaobohnen (Nibs)	26:74	22:78
Kakaosplitter (Ecuador)	36:63	40:60

Tabelle 13.1: Vergleich der Peakflächenverhältnisse für Catechin und Epicatechin in rohen und gerösteten Kakaobohnen mittels CE und HPLC

13. Referenzanalytik für Kakao- und Kakaoprodukte mittels HPLC

Probe	C/EC (CE)	C/EC (HPLC)
Kakaomasse 1 (nicht alkalisiert)	29:71	23:77
Kakaomasse 2 (nicht alkalisiert)	22:78	20:80
Schokolade (85 % Kakao)	22:78	19:81
Schokolade Trinidad (75 % Kakao)	24:76	26:74
Schokolade Wilder Kakao (75 % Kakao) Ecuador	26:73	31:69
Schokolade (70 % Kakao) ohne alkalisierte Bestandteile	22:78	20:80
Schokolade (70 % Kakao)	27:73	23:77
Schokolade (70 % Kakao) Bitterschokolade	27:73	28:72
Schokolade (65 % Kakao)	27:72	32:78
Schokolade (60 % Kakao) Bitterschokolade	28:72	24:76
Schokolade (60 %Kakao) mit 6 % Kakaokernen	29:71	25:75
Vollmilchschokolade 1 (30 % Kakao)	22:78	26:74
Vollmilchschokolade 2 (30 % Kakao)	28:72	20:80
Plantagenschokolade (62 % Kakao)	28:96	33:67
Plantagenschokolade (72 % Kakao)	35:64	40:60
Plantagenschokolade (100 % Kakao)	45:52	39:61
Schokolade mit Kakaobohnenextrakt (78 % Kakao)	11:86	15:85

Tabelle 13.2: Vergleich der Peakflächenverhältnisse für Catechin und Epicatechin in Kakao-massen und Schokoladen mittels CE und HPLC

Probe	C/EC (CE)	C/EC (HPLC)
Kakaopulver 1 (nicht alkalisiert)	29:71	24:76
Kakaopulver 2 (nicht alkalisiert)	35:65	34:66
Kakaopulver 3 (nicht alkalisiert)	38:62	32:78
Kakaopulver 4 (alkalisiert)	43:57	45:55
Kakaopulver 5 (alkalisiert)	61:39	68:32
Kakaopulver 6 (schwach entölt)	64:42	68:32
Kakaopulver 7 (schwach entölt)	52:48	63:37
Bio Kakao	30:70	28:72

Tabelle 13.3: Vergleich der Peakflächenverhältnisse für Catechin und Epicatechin in Kakaopulver mittels CE und HPLC

Probe	C/EC (CE)	C/EC (HPLC)
Blockschokolade (40 % fettarmer Kakao)	18:82	16:84
Kakaoglasur (20 % Kakaoanteil)	18:82	17:83
Mousse au chocolat-Pulver (19 % fettarmer Kakao)	49:51	47:53
Schokodessertsosse (7,5 % fettarmer Kakao)	68:32	64:36
lösliches Schokoladengetränk (20 % Kakaoanteil)	62:38	67:33

Tabelle 13.4: Vergleich der Peakflächenverhältnisse für Catechin und Epicatechin in Kakaoerzeugnissen mittels CE und HPLC

13. Referenzanalytik für Kakao- und Kakaoprodukte mittels HPLC

Probenisolat	C/EC (CE)	C/EC (HPLC)
rohe, unfermentierte Kakaobohnen (Brasilien)	8:92	5:95
geröstete Kakaobohnen (Nibs)	25:75	23:77
Kakaomasse 1 (nicht alkalisiert)	24:76	25:75
Kakaomasse 2 (nicht alkalisiert)	24:76	21:79
Schokolade 70 % ohne alkalisierte Bestandteile	23:77	21:79
Schokolade (78 % Kakao) mit Kakaobohnenextrakt	19:81	14:86
Kakaopulver 1 (nicht alkalisiert)	24:76	27:73
Kakaopulver 2 (nicht alkalisiert)	32:68	34:66
Kakaopulver 3 (nicht alkalisiert)	32:68	32:68
Kakaopulver 4 (alkalisiert)	45:55	49:51
Kakaopulver 5 (alkalisiert)	69:31	68:32
Kakaopulver 6 (schwach entölt)	56:44	51:49
Bio Kakao	25:75	23:77

Tabelle 13.5: Vergleich der Peakflächenverhältnisse für Catechin und Epicatechin in Kakao und Kakaoprodukten mittels CE und HPLC in den Flavan-3-ol-Isolaten der jeweiligen Probe

Probe	(+)-C(mg/kg)	(-)-C (mg/kg)	EC (mg/kg)
rohe, unfermentierte, getrocknete Kakaobohnen (n=1)	34	n.n.	2264
geröstete Kakaobohnen (n=3)	40,8 ± 18,4	132 ± 46,0	1032 ± 117
Schokolade 60-80% Kakaoanteil (n=6)	5 ± 4	57,5 ± 49	223 ± 144
Kakaopulver (nicht alkalisiert, n=1)	11	111	420
Kakaopulver (alkalisiert, n=3)	2,7	57 ± 10	75 ± 37

Tabelle 13.6: Quantitative Abschätzung von (+)-Catechin, (-)-Catechin und Epicatechin in Kakao und Kakaoerzeugnissen mittels chiraler HPLC, Gehalte angegeben als Durchschnittswerte; n= Anzahl der untersuchten Proben

14. Atypische Procyanidine

14.1. Enantiomere Procyanidine in Guaraná

Wie in Kap. 11 erläutert, konnten in Guaraná neben den natürlich vorkommenden Flavan-3-ol-Enantiomeren (–)-Epicatechin und (+)-Catechin auch die Enantiomeren (–)-Catechin und (+)-Epicatechin nachgewiesen werden. Dieser Befund legt nahe, dass auch die oligomeren Procyanidine in Guaraná aus atypischen Flavan-3-ol-Enantiomeren aufgebaut sein könnten. Das Vorkommen von Procyanidinen mit atypischen Flavan-3-ol-Enantiomeren als Untereinheiten konnte bereits durch Studien anderer Arbeitsgruppen bestätigt werden [6, 90]. Oligomere Procyanidine sind von Bedeutung, da ihnen wie den Flavan-3-olen positive physiologische Eigenschaften zugesprochen werden. Auch hier spielt die Bioverfügbarkeit der oligomeren Procyanidine eine wichtige Rolle in der gegenwärtigen Forschung. Bisher konnte gezeigt werden, dass aufgrund der Molekülgröße ausschließlich die Di- und Trimeren im Darm absorbiert werden [67, 93]. Außerdem wird diskutiert, ob es im Magen-Darm-Trakt aufgrund der vorherrschenden Bedingungen zu einer Spaltung bzw. Epimerisierung der Procyanidine kommt. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die oligomeren Procyanide hierbei weniger stabil sind als die monomeren Flavan-3-ole [46, 47, 49].

Für die Untersuchungen wurde Procyanidin B₂ ausgewählt, da es von allen Procyanidinen in Guaraná den höchsten Gehalt aufweist. Wie Abb. 14.1 zeigt, ist Procyanidin B₂, ein Dimer, aus zwei (–)-Epicatechin-Untereinheiten aufgebaut ((–)-Epicatechin-(4 α →8)-(–)-Epicatechin). Beide Moleküle sind zwischen dem C-4 des einen Moleküls (T-Einheit genannt) und dem C-8 des anderen Moleküls (B-Einheit genannt) miteinander verknüpft. An dieser Stelle ist am C-4 der T-Einheit ein neues Chiralitätszentrum entstanden. Im Fall von Procyanidin B₂ ist die Bindung zur M-Einheit α -ständig. Somit existieren in Procyanidin B₂ fünf Stereozentren. Es sollte untersucht werden, ob

von Procyanidin B₂ in Guaraná ein oder mehrere Enantiomere existieren. Die einfachste Variante wäre dabei ein Molekül, das aus zwei (–)-Catechin-Einheiten aufgebaut ist. Ob die M-Einheit zur T-Einheit ebenfalls in α -Stellung steht oder β -ständig ist müssen strukturaufklärende Methoden noch zeigen. Bei der Untersuchung wurden modifizierte Cyclodextrine verwendet, die aufgrund ihrer Derivatisierung eine große Kavität aufweisen. Die eingesetzten Selektoren waren Maltosyl- β -CD, Glucosyl- β -CD und SBE- β -CD, da mit diesen CDs sehr gute Trennergebnisse erzielt werden konnten. Dabei wurden unterschiedlich hohe Konzentrationen (0-10 mM) des chiralen Selektors und verschiedene Kombinationen mehrerer Cyclodextrine untereinander getestet. Mit keinem der verwendeten Cyclodextrinen war es jedoch möglich, eine enantioselektive Trennung des isolierten Procyanidins zu erreichen. Das bedeutet, dass es zu keinem Unterschied in den elektrophoretischen Mobilitäten der vorhandenen Enantiomeren kommt, was zu einer Trennung führen würde. Ein weiterer Grund dafür wäre, dass nicht nur zwei, sondern mehrere enantiomere Verbindungen vorliegen, die zu stark um einen Komplexbildung konkurrieren.

14.2. Enantiomere Procyanidine in Kakao

Im Zuge der Kakaoverarbeitung kommt es zu einer Epimerisierungsreaktion der Flavan-3-ol-Enantiomeren. Aufgrund der Einwirkung von Hitze und alkalischem pH-Wert entstehen (–)-Catechin und sehr geringe Mengen an (+)-Epicatechin. Durch den hohen Anteil an Flavonoiden in der Kakaobohne kommt es sicherlich aufgrund der Kakaoverarbeitung zu einer Epimerisierung der oligomeren Procyanidine. Es ist aber auch durchaus möglich, dass sich aufgrund der Röstung bzw. Alkalisierung des Kakaos das Procyanidin in seine monomeren Flavan-3-ole spaltet. Ein gewisser Anteil aus höheren oligomerisierten Procyanidinen, wie den Trimeren, Tetrameren etc. könnte ebenfalls monomere abspalten, die dann epimerisieren. Bei den Procyanidinen ist ein weiteres chirales Zentrum entstanden. In Kakao findet man Procyanidin B₂ und B₅, die beide aus (–)-Epicatechin-Untereinheiten aufgebaut sind, sich aber in ihrer Verknüpfung unterscheiden. Procyanidin B₂ ist $4\alpha \rightarrow 8$ und Procyanidin B₅ $4\alpha \rightarrow 6$ verknüpft [65]. Bei der Epimerisierung von Procyanidin B₂ und B₅ resultieren mehrere Arten der Bildung von Epimeren. Es besteht die Möglichkeit, dass nur eine Flavan-3-ol-Unter-

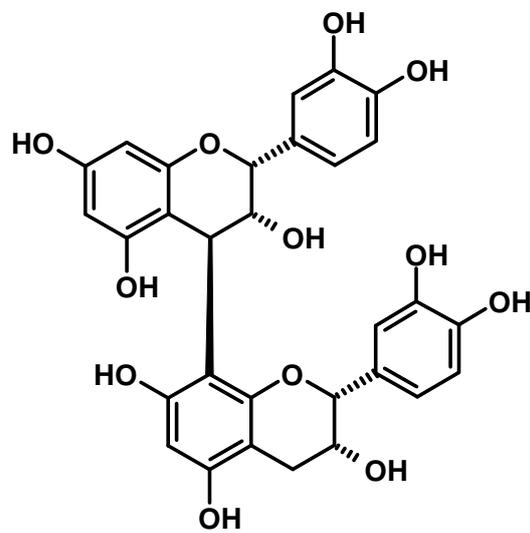


Abbildung 14.1: Procyanidin B₂

einheit epimerisiert oder beide. Aus zwei (-)-Epicatechin-Untereinheiten würden dann zwei (-)-Catechin-Untereinheiten entstehen. Inwieweit das chirale Zentrum an der $4\alpha \rightarrow 8$ - bzw. der $4\alpha \rightarrow 6$ -Verknüpfung ebenfalls epimerisiert, ist nicht bekannt. Zusätzlich spielt auch die räumliche Anordnung der einzelnen Phenylringe eine wichtige Rolle [34].

Um dies zu untersuchen, wurde Procyanidin B₂ aus alkalisiertem Kakaopulver isoliert, mittels nicht-chiraler LC-MS identifiziert und die Isolate für die chirale CE eingesetzt. Dabei kamen die gleichen chiralen Selektoren zum Einsatz wie auch bei der Untersuchung der Procyanidine aus Guaraná (s. oben). Es konnte jedoch keine Trennung in mögliche enantiomere Procyanidine erreicht werden. Dies heißt jedoch nicht, dass Procyanidin B₂ nicht enantiomer vorlag.

15. Prenylflavonoide in Hopfen

15.1. Chirale Untersuchung von Isoxanthohumol

Für die enantioselektive Trennung der Prenylflavonoide wurde auf erste Trennversuche aus dem eigenen Arbeitskreis aufgebaut. Dabei wurden verschiedene native und modifizierte Cyclodextrine in unterschiedlichen Konzentrationen getestet [35]. Die Cyclodextrine wurden in einer Konzentration von 5 und 15 mM dem Hintergrundelektrolyten zugesetzt und auf ihre Selektivität bezüglich Isoxanthohumol untersucht. Für SBE- β -CD wurden aufgrund der schon beschriebenen hohen Selektivität Konzentrationen von 0,1 und 0,5 mM eingesetzt (s. Kap. 10.5.2). Mit SBE- β -CD konnte eine sehr gute Trennung der Isoxanthohumol-Enantiomeren erreicht werden. Andere CDs, wie das HP- γ -CD oder HP- β -CD, zeigten eine viel geringere Effektivität [35].

SBE- β -CD ist ein modifiziertes β -CD, bei dem die OH-Gruppen mit Sulfobutylether-Gruppen derivatisiert sind. Durch diese Derivatisierung kommt es zum einen zu einer Vergrößerung der Kavität des CDs, was es auch großen Molekülen erlaubt, mit dem CD in Wechselwirkung zu treten. Diese Wechselwirkungen werden durch die vorhandenen Sulfobutylether-Gruppen noch ergänzt. Zusätzlich ist SBE- β -CD ab einem pH-Wert > 5 aufgrund der Sulfobutyl-Gruppen mehrfach negativ geladen. Es migriert bei kathodischer Polung gegen den EOF in Richtung der Anode. Dies erklärt die hohe Trenneffizienz von SBE- β -CD. Neutrale Moleküle, die mit dem EOF in Richtung Kathode wandern, treten mit den negativ geladenen CDs in Wechselwirkung. Die Migration der Analytmoleküle in Richtung Detektor wird auf diese Weise verzögert. Hinzu kommt noch die unterschiedlich starke Wechselwirkung bei der Trennung von Enantiomeren. Diese bilden unterschiedlich starke Bindungskonstanten aus. Für die chirale Trennung von Catechin und Epicatechin konnte mit SBE- β -CD keine Trennung aller Enantiomeren erzielt werden. Anders verhält es sich hingegen bei der enantioselektiven

Trennung von Isoxanthohumol.

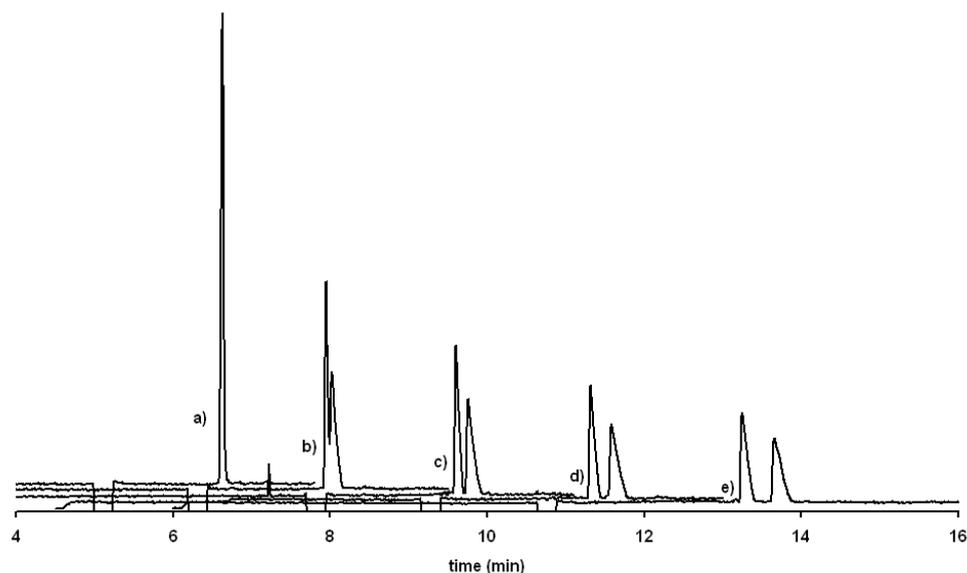


Abbildung 15.1: Chirale Trennung von Isoxanthohumol in Abhängigkeit von der Cyclodextrin-konzentration; a) 0 μM , b) 5 μM , c) 10 μM , d) 20 μM und e) 40 μM SBE- β -CD

Wie aus Abb. 6.1 ersichtlich, besitzen die Prenylflavonoide im Gegensatz zu den Flavan-3-olen keine vicinal-ständigen OH-Gruppen am B-Ring. Es ist nur eine OH-Gruppe in para-Stellung vorhanden. Somit können die Prenylflavonoide nicht mit Borat-Ionen komplexieren. Sie migrieren unter den gewählten CE-Bedingungen mit dem EOF in Richtung Kathode. Dadurch kommt es zu einer besseren Wechselwirkung mit den in entgegengesetzter Richtung migrierenden CD-Molekülen. Hieraus resultiert eine ausreichend große Differenz der Bindungskonstanten, was zu einer Mobilitätsdifferenz der Enantiomeren und letztlich zur Auftrennung im elektrischen Feld führt. Studien zum genauen Komplexbildungsmechanismus von Isoxanthohumol mit SBE- β -CD sind bisher nicht bekannt. Es ist sicherlich möglich, dass, wie schon bei Catechin und Epicatechin erläutert, die OH-Gruppe des B-Ringes in Wechselwirkung mit der Kavität des CDs tritt, während der A-Ring mit der apolaren Prenylgruppe aus diesem herausragt. Bei den Vorversuchen zur chiralen Trennung von Isoxanthohumol fiel auf, dass es bereits durch den Zusatz einer sehr geringen Konzentration an SBE- β -CD zum Hin-

15.1. Chirale Untersuchung von Isoxanthohumol

tergrundelektrolyten zu einer Auftrennung kommt. Diese lag verglichen mit den bisher verwendeten Konzentrationen um eine bzw. zwei Zehnerpotenzen niedriger. Es wurde untersucht, welche Konzentration an CD ausreicht, damit eine Basislinientrennung von Isoxanthohumol erfolgt. Wie in Abb. 15.1 gezeigt, genügte bereits eine Konzentration von 10 μM SBE- β -CD, um eine Basislinientrennung mit einer Auflösung von $R_s \geq 1,23$ für Isoxanthohumol zu erzielen. Der Effekt dieser geringen Konzentration an SBE- β -CD zeigte dessen extrem hohen Selektivitätsgrad.

Die weiteren Trennparameter wurden aus der entwickelten Methode zur chiralen Trennung von Catechin und Epicatechin übernommen. Es zeigte sich, dass durch leichte Senkung des pH-Wertes auf 8,3 und einer Anhebung der Spannung von 18 kV auf 20 kV die Trennung optimiert werden konnte. Wie Tab. 15.1 zeigt, ist aus den gebildeten Peakflächenverhältnissen und e.e.-Werten erkennbar, dass das aus Bier isolierte Isoxanthohumol racemisch vorliegt. Die beobachtete Racemisierung ist vor allem durch die erhöhte Temperatureinwirkung beim Brauprozess zu erklären. Die Reaktion ist nicht enzymatisch beeinflusst.

c(CD) in μM	R_s -Wert	Enantiomeren- Verhältnis Isoxanthohumol	α_{app}	e.e.-Wert
0	–	–	–	–
5	0,76	49:51	1,01	2
10	1,23	51:49	1,02	2
20	1,74	50:50	1,13	0
40	2,29	51:49	1,06	2

Tabelle 15.1: R_s -Werte, Peakflächenverhältnisse, Trennfaktoren und e.e.-Werte bei der enantioselektiven Trennung von Isoxanthohumol mittels CE in Abhängigkeit von der Cyclodextrinkonzentration (c(CD)= 0–40 μM)

15.2. Chirale Untersuchung von 8-Prenylnaringenin

Mit der entwickelten Methode zur chiralen Trennung von Prenylflavonoiden wurde außer Isoxanthohumol auch 8-Prenylnaringenin untersucht.

Wie die Strukturformeln in Abb. 6.1 zeigen, unterscheidet sich 8-Prenylnaringenin von Isoxanthohumol lediglich durch die Hydroxyl-Gruppe am C-5 des A-Ringes. Im Gegensatz zu Isoxanthohumol, das erst im Brauprozess entsteht, ist 8-Prenylnaringenin ein natürlicher Bestandteil von Hopfen. 8-Prenylnaringenin wurde aus Hopfenextrakt isoliert und mittels chiraler CE untersucht. Wie in Abb. 15.2 dargestellt, gelang die Enantiomertrennung von 8-Prenylnaringenin ($R_s \geq 2,30$; $\alpha_{app} = 1,03$).

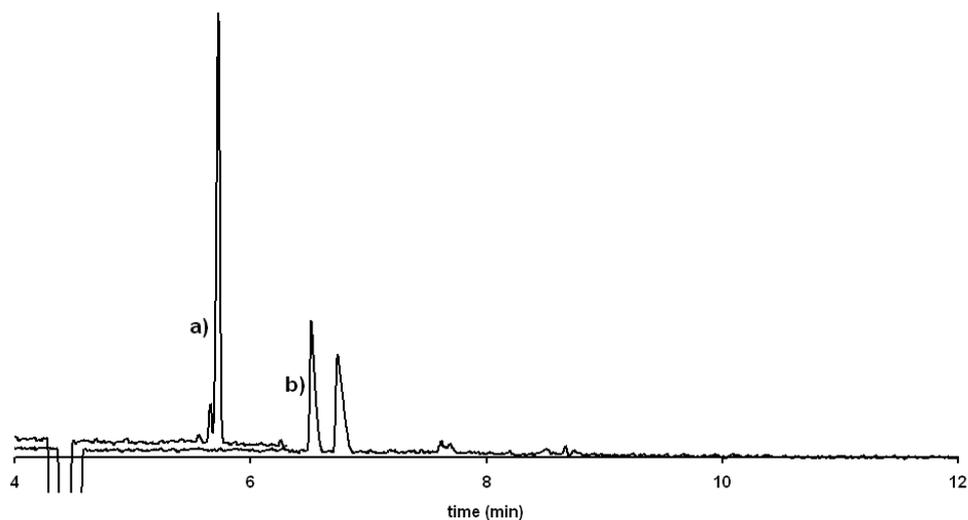


Abbildung 15.2: Chirale Trennung von 8-Prenylnaringenin; a) ohne chiralen Selektor und b) mit 30 μ M SBE- β -CD

Diese enantioselektive Trennung mittels CE konnte erstmals beschrieben werden. Bei der Bildung der Peakflächenverhältnisse und Berechnung der e.e.-Werte konnte gezeigt werden, dass die 8-Prenylnaringenin-Enantiomeren racemisch vorliegen (Peakflächenverhältnis 50:50; e.e. = 0). Die Absicherung der Ergebnisse fand durch

15.2. Chirale Untersuchung von 8-Prenylnaringenin

den Vergleich der erhaltenen Elektropherogramme und UV-Spektren mit den LC-MS Daten statt. Die Migrationsreihenfolge der Isoxanthohumol- und 8-Prenylnaringenin-Enantiomeren konnte nicht geklärt werden, da keine reinen Enantiomere als Standards erhältlich waren.

Die durchgeführten chiralen Trennungen von Isoxanthohumol und 8-Prenylnaringenin mittels enantioselektiver CE wurden mittlerweile durch die Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen bestätigt. Hierbei gelang die chirale Trennung von 8-Prenylnaringenin durch Derivatisierung an einer RP-HPLC und für Isoxanthohumol mittels MEKC [55, 81].

16. Ausblick

Es konnte erstmalig der Nachweis eines natürlichen Vorkommens aller Catechin- und Epicatechin-Enantiomeren in Guaraná erbracht werden. Weitere Forschungsarbeiten sollen folgen, um die bei der Biosynthese beteiligten Enzyme aufzuklären. Von großer Bedeutung ist hierbei auch die Frage nach der Funktion der atypischen Flavan-3-ol-Enantiomere in der Pflanze.

Weiterhin wurde gezeigt, dass in Kakao und Kakaoerzeugnissen neben (-)-Epicatechin und (+)-Catechin auch das atypische Flavan-3-ol-Enantiomer (-)-Catechin vorkommt. Dieses entsteht im Zuge des Herstellungsprozesses durch die Epimerisierung von (-)-Epicatechin. Neue Forschungsvorhaben sollen den genauen Einfluss der einzelnen technologischen Prozessparameter (Temperatur, pH-Wert etc.) klären, die die Epimerisierung während des Kakaoprozesses induzieren. Diese Untersuchungen sollen auch in Abhängigkeit von verschiedenen Kakaosorten durchgeführt werden. Zu diesem technologischen Forschungsaspekt kommt zusätzlich noch die bereits erläuterte eingeschränkte Bioverfügbarkeit von (-)-Catechin gegenüber (+)-Catechin. Über entsprechende Verzehrsstudien und den Einsatz der chiralen Analytik soll die Bioverfügbarkeit der Flavan-3-ol-Enantiomeren in Kakao und Kakaoprodukten aufgeklärt werden. Außerdem ist der Einfluss der Bildung von (-)-Catechin aus der Spaltung der oligomeren Procyanidine in die Untersuchungen mit ein zu beziehen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt wäre die genauere enantioselektive Untersuchung der Procyanidine. Es ist weiterhin unklar, ob diese auch epimerisieren. Hierfür sollen neue chirale Selektoren für die CE eingesetzt werden, sowie der Komplexbildungsmechanismus zwischen CD und den Procyanidinen ermittelt werden.

Abkürzungsverzeichnis

ASE beschleunigte Lösemittlextraktion (*accelerated solvent extraction*)

ASPEC automatisierte Festphasenextraktion (*automated sample preparation with extraction cartridges*)

C Catechin

(+)-C (+)-Catechin

(-)-C (-)-Catechin

CCE chirale Kapillarelektrophorese (*chiral capillary electrophoresis*)

α -CD α -Cyclodextrin

β -CD β -Cyclodextrin

γ -CD γ -Cyclodextrin

CD-Spektrum Circular dichroismus-Spektrum

CE Capillary electrophoresis (*Kapillarelektrophorese*)

CM- β -CD Carboxymethyl- β -Cyclodextrin

DAD Diodenarray-Detektor (*diode array detection*)

d.e. diastereomeric excess (Diastereomerenexcess)

Abkürzungsverzeichnis

DMSO Dimethylsulfoxid

e.e. enantiomeric excess (Enantiomerenexcess)

EC Epicatechin

(+)-EC (+)-Epicatechin

(-)-EC (-)-Epicatechin

EOF elektroosmotischer Fluß

ep.e. epimeric excess (Epimerenexcess)

FLD Fluoreszenzdetektor

G- β -CD Glucosyl- β -Cyclodextrin

HP- γ -CD (2-Hydroxypropyl)- γ -Cyclodextrin

HPLC Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

I.D. Innendurchmesser (*internal diameter*)

M- β -CD 6-O- α -Maltosyl- β -Cyclodextrin

MS Massenspektrometrie

MEKC mizellar elektrokinetische Chromatographie (*micellar electrokinetic chromatography*)

PA Polyamid

p.a. per analysis

RP Umkehrphase (*reversed phase*)

R_s-Wert Peakauflösung (*resolution*)

RSD relative Standardabweichung (*relative standard deviation*)

SBE- β -CD Sulfobutylether- β -Cyclodextrin

SPE Festphasenextraktion (*solid phase extraction*)

UV Ultraviolett

v Volumen

vol% Volumenprozent

Abbildungsverzeichnis

1.1.	Grundstruktur der Flavan-3-ole und monomeren Enantiomere von Catechin und Epicatechin	4
1.2.	Epimerisierungsreaktion von (+)-Catechin	5
1.3.	Epimerisierungsreaktion von (-)-Epicatechin	6
2.1.	Biosynthese der Flavan-3-ole; CHS: Chalkon-Synthase; CHI: Chalkon-Isomerase; F3'H: Flavanoid-3'-Hydroxylase; F3H: Flavanon-3 β -Hydroxylase, DFR: Dihydroflavonol-Reduktase; LDOX: Leukocyanidin-Dioxygenase (Anthocyanidin-Synthase); BAN: BANYULS-Protein oder Anthocyanidin-Reduktase; LAR: Leucoanthocyanidin-Reduktase [91]	12
2.2.	Vorgeschlagerener Mechanismus der Biosynthese der atypischen Flavan-3-ol-Enantiomere; X: unbekanntes Enzym; B: Elektronendonator	14
3.1.	Guaranáfrüchte	18
6.1.	Strukturformeln von Xanthohumol, Isoxanthohumol und 8-Prenylnaringenin	30
7.1.	Aufbau eines kapillarelektrophoretischen Trennsystems	36
7.2.	Querschnitt durch eine fused-silica Kapillare	38
7.3.	Strömungsprofil des EOF bei kathodischer Polung; μ_{Analyt} : Eigenmobilität des Analyten	38
7.4.	Struktur von α -Cyclodextrin	43
7.5.	Struktur von α -CD	43

7.6.	Prinzip der chiralen CE-Trennung; A_R , A_S : Enantiomere Analyten, Cyclo-dextrine schematisch als Kegelstümpfe dargestellt	45
7.7.	Thermodynamisch günstige Struktur des Inklusionskomplexes von (+)-Catechin und β -CD [61]	46
9.1.	MS Spektren (innerhalb des Retentionszeitfenster: 20-35 Min) eines a) Extrakts aus rohen Kakaobohnen und b) aus dem Extrakt isolierte und aufgereinigte Flavan-3-ole	62
9.2.	CD-Spektrum von (-)-Epicatechin	64
9.3.	CD-Spektrum von (+)-Catechin	65
9.4.	CD-Spektrum von (-)-Catechin	65
10.1.	Kapillarelektrophoretische Messung von Catechin und Epicatechin ohne chiralen Selektor und UV-Spektrum der monomeren Flavan-3-ole (190-400 nm, $\lambda_{max} = 280$ nm); 1: Epicatechin, 2: Catechin	72
10.2.	Enantiomerentrennung von Catechin und Epicatechin mit $c(\text{CD}) = 12$ mM HP- γ -CD; 3: (-)-Catechin, 4: (+)-Catechin, 5: (+)-Epicatechin, 6: (-)-Epicatechin	73
10.3.	Schema der chiralen Trennung von Flavan-3-olen mit Cyclodextrinen als chirale Selektoren; μ_{F-B} : Mobilität Flavanol-Borat-Komplex, EOF: elektroosmotischer Fluss, Cyclodextrine dargestellt als Kegelstümpfe	75
10.4.	Chirale Trennung von Catechin und Epicatechin mit M- β -CD ($c(\text{CD}) = 1,0$ mM); 3: (-)-Catechin, 4: (+)-Catechin, 5: (+)-Epicatechin, 6: (-)-Epicatechin	76
10.5.	Chirale Trennung von Catechin und Epicatechin mit G- β -CD ($c(\text{CD}) = 1,0$ mM); 3: (-)-Catechin, 4: (+)-Catechin, 5: (+)-Epicatechin, 6: (-)-Epicatechin	77
10.6.	Chirale Trennung von Catechin und Epicatechin mittels SBE- β -CD ($c(\text{CD}) = 0,5$ mM); 1: Epicatechin (ungetrennt), 3: (-)-Catechin, 4: (+)-Catechin	80
10.7.	Chirale Trennung von Catechin und Epicatechin mittels SBE- β -CD ($c(\text{CD}) = 2,25$ mM); 2: Catechin (ungetrennt), 5: (+)-Epicatechin, 6: (-)-Epicatechin	81

10.8. Versuch der chiralen Trennung von Catechin und Epicatechin durch die Kombination von HP- γ -CD und CM- β -CD; 1: Epicatechin, 2: Catechin . . .	83
10.9. Optimierung der chiralen Trennung von Catechin und Epicatechin mittels CE unter Veränderung des pH-Wertes a) – d)	85
10.10. (–)-Epicatechin-Borat-Komplex	87
10.11. Optimierung der chiralen Trennung von Catechin und Epicatechin unter Veränderung der Konzentration des Hintergrundelektrolyten a) – d)	88
10.12. Optimierte Enantiomerentrennung von Catechin und Epicatechin 3: (–)-Catechin, 4: (+)-Catechin, 5: (+)-Epicatechin, 6: (–)-Epicatechin (s. Kap. 9.1.3)	91
11.1. Untersuchung von wässrigem Guaranásamenextrakt mittels CE ohne chiralen Selektor; 1: Epicatechin, 2: Catechin, 7: Coffein	94
11.2. Enantiomerentrennung von Catechin und Epicatechin in wässrigem Guaranásamenextrakt mit a) M- β -CD und b) HP- γ -CD als chirale Selektoren; 3: (–)-Catechin, 4: (+)-Catechin, 5: (+)-Epicatechin, 6: (–)-Epicatechin, 7: Coffein	95
11.3. Chromatogramme von Guaranásamenextrakt a) vor und b) nach der Isolierung der monomeren Flavan-3-ole aufgenommen bei 280nm; 1: Epicatechin, 2: Catechin, 7: Coffein	98
11.4. Chirale Trennung von Catechin und Epicatechin in isoliertem Guaranásamenextrakt; a) Ohne chiralen Selektor, b) mit HP- γ -CD und c) mit M- β -CD als chirale Selektoren; 1: Epicatechin, 2: Catechin, 3: (–)-Catechin, 4: (+)-Catechin, 5: (+)-Epicatechin, 6: (–)-Epicatechin	99
11.5. Chirale Untersuchung eines SPE-Eluats aus einem guaranáhaltigen Kaugummi; 3: (–)-Catechin, 4: (+)-Catechin, 5: (+)-Epicatechin, 6: (–)-Epicatechin	103
11.6. Enantioselektive Untersuchung von Catechin und Epicatechin a) in einem Extrakt aus unfermentierten, getrockneten, ungerösteten Kakaobohnen und b) aus dem Extrakt isoliert. 4: (+)-Catechin, 6: (–)-Epicatechin, P: Procyanidin B ₂	106

11.7. Enantioselektive Untersuchung von Catechin und Epicatechin a) in einem Extrakt aus gerösteten Kakaobohnen und b) aus dem Extrakt isoliert. 3: (-)-Catechin, 4: (+)-Catechin, 6: (-)-Epicatechin, P: Procyanidin B ₂ . . .	107
11.8. Enantioselektive Untersuchung von Catechin und Epicatechin a) in einem Extrakt aus Bitterschokolade und b) aus dem Extrakt isoliert. 3: (-)-Catechin, 4: (+)-Catechin, 6: (-)-Epicatechin, P: Procyanidin B ₂ . . .	108
11.9. Enantioselektive Untersuchung von Catechin und Epicatechin a) in einem Extrakt aus Kakaopulver und b) aus dem Extrakt isoliert. 3: (-)-Catechin, 4: (+)-Catechin, 6: (-)-Epicatechin, P: Procyanidin B ₂	109
11.10. Chirale Untersuchung von Catechin und Epicatechin nach dem Rösten von rohen Kakaobohnen (2,5 Stunden bei 160 °C); 3: (-)-Catechin, 6: (-)-Epicatechin	111
11.11. Chirale Untersuchung von Catechin und Epicatechin nach der Alkalisierung von rohen Kakaobohnen (pH 8,6, 75 °C, 1 Stunde). 3: (-)-Catechin, 6: (-)-Epicatechin	112
11.12. Mechanismus der Epimerisierungsreaktion am Beispiel von (+)-Catechin in (+)-Epicatechin [26]	113
11.13. Untersuchung von Catechin und Epicatechin in frisch hergestelltem Apfelsaft; a) mit und b) ohne chiralen Selektor, 1: Epicatechin, 2: Catechin, 4: (+)-Catechin, 6: (-)-Epicatechin, 8: Chlorogensäure	118
11.14. Untersuchung von Catechin und Epicatechin in Apfelsäften unterschiedlicher Herstellungsverfahren; a) frisch gepresster Apfelsaft, b) Apfeldirektsaft, c) naturtrüber Apfelsaft aus Konzentrat, d) klarer Apfelsaft aus Konzentrat, 4: (+)-Catechin, 6: (-)-Epicatechin, 8: Chlorogensäure	120
13.1. Enantiomerentrennung von Catechin und Epicatechin in einem Extrakt aus Schokolade mittels chiraler HPLC; 1: Epicatechin (nicht-chiral getrennt), 3: (-)-Catechin, 4:(+)-Catechin, x: unbekannte Substanz	134
14.1. Procyanidin B ₂	143
15.1. Chirale Trennung von Isoxanthohumol in Abhängigkeit von der Cyclodextrinkonzentration; a) 0 μM, b) 5 μM, c) 10 μM, d) 20 μM und e) 40 μM SBE-β-CD	146

15.2. Chirale Trennung von 8-Prenylnaringenin; a) ohne chiralen Selektor und
b) mit 30 μM SBE- β -CD 148

Tabellenverzeichnis

1.1. Flavan-3-ol-Gehalte (in mg/kg) in Lebensmitteln [7]	5
3.1. Inhaltsstoffe von Guaranásamen	20
4.1. Inhaltsstoffe von luftgetrockneten Kakaokernen [14]	22
8.1. Eingesetztes Probenmaterial	49
9.1. Gradientenprogramm chirale HPLC für Flavan-3-ole	54
9.2. Gradientenprogramm Flavan-3-ole	55
9.3. Gradientenprogramm Prenylflavonoide	56
9.4. ASPEC-Sequenz zur Probenaufarbeitung von Fruchtsäften	58
9.5. ASPEC-Sequenz zur Isolierung der Flavan-3-ole aus Guaranáextrakt	59
9.6. Schema der SPE zur Extraktion der Flavan-3-ole aus Kakao und Kakao- erzeugnissen	60
9.7. SPE-Schema zur Isolierung der Flavan-3-ole aus Kakaoextrakt	61
11.1. Peakflächenverhältnisse und e.e.-Werte von (+/-)-Catechin und (+/-)-Epi- catechin bei der enantioselektiven Trennung von Catechin und Epicatechin aus Guaranásamenextrakt	97
11.2. Peakflächenverhältnisse und e.e.-Werte von (+/-)-Catechin und (+/-)- Epicatechin bei der enantioselektiven Trennung von isoliertem Catechin und Epicatechin aus Guaranásamenextrakt	99

11.3. Peakflächenverhältnisse und e.e.-Werte von (+/-)-Catechin und (+/-)-Epicatechin bei der enantioselektiven Trennung von Catechin und Epicatechin aus diversen Guaranáproben	101
12.1. Peakflächenverhältnisse von Catechin/Epicatechin, (+/-)-Catechin und (+/-)-Epicatechin und ep.e.-Werte für die enantioselektive Trennung von Catechin und Epicatechin in rohen und gerösteten Kakaobohnen;*(-)-Catechin nicht nachweisbar	124
12.2. Peakflächenverhältnisse von Catechin/Epicatechin, (+/-)-Catechin und (+/-)-Epicatechin und ep.e.-Werte für die enantioselektive Trennung von Catechin und Epicatechin in Kakaomassen und Schokoladen	126
12.3. Peakflächenverhältnisse von Catechin/Epicatechin, (+/-)-Catechin und (+/-)-Epicatechin und ep.e.-Werte für die enantioselektive Trennung von Catechin und Epicatechin in Kakaopulver	128
12.4. Peakflächenverhältnisse von Catechin/Epicatechin, (+/-)-Catechin und (+/-)-Epicatechin und ep.e.-Werte für die enantioselektive Trennung von Catechin und Epicatechin in Kakaoerzeugnissen	129
12.5. Peakflächenverhältnisse von Catechin/Epicatechin, (+/-)-Catechin und (+/-)-Epicatechin und ep.e.-Werte für die enantioselektive Trennung von Catechin und Epicatechin der durchgeführten Röst- und Alkalisierungsversuche	130
12.6. Peakflächenverhältnisse von Catechin/Epicatechin, (+/-)-Catechin und (+/-)-Epicatechin und ep.e.-Werte für die enantioselektive Trennung von Catechin und Epicatechin in den Isolaten aus Kakao und Kakaoerzeugnissen	132
13.1. Vergleich der Peakflächenverhältnisse für Catechin und Epicatechin in rohen und gerösteten Kakaobohnen mittels CE und HPLC	135
13.2. Vergleich der Peakflächenverhältnisse für Catechin und Epicatechin in Kakaomassen und Schokoladen mittels CE und HPLC	136
13.3. Vergleich der Peakflächenverhältnisse für Catechin und Epicatechin in Kakaopulver mittels CE und HPLC	137
13.4. Vergleich der Peakflächenverhältnisse für Catechin und Epicatechin in Kakaoerzeugnissen mittels CE und HPLC	137

13.5. Vergleich der Peakflächenverhältnisse für Catechin und Epicatechin in Kakao und Kakaoerzeugnissen mittels CE und HPLC in den Flavan-3-ol-Isolaten der jeweiligen Probe 138

13.6. Quantitative Abschätzung von (+)-Catechin, (-)-Catechin und Epicatechin in Kakao und Kakaoerzeugnissen mittels chiraler HPLC, Gehalte angegeben als Durchschnittswerte; n= Anzahl der untersuchten Proben 139

15.1. R_f -Werte, Peakflächenverhältnisse, Trennfaktoren und e.e.-Werte bei der enantioselektiven Trennung von Isoxanthohumol mittels CE in Abhängigkeit von der Cyclodextrinkonzentration ($c(\text{CD}) = 0 - 40 \mu\text{M}$) 147

Tabellenverzeichnis

Literaturverzeichnis

- [1] www.Acticoa.com.
- [2] www.adm.com.
- [3] www.cocoavia.com.
- [4] www.eurococoa.com.
- [5] www.theobroma-cacao.de.
- [6] ANTONELLI-USHIROBIRA, T. ; YAMAGUTHI, E. ; UEMURA, L. ; NAKAMURA, C. ; FILHO, B. ; PRADO, B. ; PALAZZO DE MELLO, J. : Chemical and microbiological study of extract from seed of guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). In: *Lat Americ J Pharm* 26(1) (2007), S. 5–9
- [7] ARTS, I. C. ; VAN DE PUTTE, B. ; HOLLMAN, P. C.: Catechin content of foods commonly consumed in the Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple food and processed food. In: *J Agric Food Chem* 48 (2000), S. 1746–1751
- [8] BABA, S. ; OSAKABE, N. ; NATSUME, M. ; MUTO, Y. ; TAKIZAWA, T. ; JUNJI, T. : In vivo comparison of the bioavailability of (+)-catechin, (–)-epicatechin and their mixture in orally administered rats. In: *Journal of nutrition (JN)* 131 (2001), S. 2885–2891
- [9] BAIS, H. ; VEPACHEDU, R. ; GILROY, S. ; CALLAWAY, R. ; VIVANCO, J. : Allelopathy and exotic plant invasion: from molecule and genes to species interactions. In: *Science* 301 (2003), S. 1377–1380

- [10] BAIS, H. ; WALKER, T. ; KENNAN, A. ; STERMITZ, F. ; VIVANCO, J. : Structure-dependent phytotoxicity of catechins and other flavonoids: Flavonoid conversions by cell-free protein extracts of *Centaurea maculosa* (spotted knapweed) roots. In: *J Agric Food Chem* 51 (2003), S. 897–901
- [11] BAIS, H. ; WALKER, T. ; STERMITZ, F. ; HUFBAUER, R. ; VIVANCO, J. : Enantiomeric-dependent phytotoxic and antimicrobial activity of (+/(-)-catechin. A rhizosecreted racemic mixture from spotted knapweed. In: *Plant Physiol* 128 (2002), S. 1173–1179
- [12] BARTEL, B. ; MATSUDA, P. : Seeing Red. In: *Plant Biol* 299 (2003), S. 352–353
- [13] BECKETT, S. : *The science of chocolate*. Royal Soc of Chemistry: Cambridge, 2000; S. 31-47
- [14] BELITZ, H. ; GROSCH, W. : *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 2002
- [15] BIRCH, A. ; CLARK-LEWIS, J. ; ROBERTSON, A. : Relative and absolute configuration of catechins and epicatechins. In: *J Chem Soc* (1957), S. 3586–3594
- [16] CARLSON, M. ; THOMPSON, R. : Liquid chromatographic determination of methylxanthines and catechins in herbal preparations containing guaraná. In: *J AOAC Int* 81(4) ((1998)), S. 691–701
- [17] CHANKVETADZE, B. ; BLASCHKE, G. : Enantioseparation in capillary electromigration techniques: recent developments and future trends. In: *J Chromatogr A* 906 (2001), S. 309–363
- [18] CHANKVETADZE, B. : *Capillary electrophoresis in chiral analysis*. John Wiley & Sons Ltd.: England, 1997
- [19] CHO, S. ; PARK, P. ; SHIN, H. ; KIM, Y. ; SHIN, D. ; SHIN, E. ; LEE, H. ; LEE, B. ; BAIK, J. ; LEE, T. : (-)-Catechin suppresses expression of Kruppel-like factor 7 and increases expression and secretion of adiponectin protein in 3T3-L1 cells. In: *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292 (2007), S. E1166–E1172

- [20] COOPER, K. ; DONOVAN, J. ; WATERHOUSE, A. ; WILLIAMSON, G. : Cocoa and health: a decade of research. In: *Brit J Nurt* 99 (2007 (ahead of print)), S. 1–11
- [21] COURBAT, P. ; WEITH, A. ; ALBERT, A. ; PELTER, A. : Contribution to the study of the behaviour of catechin in alkaline medium. In: *Helv Chim Acta* 60(5) (1977), S. 1665–1675
- [22] DASHWOOD, R. : Frontiers in polyphenols and cancer prevention. In: *J Nutr* 137 (2007), S. 267S–269S
- [23] DELLE MONACHE, F. ; FERRARI, F. ; POCE-TUCCI, A. ; MARINI-BETTOLO, G. : Catechins with (+)-epi-configuration in nature. In: *Phytochem* 11 (1972), S. 2333–2335
- [24] DELMULLE, L. ; BERGHE, T. ; DE KEUKELEIRE, D. ; VANDENABEELE, P. : Treatment of PC-3 and DU145 prostate cancer cells by prenylflavonoids from hop (*Humulus lupulus L.*) induces a caspase-independent form of cell death. In: *Phytother Res* (ahead of print) (2007)
- [25] DONOVAN, J. L. ; CRESPIY, V. ; OLIVEIRA, M. ; COOPER, K. ; GIBSON, B. ; WILLIAMSON, G. : (+)-Catechin is more bioavailable than (–)-catechin: relevance to the bioavailability of catechin from cocoa. In: *Free Radical Research* 40(10) (2006), S. 1029–1034
- [26] ELLIS, C. ; YEAP FOO, L. ; PORTER, L. : Enantiomerism: A characteristic of the proanthocyanidin chemistry of the Monocotyledonae. In: *Phytochem* 22(2) (1983), S. 483–487
- [27] ENGELHARDT, H. : *Kapillarelektrophorese Methoden und Möglichkeiten*. Friedr. Vieweg & Sohn: Wiesbaden, 1994
- [28] ENGELHARDT, U. ; GALENSA, R. : *Analytik und Bedeutung von Polyphenolen in Lebensmitteln*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1997. – 147–178 S
- [29] ERDMAN, J. ; BALENTINE, D. ; ARAB, L. ; BEECHER, G. ; DWYER, J. ; J, F. ; HARNLY, J. ; HOLLMAN, P. ; KEEN, C. ; MAZZA, G. ; M, M. ; SCALBERT, A. ; VITA, J. ; WILLIAMSON, G. ; BURROWES, J. : Flavonoids and heart health: Proceedings of

- the ILSI North America flavonoids workshop may, 31-june 1, 2005, Washington, DC. In: *J Nutr* 137 (2005), S. 718S–737S
- [30] FISHER, N. D. ; SOROND, F. A. ; HOLLENBERG, N. K.: Cocoa flavanols and brain perfusion. In: *Journal of cardiovascular pharmacology* 47 suppl 2 (2006), S. S210–4
- [31] FORSTER: What is about antioxidative characteristics in hop? In: *Proceedings of the 28th EBC Congress, Budapest, 2001*
- [32] FRAGA, C. ; ACTIS-GORETTA, L. ; OTTAVIANI, J. ; CARRASQUEDO, F. ; LOTITO, S. ; LAZARUS, S. ; SCHMITZ, H. ; KEEN, C. : Regular consumption of flavonoid-rich chocolate can improve oxidant stress in young soccer players. In: *Clin Dev Immunol* 12(1) (2005), S. 7–11
- [33] FRAZIER, R. ; AMES, J. ; NURSTEN, H. : *Capillary electrophoresis for food analysis. Method development*. RSC, 2000
- [34] SAINT-CRICQ DE GAULEJAC, N. ; VIVAS, N. ; DE FREITAS, V. ; BOURGEOIS, G. : The influence of various phenolic compounds on scavenging activity assessed by an enzymatic method. In: *J Sci Food Agric* 79 (1999), S. 1081–1090
- [35] GEL-MORETO, N. : *Enantiomerentrennung von Polyphenolen in Citrus mittels Kapillarelektrophorese (CE) und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)*, University of Bonn, Diss., 2003
- [36] GEL-MORETO, N. ; STREICH, R. ; GALENSA, R. : Chiral separation of six diastereomeric flavanone-7-O-glycosides by capillary electrophoresis and analysis of lemon juice. In: *J Chromatogr A* 925 (2001), S. 279–289
- [37] GEL-MORETO, N. ; STREICH, R. ; GALENSA, R. : Chiral separation of diastereomeric flavanone-7-O-glycosides in *Citrus* by capillary electrophoresis. In: *Electrophoresis* 24 (2003), S. 2716–2722
- [38] GERHÄUSER, C. ; ALT, A. ; KLIMO, K. ; KNAUFT, J. ; FRANK, N. ; BECKER, H. : Isolation and potential cancer chemopreventive activities of phenolic compounds of beer. In: *Phytochem. Rev.* 1 (2002), S. 369–377

- [39] GLOSSMAN-MITNIK, D. ; MENDOZA-WILSON, A. : Theoretical study of the molecular properties and chemical reactivity of (+)-catechin and (-)-epicatechin related to their antioxidant ability. In: *Theochem* 761 (2006), S. 97–106
- [40] GOTTI, R. ; FURLANETTO, S. ; PINZAUTI, S. ; CAVRINI, V. : Analysis of catechins in *Theobroma cacao* beans by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. In: *J Chromatogr A* 1112 (2006), S. 345–352
- [41] GRASSI, D. ; DESIDERI, G. ; GIUSEPPE, C. ; LIPPI, C. ; FERRI, C. ; PAQUALETTI, P. : Cocoa and cardiovascular health: the sweet heart protection. In: *Agro food Industry Hi-Tech* 17 (1. suppl) (2006), S. xiii–xvi
- [42] GREINER, G. ; WALLRAUCH, S. : Naringin als Nachweis für den Zusatz von Grapefruitsaft zu Orangen- und Tangerinensaft. In: *Flüssiges Obst* 12 (1984), S. 626–628
- [43] HAMMERSTONE, J. F. ; ACQUARONE, V. : Heat-processed products having altered monomer profiles and processes for controlling the epimerization of (-)-epicatechin and (+)-catechin in the products / Mars Incorporated, USA. 2007. – Forschungsbericht
- [44] HARNLEY, J. M. ; DOHERTY, R. F. ; BEECHER, G. R. ; HOLDEN, J. M. ; HAYTOWITZ, D. B. ; BHAGWAT, S. ; GEBHARDT, S. : Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables and nuts. In: *J Agric Food Chem* 54 (2006), S. 9966–9977
- [45] HASLAM, E. ; HARBORNE, J. (Hrsg.) ; MARBY, T. (Hrsg.) ; MARBY, H. (Hrsg.): *The flavonoids*. Chapman and Hall: London, 1975. – Chapter 10, S. 550–553 Proanthos S
- [46] HATANO, T. ; MIYATAKE, H. ; NATSUME, M. ; OSAKABE, N. ; TAKIZAWA, T. ; ITO, H. ; YOSHIDA, T. : Proanthocyanidin glycosides and related polyphenols from cocoa liquor and their antioxidant effects. In: *Phytochem* 59 (2002), S. 749–758
- [47] HOLT, R. ; LAZARUS, S. ; SULLARDS, M. ; ZHU, Q. ; SCHRAMM, D. ; HAMMERSTONE, J. ; FRAGA, C. ; SCHMITZ, H. ; KEEN, C. : Procyanindin dimer B2 [epicatechin-(4 β -8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. In: *Am J Nutr* 76 (2002), S. 798–804

- [48] ITO, R. ; YAMAMOTO, A. ; KODAMA, S. ; KATO, K. ; YOSHIMURA, Y. ; MATSUNAGA, A. ; NAKAZAWA, H. : A study on the change of enantiomeric purity of catechins in green tea infusion. In: *Food Chem* 83(4) (2003), S. 563–568
- [49] JACQUES, D. ; OPIE, C. ; PORTER, L. ; HASLAM, E. : Plant proanthocyanidins. Part 4. Biosynthesis of procyanidins and observations on the metabolism of cyanidin in plants. In: *J Chem Soc* 14 (1977), S. 1637–1643
- [50] JULIAN, C. ; MIRANDA, S. ; ZAPATA-TORRES, G. ; MENDIZABAL, F. ; OLEA-AZAR, C. : Studies of inclusion complexes of natural and modified cyclodextrin with (+)-catechin by NMR and molecular modelling. In: *Bioorg Med Chem* 15 (2007), S. 3217–3224
- [51] KENNEDY, J. A. ; MUNRO, M. H. ; POWELL, H. K. J. ; PORTER, L. J. ; YEAP, F. L.: The protonation reactions of catechin, epicatechin and related compounds. In: *Aust J Chem* 37 (1984), S. 885–892
- [52] KIATGRAJAI, P. ; WELLONS, J. ; GOLLOB, L. ; WHITE, J. : Kinetics of epimerization of (+)-catechin and its rearrangement to catechinic acid. In: *J Org Chem* 47(15) (1982), S. 2910–2912
- [53] KIM, H. ; KEENEY, P. : (–)-Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. In: *J Food Sci* 49 (1984), S. 1090–1092
- [54] KODAMA, S. ; YAMAMOTO, A. ; AKINOBU, M. ; YANAI, H. : Direct enantioseparation of catechin and epicatechin in tea drinks by 6-O- α -D-glucosyl- β -cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. In: *Electrophoresis* 25 (2004), S. 2892–2898
- [55] KODAMA, S. ; YAMAMOTO, A. ; SATO, A. ; SUZUKI, K. ; YAMASHITA, T. ; KEMMEI, T. ; TAGA, A. ; HAYAKAWA, K. : Enantioseparation of isoxanthohumol in beer by hydroxypropyl- γ -cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. In: *J Agric Food Chem* 55(16) (2007), S. 6547–52
- [56] KOFINK, M. ; PAPAGIANNOPOULOS, M. ; GALENSA, R. : Identifizierung und chirale Trennung östrogenaktiver Substanzen in Hopfen mittels LC-MS und Kapillarelektrophorese. In: *Lebensmittelchemie* 59 (2005), S. 38

- [57] KOFINK, M. ; PAPAGIANNPOULOS, M. ; GALENSA, R. : (-)-Catechin in cocoa and chocolate: Occurrence and analysis of an atypical flavan-3-ol enantiomer. In: *Molecules* 12 (2007), S. 1274–1288
- [58] KOFINK, M. ; PAPAGIANNPOULOS, M. ; GALENSA, R. : Enantioseparation of catechin and epicatechin in plant food by chiral capillary electrophoresis. In: *Eur Food Res Technol* 225 (2007), S. 569–577
- [59] KOMATSU, Y. ; SUEMATSU, S. ; HISANOBU, Y. ; SAIGO, H. ; MATSUDA, R. ; HARA, K. : Effects of pH and temperature on reaction kinetics of catechins in green tea infusion. In: *Biosci Biotech Biochem* 57(6) (1993), S. 907–910
- [60] KORVER, O. ; CK, W. : Circular dichroism spectra of flavanols. In: *Tetrahedron* 27 (1971), S. 5459–5465
- [61] KRIZ, Z. ; KOCA, J. ; IMBERTY, A. ; CHARLOT, A. ; AUZELY-VELTY, R. : Investigation of the complexation of (+)-catechin by β -cyclodextrin by a combination of NMR, microcalorimetry and molecular modelling techniques. In: *Org Biomol Chem* 1 (2003), S. 2590–2595
- [62] LAMBERT, J. ; YANG, C. : Cancer chemopreventive activity and bioavailability of tea and tea polyphenols. In: *Mutat Res* 523/524 (2003), S. 201–208
- [63] LANGGUTH, S. : *Polyphenole im Kakao und ihre ernährungsphysiologische Bedeutung*, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Diplomarbeit, 2007
- [64] Kap. 26 Species of Paullinia with economic potential In: LLERAS, E. : *Plant Production and Protection series No 26*. FAO, Rome, 1994, S. 223–228
- [65] LOKMAN, K. ; HASLAM, E. ; WILLIAMSON, M. : Structures and conformation of the procyanidin B-2 dimer. In: *Magn Reson Chem* 35 (1997), S. 854–858
- [66] MAJHENIC, L. ; SKERGET, M. ; KNEZ, Z. : Antioxidant and antimicrobial activity of guaraná seed extracts. In: *Food Chem* 104(3) (2007), S. 1258–1268
- [67] MANACH, C. ; WILLIAMSON, G. ; MONRAND, C. ; SCALBERT, A. ; REMESY, C. : Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. In: *Am J Nutr* 81 (2005), S. 230S–42S

- [68] MARX, F. : Analysis of guaraná seeds, 2. Studies on the composition of the tannin fraction. In: *Z Lebensm Unters Forsch* 190 (1990), S. 429–431
- [69] MARX, F. ; FABRICIUS, H. : Zur Analytik von Guaraná ((*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)). In: *Dtsch Lebensm Rundsch* 93(6) (1997), S. 171–174
- [70] MELLENTHIN, O. ; GALENSA, R. : Analysis of Polyphenols Using Capillary Zone Electrophoresis and HPLC: Detection of Soy, Lupin, and Pea Protein in Meat Products. In: *J Agri Food Chem* (1999), S. 594–602
- [71] MILLIGAN, S. ; KALITA, J. ; HEYRICK, A. ; DE COOMAN, L. ; RONG, H. ; DE KEU-KELEIRE, D. : Oestrogenic activity of hop phyto-oestrogen, 8-prenylnaringenin. In: *Reproduction* 123 (2002), S. 235–242
- [72] MORIN P, D. M.: Borate complexation of flavonoid-O-glycosides in capillary electrophoresis: I. Separation of flavonoid-7-O-glycosides differing in their flavonoid aglycone. In: *J Chromatogr* 628 (1993), S. 153–160
- [73] MURPHY, K. ; CHRONOPOULOS, A. ; SINGH, I. ; FRANCIS, M. ; MORIARTY, H. ; PIKE, M. ; TURNER, A. ; MANN, N. ; SINCLAIR, A. : Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cocoa*) inhibit platelet function. In: *Am J Clin Nutr* 77 (2003), S. 146–1473
- [74] NEUKAM, K. ; STAHL, W. ; TRONNIER, H. ; H, S. ; HEINRICH, U. : Consumption of flavanol-rich cocoa actually increases microcirculation in human skin. In: *Eur J Nutr* online (2006)
- [75] NYFELE, F. ; MOSER, U. ; WALTER, P. : Stereospecific effects of (+)- and (-)-catechin on glycogen metabolism in isolated rat hepatocytes. In: *Biochim Biophys acta* 763 (1983), S. 50–57
- [76] OTOBONE, F. ; SANACHES, A. ; NAGAE, R. ; MARTINS, J. ; SELA, V. ; DE MELLO, J. ; AUDI, E. : Effect of lyophilized extracts from guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) on behavioral profiles in rats. In: *Phytother Res* 21(6) (2007), S. 531–535
- [77] PAOLOCCI, F. ; ROBBINS, M. ; MADEO, L. ; MARTENS, S. ; DAMIANI, F. : Ectopic expression of a Basic Helix-Loop-Helix gene transactivates parallel pathways of

- proanthocyanidin biosynthesis. Structure, expression analysis, and genetic control of *Leucoanthocyanidin 4-reductase* and *Anthocyanidin Reductase* genes in *Lotus corniculatus*. In: *Plant Physiol* 143 (2007), S. 504–516
- [78] PAPAGIANNPOULOS, M. : *Optimierung der Extraktion von Polyphenolen mittels Festphasenextraktion*, Universität Bonn, Diss., 2007
- [79] PAPAGIANNPOULOS, M. ; WOLLSEIFEN, H. ; MELLENTIN, A. ; HABER, B. ; GALENSA, R. : Identification and quantification of polyphenols in Carob Fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and derived products by HPLC-UV-ESI/MSⁿ. In: *J Agric Food Chem* 52, (2004), S. 3784–3791
- [80] PAPAGIANNPOULOS, M. ; ZIMMERMANN, B. ; MELLENTIN, A. ; KRAPPE, M. ; MAIO, G. ; GALENSA, R. : On-line coupling of pressurized liquid extraction, solid-phase-extraction and high-performance liquid chromatography for automated analysis of proanthocyanidins in malt. In: *J Chromatogr A* 958 (2002), S. 9–16
- [81] PHILIBIN, C. ; SCHWARTZ, T. : Resolution of diastomeric flavonoid (1S)-(-)-camphanic acid esters via reversed-phase HPLC. In: *Phytochem* 68(8) (2007), S. 1206–1211
- [82] PIERZINA, D. : *HPLC-Bestimmung flavonoider Inhaltsstoffe zum Herkunfts- und Authentizitätsnachweis von Majoran und Gewürzpaprika*, TU Braunschweig, Diss., 1996
- [83] POSSEMIERS, S. ; BOLCA, S. ; GROOTAERT, C. ; HEYERICK, K. ; DHOOGHE, W. ; DE KEUKELEIRE, D. ; RABOT, S. ; VERSTRAETE, W. ; VAN DE WIELE, T. : The Prenylflavonoid Isoxanthohumol from Hops (*Humulus lupulus* L.) is activated into potent phytoestrogen 8-Prenylnaringenin in vitro and in the human intestine. In: *J Nutr* 136 (2006), S. 1862–1867
- [84] SCHMANDKE, H. : Prenylflavonoids in hops and beer-biochemical and biological activities. In: *Ernährungs-Umschau* 53(6) (2006), S. 225–229
- [85] SCRIBA, G. : Selected fundamental aspects of chiral electromigration techniques and their application to pharmaceutical and biomedical analysis. In: *J Pharm Biomed Anal* 27 (2002), S. 373–399

- [86] SLAIDING, I. (Hrsg.) ; WALKER, C. (Hrsg.) ; JUNQUERA, M. (Hrsg.) ; 30 th European Brewery Convention (Veranst.): *Investigation on the unusually high levels of phytoestrogens in dark beer*. Bd. 107/1-107/8. Fachverlag Hans Karl GmbH, 2005
- [87] SOMBRA, L. ; GOMEZ, M. ; OLSINA, R. ; MARTINEZ, L. ; SILVA, M. : Comparative study between capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography in "guaraná"based phytopharmaceuticals. In: *J Pharm Biomed Anal* 36(5) (2004), S. 989–994
- [88] SUBRAMANIAN, G. : *Chiral separation techniques*. Wiley-VCH, 2007
- [89] SZEJTLI, J. ; DAVIES, J. (Hrsg.): *Cyclodextrin technology*. Kluwer Academic Publisher, 1988
- [90] TANIGUCHI, S. ; KURODA, K. ; DOI, K. ; TANABE, M. ; SHIBATA, T. ; YOSHIDA, T. ; HATANO, T. : Revised structures of gambirins A1, A2, B1, and B2 chalcone-flavan dimers from Gambir (*Uncaria gambir* Extract). In: *Chem Pharm Bull* 55 (2007), S. 268–272
- [91] TANNER, G. ; FRANKI, A. S. ; WATSON, J. ; LARKIN, P. ; ASHTON, A. : Proanthocyanidin biosynthesis in plants. In: *J Biol Chem* 34 (2003), S. 31647–31656
- [92] TREUTTER, D. : Significance of flavonoids in plant resistance: a review. In: *Environmental chemistry letters* 4(3) (2006), S. 147–157
- [93] TSANG, C. ; AUGER, C. ; MULLEN, W. ; BORNET, A. ; ROUANET, J.-M. ; CROZIER, A. ; TEISSEDE, P.-L. : The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins following the ingestion of grape seed extract by rats. In: *Brit J Nutr* 94 (2005), S. 170–181
- [94] TSCHESCHNER, H. : *Grundzüge der Lebensmitteltechnik*. 2. Edition. Behr's Verlag, 1996
- [95] TSUCHIYA, H. : Stereospecificity in membrane effects of catechins. In: *Chem Biol Interac* 134 (2001), S. 41–54
- [96] VINSON, J. ; PROCH, J. ; BOSE, P. ; MUCHLER, S. ; TAFFERA, P. ; SHUTA, D. ; SAM-

- MAN, N. ; AGBOR, G. : Chocolate is a powerful ex vivo and in vivo antioxidant, an antiatherosclerotic agent in animal model, and a significant contributor to antioxidants in european and american diets. In: *J Agric Food Chem* 54(21) (2006), S. 8071–8076
- [97] Kap. 31 The chemistry of guaraná: guaraná, Brazil's super-fruit of the caffeinated beverages industry. In: WALKER, T. ; CHAAR, J. ; MEHR, C. ; COLLINS, J. : *Caffeinated beverages, ACS Symposium*. American chemical society, Washington DC, 2000, S. 305–317 S
- [98] WEIR, T. ; BAIS, H. ; VIVANCO, J. : Intraspecific and interspecific interactions by a phytotoxin, (-)-catechin secreted by the roots of *Centaurea maculosa* (spotted knapweed). In: *J Chem Ecol* 29(11) (2003), S. 2397–2412
- [99] WOEFEL, K. ; ROBBINS, R. : Products containing polyphenols. In: *U.S. Patent WO 2007/002883 A1*
- [100] WOLLGAST, J. ; ANKLAM, E. : Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. In: *Food Res Int* 33 (2000), S. 423–447
- [101] WOLLSEIFEN, H. ; BONER, M. ; STRATMANN, A. ; SPRENGER, C. ; FÖRSTEL, H. ; GALENSA, R. : Authentizitätsprüfung von Aprikosen und Aprikosenkonfitüre in Kombination von Polyphenol- und Stabilisotopenanalytik. In: *Lebensmittelchemie* 4 (2007), S. 99–100
- [102] WÄTZIG, H. ; DEGENHARDT, M. ; KUNKEL, A. : Strategies for capillary electrophoresis: Method development and validation for pharmaceutical and biological applications. In: *Electrophoresis* 19, (1998,), S. 2695–2752
- [103] WUNDERLICH, S. ; ZÜRCHER, A. ; BACK, W. : Enrichement of xanthohumol in the brewing process. In: *Mol Nutr Food res* 49(9) (2005), S. 874–81
- [104] XIE, D. ; SHARMA, S. ; PAIVA, N. ; FERREIRA, D. ; DIXON, R. : Role of anthocyanidin reductase encoded by BANYULS in plant flavonoid biosynthesis. In: *Science* 299 (2003), S. 396–399
- [105] XU, J. X. ; YEUNG, S. Y. V. ; QI, C. ; YU, H. ; ZHEN-YU, C. : Comparison of the

- antioxidant activity and bioavailability of tea epicatechins with their epimers. In: *British Journal of Nutrition* 91 (2004), S. 873–881
- [106] YAMAGUTI-SASAKI, E. ; ITO, L. ; CANTELI, V. ; USHIROBIRA, T. ; UEDA-NAKAMURA, T. ; FILHO, B. ; NAKAMURA, C. ; PALAZZO DE MELLO, J. : Antioxidant capacity and in vitro prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*. In: *Molecules* 12 (2007), S. 1950–1963
- [107] YANEZ, J. ; ANDREWS, P. ; DAVIES, N. : Methods of analysis and separation of chiral flavonoids. In: *J Chromatogr B* 848 (2) (2007), S. 159–181
- [108] YANG, J. ; DELLA-FERA, M. ; RAYALAM, S. ; BAILE, C. : Effect of xanthohumol and isoxanthohumol on 3T3-L1 cell apoptosis and adipogenesis. In: *Apoptosis* 12(11) (2007), S. 1953–63
- [109] ZHANG, D. ; QUANTICK, P. ; GRIGOR, J. : Changes in phenolic compounds in Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit during postharvest storage. In: *Postharv Biol Technol* 19 (2000), S. 165–172
- [110] ZIMMERMANN, B. ; FRIEDRICH, W. ; GALENSA, R. : Proanthocyanidine in Braugerste und Malz: Analytik einer Polyphenolklasse mittels ASE, SPE and HPLC-CEAD. In: *Lebensmittelchemie* 55, 158-159, 2001
- [111] ZIMMERMANN, B. ; GALENSA, R. : One for all-all for one: Proof of authenticity and tracing of foods with flavonoids. Analysis of proanthocyanidins in barley and malt. In: *Eur Food Res Technol* 24 (2006), S. 385–393

Danksagung

Die praktischen Arbeiten für die vorliegende Dissertation wurden am IEL, Bereich Lebensmittelchemie I der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn in der Zeit vom August 2003 bis August 2007 unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Rudolf Galensa durchgeführt. Ihm gilt mein besonderer Dank für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, für die hervorragende Betreuung und die Motivation, mich für die Polyphenole und die Kapillarelektrophorese zu begeistern.

Frau Professor Dr. Gabriele König danke ich ganz herzlich für ihr großes Interesse und die Bereitschaft, die Zweitkorrektur meiner Dissertation zu übernehmen. Des Weiteren danke ich Herrn Privat-Dozent Dr. Friedhelm Marx und Herrn Professor Dr. Jörn Piel für ihre Bereitschaft als Mitglieder der Prüfungskommission zu fungieren.

Herrn Dr. Bernd Schartmann von Lindt & Sprüngli Chocoladenfabriken GmbH, Aachen gilt mein besonderer Dank für die Unterstützung mit Kakao- und Schokoladenproben. Herrn Professor Dr. José G. Maia, Department of Chemistry, Federal University of Paá, Belém, Brasilien danke ich für die Bereitstellung der frischen Guaranásamen. Weiterhin danke ich den Firmen Denk Feinchemie GmbH, München für die Bereitstellung von Guaranáextrakt, und NATECO₂, GmbH & Co KG, Wolnzach für die Unterstützung mit Hopfenextrakt. Herrn Professor Dr. Hans-Ulrich Humpf, Institut für Lebensmittelchemie, Universität Münster danke ich für die Unterstützung bei der Messung der CD-Spektren. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Menelaos Papagiannopoulos für seine stetige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung bei den LC-MS-Messungen.

Mein Dank gilt weiterhin vielen Freunden und Kollegen, die für das Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ich danke insbesondere Dr. Nuria Gel-Moreto, Rainer Wollseifen, Sarah Theisen, Dr. Roberta Rodrigues, André Gordon, Silja Langguth, Imke Koch, Jan Haverkamp, Anja Stratmann, Dr. Benno Zimmermann, Christina Ritter, Jörn Wolf und Fabian Bien.

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung und den Ansporn während meiner gesamten naturwissenschaftlichen Ausbildung.