

**Methodenentwicklung
zur enantioselektiven Trennung von
Polyphenolen
in unterschiedlichen Matrices**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Christina Ritter, geb. Steinhart

aus Lörrach

Bonn 2010

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Galensa

2. Gutachter: Prof. Dr. Gabriele König

Tag der Promotion: 15. Februar 2011

Erscheinungsjahr: 2011

Meinen beiden Kindern

Léa Jasmine

und

Nouria Soline

*Sokrates, der alte Greis,
sagte oft in tiefen Sorgen:
"ach, wie viel ist doch verborgen,
was man immer noch nicht weiß."*

von

Wilhelm Busch

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden bereits in folgenden Beiträgen veröffentlicht:

Publikationen

Ritter C, Zimmermann BF, Galensa R 2010. Chiral Separation of (+)/(-)-Catechin From Sulfated and Glucuronidated Metabolites in Human Plasma After Cocoa Consumption; Anal Bioanal Chem 397:723-730

Tagungsbeiträge

Ritter C, Papagiannopoulos M, Galensa R:
Chirale Trennung von Polyphenolen mittels Kapillarelektrophorese und HPLC
Regionaltagung NRW der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Bonn, 5. März 2008
(Vortrag) (Referat in der Lebensmittelchemie)

Ritter C, Papagianopolous M, Galensa R 2008; *Chirale Trennung von Flavanoglykosiden in Zitrusssäften durch Kapillarelektrophorese mit „Sample Stacking“*; 45. Wissenschaftlicher Kongress der DGE, Bonn, 13. - 14. März 2008
(Poster) (Tagungsband)

Ritter C, Galensa R 2009; *Chirale Trennung von (+)/(-)-Catechin und (+)/(-)-Epicatechin mittels CZE und MEKC*; Informationstag "Kapillarelektromigrative Trenntechniken in Chemie, Lebensmittelchemie und Pharmazie" Marburg (Vortrag)

Ritter C, Zimmermann BF, Stehle P*, Galensa R 2009; *Chirale Trennung von (+)/(-)-Catechin in Humanplasma nach Kakaoverzehr*;
38. Deutscher Lebensmittelchemiker Tag in Berlin, 14. – 16. September 2010
(Poster) (Tagungsband)

Kothe L, Ritter C, Galensa R 2010
Welchen Einfluss hat die Röstung auf die Flavanole im Kakao? (Poster)
Regionaltagung NRW der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Münster,
17. März 2010

Gordon A, Ellinger S, Ritter C, Kürten M, Ellinger J, Zur B, Stehle P, F Marx 2010
Einfluss einer Bolusgabe eines polyphenol- und Vitamin C-reichen Fruchtsaftes aus Camu-Camu, Açaí und Anden-Brombeere auf den antioxidativen Status bei gesunden Nichtrauchern (Vortrag)

Regionalverband NRW der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Münster,
17. März 2010

Kothe L, Ritter C, Galensa R 2010

Flavanole und ihre Veränderungen bei der technologischen Verarbeitung zu Kakaoprodukten,

39. Deutscher Lebensmittelchemiker Tag in Stuttgart, 20. – 22. September 2010
(Poster) (Tagungsband)

Danksagung

Die praktischen Arbeiten für die vorliegende Dissertation wurden in der Zeit von April 2007 bis Dezember 2009 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. R. Galensa am IEL – Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften – Bereich Lebensmittelchemie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Galensa danke ich ganz besonders herzlich dafür, dass er mich trotz meiner außergewöhnlichen Lage als Mutter von zwei Kindern in seinen Arbeitskreis aufgenommen und mich bei dieser Arbeit betreut und unterstützt hat. Zudem möchte ich ihm für den mir gelassenen Freiraum hinsichtlich meiner manchmal etwas aufsehenerregenden Versuche danken.

Frau Prof. Dr. Gabriele König danke ich herzlich für ihr Interesse an dieser Arbeit und für die Übernahme des Korreferats.

Des Weiteren danke ich Herrn PD Dr. Marx und Frau PD Dr. van Echten-Deckert für ihre Bereitschaft als Mitglieder der Prüfungskommission zu fungieren.

Insbesondere möchte ich auch Herrn Dr. Weingarz und seinem Team dafür danken, dass sie stets bereit waren, mir Blutproben zu entnehmen. Dem bezüglich möchte ich mich auch noch bei Herrn Dr. Jörg Ellinger bedanken, der sich ebenfalls immer wieder dazu bereit erklärt hat, bei Vorstudien die Blutentnahmen durchzuführen.

Herrn Dr. Benno Zimmermann danke ich für seine Hilfsbereitschaft, das Lesen dieser Arbeit und die konstruktiven Korrekturvorschläge.

Allen meinen Kollegen und Mitarbeitern am Institut möchte ich ganz herzlich danken für das gute und freundliche Arbeitsklima, für die unzähligen Ratschläge und Tipps und für dreieinhalb Jahre gute Zusammenarbeit.

Meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen für ihre Unterstützung und ihr Vertrauen in mich!

Ganz besonders danke ich meinen Kindern Léa Jasmine und Nouria Soline – für alles! Insbesondere danke ich ihnen für ihr Verständnis, dass ihre Mama nicht immer Zuhause sein konnte und ihre Ermutigungen diese Arbeit trotz aller Schwierigkeiten erfolgreich beenden zu können.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis	XIX
Abkürzungsverzeichnis	XXIII
Abstract	XXVII
1. Einleitung	1
1.1. Ziel der Arbeit	1
1.2. Flavan-3-ole	2
1.2.1 Vorkommen	3
1.2.2 Biosynthese	3
1.2.3 Chiralität	6
1.2.4 Epimerisierung	6
1.2.5 Physiologische Eigenschaften	7
1.2.6 Bioverfügbarkeit	7
1.2.7 Metabolismus	8
1.3. Kakao und Kakaerzeugnisse	10
1.3.1 Botanik	10
1.3.2 Inhaltsstoffe	11
1.3.3 Verarbeitung der Kakaofrucht	13
1.4. Flavanone und ihre Glykoside	17
1.4.1 Vorkommen	19
1.4.2 Chiralität	20
1.4.3 Bedeutung in der Lebensmittelchemie	21

1.5	Orangen	22
1.5.1	Botanik	22
1.5.2	Inhaltsstoffe	23
1.5.3	Verarbeitung zu Frisch-, Direkt- und Konzentratsaft	23
1.6	Kapillarelektrophorese	26
1.6.1	Grundlagen der CE	26
1.6.2	Trenntechniken in der CE	31
1.6.2.1	Kapillarzonenelektrophorese (CZE)	31
1.6.2.2	Mizellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC)	32
1.6.2.3	CZE mit „sample stacking“	34
1.6.3	Chirale Analytik mittels CE	36
1.6.3.1	Native Cyclodextrine	37
1.6.3.2	Derivatisierte Cyclodextrine	39
1.6.3.3	Enantiomerentrennung mit Hilfe von Cyclodextrinen	40
1.6.4	Optimierungsparameter in der chiralen Analytik mittels CE	42
1.7	HPLC mit elektrochemischer Detektion	45
1.7.1	Grundlagen der elektrochemischen Detektion	45
1.7.2	Prinzip des coulometrischen Elektrodenarray Detektors	47

2.	Ergebnisse und Diskussion	51
2.1	Methodenentwicklung zur chiralen Trennung von diastereomeren Flavanoglykosiden in Orangensaft mittels CZE und „Sample Stacking“	51
2.1.1	Optimierung der Pufferkonzentration und des pH-Wertes	55
2.1.2	Auswahl und Anpassung der chiralen Selektoren	57
2.1.3	Optimierung des Umpolungsschrittes	60
2.1.4	Weitere Optimierungsparameter	63
2.1.5	Zusammenfassung der optimierten Bedingungen	63
2.1.6	Identifikation der Flavanoglykoside mittels LC-MS und semipräparativer Isolierung der Verbindungen	65
2.1.7	Methodenvalidierung	69
2.2	Entwicklung einer Cyclodextrin-modifizierten MEKC-Methode zur chiralen Trennung von Flavan-3-olen in Kakao und Kakaoprodukten	73
2.2.1	Optimierung der Cyclodextrinkonzentration	74
2.2.2	Einfluss der SDS-Konzentration	77
2.2.3	Weitere Optimierungsparameter	80
2.2.4	Zusammenfassung der optimierten Bedingungen	81
2.2.5	Methodenvalidierung	82
2.2.6	Anwendung der CD-MEKC	85
2.2.7	Vergleich der chiralen CZE mit der CD-MEKC	91
2.2.8	Fazit des Methodenvergleichs	94

2.3	Entwicklung einer chiralen HPLC Methode zur Trennung der Flavan-3-ole in Humanplasma	95
2.3.1	Methodenentwicklung	96
2.3.1.1	Chirale HPLC	96
2.3.1.2	Probenvorbereitung	100
2.3.2	Identifizierung der Flavan-3-ole	112
2.3.3	Quantifizierung	114
2.3.4	Methodenvalidierung	115
2.4	Anwendung der chiralen HPLC im Bereich von Humanstudien	117
2.4.1	Humanplasmagewinnung und Lagerung	117
2.4.2	Einflussfaktor Milch	117
2.4.3	Lagerstabilität der Humanplasmaproben	119
2.4.4	Ein-Personen-Studie <i>[Kakaogenuss]</i>	121
2.4.5	Ein-Personen-Studie <i>[(+)/(-)-Catechin Standard Verzehr]</i>	125
2.4.6	Cross-over Studie mit 12 Probanden	128
3.	Zusammenfassung	133
4.	Ausblick	135

5.	Material und Methoden	137
5.1	Chemikalien und Zubehör	137
5.1.1	Standardsubstanzen	137
5.1.2	Chemikalien für CE Trennpuffer	138
5.1.3	Materialien für die CE	138
5.1.4	Chemikalien für das HPLC-System	139
5.1.5	Materialien für die HPLC	139
5.1.6	Sonstige Materialien und Chemikalien	139
5.2	Analytische Geräte	141
5.2.1	Kapillarelektrophoresesystem	141
5.2.2	HPLC-Systeme	141
5.2.2.1	HPLC mit Coulometrischem Elektrodenarray Detektor	141
5.2.2.2	HPLC für HPLC – MS ⁿ Messungen	142
5.2.2.3	Massenspektrometer	142
5.3	Trennung von diastereomeren Flavanoglykosiden in Orangensäften	143
5.3.1	Orangen und Orangensäfte	143
5.3.2	Probenvorbereitung	143
5.3.3	Optimierte Trennparameter der CE mit „Sample Stacking“	144
5.3.4	Identifizierung mittels LC-MS	145
5.4	Chirale Trennung der monomeren Flavan-3-ole in Kakao und Kakaoprodukten mittels CD-MEKC	147
5.4.1	Kakao und Schokolade	147
5.4.2	Probenvorbereitung	147
5.4.3	Optimierte Trennparameter der CD-MEKC	148

5.5	Chirale HPLC-Trennung der Flavan-3-ole in Humanplasma nach Verzehr eines Kakaogetränks	149
5.5.1	Blut / Humanplasma	149
5.5.2	Zusammensetzung des Kakao- bzw. des (+)/(-)-Catechin Standardgetränks	149
5.5.3	Blutaufbereitung	150
5.5.4	Zusammensetzung der antioxidativen Lösung	150
5.5.5	Herstellung der Enzymlösungen	150
5.5.6	Probenvorbereitung	151
5.5.7	Optimierte Trennparameter der chiralen HPLC	152
6.	Anhang	153
7.	Literaturverzeichnis	175

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	2-Phenylbenzopyrangrundgerüst	2
Abbildung 2	Biosynthese der Flavan-3-ole	5
Abbildung 3	Verarbeitung der Kakaofrucht zu Schokolade und Kakaopulver	14
Abbildung 4	Chemische Struktur des Flavanons 2S-Naringenin	17
Abbildung 5	Flavanon-7-O-glucosid (A); Flavanon-7-O-rutinosid (B) und Flavanon-7-O-neohesperidosid (C)	18
Abbildung 6	Schematische Darstellung der Orangensaftherstellung	24
Abbildung 7	Schematischer Aufbau eines kapillarelektrophoretischen Systems	27
Abbildung 8	Zeta-Potential (ζ -Potential)	29
Abbildung 9	Flußprofile im Vergleich A: parabolisch; B: stempelförmig	30
Abbildung 10	Schematische Darstellung der CZE	32
Abbildung 11	Struktur eines SDS Moleküls	33
Abbildung 12	Schematischer Ablauf der MEKC	34
Abbildung 13	Schematische Darstellung des „Sample Stacking“ Prinzips	35
Abbildung 14	Chemische Struktur des γ -Cyclodextrins	37
Abbildung 15	Toroidale Struktur eines Cyclodextrinmoleküls	38
Abbildung 16	Schematische Darstellung der Enantiomerentrennung aufgrund unterschiedlicher Komplexbildungskonstanten zwischen R- bzw. S-Analyt und Cyclodextrin	41
Abbildung 17	Schematische Darstellung der Enantiomerentrennung aufgrund unterschiedlicher Mobilitäten der S- bzw. R-Cyclodextrin-Komplexe	41

XII | **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 18	Verschiedene Zelltypen elektrochemischer Detektoren. [A] Dünnschichtzellen planar oder röhrenförmig, [B] Wall-Jet-Zelle, [C] Durchflusszelle mit poröser AE	46
Abbildung 19	Elektrochemische Zelle eines coulometrischen Elektrodenarray Detektors, mit vier coulometrischen Elektroden in Reihe	48
Abbildung 20	Elektropherogramm einer Standardlösung aus Hesperidin und Narirutin (0,2 mg/mL) nach der Methode von Gel-Moretó (2003) ohne Injektion von Wasser vor der Probenaufgabe [B] und mit Injektion einer NaCl-Lösung vor der Probenaufgabe [A]	52
Abbildung 21	Elektropherogramm eines frisch gepressten Orangensafts aufgearbeitet und vermessen nach der Methode von Gel-Moretó et al.[59]	53
Abbildung 22	Vergleich der Elektropherogramme mit drei unterschiedlichen Pufferkonzentrationen. 1) Standardlösung (Hesperidin + Narirutin): 100 mM Boratpuffer pH 9,0 (A), 250 mM Boratpuffer pH 9,0 (B) und 400 mM Boratpuffer pH 9,0 (C). 2) Orangensaftprobe: 100 mM Boratpuffer pH 9,0 (a), 250 mM Boratpuffer pH 9,0 (b) und 400 mM Boratpuffer pH 9,0 (c)	56
Abbildung 23	Einfluss des pH-Wertes auf die Trennung der 2(R)-und 2(S)-Diastereomere von Hesperidin und Narirutin. 250 mM Boratpuffer mit pH=8,0 (A); pH=9,0 (B); pH=10,0 (C) und pH=11,0 (D)	57
Abbildung 24	Trennung der 2S-und 2R-Diastereomere von Hesperidin und Narirutin Standards mit unterschiedlichen Konzentrationen an HP- β -CD und CM- β -CD	58
Abbildung 25	Peakauflösung (R_s) der Flavanoglykoside Hesperidin und Narirutin, abhängig von der CD-Konzentration (HP- β -CD und CM- β -CD, Verhältnis 1:1)	59

Abbildung 26	Elektropherogramme einer Orangensaftprobe gemessen mit einem 250 mM Boratpuffer pH=9,0, Fused-Silica-Kapillare mit 40 cm effektive Länge und unterschiedlichen Umkehrspannungen (reverse polarity): 5 kV für 30 sec (A); 10 kV für 30 sec (B); 15 kV für 30 sec (C)	60
Abbildung 27	Elektropherogramme einer Orangensaftprobe gemessen mit einem 250 mM Boratpuffer pH=9,0, einer Fused-Silica-Kapillare mit einer effektive Länge von 40 cm und einer Gesamtlänge von 50 cm, einer Umkehrspannung von 5 kV und verschiedene Zeiten für den Umkehrschritt: 24 sec (A); 42 sec (B), 54 sec (C) und 60 sec (D)	62
Abbildung 28	Elektropherogramme einer Orangensaftprobe gemessen mit der Methode nach Gel-Moretó [59] (A) und der beschriebenen „Sample Stacking“ Methode (B). Die Zuordnung der Diastereomeren des Hesperidins wurde der Dissertation von Gel-Moretó entnommen	64
Abbildung 29	Vergrößerter Ausschnitt aus dem Elektropherogramm der optimierten Trennung von Orangensaft-Flavanonglykosiden	65
Abbildung 30	Identifizierung von Didymin (A), Narirutin-4'-glucosid (B), Hesperidin (C) und Narirutin (D) in Orangensaft durch Vergleich der erhaltenen DAD-UV-Spektren	68
Abbildung 31	chemische Struktur des HP- γ -Cyclodextrins	74
Abbildung 32	Peakauflösung (R_s) der Catechin-Enantiomere, abhängig von der Cyclodextrin-Konzentration (HP- γ -CD)	75
Abbildung 33	(-)-Epicatechin-Boratkomplex	76
Abbildung 34	Elektropherogramme eines Standards aus (+)/(-)-Catechin und (-)-Epicatechin mit unterschiedlichen SDS-Konzentrationen aber konstanter HP- γ -CD-Konzentration (100 mM). (A) 240 mM SDS; (B) 100 mM SDS; (C) 80 mM SDS; (D) 50 mM SDS	78
Abbildung 35	Darstellung der R_s -Werte von (+)/(-)-Catechin (A) und Catechin/Epicatechin (B) in Abhängigkeit der SDS-Konzentration	79

Abbildung 36	Elektropherogramm eines Standardgemisches aus (+)/(-)-Catechin und (-)-Epicatechin analysiert mittels optimierter CD-MEKC (gemessen bei 210 nm)	82
Abbildung 37	Elektropherogramm einer alkalisierten Kakaoprobe (pH 7,7) (gemessen bei 210 nm)	85
Abbildung 38	Kakaoproben gemessen mit CD-MEKC. Nicht alkalisierte Kakao (A); alkalisierte Kakao [pH 7,5] (B); stärker alkalisierte Kakao [pH 7,7] (C). (1)=(-)-Catechin; (2)=(+)-Catechin; (3)=(-)-Epicatechin	86
Abbildung 39	UV-Spektren eines (-)-Catechin Standards (A) und des als (-)-Catechin vermuteten Probenpeaks (B)	88
Abbildung 40	Darstellung der prozentualen Verhältnisse von (-)-EC zu (-)-C aus vier unterschiedlich stark alkalisierten Kakaoproben und einem handelsüblichen Kakao	89
Abbildung 41	Darstellung der prozentualen Verhältnisse von (-)-EC zu (-)-C aus drei Kakaoproben, analysiert mittels chiraler CZE [70] und CD-MEKC	90
Abbildung 42	Vergleich der Peakauflösungen (R_s) zwischen den Enantiomeren (+)/(-)-C und (+)/(-)-EC sowie zwischen den Diastereomeren (+)-C/(+)-EC, in der CZE und der CD-MEKC	91
Abbildung 43	Graphische Darstellung des zusammengesetzt linearen Gradienten zur vollständigen Trennung der Enantiomeren (+)/(-)-Catechin und (+)/(-)-Epicatechin	97
Abbildung 44	HPLC-CEAD Chromatogramm der optimierten chiralen Trennung eines (+)/(-)-Catechin/(-)-Epicatechin-Standardgemisches gemessen auf einer PM- γ -CD-Säule	98
Abbildung 45	HPLC-CEAD Chromatogramme einer nicht alkalisierten Kakaoprobe (A) und einer alkalisierten Kakaoprobe (B)	99
Abbildung 46	HPLC-CEAD Chromatogramm einer Guaranáprobe	100

Abbildung 47	Effekt der β -Glucuronidase Konzentration auf den Gehalt an freiem (+)- und (-)-Catechin (A) und (-)-Epicatechin (B). Verwendet wurde für dieses Experiment Humanplasma, das 2 Stunden nach Kakaoverzehr entnommen wurde	102
Abbildung 48	Bindung des TCA-Moleküls an die Peptidbindungen der Plasmaproteine über Wasserstoffbrückenbindungen	103
Abbildung 49	HPLC-CEAD Chromatogramme aus den Untersuchungen der Plasma Probenaufarbeitung durch direkte Proteinfällung mittels Säure. Proteinfreies Plasma + 250 ng/mL Catechin (a), Proteinfreies Plasma + 250 ng/mL Catechin + DMF (b), Proteinfreies Plasma + 250 ng/mL Catechin + TCA (c), Proteinfreies Plasma + 250 ng/mL Catechin +DMF + TCA (d)	105
Abbildung 50	Darstellung der Wechselwirkung zwischen einem TCA-Molekül und einem nativen Cyclodextrin-Molekül	106
Abbildung 51	Chromatogramm einer Humanplasmaprobe, analysiert über ein nicht chirales HPLC-CEAD System	108
Abbildung 52	Nicht chirale HPLC-CEAD Chromatogramme einer mit (+)/(-)-Catechin und (-)-Epicatechin dotierten Plasmaprobe, nach SPE-Aufarbeitung mit unterschiedlichen Aceton/H ₂ O Mischungen als Elutionsmittel [3 mL]. Aceton/H ₂ O (10/90; v+v) (a), Aceton/H ₂ O (30/70; v+v) (b), Aceton/H ₂ O (50/50; v+v) (c), Aceton/H ₂ O (70/30; v+v) (d), Aceton/H ₂ O (100/0; v+v) (e)	109
Abbildung 53	Darstellung der fraktionierten SPE-Aufarbeitung über eine Polyamid-Phase mittels Aceton / H ₂ O/ Essigsäure (70/29,8/0,2; v+v+v) als Eluent. Waschschrift mit 1000 μ L Eluent, Elution in 200 μ L bzw. 500 μ L Schritten	110
Abbildung 54	HPLC-CEAD Chromatogramme (nicht chirales System) nach SPE-Aufarbeitung mit einer Aceton/H ₂ O Mischungen (70/3; v+v) als Elutionsmittel und einer Aceton/H ₂ O/Essigsäure-Mischung (70/29,8/0,2; v+v+v) als Elutionsmittel	111
Abbildung 55	Voltamogramme der Catechin Enantiomere: (+)-Catechin in einer Standardlösung (A), (-)-Catechin-Standard (B), (+)-Catechin in einer Humanplasmaprobe (C) und (-)-Catechin in einer Humanplasmaprobe nach Verzehr eines Kakaogetränks (D)	113

XVI | **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 56	Voltamogramm des (–)-Epicatechins: (–)-Epiatechin-Standard (B) und (–)-Epicatechin in einer Humanplasmaprobe (A) nach Verzehr eines Kakaogetränks	114
Abbildung 57	Vergleich der einzelnen Peakflächen von (–)-Epicatechin, (+)-Catechin und (–)-Catechin nach Konsumieren eines Kakaogetränks gelöst in Wasser und nach Konsumieren eines Kakaogetränks gelöst in Vollmilch	118
Abbildung 58	Darstellung der Lagerstabilität von (+) und (–)-Catechin, der Summe aus (+)- und (–)-Catechin und (–)-Epicatechin gemessen über einen Zeitraum von vier Wochen	120
Abbildung 59	Darstellung des Konzentrationsverlaufs der monomeren Flavan-3-ole im Humanplasma über einen Zeitraum von 6 Stunden	121
Abbildung 60	HPLC-CEAD Chromatogramme von Humanplasmaproben nach enzymatischer Behandlung mit Sulfatase und β -Glucuronidase, analysiert mittels chiraler HPLC. Plasma nach 12 Stunden Fasten T_0 (unterschiedliche Studientage a,b) (A); Plasma 2 Stunden nach Kakaogenuss T_2 (B)	122
Abbildung 61	HPLC-CEAD Chromatogramm des zum Verzehr verwendeten Kakaopulvers [Aufarbeitung nur für monomere Catechine]	123
Abbildung 62	HPLC-CEAD Chromatogramm einer Plasmaprobe 2 Stunden nach Kakaogabe, ohne enzymatische Hydrolyse	124
Abbildung 63	HPLC-CEAD Chromatogramme eines (+)/(–)-Catechin-Standards (A) sowie einer Plasmaprobe 2 Stunden nach Verzehr einer Standardlösung nach enzymatischer Behandlung (B)	126
Abbildung 64	Darstellung des Konzentrationsverlaufs von (–)-Epicatechin im Humanplasma über einen Zeitraum von 6 Stunden bei vier ausgewählten Probanden (Proband 1,6,7 und 8), die nicht alkalisierten Kakao konsumiert haben	128

Abbildung 65	Darstellung des Konzentrationsverlaufs von (–)-Epicatechin im Humanplasma über einen Zeitraum von 6 Stunden bei zwei ausgewählten Probanden (Proband 3 und 6), die sowohl nicht alkalisierten Kakao als auch alkalisierten Kakao konsumiert haben	129
Abbildung 66	Darstellung des (–)-Epicatechin, (+)- und (–)-Catechin Plasmaspiegels bei allen 12 Probanden nach Verzehr eines identischen Kakaogetränkes aus alkalisiertem Kakao (logarithmische Darstellung)	130
Abbildung 67	HPLC-CEAD Chromatogramme der Humanplasmaproben von zwei Probanden (Proband 3, Proband 12) nach Verzehr unterschiedlicher Kakaogetränke. Nicht alkalisierter gerösteter Kakao (A) und alkalisierter gerösteter Kakao (B)	131
<hr/>		
Abbildung I Anh	Kakaofrucht am Kakaobaum (A) Kauliflori = Blüten sitzen direkt am Stamm (B)	153
Abbildung II Anh	UV-Spektren der in Orangen nachgewiesenen Flavanonglykoside	159
Abbildung III Anh	HPLC-CEAD Chromatogramme der chiralen Trennung eines (+)/(–)-Catechin und (–)-Epicatechin Standardgemisches (c = 250 ng/mL) gelöst in DMF (A) und eines (+)/(–)-Catechin und (–)-Epicatechin Standardgemisches dotiert in proteinfreies Humanplasma (B)	163
Abbildung IV Anh	HPLC-CEAD Chromatogramm der chiralen Trennung eines (+)/(–)-Catechin und (–)-Epicatechin Standardgemisches dotiert in Humanplasma (c = 250 ng/mL), gemessen über eine β-CD-Säule unter Einsatz eines linearen Gradienten	164
Abbildung V Anh	HPLC-CEAD Chromatogramme der chiralen Trennung eines (+)/(–)-Catechin und (–)-Epicatechin Standardgemisches (c = 250 ng/mL) unter isokratischen HPLC Bedingungen (10% Eluent B) mit unterschiedlichen stationären Phasen: permethyliertes-γ-Cyclodextrin (PM-γ-CD) (A), natives β-Cyclodextrin (β-CD) (B)	165

Abbildung VI Anh	HPLC-CEAD Chromatogramme der chiralen Trennung eines (+)/(-)-Catechin und (-)-Epicatechin Standardgemisches (c = 250 ng/mL) gemessen auf einer PM- γ -CD-Säule unter isokratischen Bedingungen mit unterschiedlichen Acetonitrilanteilen	166
Abbildung VII Anh	HPLC-CEAD Chromatogramme der chiralen Trennung eines (+)/(-)-Catechin und (-)-Epicatechin Standardgemisches (c = 250 ng/mL) gemessen auf einer PM- γ -CD-Säule unter Verwendung linearer Gradienten mit unterschiedlicher Steigung	167
Abbildung VIII Anh	HPLC-CEAD Chromatogramm der chiralen Trennung eines (+)/(-)-Catechin und (-)-Epicatechin Standardgemisches (c = 250 ng/mL) gemessen auf einer PM- γ -CD-Säule unter Verwendung eines zusammengesetzten Gradienten (Tabelle VII Anh)	169
Abbildung IX Anh	HPLC-CEAD Chromatogramm der chiralen Trennung eines (+)/(-)-Catechin und (-)-Epicatechin Standardgemisches (c = 250 ng/mL) gemessen auf einer PM- γ -CD-Säule unter Verwendung eines Gradienten (Tabelle VIII Anh)	170
Abbildung X Anh	Effekt der Sulfatase-Konzentration auf den Gehalt an freiem (+)- und (-)-Catechin (A) sowie auf den Gehalt an freiem (-)-Epicatechin (B)	171
Abbildung XI Anh	Konzentrationsverlauf von (+)/(-)-Catechin in Humanplasma über einen Zeitraum von 6 Stunden bei allen 12 Probanden der Cross-over Studie	172

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Überblick über die Inhaltsstoffe der Kakaobohne nach Fermentation. Kakaosorte: Forastero (Konsumkakao)	11
Tabelle 2	Überblick über die in der Kakaobohne enthaltenen polyphenolischen Verbindungen. Kakaosorte: meist Forastero oder keine Angaben	12
Tabelle 3	Cyclodextrinderivate und ihre Eigenschaften	39
Tabelle 4	Auswahl des Puffersystems in Abhängigkeit des pH-Wertes	43
Tabelle 5	Vergleich von amperometrischem und coulometrischem Detektor	45
Tabelle 6	Ausgangsbedingungen für die Methodenentwicklung zur chiralen Trennung von Flavanoglykosiden mittels CE mit „Sample Stacking“	54
Tabelle 7	Trennleistung (R_s) und Trennfaktor (α_{app}), berechnet für die Flavanoglykoside Hesperidin und Narirutin, in Abhängigkeit der Cyclodextrin-Konzentrationen von HP- β -CD und CM- β -CD	59
Tabelle 8	Analytische Bedingungen der entwickelten Methode zur chiralen Trennung von diastereomeren Flavanoglykosiden mittels CE mit „Sample Stacking“	64
Tabelle 9	LC-MS Identifizierung der in Orangen gefundenen Flavanoglykosiden	66
Tabelle 10	Nachweisgrenze (NG) und Bestimmungsgrenze (BG) von Flavanonen	69
Tabelle 11	Reproduzierbarkeit der Methode über zwei Wochen mit jeweils drei Tagen Messpause dazwischen (inter-Day). Berechnet als relative Standardabweichung der Migrationszeiten (t_{min}) und korrigierten Peakflächen (A_{corr})	70

Tabelle 12	Reproduzierbarkeit der Methode während eines Tages (intra-Day). Berechnet als relative Standardabweichung der Migrationszeiten (t_{\min}) und korrigierten Peakflächen (A_{corr})	70
Tabelle 13	Ausgangsbedingungen für die Methodenentwicklung zur chiralen Trennung von Flavan-3-olen mittels CD-modifizierter MEKC	73
Tabelle 14	Trennleistung (R_s) und Trennfaktor (α_{app}) berechnet für die Catechin-Enantiomere, in Abhängigkeit der Cyclodextrin-Konzentrationen (HP- γ -CD)	75
Tabelle 15	Optimierte Bedingungen der Methode zur chiralen Trennung von (+)/(-)-Catechin und (+)/(-)-Epicatechin mittels CD-modifizierter MEKC	81
Tabelle 16	NG und BG von (+)/(-)-Catechin nach dem DIN 32645 Verfahren	83
Tabelle 17	Reproduzierbarkeit der Methode während eines Tages (intra-Day). Berechnet als relative Standardabweichung der Migrationszeiten (t_{\min}) und korrigierten Peakflächen (A_{corr})	83
Tabelle 18	Reproduzierbarkeit der Methode über mehrere Tage (inter-Day). Berechnet als relative Standardabweichung der Migrationszeiten (t_{\min}) und korrigierten Peakflächen (A_{corr})	84
Tabelle 19	Peakflächenverhältnisse (-)-EC zu (-)-C von vier unterschiedlich stark alkalisierten Kakaoproben und einer handelsüblichen Kakaoprobe	88
Tabelle 20	Gegenüberstellung der Migrationszeiten von (-)-C, (+)-C, (+)-EC, (-)-EC bei CZE und CD-MEKC	92
Tabelle 21	Vergleich der Validierungsparameter: Reproduzierbarkeit von (+)-C und (-)-EC, Nachweisgrenze (NG) und Bestimmungsgrenze (BG)	93
Tabelle 22	Gegenüberstellung der Vor- und Nachteile der, zur chiralen Trennung von Flavan-3-olen entwickelten Methoden (CZE/CD-MEKC)	94

Tabelle 23	HPLC-Bedingungen des zusammengesetzt linearen Gradienten für eine vollständige chirale Trennung von (+)/(-)-Catechin und (-)-Epicatechin	98
Tabelle 24	Validierungsparameter der chiralen HPLC-CEAD Methode: Nachweisgrenze (NG), Bestimmungsgrenze (BG), relative Standardabweichung (R.S.D), Wiederfindung (WF) und relative Standardabweichung der Wiederfindung (R.S.D. WF)	115
Tabelle 25	Eingesetztes Probenmaterial für die Methodenentwicklung der Diastereomerentrennung von Flavanonglykosiden in Orangensaft	143
Tabelle 26	SPE-Methode zur Aufarbeitung von Orangensäften und anderen Zitrusssäften	143
Tabelle 27	Trennparameter der chiralen Trennung der Flavanonglykoside mittels CE mit „Sample stacking“	144
Tabelle 28	Gradientenprogramm zur Trennung und Identifizierung der Flavanonglykoside in Orangensaft	145
Tabelle 29	eingesetztes Probenmaterial für die Methodenentwicklung der chiralen Trennung von (+)/(-)-Catechin und (+)/(-)-Epicatechin in Kakao und kakaohaltigen Produkten	147
Tabelle 30	SPE-Methode zur Aufarbeitung von Kakao und kakaohaltigen Produkten	148
Tabelle 31	Trennparameter der chiralen Trennung der Flavan-3-ole mittels CD-MEKC	148
Tabelle 32	Probenmaterial für die Methodenentwicklung der chiralen Trennung von (+)/(-)-Catechin und (+)/(-)-Epicatechin in Humanplasma nach Genuss eines Kakaogetränks	149
Tabelle 33	Angaben über die Zusammensetzung des konsumierten Kakaogetränks bzw. der konsumierten Standardlösung	149

Tabelle 34	SPE-Methode zur Aufarbeitung von Humanplasmaproben	151
Tabelle 35	Gradientenprogramm der chiralen HPLC zur Trennung von Flavan-3-olen in Humanplasma	152

Tabelle I Anh	Inhaltsstoffe der Orange	154
Tabelle II Anh	Übersicht über untersuchte phenolische Verbindungen mittels CEAD	155
Tabelle III Anh	In Orangen nachgewiesene Flavanoglykoside und mögliche Nachweismethoden	158
Tabelle IV Anh	Überblick über die wichtigsten Gruppen chiraler Selektoren und ihr Anwendungsbereich	161
Tabelle V Anh	Überblick über die wichtigsten chiralen stationären Phasen in der HPLC, ihr Trennmechanismus und ihr Anwendungsbereich	162
Tabelle VI Anh	Bedingungen eines linearen Gradienten zur chiralen Trennung von (+)/(-)-Catechin und (+)/(-)-Epicatechin auf einer β -CD-Säule	164
Tabelle VII Anh	Peakauflösung (R_s) und Trennfaktor (α) berechnet für die chirale Trennung von (+)/(-)-Catechin und (-)-Epicatechin bei unterschiedlichen linearen Gradienten mit divergierender Steigung	168
Tabelle VIII Anh	Bedingungen eines Gradienten zur Verbesserung der chiralen Trennung von (+)/(-)-Catechin und (-)-Epicatechin	168
Tabelle IX Anh	Bedingungen eines zweiten Gradienten zur Verbesserung der chiralen Trennung von (+)/(-)-Catechin und (-)-Epicatechin	169

Abkürzungsverzeichnis

α_{app}	Trennfaktor
Ac-CD	Acetylcyclodextrin
A_{corr}	korrigierte Peakfläche
AE	Arbeitselektrode
BG	Bestimmungsgrenze
BGE	Hintergrundelektrolyt
C	Catechin
(+)-C	(+)-Catechin
(-)-C	(-)-Catechin
CD	Cyclodextrin
CD-MEKC	Cyclodextrin-modifizierte mizellare Elektrokinetische Chromatographie
CE	Kapillarelektrophorese (<i>capillary electrophoresis</i>)
CEAD	Coulometrischer Elektroden Array Detektor
CG	Catechingallat
CHI	Chalkonisomerase
CHS	Chalkonsynthase
CM- β -CD	Carboxymethyl-beta-Cyclodextrin
CMC	Kritische mizellare Konzentration (<i>critical micelle concentration</i>)
CZE	Kapillarzonenelektrophorese (<i>capillary zone electrophoresis</i>)
DAD	Diodenarray-Detektor
DFR	Dihydroflavonol-4-Reduktase
DMF	Dimethylformamid
EC	Epicatechin
(+)-EC	(+)-Epicatechin

XXIV | Abkürzungsverzeichnis

(-)-EC	(-)-Epicatechin
EGCG	Epigallocatechingallat
EGC	Epigallocatechin
ECG	Epicatechingallat
EOF	Elektroosmotischer Fluss
HE	Hilfselektrode
HP-CD	Hydroxypropylcyclodextrin
HP- β -CD	Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin
HP- γ -CD	Hydroxypropyl-gamma-Cyclodextrin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HESP	Hesperidin
I.D.	Innendurchmesser
K_R, K_S	Bindungskonstante
K_C	Stabilitätskonstante
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KV	Kilovolt
LAR	Leukoanthocyanidinreduktase
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie
LDOX	Leukocyanidin-Dioxygenase
L_{eff}	effektive Länge
L_{ges}	gesamte Länge
MCT- β -CD	Monochlortriazethyl-beta-Cyclodextrin
Me-CD	Methylcyclodextrin
MEKC	Mizellare elektrokinetische Chromatographie (<i>micellar electrokinetic chromatography</i>)
μ l	Mikroliter

µm	Mikrometer
mM	millimolar
mV	Millivolt
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
nA	Nanoampere
NARU	Narirutin
NG	Nachweisgrenze
ng	Nanogramm
NKV	Nährwertkennzeichnungsverordnung
nl	Nanoliter
OH-Gruppe	Hydroxylgruppe
PA	Polyamid
PM-γ-CD	permethyliertes-gamma-Cyclodextrin
RE	Referenzelektrode
RP	Umkehrphase (<i>reversed Phase</i>)
RSD	Relative Standardabweichung
R _s -Wert	Peakauflösung (resolution)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPE	Festphasenextraktion (solid phase extraction)
TAc-CD	Triacetylcyclodextrin
t _{min}	Migrationszeit
U	Spannung
UV/VIS	Ultraviolett/visible (sichtbar)

Abstract

New methods for the chiral separation of polyphenols in different matrices by capillary electrophoresis (CE) as well as by high performance liquid chromatography (HPLC) were developed.

The methods are not limited to foodstuffs; they also cover biological matrices.

Human plasma after consumption of cocoa was analysed to detect (+)/(-)-catechin and (+)/(-)-epicatechin. For the chiral analysis of the flavan-3-ols in human plasma, a HPLC-CEAD-System (HPLC with coulometric electrode array detector) was used.

The CEAD is highly sensitive and is able to detect polyphenols in concentrations of a few ng/mL.

Using a permethylated- γ -cyclodextrin HPLC-Column, a chiral HPLC method was developed for the flavan-3-ol enantiomeres catechin and epicatechin. After a suitable sample preparation method for human plasma with enzymatic hydrolysis of the glucuronidated and sulfated metabolites, it was possible to separate the monomeric flavan-3-ols.

This method shows high recovery, good reproducibility and low limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ). In a self-experiment, it could be noticed that both enantiomeres of catechin were absorbed from human organism.

Two further methods were developed:

1. a new method for chiral separation of flavanoglycosides in citrus juice by CE with "sample stacking". Thereby, it was possible to chirally separate four flavanoglycosides (hesperidin, didymin, narirutin and narirutin-4'-glycoside) in orange juice.

2. a cyclodextrin modified micellar electrokinetic chromatography method (CD-MEKC) to chirally separate flavan-3-ols in cocoa and cocoa products. The CD-MEKC was compared to an already existing CZE Method [Kofink M. 2009] for chiral separation of (+)/(-)-catechin and (+)/(-)-epicatechin. Both methods provide the same results but the CD-MEKC method shows better resolution.

1. Einleitung

1.1 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Methoden zur chiralen Trennung von Polyphenolen sowohl mittels Kapillarelektrophorese (CE) als auch mittels HPLC zu entwickeln. Es wurden verschiedene Lebensmittelmatrizes und Humanplasma untersucht. Im Humanplasma sollten die monomeren Flavan-3-ole (+)/(-)-Catechin und (+)/(-)-Epicatechin nach Verzehr von Kakao chiral nachgewiesen werden.

Da es bislang noch keine Literatur über chirale Trennungen von Flavan-3-olen in Humanplasma gibt, leistet diese Arbeit einen Beitrag zur Grundlagenforschung hinsichtlich Bioverfügbarkeit, Absorption und Kinetik chiraler Substanzen im menschlichen Organismus.

Bei der Entwicklung kapillarelektrophoretischer Trennmethode konnte an frühere Studien aus dem eigenen Arbeitskreis angeknüpft werden [59, 84], die sich ebenfalls mit der enantioselektiven Analytik von Flavonoiden beschäftigt haben.

Die CE ist im Vergleich zur HPLC ein relativ junges Verfahren und in der Analytik noch nicht so stark etabliert wie die HPLC. Allerdings bietet die CE wesentliche Vorteile insbesondere in der chiralen Analytik. So konnten durch Anwendung verschiedener Techniken der CE, Trennmethode zur chiralen Analytik unterschiedlicher Polyphenole erarbeitet werden. Durch Einsetzen des „sample stacking“ wurde eine Methode zur chiralen Trennung der vier Flavanoglykoside Hesperidin, Didymin, Narirutin und Narirutin-4'-glykosid in Orangensaft entwickelt und optimiert. Unter Verwendung der mizellaren elektrokinetischen Chromatographie (MEKC) wurde außerdem eine Methode zur chiralen Trennung von (+)/(-)-Catechin und (+)/(-)-Epicatechin in Kakao und Kakaoprodukten erstellt. Diese Methode soll als Referenzmethode für die bereits beschriebene Kapillarzonenelektrophorese (CZE) [84] eingesetzt werden.

In Humanplasma war jedoch eine Analytik mittels Kapillarelektrophorese nicht möglich, da die Empfindlichkeit des Systems für die im Plasma vorhandenen Flavan-3-ol-Konzentrationen nicht ausreichend war. Das System der Wahl war die HPLC mit coulometrischem Elektrodenarray Detektor, der aufgrund seiner Empfindlichkeit eine Analytik im Nanogramm-Bereich ermöglichte.

Zur Methodenentwicklung wurde polyphenolfreies Humanplasma eingesetzt, dem (+)/(-)-Catechin und (-)-Epicatechin zudosiert wurden. Für Humanplasmaproben musste eine geeignete Probenaufarbeitungsmethode erarbeitet werden, um die Plasmaproteine zu entfernen und die gesuchten Substanzen anzureichern. Die optimierte Probenaufarbeitung, kombiniert mit der entwickelten HPLC-Methode ermöglicht es, (+)/(-)-Catechin im Humanplasma nach Verzehr eines Kakaogetränks als auch nach Verzehr einer Standardlösung zu bestimmen. Dadurch wird es möglich, Humanstudien durchzuführen, welche Fragestellungen bezüglich des Stoffwechsels und der Bioverfügbarkeit chiraler Flavan-3-ole beantworten können.

1.2 Flavan-3-ole

Die Flavan-3-ole gehören zur Gruppe der Flavonoide. Flavonoide sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe und zählen zu den Polyphenolen [102]. Sie bauen auf einem 2-Phenylbenzopyrangrundgerüst auf (Abbildung 1). In Abhängigkeit des Oxidationsgrads und der Sättigung des heterozyklischen Pyranrings (C-Ring) werden die Flavonoide in Gruppen unterteilt. Zu den Flavan-3-olen zählen zum einen die monomeren Catechine wie Epicatechin und Catechin, aber auch die oligo- bzw. polymeren Procyanidine. Procyanidine sind Oligomere aus (+)-Catechin- und (-)-Epicatechineinheiten und werden auch als kondensierte Tannine bezeichnet [121].

In der Natur findet man die Flavan-3-ol Monomere fast immer gemeinsam mit den Procyanidinen [10]. Die monomeren Flavan-3-ole stellen die größte Gruppe natürlich vorkommender monomere Flavonoide dar [110]. Sie liegen häufig nicht glykosidisch gebunden vor, was für Flavonoide eher atypisch ist. Stattdessen sind sie oft mit Gallussäure verestert, wobei die sogenannten Gallate wie Epigallocatechingallat oder Catechingallat entstehen. Veresterungen mit Gallussäure finden vorwiegend an Position C-3 des Pyranrings statt. An den C-Atomen 5, 7, 3', 4', und 5' tragen Catechine bevorzugt Hydroxyl-Gruppen.

Aufgrund des Fehlens einer Doppelbindung am C-2/C-3 des Pyranrings gibt es zwei nebeneinander liegende Chiralitätszentren, welche ein charakteristisches Merkmal der Flavan-3-ole darstellen. Durch das Vorhandensein dieser beiden Stereozentren liegen einige Catechine als Diastereomere sowie als Enantiomere vor.

Als Hauptvertreter der natürlich vorkommenden Catechine sind (+)-Catechin und (-)-Epicatechin zu nennen [176]. Diese beiden Verbindungen spielen in der hier vorliegenden Arbeit eine dominierende Rolle.

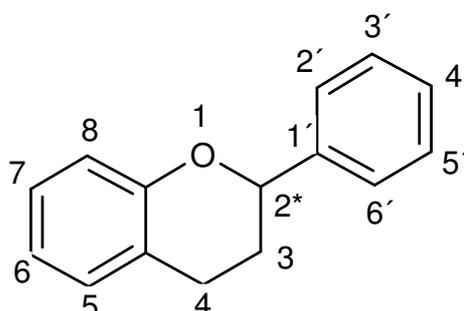


Abbildung 1 2-Phenylbenzopyrangrundgerüst.

1.2.1 Vorkommen

Flavan-3-ole sind in sehr vielen pflanzlichen Lebensmitteln vorhanden. Vor allem sind die monomeren Flavan-3-ole (+)-Catechin und (–)-Epicatechin in heimischen Obstsorten wie Äpfeln, Birnen, Pflaumen aber auch in Süßkirschen und Erdbeeren zu finden [16, 20].

In auffallend großen Mengen finden sich Catechin und Epicatechin in Kakao, Tee, Weintrauben und Guaraná [85].

Aufgrund des Biosynthesewegs werden die monomeren Flavan-3-ole nahezu ausschließlich als (+)-Catechin und (–)-Epicatechin gebildet (siehe Abschnitt 1.2.2). Bislang sind nur wenige Pflanzen bekannt, bei denen nennenswerte Mengen der Enantiomere (–)-Catechin und (+)-Epicatechin vorkommen. So konnten in einigen Palmenspezies (z.B. *Phoenix Canariensis* L.) sowie in Guaraná die in der Natur nur sehr selten vorkommenden 2S-konfigurierten Enantiomere (–)-Catechin und (+)-Epicatechin nachgewiesen werden [85, 120]. Diese können auch im Zuge eines Lebensmittelverarbeitungsprozesses (z.B. erhitzen im alkalischen Milieu) gebildet werden [78].

1.2.2 Biosynthese

Die Flavonoide werden allgemein als Minorkomponenten im Sekundärstoffwechsel der Pflanzen gebildet. Ihre Synthese ist durch unterschiedliche Faktoren reguliert. Grundsätzlich ist die Biosynthese durch die Genetik der Pflanzen bestimmt [53]. Alle zur Synthese der Flavonoide benötigten Vorstufen entstammen dem lichtinduzierten Kohlenhydratstoffwechsel.

Es wurde festgestellt, dass außer Licht- und Nährstoffverfügbarkeit einer Pflanze auch andere Umweltfaktoren Einfluss auf die Synthese dieser bioaktiven Substanzen haben [53, 65]. Beispielsweise wurde festgestellt, dass in pilzinfiziertem Pflanzengewebe höhere Gehalte an Flavan-3-olen vorlagen als in nicht infiziertem Gewebe [97]. Dies ließ den Schluss zu, dass bestimmte Infektionen die Flavan-3-ol-Biosynthese in der Pflanze anregen. Aufgrund der gleichen Substituentenmuster, die alle Flavonoide aufweisen, liegt nahe, dass die einzelnen Flavonoidunterklassen aus Zwischenschritten oder Abzweigungen innerhalb desselben Biosynthesewegs entstehen. Der entscheidende Schritt dieser Biosynthese ist der Aufbau der entsprechend substituierten Chalkone. Aus ihnen können dann die jeweiligen Flavonoide gebildet werden. Hier soll nun exemplarisch die Biogenese der Flavan-3-ole (+)-Catechin und (–)-Epicatechin beschrieben werden. Zu Beginn verläuft die Biosynthese über zwei getrennte Wege. Zum einen bildet sich aus Brenztraubensäure (Pyruvat) über die oxidative Decarboxylierung aktivierte Essigsäure (Acetyl-CoA), welche durch das Enzym Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) zu Malonyl-CoA wird.

In einem parallel verlaufenden Biogeneseweg, dem sogenannten Shikimisäureweg, werden aus D-Erythrose-4-phosphat und Phosphoenolpyruvat Phenolpropanderivate, wie das Cumaroyl-CoA gebildet. Über den sogenannten Phenylpropanoid-Metabolismus werden drei Einheiten Malonyl-CoA aus dem Glucose Abbau mit einem Cumaroyl-CoA des Shikimisäureweg, unter Einwirkung des Enzyms Chalkonsynthase (CHS) zum entsprechenden Chalkon z.B. Naringenin-Chalkon umgesetzt [49, 179]. Katalysiert durch die Chalkonisomerase (CHI) entsteht durch Ringschluss am C-2 des C-Rings das Flavanon (Naringenin). Diese Verbindung weist bereits die typische Grundstruktur der Flavonoide auf und besitzt auch schon am C-2 des C-Rings ein Chiralitätszentrum. Ausgehend von diesem Flavanon (hier das Naringenin) können alle weiteren Flavonoidunterklassen synthetisiert werden.

Im Fall der Biosynthese der Flavan-3-ole wird das Flavanon in Position 3 durch das Enzym Flavanon-3-hydroxylase zu einem Dihydroflavonol (Taxifolin, Dihydroquercetin) hydroxyliert. Dieses wird im weiteren Reaktionsverlauf von der Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR) durch Reduktion der Carbonylgruppe an Position 4 zu einem Flavan-3,4-diol reduziert. Diese Verbindung ist der direkte Vorläufer der Flavan-3-ole.

Von besonderem Interesse ist nun die Synthese der monomeren Flavan-3-ole (+)-Catechin und (-)-Epicatechin. Unerwarteter Weise verläuft der weitere Biosyntheseweg dieser beiden Verbindungen unterschiedlich. Ausgehend von dem Flavan-3,4-diol wird (+)-Catechin durch die Einwirkung des Enzyms Leukocyanidin-4-reduktase gebildet und weist eine 2,3-trans-Konfiguration auf. (-)-Epicatechin wird, im Gegensatz zu (+)-Catechin, über mehrere Reaktionsschritte aus dem Flavan-3,4-diol gebildet. Dies liegt daran, dass zur Bildung des (-)-Epicatechin, eine Konfigurationsänderung am C-3 des Pyranrings erfolgen muss. Katalysiert durch die Leukocyanidin-Dioxygenase (LDOX) wird aus dem Flavan-3,4-diol ein Cyanidin gebildet, und damit alle chiralen Zentren entfernt. Im weiteren Verlauf werden über eine Anthocyanidin-Reduktase (BANYULS-Protein, BAN), welche zwei äquivalente Wasserstoffe liefert, am C-2 als auch am C-3 des C-Rings neue Stereozentren gebildet. Dabei entsteht das 2,3-cis konfigurierte (-)-Epicatechin (Abbildung 2).

Untersuchungen haben gezeigt, dass das BANYULS-Protein nur in der Lage ist, 2,3-cis konfigurierte Moleküle zu bilden und nicht 2,3-trans Konfigurationen [181]. *Paolucci et al.* (2007) [129] zeigten außerdem, dass das Enzym Leucoanthocyanidinreduktase (LAR) ausschließlich auf (+)-Catechin reagiert, jedoch nicht auf (+)-Epicatechin, (-)-Epicatechin oder (-)-Catechin.

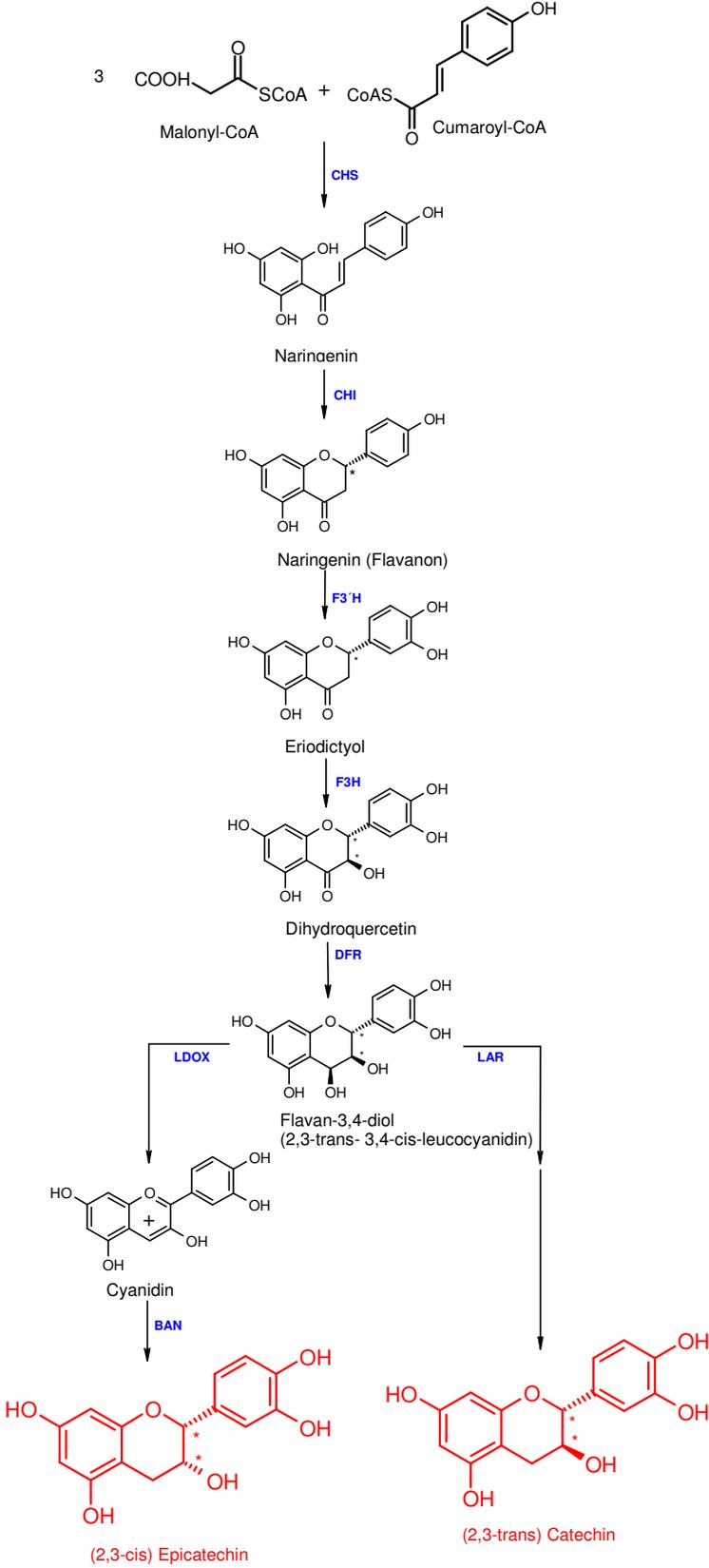


Abbildung 2 Biosynthese der Flavan-3-ole [166]

1.2.3 Chiralität

Eine Verbindung wird unter anderem dann als chiral bezeichnet, wenn mindestens ein optisch aktives Kohlenstoffatom mit vier unterschiedlichen Liganden vorliegt. Dieses Atom stellt das Stereozentrum des Moleküls dar, bei dem zwei verschiedene räumliche Anordnungen möglich sind. Moleküle die mehrere Stereozentren besitzen können Enantiomere ausbilden, sofern die Konfiguration an allen stereogenen Zentren umgekehrt ist. Enantiomere verhalten sich wie Bild und Spiegelbild. Ist die Konfiguration an nicht allen Stereozentren umgekehrt, so liegen Diastereomere vor.

Wie bereits in Abschnitt 1.2 erwähnt, besitzen die Flavan-3-ole an Position C-2 und C-3 des C-Rings Stereozentren. Dadurch liegen für diese Verbindungsklasse sowohl Diastereomere als auch Enantiomere vor. Die bekanntesten und auch relevantesten Flavan-3-ole sind Catechin und Epicatechin. Sie sind Diastereomere, bilden untereinander aber auch Enantiomere aus. Die Stellung des Phenylrings am C-2 und der Hydroxylgruppe am C-3 ist beim Catechin trans-konfiguriert und beim Epicatechin cis-konfiguriert (Abbildung 2).

1.2.4 Epimerisierung

Als Epimerisierung wird die Konfigurationsumkehr an einem asymmetrischen C-Atom bezeichnet.

Wie in Abschnitt 1.2.3 erläutert, besitzen die monomeren Flavan-3-ole Catechin und Epicatechin zwei nebeneinander liegende Stereozentren, auf Grund derer es ihnen möglich ist zu epimerisieren. Eine Epimerisierung kann in diesem Fall durch unterschiedliche Einwirkungen hervorgerufen werden.

Beispielsweise wurde festgestellt, dass bei einer alkalischen Behandlung von Kakao, die natürlich in der Kakaobohne vorkommenden Flavan-3-ole (–)-Epicatechin und (+)-Catechin, zu den entsprechenden Enantiomeren (–)-Catechin und (+)-Epicatechin epimerisieren [78].

Zusätzlich gilt zu bedenken, dass sowohl in einigen Palmarten als auch in Guaraná alle vier Epimere gefunden wurden. Dies lässt vermuten, dass innerhalb des Biosynthesewegs eine Epimerisierung erfolgen muss. Bisher ist die Biosynthese der in der Natur selten vorkommenden Flavan-3-ole (+)-Epicatechin und (–)-Catechin kaum untersucht worden. Es besteht jedoch die Annahme, dass die Epimerisierung über eine enzymatisch gesteuerte Reaktion erfolgt, wobei ein C-2-Epimerase Enzymkomplex, der bisher noch nicht identifiziert wurde, die Reaktion katalysieren soll. In diesem Reaktionsschritt wird am C-2 der Pyranring geöffnet und aus einer 2R 2,3-cis Konfiguration wird eine 2S 2,3-trans Konfiguration [47, 69].

1.2.5 Physiologische Eigenschaften

Aus ernährungsphysiologischer Sicht haben die Flavan-3-ole an Bedeutung gewonnen. Zahlreiche epidemiologische Studien konnten belegen, dass die Aufnahme von catechinreichen Lebensmitteln zu protektiven Effekten gegenüber einer Vielzahl degenerativer Erkrankungen führt.

Insbesondere wurden hierzu die Wirkungen hinsichtlich kardiovaskulärer Erkrankungen, Krebs, Arteriosklerose und Alterungsprozessen untersucht [14, 15, 77, 94, 95, 140]. Nachweislich beruhen diese positiven Eigenschaften der Catechine auf einer Thrombozytenaggregation oder des endothelialen Stickstoffmonoxid-Metabolismus [65, 150].

Zusätzlich gibt es aus Tierstudien sowie aus epidemiologischen Studien Hinweise auf mögliche Einflüsse der Flavan-3-ole auf den Glucosemetabolismus. Es wurde dabei festgestellt, dass Flavan-3-ole die Insulinsensitivität erhöhen [161]. Dadurch gewinnen diese Substanzen im Hinblick auf Diabeteserkrankungen an Bedeutung.

Polyphenole, wie die Flavan-3-ole, besitzen zum größten Teil eine ausgeprägte antioxidative Kapazität [38, 147]. Da degenerative Erkrankungen häufig auf oxidativen Stress zurückzuführen sind, wird diese Eigenschaft der Flavan-3-ole besonders intensiv untersucht. Beispielsweise wurde nach Aufnahme von grünem Tee, der erhebliche Mengen an Flavonoiden enthält, ein Anstieg des antioxidativen Potenzials im Plasma festgestellt [65]. Zu berücksichtigen bleibt, dass die Auswirkungen der Flavan-3-ole auf den menschlichen Organismus von individuellen genetischen Variationen abhängig sein können [65].

Auch wenn in einigen Studien gezeigt wurde, dass zumindest eine teilweise Aufnahme nach Verzehr von Flavonoiden gegeben ist [148, 188], so fehlen doch noch grundlegende Kenntnisse über Absorption, Metabolismus und Bioverfügbarkeit im Menschen. Daher kann eine tatsächliche Aufnahme und eine Wirkkonzentration der Flavan-3-ole nicht sicher abgeschätzt werden, weshalb es derzeit auch noch keine Zufuhrempfehlungen hinsichtlich eines protektiven Effekts der Flavonoide gibt.

1.2.6 Bioverfügbarkeit

Um eine klare Aussage über ernährungsphysiologische Wirkungen der Flavan-3-ole treffen zu können, ist es von Bedeutung, die Bioverfügbarkeit dieser Substanzklasse im menschlichen Organismus zu untersuchen. Es ist dabei nicht nur wichtig zu wissen, wie viel Flavan-3-ole pro Tag über die Nahrung aufgenommen

wurden, sondern insbesondere stellt sich die Frage, wie viel dieser Flavan-3-ol Menge gelangt tatsächlich in den menschlichen Organismus und an die entsprechenden Wirkungsorte.

Bislang gibt es nur wenige Daten über die Verfügbarkeit der Flavan-3-ole für den Menschen. Die meisten Studien hinsichtlich Bioverfügbarkeit wurden mit Labortieren durchgeführt. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind jedoch nur sehr begrenzt auf den Menschen übertragbar. Bereits innerhalb verschiedener Tiergattungen sind erhebliche Abweichungen im Metabolismus der Flavonoide zu verzeichnen [180].

In einigen Humanstudien ist es dennoch gelungen, Catechine nach Verzehr flavanolreicher Lebensmittel, im Blutplasma oder Urin wieder zu finden. Beispielsweise konnte nach Aufnahme von schwarzem oder grünem Tee die Gesamtcatechinkonzentration im Blut bestimmt werden, die allerdings nur $\leq 1\%$ der aufgenommenen Catechinmenge entsprach [98, 173].

Weitere Studien, in denen Plasmaproben untersucht wurden, stellten ebenfalls fest, dass nur sehr geringe Mengen der aufgenommenen Flavan-3-ol-Mengen wieder zu finden sind. Dennoch besteht die Meinung, dass bereits diese geringen Konzentrationen ausreichen, um biologische Effekte hervorzurufen.

Außerdem wurde festgestellt, dass Flavan-3-ole ihre maximale Konzentration im Blut nach etwa 1,5 bis 2 h erreichen. Abhängig von der Lebensmittelmatrix kann sich dieses Maximum durchaus um $\pm 0,5$ h verschieben. Der Plasmaspiegel der Flavanole nimmt rapide ab, so dass nach 7–8 h die Ausgangskonzentration wieder erreicht wird [140].

Die Einflüsse verschiedener Lebensmittelinhaltsstoffe, wie Proteine, Fette oder Kohlenhydrate auf die Bioverfügbarkeit bleiben jedoch bisher weitestgehend ungeklärt und bedürfen weiterer Forschungsarbeiten.

1.2.7 Metabolismus

Der menschliche Organismus ist ein sehr komplexes System, dessen Stoffwechselwege über ein verzweigtes Netz enzymatischer Reaktionen verläuft. Es ist daher schwierig, den exakten metabolischen Weg der Flavanole im Menschen nachzuvollziehen.

In einigen *in vitro* als auch *in vivo* Studien, wurde festgestellt, dass die Flavanole zum größten Teil über die Darmwand des Dickdarms resorbiert werden [2]. In wie weit eine Absorption der Flavanole über die Mundschleimhaut oder den Magen stattfindet ist noch nicht ausreichend geklärt worden. Sicher ist jedoch, dass die Flavanole und Procyanidine stabil gegenüber der Magensäure sind [142].

Freie Flavanole konnten bislang nur in sehr vereinzelt Fällen im Blutplasma nachgewiesen werden [39, 40]. Über eine Reihe weiterer Untersuchungen wurde erkannt, dass die Flavanole rasch und nahezu vollständig metabolisiert werden [72, 93, 149, 158, 172]. Dieser Metabolisierungsprozess läuft, nach bisherigem Wissensstand, vorwiegend in der Leber ab, da hier die entsprechenden Enzyme lokalisiert sind. Katalysiert durch diese Enzyme werden die Hydroxylgruppen der aufgenommenen Catechine sulfatiert, methyliert und glucuronidiert [1, 149]. Die

Hauptmetabolite des Epicatechin beispielsweise sind die Glucuronide und ihre 3'-O-methylierten Metabolite [66]. Als solche können die Flavan-3-ole in die Blutbahn und somit an ihren Wirkungsort gelangen.

Flavanole, die nicht über die Darmmukosa absorbiert wurden, werden größtenteils durch Mikroorganismen des Darms zu einer Vielzahl an Derivaten der phenolischen Säuren und Valerolactonen abgebaut. Diese Metabolite können absorbiert [157] und rasch über Galle und Urin ausgeschieden werden [137].

Ein wesentlicher Punkt, der bezüglich Metabolismus und Wirkung der Flavonoide nicht zu vernachlässigen ist, sind ihre strukturellen Unterschiede. So wurde festgestellt, dass bereits bei Differenzen in der räumlichen Anordnung bestimmte Monomere besser absorbiert werden als andere. Folglich kann sich auch der Metabolismus der Enantiomeren dieser Substanzen unterscheiden [65].

1.3 Kakao und Kakaoerzeugnisse

1.3.1 Botanik

Der Kakaobaum, mit der botanischen Bezeichnung *Theobroma cacao* L., zählte früher zur Familie der Sterculiaceae (Sterkuliengewächse) und wird heute zur Familie der Malvaceae (Malvengewächse) und der Unterfamilie Byttnerioideae gezählt. Die Unterfamilie der Byttnerioideae unterteilt sich in mehrere Gattungen, darunter die Gattung *Theobroma*. Diese lässt sich in 22 Arten unterteilen, wobei nur *Theobroma cacao* zur Erzeugung des Kakaos dient. Durch Züchtung entstanden schließlich verschiedene Sorten des *Theobroma cacao* L.

Zu den wichtigsten Sorten in der Kakao- und Schokoladenherstellung gehören die Sorten Criollo, Forastero und Trinitario. Diese drei Sorten werden grob unterteilt in Edelkakao (Criollo, Trinitario) und Konsumkakao (Forastero). Die Einteilung wurde aufgrund der wirtschaftlichen Bedeutung und des Geschmacks vorgenommen. So ist der Forastero-Kakao zwar geschmacklich nicht so gut, aber wegen seiner Widerstandsfähigkeit gegenüber Pflanzenkrankheiten besser kultivierbar als die Edelkakaosorten. Die Sorte Forastero macht daher insgesamt um die 80% der gesamten Kakaoernte aus.

Der Kakaobaum ist ein langer dünner Unterholzbaum, der im Schatten größerer tropischer Bäume wächst. Er kann bis zu 15 m hoch werden und trägt große, glatte, schwertartige Blätter, die das ganze Jahr über grün sind. Die Blüten und somit die Kakaofrüchte sitzen direkt am Stamm und den größeren Ästen (Kauliflorie) (Abbildung I Anhang). Die Blüten entspringen dem älteren Holz, blühen das ganze Jahr und bringen auch über das ganze Jahr hindurch Früchte hervor.

Die Früchte des Kakaobaums sind im unreifen Stadium grün und erreichen, je nach Kakaosorte, während der Reife eine gelbe, gelbrote oder rot- bis rotbraune Farbe. Sie sind ledrig-holzig und können eine Länge von 15–25 cm und eine Dicke von 7–10 cm erreichen. Botanisch betrachtet sind die Kakaofrüchte Beeren. Im Inneren der Frucht sind in Fünferreihen 25 bis 50 bohnenförmige Samen in ein helles süßliches Fruchtmus eingebettet. Diese Samen werden auch als Kakaobohnen bezeichnet und sind etwa 2 cm lang und 1 cm breit. Sie sind das eigentliche Ausgangsmaterial der Kakao- und Schokoladenproduktion.

1.3.2 Inhaltsstoffe

Die Kakaobohne mit über 300 chemischen Verbindungen zählt zu den komplexesten Nahrungsmitteln der Welt.

Neben dem hohen Fettgehalt enthält die Kakaobohne erhebliche Mengen an Kohlenhydraten und Proteinen (Tabelle 1).

*Tabelle 1 Überblick über die Inhaltsstoffe der Kakaobohne nach Fermentation.
Kakaosorte: Forastero (Konsumkakao)*

Inhaltsstoffe der Kakaobohne (nach Fermentation)	Gehalt (%)
Fett (Kakaobutter)	54,0
Proteine	11,5
Cellulose	9,0
Stärke und Pentosane	7,5
Gerbstoffe und farbgebende Bestandteile	6,0
Wasser	5,0
Mineralstoffe und Salze	2,6
organische Säuren und Geschmackstoffe	2,0
Theobromin	1,2
verschiedene Zucker	1,0
Koffein	0,2

Aber nicht nur die Gehalte der Hauptnährstoffe machen die Kakaobohne zu einem wichtigen Lebensmittelrohstoff, sondern insbesondere die Vielzahl verschiedener Minorkomponenten lassen die Kakaobohne immer mehr ins Zentrum der Wissenschaft rücken.

Die anregenden Alkaloide, Theobromin und Coffein machen 1 bis 2% des Kakaos aus. Sie stimulieren das zentrale Nervensystem und wirken gefäßerweiternd. Zudem enthält die Kakaobohne eine ganze Reihe an Verbindungen, die als Neurotransmitter fungieren. Die wichtigsten darunter sind: Anandamid, Arginin, Dopamin, Histamin und Serotonin.

Von großer Bedeutung sind ebenfalls die phenolischen Verbindungen. Verglichen mit anderen polyphenolhaltigen Lebensmitteln (Äpfel, Trauben, Wein) enthält die Kakaobohne erhebliche Mengen an Flavonoiden. Dies sind vorwiegend die Flavan-3-ole, Procyanidine und ein geringer Anteil an Anthocyanen (Tabelle 2).

(-)-Epicatechin, wurde neben geringen Mengen an (+)-Catechin, (+)-Gallocatechin und (-)-Epigallocatechin, als Hauptflavan-3-ol ermittelt. Diese Verbindungen sorgen für die antioxidativen Eigenschaften des Kakaos und liefern vermutlich einen Beitrag für seinen positiven gesundheitlichen Nutzen.

Tabelle 2 Überblick über die in der Kakaobohne nachgewiesenen polyphenolischen Verbindungen. Kakaosorte: meist Forastero oder keine Angaben

Polyphenole in der Kakaobohne	Gehalte mg/kg	Literatur
Monomere Flavan-3-ole (Catechine)		
* (-)-Epicatechin	5700–15300 21890–43270	(Gotti et al 2006); (Kim & Keeney 1984)
* (+)-Catechin	646 140–450	(Tomas Barberán et al 2007) (Gotti et al 2006)
* (+)-Gallocatechin	Spuren	(Forsyth 1955, Rohan 1958, Griffiths 1960, Wollgast 2005)
* (-)-Epigallocatechin	Spuren	
Anthocyane	4–4,5% des Gesamt- Polyphenolgehalts	(Forsyth und Quesnel 1957)
* Cyanidin-3- β -D-galactosid		
* Cyanidin-3- α -L-arabinosid		
Flavonole	keine Angaben	
* Quercetin		(Rohan und Connell 1964, Sanbongi et al 1998, Wollgast 2005, Stark et al 2005, Tomas-Barberán 2007)
* Quercetin-3-O-glucosid		
* Quercetin-3-O-galactosid		
* Quercetin-3-O-arabinosid		
* Quercetin-3-O-glucuronid		
Flavone	keine Angaben	
* Apigenin		(Sánchez-Rabaneda et al. 2003)
* Vitexin und Isovitexin		
* Luteolin und Luteolin-7-O- glucosid		
* Orientin und Isoorientin		
* Apigenin-8-C-glucosid		(Stark et al. 2005, Sánchez- Rabaneda et al. 2003)
* Apigenin-6-C-glucosid		
Flavanone	keine Angaben	(Stark et al. 2005)
* Naringenin		
* Naringenin-7-O-glucosid		
Proanthocyanidine	unterschiedliche Gehalte:	
* Procyanidin B2 (Dimer)	20800–80500	(Lambert et al 2003)
* Procyanidin C1 (Trimer)	6600–15500	(Adamson et al 1999)
* Procyanidin B5 (Dimer)		(Porter et al 1991, Wollgast et al 2005)
* Procyanidine des A-Typs		

1.3.3 Verarbeitung der Kakaofrucht

Abbildung 3 zeigt einen Überblick der Verarbeitung der Kakaofrucht zum Kakaoprodukt.

Bei der Ernte muss mit äußerster Sorgfalt vorgegangen werden, um die Samenkissen, aus denen die Frucht hervorgegangen ist, nicht zu verletzen. An diesen Stellen könnten sonst keine weiteren Früchte mehr wachsen. Anschließend werden die Früchte mit Macheten geöffnet und das Fruchtfleisch, sowie die Kakaosamen aus den Schalen gelöst. Samen und Fruchtfleisch werden für zwei bis acht Tage zwischen Bananenblätter oder in Holzkisten geschichtet. Während dieser Zeit setzt ein Fermentationsprozess ein, der zur Gärung des zuckerhaltigen Fruchtfleisches führt. Während des Gärungsvorgangs herrschen Temperaturen zwischen 45–50°C, wodurch die Keimfähigkeit verloren geht. Zusätzlich senkt sich während dieses Prozesses der pH-Wert von 6,5 auf 4,5. Die Zellwände werden während der Fermentation zerstört und die Enzymtätigkeit aktiviert. Der Zellsaft kann sich dann in dem ganzen Samen ausbreiten. Zusätzlich verursacht die Fermentation eine Abnahme der Flavan-3-ole und anderer Polyphenole, wodurch sich die bitteren und adstringierenden Eigenschaften des Kakaosamens reduzieren. Außerdem erfolgt die Bildung von Farbkomponenten, die dem zuvor weißlich-gelben Kakaosamen eine bräunliche Färbung verleihen. Am Ende des Fermentationsprozesses werden die Kakaosamen als Kakaobohnen bezeichnet.

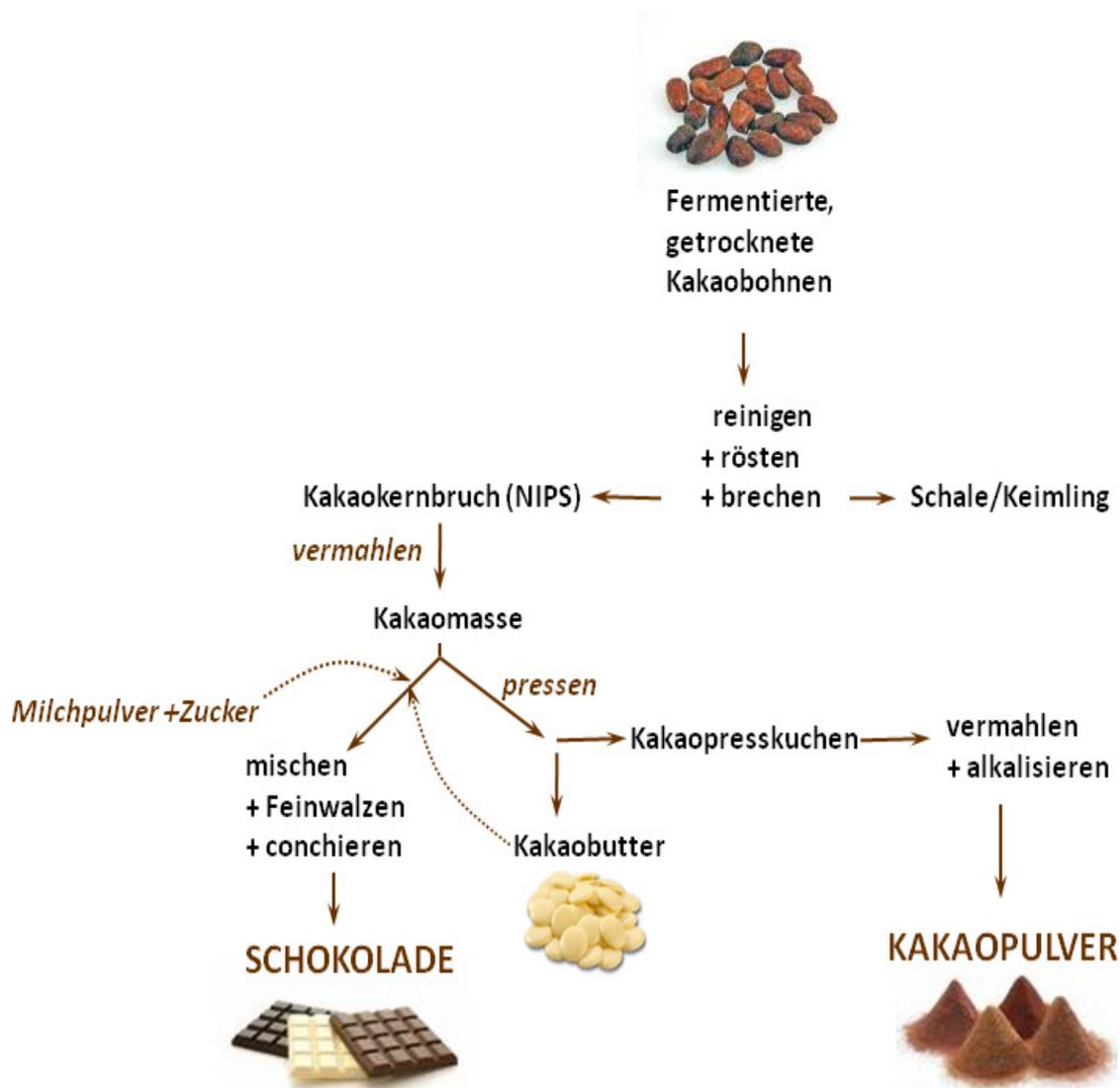


Abbildung 3 Verarbeitung der Kakaofrucht zu Schokolade und Kakaopulver

Die so erhaltenen Bohnen haben einen Wassergehalt von 60%. Um die Bohnen lagerfähig zu machen, werden sie ein bis zwei Wochen in der tropischen Sonne getrocknet. Während des Trocknens reduziert sich das Gewicht der Bohnen um mehr als die Hälfte und der Wassergehalt wird auf maximal 7% reduziert. Durch die Sonnenbestrahlung wird außerdem das Aroma der Bohnen weiter entwickelt. Es wurde aber auch festgestellt, dass sich während einer zweitägigen Sonnentrocknung der (-)-Epicatechingehalt der Kakaobohne um ca. 50% reduziert. Ein Teil dieses Verlustes wird auf die Polyphenoloxidase zurückgeführt, die nach Fermentation und Trocknung noch eine Restaktivität von ungefähr 2% aufweist [178].

In der Regel werden die Kakaobohnen nicht in ihren Anbauländern, sondern in Europa oder Nordamerika weiter verarbeitet. Dort werden die Kakaobohnen, nach Entfernen von Verunreinigungen wie Sand, Holz, Jutefasern etc., einer thermischen Vorbehandlung unterzogen. Die Behandlung dient der Reduzierung von Bakterien und der Verbesserung der Kakaokernbruchausbeute.

Im Anschluss folgt die Röstung. Dieser Prozess dient der vollständigen Entfaltung des Kakaoaromas. Durch chemische Prozesse, die während des Röstprozesses ablaufen, können bis zu 400 unterschiedliche Aromastoffe entstehen. Die Bohne entwickelt ihre braune Farbe, und die Schale löst sich von den Keimblättern. Nach der Röstung folgt das Brechen und Entfernen der Schalen. Bei diesem Vorgang werden die Bohnen zunächst durch Walzen in kleine Stücke zerbrochen. Danach werden die leichten Schalenteile durch einen starken Luftstrom weggeblasen und übrig bleibt der Kakaobruch. Die erhaltenen Kakaostücke werden auch als Nibs bezeichnet. In den Nibs sind einige unerwünschte Geschmacks- und Geruchsstoffe enthalten (u.a. Acetaldehyd, Aceton, i-Butanol, Ethanol, i-Propanol, Essigsäureethylester, Essigsäure, i-Pentanal, Methanol, Diacetyl). Diese Stoffe werden am Ende der Schokoladenherstellung durch das Conchieren beseitigt. Diese unerwünschten Stoffe werden in der Kakaomasse durch die Kakaobutter eingeschlossen und lassen sich dadurch nur schwierig eliminieren. Um das zeit-, energie- und kostenaufwendige Conchieren verkürzen zu können, werden bereits Verfahren zur Kakaokernbruchveredelung angewandt. Die Veredelung erfolgt in einem speziellen Druckreaktor. Bei der Kakaopulverherstellung wird dem Kakaokernbruch in diesem Reaktor bereits eine Alkalilösung zugesetzt. Zur Herstellung von Schokolade wird eine Lösung aus Zucker und weiteren Stoffen hinzugefügt.

Damit aus den Nibs Kakaomasse wird, werden diese in beheizten Walzen auf Teilchengrößen von 20–30 μm zerkleinert [18]. Dabei entsteht eine homogene fließfähige Masse, die direkt zur Herstellung von Schokolade eingesetzt werden kann. Zur Verarbeitung der Kakaomasse zu Kakaopulver, muss aus technologischen Gründen ein Teil des Fettes abgepresst werden. Die auf 90 °C bis 100 °C vorgewärmte Kakaomasse wird in hydraulischen Pressen zusammengedrückt. Dabei entsteht ein Druck von bis zu 900 bar. Es erfolgt eine Auftrennung in Kakaobutter und Kakaopresskuchen. Der größte Teil der Kakaobutter wird zur Schokoladenherstellung, aber auch in pharmazeutischen und kosmetischen Produkten eingesetzt. Der Presskuchen, der noch 10–24% Fett enthält, wird zu Kakaopulver zermahlen. Es wird zwischen schwach entöltem Kakaopulver (20–22% Fett) und stark entöltem Kakaopulver (10–20% Fett) unterschieden.

Das Kakaopulver unterliegt meist einer alkalischen Behandlung (auch Dutching genannt), die den Geschmack und die Farbe des Kakaos beeinflusst. Während dieses Prozesses wird das Pulver mit Salzen behandelt (z.B. mit Magnesiumoxid, Natriumhydroxid oder Natriumcarbonat). Abhängig von der Art des

Alkalisierungsmittels, der Zeit und der Temperatur, können bestimmte Produkteigenschaften erreicht werden. Beispielsweise besitzt alkalisiertes Kakaopulver eine wesentlich bessere Benetzbarkeit und ist daher für die Herstellung von Kakaotränken besonders geeignet [19, 170]. Eine Alkalisierung kann aber schon in früheren Stadien der Verarbeitung stattfinden. So ist es auch allgemein üblich, die Nibs vor oder nach dem Rösten einer Alkalisierung zu unterziehen.

Das entstandene Kakaopulver dient als Rohstoff für verschiedene Kakaoprodukte, zum Beispiel: Soßen, Gebäck (Kuchen, Plätzchen), Eis, Schokoladenmousse, Schokoladenpudding, Schokoladengenüsse und vieles mehr.

1.4 Flavanone und ihre Glykoside

Die Flavanone leiten sich vom 1,3-Diphenylpropan ab und tragen, sowie alle Flavonoide, an der C-2-Position des Aglykons einen Phenylrest. An dieser Stelle im Molekül besitzen sie somit ein stereogenes Zentrum (Abbildung 4).

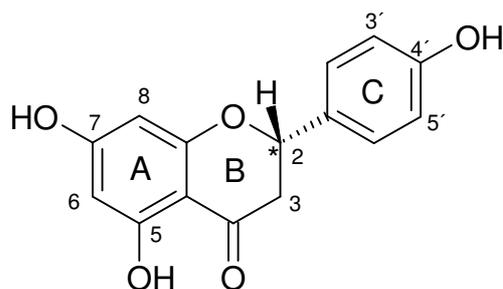


Abbildung 4 Chemische Struktur des Flavanons 2S-Naringenin

Die Flavanone kommen im Pflanzenreich nur in geringen Konzentrationen vor mit Ausnahme der *Citrus ssp* [49]. Sie haben eine große Tendenz, unterschiedliche Substituenten zu binden. So konnten monohydroxylierte Flavanone, C-methylierte, isoprenylierte, sowie Furan- und Pyranflavanone gefunden werden [67, 68]. Eine besondere Rolle spielen die glykosidierten Flavanone. Sie können wegen des Chiralitätszentrum am C-2 des Aglykons und der chiralen Zuckerkomponente als Diastereomere existieren. Genaueres über das stereochemische Verhalten der Flavanone und ihrer Glykoside wird in Abschnitt 1.4.2 besprochen. Die Flavanone sind am häufigsten mit Glucose, Rutinose (6-O- α -L-Rhamnosyl-D-glucose) oder Neohesperidose (2-O- α -L-Rhamnosyl-D-glucose) verbunden. Die Bindung des Zuckers findet vorwiegend an Position 7 des A-Rings statt (Abbildung 5).

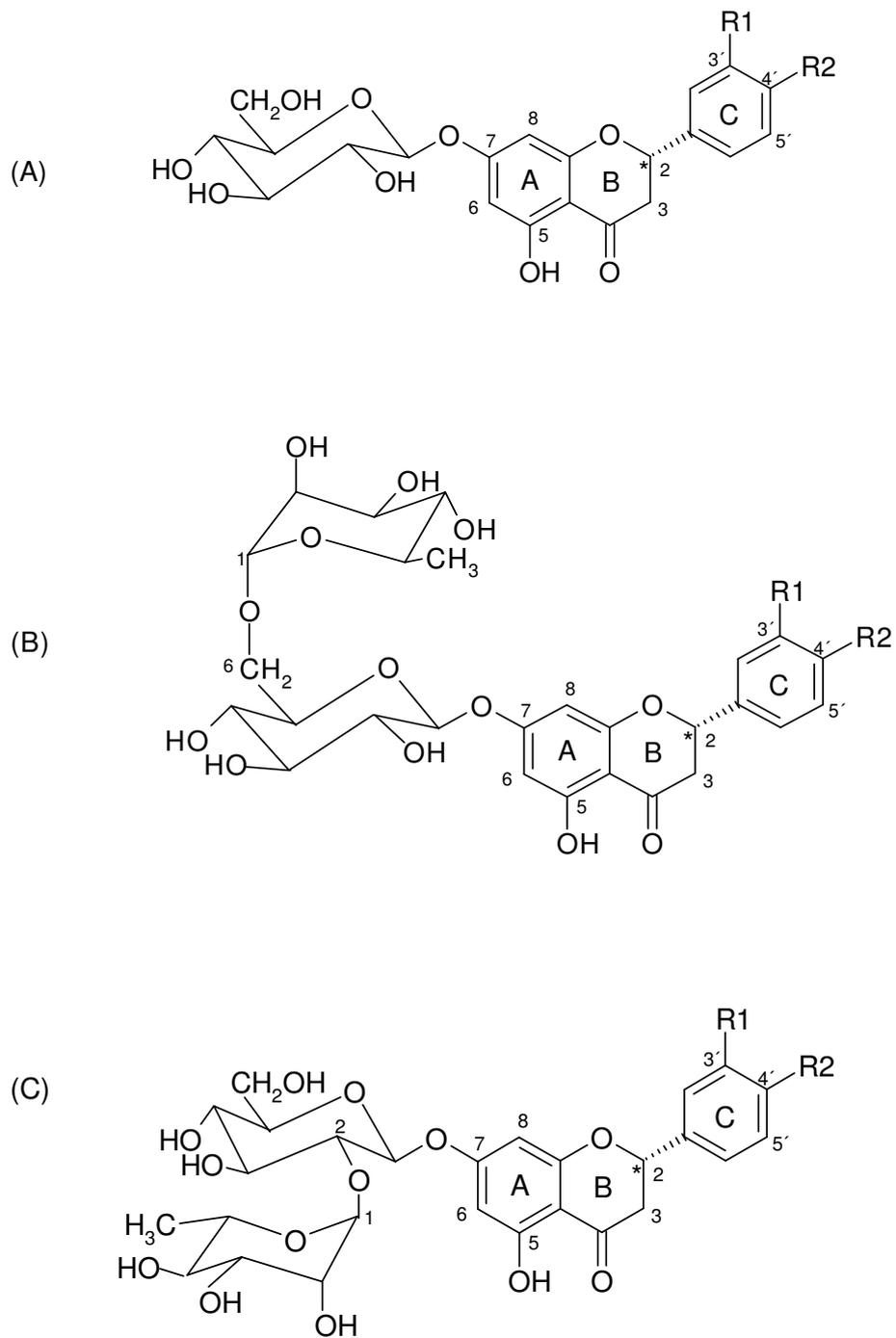


Abbildung 5 Flavanon-7-O-glucosid (A); Flavanon-7-O-rutinosid (B) und Flavanon-7-O-neohesperidosid (C)

1.4.1 Vorkommen

Die größten Mengen von Flavanonen liegen in Zitrusfrüchten vor. In ihnen erreichen die Flavanone eine Konzentration von bis zu 5% der Trockenmasse. Während der Reifung der Früchte erhöht sich ihre Konzentration.

In den Zitrusfrüchten liegen die Flavanone vorwiegend substituiert vor. Als Aglykone dominieren Naringenin, Hesperitin, Eriodictyol und Isosakuranetin. Die häufigste Form der Substituierung in Zitrusfrüchten ist die Glykosidierung mit unterschiedlichen Zuckern. In den Früchten Mandarine, Süßorange und Zitrone sind überwiegend Flavanonrutinoside zu finden, insbesondere das Hesperidin. Grapefruits und Bitterorangen enthalten hingegen nur geringe Mengen an Rutinosiden. Der Hauptteil der Flavanonglykoside sind hier insbesondere die Neohesperidoside. Je nach dem, welches dieser beiden Glykoside in einer Frucht dominiert, können die Zitrusfrüchte in zwei Gruppen eingeteilt werden. Dies sind einerseits die bitter schmeckenden Zitrusfrüchte wie z.B. Pampelmuse, Grapefruit und Sauerorange, deren Hauptflavanonglykoside die Neohesperidoside sind, die einen intensiv bitteren Geschmack besitzen, und andererseits die süß schmeckenden Zitrusfrüchte wie z.B. die Süßorange, Mandarine, Clementine etc., deren Hauptflavanonglykoside die geschmacksneutralen Rutinoside sind.

1.4.2 Chiralität

Wie bereits in Abschnitt 1.2.2 erwähnt, bildet sich bei der Biosynthese der Flavonoide das Naringenin-Chalkon (4, 2', 4', 6'-Tetrahydroxychalkon), welches unter der Einwirkung der CHI cyclisiert. Es entsteht das (-)-2S-Naringenin. Diese Verbindung kann infolge eines Chiralitätszentrums an Position C-2 zwei enantiomere Formen aufweisen. Das Enzym ist stereoselektiv, so dass ausschließlich das 2S-Naringenin gebildet wird. Das 2R-Naringenin kann daraus durch nicht-enzymatische Racemisierung entstehen.

Bei stereochemischen Untersuchungen natürlicher Pflanzenextrakte wurden stets die (-)-2S-Flavanone im Überschuss gefunden [89].

In pflanzlichen Lebensmitteln hingegen kommen vielfach Mischungen beider chiraler Formen vor. Erklärt werden kann dies damit, dass unter bestimmten Bedingungen aufgrund einer nicht-enzymatischen Racemisierung die ursprüngliche enzymatisch eingestellte Enantiomerenreinheit verändert wird. Dieser Prozess verläuft bereits während der Fruchtreifung, des Wachstums sowie während des Transports und der Verarbeitung der Früchte. Die (-)-2S-Form überwog dennoch in den meisten Fällen [168]. Betrachtungen hinsichtlich der Diastereomerenverhältnisse der Flavanoglykoside in Zitrusfrüchten ergaben eindeutige Unterschiede zwischen unreifen und reifen Früchten.

So wurde bereits 1975 von Gaffield und Lundin [57] festgestellt, dass in unreifen Grapefruits nur 2S-Naringin vorkommt, in reifen Früchten aber beide diastereomeren Formen zu finden sind. Diese Erkenntnis konnte 1991 auch von Krause und Galensa [89] mittels HPLC bestätigt werden. Derartige Analysen wurden schließlich auch für andere Zitrusfrüchte durchgeführt. Beispielsweise wurde das Flavanoglykosid Narirutin in Orangen nachgewiesen und chiral getrennt. Eine Erkenntnis dabei war, dass in Orangensaft Narirutin als racemisches Gemisch vorliegt [89].

1.4.3 Bedeutung in der Lebensmittelchemie

Flavanone und ihre Glykoside haben unterschiedliche sensorische Eigenschaften. Diese sensorisch relevanten Verbindungen und ihre Derivate beeinflussen die Qualität der Früchte und sind daher insbesondere für die Lebensmittelindustrie von großer Bedeutung. Die Flavanoneohesperidoside werden industriell als Bitterstoffe eingesetzt. Ihre Derivate, die Dihydrochalkone, besitzen indessen eine enorme Süßkraft (1000-fach süßer als Saccharose), weswegen sie gerne als Zuckerersatz verwendet werden. Gewonnen werden diese Stoffe durch Extraktion aus Zitrustrester.

In der Lebensmittelanalytik haben die Flavanone und ihre Glykoside ebenfalls an Bedeutung gewonnen. Aufgrund ihres ubiquitären und gleichzeitig spezifischen Vorkommens in Zitrusfrüchten [144, 27, 59] sind sie als chemotaxische Marker zum Nachweis der Authentizität von Zitrusfrüchten geeignet.

Somit ist es z.B. möglich, einen Zusatz von Grapefruitsaft zu Orangensaft über Naringin nachzuweisen [146] bzw. der Zusatz von Orangensaft zu Grapefruitsaft kann durch das Überschreiten eines Hesperidin-Grenzwertes ermittelt werden.

1.5 Orangen

1.5.1 Botanik

Als Orange wird die Frucht des immergrünen Baums *Citrus x Aurantium* (syn. *Citrus aurantium* L. var. *sinensis* L. oder *Citrus sinensis* L.) bezeichnet. Sie gehört zur Gattung der Zitruspflanzen (*Citrus*) aus der Familie der Rutaceae (Rautengewächse). Die Orange ist eine Kreuzung von Mandarine (*Citrus reticulata*) und Pampelmuse (*Citrus maxima*) [126].

Die Orangensorten werden unterteilt in Bitterorangen (Pomeranzen) und vier Gruppen süßer Orangen. Zu diesen zählen die Blondorangen als wichtigste Gruppe der Süßorangen, die Navelorangen, die pigmentierten Orangen (Blut- und Halbblutorangen) sowie die säurefreien Orangen.

Orangenbäume sind immergrün und können Wuchshöhen von bis zu zehn Metern erreichen. Die weißen Blüten stehen einzeln in den Blattachsen oder aber in Blütengruppen zusammen. Wie viele andere Zitrusarten sind sie Selbstbefruchter. Die äußere Schicht der reifen Früchte ist orange gefärbt (Exokarp, Flavedo), und im Inneren ist die Fruchtschale mit einer weißen Haut ausgekleidet (Mesokarp, Albedo). Die Schale enthält außerdem zahlreiche Öldrüsen, die mit angenehm duftenden ätherischen Ölen gefüllt sind. Die Frucht (Hesperidium) besteht aus zehn bis 13 Segmenten, die von Saftschläuchen durchzogen sind. Jedes dieser Segmente ist von einem dünnen Häutchen (Endokarp) umgeben.

1.5.2 Inhaltsstoffe

Die Orange enthält 80% Wasser, 8% Zucker (Saccharose, Glucose und Fructose), 7% organische Säuren (v.a. Zitronen und Äpfelsäure) und 50 mg Vitamin C/100 g (empfohlener Tagesbedarf laut NKV liegt bei 80 mg [28]). Weitere Inhaltsstoffe siehe Tabelle I Anh. Wie bei Zitrusfrüchten zu erwarten, enthalten Orangen Flavanone und ihre Derivate (in Tabelle II Anh. sind vier in Orangen nachgewiesene Flavanonglykoside aufgelistet). Wie in Abschnitt 1.4.3 erwähnt, können die Flavanonglykoside als Marker zur Identifizierung von Saftverfälschungen verwendet werden [146].

1.5.3 Verarbeitung zu Frisch-, Direkt- und Konzentratsaft

Das im Welthandel bedeutendste Orangenprodukt ist der Orangensaft, welcher zum Großteil aus Brasilien stammt und in Form von Konzentrat gehandelt wird. Heutzutage kommen auch immer mehr Direkt- und Frischsäfte auf den Markt. Abbildung 6 zeigt schematisch die Verarbeitungsprozesse zur Herstellung von Zitrusäften (Orangensäften).

In diesem Prozess sind als wesentliche Verarbeitungsschritte die Pasteurisierung und die Konzentrierung zu erwähnen.

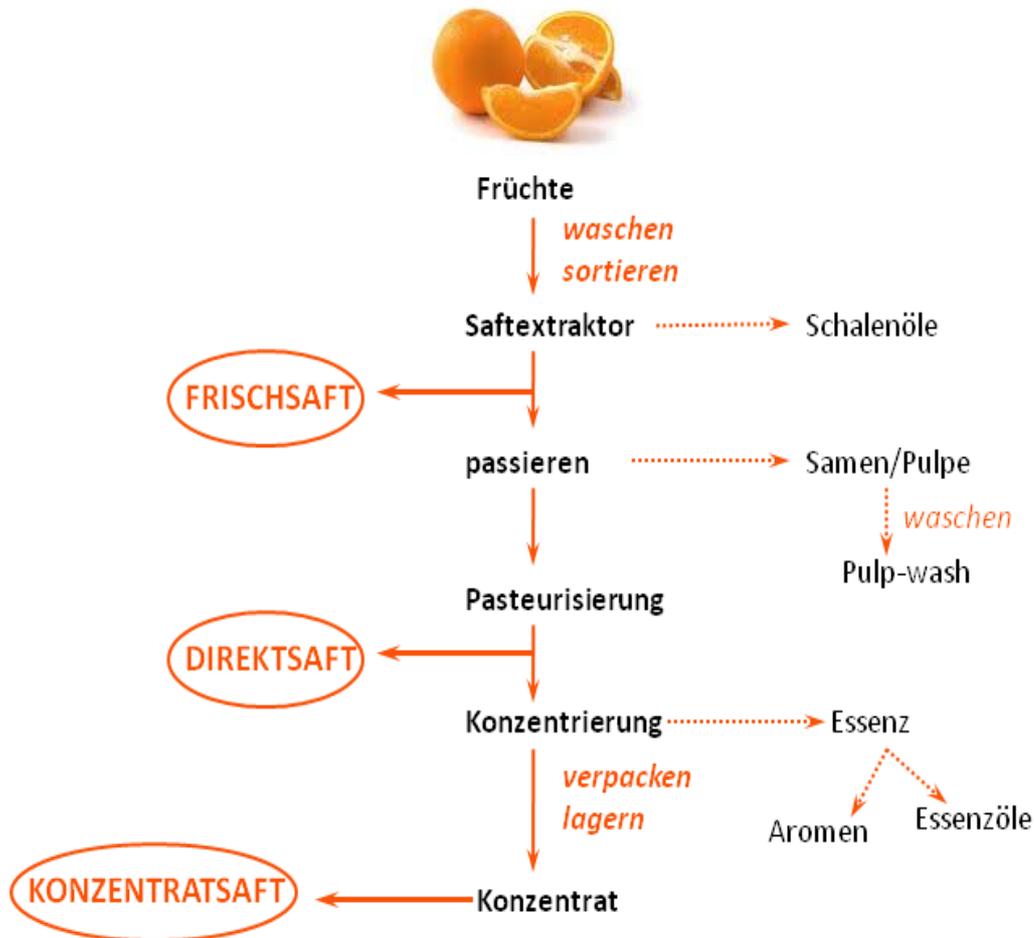


Abbildung 6 Schematische Darstellung der Orangensafterstellung

Pasteurisierung

Die Pasteurisierung stellt ein klassisches Verfahren zur Haltbarmachung von Säften dar. Es dient der Abtötung von Mikroorganismen wie Bakterien, Hefen und Schimmelpilzen, sowie einer Inaktivierung lebensmitteleigener und mikrobieller Enzyme. Da durch zu lange Erhitzungszeiten die Qualität der Säfte gemindert würde, werden die Säfte einer Hochtemperatur-Kurzzeiterhitzung in speziellen Plattenwärmeaustauschern (80–90 °C, 10–15 sec) unterzogen. Im Anschluss folgt direkt eine rasche Rückkühlung der Säfte. Da beide Schritte der Pasteurisierung in einem Arbeitsgang durchgeführt werden können, werden mögliche chemische Veränderungen im Saft weitestgehend vermieden.

Zudem gibt es schonendere Verfahren, bei denen z.B. mit Hochdruck und niedrigeren Temperaturen [132, 133] oder mit elektrischen Feldern [136] gearbeitet wird. Wie aus Abbildung 6 zu erkennen ist, kommt der pasteurisierte Saft als Direktsaft in den Handel oder wird zu Saftkonzentrat verarbeitet.

Konzentrierung

Der Konzentrationsprozess dient der Entfernung des Wassers. Die dadurch erhaltenen Konzentrate haben einen relativ hohen Zuckergehalt und nur noch geringe Mengen an Wasser, wodurch sie chemisch und mikrobiologisch stabil sind.

Die Konzentrierung hat zudem die Vorteile, dass Konzentrate einfacher und billiger zu transportieren und zusätzlich besser zu vermarkten sind. Außerdem können saisonale Unterschiede in der Menge und Qualität der Ernte besser ausgeglichen und den Marktgegebenheiten angepasst werden.

Bei der Konzentrierung eines Saftes wird der Erhalt eines qualitativ einwandfreien Konzentrates angestrebt. Es soll in Aussehen, Aroma und Geschmack ansprechend sein und sich nach seiner Rückverdünnung mit Wasser möglichst nicht vom Ausgangsprodukt unterscheiden.

Die Konzentrierung findet in Hochtemperatur-Kurzzeit-Apparaturen, beispielsweise einem drei- bis vierstufigen Fallstromverdampfer, statt. Da einige Verbindungen in Säften hitzelabil sind, ist es von Bedeutung, die Verdampfungstemperatur so niedrig wie möglich und die Verweildauer des Saftes im Verdampfer so gering wie möglich zu halten. Damit wird garantiert, dass die natürlichen Inhaltsstoffe weitgehend erhalten bleiben.

Die flüchtigen Aromastoffe gehen während des Verdampfungsprozesses nicht verloren. Sie werden in einer separaten Aromakolonne durch Kondensation und Destillation aus den abgedampften Produktbrüden (Wasserdampf + Aromastoffe) gewonnen und als Aromakonzentrat gelagert. Diese Aromakonzentrate werden z.B. dem rückverdünnten Saft wieder zugesetzt, um so einen nahezu naturidentischen Geschmack zu erhalten. Außerdem wird oftmals zur Verbesserung des Aromas kaltgepresstes Schalenöl zugefügt.

1.6 Kapillarelektrophorese

Ein Teil der methodischen Entwicklungen und Untersuchungen dieser Arbeit wurde mittels Kapillarelektrophorese (CE = Capillary electrophoresis) durchgeführt.

Das eigentliche Prinzip der Kapillarelektrophorese wurde bereits im 1. Gesetz von Kohlrausch formuliert, welches besagt, dass „geladene Teilchen in Lösung unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes mit unterschiedlicher Geschwindigkeit wandern“. Die CE als Methode mit hocheffizienten Trennleistungen gibt es jedoch erst seit Beginn der 80er Jahre. Um die Trenntechnik der CE auch in der Routineanalytik zu etablieren, wurden in den letzten 10 bis 15 Jahren die Geräte erheblich verbessert.

Die CE wird beispielsweise im Pharmabereich zur Reinheitskontrolle synthetisch hergestellter Medikamente eingesetzt. Auch in kriminaltechnischen Labors wird sie aufgrund ihrer hervorragenden Trennleistung, ihrer einfachen Handhabung und der Möglichkeit schnell und effektiv neue Methoden zu entwickeln eingesetzt. Aber auch im Lebensmittelbereich kann die CE als alternative Trenntechnik angewendet werden. Untersuchungen auch aus dem eigenen Arbeitskreis zeigten bereits, dass diese Technik erfolgreich im lebensmittelanalytischen Bereich genutzt werden kann [59, 60, 61, 84, 85, 86, 117].

1.6.1 Grundlagen der CE

Die Kapillarelektrophorese basiert auf dem Prinzip der Elektrophorese. Unter dieser wird die unterschiedliche Wanderung von Teilchen in einem meist flüssigen Medium unter Anlegen eines elektrischen Feldes verstanden. Aufgrund verschiedener Ladungsdichten, Formen und Größen der Teilchen, weichen ihre Wanderungsgeschwindigkeiten von einander ab. Deshalb kommt es im Zuge einer elektrophoretischen Wanderung zur Trennung der Ionen.

Bei der Kapillarelektrophorese findet diese Trennung in einer mit Elektrolytlösung gefüllten Glaskapillare statt. Bei den meisten Applikationen werden Polyimid beschichtete fused-silica Kapillaren verwendet, die eine Gesamtlänge von 30–100 cm, und einen Innendurchmesser von 25–100 μm haben können. Die Länge einer Kapillare wird mit der Gesamtlänge L_{ges} (= Länge vom Anfang bis zum Ende der Kapillare) und der effektiv Länge L_{eff} (= Länge vom Kapillaranfang bis zum Detektorfenster) angegeben. Nach der Probenaufgabe, an der Seite des Kapillarinlets (Anodenseite) tauchen beide Kapillarenden in die mit Elektrolytlösung gefüllten Puffergefäße ein (Abbildung 7). Zwischen den Kapillarenden wird dann eine Spannung von bis zu 30 kV angelegt. Die Probenkomponenten migrieren im elektrischen Feld unterschiedlich schnell in Richtung Kathode und passieren dabei einen Detektor, mit dem eine qualitative

und quantitative Auswertung erfolgen kann. Da die Detektionsschichtdicke in der CE nur sehr klein ist, ergibt sich im Vergleich zur HPLC nur eine geringe Empfindlichkeit (Lambert-Beer'sches Gesetz). Die Detektion erfolgt bei der Kapillarelektrophorese meist in der Kapillare, um Effizienzverluste durch Vermischungseffekte außerhalb der Kapillare zu vermeiden. Diese Art der Detektion erfolgt mit Hilfe direkter und indirekter UV/VIS- und Fluoreszenzmethoden. Es gibt auch die Möglichkeit der Probendetektion am Ende der Kapillare. Zurzeit käuflich zu erwerbende Post-column-Detektoren sind Leitfähigkeitsdetektoren und massenselektive Detektoren [34, 35, 48, 54, 91].

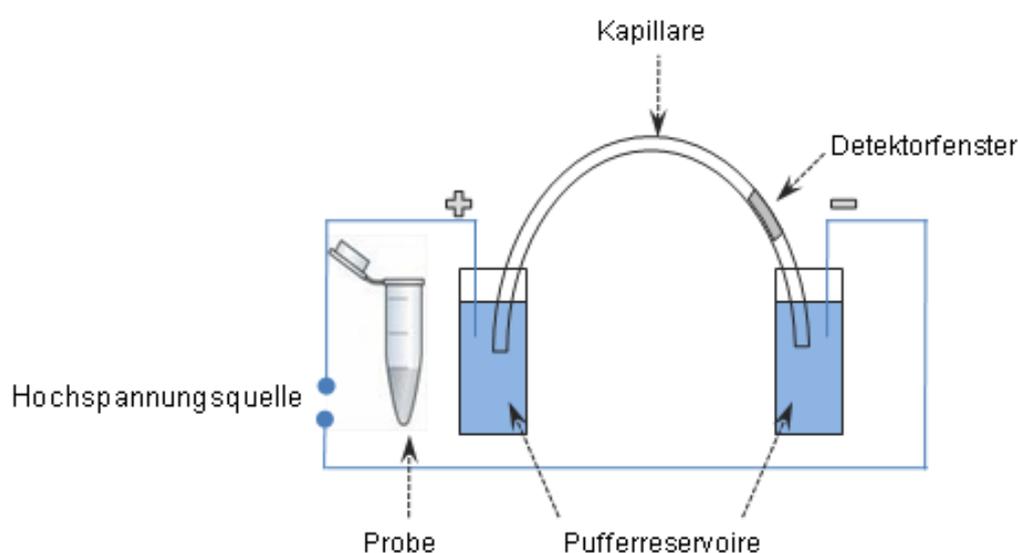


Abbildung 7 Schematischer Aufbau eines kapillarelektrophoretischen Systems

Elektrophoretische Mobilität = Eigenmobilität

Jedes geladene Teilchen besitzt eine eigene Mobilität, die sich aus dessen Molekülmasse, Ladungsdichte, Ladungsart und Größe ergibt.

Die elektrophoretische Mobilität μ_{EP} einer Substanz ist ihre Geschwindigkeit v im elektrischen Feld, bezogen auf die elektrische Feldstärke E (Gl.1). Da sich die Geschwindigkeit v aus der effektiven Kapillarlänge L_{eff} und der Migrationszeit t_{min} berechnen lässt (Gl.2), und die elektrische Feldstärke der Quotient aus Spannung U und der gesamten Kapillarlänge L_{ges} ist (Gl.3), kann die Mobilität eines Analyten nach Gleichung 4 bestimmt werden. In der CE wird durch die unterschiedlichen Eigenmobilitäten der Analyten ein selektiver Transport und somit die gewünschte Trennung erreicht [48]. Grundvoraussetzung für eine Trennung in der CE ist ein Mobilitätsunterschied zwischen den Analytmolekülen.

$$\mu_{EP} = \frac{v}{E} \quad \text{Gl.1}$$

$$v = \frac{L_{eff}}{t_{min}} \quad \text{Gl.2}$$

$$E = \frac{U}{L_{ges}} \quad \text{Gl.3}$$

$$\mu_{EP} = \frac{L_{eff} \cdot L_{ges}}{t_{min} \cdot U} \quad \text{Gl.4}$$

- μ_{EP} : elektrophoretische Mobilität
 v : elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit
 E : Stärke des angelegten elektrischen Feldes
 L_{eff} : effektive Kapillarlänge
 L_{ges} : Gesamtlänge der Kapillare
 U : angelegte Spannung
 t_{min} : Migrationszeit

Elektroosmotischer Fluss = Systemsspezifische Trennkraft

Ein in der CE sehr wichtiger elektrokinetischer Effekt, ist die Elektroosmose. Sie beschreibt die Bewegung einer Flüssigkeit relativ zu einer geladenen Oberfläche unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes (= elektroosmotischer Fluss, EOF). Nur aufgrund dieses Effekts können alle Analyten in eine Richtung wandern, auch Anionen und neutrale Moleküle wandern dadurch mit in Richtung Kathode und können detektiert werden.

Die innere Oberfläche der Kapillare ist mit Silanolgruppen benetzt. Diese dissoziieren ab einem pH-Wert > 2,0 und bilden dadurch an der Glasoberfläche einen negativen Ladungsüberschuss aus. An dieser negativen Schicht werden die Kationen des Pufferelektrolyten adsorbiert und Anionen abgestoßen. Ein Teil dieser Kationen wird durch die elektrostatische Anziehungskraft in der Nähe der Kapillarwand fixiert, wodurch sich eine starre Grenzschicht („Sternschicht“) bildet. Da die Kationen von einer Hydrathülle umgeben sind, können aus sterischen Gründen nicht alle Kationen an der negativen Oberfläche fixiert werden. Um die

verbleibenden negativen Ladungen an der Kapillaroberfläche auszugleichen, werden weitere Gegenionen angelagert. Dadurch entsteht eine diffuse Grenzschicht, die sogenannte "Gouy-Chapman-Schicht", deren Kationenkonzentration exponentiell mit dem Abstand von der fused-silica Oberfläche abnimmt (Abbildung 8). Diese Abnahme wird als ζ -Potential (Zeta-Potential) bezeichnet. Der EOF ist direkt proportional zu diesem ζ -Potential und wird mathematisch, wie in Gl. 5 beschrieben angegeben.

$$\mu_{eo} = \frac{\zeta \cdot \epsilon \cdot E}{4 \cdot \pi \cdot \eta} \quad \text{Gl.5}$$

- μ_{eo} : elektroosmotische Mobilität
- ζ : Zeta-Potential
- ϵ : Dielektrizitätskonstante
- E : angelegte Feldstärke
- H : Viskosität des Elektrolyten

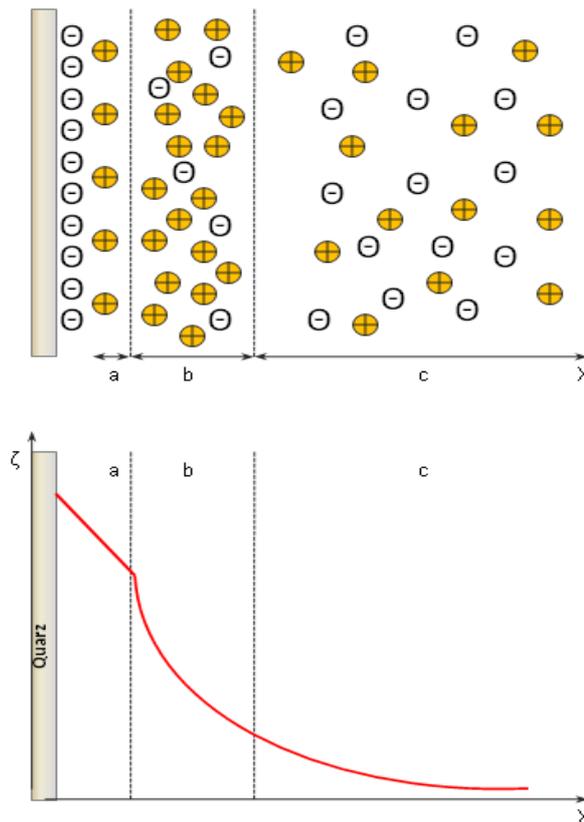


Abbildung 8 Zeta-Potential (ζ -Potential) [48]
 a: starre Grenzschicht („Sternschicht“ oder „Helmholtz-Schicht“)
 b: diffuse Grenzschicht („Gouy-Chapman-Schicht“ oder „Debye-Hückel-Schicht“)
 c: freie Schicht

Wird in einer mit Elektrolyt gefüllten Kapillare, parallel zur geladenen Oberfläche, ein elektrisches Feld angelegt, so zieht das Feld die solvatisierten Kationen in der "Gouy-Chapman-Schicht" längs seiner Achse an und bewegt infolge der inneren Reibung die gesamte Flüssigkeit in der Kapillare mit. Im Falle von fused-silica Kapillaren mit einer Anreicherung von positiven Ionen in der Grenzschicht, wird der elektroosmotische Fluss (EOF) zur Kathode hin induziert [48, 92, 127]. Es resultiert ein flaches, stempelförmiges Strömungsprofil und es ergeben sich nur geringe Bandenverbreiterungen. Bei druckbetriebenen Systemen wie der HPLC, treten parabolische Strömungsprofile auf, die zu höheren Bandenverbreiterungen führen.

Abbildung 9 zeigt den Vergleich der beiden Strömungsprofile.

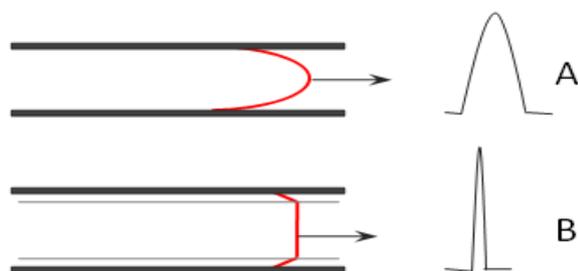


Abbildung 9 Flußprofile im Vergleich A: parabolisch; B: stempelförmig [48]

1.6.2 Trenntechniken in der CE

Die Kapillarelektrophorese bietet diverse Techniken zur Entwicklung neuer Methoden.

Einige der bekanntesten Verfahren wurden im Zuge dieser Arbeit eingesetzt und führten zu den gewünschten Ergebnissen.

1.6.2.1 Kapillarzonenelektrophorese (CZE)

Die Zonenelektrophorese findet in der kapillarelektrophoretischen Analytik die breiteste Anwendung. Alle anderen Verfahren der CE bauen auf diesem Prinzip auf.

Es bleiben bei der CZE der pH-Wert und die Ionenstärke der Pufferlösung sowie die Feldstärke über die gesamte Trennstrecke hinweg konstant.

Der schematische Ablauf der CZE ist in Abbildung 10 dargestellt. Sie ist ein in der Anwendung unkompliziertes Analysenverfahren.

Die Elektrolytlösung hat bei dieser Technik die Aufgabe, den pH-Wert konstant zu halten und den Stromtransport zu gewährleisten. Die Höhe des pH-Wertes wirkt sich auf den EOF und somit auf den Proben transport aus. Bei Fused-Silica-Kapillaren steigt die Geschwindigkeit des EOF mit dem pH-Wert des BGE an, da das ζ -Potential, und damit der EOF von der Oberflächenladung der Kapillarwand abhängig ist. Dies bedeutet, dass im alkalischen Bereich (hohe pH-Werte) viele der Silanolgruppen dissoziiert vorliegen und dadurch ein größerer EOF entsteht. Zusätzlich beeinflusst der pH-Wert den Ionisationsgrad der Proben teilchen und dadurch auch ihre Ionenbeweglichkeit. Die Pufferkonzentration hat ebenfalls einen Einfluss auf die Probentrennung. Wie aus Abschnitt 1.6.1 Gl. 5 hervorgeht, ist der EOF umgekehrt proportional zur Viskosität des Elektrolyten. Der EOF sinkt folglich mit zunehmender Pufferkonzentration.

Um eine selektive, kapillarelektrophoretische Methode mit Basislinientrennung zu entwickeln, müssen also die Konzentration der Elektrolytlösung, der pH-Wert sowie die Feldstärke optimiert werden. Weitere Optimierungsparameter, sind die Kapillarlänge, Kapillartemperatur und der Einsatz von Pufferadditiven wie organische Lösungsmittel, Harnstoff, Cyclodextrine etc. Auf einzelne Additive wird in den Abschnitten 1.6.2.2 und 1.6.2.3 näher eingegangen.

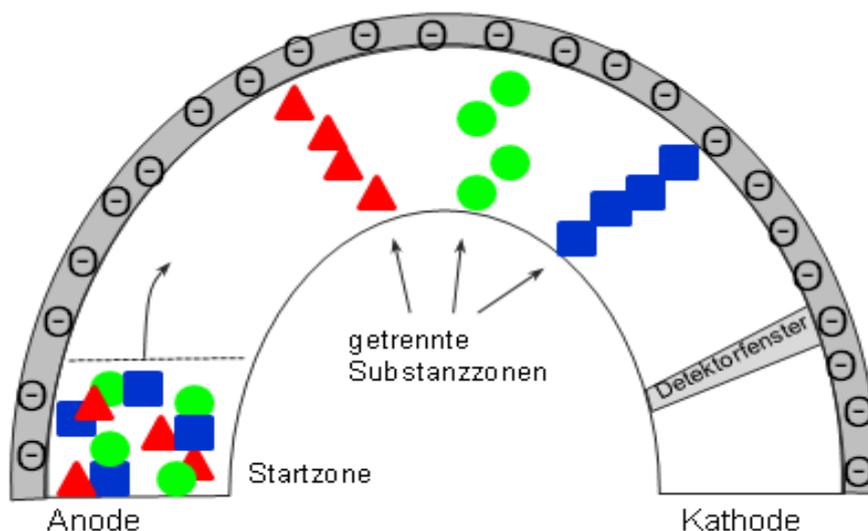


Abbildung 10 Schematische Darstellung der CZE

1.6.2.2 Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (MEKC)

Terabe et al. [167] führte 1984 die mizellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC) ein. Sie ermöglicht die Auftrennung neutraler Verbindungen mittels CE. Im Vergleich hierzu wandern in der CZE neutrale Probenkomponenten mit dem EOF Richtung Kathode und erscheinen im Elektropherogramm als Gruppenpeak. Grundlage der MEKC ist es, der Elektrolytlösung ein Mizellen bildendes Detergens in Konzentrationsbereichen oberhalb der sogenannten kritischen mizellaren Konzentration ($CMC = \textit{critical micelle concentration}$) zuzusetzen. Dies sind meistens Tenside. Das wegen seiner hohen Wasserlöslichkeit, seiner niedrigen CMC (ca. 8 mmol/L in Wasser) und seiner geringen UV-Absorption am weitesten verbreitete ionische Tensid ist das Natriumdodecylsulfat (SDS). Wie in Abbildung 11 zu sehen ist, setzen sich oberflächenaktive Verbindungen aus einem hydrophilen und hydrophoben Teil zusammen.

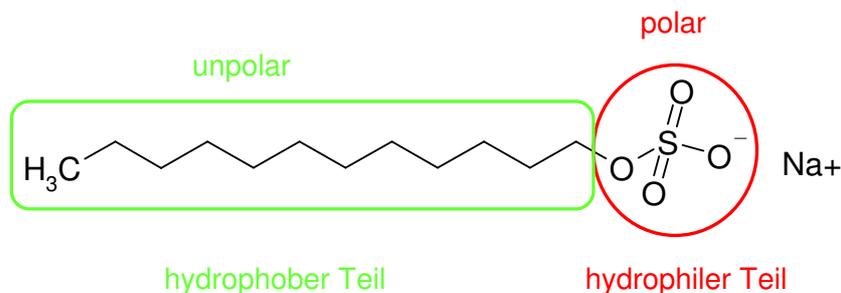


Abbildung 11 Struktur eines SDS Moleküls

Die sich daraus bildenden Mizellen sind im inneren hydrophob und nach außen hin geladen, so dass sie beim Anlegen eines elektrischen Feldes eine Eigenmobilität aufweisen. Die neutralen Analyten werden durch unterschiedliche Aufenthaltswahrscheinlichkeiten – bedingt durch die Verteilungskoeffizienten – in der wässrigen bzw. mizellaren Phase des Elektrolyten getrennt.

Folglich halten sich polare neutrale Stoffe bevorzugt im wässrigen Puffer auf und wandern zusammen mit dem EOF in Richtung Kathode. Im Gegensatz dazu halten sich unpolare neutrale Stoffe fast ausschließlich im Inneren der Mizelle auf und erreichen mit deren Geschwindigkeit den Detektor. Da die Mizellen negativ geladen sind, wandern sie zwar aufgrund des endosmotischen Flusses in Richtung Kathode, werden aber durch ihre Elektromigration in Richtung Anode gebremst. Die Analytmoleküle können durch unterschiedliche Affinitäten zu den Mizellen getrennt werden. In Abbildung 12 ist die Trennung mittels MEKC schematisch dargestellt.

Die mizellare elektrokinetische Chromatographie beschränkt sich nicht nur auf die Trennung neutraler Analyten, sondern wird auch zur Selektivitätserhöhung bei der Trennung geladener Verbindungen oder bei chiralen Trennaufgaben eingesetzt. Für die chirale Analytik mittels MEKC ist die Zugabe chiraler Selektoren wie Cyclodextrine, chirale Kronenether oder Gallensäurederivate zum Trennpuffer erforderlich.

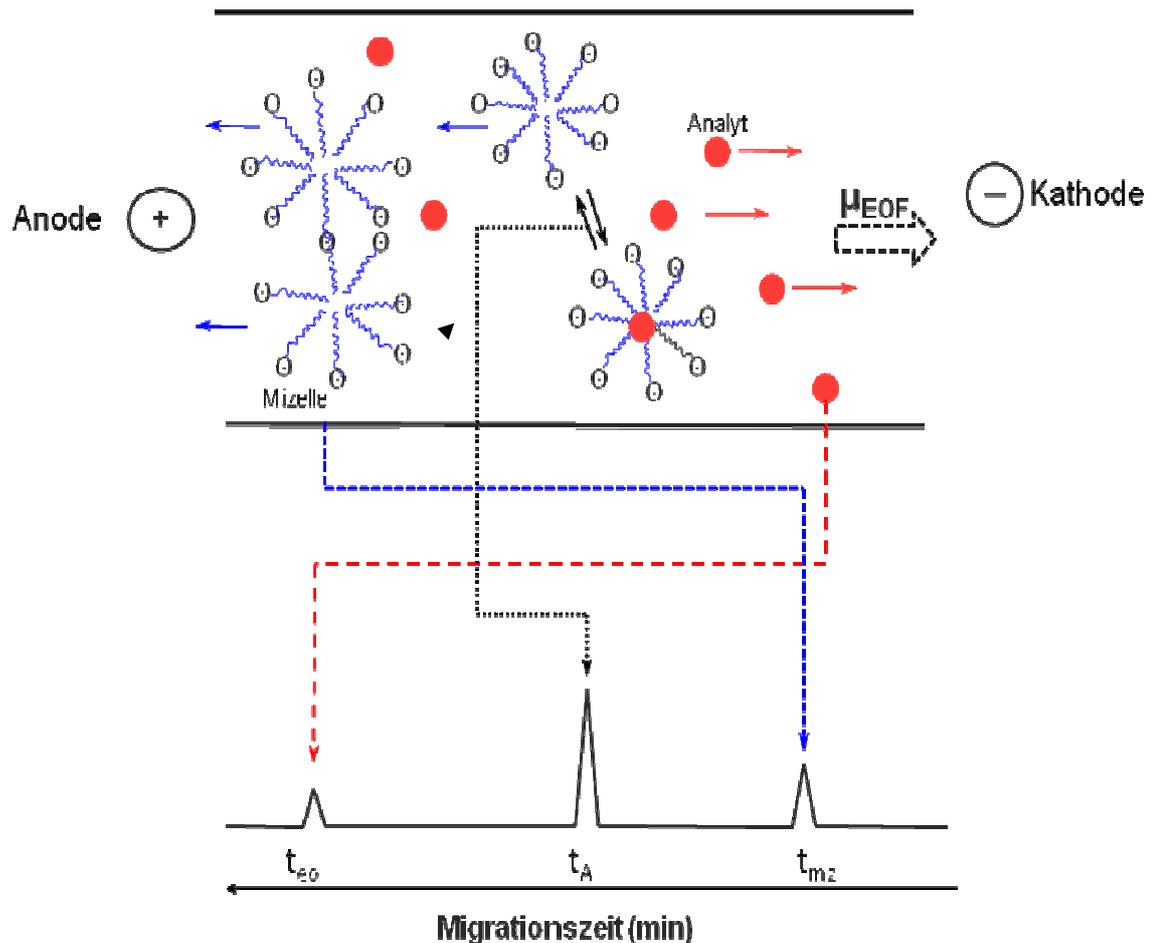


Abbildung 12 Schematischer Ablauf der MEKC

1.6.2.3 CZE mit „sample stacking“

In der Kapillarelektrophorese treten aufgrund geringer Druckdifferenzen und kurzer Injektionszeiten Probleme in der Reproduzierbarkeit auf. Die Injektion größerer Probenvolumina vermindert durch Überladung der Kapillare die Effizienz der Trennung. Durch eine Aufkonzentrierung der Probenbestandteil vor der eigentlichen Trennung ist es möglich, größere Volumina zu injizieren, ohne dass es zu gravierenden Effizienzverlusten in der Trennung kommt. Um dies zu erreichen, können unterschiedliche Verfahren zur Anreicherung der Probe in der Kapillare angewandt werden.

Eine Möglichkeit ist das „Elektro-Stacking“, dabei wird durch den Einsatz diskontinuierlicher Puffersysteme ein Konzentrierungseffekt erreicht.

Effektiver ist jedoch das in diesem Kapitel beschriebene „Sample Stacking“. Bei dieser Technik wird im Anschluss an die Probeninjektion das elektrische Feld für kurze Zeit in entgegengesetzter Richtung angelegt.

Während der inversen Polung wird die Proben Lösungsmittel wieder aus der Kapillare entfernt, die Analyten bleiben jedoch in der Kapillare. Voraussetzung ist jedoch, dass die zu analysierenden Ionen entgegen dem EOF wandern, damit sie nicht mit der Probenlösung wieder aus der Kapillare strömen. Diese Ionen werden zudem an der Grenzschicht zwischen Probenlösung und Trennpuffer aufkonzentriert. Kurz bevor diese Grenzschicht den Kapillaranfang erreicht, wird das elektrische Feld wieder umgepolt und die eigentliche Trennung beginnt.

In Abbildung 13 wird das Prinzip des „Sample Stacking mit Feldumkehr“ schematisch dargestellt.

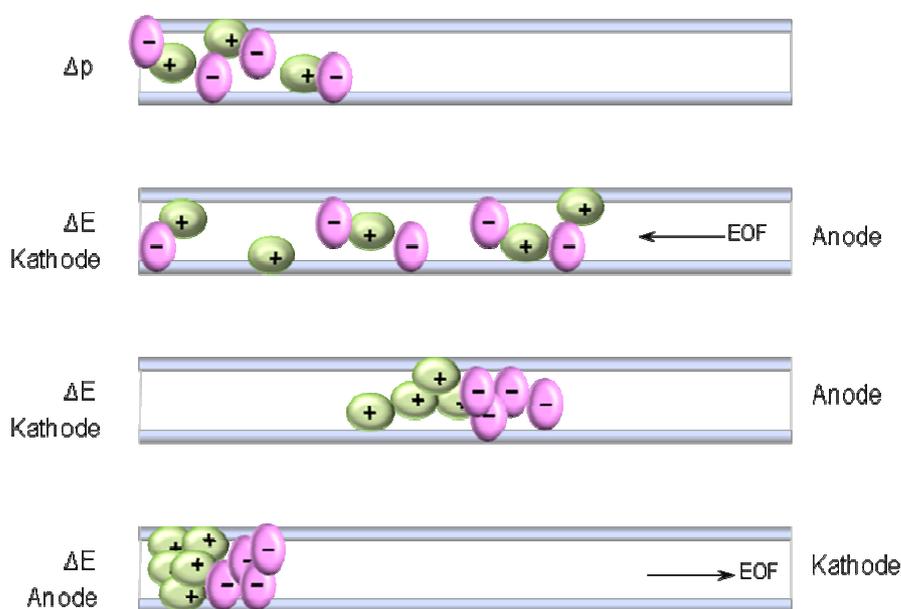


Abbildung 13 Schematische Darstellung des „Sample Stacking“ Prinzips

Bedingt durch das große Injektionsvolumen, das eingesetzt werden kann, können die Analytionen bis auf das Tausendfache aufkonzentriert werden. Der positive Aspekt an diesem Verfahren ist, dass eine bessere Reproduzierbarkeit erreicht werden kann und auch die Empfindlichkeit gesteigert wird.

Der Nachteil des „Sample Stacking“ liegt insbesondere darin, dass im Falle einer zu späten Umpolung die Analytionen teilweise aus der Kapillare heraus wandern. Diese Ionen gehen folglich verloren und werden analytisch nicht erfasst. Eine

quantitative Bestimmung wäre unter solchen Umständen mit einem systematischen Fehler belastet.

1.6.3 Chirale Analytik mittels CE

Um Analyten chiral trennen zu können, bedarf es einer chiralen Umgebung. In der CE kann ein solches Umfeld durch den Zusatz chiraler Selektoren zum Puffer geschaffen werden. Chirale Selektoren sind optisch aktive Verbindungen, die eine pseudostationäre Phase in der Trennlösung bilden. Das Prinzip der chiralen Trennung basiert auf der unterschiedlichen Verteilung der Enantiomeren zwischen Elektrolytlösung und dem chiralen Selektor. Infolgedessen kann bei diesem Trennverfahren auch von einem chromatographischen Prozess gesprochen werden.

Enantiomere sind in all ihren chemischen sowie physikalischen Eigenschaften identisch. Sie unterscheiden sich in ihrer räumlichen Anordnung sowie in ihrer optischen Aktivität. Die räumlichen Unterschiede sind für eine Trennung der Enantiomeren wesentlich, denn auf Grund ihrer sterischen Divergenz treten sie unterschiedlich stark mit dem chiralen Selektor in Wechselwirkung.

Da die eingesetzten Selektoren ebenfalls chiral sind, entstehen bei der Wechselwirkung mit einem Enantiomer kurzzeitig Diastereomerenkomplexe. Folglich gibt es zwei Möglichkeiten einer Enantiomerentrennung in der CE:

1. Trennung aufgrund unterschiedlicher Bindungskonstanten K ($K_R \neq K_S$), aber mit gleicher Mobilität der Diastereomerenkomplexe ($\mu_{cR} = \mu_{cS}$)
2. Trennung aufgrund unterschiedlicher Mobilität der Diastereomerenkomplexe ($\mu_{cR} \neq \mu_{cS}$), aber mit gleicher Bindungskonstante der Enantiomeren ($K_R = K_S$)

Diese beiden Trennmechanismen treten meistens gemeinsam auf oder überlagern sich gegenseitig [33].

In der CE werden verschiedene chirale Selektoren verwendet. Die meisten dieser Selektoren sind wasserlöslich und lassen sich dem Trennpuffer zusetzen. Die in der Kapillarelektrophorese am häufigsten eingesetzten Selektoren sind die Cyclodextrine (CD) und ihre Derivate. Aufgrund ihrer Modifikationsmöglichkeiten bieten sie einen breiten Anwendungsbereich in der kapillarelektrophoretischen Analytik.

1.6.3.1 Native Cyclodextrine

Native Cyclodextrine sind zyklische Oligosaccharide. Sie sind aus mehreren D-(+)-Glucopyranoseeinheiten aufgebaut, die über eine α -[1-4] glykosidische Bindung mit einander verknüpft sind. Abhängig von der Anzahl der Glucoseeinheiten wird von α -Cyclodextrin (6 Glucoseeinheiten), β -Cyclodextrin (7 Glucoseeinheiten) oder γ -Cyclodextrin (8 Glucoseeinheiten) gesprochen. In Abbildung 14 ist die chemische Struktur des γ -Cyclodextrins dargestellt.

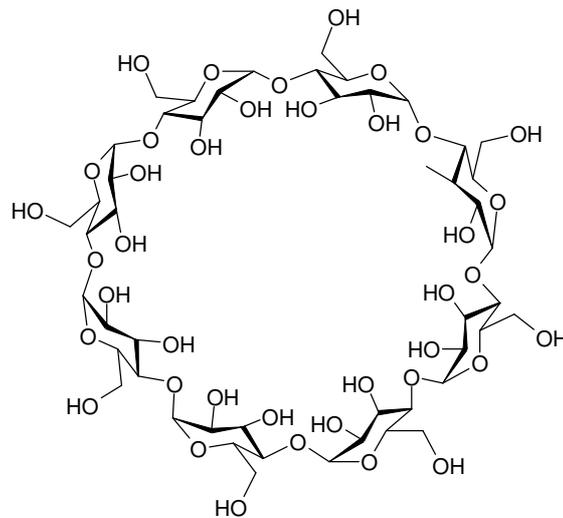


Abbildung 14 Chemische Struktur des γ -Cyclodextrins

Bei räumlicher Betrachtung der Cyclodextrinmoleküle ist zu erkennen, dass sie die Form eines Kegelstumpfes besitzen der im Inneren einen Hohlraum aufweist (Abbildung 15).

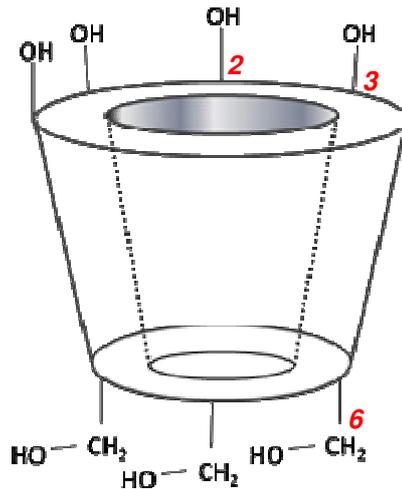


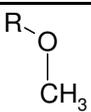
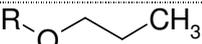
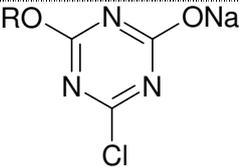
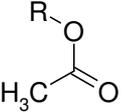
Abbildung 15 Toroidale Struktur eines Cyclodextrinmoleküls

Aufgrund der Lage der Glucose-Bausteine im Cyclodextrin-Molekül und vor allem durch die primären Hydroxylgruppen, die wegen der freien Drehbarkeit des Kohlenstoff-Atoms 6 zeitweilig zum Hohlraum ausgerichtet sind, ergibt sich diese toroidale Struktur. Die am oberen, weiteren Rand des Cyclodextrin-Moleküls liegenden sekundären Hydroxylgruppen (an C-2 und C-3) sind nicht beweglich, so dass das Cyclodextrin-Molekül nur im unteren Teil schmaler wird. Durch die Wechselwirkungen der Hydroxylgruppen an C-2 und C-3 benachbarter Glucose-einheiten, ist die Struktur der Cyclodextrine relativ stabil. Die Kavität der Cyclodextrine ist aufgrund der glykosidisch gebundenen Sauerstoffatome und der Methin-Protonen am C-3 und C-5 hydrophob. Der äußere Bereich ist hydrophil. Folglich ist es den Cyclodextrinen möglich, Einschussverbindungen mit apolaren Substanzen einzugehen. Infolge der hydrophilen Außenfläche ist es jedoch auch möglich, dass polare Analyten mit den Cyclodextrinen wechselwirken. In Abschnitt 1.6.3.3 wird etwas genauer auf die Art der Wechselwirkungen eingegangen.

1.6.3.2 Derivatisierte Cyclodextrine

Um Eigenschaften wie Wasserlöslichkeit und Reaktivität der Cyclodextrine zu verbessern, können sie modifiziert werden. Dies erfolgt durch Substitution der OH-Gruppen der Glucosemoleküle mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen, wie z.B. Sulfat-, Hydroxyether-, Carbonyl- und Aminogruppen. In Tabelle 3 sind einige Cyclodextrinderivate und ihre Eigenschaften aufgelistet.

Tabelle 3 Cyclodextrinderivate und ihre Eigenschaften

Derivat	Substituent	Eigenschaften
Methyl-Cyclodextrin (Me-CD)		Gute Wasserlöslichkeit Gute Lösungsvermittlung
Hydroxypropyl-Cyclodextrin (HP-CD)		hydrophober Reagenzien in wässrigen Medien Löslich in organischen Lösungsmitteln
Monochlorotriazenyl-β-Cyclodextrin (MCT-β-CD)		Reaktiv
Acetylcyclodextrin (Ac-CD)		Biologisch abbaubar

Für eine selektive Modifizierung der Cyclodextrine ist die Nucleophilie der drei unterschiedlichen Arten von Hydroxylgruppen bedeutsam. Die basischen Eigenschaften der OH-Gruppen an C-6 sind am stärksten ausgeprägt, weshalb sie als Nucleophile wirken. Die Hydroxylgruppen am C-2 reagieren dagegen eher sauer und werden daher als erste deprotoniert. Die Hydroxylgruppen am C-3 lassen sich am schlechtesten derivatisieren.

Insbesondere wird durch die Modifizierung die Löslichkeit beeinflusst. Zusätzlich verändert sich aber auch noch die Kavitätsgröße. Somit können beispielsweise Moleküle, die aufgrund ihrer Größe keine Wechselwirkungen mit nativen Cyclodextrinen eingehen können, mit einem derivatisierten Cyclodextrin komplexieren. In Abhängigkeit der eingesetzten funktionellen Gruppen können geladene Cyclodextrine entstehen, die dann beispielsweise gegen den EOF migrieren, wodurch sich auch neutrale Moleküle auftrennen lassen [31].

1.6.3.3 Enantiomerentrennung mit Hilfe von Cyclodextrinen

Wie bereits in den vorangegangenen Abschnitten erwähnt wurde, gehen die Enantiomere mit den Cyclodextrinen Komplexe ein, welche auch als Wirt-Gast-Komplexe bezeichnet werden [76]. Dabei werden die Cyclodextrinmoleküle als Wirt und die Analytverbindungen als Gast bezeichnet. Das Gastmolekül ist stets bestrebt, sich so in die Kavität der Cyclodextrine einzulagern, dass die Summe der Wechselwirkungskräfte maximal ist. Die gesamte Wechselwirkung kann sich aus van-der-Waals-Kräften, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken und hydrophoben Wechselwirkungen zusammensetzen. Dipole von Gast und Wirt werden immer bestrebt sein, eine anti-parallele Ausrichtung anzunehmen [80]. Hydrophobe und van-der-Waals-Wechselwirkungen treten insbesondere im Inneren der Cyclodextrin-Kavität auf. Diese Wechselwirkungen können, je nach Art der Substitution der OH-Gruppen, auch zwischen den Substituenten und dem Gastmolekül beobachtet werden.

Zusätzlich zu der Art und Weise, wie sich das Gastmolekül in die Cyclodextrin-Kavität einlagern kann, ist die Stabilitätskonstante (K_C) des ausgebildeten Komplexes ein weiterer wichtiger Parameter, um eine gute Enantiomerentrennung zu erreichen [75].

Bezüglich der Ladung des eingesetzten Cyclodextrins können in der Kapillarelektrophorese drei Fälle unterschieden werden: neutral, positiv oder negativ geladene Cyclodextrine. Eine weitere Differenzierung ist nach dem pH-Wert des Hintergrundelektrolyten (BGE) möglich. Diese Parameter sind für das Migrationsverhalten des Analyten ausschlaggebend. Bei der Verwendung neutraler Cyclodextrine tragen diese nicht zum aktiven Transport der Analyten bei, sondern verhalten sich wie eine quasi stationäre Phase. Basische Analyten sind bei saurem pH-Wert des Hintergrundelektrolyten selbst positiv geladen und wandern mit ihrer Eigenmobilität zur Kathode. Saure Analyten liegen in basischem BGE mit negativer Ladung vor. Da infolge des basischen pH-Wertes der Pufferlösung der EOF entsteht, werden die negativ geladenen Analyten mit dem EOF in Richtung Kathode transportiert.

Ist das Cyclodextrin positiv geladen, so wandert es aus elektrophoretischen Gründen zur Kathode und trägt so aktiv zum Transport der Verbindung bei. Der komplexierte Analyt nutzt das Cyclodextrin als „Transportmittel“.

Negativ geladene Cyclodextrine wandern allerdings entsprechend ihrer elektrophoretischen Mobilität in Richtung Anode. In dem Fall würden eingelagerte Moleküle den Detektor nie erreichen. Nur unter der Bedingung eines alkalischen BGE, liegt ein so starker EOF vor, dass die negativ geladenen Cyclodextrin-Analyt-Komplexe Richtung Kathode wandern und zum Detektor gelangen können.

Die Abbildungen 16 und 17 veranschaulichen das Prinzip der Enantiomerentrennung einerseits aufgrund unterschiedlicher Komplexbildungskonstanten (Abbildung 16) und andererseits aufgrund unterschiedlicher Mobilitäten der S-Cyclodextrin- bzw. R-Cyclodextrin-Komplexe (Abbildung 17).

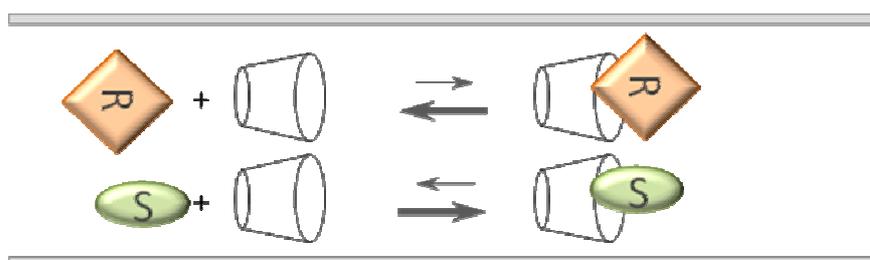


Abbildung 16 Schematische Darstellung der Enantiomerentrennung aufgrund unterschiedlicher Komplexbildungskonstanten zwischen R- bzw. S-Analyt und Cyclodextrin.
Verändert nach [48]

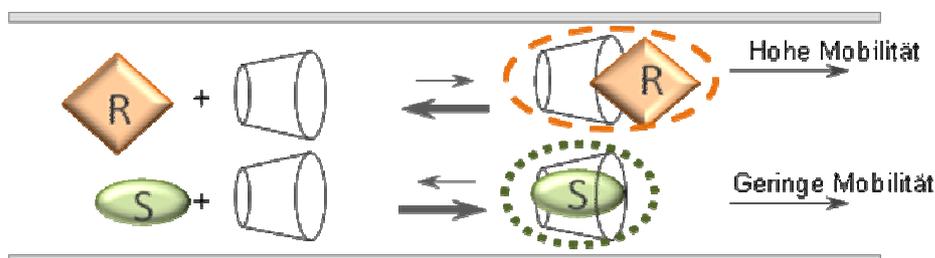


Abbildung 17 Schematische Darstellung der Enantiomerentrennung aufgrund unterschiedlicher Mobilitäten der S- bzw. R-Cyclodextrin-Komplexe. Verändert nach [48]

1.6.4 Optimierungsparameter in der chiralen Analytik mittels CE

Die Suche nach dem passenden und erfolgversprechenden Selektor stellt ein Problem bei der Entwicklung chiraler Trennmethode dar. Bei den Cyclodextrinen gibt es noch keine Möglichkeit vor auszusehen, welches Cyclodextrin eine chirale Erkennung eines bestimmten Analyten leisten wird, da es in der Analytik bislang keine grundlegenden Erkenntnisse über den Mechanismus der Komplexbildung zwischen Cyclodextrin und den verschiedenen funktionellen Gruppen gibt. Somit ist man bei der Wahl der chiralen Selektoren zunächst auf eine Literaturrecherche angewiesen.

Aber nicht nur die Wahl des chiralen Selektors ist ausschlaggebend für eine erfolgreiche Trennung chiraler Verbindungen, sondern auch alle anderen kapillarelektrophoretischen Faktoren spielen eine Rolle.

Zu diesen Faktoren zählen die Wahl des Trennpuffers und seine Konzentration, pH-Wert sowie der Zusatz von Pufferadditiven, wie organische Lösungsmittel oder Mizellbildner. Auch die Konzentration des Selektors ist von großer Bedeutung. Daher muss jeder dieser Parameter systematisch untersucht und dem Analyten angepasst werden, was im Folgenden gezeigt wird.

Wahl des Hintergrundelektrolyten

Grundsätzlich ist die Wahl des Elektrolyten abhängig von dem gewünschten pH-Wert. In Tabelle 4 ist aufgelistet, welche Puffer für die entsprechenden pH-Bereiche empfohlen werden [48].

Häufig wird die Effizienz der Trennung durch höhere Elektrolytkonzentrationen verbessert. Dieser Effekt hängt von der elektrophoretischen Mobilität des Puffers und des Analyten ab. Je ähnlicher ihre elektrophoretische Mobilitäten sind, umso gleichmäßiger ist die elektrische Feldstärke in der Kapillare und die erhaltenen Peaks haben eine einheitliche symmetrische Form, was zu einer effizienteren Trennung führt. Weitere Effekte, die auf höhere Elektrolytkonzentrationen zurückzuführen sind, wurden bereits in Abschnitt 1.6.2.1 erläutert.

Tabelle 4 Auswahl des Puffersystems in Abhängigkeit des pH-Wertes [48]

pH-Bereich	Puffersystem	Säure	Base
2,0 – 3,0	Phosphat	H_3PO_4	KH_2PO_4
6,0 – 8,0	Phosphat	NaH_2PO_4	Na_2HPO_4
3,5 – 5,5	Acetat	CH_3COOH	CH_3COONa
8,0 – 9,0	Borat	H_3BO_3	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$
9,5 – 10,0	Borat	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$	NaOH

pH-Wert

Der pH-Wert wird meistens so eingestellt, dass die Analyten in geladener Form vorliegen. Bei neutralen Analyten orientiert sich die pH-Wert Einstellung an der gewünschten Größe des EOF und bei chiralen Trennungen mit Cyclodextrinen zusätzlich an der Ladung der Cyclodextrine.

Wahl und Konzentration des chiralen Selektors

Es werden zunächst unterschiedliche verfügbare Cyclodextrine auf ihren Trennungseffekt hin untersucht. Cyclodextrine erzielen insbesondere bei Analyten mit einem aromatische Ring oder partial hydrophoben Teilen einen guten Effekt in der chiralen Trennung. Bei geladenen Analyten können zunächst ungeladene Cyclodextrine eingesetzt werden, bei neutralen Analyten müssen geladene Cyclodextrine ausgewählt werden. Zeigen weder die nativen noch die modifizierten Cyclodextrine eine chirale Erkennung, müssen andere Selektoren getestet werden. Tabelle III im Anhang gibt einen Überblick über die wichtigsten Klassen chiraler Selektoren mit ihren möglichen Anwendungsbereichen.

Die zu trennenden Verbindungen besitzen unterschiedliche Optima bezüglich der Cyclodextrin-Konzentrationen. Ein überschreiten dieses Optimums führt zu einer Verschlechterung der chiralen Trennung.

Trennungsspannung

Das Anlegen höherer Spannungen verbessert einerseits die Effizienz, andererseits wird dadurch mehr Joule'sche Wärme verursacht, was wiederum zu Bandenverbreiterungen führen kann [128].

Kapillartemperatur

Bei den meisten kapillarelektrophoretischen Systemen besteht die Möglichkeit, die Kapillare und die Proben in einem Bereich von 15 – 60 °C zu temperieren. Durch niedrige Temperaturen erhöht sich die Viskosität des Trennpuffers, wodurch sich die Bandenverbreiterung durch Diffusion reduziert. Außerdem erreicht man mit niedrigeren Temperaturen bessere Selektivitäten, da der Analyt sich, aufgrund reduzierter Löslichkeit im Puffer, länger komplexiert im Cyclodextrin aufhält. Erfahrungsgemäß sind Temperaturen zwischen 20 – 25 °C optimal.

Pufferzusätze

Dem Trennpuffer können Additive, wie z.B. organische Lösungsmittel, Komplexbildner, Tenside etc. zugesetzt werden. Vielfach verbessert sich dadurch die Selektivität des chiralen Selektors. Durch den Einsatz solcher Pufferadditive wird die chirale Wirkung des Selektors beeinflusst. Genaueres über die Wirkung der Additive kann bisher nicht gesagt werden. Ihre Wirkung wird auf mögliche Veränderungen des pK_a -Wertes und der Solvation des Analyten zurückgeführt [177].

1.7 HPLC mit elektrochemischer Detektion

Elektrochemische Detektoren sind bereits seit den 50er Jahren bekannt, fanden jedoch wenig Anklang in der Analytik, da das verwendete Prinzip der Polarografie als zu umständlich galt [6]. Heutzutage sind sie technisch so weit ausgereift, dass sie zu den Detektoren mit der höchsten Selektivität und der höchsten Empfindlichkeit zählen.

1.7.1 Grundlagen der elektrochemischen Detektion

Bei der elektrochemischen Detektion werden das Oxidations- bzw. das Reduktionsvermögen chemischer Substanzen für ihren Nachweis ausgenutzt. Innerhalb der elektrochemischen Detektion werden fünf Techniken unterschieden:

1. Leitfähigkeits-Detektoren
2. Dielektrizitätskonstante-Detektoren
3. Potentiometrische Detektoren
4. Amperometrische Detektoren
5. Coulometrische-Array-Detektoren

In Tabelle 5 werden amperometrischer- und coulometrischer Detektor gegenübergestellt.

Tabelle 5 Vergleich von amperometrischem und coulometrischem Detektor [7]

Amperometrische Dünnschichtzelle	Coulometrische Graphit- Durchflusszelle
* Umsatz 2-10%	* Umsatz 100%
* Umsatzrate flussabhängig	* Umsatzrate weitgehend unabhängig vom Fluss
* Gutes Signal-Rausch-Verhältnis	* Gutes Signal-Rausch-Verhältnis
* Geringe Stabilität	* Sehr gute Stabilität
* Langsame Äquilibration	* Schnelle Äquilibration
* Nur eingeschränktes Screening	* Screening möglich
* Verschiedene Elektrodenmaterialien	* Ausschließlich poröse Graphitelektrode
* Zellvolumen variabel	* Zellvolumen nicht variabel

Die amperometrischen und coulometrischen Detektoren arbeiten in der Regel nach der 3-Elektrodenteknik. Das bedeutet, dass zwischen einer Arbeitselektrode (AE) und einer Hilfselektrode (HE) ein Strom fließt. Mit Hilfe einer Referenzelektrode (RE) wird das Potential der HE festgelegt. Der Spannungsabfall zwischen AE und HE kann über einen Potentiostaten kompensiert werden [162].

Werden Analyten in einer elektrochemischen Zelle umgesetzt, fließt zusätzlich ein Faraday'scher Strom. Dieser ist direkt proportional zu der Reaktionsgeschwindigkeit der Elektrodenreaktion, welche sowohl von der Konzentration des Analyten sowie von dem gewählten Potential abhängt [22]. Der entstehende Strom wird elektrisch verstärkt und kann dann von einem Messgerät als elektrisches Signal erfasst werden.

Da nur eine begrenzte Anzahl an funktionellen Gruppen und chemischen Strukturen einem Redoxprozess bei einem bestimmten Arbeitspotential zugänglich sind, zeichnet sich die elektrochemische Detektion neben hoher Empfindlichkeit auch durch hohe Selektivität aus.

Im Aufbau der Durchflusszellen gibt es insbesondere große Unterschiede in der Form der AE und ihrer Anordnung bezüglich der Strömungsrichtung des Eluenten. Abbildung 18 zeigt mögliche Zelltypen, die auch zum größten Teil Anwendung finden.

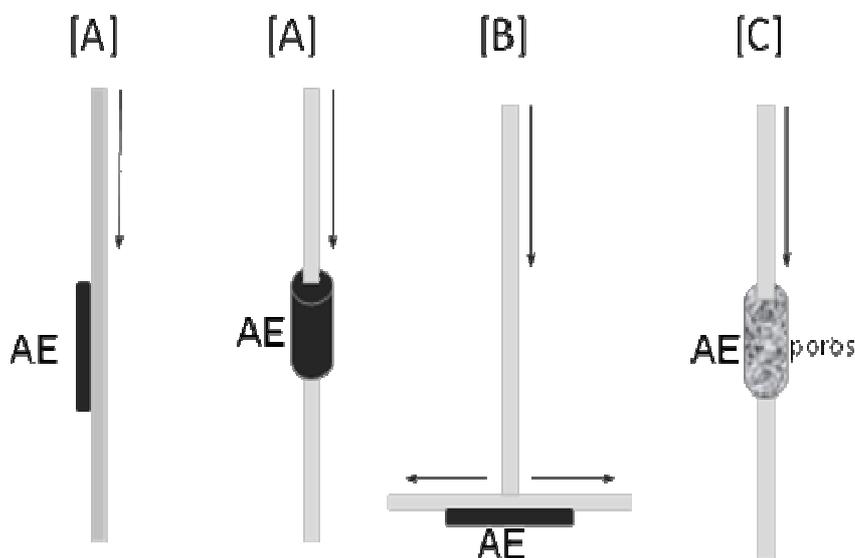


Abbildung 18 Verschiedene Zelltypen elektrochemischer Detektoren. [A] Dünnschichtzellen planar oder röhrenförmig, [B] Wall-Jet-Zelle, [C] Durchflusszelle mit poröser AE

Bei der Dünnschicht-Zelle wird der Eluentenstrom parallel über die AE geleitet. Die Oberfläche der AE kann dabei entweder planar sein oder röhrenförmig (Abbildung 18 [A]). Bei der Wall-Jet-Zelle trifft der Eluentenstrom senkrecht auf die AE (Abbildung 18 [B]). Diese beiden Zelltypen haben aufgrund der geringen Diffusion des Analyten zur Elektrode nur eine sehr geringe Umsatzrate (2-10%) [164]. Durch Oberflächenvergrößerung der Elektroden kann der Umsatz gesteigert werden. Infolgedessen wird bei einer Durchflusszelle (Abbildung 18 [C]), bei der der Fluss des Eluenten durch eine poröse AE hindurch fließt, eine wesentlich größerer Umsatzrate erreicht. Ein Umsatz von 100% kann nur durch coulometrisch arbeitende Detektoren erreicht werden.

1.7.2 Prinzip des coulometrischen Elektrodenarray Detektors

Die Verwendung von Multielektrodenarray Detektoren beinhaltete zu Beginn der Entwicklung gewisse Schwierigkeiten. Insbesondere traten Probleme hinsichtlich der Aufrechterhaltung der potentiostatischen Kontrolle über das Array auf [51].

1984 gelang es einem US-amerikanischen Arbeitskreis einen coulometrischen 16-Kanal Array Detektor zu entwickeln [112, 113]. Jede Arbeitselektrode besitzt in diesem System eine eigene Hilfs- und Referenzelektrode und wird über einen eigenen Potentiostaten angesteuert.

Dieses Prinzip liegt in überarbeiteter Form dem in dieser Arbeit eingesetzten coulometrischen Elektrodenarray-Detektor (CEAD) zugrunde. Das Besondere bei dieser Messtechnik ist ihre sehr gute Empfindlichkeit. Diese kann bis zu drei Zehnerpotenzen besser sein als bei der UV-Detektion. Dadurch wird eine Analytik in sehr niedrigen Konzentrationsbereichen möglich.

In Abbildung 19 wird der schematische Aufbau einer elektrochemischen Zelle dargestellt. Der CEAD kann aus bis zu 16 coulometrisch arbeitenden Elektroden bestehen, die in Reihe geschaltet sind und von denen jeweils vier Elektroden in einem Block zusammen gefasst werden.

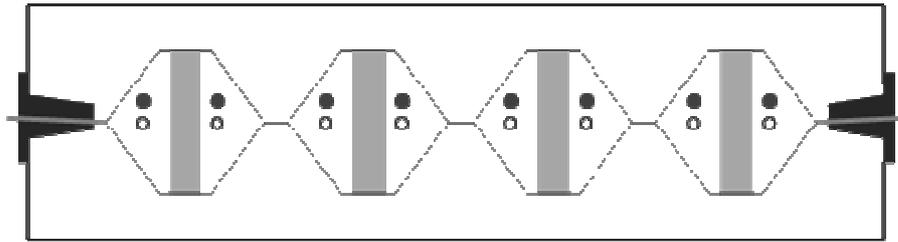


Abbildung 19 Elektrochemische Zelle eines coulometrischen Elektrodenarray Detektors, mit vier coulometrischen Elektroden in Reihe
 Grau: Arbeitselektrode aus Graphit; Schwarz: Palladium Referenzelektrode;
 Weiß: Hilfelektrode aus Platin

Als Arbeitselektrode wird eine Durchflusszelle aus porösem Graphit verwendet. Aufgrund der Porosität hat die Elektrode eine relativ große Oberfläche, die einen quantitativen Umsatz des Analyten gewährleistet [164]. Bezüglich des Totvolumens, der Bandenverbreiterung und der Druckeigenschaften ist die Arbeits-elektrode so konzipiert, dass nur minimale Verschlechterungen der Trennung am letzten Sensor des Arrays und nur geringe Retentionszeit-Verschiebungen auftreten [113]. Die Hilfelektroden und die Referenzelektroden sind aus Palladium bzw. Platin.

Für jede einzelne Elektrode des CEAD kann ein eigenes individuelles Potential gewählt werden, welches zwischen -1000 mV und 2000 mV liegt. Jede Elektrode liefert somit ein eigenes Chromatogramm. Werden die Potentiale von Elektrode zu Elektrode erhöht, können substanzspezifisch hydrodynamische Voltamogramme erstellt werden, die eine dreidimensionale Auflösung eines Signals liefern. Die Voltamogramme sind für jede Substanz charakteristisch. Sie können somit zusätzlich zur Retentionszeit als Identifizierungsmöglichkeit und Signalkontrolle genutzt werden. Meistens werden die Potentiale der Elektroden so gewählt, dass eine Substanz nicht nur bei einer Elektrode ein Signal gibt sondern bei mehreren. Dadurch ist die Möglichkeit gegeben, über Verhältnisbildung der Signale benachbarter Elektroden co-eluierende Substanzen zu erkennen [112, 164].

Wird eine Substanz bei niedrigen Potentialen bereits vollständig umgesetzt, so stört diese nicht die folgenden Elektrodensignale. Folglich kann eine zweite Verbindung, die zur gleichen Retentionszeit eluiert aber erst bei höheren Potentialen umgesetzt wird, unabhängig vom ersten Analyten bestimmt werden. Das besondere des CEAD, im Vergleich zu anderen elektrochemischen Detektoren, ist seine Gradiententauglichkeit. Bei Verwendung eines Gradienten ist zu berücksichtigen, dass sich währenddessen die Ionenstärke, der Anteil an organischem Lösungsmittel im Eluenten als auch der pH-Wert verändern. Dies

führt durch Beeinflussung der Leitfähigkeit der mobilen Phase zu einer Drift in der Basislinie. Dies wird beim CEAD durch einen speziellen Algorithmus berücksichtigt und minimiert [7].

Der Einsatz des coulometrischen Elektroden Array Detektors ist inzwischen in vielen Bereichen verbreitet. Insbesondere findet dieses Prinzip Anwendung in der Lebensmittel- und Umweltanalytik, aber auch zunehmend in der pharmazeutischen [185], biologischen und klinischen Analytik.

In einigen Veröffentlichungen wurde der Einsatz des CEAD zur Bestimmung phenolischer Verbindungen in Lebensmitteln und biologischen Matrices bereits gezeigt (Beispiele siehe Tabelle III Anhang).

Aufgrund seiner Empfindlichkeit wird der CEAD immer häufiger zur Analyse von Körperflüssigkeiten eingesetzt, da hier die Konzentration der Analyten sehr gering ist [87, 88, 116].

2. Ergebnisse und Diskussion

2.1 Methodenentwicklung zur chiralen Trennung von diastereomeren Flavanonglykosiden in Orangensaft mittels CZE und „Sample Stacking“

Vorversuche mit Hesperidin- und Narirutin-Standards

In Anlehnung an bereits vorangegangene Forschungsarbeiten bezüglich chiraler Trennungen von Flavanonglykosiden von Gel-Moretó (2003) [59] wurden Versuche zur Überprüfung der vorhandenen Methode durchgeführt. Hierzu wurden Standards der in Orangen mengenmäßig dominierenden Flavanonglykoside Hesperidin und Narirutin eingesetzt. Die Konzentration der Standardlösungen betrug 0,2 mg/mL.

Die Ergebnisse von Gel-Moretó konnten nicht nachvollzogen werden, da es zu Beginn jeder Messung zu Spannungsabbrüchen kam. Ursache ist die Injektion von Wasser mit zu geringer Leitfähigkeit vor und nach der Probenaufgabe.

Messungen, bei denen die Injektion eines Wasserpfropfens vor und nach der Probenaufgabe weggelassen wurde, bestätigten dies. Das Injizieren eines Wasserpfropfens vor der eigentlichen Probenaufgabe wird üblicherweise zum Aufkonzentrieren der Analyten innerhalb der Probenzone vorgenommen. Wird die Injektion des Wassers weggelassen, könnte dies zu einer Verschlechterung in der Auftrennung der diastereomeren Flavanonglykoside führen. Folglich wurden weitere Versuche durchgeführt, bei denen das Wasser durch schwach konzentrierte Salzlösungen (NaCl-Lösung, $c = 0,001 \text{ mol/L}$) ersetzt wurde. Unter diesen Umständen bleibt die Leitfähigkeit innerhalb der Kapillare erhalten und relevante Schwankungen in der Stromstärke werden vermieden. Die Ionenkonzentration in der Salzlösung ist dennoch so niedrig, dass der Spannungsabfall so hoch ist, dass die Analyten in der nachfolgenden Probenzone in dem dort vorliegenden, wesentlich stärkeren Feld aufkonzentriert werden.

Eine wesentliche Verbesserung der chiralen Trennung von Hesperidin und Narirutin war jedoch nicht festzustellen. Anhand einer Standardlösung wird deutlich, dass der Wasserpfropfen bzw. der Pfropfen Salzlösung keinen wesentlichen Einfluss auf die Trennung der Flavanonglykoside hat (Abbildung 20). Die Wasserinjektion wurde durch einen so genannten Wasser-Dip ersetzt. Dieser Wasser-Dip hat ausschließlich den Effekt mögliche Verschleppungen von Puffer oder Probe zu vermeiden, indem die Kapillarenden für wenige Sekunden in Wasser eintauchen und dadurch Puffer- oder Probenreste von der Kapillare und den Elektroden entfernt werden. Dies ist auch deswegen wichtig, weil die Flavanonglykoside in alkalischem Medium racemisieren. Bei einer Kontamination

der Probenlösung mit Pufferresten, würde sich im Laufe der Zeit die Konzentration an Flavanonglykosiden verändern [60].

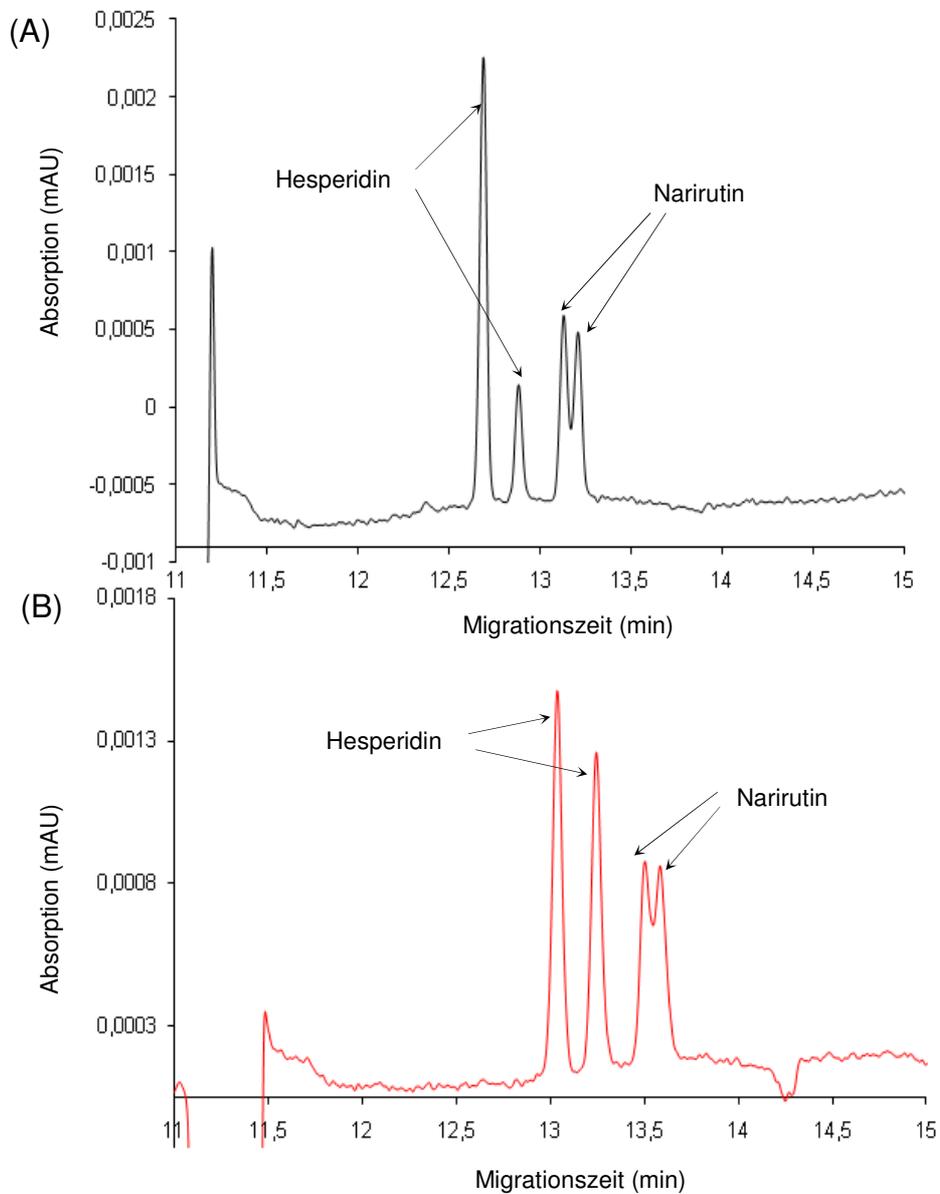


Abbildung 20 *Elektropherogramm einer Standardlösung aus Hesperidin und Narirutin (0,2 mg/mL) nach der Methode von Gel-Moretó (2003) ohne Injektion von Wasser vor der Probenaufnahme [B] und mit Injektion einer NaCl-Lösung vor der Probenaufnahme [A]*

Die Elektropherogramme der Abbildung 20 zeigen eine chirale Trennung des Hesperidins, jedoch nur eine Antrennung des Narirutins. Unter Berücksichtigung der Orangensaftmatrix wird deutlich, dass mit der bereits bekannten CZE-Methode keine ausreichende Trennung der Flavanonglykoside erreicht werden kann. Das Elektropherogramm der Abbildung 21 zeigt, dass die als Hesperidin identifizierten Peaks „Schultern“ aufweisen, was vermuten lässt, dass diese Peaks kein reines Hesperidin darstellen, sondern noch weitere Substanzen beinhalten.

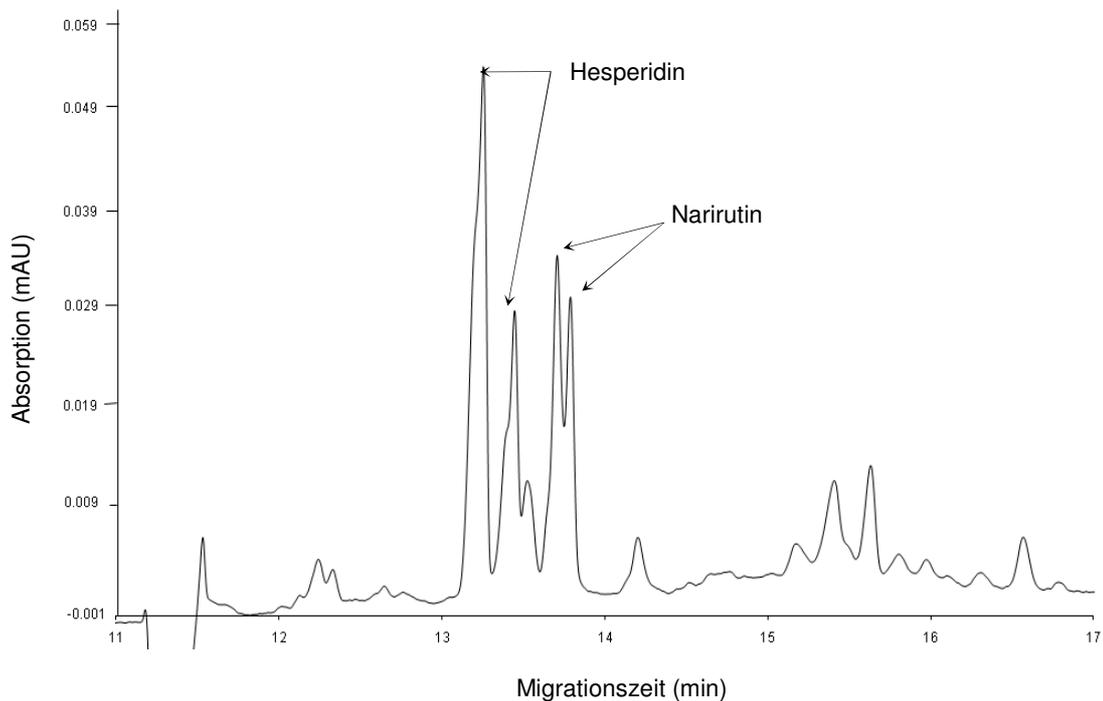


Abbildung 21 *Elektropherogramm eines frisch gepressten Orangensafts aufgearbeitet und vermessen nach der Methode von Gel-Moretó et al.[59]*

Um eine vollständigere chirale Trennung der Flavanonglykoside in Zitrus Säften zu erreichen, wurde sich das Prinzip des „Sample Stackings“ (siehe Abschnitt 1.6.2.3) zu Nutze gemacht.

Festlegen der Ausgangsbedingungen

In vorangegangenen Arbeiten von Mellenthin (1998) [117] und Gel-Moretó (2003) [59] sind bereits ausführliche Untersuchungen bezüglich Wahl und Art der chiralen Selektoren durchgeführt worden. Diese Erkenntnisse wurden als Ausgangsbedingung für die weiteren Methodenentwicklung übernommen. Gleichermaßen wurden auch die Art, Konzentration und der pH-Wert des Hintergrundelektrolyten festgelegt.

In Tabelle 6 sind die Ausgangsbedingungen für die Methodenentwicklung der chiralen Trennung von Flavanonglykosiden in Orangensäften aufgelistet.

Tabelle 6 Ausgangsbedingungen für die Methodenentwicklung zur chiralen Trennung von Flavanonglykosiden mittels „Sample Stacking“

Kapillare	40 cm effektiv Länge; 50 cm Gesamtlänge; 75 µm I.D.
Kapillartemperatur	20 °C
Trennspannung	18 kV
Trennpuffer	100 mM Boratpuffer
pH-Wert des Puffers	pH = 9,0
Chirale Selektoren	15 mM HP-β-CD; 15 mM CM-β-CD
Umkehrspannung	5 kV; 0,3 sec
Puffer Injektion hinter der Probenzone	0,5 psi; 3 sec
Wellenlänge	290 nm

2.1.1 Optimierung der Pufferkonzentration und des pH-Wertes

Wie bereits in Abschnitt 1.6.4 erwähnt, ist die Wahl des Hintergrundelektrolyten abhängig von dem gewünschten pH-Wert.

Um Flavanonglykoside zu trennen, ist ein basischer pH-Wert notwendig, was aus einigen älteren Forschungsarbeiten hervorgeht [9, 11, 29, 134, 165]. Mit der in Tabelle 6 angegebenen Bedingungen und den Standards Hesperidin und Narirutin, wurden Boratpuffer mit drei verschiedenen Konzentrationen (100, 250 und 400 mM) und einem pH-Wert von 9,0 getestet. Um die in Orangensaft vorhandene Hintergrundmatrix bei der Methodenoptimierung mit berücksichtigen zu können, wurde zusätzlich eine aufgearbeitete Orangensaftprobe unter identischen Bedingungen analysiert.

Bei höheren Konzentrationen des Hintergrundelektrolyten ist eine bessere Trennung zu erkennen. Insbesondere ist eine Verbesserung der Trennung des Narirutin zu beobachten. In Abbildung 22 wird deutlich, dass eine weitere Konzentrationserhöhung des Hintergrundelektrolyten offensichtlich nicht mit einer weiteren Verbesserung der Trennleistung korreliert. Eine Erhöhung der Elektrolytkonzentration von 250 mM auf 400 mM zeigt keine Verbesserung der Trennleistung (Abbildung 22 (B) und (C)). Berücksichtigt man noch zusätzlich die Hintergrundmatrix des Orangensaftes, tritt sogar eine Verschlechterung der Trennung ein (Abbildung 22 (b) und (c)). Dies kann dadurch erklärt werden, dass aufgrund hoher Elektrolytkonzentrationen in der Lösung größere Ströme verursacht werden, was zu einer Temperaturerhöhung innerhalb der Kapillare führt (*Joul'sche Wärme*). Die entstehende Wärme wird ausschließlich über die Kapillarwand abtransportiert, wodurch sich ein radialer Temperatur- und Viskositätsgradient im Puffer ausbildet. Die Viskositätsunterschiede, die zwischen Kapillarmitte und Kapillarwand entstehen, führen schließlich zu Migrationsunterschieden und folglich zu einer Bandenverbreiterung und einem Verlust in der Auflösung [48].

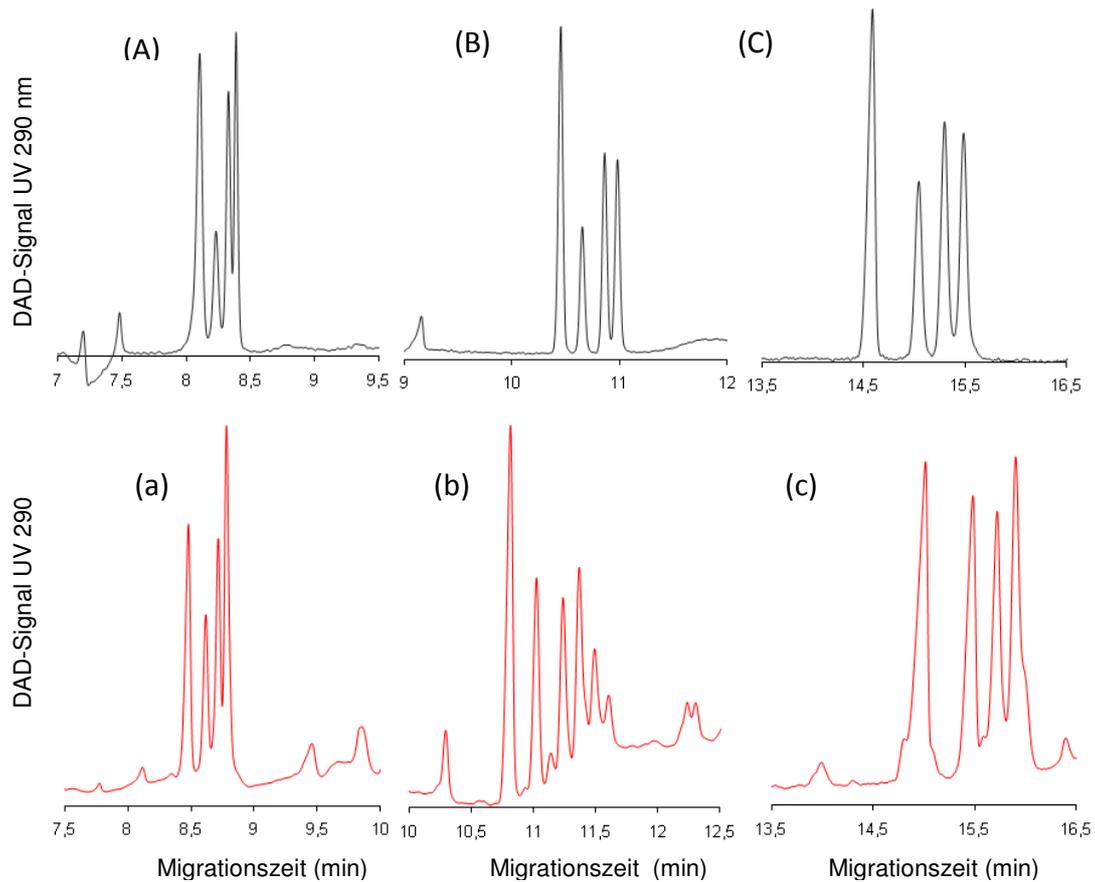


Abbildung 22 Vergleich der Elektropherogramme mit drei unterschiedlichen Pufferkonzentrationen. 1) Standardlösung (Hesperidin + Narirutin): 100 mM Boratpuffer pH 9,0 (A), 250 mM Boratpuffer pH 9,0 (B) und 400 mM Boratpuffer pH 9,0 (C). 2) Orangensaftprobe: 100 mM Boratpuffer pH 9,0 (a), 250 mM Boratpuffer pH 9,0 (b) und 400 mM Boratpuffer pH 9,0 (c)

Nicht zu vernachlässigen ist die Reaktion der im Boratpuffer enthaltenen Boratanionen, die mit phenolischen Verbindungen einen Komplex bilden. Dies geschieht bevorzugt an zwei cis-konfigurierten Hydroxylgruppen benachbarter Kohlenstoffatome [73]. Solche OH-Gruppen liegen bei allen Rutinosiden (z.B. Hesperidin und Narirutin) und Neohesperidosiden (an C-2 und C-3 der Rhamnose) vor. Diese Komplexbildungsreaktion ist stark pH-abhängig und wird insbesondere bei höheren pH-Werten begünstigt.

Um den Einfluss des pH-Wertes zu untersuchen, wurden Trennpuffer mit gleichbleibender Elektrolytkonzentration (250 mM Borat) aber unterschiedlichen pH-Werten (8,5; 9,0 und 10,0) zur Messung einer Standardlösung aus Hesperidin und Narirutin eingesetzt. Zunächst konnte eine Verbesserung der Trennleistung mit zunehmendem pH-Wert beobachtet werden (Abbildung 23). Diese Tatsache

lässt sich dadurch erklären, dass mit zunehmendem pH-Wert der EOF beschleunigt wird und somit die neutralen Cyclodextrine mit sich reißt. Gleichzeitig resultieren auch stärkere negative Ladungen der Flavanone. Die Analytmoleküle verweilen länger in der Kapillare und können besser aufgetrennt werden. Für das Hesperidin lässt sich dieser Effekt über den gesamten geprüften pH-Bereich beobachten. Für Narirutin ist ab einem pH-Wert von 10,0 eine Verschlechterung der chiralen Trennung zu verzeichnen.

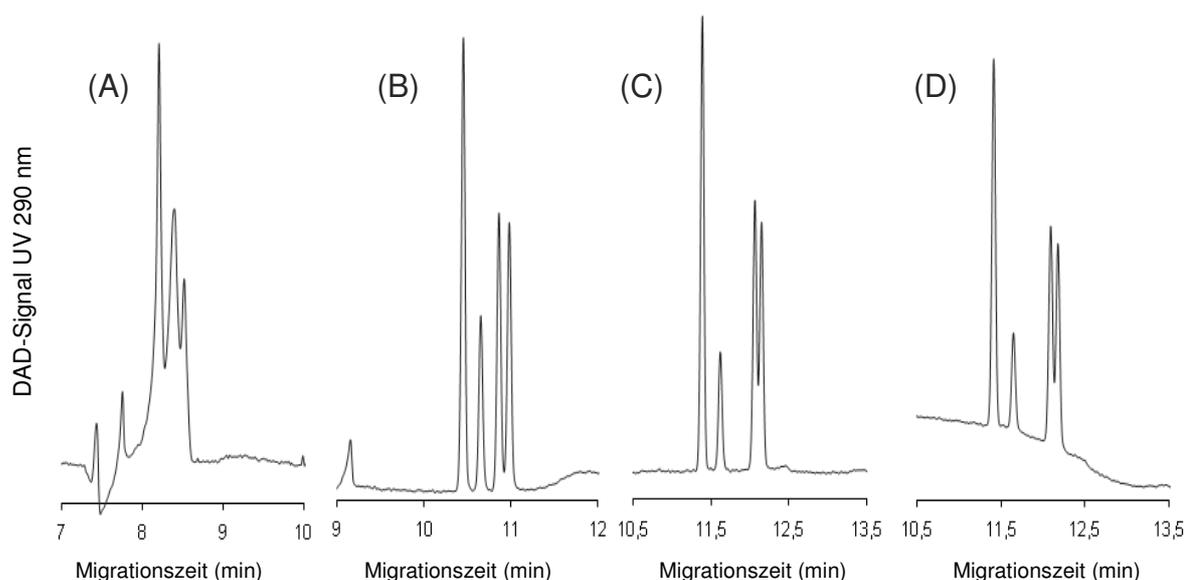


Abbildung 23 Einfluss des pH-Wertes auf die Trennung der 2(R)- und 2(S)-Diastereomere von Hesperidin und Narirutin. 250 mM Boratpuffer mit pH=8,0 (A); pH=9,0 (B); pH=10,0 (C) und pH=11,0 (D)

2.1.2 Auswahl und Anpassung der chiralen Selektoren

Ausgehend von den Ergebnissen der Arbeit von Gel-Moretó (2003) [59], die mittels eines Mischpuffers eine gute Trennung der Flavanonglykoside erreichte, wurden die entsprechenden chiralen Selektoren für die hier vorliegende Arbeit ausgewählt.

Wie bei Gel-Moretó et al. [59, 60, 61] beschrieben wurde, ist eine Mischung aus zwei Cyclodextrinen für die chirale Trennung von Flavanonglykosiden am besten geeignet. Es wurde hierzu ein ungeladenes Cyclodextrin, das Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (HP- β -CD), in Kombination mit einem negativ geladenen

Cyclodextrin eingesetzt (CM- β -CD). Bereits in älteren Veröffentlichungen gibt es Hinweise darüber, dass die Zugabe ionisierter Cyclodextrine eine deutliche Verbesserung der Trennleistung bewirkt [32, 52, 106], da sich die beiden Additive in ihren Wirkungen ergänzen. Neutrale und geladene Cyclodextrine haben eine entgegengesetzte Wirkung auf die Mobilität der Analyten. Bei der Ausbildung von Analyt-CD-Komplexen mit neutralen Cyclodextrinen werden die Flavanonmoleküle beschleunigt. Eine Komplexbildung mit negativ geladenen Cyclodextrinen führt zur Reduzierung der Mobilität. HP- β -CD und CM- β -CD wurden im Verhältnis 1:1 und in unterschiedlichen Konzentrationen (jeweils 1 mM, 1,5 mM, 5 mM, 10 mM und 15 mM für HP- β -CD und CM- β -CD) dem Hintergrundelektrolyten zugesetzt. Als Elektrolytlösung diente in diesem Fall ein 200 mM Boratpuffer mit pH-Wert 9,0. Abbildung 24 zeigt, dass sich die Migrationszeiten mit zunehmender Konzentration an chiralem Selektor verlängern.

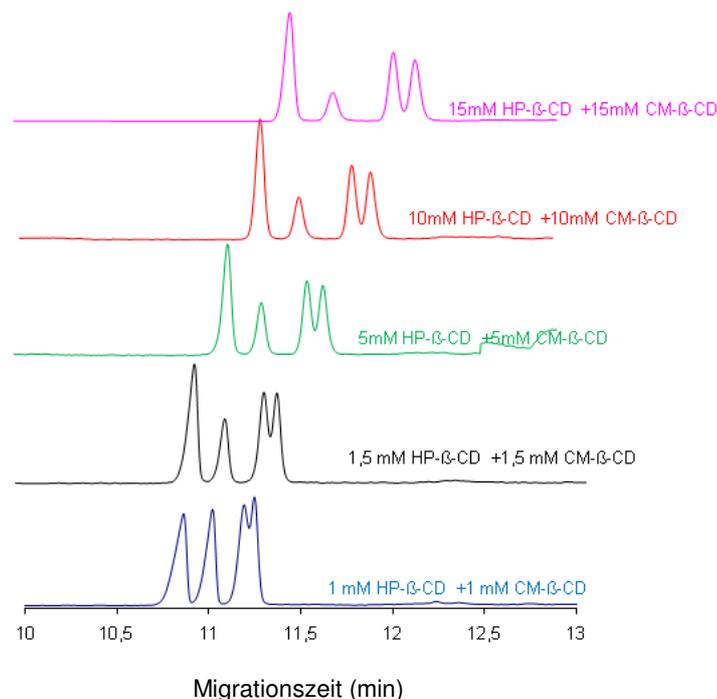


Abbildung 24 Trennung der 2S- und 2R-Diastereomere von Hesperidin und Narirutin Standards mit unterschiedlichen Konzentrationen an HP- β -CD und CM- β -CD

Berechnungen der Trennleistung (R_s) und des Trennfaktors (α_{app}) machen deutlich, dass sich die Trennung der (R)- und (S)-Diastereomere von Hesperidin und Narirutin mit zunehmender Konzentration an HP- β -CD und CM- β -CD deutlich verbessert (Abbildung 25/Tabelle 7).

Tabelle 7 Trennleistung (R_s) und Trennfaktor (α_{app}), berechnet für die Flavanonglykoside Hesperidin und Narirutin, in Abhängigkeit der Cyclodextrin-Konzentrationen von HP- β -CD und CM- β -CD

CD-Konzentration (mM)	Peakauflösung R_s Hesperidin	Peakauflösung R_s Narirutin	α_{app} (Hesp)	α_{app} (Nar)
1,00	0,57	0,37	1,02	1,01
1,50	0,69	0,51	1,02	1,01
5,00	0,88	0,67	1,02	1,01
10,00	1,11	0,78	1,02	1,01
15,00	1,52	0,88	1,02	1,01

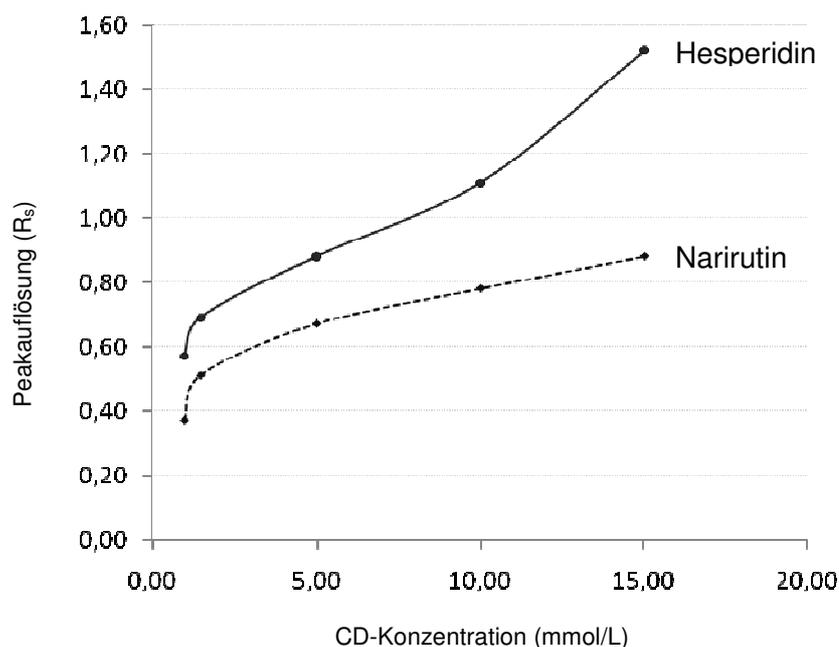


Abbildung 25 Peakauflösung (R_s) der Flavanonglykoside Hesperidin und Narirutin, abhängig von der CD-Konzentration (HP- β -CD und CM- β -CD, Verhältnis 1:1)

Sowohl unterschiedliche Komplexbildungskonstanten, als auch die unterschiedlichen Mobilitäten der gebildeten Flavanon-Cyclodextrin-Komplexe, führen dazu, dass sich Hesperidin bereits bei einer Konzentration von 1,5 mM HP- β -CD kombiniert mit 1,5 mM CM- β -CD trennen lässt, während Narirutin unter diesen Bedingungen nur angetrennt wird. Für Narirutin liegt die günstigste Konzentration bei 15 mM für beide Cyclodextrine.

2.1.3 Optimierung des Umpolungsschrittes

Beim Prinzip des „Sample Stackings“ ist es wesentlich, eine optimale Spannung für den Trennschritt mit umgekehrter Polarität zu finden.

Zusätzlich ist es wichtig, den Zeitpunkt der Umpolung genau festzulegen. Abbildung 26 zeigt drei Elektropherogramme einer Orangensaftprobe, die mit unterschiedlichen Umkehrspannungen, aber identischer Umpolungszeit gemessen wurden.

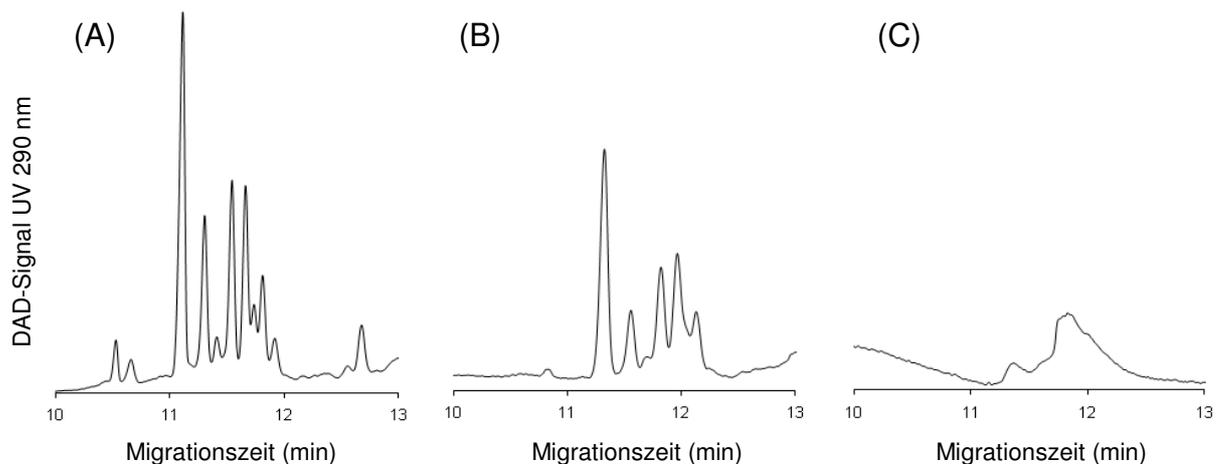


Abbildung 26 Elektropherogramme einer Orangensaftprobe gemessen mit einem 250 mM Boratpuffer pH=9,0, Fused-Silica-Kapillare mit 40 cm effektive Länge und unterschiedlichen Umkehrspannungen (reverse polarity): 5 kV für 30 sec (A); 10 kV für 30 sec (B); 15 kV für 30 sec (C)

Es ist offensichtlich, dass sich die Trennung mit zunehmender Umkehrspannung verschlechtert und die Intensität der Peaks abnimmt. Bei einer Umkehrspannung von 15 kV über einen Zeitraum von 30 sec (Abbildung 26 (C)), geht die Peakintensität gegen Null, und es ist keine Auftrennung der Substanzen mehr zu erkennen. Dies liegt daran, dass der Rückpolungsschritt zu einem zu späten Zeitpunkt erfolgte. Folglich wandert ein Teil der Grenzschicht, an der die Probenmoleküle sich aufkonzentriert haben, wieder aus der Kapillare heraus und wird nicht mehr erfasst (siehe Abschnitt 1.6.2.3). Ähnliche Elektropherogramme ergeben sich auch beim Konstanthalten der Umkehrspannung (5 kV) und einer Verlängerung des Umpolungszeitraums (Abbildung 27). Beim Einsetzen geringer Umkehrspannungen kann der Umpolungszeitraum bis zu 54 sec betragen, bevor eine Minderung in der Trennleistung zu verzeichnen ist. Ab 60 sec treten dann Verluste in den Peakintensitäten auf. Der Vorteil an den geringeren Umkehrspannungen und längeren Zeiten im Vergleich zu hohen Spannungen und kurzen Zeiten ist, dass die Analytmoleküle sich besser in der Grenzschicht zwischen Puffer und Analytlösung anreichern können. Außerdem wandern die Moleküle abhängig von Größe und Ladungsdichte unterschiedlich schnell im elektrischen Feld und liegen in der erhaltenen Probenzone bereits sortiert vor. Diese Vorsortierung ist bei langsamer Wanderungsgeschwindigkeit effektiver. Die Folge sind schmale Peaks und bessere Trennungen.

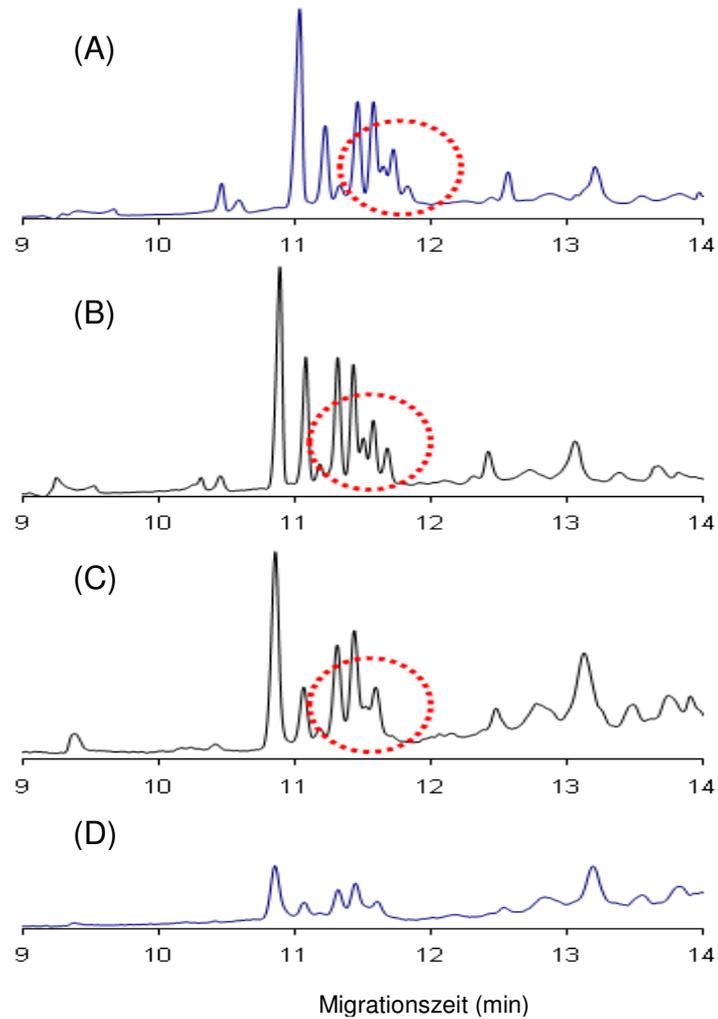


Abbildung 27 *Elektropherogramme einer Orangensaftprobe gemessen mit einem 250 mM Boratpuffer pH=9,0, einer Fused-Silica-Kapillare mit einer effektiven Länge von 40 cm und einer Gesamtlänge von 50 cm, einer Umkehrspannung von 5 kV und verschiedene Zeiten für den Umkehrschritt: 24 sec (A); 42 sec (B), 54 sec (C) und 60 sec (D)*

Wie in Abschnitt 1.6.2.3 erläutert, ermöglicht das Prinzip des „Sample Stackings“ außerdem die Injektion größerer Probenvolumina, ohne dass es zu Effizienzverlusten in der Trennung kommt.

2.1.4 Weitere Optimierungsparameter

Die in den vorausgehenden Abschnitten erhaltenen Ergebnisse sind alle unter den in Tabelle 6 dargestellten Bedingungen erzielt worden.

Hierbei wurde eine Fused-Silica-Kapillare mit 75 µm I.D. und einer Gesamtlänge von 50 cm (effektive Länge von 40 cm) verwendet. Versuche mit Kapillaren unterschiedlicher Länge (50 cm Gesamtlänge/40 cm effektive Länge, 60 cm Gesamtlänge/50 cm effektive Länge und 70 cm Gesamtlänge/60 cm effektive Länge) ergaben, dass mit zunehmender Kapillarlänge die Peakauflösung besser wurde. Allerdings wurden dadurch auch die Analysenzeiten länger, weshalb Kapillarlängen größer 70 cm Gesamtlänge sich nicht als sinnvoll erwiesen.

Es wurden außerdem drei verschiedene Kapillartemperaturen (25°C, 20°C und 15°C) getestet, wobei sich herausstellte, dass sich die chirale Trennung mit sinkender Kapillartemperatur verbesserte.

Die Trennung von Hesperidin und Narirutin verbesserte sich mit abnehmender Trennungsspannung. Da Spannungen kleiner 18 kV nur noch minimale Verbesserungen ergaben, die Migrationszeiten sich im Vergleich dazu jedoch erheblich verlängerten, wurde eine Trennungsspannung von 18 kV gewählt.

Die Auswirkung einer Zugabe an organisches Lösungsmittel zum Trennpuffer wurde ebenfalls überprüft. Für die Untersuchung von Flavanonen ergab sich dadurch allerdings keine Verbesserung.

2.1.5 Zusammenfassung der optimierten Bedingungen

Unter Berücksichtigung aller in diesem Abschnitt optimierten Parameter (Tabelle 8), ist eine kapillarelektrophoretische Methode entwickelt worden, die es möglich macht, Hesperidin und Narirutin chiral und basisliniengetrennt nachzuweisen.

Abbildung 28 zeigt, dass sechs weitere Substanzen getrennt wurden, was mit der bislang bekannten Methode nicht gelang.

Folglich sind die bisher ermittelten diastereomeren Verhältnisse aufgrund von Peaküberlagerungen stark fehlerbehaftet. Durch die verbesserte Trennung verändern sich die Verhältnisse der diastereomeren Flavanonglykoside. Es ist nun möglich, exaktere Verhältnisse zu bestimmen und Veränderungen im diastereomeren Muster durch Verarbeitungsprozesse, wie z.B. Hitzebehandlungen, besser bzw. überhaupt erst zu erkennen.

Tabelle 8 Analytische Bedingungen der entwickelten Methode zur chiralen Trennung von diastereomeren Flavanoglykosiden mittels CE mit „Sample Stacking“. (Fettdruck = veränderte Parameter bezogen auf die in Tabelle 6 angegebenen Ausgangsbedingungen)

Kapillare	60 cm effektiv; 70 cm gesamt Länge; 75 µm I.D.
Kapillartemperatur	15 °C
Trennspannung	18 kV
Trennpuffer	250 mM Boratpuffer
pH-Wert des Puffers	pH = 9,0
Chirale Selektoren	15 mM HP-β-CD; 15 mM CM-β-CD
Umkehrspannung	5 kV; 0,7 sec
Puffer Injektion hinter der Probenzone	0,7 psi; 3 sec
Wellenlänge	290 nm

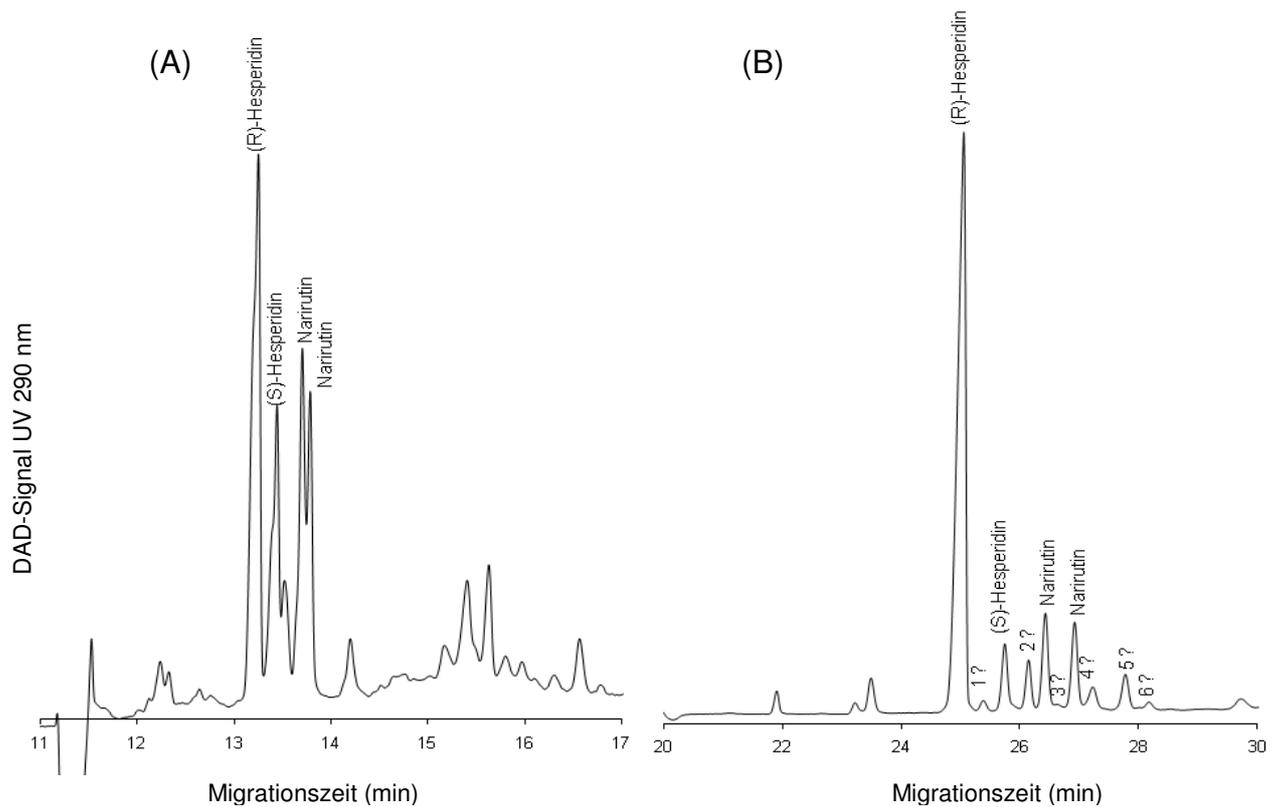


Abbildung 28 Elektropherogramme einer Orangensaftprobe gemessen mit der Methode nach Gel-Moretó [59] (A) und der hier beschriebenen „Sample Stacking“ Methode (B). Die Zuordnung der Diastereomeren des Hesperidins wurde der Dissertation von Gel-Moretó entnommen [59]

2.1.6 Identifizierung der Flavanonglykoside mittels LC-MS und semipräparative Isolierung der Verbindungen

In Abbildung 29 sind neben (R)- und (S)-Hesperidin und den Diastereomeren des Narirutin weitere sechs Peaks zu erkennen. Um diese Verbindungen zu identifizieren, wurde die LC-Elektrospray-MS herangezogen.

Es wurde im negativen Modus gemessen, wobei die Massen der gebildeten Quasi-Molekülanionen $[M-H]^-$ erfasst werden konnten. Geräteangaben und Parameter siehe in Abschnitt 5.2.2. Anhand der Fragmentierungsmuster konnten in Orangensaft Hesperidin, Narirutin, Didymin und Narirutin-4'-glucosid, die bereits in der Literatur beschrieben wurden, nachgewiesen werden. Außer Hesperidin und Narirutin konnten die über LC-MS identifizierten Flavanonglykoside nicht den Peaks in Abbildung 29 zugeordnet werden. Deshalb wurde eine semipräparative Isolierung der einzelnen Verbindungen über ein nicht chirales HPLC-System vorgenommen.

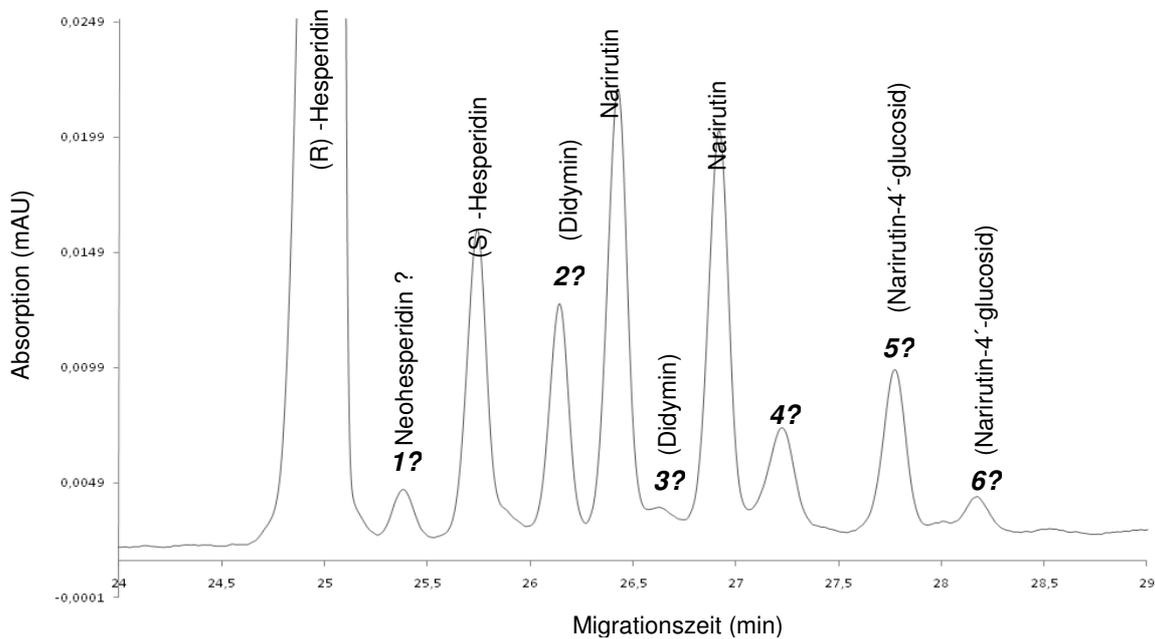


Abbildung 29 Vergrößerter Ausschnitt aus dem Elektropherogramm der optimierten Trennung von Orangensaft-Flavanonglykosiden

Die dementsprechend erhaltenen Fraktionen wurden einerseits mittels chiraler CE untersucht und andererseits mit LC-MS analysiert und identifiziert. Eine eindeutige Identifizierung war schließlich über die spezifischen Massen und über die Fragmentierungsmuster möglich. Tabelle 9 zeigt die LC-MS Daten der in Süßorangen enthaltenen Flavanonglykoside.

Tabelle 9 LC-MS Identifizierung der in Orangen gefundenen Flavanonglykoside

Flavanone	Max. UV	MS [M-H] ⁻	MS [M-H] ⁻ + 2 H ₂ O	MS ² Fragmentierung
Hesperidin	279,9 nm	609,6		301,3 [M-H-308,5] ⁻
Narirutin	279,6 nm	579,7		271,1 [M-H-308,6] ⁻
Didymin	279,7 nm	593,9		285,2 [M-H-308,7] ⁻
Narirutin-4'-glucosid	280,5 nm		777,4	740,6 578,6 [M-H-162,0] ⁻ 432,6 [M-H-308,0] ⁻ 270,6 [M-H-469,9] ⁻

Hesperidin, Narirutin und Didymin fraktionierten mit der Abspaltung des gesamten Zuckerrestes vom Aglykon. Dies ist typisch für alle Rutinoside. Beim Narirutin-4'-glucosid entsprachen die m/z-Signale der Molekülmasse und der Anlagerung von zwei bzw. vier Wassermolekülen. Bei der Fraktionierung spalteten sich dann eine Hexose (MW = 180,2 g/mol), eine Desoxyhexose (MW = 164 g/mol) und eine weitere Hexose ab.

Eine Zuordnung der identifizierten Flavanone zu den Peaks des Elektropherogramms (Abbildung 29) war zum Teil durch Migrationszeitenvergleich möglich. Es wurden hierzu die Migrationszeiten der Isolate und Standards mit den Migrationszeiten der Probensubstanzen verglichen. Es konnte bereits anhand dessen festgestellt werden, dass es sich bei den unbekanntem Peaks 2 und 3 (Abbildung 29) um das Didymin handeln muss und die Peaks 5 und 6 die Diastereomeren des Narirutin-4'-glucosids sein müssen. In der CE können die Migrationszeiten stärker schwanken als die Retentionszeiten in der HPLC. So sind die Zeitverschiebungen bei Standardmessungen nur gering, wohingegen bei Messungen der gleichen Verbindung aus Probelösungen die Migrationszeiten sehr stark abweichen können. Teilweise gibt es trotz identischer Analysenbedingungen Zeitverschiebungen bis zu 8%. Ursachen für diese geringe Reproduzierbarkeit sind vermutlich unterschiedliche Viskositäten als auch Matrixeffekte der Probe.

Daher ist der Migrationszeitenvergleich nicht aussagekräftig genug bezüglich der Peakidentifizierung in der CE. Es wurden somit UV/Vis-Spektren im Wellenlängenbereich von 190–600 nm zur Absicherung herangezogen. Ein Vergleich der Spektren der Probenpeaks mit den Spektren der Isolate und Standardsubstanzen, als auch die 1. Ableitung der Spektren ließen eine Zuordnung der Flavanone sowie eine Absicherung der bisherigen Vermutungen zu (Abbildung 30 und DAD-Spektren vergrößert in Abbildung II Anh.).

Demzufolge konnten die Peaks 2 und 3 des Elektropherogramms aus Abbildung 29 eindeutig als Didymin Diastereomere identifiziert werden, und die Peaks 5 und 6 wurden als Diastereomere des Narirutin-4'-glucosid erkannt. Peak 1 ist vermutlich Neohesperidin. Eine Identifizierung des Peak 4 steht noch aus.

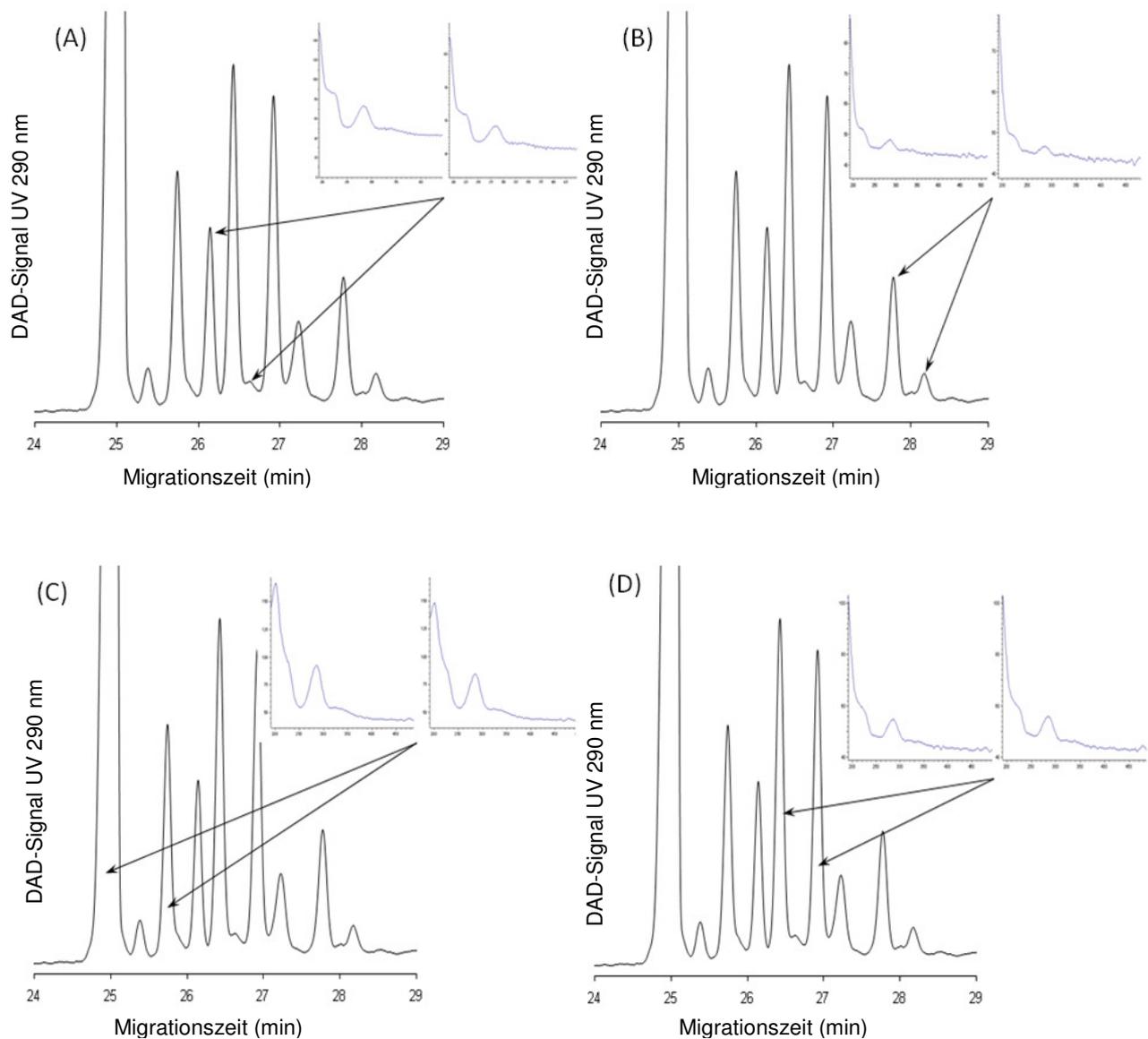


Abbildung 30 Identifizierung von Didymin (A), Narirutin-4'-glucosid (B), Hesperidin (C) und Narirutin (D) in Orangensaft durch Vergleich der erhaltenen DAD-UV-Spektren

2.1.7 Methodvalidierung

Nachweis und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze (NG) und die Bestimmungsgrenze (BG) für Hesperidin und Narirutin wurden nach DIN 32645 [41] bestimmt. Zur Berechnung der NG und BG wurden die korrigierten Peakflächen (A_{corr}) eingesetzt. Die Standardkonzentrationen lagen zwischen 25 mg/L und 1 mg/L. Tabelle 10 präsentiert die Ergebnisse.

Tabelle 10 Nachweisgrenze (NG) und Bestimmungsgrenzen von Flavanonen

Flavanone	Nachweisgrenze (NG) mg/L	Bestimmungsgrenze (BG) mg/L
Hesperidin	3,7	13,9
Narirutin	3,5	12,7

Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit der hier entwickelten Methode wurde innerhalb eines Tages (intra-Day) und innerhalb mehrerer Tage (inter-day) untersucht. Es wurde Bestimmung der Reproduzierbarkeit eine Orangensaftprobe eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 und Tabelle 12 zu finden.

Tabelle 11 *Reproduzierbarkeit der Methode über zwei Wochen mit jeweils drei Tagen Messpause dazwischen (inter-day). Berechnet als relative Standardabweichung der Migrationszeiten (t_{min}) und korrigierten Peakflächen (A_{corr})*

Flavanone	Rel. Standardabweichung % der Migrationszeit (t_{min})	Rel. Standardabweichung % der Peakfläche (A_{corr})
(R)-Hesperidin	0,69	1,32
(S)-Hesperidin	0,32	1,05
Narirutin (1)	0,50	3,50
Narirutin (2)	0,50	3,30

Tabelle 12 *Reproduzierbarkeit der Methode während eines Tages (intra-day). Berechnet als relative Standardabweichung der Migrationszeiten (t_{min}) und korrigierten Peakflächen (A_{corr})*

Flavanone	Rel. Standardabweichung % der Migrationszeit (t_{min})	Rel. Standardabweichung % der Peakfläche (A_{corr})
(R)-Hesperidin	0,08	1,41
(S)-Hesperidin	0,10	0,86
Narirutin (1)	0,19	3,36
Narirutin (2)	0,23	3,05

Die relativen Standardabweichungen der korrigierten Peakflächen unterscheiden sich bei Messungen innerhalb eines Tages, verglichen mit Messungen unterschiedlicher Tage, nur unwesentlich. Indessen unterscheidet sich die inter-day- und intra-day-Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten stärker. Ursache sind insbesondere Schwankungen des EOFs. Dieser wird sehr stark durch irreversible Adsorptionen von Probenbestandteilen an der Kapillarwand beeinflusst aber auch durch Veränderungen im Puffersystem (pH-Wert, Konzentration) [48, 56]. Bei Messungen, die an unterschiedlichen Tagen laufen, ist es daher ratsam,

regelmäßig den Trennpuffer zu wechseln und die Kapillare ausreichend mit Natronlauge zu konditionieren. Bei Proben deren Matrixbestandteile leicht und irreversibel an der Kapillarinnenwand adsorbieren, ist es zudem empfehlenswert, auch die Kapillare häufiger zu wechseln. Somit lassen sich Schwankungen in der Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten minimieren.

2.2 Entwicklung einer Cyclodextrin-modifizierten MEKC-Methode zur chiralen Trennung von Flavan-3-olen in Kakao und Kakaoprodukten

In einer früheren Forschungsarbeit konnte eine chirale CZE-Methode zur Trennung von Flavan-3-olen in Kakao und Schokolade bereits erfolgreich etabliert werden [84, 85, 86].

In Anlehnung an zwei Veröffentlichungen, in denen Polyphenole mit Hilfe einer Cyclodextrin unterstützten MEKC getrennt werden konnten, wurde in dieser Arbeit eine HP- γ -CD modifizierte MEKC entwickelt, die als Referenzmethode zu der bestehenden CZE zur Trennung der Flavan-3-ole (+)/(-)-Catechin und (+)/(-)-Epicatechin in Kakao und Kakaoprodukten dienen soll.

Vorversuche mit den Standards (+)/(-)-Catechin und (-)-Epicatechin*

Aus den Veröffentlichungen von Shuji Kodama und Mitarbeitern [83] sowie Roberto Gotti und Mitarbeitern [63] ergaben sich die in Tabelle 13 aufgelisteten Ausgangsbedingungen für die Entwicklung einer Cyclodextrin-modifizierten chiralen MEKC-Methode zur Trennung chiraler Flavan-3-ole.

Tabelle 13 Ausgangsbedingungen für die Methodenentwicklung zur chiralen Trennung von Flavan-3-olen mittels CD-modifizierter MEKC

Kapillare	40 cm effektiv; 50 cm gesamt; 75 μ m I.D.
Kapillartemperatur	20 °C
Trennspannung	25 kV
Trennpuffer	200 mM Boratpuffer + 20 mM Phosphatpuffer
pH-Wert des Puffers	pH = 6,4
Chirale Selektoren	10 mM HP- γ -CD
Mizellbildner	240 mM SDS
Wellenlänge	210 nm

* (+)-Epicatechin ist als Standard kommerziell nicht erhältlich

2.2.1 Optimierung der Cyclodextrinkonzentration

Aufgrund der von Kofink (2009) [84] entwickelten chiralen CZE-Methode zur chiralen Trennung von Flavan-3-olen und seinen Untersuchungen bezüglich der Wahl des chiralen Selektors wurde in dieser Arbeit das HP- γ -CD als chirales Pufferadditiv gewählt.

Dieses Cyclodextrin ist ein modifiziertes ungeladenes γ -CD mit 8 Glucoseeinheiten. Die Hydroxylgruppen der Glucoseeinheiten sind dabei mit Propylenoxid modifiziert. Das Molekül enthält also Hydroxypropyl-Ether-Gruppen (Abbildung 31).

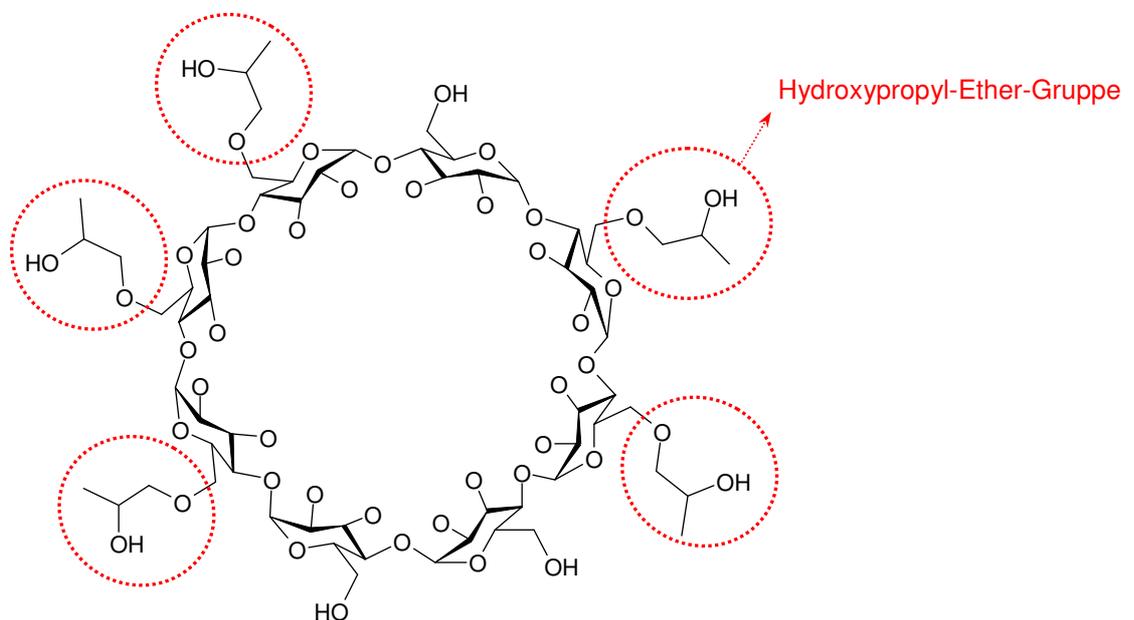


Abbildung 31 Chemische Struktur des HP- γ -Cyclodextrins

Zur Ermittlung der optimalen Konzentration an HP- γ -Cyclodextrin wurden mehrere Trennpuffer mit unterschiedlichen Cyclodextrinkonzentrationen untersucht (10, 20, 25, 30, 40, 50, 70 und 100 mM). Wie Abbildung 32 zeigt, verbessert sich die Trennung der Catechin-Enantiomere mit zunehmender Cyclodextrinkonzentration. In niedrigen Konzentrationsbereichen werden bereits durch geringe Erhöhungen der Cyclodextrin-Konzentration relativ große Effekte in der Verbesserung der Trennleistung erreicht. Bei höheren Konzentrationen können selbst bei großen Konzentrationssprüngen nur minimale Verbesserungen in der Trennleistung beobachtet werden.

In Tabelle 14 sind die berechneten Trennleistungen (R_s) und der Trennfaktor (α_{app}) für die Catechin-Enantiomeren wiedergegeben.

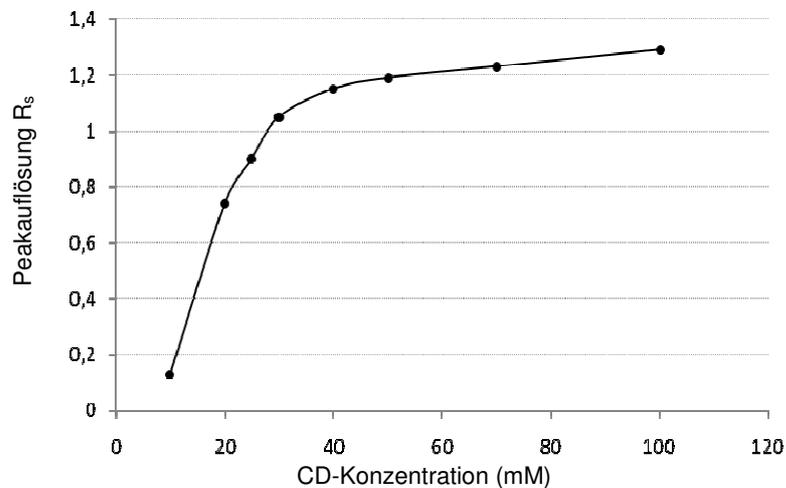


Abbildung 32 Peakauflösung (R_s) der Catechin-Enantiomere, abhängig von der Cyclodextrin-Konzentration (HP- γ -CD)

Tabelle 14 Trennleistung (R_s) und Trennfaktor (α_{app}) berechnet für die Catechin-Enantiomere, in Abhängigkeit der Cyclodextrin-Konzentrationen (HP- γ -CD)

CD-Konzentration (mM)	Peakauflösung R_s (+)/(-)-Catechin	Trennfaktor α_{app}
10,00	0,13	1,02
20,00	0,74	1,02
25,00	0,90	1,02
30,00	1,04	1,02
40,00	1,15	1,02
50,00	1,19	1,01
70,00	1,23	1,02
100,00	1,29	1,01

Das im Trennpuffer eingesetzte Borat bildet mit vicinalständigen OH-Gruppen Komplexe [48, 122]. Da die Flavan-3-ole Catechin und Epicatechin am B-Ring vicinale OH-Gruppen besitzen, sind sie in der Lage, negativ geladene Boratkomplexe auszubilden (Abbildung 33). Diese Komplexe wandern entgegen dem EOF in Richtung Anode. Die aus dem SDS gebildeten Mizellen sind ebenfalls negativ geladen. Durch ihre höhere Ladungsdichte wandern sie jedoch schneller Richtung Anode und erreichen später den Detektor. Durch den Zusatz eines Cyclodextrins kommt eine weitere Komponente hinzu, die ebenfalls einen erheblichen Einfluss auf die Trennung nimmt. Neutrale Cyclodextrine, z.B. HP- γ -CD, wandern zusammen mit dem EOF in Richtung der Kathode und beschleunigen dadurch die negativ geladenen Flavan-3-ol-Boratkomplexe.

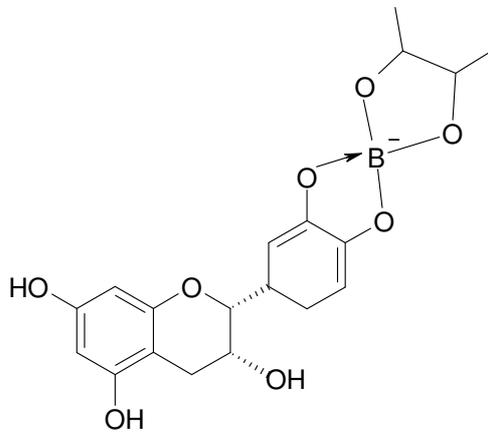


Abbildung 33 (-)-Epicatechin-Boratkomplex

2.2.2 Einfluss der SDS-Konzentration

Um zu untersuchen, welche Wirkung die Konzentration des Mizellbildners auf die chirale Trennung der Flavan-3-ole hat, wurden Trennpuffer mit unterschiedlichen SDS-Konzentrationen (240, 120, 100, 90, 80, 60 und 50 mM) hergestellt. Die Konzentration an Borat- und Phosphatpuffer sowie die Cyclodextrinkonzentration blieben in allen Versuchen konstant.

Wie in den Elektropherogrammen der Abbildung 34 zu erkennen ist, hat die SDS-Konzentration keinen signifikanten Einfluss auf die Trennung der Enantiomeren, sondern beeinflusst hauptsächlich die Diastereomerentrennung.

Vergleiche der Auflösung R_s einerseits zwischen den Enantiomeren (+)/(-)-Catechin und andererseits zwischen den Diastereomeren (+)-Catechin und (-)-Epicatechin bestätigen diese Beobachtung. In Abbildung 35 ist die ermittelte Auflösung in Abhängigkeit der SDS-Konzentration graphisch dargestellt. Die Messreihe (A) lässt erkennen, dass die Auflösung der Enantiomeren-Peaks über den gesamten Anstieg der SDS-Konzentration konstant bleibt. Hingegen ist bei Messreihe (B), welche die Veränderungen in der Trennleistung der Diastereomeren veranschaulicht, ein signifikanter Anstieg mit zunehmender SDS-Konzentration zu verzeichnen.

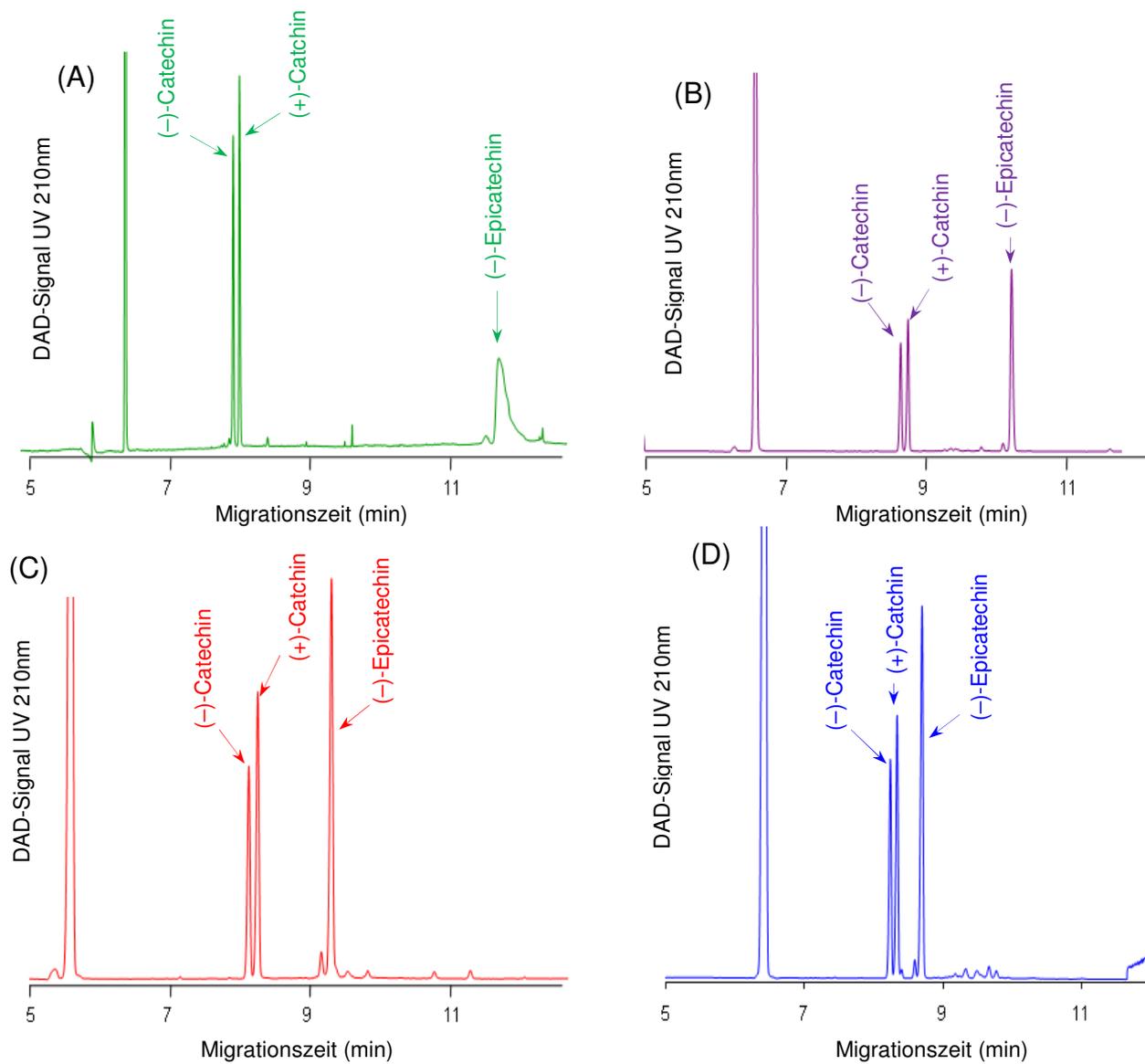


Abbildung 34 Elektropherogramme eines Standards aus (+)/(-)-Catechin und (-)-Epicatechin mit unterschiedlichen SDS-Konzentrationen aber konstanter HP- γ -CD-Konzentration (100 mM). (A) 240 mM SDS; (B) 100 mM SDS; (C) 80 mM SDS; (D) 50 mM SDS

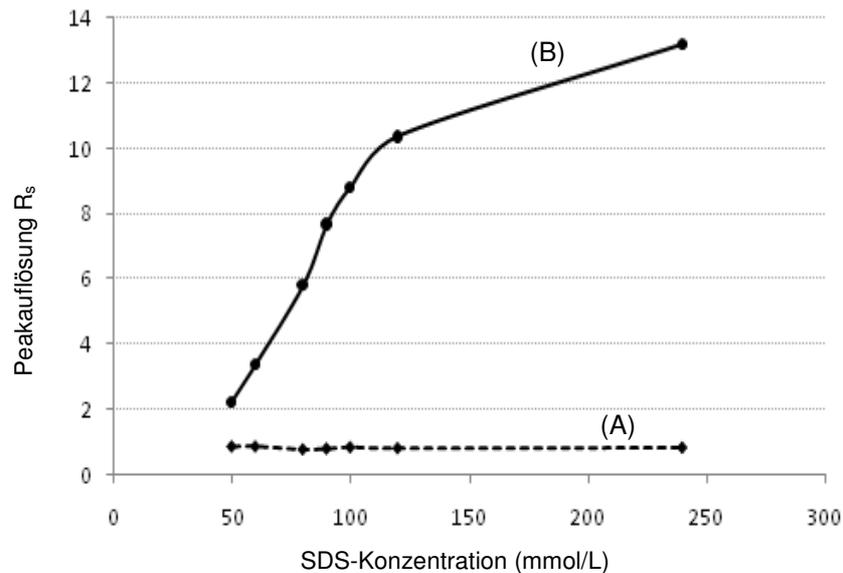


Abbildung 35 Darstellung der R_s -Werte von (+)/(-)-Catechin (A) und Catechin/Epicatechin (B) in Abhängigkeit der SDS-Konzentration

Diese Beobachtung lässt sich nicht durch einen Anstieg in der Ionenstärke erklären, da sich der EOF während des gesamten Anstiegs der SDS-Konzentration nicht signifikant verändert. Das lässt sich vor allem daran erkennen, dass die Migrationszeiten des Catechins während des SDS Anstiegs nahezu konstant bleiben. Die Verteilung der gelösten Stoffe zwischen dem Cyclodextrin und den Mizellen ist sehr stark von der SDS-Konzentration abhängig. Die längeren Migrationszeiten des Epicatechins begründen sich somit in einem Anstieg des Verhältnisses mizellare Phase zu wässriger Cyclodextrin-Phase. Da sich durch die Erhöhung der SDS-Konzentration lediglich die Migrationszeiten des (-)-Epicatechins verschieben, wird vermutet, dass die Affinität des Epicatechins zum HP- γ -CD, relativ gering ist. Folglich hält sich das (-)-Epicatechin länger in der mizellaren Phase als in der Kavität der Cyclodextrine auf.

2.2.3 Weitere Optimierungsparameter

Zusätzlich zu der Optimierung der Cyclodextrinkonzentration und der SDS-Konzentration wurden die Parameter Temperatur, Trennungsspannung und Kapillarlänge untersucht.

Versuche mit vier unterschiedlichen Temperaturen (30 °C, 25 °C, 20 °C und 15 °C) ergaben, dass sich mit abnehmender Temperatur die Enantiomerentrennung verbessert und die Migrationszeiten sich erhöhen. Bei Temperaturen oberhalb 25 °C ist die Peakauflösung signifikant verschlechtert. Dies liegt daran, dass bei hohen Temperaturen der EOF auch entsprechend hoch ist und infolge einer kürzeren Aufenthaltsdauer des Analyten in der Kapillare eine nicht ausreichende Komplexierung des Analyten mit dem Cyclodextrin stattfinden kann. Da die Trennung bei 15 °C am besten war, wurde diese als optimale Trenntemperatur festgelegt.

Beim Variieren der Kapillarlängen (Gesamtlängen von 50 cm (40 cm effektiv), 60 cm (50 cm effektiv) und 70 cm (60 cm effektiv)) wurde beobachtet, dass sich mit zunehmender Kapillarlänge die Trennleistung verbessert. Folge der längeren Trennstrecke sind verlängerte Analysenzeiten. Da sich die Trennleistung erheblich verbesserte, wurden in diesem Fall auch etwas längere Analysenzeiten in Kauf genommen. Kapillarlängen oberhalb 60 cm Gesamtlänge brachten keine weiteren Verbesserungen in der Trennleistung.

Eine weitere veränderbare Größe ist die Trennungsspannung. Die Höhe der Spannung beeinflusst das gesamte System, sowohl den EOF als auch die Mobilität der Analytmoleküle. Es wurden Untersuchungen mit 10 kV, 15 kV, 18 kV, 20 kV, 25 kV und 30 kV durchgeführt. Bei der CD-modifizierten MEKC konnte mit einer Trennungsspannung von 25 kV eine gute Trennung erreicht werden.

Bei höheren Spannungen kam es vermehrt zu Zusammenbrüchen in der Spannungskurve, da aufgrund der recht hohen Elektrolytkonzentration im Puffer ein hoher Stromfluss entstanden ist. Zu geringe Spannungen dagegen führten zu langen Migrationszeiten und Peakverbreiterungen.

Der Zusatz organischer Lösungsmittel zum Trennpuffer wurde ebenfalls überprüft. Für diese Versuche wurden Methanol (0,1%, 1%) und Acetonitril (0,1%, 1%) dem Hintergrundelektrolyten zugesetzt. Jedoch war weder beim Zusatz von Methanol noch beim Zusatz von Acetonitril eine Verbesserung der Enantiomeren-Trennung zu verzeichnen. Eine Lösungsmittelzugabe erfolgte daher nicht.

2.2.4 Zusammenfassung der optimierten Bedingungen

Unter Berücksichtigung aller in den Abschnitten 2.2.1 bis 2.2.3 untersuchten Aspekte ergibt sich eine optimale Methode für die chirale Trennung der monomeren Flavan-3-ole (+)/(-)-Catechin und (+)/(-)-Epicatechin in Kakao und kakaohaltigen Produkten. Die optimierten Trennbedingungen sind in Tabelle 15 wiedergegeben.

Tabelle 15 Optimierte Bedingungen der Methode zur chiralen Trennung von (+)/(-)-Catechin und (+)/(-) Epicatechin mittels CD-modifizierter MEKC (Fettdruck = veränderte Parameter bezogen auf die in Tabelle 13 angegebenen Ausgangsbedingungen)

Kapillare	50 cm effektiv; 60 cm gesamt Länge; 75 µm I.D.
Kapillartemperatur	15 °C
Trennspannung	25 kV
Trennpuffer	200 mM Boratpuffer + 20 mM Phosphatpuffer
pH-Wert des Puffers	pH = 6,4
Chirale Selektoren	30 mM HP-γ-CD
Mizellbildner	100 mM SDS
Wellenlänge	210 nm

Die Messung eines Standardgemisches aus (+)/(-)-Catechin und (-)-Epicatechin unter den optimierten CD-MEKC Bedingungen ergibt das in Abbildung 36 dargestellte Elektropherogramm. Es werden alle drei monomeren Flavan-3-ol-Enantiomere bzw- Epimere getrennt.

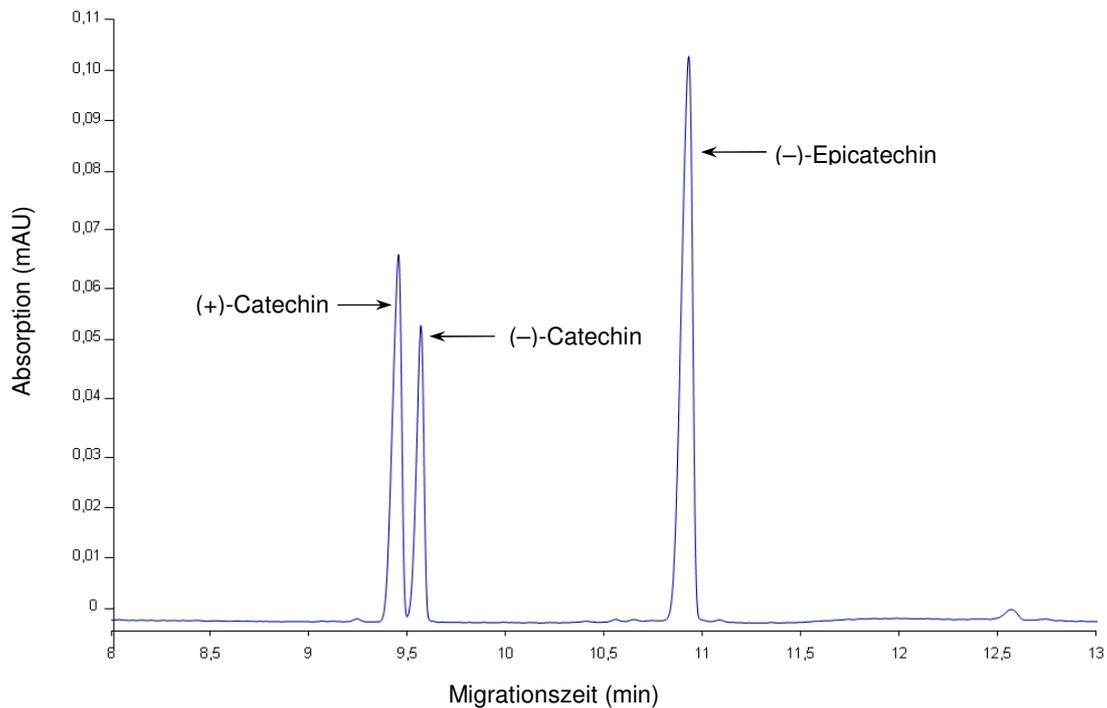


Abbildung 36 Elektropherogramm eines Standardgemisches aus (+)/(-)-Catechin und (-)-Epicatechin analysiert mittels optimierter CD-MEKC (gemessen bei 210 nm)

2.2.5 Methodvalidierung

Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze von (+)/(-)-Catechin mit der beschriebenen CD-MEKC Methode wurden nach DIN 32645 [41] (siehe Abschnitt 2.1.7) bestimmt. Es wurden Standardlösungen mit Konzentrationen von 1,0 mg/mL bis 0,004 mg/mL hergestellt und mit der optimierten CD-MEKC-Methode vermessen. Aus der Summe der korrigierten Peakflächen (A_{corr}) bzw. Peakhöhen von (+)-Catechin und (-)-Catechin konnten die entsprechenden NG und BG berechnet werden. In Tabelle 16 sind die erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 16 NG und BG von (+)/(-)-Catechin nach dem DIN 32645 Verfahren

	(+)/(-)-C (Peakfläche)	(+)/(-)-C (Peakhöhe)
NG (mg/L)	7	6
BG (mg/L)	25	19

Wie aus den Werten für NG und BG ersichtlich ist, ergibt die Auswertung über die Peakhöhen nahezu die gleichen Ergebnisse wie die Auswertung über die korrigierten Peakflächen. NG und BG, berechnet über die Peakhöhen, waren nur unwesentlich niedriger als die Werte der Peakflächen, was auf mögliche Integrationsungenauigkeiten zurückzuführen ist.

Reproduzierbarkeit

Für die hier beschriebene CD-MEKC Methode wurde die Reproduzierbarkeit innerhalb eines Tages (intra-day) und über mehrere Tage hinweg (inter-day) untersucht.

Tabelle 17 gibt die Ergebnisse der intra-Day Untersuchungen bezüglich Migrationszeiten und korrigierter Peakflächen wieder. Die Werte der inter-day Analysen sind in Tabelle 18 wiedergegeben.

Tabelle 17 Reproduzierbarkeit der Methode während eines Tages (intra-day). Berechnet als relative Standardabweichung der Migrationszeiten (t_{min}) und korrigierten Peakflächen (A_{corr})

Flavan-3-ole	relative Standardabweichung % (t_{min})	relative Standardabweichung % (A_{corr})
(+)-Catechin	0,94	1,09
(-)-Catechin	0,90	1,03
(-)-Epicatechin	0,98	1,18

Tabelle 18 *Reproduzierbarkeit der Methode über mehrere Tage (inter-day).
Berechnet als relative Standardabweichung der Migrationszeiten (t_{min}) und
korrigierten Peakflächen (A_{corr})*

Flavan-3-ole	relative Standard- abweichung % (t_{min})	relative Standard- abweichung % (A_{corr})
(+)-Catechin	1,74	1,53
(-)-Catechin	1,52	1,58
(-)-Epicatechin	1,98	1,89

Werden die Werte der relativen Standardabweichungen, die bei Messungen innerhalb eines Tages erreicht wurden, mit den relativen Standardabweichungen aus Messungen unterschiedlicher Tage verglichen, so ist zu erkennen, dass die Reproduzierbarkeit schlechter wird, wenn einige Tage zwischen den einzelnen Messungen liegen. Verursacht werden kann dies durch Veränderungen des Puffersystems. Beispielsweise können sich Konzentration und pH-Wert des Puffers verändern. Bereits geringe Abweichungen dieser Parameter führen zu Schwankungen im EOF, was folglich zu Verschiebungen der Migrationszeiten führt. In Abschnitt 2.1.7 wurden bereits einige Maßnahmen angegeben, die mögliche Schwankungen in der Reproduzierbarkeit einer Methode minimieren können.

2.2.6 Anwendung der CD-MEKC

Die Entwicklung und Optimierung der angeführten Methode wurde fast ausschließlich mit den Standardsubstanzen (+)/(-)-Catechin und (-)-Epicatechin durchgeführt. Ziel war es, diese Methode zur Analyse von Flavan-3-olen in Lebensmittelmatrices, insbesondere in Kakao und Kakaoprodukten, anzuwenden.

Kakao

Mit der beschriebenen CD-MEKC wurden unterschiedliche Kakaopulver mit unterschiedlichen Alkalisierungsgraden untersucht. Damit konnte überprüft werden, ob diese Methode auch dann noch gute Trennungen der Enantiomeren liefert, wenn eine komplexe Lebensmittelmatrix vorliegt. Die Abbildung 37 zeigt eine bei pH 7,7 alkalisierte Kakaoprobe, die mittels CD-MEKC analysiert wurde.

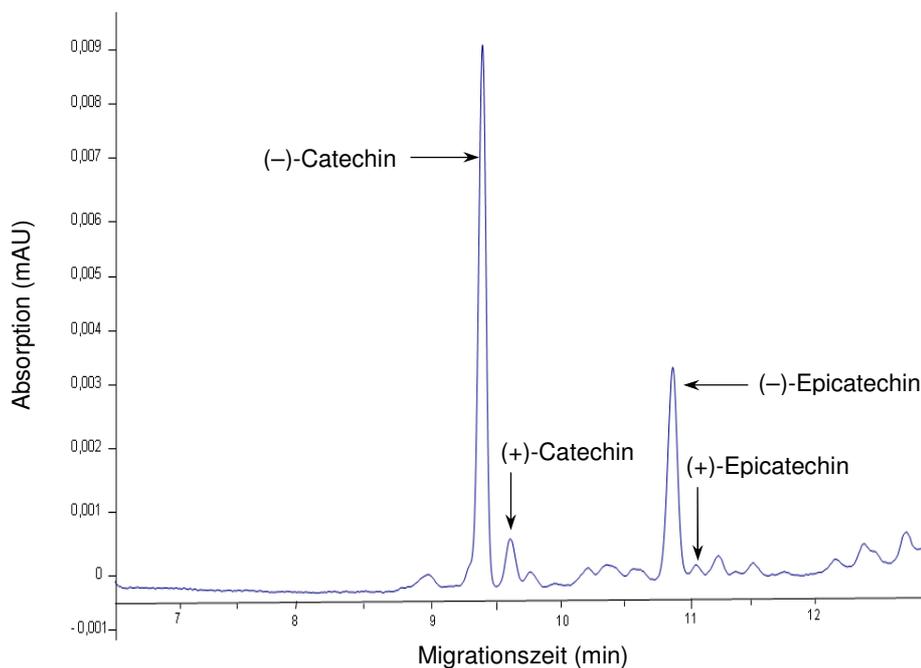


Abbildung 37 *Elektropherogramm einer alkalisierten Kakaoprobe (pH=7,7) (gemessen bei 210 nm)*

Die Enantiomere des Catechins und Epicatechins lassen sich mit dieser Methode trennen. In den folgenden Versuchen wird sich insbesondere auf das (+)/(-)-Catechin und das (-)-Epicatechin konzentriert, da das atypische (+)-Epicatechin nur in sehr geringen Mengen vorkommt und es häufig nicht möglich ist, neben dem in vergleichsweise sehr hohen Konzentrationen vorkommenden (-)-Epicatechin, die viel geringeren Gehalte des atypischen Enantiomers nachzuweisen.

Abbildung 38 zeigt drei Elektropherogramme von unterschiedlich stark alkalisierten Kakaoproben und einer nicht alkalisierten Kakaoprobe. Es lässt sich erkennen, dass sich mit zunehmender Stärke der Alkalisierung der Epimerisierungsgrad erhöht.

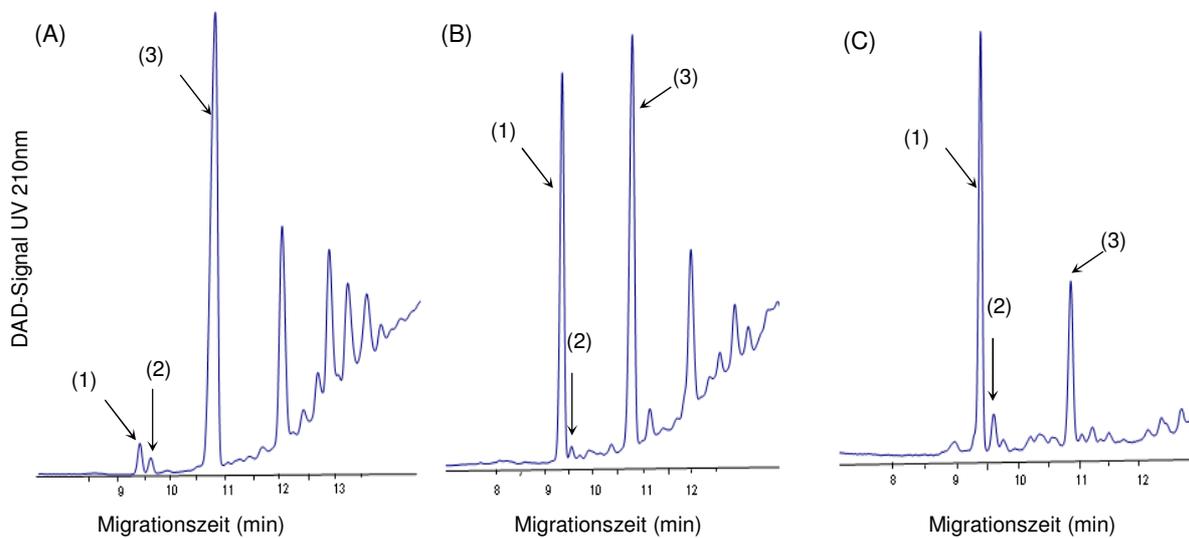


Abbildung 38 Kakaoproben gemessen mit CD-MEKC. Nicht alkalisierte Kakao (A); alkalisierte Kakao [pH 7,5] (B); stärker alkalisierte Kakao [pH 7,7] (C). (1)=(-)-Catechin; (2)=(+)-Catechin; (3)=(-)-Epicatechin

Die Analyse der nicht alkalisierten, fermentierten und gerösteten Kakaoprobe konnte bestätigen, dass das in Kakao vorherrschende Flavan-3-ol das (-)-Epicatechin ist und (+)-Catechin nur in geringen Konzentrationen vorliegt. Bei genauer Betrachtung des Elektropherogramms (A) aus Abbildung 38 wird deutlich, dass bei dieser Kakaoprobe neben dem natürlich vorkommenden (-)-Epicatechin und (+)-Catechin zusätzlich ein kleiner Peak neben dem (+)-Catechin zu sehen ist, welcher als das atypische (-)-Catechin identifiziert werden konnte. Die Identifizierung des (-)-Catechins erfolgte sowohl durch Vergleich der Migrationszeiten mit einem kommerziell erhältlichen Standard als auch durch dotieren der Kakaoprobe mit einem (-)-Catechin-Standard. Zur Absicherung wurden zusätzlich die UV-Spektren des Catechin-Standards und des Probenpeaks miteinander verglichen. In Abbildung 39 sind die UV-Spektren des (-)-Catechin-Standard und des unbekanntes Probenpeaks

gegenübergestellt. Das Vorkommen dieses atypischen Enantiomers in einer nicht alkalisierten Kakaoprobe lässt sich damit erklären, dass eine Epimerisierung nicht nur im alkalischen Milieu stattfindet, sondern auch bei erhöhten Temperaturen eintreten kann. Aus früheren Röstversuchen, die im Labormaßstab durchgeführt wurden, ist bekannt, dass in geringem Umfang bereits auch durch Hitzeeinwirkung Epimerisierung stattfindet [12, 84].

Analysen unterschiedlich stark alkalisierter Kakaoproben ergaben, dass bereits in schwach alkalischen pH-Bereichen ($\text{pH} = 7,5\text{--}7,7$) Epimerisierung eintritt. Wie aus den Abbildungen 38 (B) und (C) zu erkennen ist, epimerisiert bei diesen pH-Werten sehr viel (–)-Epicatechin zu (–)-Catechin. Minimale Abweichungen im pH-Wert führen zudem zu deutlichen Veränderungen des Verhältnisses (–)-Epicatechin zu (–)-Catechin. In Tabelle 19 sind die (–)-Epicatechin/(–)-Catechin Verhältnisse nicht alkalisierter und schwach alkalisierter Kakaoproben gegenüber gestellt. Eine Alkalisierung bei pH 7,5 ergibt bereits einen höheren Anteil an atypischem (–)-Catechin als an natürlich vorkommenden (–)-Epicatechin. Eine Erhöhung des pH-Wertes auf 7,7 führt zu einer Verschiebung des Verhältnisses zu Gunsten des (–)-Catechins.

Das Verhältnis von (–)-Epicatechin zu (–)-Catechin veränderte sich bei einer weiteren pH-Wert Erhöhung auf 8,0 wieder zu Gunsten des (–)-Epicatechin. Da es sich bei der Epimerisierung um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, kann nicht nur das (–)-Epicatechin zu (–)-Catechin epimerisieren sondern auch umgekehrt das (–)-Catechin zu (–)-Epicatechin. Daher wird vermutet, dass sich bereits im pH-Bereich von 7,7 ein Gleichgewicht eingestellt hat, und jede weitere pH-Wert Erhöhung während des Alkalisierungsprozesses zu einer rückläufigen Reaktion führt.

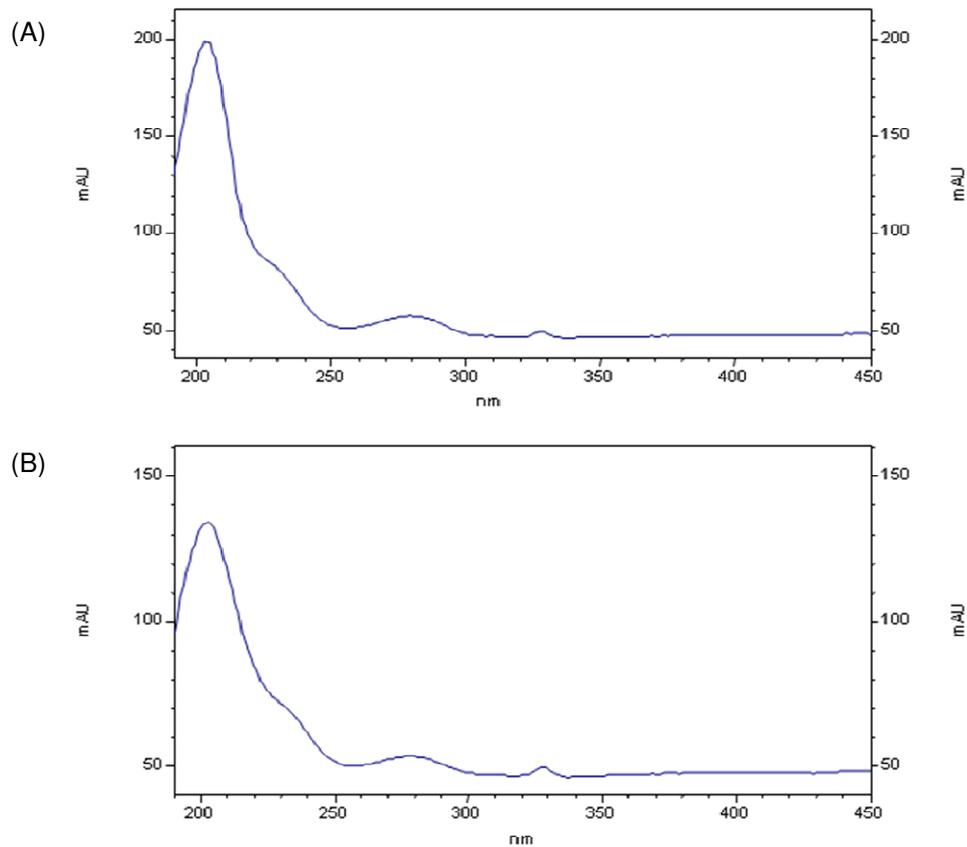


Abbildung 39 UV-Spektren eines (-)-Catechin-Standards (A) und des als (-)-Catechin vermuteten Probenpeaks (B)

Tabelle 19 Peakflächenverhältnisse (-)-EC zu (-)-C von vier unterschiedlich stark alkalisierten Kakaoproben und einer handelsüblichen Kakaoprobe

pH-Wert	Verhältnis (-)-EC/(-)-C	% (-)-EC e.e.	% (-)-C e.e.
7,0	1,15	53,5	46,5
7,5	0,82	45,2	54,8
7,7	0,61	37,9	62,1
8,0	1,12	52,9	47,1
handelsüblicher Kakao	0,52	34,0	66,0

Zusätzlich wurde ein handelsüblicher Kakao untersucht. Sein (-)-Epicatechin/(-)-Catechin Verhältnis wurde berechnet und den Ergebnissen der Kakaoproben mit bekanntem Alkalisierungsgrad gegenübergestellt. In Abbildung 40 sind die prozentualen Verhältnisse von (-)-Epicatechin zu (-)-Catechin graphisch dargestellt.

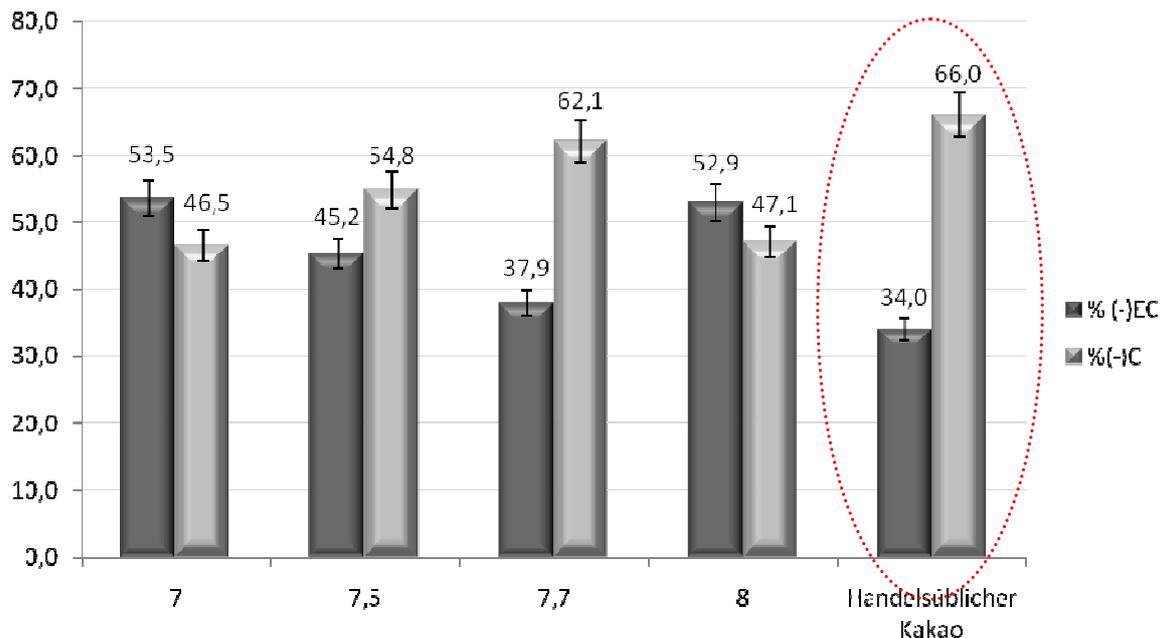


Abbildung 40 Darstellung der prozentualen Verhältnisse von (-)-EC zu (-)-C aus vier unterschiedlich alkalisierten Kakaoproben und einem handelsüblichen Kakao

Durch den Vergleich der Peakflächenverhältnisse des handelsüblichen Kakao mit denen der Kakaoproben mit bekanntem Alkalisierungsgrad, kann der Grad der Alkalisierung abgeschätzt werden. Bei dem in dieser Arbeit untersuchten handelsüblichen Kakao, handelt es sich offensichtlich um eine stark alkalisierte Kakaoprobe. Das Verhältnis 34% (-)-Epicatechin zu 66% (-)-Catechin, lässt den Schluss zu, dass der Kakao einer Alkalisierung im pH-Bereich von 7,7 unterzogen wurde. Um genauere Aussagen über den Alkalisierungsgrad handelsüblicher Kakaoprodukte machen zu können, ist es jedoch notwendig, weitere pH-Wertbereiche bezüglich der Alkalisierung von Kakao zu untersuchen und die entsprechenden Peakflächenverhältnisse zu ermitteln. (Da der Schwerpunkt dieser Arbeit jedoch auf der Methodenentwicklung lag, wurde dieser Punkt vorerst nicht weiter verfolgt.)

Die CD-MEKC wurde als schnelle sowie reproduzierbare Referenzmethode zu der von Kofink et al. [84, 85] beschriebenen chiralen CZE entwickelt. Als Referenzmethode sollte die CD-MEKC die Richtigkeit sowie Zuverlässigkeit der CZE-Methode bestätigen können.

Es wurden folglich verschiedene Kakaoproben zum einen mittels CZE als auch mittels CD-MEKC analysiert. Die erhaltenen Ergebnisse wurden anhand der ermittelten Peakflächenverhältnisse (-)-Epicatechin zu (-)-Catechin miteinander verglichen.

In Abbildung 41 werden die Ergebnisse von drei unterschiedlichen Kakaoproben, die mit beiden Methoden untersucht wurden gegenübergestellt.

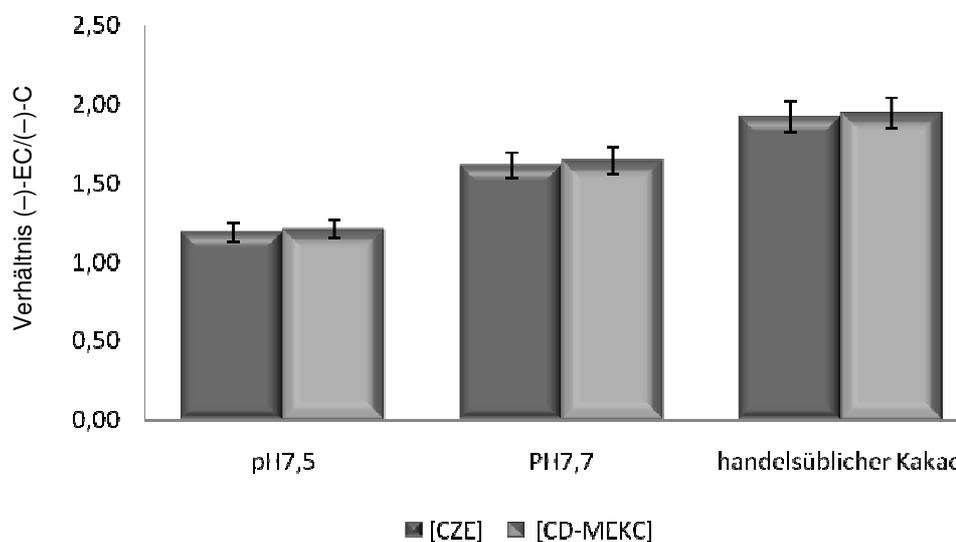


Abbildung 41 Darstellung der prozentualen Verhältnisse von (-)-EC zu (-)-C aus drei Kakaoproben, analysiert mittels chiraler CZE [84] und CD-MEKC

Unabhängig von der angewandten Analysenmethode werden für die jeweiligen Kakaoproben die gleichen Werte bestimmt.

2.2.7 Vergleich der chiralen CZE mit der CD-MEKC

Vergleich der Peakauflösungen R_s

Die Peakauflösung für die chirale Trennung der Flavan-3-ole ist bei der CD-MEKC besser als bei der CZE. In einer graphischen Darstellung (Abbildung 42) sind die Auflösungen der Enantiomeren und Diastereomeren beider Analysemethoden gegenübergestellt.

Abgesehen von der Trennung der Diastereomeren (+)-Catechin und (+)-Epicatechin bei der CD-MEKC werden bei beiden Methoden keine Basislinientrennungen erreicht.

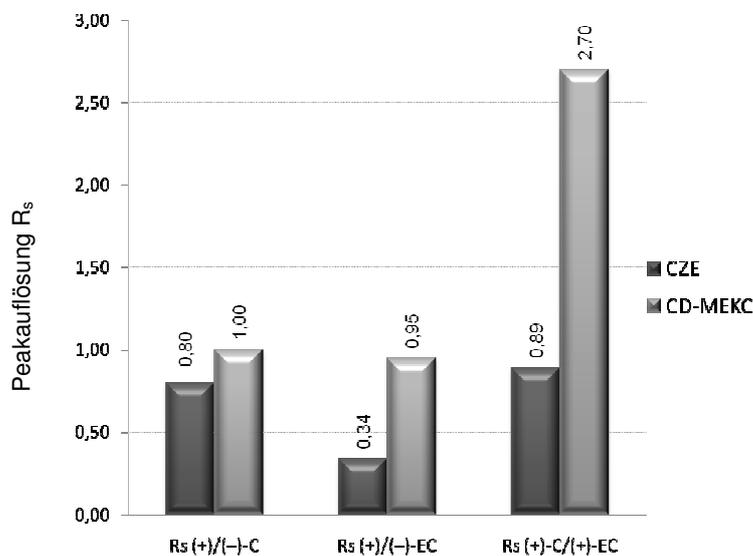


Abbildung 42 Vergleich der Peakauflösungen (R_s) zwischen den Enantiomeren (+)/(-)-C und (+)/(-)-EC sowie zwischen den Diastereomeren (+)-C/(+)-EC in der chiralen CZE und der CD-MEKC

Vergleich der Analysenzeiten

Die Migrationszeiten und damit die Gesamtanalysendauer unterscheiden sich in der CZE und CD-MEKC für (–)-Catechin, (+)-Catechin, (+)-Epicatechin und (–)-Epicatechin praktisch nicht (Tabelle 20).

Tabelle 20 Gegenüberstellung der Migrationszeiten von (–)-C, (+)-C, (+)-EC, (–)-EC, bei CZE und CD-MEKC

	Migrationszeit (min) [CZE]	Migrationszeit (min) [CD-MEKC]
(–)-Catechin	9,94	9,43
(+)-Catechin	10,07	9,72
(+)-Epicatechin	10,18	10,48
(–)-Epicatechin	10,31	10,87

Durch Verringerung der SDS-Konzentration bei der CD-MEKC (Abschnitt 2.2.2) können die Migrationszeiten des (+)-Epicatechin und (–)-Epicatechin auf unter 10 min gekürzt werden. Wie effizient dies ist, hängt von der zu untersuchenden Lebensmittelmatrix sowie von der Art und Anzahl weiterer phenolischer Verbindungen ab. Obwohl beide Methoden unterschiedlichen Trennmechanismen unterliegen und verschiedene Hintergrundelektrolyte besitzen, bleibt die Migrationsreihenfolge identisch.

Bei beiden Methoden beruht die Migrationsreihenfolge von Catechin und Epicatechin auf der räumlichen Anordnung der phenolischen Gruppen am C-2- und der OH-Gruppe am C-3-Atom.

Vergleich der Validierungsparameter

In Tabelle 21 werden die Reproduzierbarkeit, Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze beider Methoden gegenübergestellt.

Tabelle 21 Vergleich der Validierungsparameter: Reproduzierbarkeit von (+)-C und (-)-EC, Nachweisgrenze (NG) und Bestimmungsgrenze (BG)

	CZE	CD-MEKC
Reproduzierbarkeit	0,8 (intra-Day)	0,94 (intra-Day)
(RSD t_{\min}) (+)-C	0,97 (inter-Day)	1,74 (inter-Day)
Reproduzierbarkeit	0,77 (intra-Day)	0,98 (intra-Day)
(RSD t_{\min}) (-)-EC	0,99 (inter-Day)	1,98 (inter-Day)
NG	5 $\mu\text{g/mL}$	6 $\mu\text{g/mL}$
BG	10 $\mu\text{g/mL}$	19 $\mu\text{g/mL}$

Die Reproduzierbarkeit der CD-MEKC ist geringer als die der CZE. Die Ursache dafür liegt vermutlich in der Labilität des EOF in der CD-MEKC. Signifikante Verschlechterungen treten insbesondere bei inter-day-Analysen auf. Dies lässt sich durch die komplexere Zusammensetzung des Hintergrundelektrolyten erklären. Durch die gesteigerte Anzahl an Substanzen, die zur Herstellung des Trennpuffers notwendig sind, erhöht sich das Fehlerpotential. Ungenaue Einwaagen, pH-Wert Schwankungen oder Chemikalien aus anderen Chargen können zu Veränderungen im EOF und somit zu Verschiebungen in den Migrationszeiten führen. Der Vergleich von NG und BG beider Methoden zeigt keine signifikanten Differenzen. Bei beiden Methoden wurden die Parameter NG und BG nach DIN 32645 ermittelt.

In der nachfolgenden Tabelle 22 sind die Vor- und Nachteile der CZE und der CD-MEKC nochmals zusammenfassend gegenübergestellt.

Tabelle 22 Gegenüberstellung der Vor- und Nachteile der, zur chiralen Trennung von Flavan-3-olen entwickelten Methoden (CZE / CD-MEKC)

	VORTEIL	NACHTEIL
CZE	<ul style="list-style-type: none"> * Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten gut * Migrationszeiten kurz * NG/BG relativ niedrig 	<ul style="list-style-type: none"> * Peakauflösung R_s schlechter
CD-MEKC	<ul style="list-style-type: none"> * Peakauflösung R_s sehr gut * Migrationszeiten kurz * NG/BG relativ niedrig 	<ul style="list-style-type: none"> * Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten schlechter

2.2.8 Fazit des Methodenvergleichs

Der Vergleich der in dieser Arbeit entwickelten CD-MEKC zur chiralen Trennung von Flavan-3-olen in Kakao und Kakaoprodukten mit der von Kofink et al. (2007) [85] beschriebenen chiralen CZE-Methode macht deutlich, dass die CD-MEKC als Referenzmethode zur CZE geeignet ist.

In den vorangehenden Kapiteln wurde festgestellt, dass die Migrationszeiten der CD-MEKC nahezu identisch mit den Migrationszeiten der CZE sind. Auch die NG und BG für die Analyten Catechin und Epicatechin liegen bei beiden Methoden im gleichen Konzentrationsbereich. Wie in Abschnitt 2.2.6 gezeigt wurde, werden bei der Untersuchung von Probenmaterial gleiche Ergebnisse erzielt, was erkennen lässt, dass sowohl die CZE als auch die CD-MEKC zuverlässig arbeiten.

Nachteilig ist die deutlich schlechtere Reproduzierbarkeit der CD-MEKC (Abschnitt 2.2.7). Besonders ausgeprägt ist dies bei Analysen, die an unterschiedlichen Tagen ausgeführt wurden. Dennoch liegen die Reproduzierbarkeiten in einem für die CE akzeptablen Bereich.

2.3 Entwicklung einer chiralen HPLC Methode zur Trennung der Flavan-3-ole in Humanplasma

In den letzten Jahrzehnten beschäftigte sich die Lebensmittelchemie vorwiegend mit der qualitativen und quantitativen Bestimmung von Lebensmittelinhaltsstoffen. Im Laufe der Zeit wurden einigen Verbindungsklassen, so auch den Polyphenolen, positive physiologische Eigenschaften zugeschrieben (siehe Abschnitt 1.2.5), wodurch sich teilweise eine Schwerpunktverlagerung zur wirkungsbezogenen Analytik ergab. Jedoch können diese Verbindungen nur dann eine Wirkung im menschlichen Organismus erzielen, wenn sie vom Menschen resorbiert werden. Aus diesem Grund befasst sich die Lebensmittelchemie immer mehr mit der Analytik physiologisch wichtiger Lebensmittelinhaltsstoffe in Humanproben wie Blut, Plasma, Urin etc. Ziel dabei ist es, einen Einblick in den menschlichen Metabolismus zu bekommen und mehr Erkenntnisse über die Bioverfügbarkeit einzelner Verbindungen zu erlangen. Erst dann besteht die Möglichkeit, eine Aussage über die Bedeutsamkeit einer Verbindung im Hinblick auf ihre physiologische Wirksamkeit für den Menschen zu treffen.

Über die monomeren Flavan-3-ole gibt es bislang nur wenige Informationen, was ihr Verhalten im menschlichen Organismus betrifft. In einigen Veröffentlichungen [17, 42, 44] werden Angaben über die Bioverfügbarkeit von (+)/(-)-Catechin und (+)/(-)-Epicatechin in Tieren gemacht, jedoch ist bekannt, dass Tierstudien nicht eins zu eins auf den Menschen übertragbar sind. Weiterhin liegt auch Literatur über die Analytik der Catechine in Humanplasma vor [30, 99, 111, 188]. In diesen Veröffentlichungen handelt es sich vorwiegend um den Nachweis der Tee-Catechine (EGCG, EGC, CG, ECG etc.) nach Genuss von grünem Tee. Die Chiralität der Verbindungen wird bei diesen Methoden jedoch nicht berücksichtigt.

Wie aus einer früheren Arbeit des Arbeitskreises bekannt ist [84] und in eigenen Versuchen (Abschnitt 2.2) festgestellt und belegt werden konnte, enthält unbehandelter Kakao hohe Gehalte an (-)-Epicatechin und einen kleinen Anteil (+)-Catechin. Während der Verarbeitung der Kakaobohne zu Kakaopulver oder Schokolade finden unterschiedliche chemische als auch enzymatische Reaktionen statt. Die alkalische Behandlung des Kakao katalysiert die Epimerisierungsreaktion von (-)-Epicatechin zu (-)-Catechin und von (+)-Catechin zu (+)-Epicatechin (siehe auch Kapitel 1.2.3 und 1.2.4).

Daraus resultiert die Frage, ob diese neu entstandenen, atypischen Enantiomere gleichermaßen bioverfügbar sind wie die natürlich vorkommenden Catechine. Um dies beantworten zu können, bedarf es einer ausreichend sensitiven und selektiven Methode zur chiralen Analytik von (+)/(-)-Catechin und (+)/(-)-Epicatechin in Humanplasma.

2.3.1 Methodenentwicklung

Die Schwierigkeit bei der Analyse und der chiralen Trennung der Catechine in biologischen Matrices ist ihre geringe Konzentration (hier: im Plasma). Aber auch ihre Tendenz an Proteine zu binden sowie die Intensität und Art ihrer Metabolisierung im menschlichen Organismus, erschweren die Analytik. Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass die Catechine bereits während der Probenentnahme, als auch während der Lagerung und Probenaufarbeitung, oxidationsempfindlich sind. Um die Oxidation der Analyten zu minimieren, wird dem entnommenen Plasma eine antioxidative Lösung zugesetzt. Zusätzlich kann die Oxidation durch eine einfache und schnelle Probenaufarbeitung minimiert werden.

Die Entwicklung dieser Methode beinhaltet somit zwei wichtige Teilabschnitte, die für ein zuverlässiges Ergebnis essentiell sind:

1. Optimale Aufarbeitung der Humanplasmaproben
2. HPLC-Methode zur chiralen Trennung der Flavan-3-ole (Epimere und Enantiomere)

2.3.1.1 Chirale HPLC-Methode

Für die chirale HPLC ist der Einsatz spezieller Säulen notwendig. In Abhängigkeit von dem zu trennenden Analyten, dem Probenmaterial sowie dem eingesetzten Fließmittel, können unterschiedliche Arten chiraler stationärer Phasen eingesetzt werden. Die Tabelle IV im Anhang stellt einige chirale stationäre Phasen, ihren jeweiligen Trennmechanismus sowie ihren Anwendungsbereich vor.

In Anlehnung an eine Veröffentlichung von Cooper et al. (2007) [37], in der mittels einer β -Cyclodextrin Säule die Enantiomeren (+)(-)-Catechin und (+)(-)-Epicatechin in Schokolade getrennt werden konnten, wurden Vorversuche mit (+)(-)-Catechin /(-)-Epicatechin-Standardmischungen an einer β -CD-Säule vorgenommen. Mit den von Cooper et al. (2007) [37] beschriebenen HPLC-Bedingungen konnte eine chirale Trennung der Standardsubstanzen nicht nachvollzogen werden. Unter Beibehalt der mobilen und der stationären Phase und durch modifizieren einiger Parameter (Temperatur, Fluß, Gradient) gelang es die Standards (+)(-)-Catechin und (-)-Epicatechin zu trennen.

Die Analyse einer Humanplasmaprobe, dotiert mit (+)(-)-Catechin und (-)-Epicatechin ergab, dass mit dieser Methode (-)-Epicatechin nicht und (+)(-)-Catechin nur schlecht nachweisbar sind, was aus der komplexen Zusammensetzung des Blutplasmas resultiert. In weiteren Experimenten wurden weitere unterschiedliche Gradienten eingesetzt. Diese erzielten jedoch auch keine wesentlich besseren Ergebnisse. Es steht somit fest, dass unter Verwendung einer β -CD-Säule zwar eine chirale Trennung der Flavan-3-ole in Kakao möglich ist, aber für die

Trennung in Humanplasma als nicht geeignet angesehen werden muss (überprüfte HPLC-Bedingungen und entsprechende Abbildungen sind im Anhang S.157 bis 158 zu finden).

Bei der Wahl einer geeigneteren stationären Phase wurde sich auf die Erfahrung in der chiralen CE-Analytik gestützt. In der CE wird zur chiralen Trennung der Flavanole in Kakao ein modifiziertes γ -CD (Hydroxypropyl- γ -CD) eingesetzt (siehe Abschnitt 2.2.) [85]. HPLC und CE basieren zwar auf unterschiedlichen Trennmechanismen, jedoch ist das Prinzip der chiralen Trennung durch den Einsatz von Cyclodextrinen identisch (Siehe Abschnitt 1.6.3.3). Die Enantiomeren von Catechin und Epicatechin gehen mit den Cyclodextrinen mit unterschiedlich starker Affinität Komplexe ein. Es ist dabei unerheblich ob das Cyclodextrin kovalent an Silicagel gebunden vorliegt oder ob es sich in einem Trennpuffer gelöst befindet.

Weitere HPLC-Untersuchungen wurden daher auf einer permethylierten- γ -Cyclodextrin Säule durchgeführt. Unter isokratischen Bedingungen konnten bereits Verbesserungen der Trennung von (+)/(-)-Catechin und (-)-Epicatechin in dotiertem Humanplasma, im Vergleich zu der β -Cyclodextrin Säule, festgestellt werden. Dennoch wurden sowohl weitere Untersuchungen unter isokratischen Bedingungen, aber unterschiedlicher Eluentenzusammensetzung durchgeführt, als auch verschiedene lineare und zusammengesetzte Gradienten getestet (HPLC-Bedingungen und entsprechende Abbildungen sind im Anhang S.159 bis 164 zu finden).

Nach Veränderung der mobilen Phase und dem Einsatz eines in Abbildung 43 und Tabelle 23 dargestellten zusammengesetzten Gradienten, gelang eine vollständige chirale Trennung der monomeren Flavan-3-ole (+)/(-)-Catechin und (-)-Epicatechin in Humanplasma.

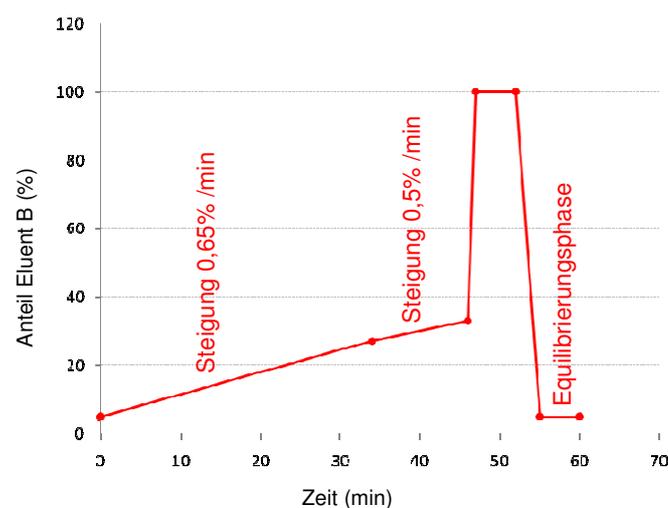


Abbildung 43 Graphische Darstellung des zusammengesetzt linearen Gradienten zur vollständigen Trennung der Enantiomeren (+)/(-)-Catechin und (+)/(-)-Epicatechin

Tabelle 23 HPLC-Bedingungen des zusammengesetzt linearen Gradienten für eine vollständige chirale Trennung von (+)/(-)-Catechin und (+)/(-)-Epicatechin

Zeit (min)	% Eluent B
0	5
34	27
46	33
47	100
52	100
55	5
60	5

Das Chromatogramm in Abbildung 44 zeigt, dass unter diesen Gradientenbedingungen eine chirale Trennung gelang. Die Enantiomere (+)/(-)-Catechin sowie (-)-Epicatechin sind fast basisliniengetrennt.

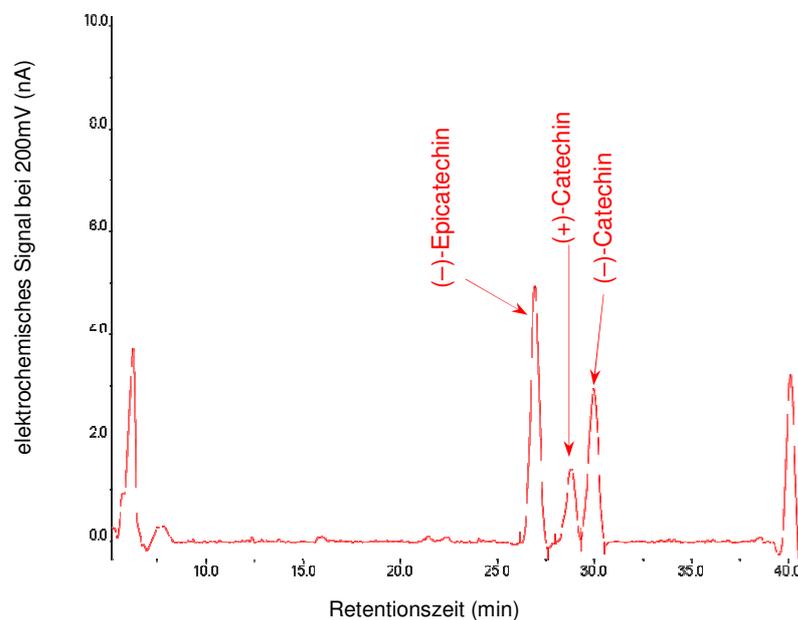


Abbildung 44 HPLC-CEAD Chromatogramm der optimierten chiralen Trennung eines (+)/(-)-Catechin/(-)-Epicatechin-Standardgemisches gemessen auf einer PM- γ -CD-Säule

Die in diesem Abschnitt dargestellte Methode wurde ausschließlich mit einem (+)/(-)-Catechin- und (-)-Epicatechin-Standardgemisches entwickelt. Da das (+)-Epicatechin nicht kommerziell als Standard erhältlich ist, konnte diese Verbindung bei der Methodenentwicklung nicht mit berücksichtigt werden.

Als nächstes wurden Kakaoproben unterschiedlichen Alkalisierungsgrades analysiert (Abbildung 45 (A) und (B)), so wie eine Guaranáprobe (Abbildung 46). Guaraná weist von Natur aus alle vier Enantiomeren auf [86], weshalb diese Probe zur Überprüfung einer erfolgreichen chiralen Trennung von (+)/(-)-Catechin als auch von (+)/(-)-Epicatechin geeignet ist.

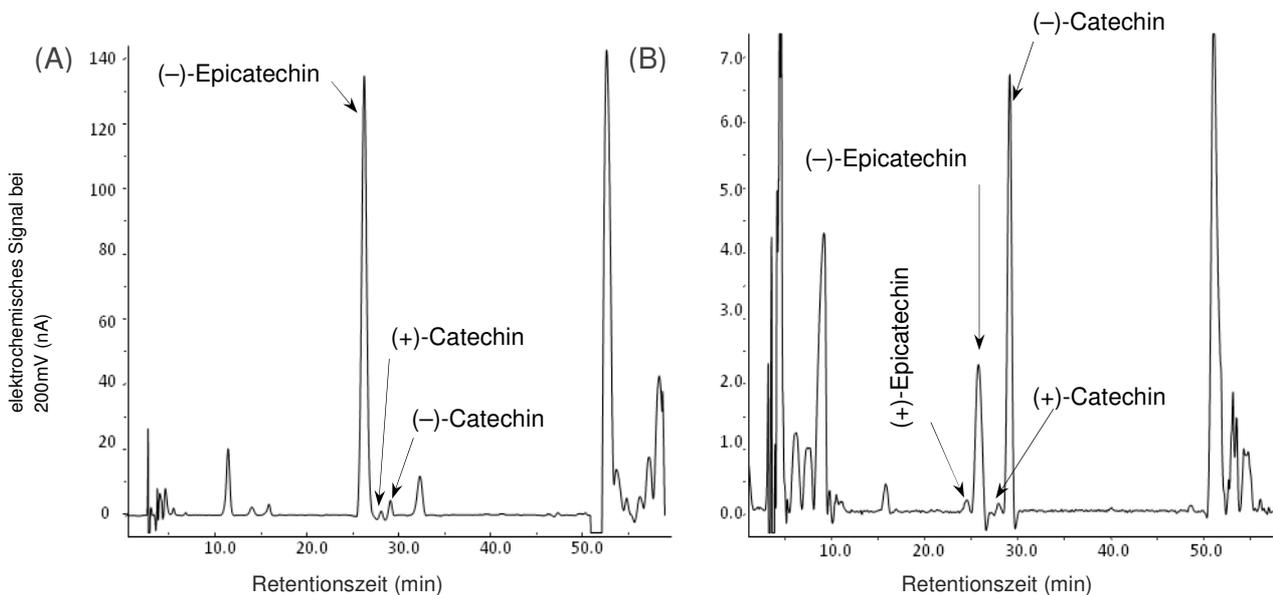


Abbildung 45 HPLC-CEAD Chromatogramme einer nicht alkalisierten Kakaoprobe (A) und einer alkalisierten Kakaoprobe (B)

Wie aus den Chromatogrammen der Kakao- und Guaranáanalysen deutlich wird, ist die entwickelte HPLC-Methode auch unter Einfluss einer Lebensmittelmatrix in der Lage, die monomeren Flavan-3-ole chiral zu trennen. Zudem konnten sowohl die Kakaoergebnisse als auch das Ergebnis der Guaranáprobe sicherstellen, dass durch diese Methode nicht nur (+)/(-)-Catechin sondern auch (+)/(-)-Epicatechin chiral getrennt werden können.

Eine Identifizierung des (+)-Epicatechins konnte durch Voltammogramm-Vergleich durchgeführt werden (genauer zur Identifizierung siehe Abschnitt 2.3.2).

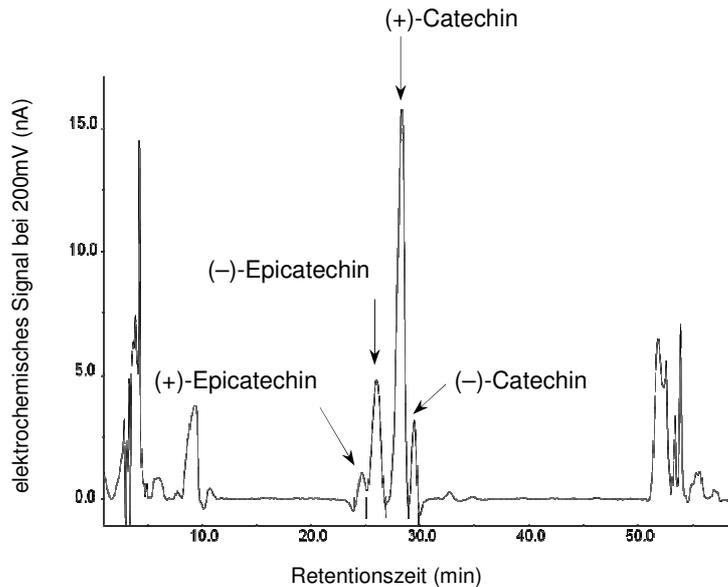


Abbildung 46 HPLC-CEAD Chromatogramm einer Guaranáprobe

2.3.1.2 Probenvorbereitung

Enzymatische Spaltung

Die Flavan-3-ole Catechin und Epicatechin werden vom menschlichen Organismus vollständig metabolisiert. Es bilden sich dabei vorwiegend methylierte, glucuronidierte und sulfatierte Flavan-3-ol-Derivate [17, 42, 43, 93]. Folglich können diese Verbindungen nicht als freie Catechine im Plasma gefunden werden. Der erste Schritt der Probenvorbereitung ist also die enzymatische Hydrolyse der Konjugate. Dabei ist zu beachten, dass ausschließlich die glucuronidierten- und sulfatierten Catechinderivate hydrolysiert werden. Methylierungen können enzymatisch nicht gespalten werden. Infolgedessen werden mit dieser Methode nur die glucuronidierten und sulfatierten Flavan-3-ole erfasst.

Hinsichtlich der Metabolisierung gibt es in der Literatur divergierende Aussagen. Einige Autoren sind der Meinung, dass die Catechine nur als Glucuronide und methylierte Derivate im Plasma vorkommen, nicht aber als Sulfate [109, 125, 169]. Andererseits gibt es auch Berichte, dass die Catechine im menschlichen Organismus auch sulfatiert werden [42, 135, 143]. Um herauszufinden, ob die Catechine tatsächlich sulfatiert im Plasma vorkommen, wurde eine Reihe an Untersuchungen durchgeführt. Zu einer nach Kakaogenuss erhaltenen Plasmaprobe wurde einerseits nur das Enzym β -Glucuronidase zugesetzt und die Probe anschließend analysiert. In einem weiteren Versuch wurde die identische Plasmaprobe zusätzlich zur β -Glucuronidase, mit Sulfatase versetzt. Ein Vergleich der Ergebnisse beider Versuche

ergab, dass nach Inkubation der Probe mit beiden Enzymen ein deutlicher Anstieg in der

Catechin-Konzentration zu verzeichnen war. Weiterhin wurde eine Plasmaprobe zunächst ohne Enzymzugabe analysiert und anschließend mit dem Enzym Sulfatase behandelt. Ohne Enzymierung konnte kein freies Catechin oder Epicatechin detektiert werden. Im Fall der Inkubation mit dem Enzym Sulfatase war es jedoch möglich, freies Catechin zu identifizieren. Es ist somit sichergestellt worden, dass im vorliegenden Fall die monomeren Flavan-3-ole sowohl glucuronidiert als auch sulfatiert im Humanplasma vorkommen.

Da es bislang nur wenig Informationen über die Konzentration an glucuronidierten und sulfatierten Catechinen in Humanplasma nach Kakaoverzehr gibt, musste überprüft werden, wie viel Enzym notwendig ist, um alle glucuronidierten und sulfatierten Flavan-3-ole zu hydrolysieren. Dazu wurde die Konzentration an β -Glucuronidase und Sulfatase stufenweise erhöht, bis kein signifikanter Anstieg in der Catechin-Konzentration mehr zu verzeichnen war. Das Ergebnis zeigte, dass für eine vollständige Hydrolyse der Glucuronid- und Sulfat-Konjugate in 500 μ L Humanplasma, 6250 U β -Glucuronidase und 250 U Sulfatase benötigt wird. Im Vergleich mit den Enzymkonzentrationen, die Lee et al. (1995) [98] zur Hydrolyse der Teecatechine in 500 μ L Humanplasma benötigte (1562,5 U β -Glucuronidase + 6,25 U Sulfatase) sind in diesem Fall die 4-fache Menge an β -Glucuronidase und das 40-fache an Sulfatase erforderlich. Die Inkubationszeiten und die Inkubationstemperaturen sind bei der Methode von Lee et al. (1995) [98] und der hier vorgestellten Methode identisch. Abbildung 47 stellt graphisch dar, wie die Catechin-/Epicatechin-Konzentration mit ansteigender Enzymmenge wächst.

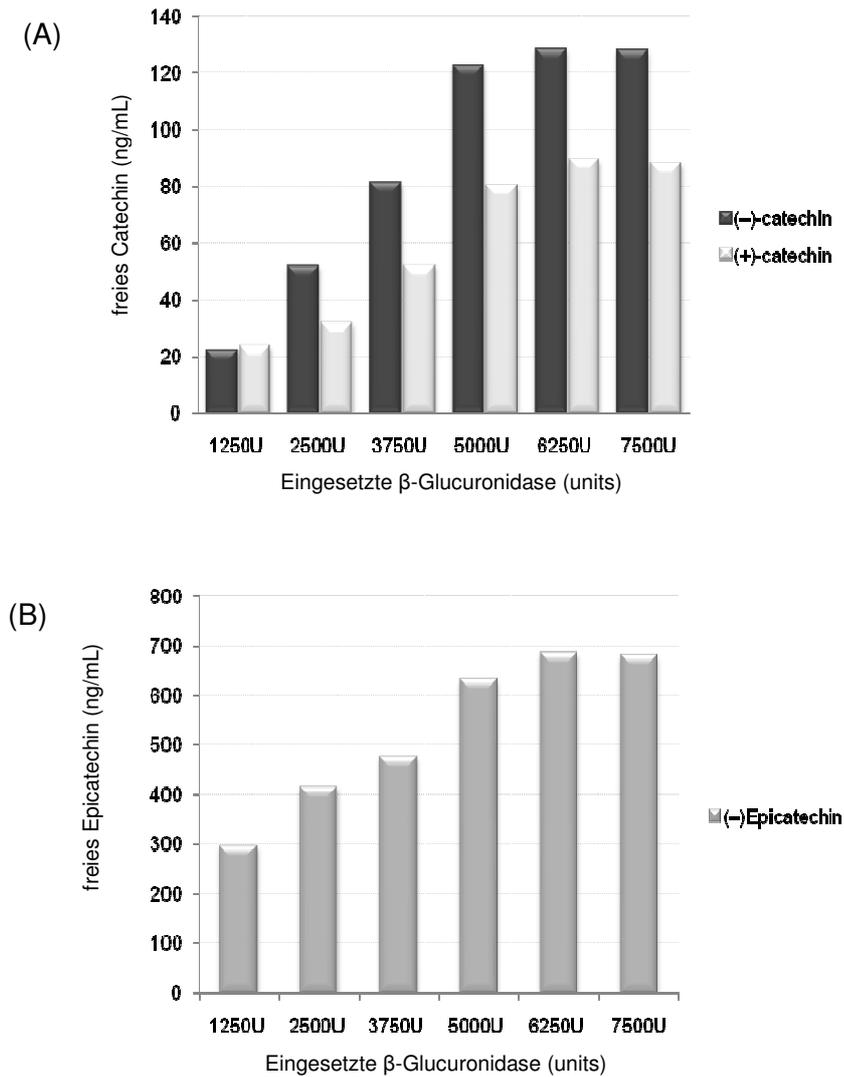


Abbildung 47 Effekt der β -Glucuronidase Konzentration auf den Gehalt an freiem (+)- und (-)-Catechin (A) und (-)-Epicatechin (B). Verwendet wurde für dieses Experiment Humanplasma, das 2 h nach Kakaoverzehr entnommen wurde

Entsprechende Diagramme werden auch für die Menge an eingesetzter Sulfatase erhalten (siehe Abbildung X im Anhang).

Probenvorbereitung durch Proteinfällung

In Anlehnung an einen Artikel von Zimmermann et al. (2009) [188] wurde zunächst versucht, die Flavan-3-ole direkt aus dem nach Fällung der Plasmaproteine erhaltenen Überstand zu analysieren. Hierzu wurden die Plasmaproteine mit Hilfe eines Gemisches aus Dimethylformamid (DMF) und Trichloressigsäure (TCA) ausgefällt.

TCA ist ein sehr stark denaturierendes Proteinfällungsreagenz. Bereits niedrige Konzentrationen an TCA genügen, um eine nahezu vollständige Proteinfällung zu erreichen.

Der Verdünnungsfaktor durch die Fällungsmittel liegt bei dieser Art der Probenvorbereitung bei nur 1,6. Dies ist in Hinsicht auf die niedrigen Analytkonzentrationen im Humanplasma maßgebend.

Das Prinzip der Proteinfällung mittels TCA liegt zum einen darin, dass es das über Wasserstoffbrücken an die Proteine gebundene Wasser eliminiert. Durch die Anlagerung des TCA an die Peptidbindungen der Proteine wird die Wasserlöslichkeit zerstört und die Proteine fallen aus (Abbildung 48).

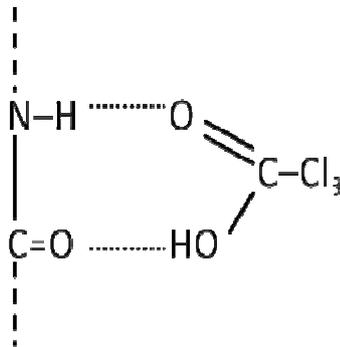


Abbildung 48 Bindung des TCA-Moleküls an die Peptidbindungen der Plasmaproteine über Wasserstoffbrückenbindungen

Zusätzlich wird durch das TCA die Tertiärstruktur des Proteins zerstört. Die Proteinfällung mittels DMF basiert grundsätzlich auf einem ähnlichen Mechanismus wie die Fällung mittels TCA. Allerdings hat DMF im Vergleich zu TCA einen pH-Wert von 7,0 bei 20 °C und somit keinen sauren Charakter. Da die Catechine sehr gut in DMF löslich sind, wird durch den Zusatz von DMF verhindert dass die Catechine von den gefällten Proteinen adsorbiert werden.

Untersuchungen, bei denen in polyphenolfreies Humanplasma Catechin- und Epicatechin-Standard dotiert wurde, und welche nach dem oben erwähnten Verfahren, der Proteinfällung mit TCA und DMF, aufgearbeitet wurden, ergaben,

dass nur geringe Teile des zudotierten Standards mit der hier beschriebenen chiralen HPLC-Methode wieder zu finden sind. Zudem weisen die erhaltenen Chromatogramme einen Matrixpeak auf, der sich über fast das gesamte Chromatogramm hinweg zieht und dadurch die Analyten überlagert.

Mehrere Versuchsreihen zeigten schließlich, dass die schlechte Trennung und der im Chromatogramm vorhandene Matrixpeak durch das zur Fällung der Proteine eingesetzt TCA verursacht wird (Abbildung 49).

Dies lässt sich damit erklären, dass die TCA-Moleküle zusammen mit den Cyclo-dextrinen der stationären Phase Wechselwirkungen eingehen, was dazu führt, dass die zur chiralen Trennung der Flavan-3-ole benötigten aktiven Zentren besetzt werden. Es findet somit nicht in ausreichender Menge Komplexbildung zwischen Analyt und stationärer Phase statt. Die Analyten werden folglich kontinuierlich über den gesamten Analysenzeitraum von der Säule eluiert, es wird vorwiegend ein Matrixpeak sichtbar.

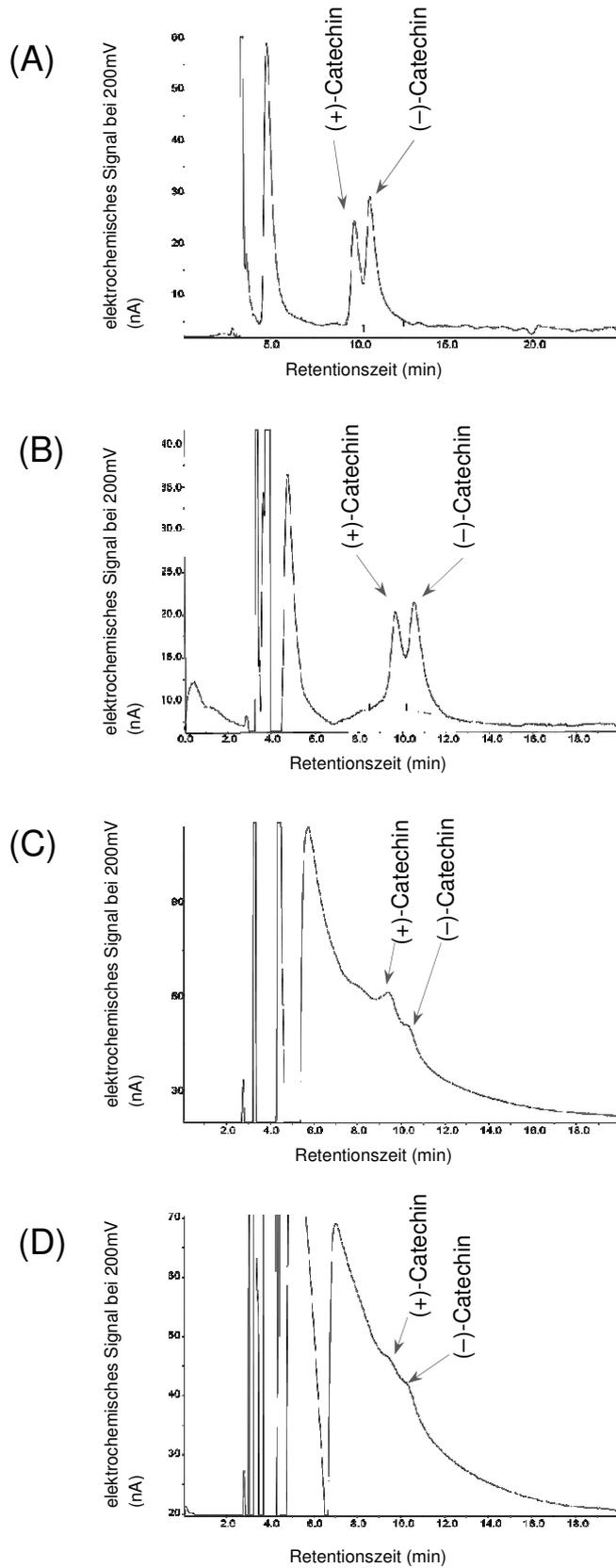


Abbildung 49 HPLC-CEAD Chromatogramme aus den Untersuchungen der Plasma Probenaufarbeitung durch direkte Proteinfällung mittels Säure. Proteinfreies Plasma + 250 ng/mL Catechin (a), Proteinfreies Plasma + 250 ng/mL Catechin + DMF (b), Proteinfreies Plasma + 250 ng/mL Catechin + TCA (c), Proteinfreies Plasma + 250 ng/mL Catechin +DMF + TCA (d)

Abbildung 50 zeigt am Beispiel eines nativen Cyclodextrins, welche Wechselwirkungsmöglichkeiten zwischen TCA und einem Cyclodextrin besteht.

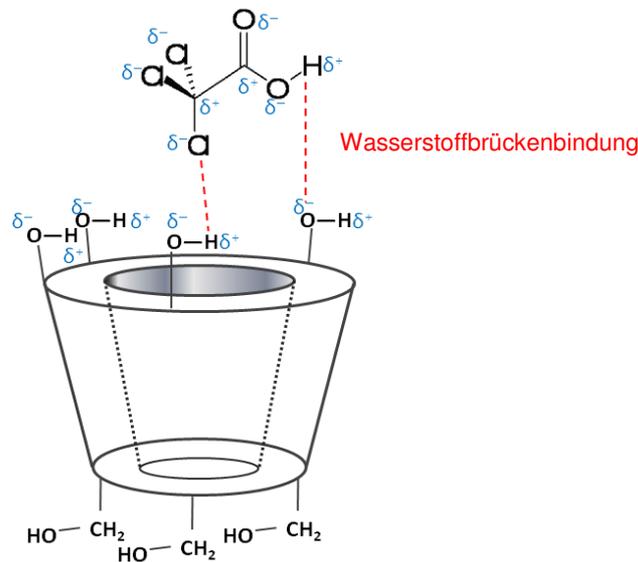


Abbildung 50 Darstellung der Wechselwirkung zwischen einem TCA-Molekül und einem nativen Cyclodextrin-Molekül. verändert nach [13]

Das TCA bildet eine Barriere für die Ausbildung von Inklusionskomplexen. Zusätzlich werden die Hydroxylgruppen des Cyclodextrins für Wechselwirkungen mit dem Analyten blockiert [13].

Demnach ist TCA für eine nachfolgende chirale Analytik mittels Cyclodextrinen als Proteinfällungsreagenz nicht geeignet. DMF hingegen führte zu keiner Verschlechterung der chiralen Catechin-Analytik. Der Nachteil der Präzipitation von Plasmaproteinen mit Hilfe von reinem DMF ist der größere Überschuss an DMF, der eingesetzt werden muss, um eine vollständige Fällung der Proteine zu erreichen. Versuche bezüglich der Proteinfällung mit DMF haben gezeigt, dass zu einem Teil Humanplasma mindestens die gleiche Menge an DMF zugegeben werden muss, damit der größte Teil des Proteins gefällt wird.

Humanplasmaproben, die nach Verzehr eines stark konzentrierten Kakaotranks gewonnen wurden, wurden zunächst mit Sulfatase und β -Glucuronidase inkubiert. Das Plasmaprotein wurde mit DMF im Verhältnis 1:1 gefällt. Nach Abtrennen des Proteinniederschlags durch Zentrifugation wurden die Proben per chiraler HPLC analysiert. Die Untersuchungen ergaben keinerlei Wiederfindung der monomeren Flavan-3-ole.

Für das Fehlen der wichtigsten Kakaobestandteile im menschlichen Plasma nach Konsum eines kakaohaltigen Getränkes gab es mehrere mögliche Ursachen:

- Keine Resorption der Verbindungen
- Störung der chiralen HPLC-Methode durch Plasmabestandteile
- Zu geringer Gehalt der Verbindungen im Humanplasma
- Nicht geeignete Probenaufarbeitung

Zunächst konnte anhand einer nicht chiralen HPLC-Analytik [188] belegt werden, dass die beiden monomeren Flavan-3-ole Catechin und Epicatechin tatsächlich nach Kakaoverzehr im Humanplasma wieder zu finden sind (Abbildung 51). Die identisch aufgearbeiteten Plasmaproben, gemessen über das chirale HPLC-System, ergaben aber erneut keine Wiederfindung der Catechine im Plasma. Um auszuschließen, dass möglicherweise Bestandteile des Humanplasmas die chirale Analytik stören, wurden Plasmaproben mit Standard dotiert, mit der DMF Proteinfällungsmethode aufgearbeitet und chiral analysiert. Dabei war eine erfolgreiche Trennung der Analyten zu verzeichnen. Die Abwesenheit der Catechine bei der chiralen HPLC-Analytik wurde somit auf die Probenaufarbeitungsmethode zurückgeführt.

Eine chirale Analytik der Flavan-3-ole unmittelbar aus Humanplasma nach Proteinfällung ist demzufolge nicht möglich, da durch die Enzymierung und die Proteinfällung das Plasma so stark verdünnt wird, dass die zu analysierenden Verbindungen mit dem eingesetzten System nicht mehr detektierbar sind.

Ein Verfahren zum Entfernen der Plasmaproteine und zur Konzentrierung der Analyten ist notwendig.

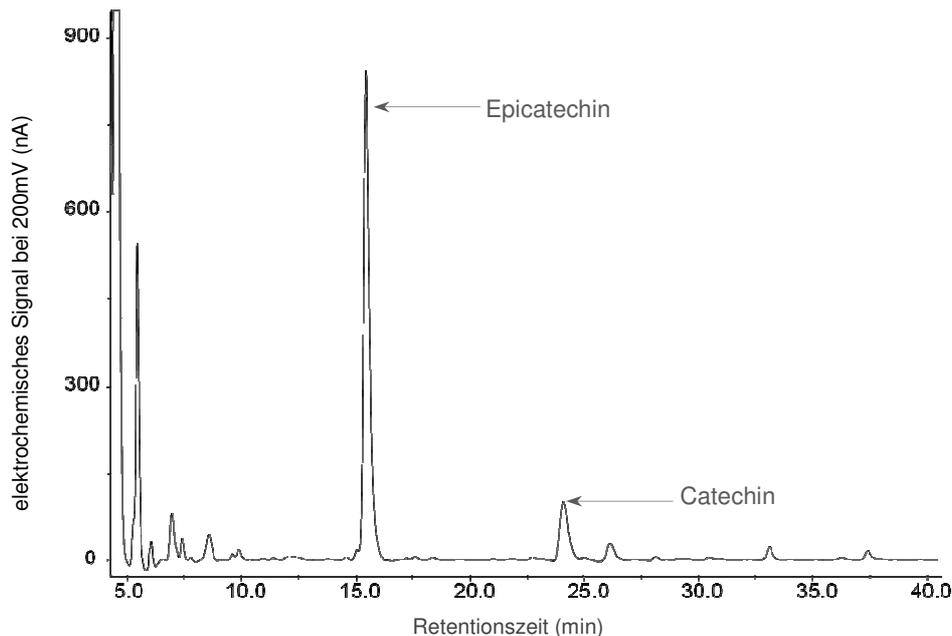


Abbildung 51 Chromatogramm einer Humanplasmaprobe, analysiert über ein nicht chirales HPLC-CEAD System

Probenvorbereitung mittels SPE

In der Literatur wurden einige Methoden gefunden, die mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat Catechine aus Plasma extrahiert haben [44, 98]. Die Wiederfindung ist jedoch gering. So hat beispielsweise Wiese et al. (2009) [178] bei einem Methodenvergleich festgestellt, dass bei der Extraktion mit Ethylacetat die Wiederfindung für Epicatechin bei knapp 42% liegt. Auch Lee et al. (1995) [98] bestätigte die geringe Effizienz dieser Extraktionsmethode. Zudem ist die Extraktion mit Ethylacetat zu unspezifisch, da viele andere Matrixbestandteile mit erfasst werden [36]. Dadurch treten Störpeaks im Chromatogramm auf, die mit den Catechinen zusammen eluieren und somit zu falschen Ergebnissen führen können. Auf Grund dessen wurde sich für eine Festphasenextraktion (SPE) entschieden. Durch den Einsatz der SPE können zum einen die Plasmaproteine entfernt und gleichzeitig die Analyten aufkonzentriert werden. Entscheidende Einflussfaktoren bei der Festphasenextraktion sind die Wahl des Adsorbentmaterials und die Zusammensetzung der Auftrage-, Wasch- und Elutionsmittel. Beim Probenaufgabe- und Waschschrift sollen die interessierenden Analyten vollständig adsorbiert und unerwünschte Probenkomponenten weitestgehend entfernt werden. Bei der Elution sollen die Analyten hingegen komplett desorbieren und zwar mit möglichst geringem Volumen an Elutionsmittel. Anhand der Erfahrungen aus der Kakao und Schokoladenaufarbeitung [84], kam eine C_{18} -Phase oder eine Polyamid-Phase in Frage. Die C_{18} -Festphase bringt jedoch das gleiche Problem der Unspezifität mit sich, wie die Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat. Die Wiederfindung der

Catechine über das C_{18} -System ist aber immer noch wesentlich besser (72–76%), als bei der Ethylacetatextraktion.

Untersuchungen an einer Polyamid-Phase mit unterschiedlichen Aceton/Wasser-Gemischen als Elutionsmittel zeigten, dass ein Gemisch aus 70% Aceton und 30% H_2O für die Elution der Catechine am geeignetsten ist (Abbildung 52).

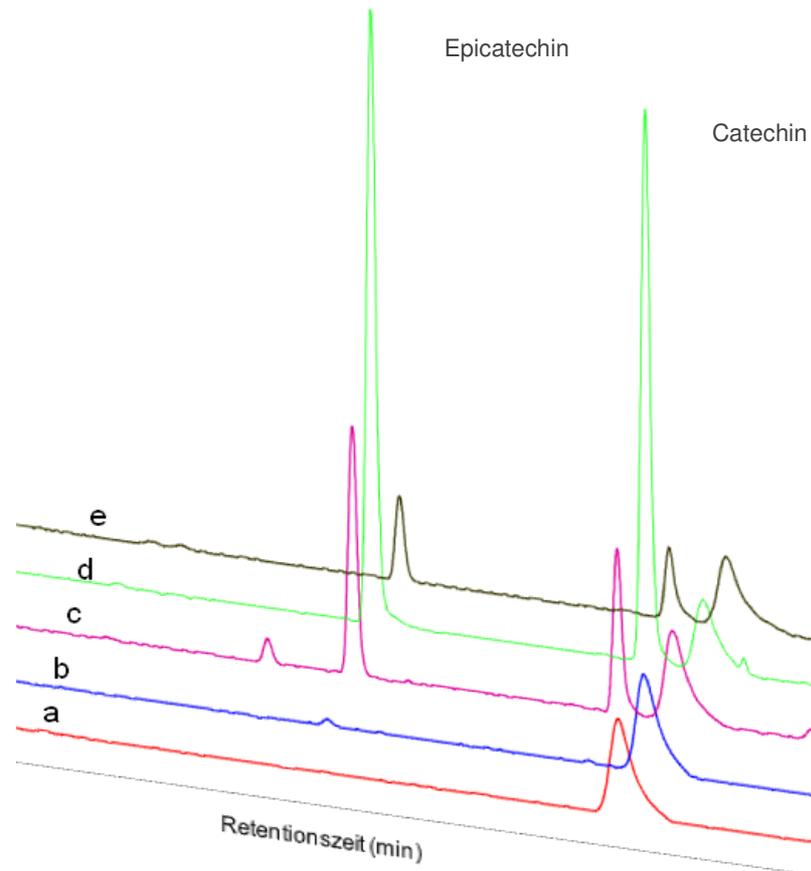


Abbildung 52 Nicht chirale HPLC-CEAD Chromatogramme einer mit (+)/(-)-Catechin und (-)-Epicatechin dotierten Plasmaprobe, nach SPE-Aufarbeitung mit unterschiedlichen Aceton/ H_2O Mischungen als Elutionsmittel (3 mL). Aceton/ H_2O (10/90; v+v) (a), Aceton/ H_2O (30/70; v+v) (b), Aceton/ H_2O (50/50; v+v) (c), Aceton/ H_2O (70/30; v+v) (d), Aceton/ H_2O (100/0; v+v) (e)

Zusätzlich wurden weitere Versuche durchgeführt, bei denen die Substanzen fraktioniert von der Polyamid-Phase eluiert wurden. Hierzu wurden 500 μ L Humanplasma mit Catechin- und Epicatechin-Standard dotiert und auf eine Polyamidphase (3 mL/500 mg) gegeben. Die Verbindungen wurden in 200 μ L Schritten von der Polyamid-Festphase eluiert und die einzelnen Fraktionen über ein

nicht chirales HPLC-System analysiert. Die Ergebnisse werden in Abbildung 53 gezeigt. Sie verdeutlichen, dass 2,5–3,0 mL Eluent benötigt werden, um nahezu alle gewünschten Verbindungen von der Festphase zu desorbieren.

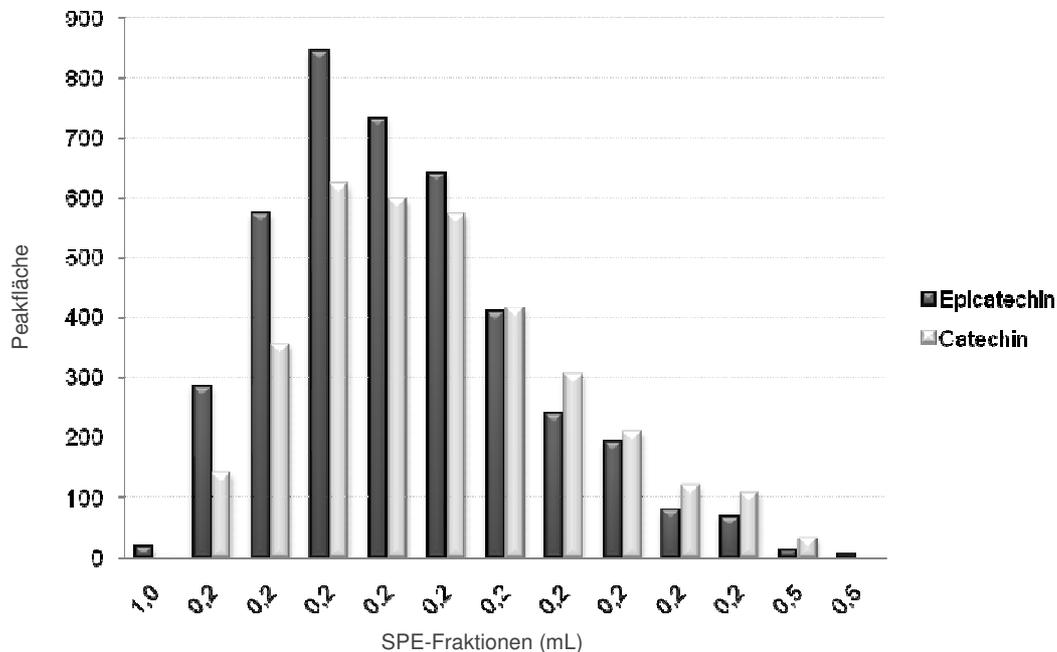


Abbildung 53 Darstellung der fraktionierten SPE-Aufarbeitung über eine Polyamid-Phase mittels Aceton/H₂O/Essigsäure (70,0/29,8/0,2; v+v+v) als Eluent. Waschschrift mit 1000 μ L Eluent, Elution in 200 μ L bzw. 500 μ L Schritten

Über diesen Aufarbeitungsschritt wurden zwar die Plasmaproteine entfernt und die Flavan-3-ole aus dem Plasma extrahiert, jedoch liegen die erwünschten Verbindungen noch nicht in konzentrierter Form vor, sondern in einer sehr stark verdünnten Lösung (1:6 verdünnt). Deshalb wurde das Eluat mittels Stickstoffstrom bei 40 °C auf 100 μ L eingengt. Dies bewirkt eine Aufkonzentrierung der Analyten um das 5-fache. Unter diesen Bedingungen werden schließlich gute Wiederfindungen (90–97%) und gute Reproduzierbarkeiten (0,9–1,5% R.S.D) erreicht.

Da Catechine bekanntlich im leicht sauren Milieu stabiler sind als in neutralem Milieu, wurden dem Eluenten 0,2% Essigsäure zugesetzt. Versuche bezüglich der Elutionskraft des Aceton/H₂O-Gemisches mit und ohne Säure-Zusatz, zeigten, dass die Essigsäure keinen Einfluss auf die Desorption der Catechine hat. In Abbildung 54 sind die Chromatogramme einer mit Standard dotierten Plasmaprobe nach SPE-Aufarbeitung dargestellt. Die Flavan-3-ole wurden sowohl mit Aceton/H₂O im Verhältnis 70/30 (v+v) als auch mit einem Gemisch aus Aceton/H₂O/Essigsäure (70/29,8/0,2; v+v+v) von der Polyamidphase eluiert. Die Chromatogramme sind nahezu kongruent.

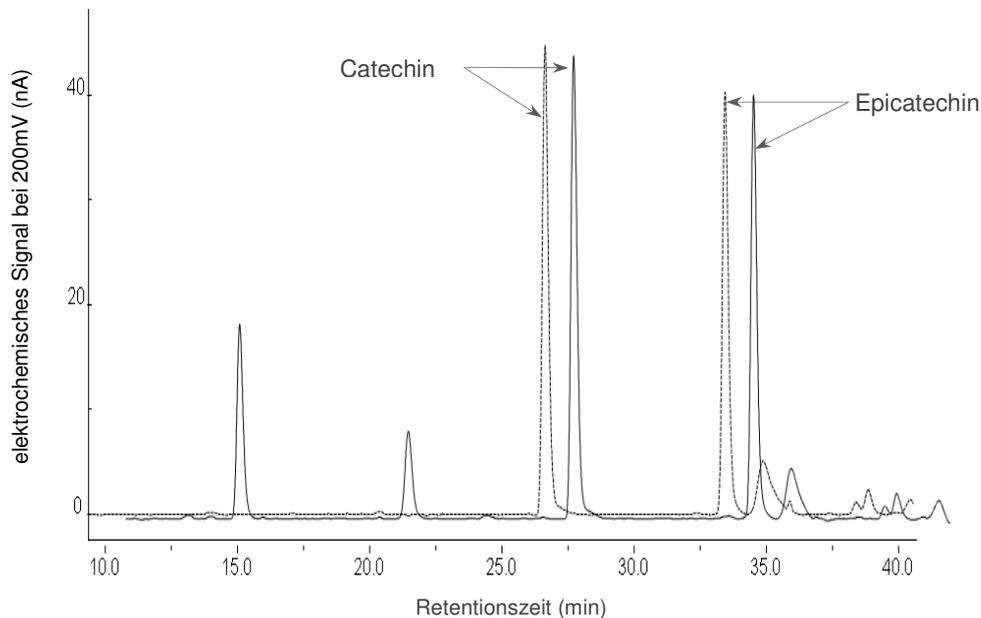


Abbildung 54 HPLC-CEAD Chromatogramme (nicht chirales System) nach SPE-Aufarbeitung mit einer Aceton/H₂O Mischungen (70/30; v+v) als Elutionsmittel (---) und einer Aceton/H₂O/Essigsäure-Mischung (70/29,8/0,2; v+v+v) als Elutionsmittel (—) [zur besseren Erkennung wurden die Chromatogramme zeitversetzt dargestellt]

Details zur Probenaufarbeitung sind im Material und Methodenteil Abschnitt 5.5.6 zu finden.

Unter Verwendung eines weiteren Elutionsmittels, einem Gemisch aus DMSO und Ameisensäure (99/1; v+v) [84], wurden identische Untersuchungen an einer Polyamid-Phase durchgeführt. Die fraktionierte SPE ergab, dass in diesem Fall die Catechine erst mit dem zweiten und dritten Milliliter Eluat desorbieren und die ersten 1,5 mL verworfen werden können. Das Gemisch aus DMSO/Ameisensäure eluiert die Catechine besser von der Polyamid-Phase als das Aceton/Wasser-Gemisch. Dennoch wird zur kompletten Desorption der Catechine so viel Elutionsmittel benötigt, dass auch unter diesen Bedingungen eine Aufkonzentrierung des Eluates unumgänglich ist. DMSO ist jedoch aufgrund seines wesentlich höheren Siedepunktes (Sdp. 189°C) im Vergleich zum Aceton (Sdp. 56°C) schwieriger zu entfernen. Folglich wurde das Aceton/H₂O/Essigsäure-Gemisch als Elutionsmittel beibehalten.

Ergebnis der Probenvorbereitung

Die optimierte Probenvorbereitung für Humanplasma, in welchem Catechin-Enantiomere analysiert werden sollen, beinhaltet folgende drei Schritte:

1. Enzymatische Behandlung von 500 μL Humanplasma mit 6250 U β -Glucuronidase und 250 U Sulfatase bei 37 °C für 45 min.
2. Festphasenextraktion auf einer Polyamid-Phase und Elution der Catechine mit einem Lösungsmittelgemisch aus Aceton/ H_2O /Essigsäure 70:29,8:0,2 (v+v+v).
3. Lösungsmittelverdampfung mittels eines Stickstoffstroms bei einer Temperatur von 40 °C

2.3.2 Identifizierung der Flavan-3-ole

Bei der Detektion mittels CEAD kann eine Identifizierung der Verbindungen mit Hilfe der entsprechenden Strom-/Spannungskurve vorgenommen werden. Diese hydrodynamischen Kurven, auch Voltamogramme genannt, werden durch Auftragen der Detektorsignale gegen die gewählten Potentiale erhalten. Diese Kurven sind für die jeweilige Substanz charakteristisch. Der Verlauf der Voltamogramme von Standardsubstanz und Probensubstanz müssen miteinander übereinstimmen.

Zusätzlich erfolgt ein Retentionszeitenvergleich von Standardsignal und Probensignal. In Abbildung 55 sind die Voltamogramme einer (+)/(-)-Catechin Standardlösung dem (+)/(-)-Catechin einer Humanplasmaprobe gegenübergestellt. Die Voltamogramme von Standard und Probe stimmen überein. Auch die Retentionszeiten der Probensignale stimmen mit den Retentionszeiten der Standardsignale überein.

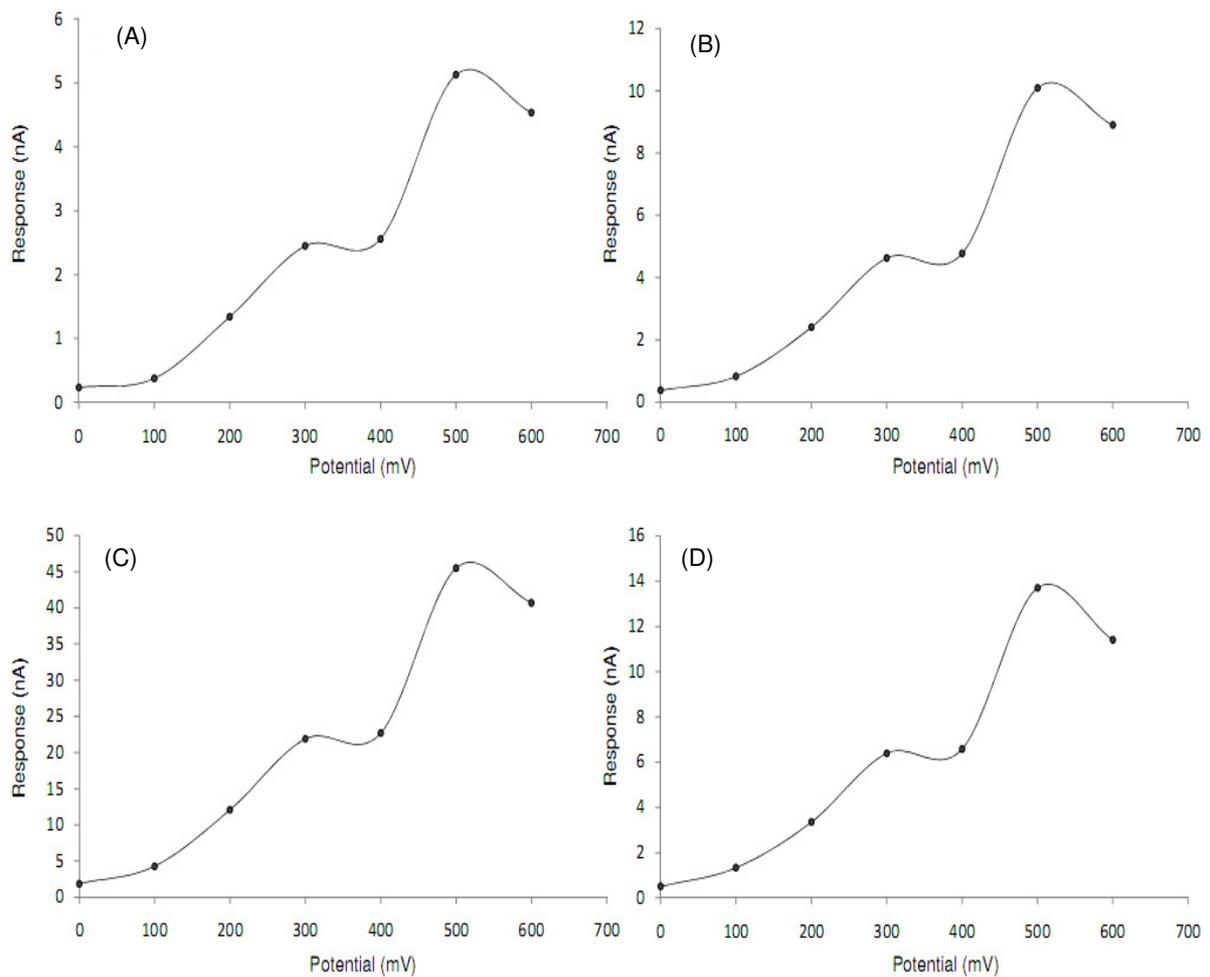


Abbildung 55 Voltammogramme der Catechin-Enantiomere: (+)-Catechin in einer Standardlösung (A), (-)-Catechin-Standard (B), (+)-Catechin in einer Humanplasmaprobe (C) und (-)-Catechin in einer Humanplasmaprobe nach Verzehr eines Kakaogetränks (D)
[die Höhen der Voltammogramme sind konzentrationsbedingt unterschiedlich hoch]

Unter vergleichbaren Bedingungen wurden auch die Voltammogramme des (-)-Epicatechin-Standard dargestellt und mit dem Voltammogramm des Probensignals verglichen (Abbildung 56).

Das Voltammogramm des Standards und die Retentionszeiten sind mit dem Voltammogramm und den Retentionszeiten des Probensignals nahezu deckungsgleich.

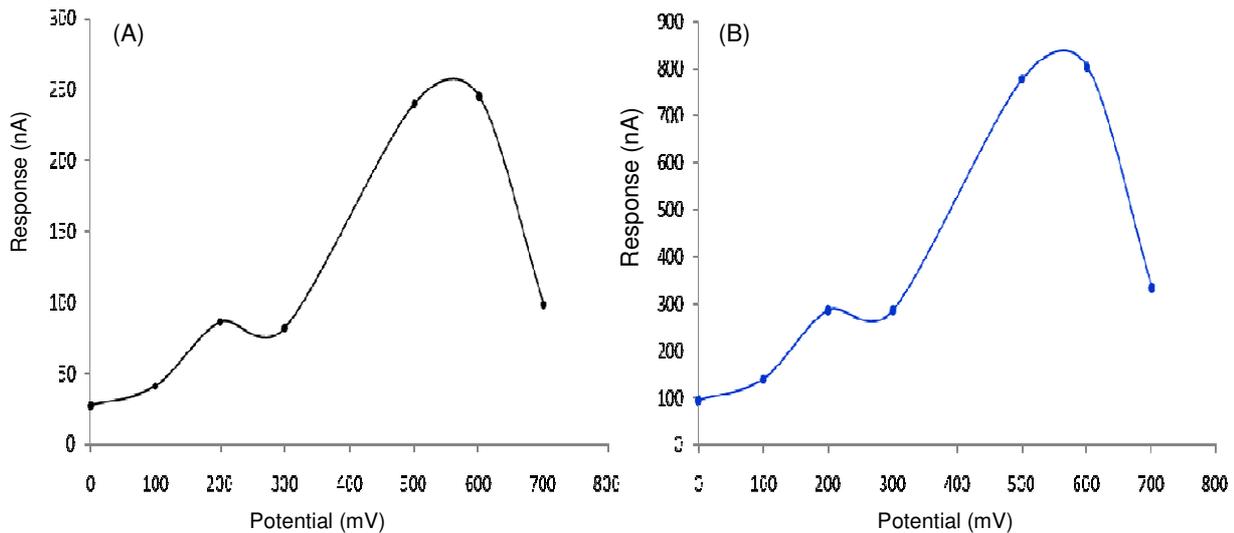


Abbildung 56 Voltammogramm des (-)-Epicatechins: (-)-Epicatechin-Standard (B) und (-)-Epicatechin in einer Humanplasmaprobe (A) nach Verzehr eines Kakaogetränks
[die Höhen der Voltammogramme sind konzentrationsbedingt unterschiedlich hoch]

2.3.3 Quantifizierung

Zur Quantifizierung der Catechin- und Epicatechin-Enantiomeren werden externe Standards eingesetzt und für jede Verbindung eine Kalibriergerade mit entsprechender linearer Regressionsgleichung erstellt. Basierend auf Erfahrungen aus dem eigenen Arbeitskreis und denen anderer Arbeitsgruppen, hat es sich als günstig erwiesen, für eine quantitative Auswertung die Summe der Peakflächen oder Peakhöhen aus den 2 bis 3 dominantesten Kanälen zu verwenden. Die während der Methodenentwicklung erhaltenen Daten wurden dahingehend überprüft und die monomeren Flavan-3-ole bei 200 mV und 300 mV quantitativ ausgewertet.

Bei der elektrochemischen Detektion ist zu beachten, dass diese im Vergleich zur UV-Detektion größeren Schwankungen unterliegt. Folglich sollte für jede neue Messreihe eine neue Kalibriergerade erstellt werden.

2.3.4 Methodvalidierung

Für die in diesem Abschnitt behandelte Methode, wurden die folgenden Validierungsparameter untersucht:

- i. Wiederfindung (WF)
- ii. Reproduzierbarkeit
- iii. Nachweis- und Bestimmungsgrenze (NG, BG)
- iv. Linearität (r^2)

In Tabelle 24 sind die errechneten Wiederfindungswerte, Reproduzierbarkeiten (angegeben als Standardabweichung S.D.) sowie die Werte der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von (+)- und (-)-Catechin und der Summe der Catechin-Enantiomeren wiedergegeben.

Tabelle 24 Validierungsparameter der chiralen HPLC-CEAD Methode:
Nachweisgrenze (NG), Bestimmungsgrenze (BG), relative Standardabweichung (R.S.D), Wiederfindung (WF) und relative Standardabweichung der Wiederfindung (R.S.D. WF)

	NG (ng/mL)	BG (ng/mL)	WF (%)	R.S.D.WF (%)	R.S.D. (%)
(+)-Catechin	6,8	16,9	89,9	1,5	0,97
(-)-Catechin	5,9	12,8	92,3	1,1	1,54
Σ Catechin- Enantiomere (nicht chirales HPLC- System)	5,9	12,7	96,8	1,4	0,89

Die Wiederfindung der (+)- und (-)-Catechin-Gehalte, ermittelt nach der hier vorgestellten chiralen HPLC-Methode, liegen nur geringfügig niedriger, als die in der Literatur gefundenen Wiederfindungen, die über nicht chirale Systeme ermittelt wurden [45, 119, 124]. Die Reproduzierbarkeit der chiralen Methode liegt ebenfalls im Bereich der Reproduzierbarkeiten nicht chiraler Systeme [124].

Für die beschriebene chirale HPLC-Methode liegen die Nachweisgrenzen für (+)- und (-)-Catechin zwischen 5,9 und 6,8 ng/mL und die Bestimmungsgrenzen liegen zwischen 12,8 und 16,9 ng/mL. Es gibt nur wenige nicht-chirale HPLC-

Methoden, die bessere Nachweisgrenzen und Bestimmungsgrenzen für die Flavanole erreichen. Der Linearitätsfaktor der chiralen HPLC liegt in einem Bereich von 6–600 ng/mL oberhalb 0,9980.

2.4 Anwendung der chiralen HPLC im Bereich von Humanstudien

2.4.1 Humanplasmagewinnung und Lagerung

Alle zur Methodenentwicklung benötigten Plasmaproben wurden aus einem Selbstversuch einer gesunden weiblichen Probandin (33 Jahre alt, 46kg KG, Nichtraucher) gewonnen.

Ein Tag vor jedem Selbstversuch wurde der Probandin eine polyphenolfreie Ernährung und ein 12 stündiges Fasten auferlegt, um sicherzustellen, dass die detektierten Catechine tatsächlich aus dem Verzehr des Kakaogetränks stammen. Am Tag des Versuchs wurde der Probandin zunächst morgens nüchtern 9-27 mL Blut entnommen. Diese Proben wurden stets als polyphenolfrei analysiert.

Anschließend konsumierte die Probandin ein stark konzentriertes Kakaogetränk aus 46 g Kakaopulver und 20 g Haushaltszucker, gelöst in 250 mL Vollmilch (siehe Abschnitt 5.5.2). Bis zur nächsten Blutentnahme war es der Probandin nicht gestattet, Getränke (mit Ausnahme von Wasser) oder Nahrung auf zu nehmen. Zwei Stunden nach dem Verzehr des Getränkes wurde erneut Blut entnommen. Die Blutentnahme erfolgte jeweils in 9 mL EDTA-Röhrchen und die Blutproben wurden unverzüglich nach Entnahme auf Eis gekühlt.

Zur Humanplasmagewinnung wurden die Blutproben direkt nach Blutentnahme 15 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Plasma wurde unverzüglich in 500 µL-Portionen aliquotiert, mit einer antioxidativen Lösung (siehe Abschnitt 5.5.4) [188] stabilisiert und bei -80°C eingefroren. Unter diesen Bedingungen zeigten sich die Catechine als stabil [36, 99, 104, 188].

2.4.2 Einflussfaktor Milch

Milch enthält, abhängig von der verwendeten Milchsorte, 1,5–4% Fett und 3,5% Protein. Im Hinblick auf die Resorption von Polyphenolen ins menschliche Blut gibt es divergierende Meinungen darüber, inwieweit MilCHFett sowie Milchproteine die Aufnahme ins Blut hemmen. Serafini et al. (1999) [153] berichtete, dass die Zugabe von Milch zu schwarzem Tee den Anstieg des antioxidativen Potentials im Blut verringert. Dabei wurde davon ausgegangen, dass es zu Interaktionen zwischen den Milchproteinen und den Tee-Catechinen kommt, was eine verminderte Aufnahme ins Blut zur Folge haben könnte. Deshalb wurden mehrere Studien durchgeführt, die den Effekt der Milchproteine auf die Bioverfügbarkeit der Flavonoide untersuchten [79, 100, 145, 174]. So haben beispielsweise Roura et al. (2007) [145] und Keogh et al. (2007) [79] feststellen können, dass Milchproteine offenbar keinen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit der Kakaoflavonoide haben.

Um sicherzustellen, dass die Resorption von Catechin und Epicatechin in den menschlichen Organismus tatsächlich nicht durch den Einfluss von Milchproteinen oder Milchfett gehemmt wird, wurden im Rahmen dieser Arbeit entsprechende Untersuchungen durchgeführt.

Für diese Untersuchungen konsumierte die Probandin an zwei unterschiedlichen Tagen jeweils ein Kakaotränk. Dabei handelte es sich am ersten Tag der Untersuchungsreihe um ein milchfreies Kakaotränk auf Wasserbasis. Eine Woche später wurde die identische Menge an Kakao, gelöst in Vollmilch, aufgenommen. An beiden Versuchstagen wurde der Probandin Blut entnommen. Das erhaltene Plasma wurde direkt am Tag der Blutentnahme aufgearbeitet und analysiert.

Ein Vergleich der erhaltenen Catechin-/Epicatechin-Konzentrationen, die in den beiden Humanplasmaproben gefunden wurden, zeigt, dass die Milch keinen signifikanten Einfluss auf die Resorption der Flavan-3-ole ins Blut hat (Abbildung 57). Beim Verzehr des Kakaos mit Vollmilch zeigt (-)-Epicatechin sogar einen geringfügig höheren Wert als der Wert, der nach dem Verzehr mit Wasser erhalten wurde. Dies hat jedoch keine Bedeutung, da derartige Abweichungen von der physiologischen Konstitution der Probandin sowie ihrer Ernährung in den letzten Tagen abhängen können. Dementsprechend kann auch die minimale Abweichung im (-)-Catechin-Wert erklärt werden.

In den darauf folgenden Selbstversuchen, wurde das Kakaotränk ausschließlich mit Vollmilch hergestellt. Hintergrund dieser Entscheidung war es, dass im alltäglichen Gebrauch Kakaotränke mit Milch hergestellt werden und die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche möglichst der Realität entsprechen sollten.

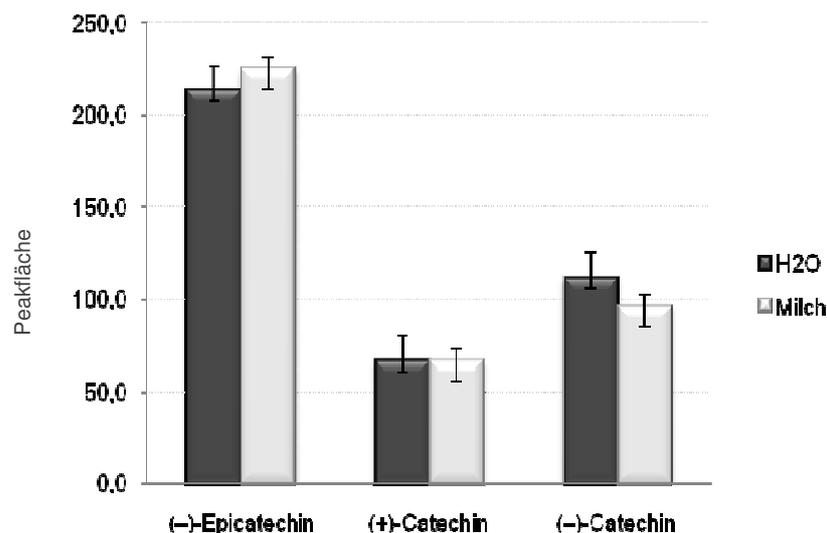


Abbildung 57 Vergleich der einzelnen Peakflächen von (-)-Epicatechin, (+)-Catechin und (-)-Catechin nach Konsumieren eines Kakaotränks gelöst in Wasser und nach Konsumieren eines Kakaotränks gelöst in Vollmilch

2.4.3 Lagerstabilität der Humanplasmaproben

Um Humanstudien sinngerecht und mit dem Ziel, stichhaltige Ergebnisse zu erhalten, durchführen zu können, ist es wichtig, zu ermitteln unter welchen Bedingungen und vor allem auch wie lange die zu analysierenden Verbindungen in gelagerten Proben (hier: Humanplasma) stabil sind. In der Literatur gibt es Hinweise bezüglich der Stabilität von Tee-Catechinen in Humanplasma. So haben Lotito et al.(2006) [105] und Lee et al. (1995) [98] feststellen können, dass durch den Zusatz einer antioxidativen Lösung (siehe Abschnitt 4.5.4) und Lagerung der Proben bei -80°C , eine Stabilität der Catechine von bis zu 6 Monaten erreicht werden kann.

Unter diesen beschriebenen Bedingungen wurde in dieser Arbeit ein Lagerungsversuch zur Stabilität der Kakao-Flavan-3-ole in Humanplasma durchgeführt. Hierzu wurde der Probandin zwei Stunden nach Kakaogenuss Blut entnommen. Von dem gewonnenen Plasma wurden $500\ \mu\text{L}$ direkt aufgearbeitet (siehe Abschnitt 2.4.1) und nach der beschriebenen chiralen HPLC-Methode analysiert. Das restliche Plasma wurde in $500\ \mu\text{L}$ Portionen aliquotiert, mit antioxidativer Lösung versetzt und bei -80°C eingefroren und gelagert.

In unterschiedlichen Zeitabständen wurden die Plasmaproben unter gleichbleibenden Bedingungen aufgearbeitet und vermessen. Dementsprechend wurden die erhaltenen Konzentrationen der monomeren Kakao-Catechine nach 4, 7, 15, 19, 20 und 27 Tagen Lagerung gegenübergestellt und verglichen.

Aus der in Abbildung 58 wiedergegebenen Darstellung wird sichtbar, dass der Gehalt der monomeren Flavan-3-ole mit ansteigender Lagerungszeit abnimmt.

Nach 27 Tagen hat sich die Konzentration des Catechin-Gehaltes (Σ (+)- und (-)-Catechin) um nahezu 50% reduziert, die Konzentration des (-)-Epicatechins im Plasma sogar um bis zu 65%. Werden die einzelnen Epimere des Catechins betrachtet, sind nach 27 Tagen vom (+)-Catechin nur noch knapp 44% des Ausgangsgehaltes wiederzufinden, wohingegen (-)-Catechin noch zu 71% enthalten ist.

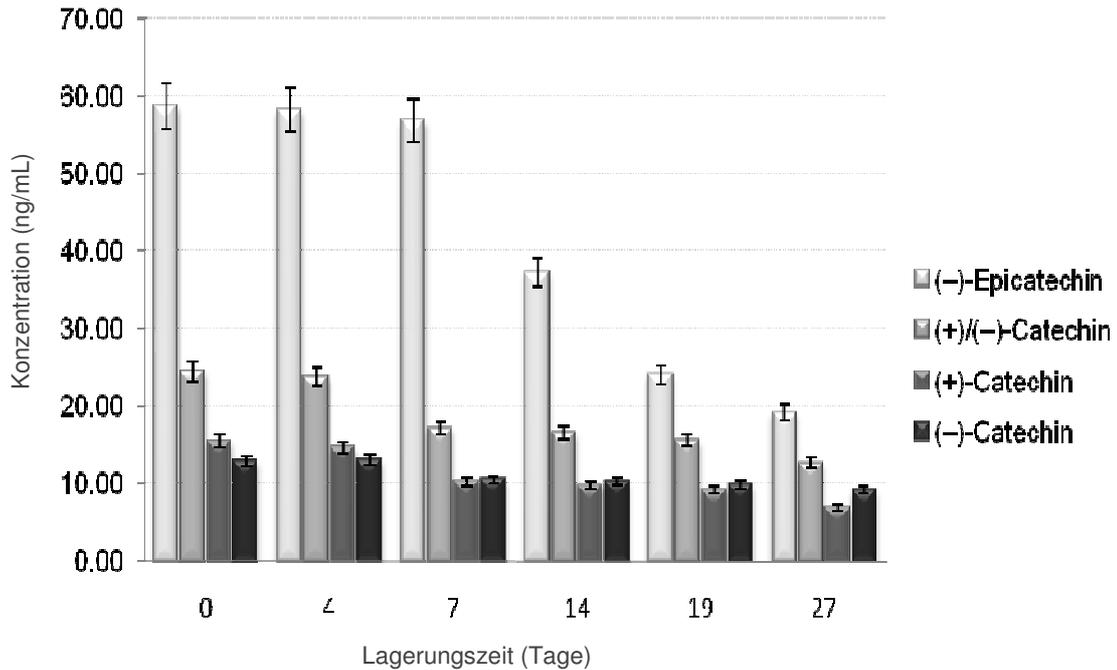


Abbildung 58 Darstellung der Lagerstabilität von (+)- und (-)-Catechin, der Summe aus (+)- und (-)-Catechin und (-)-Epicatechin gemessen über einen Zeitraum von vier Wochen

Eine plausible Erklärung für diese Beobachtung gibt es derzeit noch nicht. Alle, bei der Lagerung der Plasmaproben beachteten Parameter sprechen gegen einen Abbau der Verbindungen während der Lagerungszeit. Bei einer Temperatur von -80°C sind bekanntlich alle enzymatischen Reaktionen ausgeschaltet. Catechine sind stark oxidationsempfindlich und werden unter Lichteinfluss, bei basischem pH-Wert oder durch Oxidasen zersetzt. Durch die Zugabe einer Lösung aus Ascorbinsäure und EDTA liegt einerseits ein saurer pH-Wert in der Probe vor und andererseits wirkt die Ascorbinsäure als Scavenger und verhindert somit die Oxidation. Auch das enthaltene EDTA minimiert das Risiko eines oxidativen Abbaus, indem es Metallionen komplexiert, die zu einer Oxidation der Catechine führen könnten. Um mehr Informationen und Hinweise bezüglich dieser Beobachtung zu erhalten und zur Absicherung der in Abbildung 58 dargestellten Ergebnisse, ist es erforderlich, eine größere Anzahl an Lagerungsstudien mit weiteren Lagerungsparametern durchzuführen. Die in dieser Arbeit beschriebenen Analysen wurden deshalb spätestens vier Tage nach Blutentnahme durchgeführt, um sicherzustellen, dass noch kein Abbau der zu untersuchenden Verbindungen stattgefunden hat.

2.4.4 Ein-Personen-Studie [Kakaogenuss]

Im Verlauf einer Ein-Personen-Studie wurde der Probandin insgesamt siebenmal zu unterschiedlichen Zeitpunkten Blut entnommen.

Zur Kontrolle auf Polyphenolfreiheit des Plasmas wurde eine Probe vor Genuss des Kakaotranks (T_0) entnommen. Nach Kakaokonsum wurde jeweils nach ½ h, 1 h, 1 ½ h, 2 h, 3 h und 6 h Blutproben genommen. Die erhaltenen Proben wurden unverzüglich, wie in Abschnitt 2.3.1.2 beschrieben, aufgearbeitet und analysiert. In Abbildung 59 ist der Konzentrationsverlauf des (-)-Epicatechins, (+)-Catechins und (-)-Catechins im Humanplasma über den Zeitraum von 6 Stunden graphisch wiedergegeben. Das Maximum an Flavanolen im Humanplasma ist 2 Stunden nach Bolusgabe eines Kakaotranks erreicht.

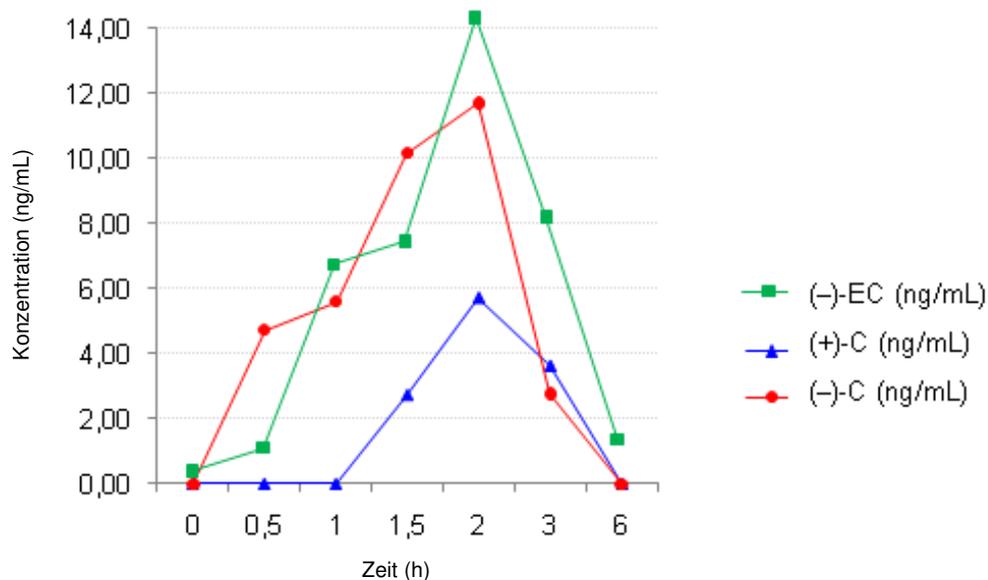


Abbildung 59 Darstellung des Konzentrationsverlaufs der monomeren Flavan-3-ole im Humanplasma über einen Zeitraum von 6 Stunden

Bereits Bell et al. (2000) [21], die (+)-Catechin nach Genuss von Rotwein im Humanplasma nachgewiesen haben, konnten feststellen, dass nach 1–2 h die maximale Konzentration im Plasma erreicht wird. Auch nach Genuss von grünem Tee wurde der maximale Gehalt an Tee-Catechinen nach 1–2 h ermittelt [100,105].

Die Flavanole werden demzufolge vom menschlichen Organismus schnell resorbiert, haben allerdings nur eine kurze Verweildauer. Dies ist aus der in dieser Arbeit durchgeführten Ein-Personen-Studie wie auch aus den Literaturstudien ersichtlich.

Der Plasmaspiegel an Flavanolen ist nach 6–8 h wieder nahezu am Ausgangswert angelangt. Die nachfolgenden Untersuchungen wurden daher anhand der 0 h-Proben (T_0) und 2 h-Proben (T_2) durchgeführt.

In Abbildung 60 sind Chromatogramme wiedergegeben, die von Plasmaproben der Zeitpunkte 0 h und 2 h stammen. Sowohl die T_0 - als auch die T_2 -Plasmaprobe wurden der enzymatischen Behandlung mit Sulfatase und β -Glucuronidase unterworfen. Für den Zeitraum T_0 sind in Abbildung 60 zwei Chromatogramme abgebildet

[(a), (b)], die aus zwei unterschiedlichen Studientagen stammen.

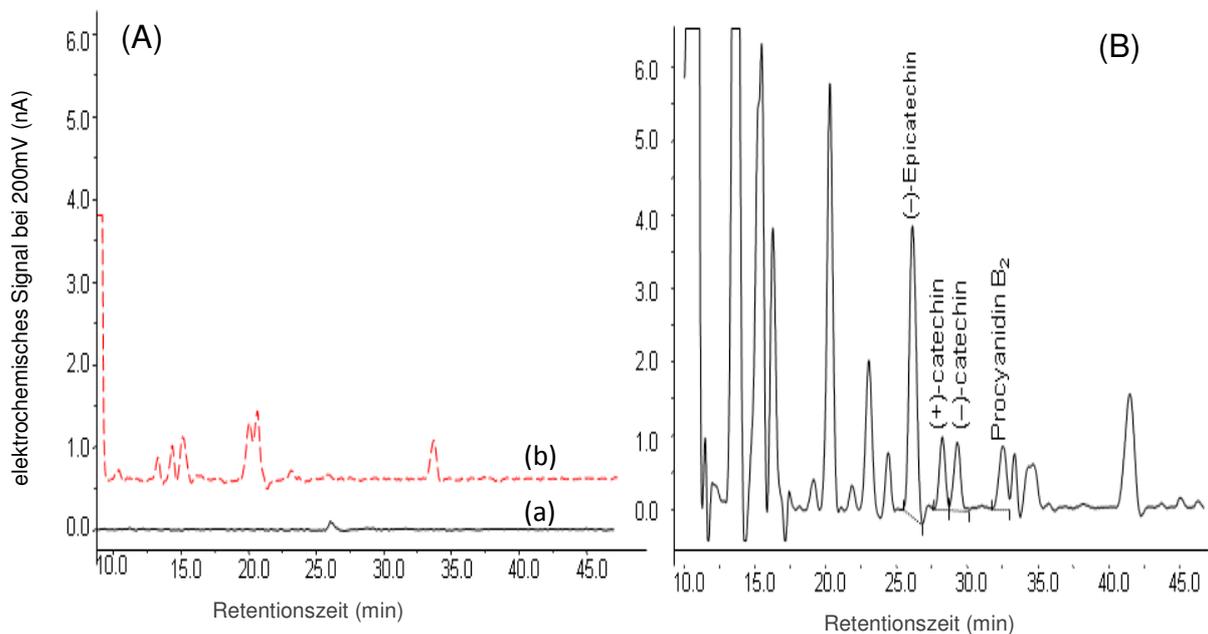


Abbildung 60 HPLC-CEAD Chromatogramme von Humanplasmaproben nach enzymatischer Behandlung mit Sulfatase und β -Glucuronidase, analysiert mittels chiraler HPLC

Plasma nach 12 Stunden Fasten T_0 (unterschiedliche Studientage)(A); Plasma 2 Stunden nach Kakaogenuss T_2 (B)

Anhand der T_0 -Proben ist zu erkennen, dass die Probandin sich an die eintägige polyphenolfreie Diät gehalten hat, wodurch im Chromatogramm zum Zeitpunkt T_0 fast keine Signale sichtbar werden. Es zeigt aber auch, dass die T_0 -Proben sich, abhängig von der körperlichen Konstitution oder der Ernährungsweise der Probandin, verändern.

Folglich kann davon ausgegangen werden, dass die nach dem Kakaoverzehr detektierten Signale aus dem Kakao stammen.

Das Ergebnis der T_2 -Probe (Abbildung 60 (B)) weist viele Signale auf. Dabei sind die monomeren Flavan-3-ole (-)-Epicatechin, (+)-Catechin und (-)-Catechin eindeutig

wieder zu finden. Auch Procyanidin B₂, das Proanthocyanidin mit der höchsten Konzentration in Kakao konnte in der Humanplasmaprobe detektiert werden.

Bislang wurde nur in einer Veröffentlichung von Holt et al. (2002) [74] von einer Identifizierung des Procyanidin B₂ in Humanplasma berichtet. Mit dieser hier vorliegenden Arbeit konnte somit das Ergebnis von Holt et al. bestätigt werden. Allerdings erfolgte die Identifizierung dieser Verbindung ausschließlich durch Retentionszeitenvergleich und einen Vergleich der Voltamogramme des Procyanidin B₂-Standards und des Probensignals.

Wie das Chromatogramm der Abbildung 60 (B) erkennen lässt, kann kein (+)-Epicatechin detektiert werden, obgleich der konsumierte Kakao (+)-Epicatechin beinhaltet (Abbildung 61). Ursache dessen ist der sehr geringe Gehalt an (+)-Epicatechin in Kakao (Kapitel 1.2).

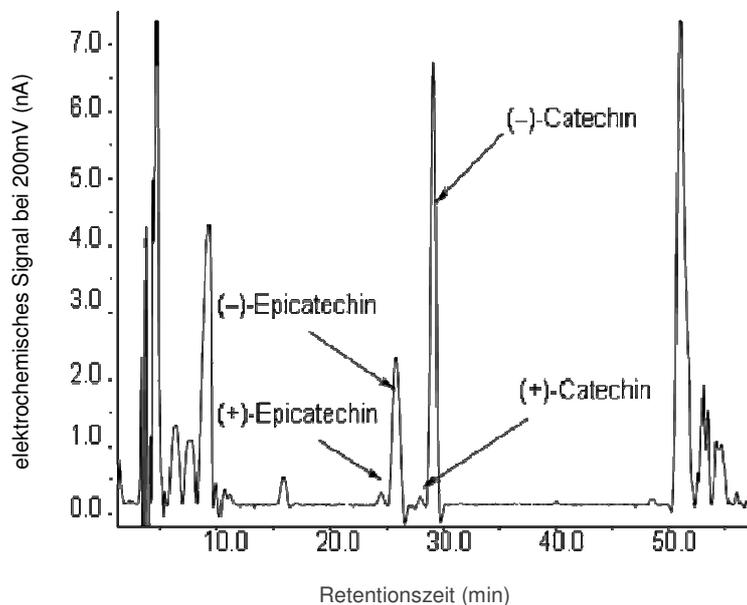


Abbildung 61 HPLC-CEAD Chromatogramm des zum Verzehr verwendeten Kakaopulvers [Aufarbeitung nur für monomere Catechine (siehe Abschnitt 5.4.2)]

In einigen Publikationen über den Metabolismus der Flavanole beim Menschen wird berichtet, dass Catechin und Epicatechin nicht frei sondern vollständig als Glucuronide, Sulfate und methylierte Derivate im menschlichen Organismus vorliegen [17, 41, 42, 89]. Zur Überprüfung dessen, wurde eine T₂-Probe ohne vorangehende enzymatische Hydrolyse aufgearbeitet und analysiert.

Abbildung 62 bestätigt, dass die monomeren Flavan-3-ole nicht nennenswert in freier Form im Humanplasma vorkommen.

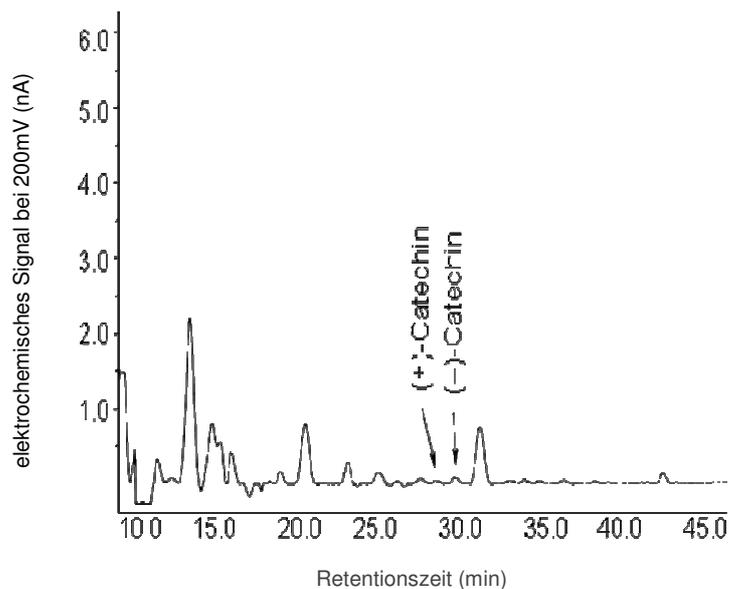


Abbildung 62 HPLC-CEAD Chromatogramm einer Plasmaprobe 2 Stunden nach Kakaogabe, ohne enzymatische Hydrolyse

Die Konzentration von (+)- und (-)-Catechin in einer 2 Stunden nach Bolusgabe eines Kakaogetränks erhaltenen Humanplasmaprobe, die einer enzymatischen Behandlung unterworfen wurde, beträgt z.B. 22,1 ng/mL für (+)-Catechin und 27,5 ng/mL für (-)-Catechin.

Im Humanplasma ergibt sich somit ein (+)-Catechin zu (-)-Catechin Verhältnis von 0,8. Im Kakaopulver liegt dieses Verhältnis bei 0,043.

Die Verschiebung des Verhältnisses wird in einem weiteren Experiment, das in Abschnitt 2.4.2 besprochen wird, bestätigt und genauer diskutiert.

Bei allen in diesem Abschnitt erhaltenen Ergebnissen und neuen Erkenntnissen, ist es wichtig zu berücksichtigen, dass mittels dieser Methode bislang ausschließlich die glucuronidierten- und sulfatierten Catechine analysiert werden können. Methylierte Flavanole werden hierbei nicht registriert, da diese nicht durch enzymatische Hydrolyse freigesetzt werden können. Es ist anzunehmen, dass ein oder mehrere der in Abbildung 60 (B) auftretenden, nicht identifizierten Signale methylierte Catechine sein können. Methylierte Catechine sind nicht als Standards erhältlich. Auch eine Identifizierung der methylierten Verbindungen im Humanplasma mittels LC-MS stellt sich als problematischer dar als erwartet, da die Konzentrationen der Verbindungen in den Plasmaproben so gering sind, dass eine Fragmentierung der Verbindungen durch die MS nicht gemessen werden kann.

Demnach ist es notwendig, die methylierten Catechine selbst zu synthetisieren und zu isolieren. Da Catechin und Epicatechin vier methylierbare Hydroxylgruppen haben, können bei der Synthese unterschiedliche Derivate an methyliertem Catechin und Epicatechin entstehen.

Vom 3'-O-methylierten-Catechin und 4'-O-methylierten-Catechin ist bekannt, dass sie im Humanplasma nach Verzehr von catechinhaltiger Nahrung vorliegen. Eine gezielte Synthese der methylierten Catechine konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht realisiert werden.

Fazit der Ein-Personen-Studie [Kakaogenuss]

Anhand dieser Vorstudie konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl (+)-Catechin als auch (-)-Catechin vom menschlichen Organismus resorbiert werden. Zusätzlich wurde festgestellt, dass das (-)-Catechin tendenziell einem anderen Metabolismus unterliegt, als das von Natur aus in der Kakaobohne vorkommende (+)-Catechin. Darüber hinaus war es mit der chiralen HPLC möglich, Angaben aus der Literatur, die über nicht-chirale Systeme gemacht wurden, zu bestätigen. Eine exakte Aussage über die Bioverfügbarkeit und den exakten Metabolismus der einzelnen Enantiomere kann jedoch noch nicht getroffen werden.

2.4.5 Ein-Personen-Studie [(+)/(-)-Catechin-Standard Verzehr]

Bei diesem Vorversuch wird entsprechend der Vorstudie aus Abschnitt 2.4.1.4 vorgegangen. Der Unterschied zu der Ein-Personen-Studie aus dem vorangegangenen Abschnitt ist, dass die Probandin statt eines Kakaogetränks eine Lösung aus einem (+)/(-)-Catechin-Standard, gelöst in Vollmilch, konsumierte. Hintergrund dieses Versuches war es, anhand der Gabe eines racemischen Gemisches aus (+)- und (-)-Catechin, leichter eine Aussage über die Bioverfügbarkeit bzw. über die Art der Metabolisierung der einzelnen Enantiomere machen zu können. Aber auch die Möglichkeit, dadurch eine wesentlich größere Menge an (+)/(-)-Catechin aufnehmen zu können und somit größere und eindeutiger Signale im Humanplasma zu erhalten, begründeten diese Art von Selbstversuch. Mit der Bolusgabe von 225 mg (+)/(-)-Catechin-Standard, hat die Probandin in etwa das 10-fache an Catechin aufgenommen, als nach Genuss des Kakaogetränks. Die Chromatogramme der Abbildung 63 zeigen zum einen die chirale Trennung des zum Verzehr verwendeten reinen (+)/(-)-Catechin-Standard (A) und zum zweiten die chirale Trennung der Catechine in Humanplasma 2 Stunden nach Aufnahme der Standardlösung.

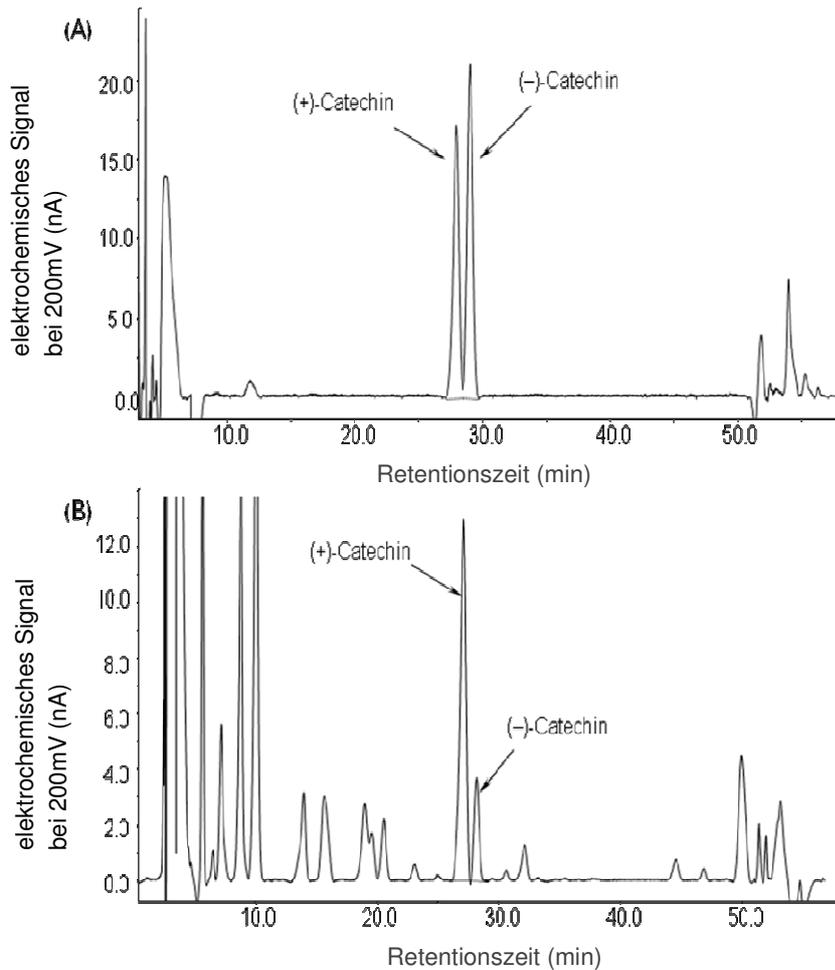


Abbildung 63 HPLC-CEAD Chromatogramme eines (+)/(-)-Catechin-Standards (A) sowie einer Plasmaprobe 2 Stunden nach Verzehrs einer Standardlösung nach enzymatischer Behandlung(B)

Wie zu erkennen ist, hat sich das Verhältnis von (+)-Catechin zu (-)-Catechin im Humanplasma im Vergleich zum reinen Standard deutlich verändert.

Im Humanplasma wurden 225 ng/mL (+)-Catechin und nur 63 ng/mL (-)-Catechin gefunden. Damit ergibt sich in der Plasmaprobe ein Verhältnis von (+)- zu (-)-Catechin von 4,05, wohingegen das Verhältnis der beiden Enantiomere im verzehrten Standard bei 0,81 liegt.

Dieses Ergebnis, als auch das Ergebnis der Vorstudie nach Kakaogenuss, zeigen, dass relativ zur aufgenommenen (+)/(-)-Catechin Menge mehr glucuronidiertes und sulfatiertes (+)-Catechin im Plasma zu finden ist als (-)-Catechin.

Die glucuronidierten und sulfatierten Catechine werden durch Hydrolyse mittels der Enzyme β -Glucuronidase und Sulfatase freigesetzt. Aus diesem Grund muss die hier getroffene Aussage mit Vorsicht betrachtet werden, da es nicht absolut sicher ist, ob die eingesetzten Enzyme stereospezifisch reagieren.

Unter der Annahme, dass die Enzyme die Dekonjugation nicht stereoselektiv beeinflussen, weisen die erhaltenen Werte der Versuche darauf hin, dass (-)-

Catechin womöglich weniger gut resorbiert wird als (+)-Catechin bzw. einem anderen Metabolismus unterliegt. Beispielsweise könnte das (–)-Catechin zu höheren Anteilen methyliert im Plasma vorliegen als das (+)-Catechin.

2.4.6 Cross-over Studie mit 12 Probanden

Zusammen mit der Abteilung Ernährungsphysiologie des IEL wurde im Januar 2010 eine Humanstudie mit insgesamt 12 Probanden (6 Frauen, 6 Männer, Nichtraucher) im Cross-over Design durchgeführt [Danone Projekt].

Jeder der Probanden musste an zwei unterschiedlichen Tagen ein Kakaotränk zu sich nehmen. Die Kakaotränke wurden zum einen aus nicht alkalisiertem und andererseits aus stark alkalisiertem Kakaopulver hergestellt. Wie bereits gezeigt wurde, sind die Epimerenverhältnisse in nicht alkalisiertem und alkalisiertem Kakao unterschiedlich. Jedem Probanden wurde zu sieben unterschiedlichen Zeitpunkten Blut entnommen. Die erste Blutentnahme erfolgte morgens nüchtern vor Genuss des Kakaotränks. Die weiteren 6 Blutentnahmen fanden anschließend nach ½ h, 1 h, 1 ½ h, 2 h, 3 h und 6 h nach Verzehr des Kakaotränks statt. Somit konnte für jeden der Probanden festgestellt werden, wann sein Maximum an Flavan-3-olen im Blut erreicht wurde. Abbildung 64 zeigt am Beispiel von (-)-Epicatechin und vier ausgewählten Probanden, dass der Zeitpunkt des Maximums bei den Probanden zwischen 0,5 h und 2 h schwankt. Aber auch bei den einzelnen Probanden sind Unregelmäßigkeiten zu beobachten (Abbildung 65). Die Ursachen für derartige Schwankungen, können die körperliche Konstitution sowie die Lebens- und Ernährungsweise der einzelnen Probanden sein. Die Abbildung XI im Anhang zeigt die Konzentrationsverläufe von (+)/(-)-Catechin im Humanplasma von allen 12 Probanden.

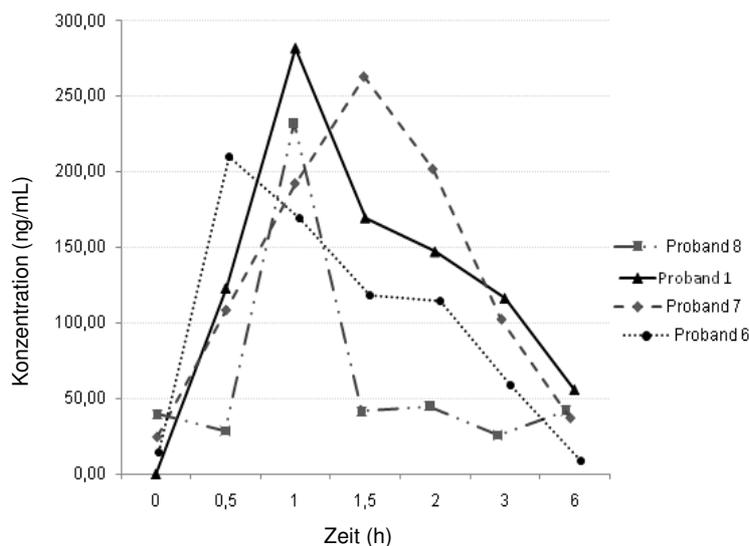


Abbildung 64 Darstellung des Konzentrationsverlaufs von (-)-Epicatechin im Humanplasma über einen Zeitraum von 6 Stunden bei 4 ausgewählten Probanden (Proband 1, 6, 7 und 8), die nicht alkalisierten Kakao konsumiert haben

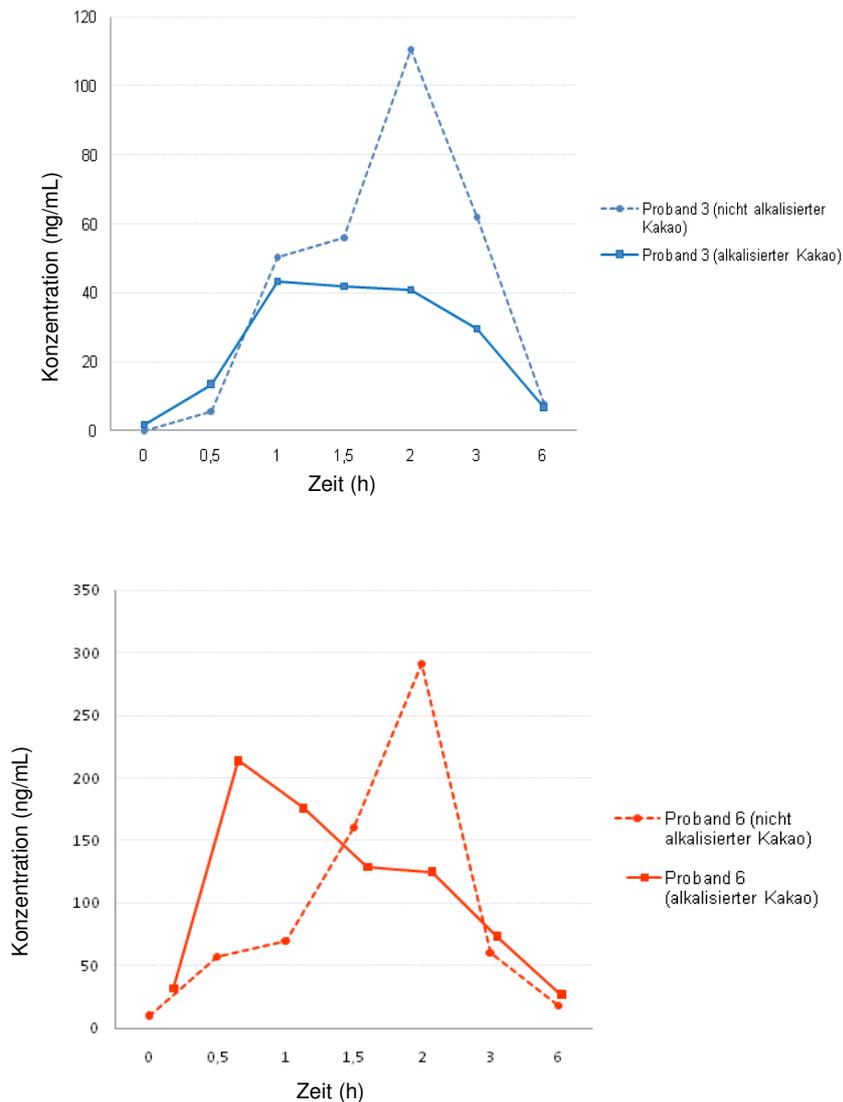


Abbildung 65 Darstellung des Konzentrationsverlaufs von (-)-Epicatechin im Humanplasma über einen Zeitraum von 6 Stunden bei zwei ausgewählten Probanden (Proband 3 und 6), die sowohl nicht alkalisierten Kakao als auch alkalisierten Kakao konsumiert haben

Derartige Diskrepanzen innerhalb der gesamten Probandengruppe werden auch bei Betrachtung des Catechin/Epicatechin-Plasmaspiegel deutlich. Die Graphik in Abbildung 66 zeigt, wie stark der Gehalt an (-)-Epicatechin, (+)-Catechin und (-)-Catechin im Humanplasma nach Aufnahme eines identischen Kakaotranks variiert (logarithmische Darstellung).

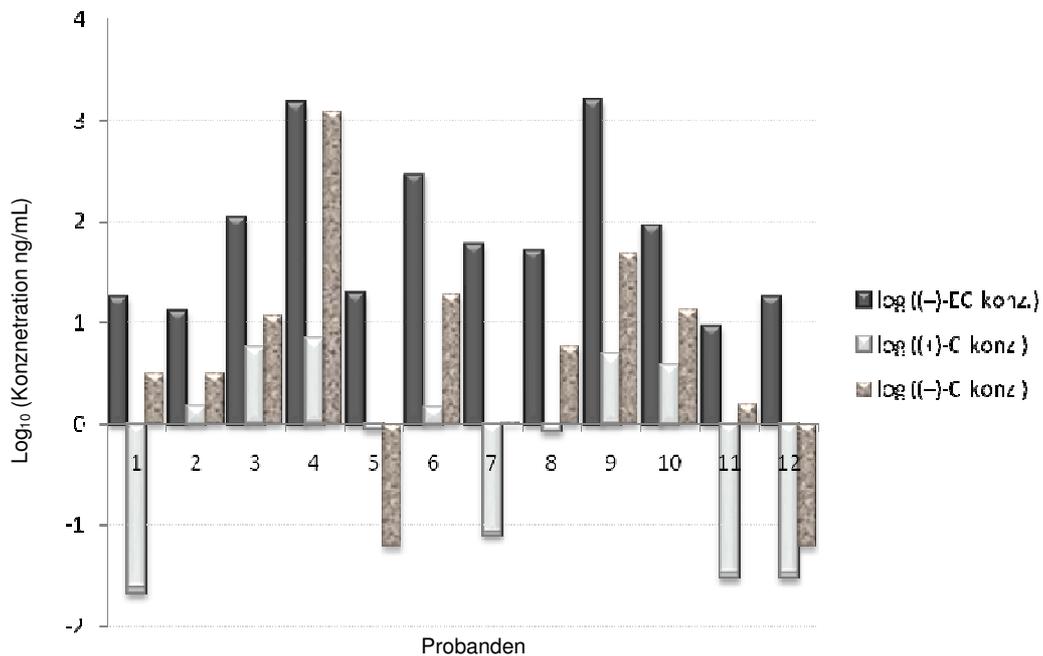


Abbildung 66 Darstellung des (-)-Epicatechin, (+)- und (-)-Catechin Plasmaspiegels bei allen 12 Probanden nach Verzehr eines identischen Kakaotränkes aus alkalisiertem Kakao. (logarithmische Darstellung)

Eine Erklärung für die so unterschiedlichen Gehalte an Flavan-3-olen im Plasma gibt es derzeit noch nicht. Es besteht auch hier die Vermutung, dass das Resorptionsvermögen einer Person von ihrer körperlichen Konstitution sowie von ihrer Lebensgewohnheit abhängt oder, dass die Absenz bestimmter Enzyme bei einigen Probanden zu einer verminderten Resorption der Flavan-3-ole führen kann.

Bei dieser Studie konnte anhand der chiralen Analytik nachgewiesen werden, ob ein Proband einen stark alkalisierten Kakao oder einen nicht alkalisierten Kakao konsumiert hat. Da jeder Proband, verblindet und an unterschiedlichen Tagen Kakao mit divergierenden Verhältnissen an (+)/(-)-Catechin und (+)/(-)-Epicatechin zu sich genommen hat, war es möglich die Ergebnisse beider Versuchstage für jeden Probanden gegenüber zustellen und so zu ermitteln, welcher Kakao an welchem Tag konsumiert wurde. In Abbildung 67 sind von 2 Probanden repräsentative Chromatogramme gegenübergestellt, die den Unterschied zwischen dem Verzehr von alkalisiertem und nicht alkalisiertem Kakao verdeutlichen.

Bei beiden ist deutlich zu erkennen, dass das (-)-Epicatechin Signal nach Verzehr von alkalisiertem Kakao (Abbildung 67 B) kleiner wird und das (-)-Catechin Signal dafür etwas zunimmt. Allerdings korreliert die (-)-Epicatechin Abnahme nicht mit der Zunahme an (-)-Catechin. Diese Ergebnisse der Cross-over Studie zeigen, ebenso

wie bereits die vorangegangenen Ein-Personen-Studien, dass der menschliche Organismus durchaus in der Lage ist, beide Enantiomere des Catechins zu resorbieren.

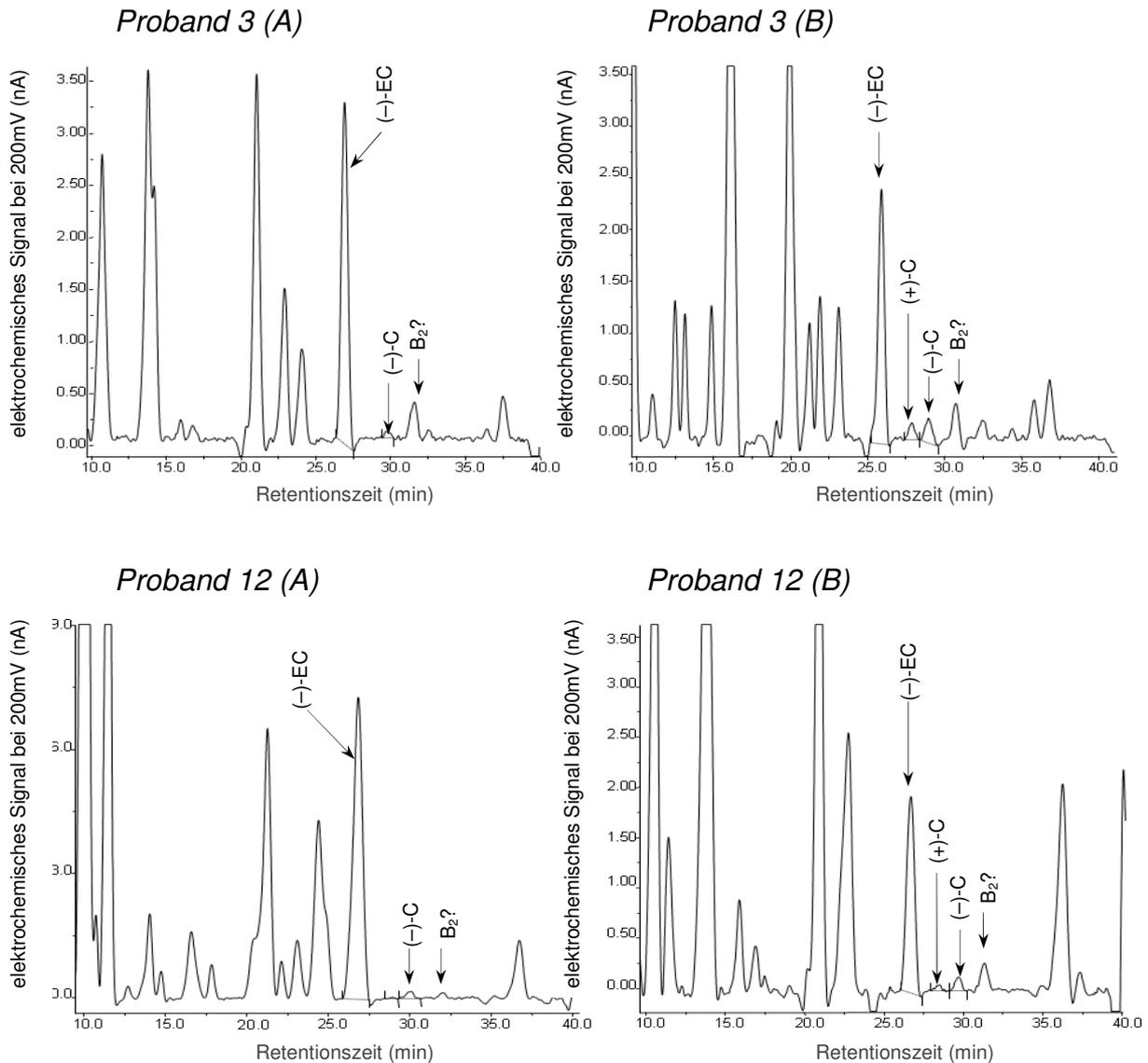


Abbildung 67 HPLC-CEAD Chromatogramme der Humanplasma-proben von zwei Probanden (Proband 3, Proband 12) nach Verzehr unterschiedlicher Kakaogetränke. Nicht alkalischer gerösteter Kakao (A) und alkalischer gerösteter Kakao (B)

Ein weiteres Ziel dieser Studie war, heraus zu finden, ob und in wie fern die Entstehung der atypischen Catechin-Enantiomere Einfluss auf physiologische Aspekte nimmt. Die physiologischen Untersuchungen, wie beispielsweise die antioxidative Kapazität (TEAC), wurden von der Abteilung Ernährungsphysiologie

des IEL (Universität Bonn) übernommen und ausgewertet. Die dabei erhaltenen Ergebnisse werden in dieser Arbeit nicht vorgestellt, sollen aber in einer gemeinsamen Veröffentlichung diskutiert werden. Die analytischen Untersuchungen der Humanplasmaproben auf Vorkommen und Gehalt an (+)/(-)-Catechin und (+)/(-)-Epicatechin wurden mit der in Abschnitt 2.3 dargestellten HPLC Methode ausgeführt.

3. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Methoden zur chiralen Trennung einiger enantiomerer als auch diastereomerer Polyphenole entwickelt und optimiert.

Die Methodenentwicklung beschränkte sich hierbei nicht nur auf Inhaltsstoffe bestimmter Lebensmittel, sondern umfasste zusätzlich Humanplasma als komplexe biologische Matrix. Im Vordergrund der methodischen Entwicklungen stand die chirale Trennung der monomeren Flavan-3-ole (+)- und (-)-Catechin sowie (+)- und (-)-Epicatechin.

Die Wahl der eingesetzten analytischen Geräte war von der zu erwartenden Konzentrationsmenge der Verbindungen in der jeweiligen Matrix abhängig. In Kakao liegen hohe Konzentrationen an Catechinen vor. Orangen und Orangensäfte enthalten größere Mengen an Flavanoglykosiden. Folglich war es bei beiden Fällen erfolgversprechend, die Kapillarelektrophorese mit Diodenarraydetektor (DAD) als analytisches Verfahren einzusetzen.

Da der menschliche Organismus nur Bruchteile der aufgenommenen Flavanole resorbiert, sind im Humanplasma Konzentrationen im Nanogramm pro Milliliter-Bereich zu erwarten. Für einen derart niedrigen Konzentrationsbereich ist das CE-DAD System nicht ausreichend empfindlich.

Als Verfahren der Wahl kam somit ein chirales HPLC-System mit coulometrischem Elektrodenarray-Detektor (CEAD) zum Einsatz, da diese Art von Detektion eine sehr hohe Empfindlichkeit aufweist.

Methodenentwicklung zur chiralen CE-Trennung von Flavanoglykosiden

Vier in Orangensaft vorkommende Flavanoglykoside (Hesperidin, Didymin, Narirutin und Narirutinglykosid) wurden unter Einsatz eines speziellen kapillarelektrophoretischen Verfahrens chiral, teilweise zum ersten Mal in ihre jeweiligen Diastereomere getrennt. Der erste Anhaltspunkt für die Methodenentwicklung war die Arbeit von Gel-Moretó (2003) [59], in welcher bereits die Flavanoglykoside Hesperidin und Narirutin mittels CE chiral analysiert wurden.

Zur Aufkonzentrierung der Verbindungen am Anfang der Kapillare und zur Verbesserung der Trennung wurde das „Sample Stacking“-Verfahren angewendet.

Als chiraler Selektor wurde eine Kombination aus HP- β -CD und CM- β -CD eingesetzt. Durch Variation weiterer kapillarelektrophoretischer Parameter (pH-Wert des Puffers, Pufferzusammensetzung und CD-Konzentration) konnte eine Basislinientrennung aller vier Diastereomerenpaare erreicht werden.

Methodenentwicklung zur chiralen Trennung von Flavan-3-olen mittels CD-MEKC

Durch Einsatz eines kapillarelektrophoretischen Verfahrens, der CD-MEKC, wurde eine Referenzmethode zu der CZE-Methode von Kofink et al. (2007) [86], entwickelt, die eine chirale Trennung der in Kakao vorkommenden monomeren Flavan-3-ole (Catechin und Epicatechin) ermöglicht. Hierzu wurden unterschiedliche Pufferzusammensetzungen und Pufferkonzentrationen getestet. Als Mizellbildner wurde SDS verwendet und dessen Konzentration optimiert. Der zur chiralen Trennung benötigte und am besten geeignete Selektor ist bei dieser Methode, wie auch bei der CZE, das HP- γ -CD.

Es wurden mit CD-MEKC sowie mit der CZE [85] Kakaoproben analysiert und die erhaltenen Ergebnisse aus beiden Methoden verglichen, wobei sich eine sehr gute Übereinstimmung ergab.

Chirale Trennung der Flavan-3-ole in Humanplasma mittels HPLC-CEAD

Unter Verwendung einer permethylierten Gamma-Cyclodextrinsäule (PM- γ -CD) wurde eine chirale HPLC Methode zur Trennung der Catechin-Enantiomere entwickelt. Zusammen mit der Erprobung einer geeigneten Aufarbeitungsmethode für Humanplasmaproben ist es gelungen, die monomeren Flavan-3-ole der glucuronidierten und sulfatierten Metabolite chiral in Humanplasma nach Kakaogenuss zu analysieren.

Nach bisherigem Wissensstand ist dies die erste in der Literatur beschriebene chirale Trennung der Catechin-Enantiomeren in menschlichem Blutplasma [143].

Die Methode liefert hohe Wiederfindungen und gute Reproduzierbarkeiten, sowie niedrige Werte für die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen. In einem Selbstversuch konnte schließlich gezeigt werden, dass tatsächlich beide Flavanol-Enantiomere vom menschlichen Organismus resorbiert werden. Anhand weiterer Selbstversuche wurde festgestellt, dass die atypischen Enantiomere offensichtlich einem anderen Metabolismus unterliegen oder möglicherweise nicht in dem gleichen Umfang resorbiert werden, wie die von Natur aus im Kakao vorkommenden Catechine.

Um dies exakt aufklären zu können, ist es erforderlich, die methylierten Catechine ebenfalls chiral analysieren zu können. Erst dann kann eine eindeutige Aussage über die Bioverfügbarkeit der Catechin-Enantiomere gemacht werden. Dies konnte im Laufe dieser Arbeit nicht realisiert werden.

4. Ausblick

Die in dieser Arbeit entwickelte kapillarelektrophoretische Methode zur Trennung der Flavanoglykoside in Orangensaft soll dazu dienen, dass anhand der Verhältnisse der jeweiligen Diastereomeren überprüft werden kann, nach welchem Verfahren ein Orangensaft hergestellt wurde, d.h. ob es sich um einen frisch gepressten Orangensaft, einen Direktsaft oder um einen aus Orangensaftkonzentrat hergestellten Saft handelt.

Auch die CD-MEKC, die zur chiralen Trennung der Catechin-Enantiomeren als Referenzmethode entwickelt wurde, soll im weiteren dazu dienen, herausfinden zu können, welchen Einfluss die Verfahrensschritte zur Herstellung von Kakao und kakaohaltigen Produkten auf die Enantiomerenverhältnisse hat. In einer bereits laufenden Dissertation wird der Einfluss des Röstprozesses untersucht.

Der sicherlich interessanteste Aspekt ist die chirale Trennung von (+)/(-)-Catechin und (-)-Epicatechin der glucuronidierten und sulfatierten Metabolite in Humanplasma nach Verzehr von Kakao. Mit der beschriebenen chiralen HPLC-Methode kann auch (+)- und (-)-Epicatechin getrennt werden. In Humanplasma ist die Konzentration an (+)-Epicatechin allerdings so gering, dass es mit dem verwendeten HPLC-System nicht mehr detektierbar ist. Durch diese Methode werden zum ersten Mal nähere Einblicke in den Metabolismus und die Resorption chiraler Polyphenole in den menschlichen Organismus ermöglicht. Die hier entwickelte chirale HPLC soll die Auswertung ernährungsphysiologischer Studien, die mit Kakao oder kakaohaltigen Produkten durchgeführt werden, unterstützen. In einer cross-over Studie, die zusammen mit Abteilung Ernährungsphysiologie des IEL (Universität Bonn) durchgeführt wurde, konnte die in dieser Arbeit dargestellte Methode bereits erfolgreich angewendet werden [gemeinsame Veröffentlichung in Vorbereitung].

Angesichts der Tatsache, dass bislang nur die glucuronidierten und sulfatierten Catechine im Blut erfasst werden, soll durch weitere Forschungen auch die Identifikation sowie die chirale Trennung der methylierten Catechine im Humanplasma erarbeitet werden. Überdies hinaus, soll es in der Zukunft möglich werden, die im Humanplasma vorkommenden chiralen Metabolite der Flavan-3-ole direkt und ohne vorangehende enzymatische Hydrolyse analytisch bestimmen zu können.

5. Material und Methoden

5.1 Chemikalien und Zubehör

5.1.1 Standardsubstanzen

Flavanon-7-O-glykoside

Naringin [Naringenin-7-O-neohesperidosid]	Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)
Hesperidin [Hesperetin-7-O-rutinosid]	Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)
Narirutin [Naringenin-7-O-rutinosid]	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Neohesperidin [Hesperetin-7-O-neohesperidosid]	Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)
Eriocitrin [Eriodictyol-7-O-rutinosid]	Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)
Didymin [Isosakuranetin-7-O-rutinosid]	Extrasynthèse (Genay, Frankreich)

Flavan-3-ole

(+)-Catechin	Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)
(+)/(–)-Catechin Hydrat	Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)
(–)-Epicatechin	Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)
Procyanidin B ₂	Fluka (Buchs, Schweiz)

5.1.2 Chemikalien für CE-Trennpuffer

Borsäure, p.a. (H_3BO_3)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
di-Natriumtetraborat ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$)	KMF (Lohmar, Deutschland)
Natriumhydroxid Plätzchen p.a. (NaOH)	Merk (Darmstadt, Deutschland)
Salzsäure rauchend 37%, p.a. (HCl)	Fluka (Buchs, Schweiz)

Pufferadditive

Natriumdodecylsulfat	Merk (Darmstadt, Deutschland)
Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (HP- β -CD)	Wacker-Chemie (Burghausen, Deutschland)
Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (HP- β -CD)	Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)
Carboxymethyl- β -Cyclodextrin (CM- β -CD)	Fluka (Buchs, Schweiz)
(2-Hydroxypropyl)- γ -Cyclodextrin (2HP- γ -CD)	Fluka (Buchs, Schweiz)

5.1.3 Materialien für die CE

Kapillare, 75 μm I.D., 375 μm O.D., 5 m	Beckman Coulter (Fullerton, USA)
Kühlflüssigkeit P/ACE MDQ	Beckman Coulter (Fullerton, USA)
PCR Vials	Beckman Coulter (Fullerton, USA)
1,5 mL KGW-Vials, 32 x 11,6 mm	VWR (Darmstadt, Deutschland)

5.1.4 Chemikalien für das HPLC-System

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Reinstwasser	Millipore Direct Q ® 3UV (Molsheim, Deutschland)
Acetonitril, HPLC-Qualität	Fisher Scientific (Loughborough, England)
Ortho-Phosphorsäure, 85% p.a.	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

5.1.5 Materialien für die HPLC

Cyclobond I-2000 RSP (250 x 4.6 mm I.D)	astec (Whippany, NJ, USA)
Permethylierte- γ - Cyclodextrin Säule (200 x 4 mm I.D., Partikelgröße 5 μm)	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Aqua-Vorsäule (4 x 2.0 mm)	Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland)
Glas-Vials conic, N8-1	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Vials, braun, N8-1	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)

5.1.6 Sonstige Materialien und Chemikalien

Chromabond SPE-Kartuschen C18 Hydra	3 mL / 500 mg, Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Chromabond SPE-Kartuschen C18 Hydra	6 mL / 1000 mg, Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Chromabond SPE-Kartuschen Polyamid	3 mL / 500 mg, Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)

Chromabond SPE-Kartuschen Polyamid	6 mL / 1000 mg, Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Chromafil Einmalfilter, PET 0,45 µm	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Eppendorfcups, 1,5 mL	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
EDTA Blutröhrchen, KE/9 mL	Sarstedt AG & Co (Nümbrecht, Deutschland)
Multifly Kanülen, pyrogenfrei	Sarstedt AG & Co (Nümbrecht, Deutschland)
Methanol, HPLC grade	Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland)
Ethanol, p.a.,reinst	Merck (Darmstadt, Deutschland)
N,N-Dimethylformamid (DMF), p.a.	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO), HPLC	Merck [Prolabo] (Darmstadt, Deutschland)
EDTA	Merck [Prolabo] (Darmstadt, Deutschland)
Ascorbinsäure	Merck [Prolabo] (Darmstadt, Deutschland)

5.2 Analytische Geräte

5.2.1 Kapillarelektrophoresesystem

CE-Gerät:	P/ACE MDQ capillary electrophoretic System (Beckman Coulter, Krefeld, Germany)
Detektor:	Photodiodenarraydetektor (Beckman Coulter, Krefeld, Germany) Scanbereich: 190-600 nm
Datenverarbeitung:	Beckman 32 Karat Software Version 7.0
Computer:	IBM Personal Computer
Kapillaren:	fused-silica Kapillaren, 375 µm O.D., 75 µm I.D. Einrichten des Detektionsfensters, durch Abbrennen der äußeren Polyimidschicht (Beckman Coulter, Krefeld, Germany)

5.2.2 HPLC-Systeme

5.2.2.1 HPLC mit Coulometrischem Elektrodenarray Detektor

Pumpen:	Model 580 Solvent Delivery Module (ESA, Chelmsford, MA, USA)
Degasser:	Degasys DG-1310 (Uniflows, Tokyo, Japan)
Mischkammer	M800 (Kontron Instruments, Neufahrn)
Pulsationsdämpfer	Artnr.: 14-0177 (ESA, Chelmsford, MA, USA)
Säulenofen	Mistral (ESA, Chelmsford, MA, USA) Temperatur: 30 °C
Chirale Säulen:	Cyclobond I-2000 RSP 250 x 4.6 mm, Nucleodex PM-γ-Cyclodextrin, 200 x 4 mm I.D., Partikelgröße 5 µm
Nicht chirale Säule:	Aqua RP18, 150 x 4.6 mm I.D., Partikelgröße 3 µm (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany)
Vorsäule:	Aqua RP18, 4 mm, 3 mm I.D.
Probenaufgabe:	Autosampler MODEL 540 mit 100 µL-Probenschleife und Kühlfunktion (ESA, Chelmsford, MA, USA) Temperatur: 4 °C Injektion: 20 µL
Detektor:	Coulometric Electrode Array System (CEAS) CoulArray 5600 mit 4 Elektroden (ESA, Chelmsford, MA, USA)

Potential: 0–400 mV, z.T. 500-800 mV
Reinigung der Elektroden nach jeder Analyse:
1000 mV für 20 s, anschließend –350 mV für 20 s
Datenverarbeitung: CoulArray for Windows, Software Version 1.3

5.2.2.2 HPLC für HPLC-MSⁿ-Messungen

Pumpe: P-580 A HPG (Dionex, Idstein, Germany)
Degasser: Degasys DG-1310 (Uniflows, Tokyo, Japan)
Säulenofen: STH 585 Column Oven (Dionex)
Temperatur: 35 °C
Säule: Aqua RP18, 150 x 2.0 mm I.D., Partikelgröße 3µm
(Phenomenex, Aschaffenburg, Germany)
Probenaufgabe: Autosampler ASI-100T (Dionex)
Injektion: 5 µL
Detektor: UVD-340S mit Kapillarzelle
Datenverarbeitung: PC mit Software „Chromeleon“,
letzte Version 6.8 SP Build (Steuerung,
Datenaufnahme)

5.2.2.3 Massenspektrometer

Massenspektrometer: LCQ Classic Ion Trap-Massenspektrometer
(Thermo Fisher Scientific, Dreieich)
Ionenquelle: ESI mit Metal Needle Kit (Thermo)
Zudosage: System Gold Programmable Solvent Modul 116
(Beckman, Unterschleißheim)
Datenverarbeitung: PC mit Software Xcalibur, Version 1.2 SP1 (Thermo)

5.3 Trennung von diastereomeren Flavanonglykosiden in Orangensäften

5.3.1 Orangen und Orangensäfte

Tabelle 25 *eingesetztes Probenmaterial für die Methodenentwicklung der Diastereomeren Trennung von Flavanonglykosiden in Orangensaft*

Probenmaterial	Herkunft
Orangen frisch (handelsüblich)	Meckenheimer Wochenmarkt laut Etikett: Spanien
Blutorangen frisch (handelsüblich)	Meckenheimer Supermarkt
Orangensaft (handelsüblich)	„Merziger“, Aldi, Lidl

5.3.2 Probenvorbereitung

SPE-Methode nach [59]

SPE-Kartusche: C₁₈-Hydrat (siehe Abschnitt 4.1.6)
 Größe: 6 mL/1000 mg (siehe Abschnitt 4.1.6)
 Eluent: DMSO + Ameisensäure (99+1, v+v)

Tabelle 26 *SPE-Methode zur Aufarbeitung von Orangensäften und anderen Zitrus Säften*

Konditionieren	2 mL DMSO/Ameisensäure (99+1, v+v)
Waschen	10 mL bidestilliertes H ₂ O
Probenaufgabe	20 mL Orangensaft, homogenisiert und zentrifugiert
Waschen	10 mL bidestilliertes H ₂ O
Eluieren	2 x 0,5 mL DMSO/Ameisensäure (99+1, v+v)

5.3.3 Optimierte Trennparameter der CE mit „Sample Stacking“

Tabelle 27 Trennparameter der chiralen Trennung der Flavanonglykoside mittels CE mit „Sample stacking“

Kapillare	60 cm effektiv, 70 cm gesamt Länge, 75 µm I.D.,
Kapillartemperatur	15 °C
Trennspannung	18 kV
Trennpuffer	250 mM Boratpuffer
pH-Wert des Puffers	pH = 9,0
Chirale Selektoren	15 mM HP-β-CD , 15 mM CM-β-CD
Reverse polarity	5 kV, 0,7 sec
Puffer Injektion hinter der Probenzone	0,7 psi, 3 sec

5.3.4 Identifizierung mittels LC-MS

Chromatographische Bedingungen

Geräte Parameter siehe Abschnitt 5.2.2.2

Eluenten: A: 1% Essigsäure/Wasser
B: 1% Essigsäure/Acetonitril
Gradient: siehe Tabelle 29
Fluß: 0,3 mL/min

Tabelle 28 Gradientenprogramm zur Trennung und Identifizierung der Flavanonglykoside in Orangensaft

Zeit (min)	Anteil mobile Phase B (%)	Verlauf
0	10	Start
30	30	Linearer Gradient, Steigung 0,5% pro min
50	100	Waschschritt
51	10	Re-Equilibrierung (Start)
60	10	Re-Equilibrierung (Ende)

MS-Bedingungen

Geräteparameter siehe Abschnitt 5.2.2.2

Modus: negativer ESI Modus
Source Voltage: 4,0 kV
Sheath Gas Flow: 90 Arbitrary Units
Auxiliary Gas Flow: 5 Arbitrary Units
Capillary Voltage: 10 V
Tube Lens Offset: 20 V
First Octapole Offset: +4 V
Interoctapole Lens Voltage: +30 V
Second Octapole Offset: 10 V
Trap DC Offset: 10 V
Kapillartemperatur: 310 °C
Stoßgas: Helium (10^{-5} Torr)³⁰
Stoßenergie: 40% (Schwingungsamplitude)
Isolation width: 2,8 m/z

Auf Grund des hohen wässrigen Anteils in der mobilen Phase, wird zur Verbesserung der Ionisierung über eine HPLC-Pumpe Methanol zudosiert. Die Methanol-Zudosage ist von dem vorhandenen HPLC-Fluss abhängig. Das bedeutet, dass das Verhältnis von HPLC-Fluss zu Methanol-Zudosage drei zu eins beträgt.

5.4 Chirale Trennung der monomeren Flavan-3-ole in Kakao und Kakaoprodukten mittels CD-MEKC

5.4.1 Kakao und Schokolade

Tabelle 29 *eingesetztes Probenmaterial für die Methodenentwicklung der chiralen Trennung von (+)/(-)-Catechin und (+)/(-)-Epicatechin in Kakao und kakaohaltigen Produkten*

Probenmaterial	Herkunft
Kakaopulver	handelsüblich aus dem Supermarkt
Kakaobohnen fermentiert und gemahlen (unalkalisiert)	ZDS (Zentralfachschule deutscher Süßwarenindustrie), Solingen
Kakaopulver unterschiedlich stark alkalisiert	Schokinag GmbH und Co.KG, Mannheim, Deutschland
Schokolade	handelsüblich, verschiedene Sorten aus dem Supermarkt

5.4.2 Probenvorbereitung

Nach einer Methode von Kofink 2009 [84], werden zwischen 0,5 und 1,0 g Kakao mit 30 mL MeOH/H₂O (80+20, v+v) aufgeschlämmt. Diese Mischung wird mehrere Stunden bei Raumtemperatur und Atmosphärendruck auf einem Magnetrührer gemischt, bis alles Methanol verdunstet ist. Dem erhaltenen Rückstand werden 30 mL bidestilliertes H₂O zugesetzt und die Suspension wird bei 10 000 U/min 15 min zentrifugiert. Das Zentrifugat wird anschließend durch einen Faltenfilter filtriert und das Filtrat wird schließlich einer Festphasenextraktion unterworfen.

SPE-Methode nach [130]

SPE-Kartusche: Polyamid (siehe Abschnitt 4.1.6)
 Größe: 6 mL/1000 mg (siehe Abschnitt 4.1.6)
 Eluent: DMSO + Ameisensäure (99+1, v+v)

Tabelle 30 *SPE-Methode zur Aufarbeitung von Kakao und kakaohaltigen Produkten*

Konditionieren	2 mL DMSO/Ameisensäure (99+1, v+v)
Waschen	10 mL bidestilliertes H ₂ O
Probenaufgabe	30 mL Filtrat
Waschen I	20 mL bidestilliertes H ₂ O
Waschen II	1,5 mL DMSO/Ameisensäure (99+1, v+v)
Eluieren	2 x 1 mL DMSO-Ameisensäure (99+1, v+v)

5.4.3 Optimierte Trennparameter der CD-MEKC

Tabelle 31 *Trennparameter der chiralen Trennung der Flavan-3-ole mittels CD-MEKC*

Kapillare	50 cm effektiv, 60 cm gesamt Länge, 75 µm I.D.
Kapillartemperatur	15 °C
Trennspannung	25 kV
Trennpuffer	200 mM Boratpuffer + 20 mM Phosphatpuffer
pH-Wert des Puffers	pH = 6,4
Chirale Selektoren	30 mM HP-γ-CD
Mizellbildner	SDS, 100 mM

5.5 Chirale HPLC-Trennung der Flavan-3-ole in Humanplasma nach Verzehr eines Kakaotranks

5.5.1 Blut / Humanplasma

Tabelle 32 Probenmaterial für die Methodenentwicklung der chiralen Trennung von (+)/(-)-Catechin und (+)/(-)-Epicatechin in Humanplasma nach Genuss eines Kakaotranks

Probenmaterial	Herkunft
Humanplasma nüchtern T ₀	Proband: weiblich, gesund, 160 cm groß 46 kg KG, Nichtraucherin
Humanplasma 2 h nach Genuss eines Kakaotranks T ₂ (Zusammensetzung des Kakaotranks siehe Abschnitt 4.5.2)	
Humanplasma 2 h nach Verzehr eines (+)/(-)-Catechin Standards T ₂	

5.5.2 Zusammensetzung des Kakaotranks bzw. (+)/(-)-Catechin Standardgetranks

Tabelle 33 Angaben über die Zusammensetzung des konsumierten Kakaotranks bzw. der konsumierten Standardlösung

Kakaotränk	46 g Kakaopulver + 20 g Haushaltszucker in 250 mL Vollmilch unter Wärmezufuhr gelöst. Bezogen auf das Körpergewicht entspricht dies 1 g Kakaopulver pro kg KG gelöst in ca. 5,5 mL Vollmilch
Standardgetränk	225 mg (+)/(-)-Catechin Standard + 20 g Haushaltszucker in 250 mL Vollmilch gelöst.

5.5.3 Blutaufbereitung

Blutentnahme in 9 mL EDTA-Röhrchen

direktes Kühlen auf Eis

15 min zentrifugieren bei 4000 rpm

Aliquotieren des Blutplasmas in 500 µL Portionen

Stabilisieren der einzelnen Plasma-Portionen mit 10 µL einer antioxidativen Lösung

Lagerung bei -80°C

5.5.4 Zusammensetzung der antioxidativen Lösung

0,4 mol/L NaH_2PO_4 -Puffer
+ 2% (20 g/L) Ascorbinsäure und
+ 0,1% (1 g/L) EDTA } mit H_3PO_4 auf pH 3,6 einstellen

5.5.5 Herstellung der Enzymlösungen

β -Glucuronidase-Lösung 4,8 mg (25 000 units) in 500 µL Phosphatpuffer
(75 mmol/L, pH 6,8) suspendieren = 50 U/µL

Sulfatase-Lösung 34,5 mg (1000 units) in 250 µL Phosphatpuffer
(75 mmol/L, pH 6,8) suspendieren = 4 U/µL

5.5.6 Probenvorbereitung

enzymatische Hydrolyse

500 μ L Humanplasma	}	mischen und 45 min bei 37 °C inkubieren
+ 125 μ L β -Glucuronidase-Lösung (siehe 4.5.5)		
+ 62,5 μ L Sulfatase-Lösung (siehe 4.5.5)		

Festphasenextraktion (SPE)

SPE-Kartusche:	Polyamid (Siehe Abschnitt 4.1.6)
Größe:	3 mL/500 mg (Siehe Abschnitt 4.1.6)
Eluent:	Aceton/H ₂ O/Essigsäure (70+29,8+0,2; v+v+v)

Tabelle 34 *SPE-Methode zur Aufarbeitung von Humanplasmaproben*

Konditionieren	2 mL Aceton/H ₂ O/Essigsäure (70+29,8+0,2; v+v+v) 20 mL bidestilliertes H ₂ O
Probenaufgabe	enzymierte Plasmaprobe (komplett)
Waschen I	10 mL bidestilliertes H ₂ O
Waschen II	1 mL Aceton/H ₂ O/Essigsäure (70+29,8+0,2; v+v+v)
Eluieren	3 mL Aceton/H ₂ O/Essigsäure (70+29,8+0,2; v+v+v)

Probenlösungen mittels Stickstoffstrom auf 200 μ L einengen.

5.5.7 Optimierte Trennparameter der chiralen HPLC

Eluent:	A: 20 mM NaH ₂ PO ₄ Puffer mit pH 3,4 B: Acetonitril/Eluent A, 2+1, v+v
Gradient:	siehe Tabelle 36
Fluß:	0,6 mL/min

Tabelle 35 *Gradientenprogramm der chiralen HPLC zur Trennung von Flavan-3-olen in Humanplasma*

Zeit (min)	Anteil mobile Phase B (%)	Verlauf
0	5	Start
34	27	Linearer Gradient, Steigung 0,65 %/min
46	33	Linearer Gradient, Steigung 0,5 %/min
47	100	Waschschritt
52	100	Waschschritt
55	5	Re-Equilibrierung und Reinigung der elektrochemischen Zellen
60	5	

(A)



(B)



Abbildung I Anh. Kakaofrucht am Kakaobaum (A) [www.barbarossa-Apotheke.biz]
Kauliflori = Blüten sitzen direkt am Stamm(B) [www.schule-bw.de]

Tabelle I Anh. Inhaltsstoffe der Orange

Inhaltsstoffe der Orange	Anteil pro 100g
Wasser	85,7 g
Proteine	1,0 g
Fett	0,2 g
Kohlenhydrate	8,25 g
Ballaststoffe	1,6 g
Mineralstoffe	0,48 g
Fruchtsäuren	1,13 g
Vitamin B1	0,079 mg
Vitamin B2	0,042 mg
Nicotinamid	0,3 mg
Vitamin C	49,4 mg

Tabelle II Anh. Übersicht über untersuchte phenolische Verbindungen mittels CEAD

Autoren	Jahr	untersuchte Verbindungen	Lebensmittel	biologische Matrix	Bemerkung
[4] Aaby K., Ekeberg D., Skrede G.	2007	Glykoside des Quercetins, Kaempferol, Cyanidin, Pelargonidin, Flavanole, Derivate der p-Coumarsäure, Anthocyane, Ellagetannine, Ellaginsäure	Erdbeeren (<i>Fragaria x ananassa</i>)		
[3] Aaby K., Hvattum E., Skrede G.	2004	Kaempferol, Quercetin, Myricetin, (+)-Catechin, (-)-Epicatechin, Peonidin, cyanidin, Malvidin, Petunidin, Delphinidin, p-Coumarsäure, Kaffeesäure, Chlorogensäure, Derivate der Zimtsäure			Bestimmung der antioxidativen Kapazität der untersuchten Verbindungen . (FRAP), (ORAC)
[5] Achilli G., Cellerino G.P., Gamache P.H.	1993	36 verschiedene Moleküle: Flavonoide z.B. Catechin, Naringin, Hesperidin etc. Einfache und komplexe Phenole	fermentierte Getränke (z.B. Bier), Fruchtsäfte (z.B. Zitrusfrüchte), Pflanzenextrakte (z.B. Tabakextrakt)		
[24] Bolarinwa A., Linseisen J.	2005	23 Flavonoide z.B. Catechin, Epicatechin, Gallocatechin etc. und phenolische Säuren z.B. Vanillinsäure, Kaffeesäure etc.		Humanplasma	

Tabelle II Anh. Übersicht über untersuchte phenolische Verbindungen mittels CEAD

Autoren	Jahr	untersuchte Verbindungen	Lebensmittel	biologische Matrix	Bemerkung
[25] Brachmann S., Rodrigues R.B., Marx F., Stehle P., Galensa R.	2006		Fruchtsäfte		antioxidative Kapazität
[188] Zimmermann B.F., Papagiannopoulos M., Brachmann S., Lorenz M., Stangl V., Galensa R.	2008	Catechin, Epicaetchin, Epicatechingallat, Epigallocatechin, Epigallocatechingallat		Humanplasma nach Genuß von grünem Tee	
[171] Unno T., Sagesaka Y.M., Kakuda T.	2005	Catechin, Epicaetchin, Epicatechingallat, Epigallocatechin, Epigallocatechingallat, Gallocatechin, Catechingallat, Gallocatechingallat		Humanplasma nach Genuß von grünem Tee	
[99] Lee M-J., Prabhu S., Meng X., Li C., Yang C.S.	2000	Epigallocatechingallat, Epigallocatechin, Epicatechin, Epicatechingallat, Theaflavine		Humanplasma, Urin und Gewebe nach Genuß von grünem Tee	
[36] Chu K.O., Wang C.C., Rogers M.S., Choy K.W., Pang C.P.	2004	Catechin, Epicatechin, Gallocatechin, Epigallocatechin, Catechingallat, Epicatechingallat, Gallocatechingallat, Epigallocatechingallat		Humanplasma und Urin nach Genuß von grünem Tee	
[50] Erlund I., Alfthan G., Siren H., Ariniemi K., Aro A.	1999	Quercetin		Humanplasma	
[81] Klejdus B., Vacek J., Adam V., Zehnález J., Kizek R., Trnková L., Kubán V.	2004	Isoflavones z.B. Genistein, Daidzein	Produkte aus Sojabohnen	Urin	

Tabelle II Anh. Übersicht über untersuchte phenolische Verbindungen mittels CEAD

Autoren	Jahr	untersuchte Verbindungen	Lebensmittel	biologische Matrix	Bemerkung
[187] Zimmermann B.F., Galensa R.	2006	Flavonoide, Proanthocyanidine	Gerste und Malz		
[58] Gamache P., Ryan E., Acworth I.N.	1993	Flavonoide und andere phenolische Verbindungen	Saftgetränke		
[71] Henning S.M., Niu Y., Liu Y., Lee N.H., Hara Y., Thames G.D., Minutti R.R., Carpenter C.L., Wang H., Heber D.	2005	Epigallocatechin-gallat, Epigallocatechin, Epicatechin, Epicatechingallat,	Grüner Tee	Humanplasma	
[156] Sontag G., Kral K.	1981	Hesperidin	Orangensaft		
[114] McMurrough I., Baert T.	1994	Flavanole, Procyanidin B ₃ , Prodelphinidin B ₃	Bier		
[103] Long H., Zhu Y., Cregor M., Tian F., Coury L., Kissinger C.B., Kissinger P.T.	2001	Epigallocatechin-gallat		Blutplasma von Raten	
[108] Maiani G., Serafini M., Salucci M., Azzini E., Ferro-Luzzi A.	1997	Epigallocatechin-gallat, Epigallocatechin, Epicatechin, Epicatechingallat, Coffein, Kaffeesäure		Humanplasma nach Genuß von grünem Tee	
[115] McMurrough I., Madigan D.	1996	Dimere und Trimere Proanthocyanidine	Gerste		
[118] Milbury P.E., Chen C-Y., Dolnikowski G.G., Blumberg J.B.	2006	Flavonoide z.B.(+)-Catechin, (-)-Epicatechin, Quercetin, Kaempferol, Isorhamnetin phenolische Säuren z.B. Vanillinsäure	Mandeln (<i>Prunus dulcis</i>)		

Tabelle III Anh. In Orangen nachgewiesene Flavanoglykoside und mögliche Nachweismethoden

Trivialname	Systematischer Name	Summenformel	MW	Nachweismethode (Literatur)
Hesperidin	Hesperitin-7-O-rutinosid 5,7,3'-Trihydroxy-4'-methoxyflavanon-7-O-rutinosid	$C_{28}H_{34}O_{11}$	610,57	HPLC-UV (Kanes et al., 1993) HPLC-UV (Mouly et al, 1994) HPLC-UV-Fluoresz. & LC-MS (Robards et al 1997) Chirale CE-UV (Núria Gel-Moretó 2003)
Narirutin	Naringenin-7-O-rutinosid 5,7,4'-Trihydroxyflavanon-7-O-rutinosid	$C_{27}H_{32}O_{14}$	580,54	HPLC-UV (Kanes et al., 1993) HPLC-UV (Mouly et al, 1994) HPLC-UV-Fluoresz. & LC-MS (Robards et al 1997) CE-UV (Cancalon 1999)
Didymin	Isosakuranetin-7-O-rutinosid 5,7-Dihydroxy-4'-methoxyflavanon-7-O-rutinosid	$C_{28}H_{34}O_{14}$	594,57	HPLC-UV (Kanes et al., 1993) HPLC-UV-Fluoresz. & LC-MS (Robards et al 1997) CE-UV (Cancalon 1999)
Narirutin-4'-O-glucosid	Naringenin-7-O-rutinosid-4'-O-glucosid	$C_{33}H_{42}O_{19}$	742,69	HPLC-UV (Kanes et al., 1993) HPLC-UV-Fluoresz. & LC-MS (Robards et al 1997)

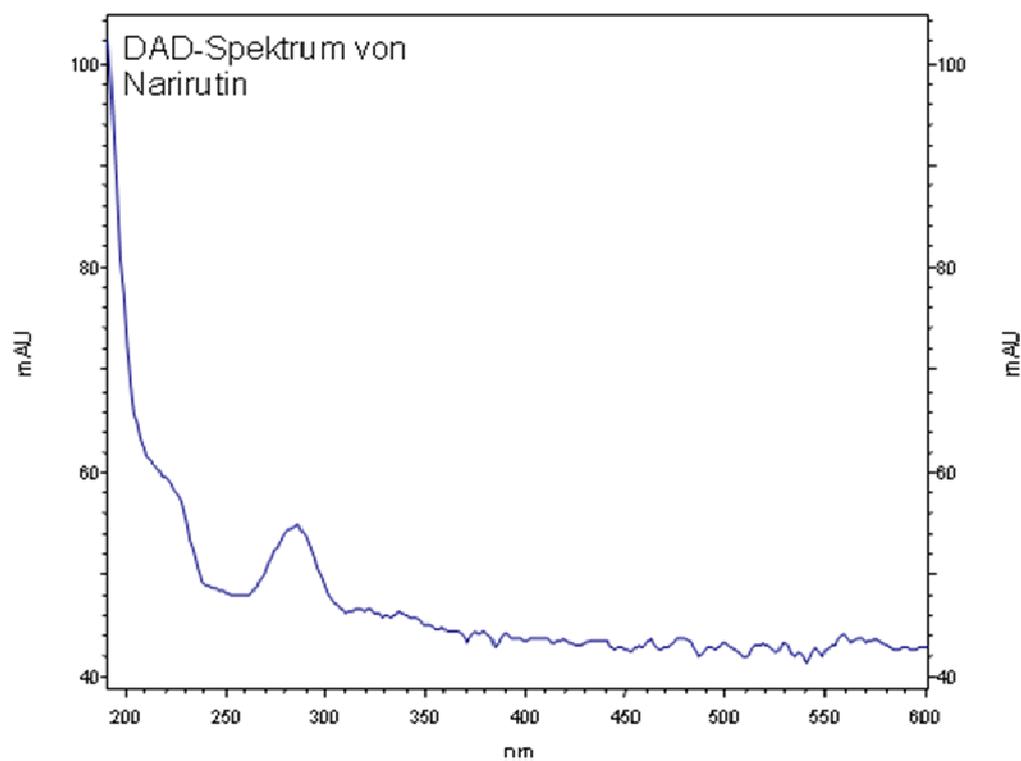
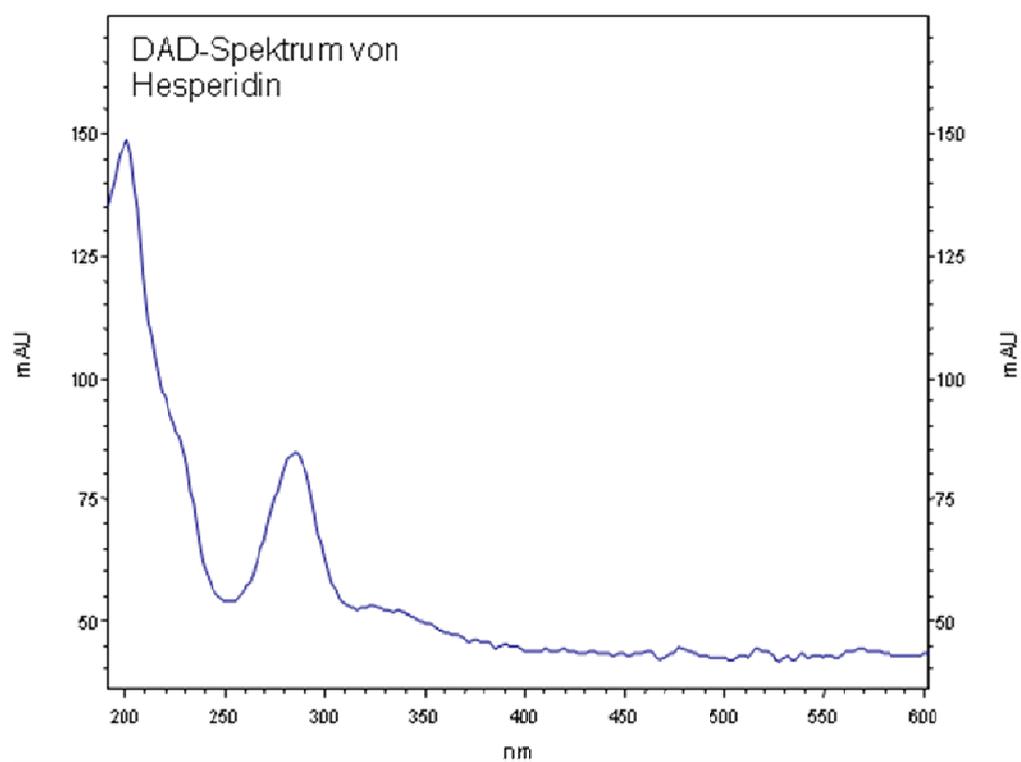


Abbildung II Anh. UV-Spektren der in Orangen nachgewiesenen Flavanoglykoside

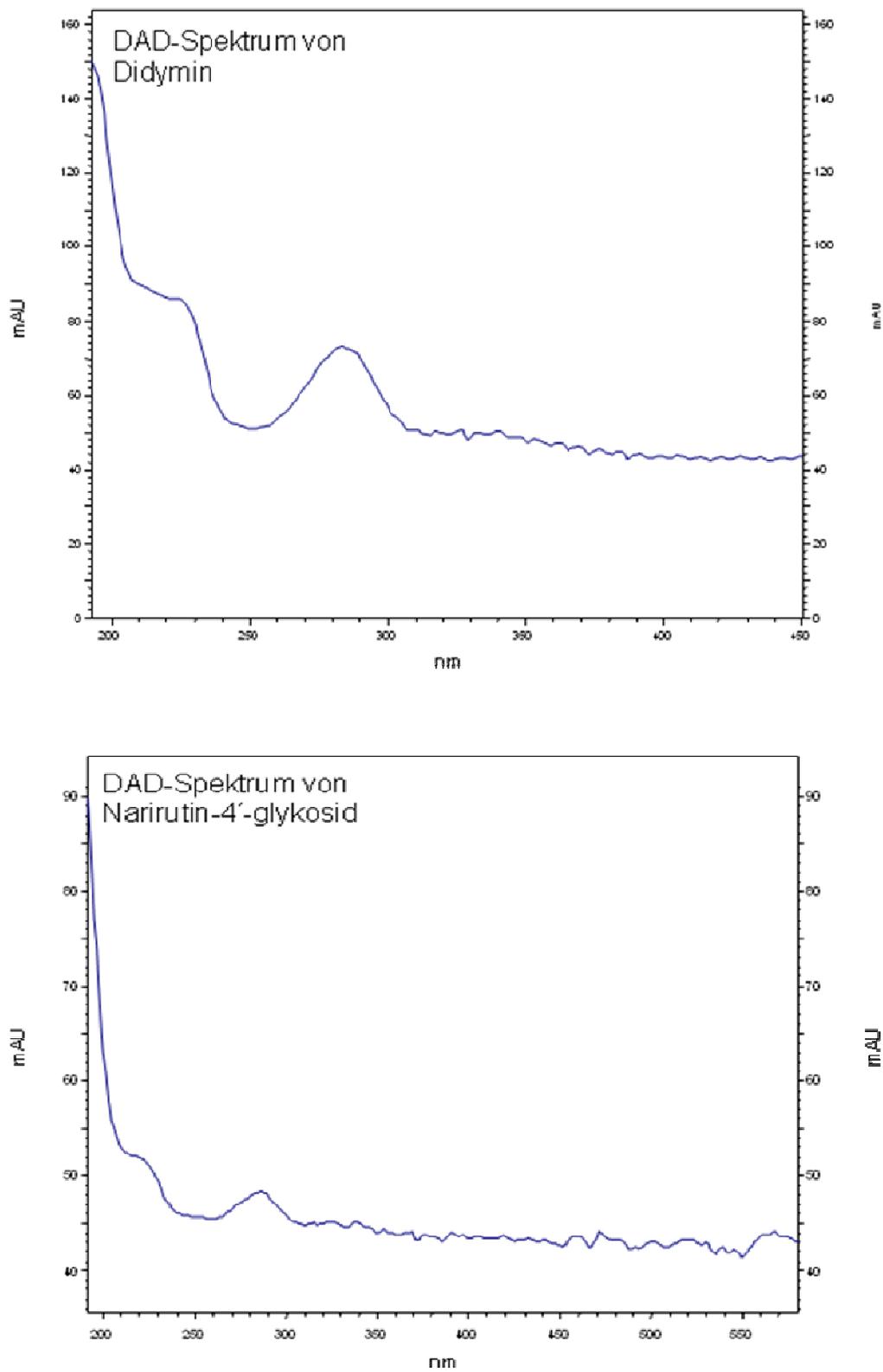


Abbildung II Anh. UV-Spektren der in Orangen nachgewiesenen Flavanonglykoside

Tabelle IV Anh. Überblick über die wichtigsten Gruppen chiraler Selektoren und ihr Anwendungsbereich (Rizzi, 2001)

Selektor-Gruppe	Chirale Selektoren	Anwendungsbereich
Cyclodextrine (CD) und ihre Derivate	α -, β - und γ -Cyclodextrin (\emptyset) methylierte CD (\emptyset) hydroxyalkylierte CD (\emptyset) carboxymethylierte CD (-) carboxyethylierte CD (-) sulfatierte CD (—) aminoalkylierte CD (++)	aromatische oder partiell hydrophobe Proben, die zur Ausbildung von Inklusionskomplexen mit CD befähigt sind
Chirale Mizellenbildner	Salze der Gallensäure und Derivate (-)	basische Analyten Dansyl-Aminosäuren
Chirale Metallkomplexe	α -hydroxy und α -aminosäuren mit Metallen (Cu)*	Dansyl-Aminosäuren
Chirale Kronenether	18-Krone-6-tetracarboxylsäure (-)	primäre basische Amine
Proteine und Glycoproteine (-) und (+)	Rinderserumalbumin Humanalbumin Orosomuroid Ovomucoid	wenige Applikationen. Selektor hat eigene UV-Aktivität = Detektionsprobleme
Oligosaccharide, Polysaccharide z.T. derivatisiert**	Dextran, Dextrin, Heparin Cellulose, Amylose	breiter Anwendungsbereich
Antibiotika (-) und (+)	Vancomycin, Rifampycin, Teicoplanin, Ristocetin	Saure oder basische Analyten

Tabelle V Anh. Überblick über die wichtigsten chiralen stationären Phasen in der HPLC, ihr Trennmechanismus und ihr Anwendungsbereich

Matrix/Modifizierung	Trennmechanismus	Beispielsäulen	Verbindungen
Modifizierte Amylose-/Cellulosephasen auf Kieselgelbasis	Polare und π - π Wechselwirkungen	z.B. NUCLEOCEL (MN) z.B. chiracel & chirapak (Daicel) z.B. EUROCEL (Knauer) z.B. Kromasil® Amycoat und Cellucoat	Ibuprofen, Atropine, Benzoin, Beta-Blocker wie Metoprolol, Benzodiazepine wie Oxazepam
Permethylierte und underivatisierte Cyclodextrinphasen auf Kieselgelbasis	Bildung von Einschlußkomplexen und Wasserstoffbrückenbindungen	z.B. NUCLEODEX (MN) z.B. CHIRADEX (Merk)	phenolische Verbindungen
kovalent gebundene Aminosäure – Cu(II)-Komplexe auf Kieselgelbasis	Ligandenaustausch	z.B. NUCLEOSIL CHIRAL-1 (MN)	Aminosäuren, Dicarbonsäuren oder Diamine
“Brush-Typ” Phase auf Kieselgelbasis N-(3,5-Dinitrobenzoyl)-D-phenylglycin bzw. der optische Antipode	Charge-Transfer-, Dipol-Dipol Wechselwirkungen	z.B. NUCLEOSIL CHIRAL-2/3 (MN)	Pestizide, z.B. Herbizide auf Basis von Propionsäurederivaten, Pharmazeutika
Proteinphase (BSA) auf Kieselgel	Enantioselektive Bindung an chirale Proteinoberflächenstrukturen	z.B. RESOLVOSIL BSA-7 (MN)	
Optisch actives Polymer: Poly-(N-Acryloyl-S-Phenylalaninethylester	Enantioselektive Bindung	ChiraSpher (Merk)	z.B. Beta-Blocker
O-9-(tert-Butyl-Carbamoyl)-chinidin immobilisiert auf Kieselgel	Anionenaustausch	Chiralpak® QD-AX	Saure chirale Verbindungen mit Carboxyl-, Phosphin-, Phosphon-, Phosphor- oder Sulfonsäuregruppen
O-9-(tert-Butyl-Carbamoyl)-chinin		Chiralpak® QN-AX	

Entwicklungsschritte der chiralen HPLC-Methode:

1. β -Cyclodextrin Säule

mobile Phase A: 50mM NaH₂PO₄; pH = 4,0

mobile Phase B: ACN/30mM NaH₂PO₄; pH = 4,0 (80/20, v+v)

isokratische Bedingungen: 90% A und 10% B

Fluss: 1,0 mL/min

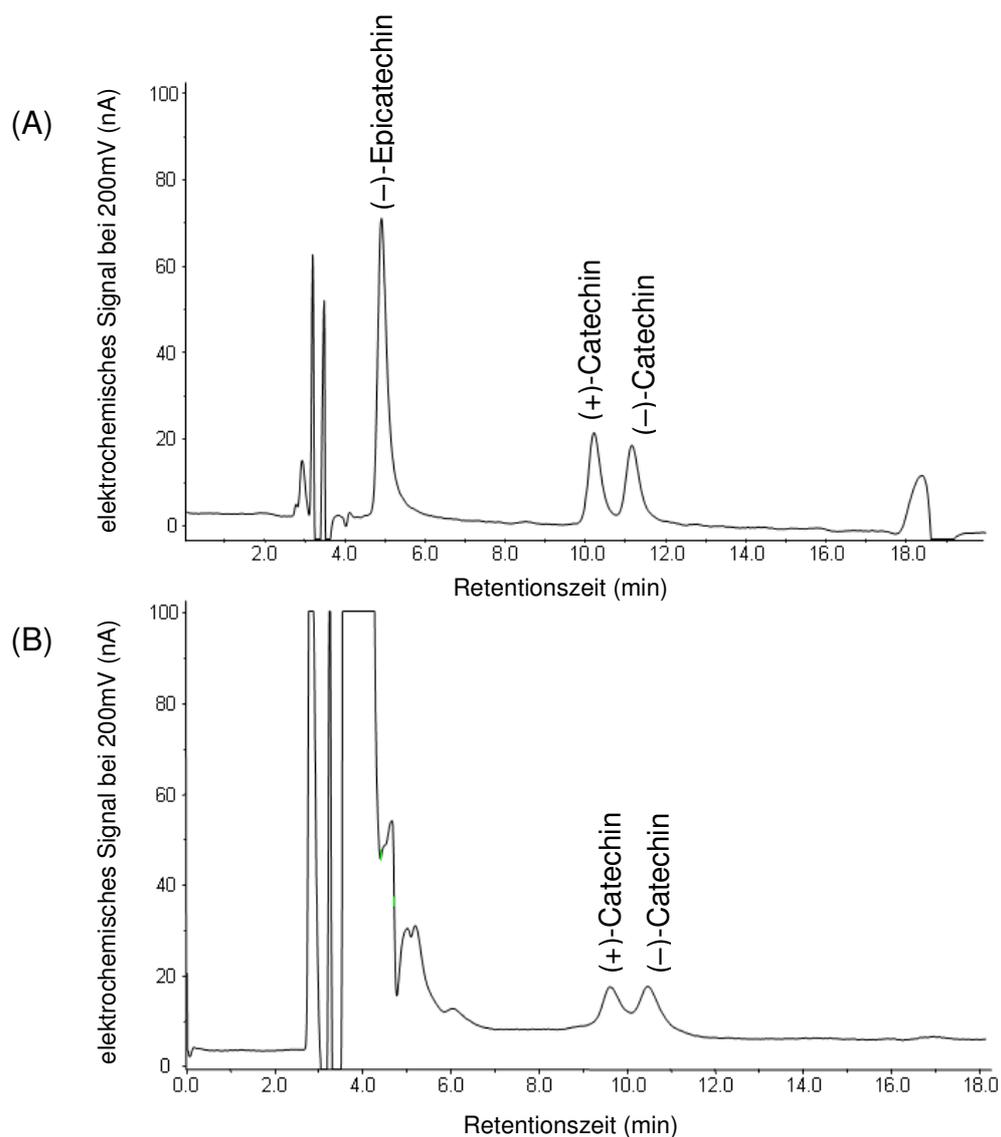


Abbildung III Anh. HPLC-CEAD Chromatogramme der chiralen Trennung eines (+)/(-)-Catechin und (-)-Epicatechin Standardgemisches ($c = 250 \text{ ng/mL}$) gelöst in DMF (A) und eines (+)/(-)-Catechin und (-)-Epicatechin Standardgemisches dotiert in proteinfreies Humanplasma (B)

Entwicklungsschritte der chiralen HPLC-Methode:

2. β -Cyclodextrin Säule

mobile Phase A: 50mM NaH_2PO_4 ; pH = 4,0

mobile Phase B: ACN/30mM NaH_2PO_4 ; pH = 4,0 (80/20, v+v)

linearer Gradient: siehe Tabelle VI Anh.

Fluss: 1,0 mL/min

Tabelle VI Anh. Bedingungen eines linearen Gradienten zur chiralen Trennung von (+)/(-)-Catechin und (+)/(-)-Epicatechin auf einer β -CD-Säule

Zeit (min)	% Eluent B
0	5
30	35
31	100
41	100
42	5
52	5

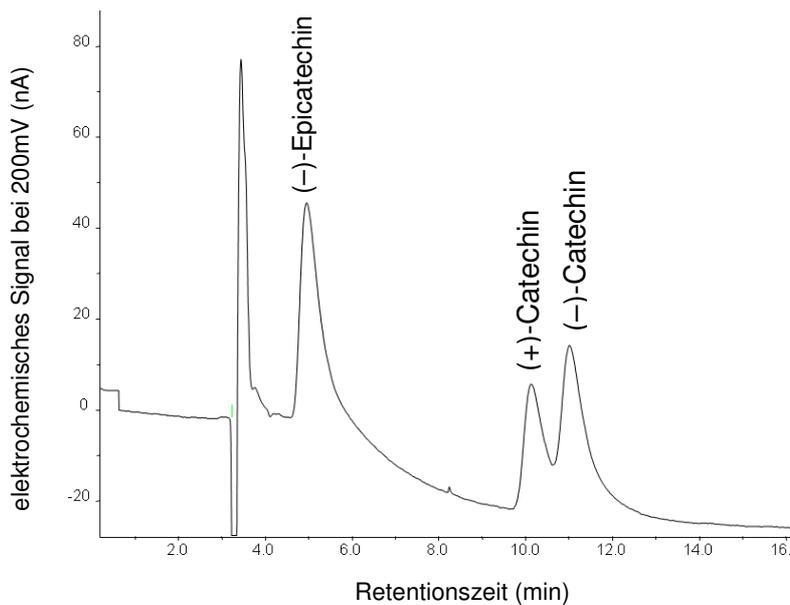


Abbildung IV Anh. HPLC-CEAD Chromatogramm der chiralen Trennung eines (+)/(-)-Catechin und (-)-Epicatechin Standardgemisches dotiert in Humanplasma ($c = 250 \text{ ng/mL}$), gemessen über eine β -CD-Säule unter Einsatz eines linearen Gradienten

Entwicklungsschritte der chiralen HPLC-Methode:

3. PM- γ -Cyclodextrin Säule

mobile Phase A: 50mM NaH₂PO₄; pH = 4,0

mobile Phase B: ACN/30mM NaH₂PO₄; pH = 4,0 (80/20, v+v)

isokratische Bedingungen: 90% A und 10% B

Fluss: 1,0 mL/min

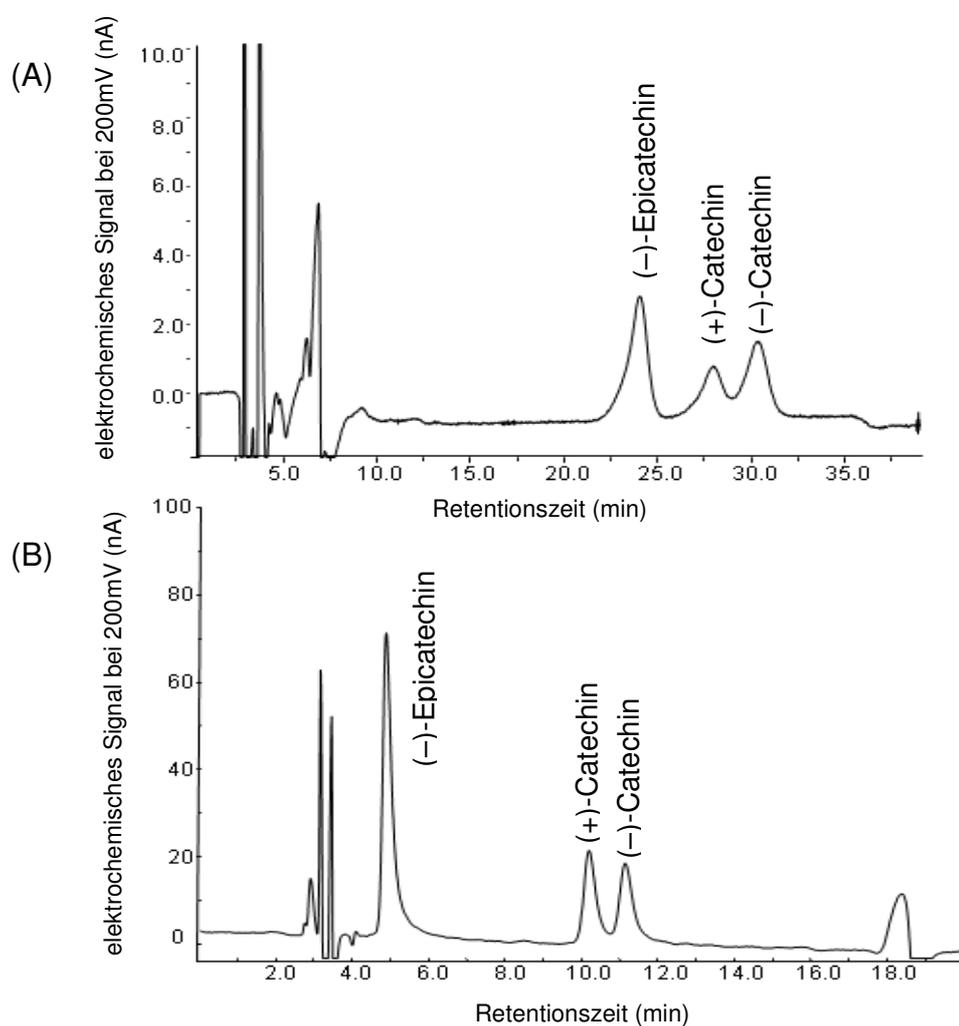


Abbildung V Anh. HPLC-CEAD Chromatogramme der chiralen Trennung eines (+)/(-)-Catechin und (-)-Epicatechin Standardgemisches ($c = 250 \text{ ng/mL}$) unter isokratischen HPLC Bedingungen (10% Eluent B) mit unterschiedlichen stationären Phasen: permethyliertes- γ -Cyclodextrin (PM- γ -CD) (A), natives β -Cyclodextrin (β -CD) (B)

Abbildung IV Anh. zeigt, dass bei dem Einsatz der PM- γ -CD Phase wesentlich längere Retentionszeiten für die monomeren Flavan-3-ole erreicht werden als bei der β -CD Phase. Dies lässt vermuten, dass die monomeren Flavan-3-ol-Enantiomere stärkere Wechselwirkungen mit dem PM- γ -CD eingehen als mit dem underivatisierten β -CD. Eine logische Erklärung für dieses Verhalten, aufgrund von möglichen Zusammenhängen in der Form, Größe und Derivatisierung des Selektors und des Selektanden sind nicht zu erkennen. Dem Anschein nach liegt ein Prozess vor, bei dem Inklusionen, Wasserstoffbrückenbindungen, Dispersionskräfte, Dipol-Dipol-, elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen eine Rolle spielen können [151, 155, 182]. Eine Inklusion des Analyten in die Kavität des Cyclodextrins scheint nicht unbedingt von vorherrschender Bedeutung für die Enantioselektivität zu sein, da Enantiomerentrennungen der Polyphenole auch mittels stationärer Phasen auf Basis von Cellulose und Amylose möglich sind [90, 183]. Auch mit linearen, derivatisierten Dextrinen, die aus 7 bis 8 Glucoseeinheiten aufgebaut sind, konnten unterschiedliche Verbindungen chiral getrennt werden [154].

4. PM- γ -Cyclodextrin Säule

mobile Phase A: 20mM NaH₂PO₄; pH = 3,4

mobile Phase B: ACN/mobile Phase A; (2+1, v+v)

isokratische Bedingungen: mit verschiedenen Anteilen an organischem Lösungsmittel (5%, 10%, 15% und 20% mobile Phase B)

Fluss: 1,0 mL/min

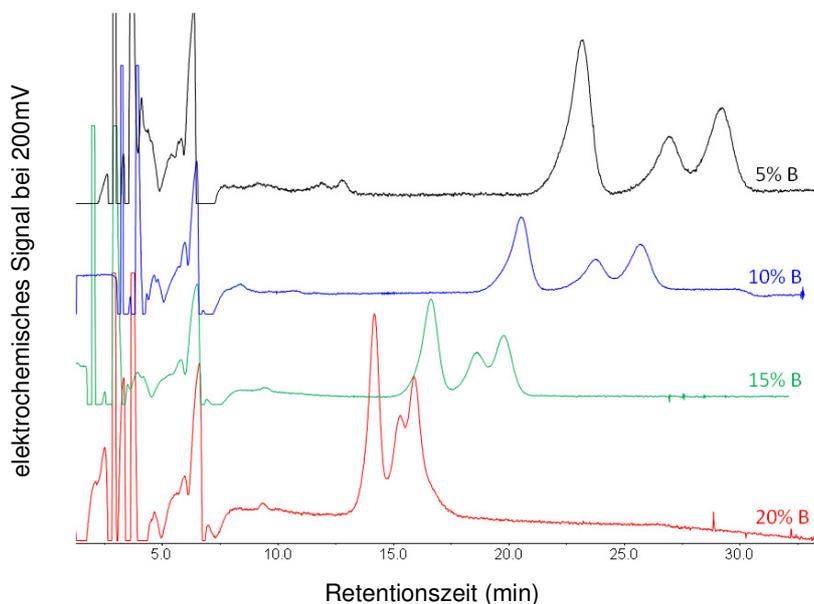


Abbildung VI Anh. HPLC-CEAD Chromatogramme der chiralen Trennung eines (+)/(-)-Catechin und (-)-Epicatechin Standardgemisches ($c = 250 \text{ ng/mL}$) gemessen auf einer PM- γ -CD-Säule unter isokratischen Bedingungen mit unterschiedlichen Acetonitrilanteilen

Die Chromatogramme der Abbildung V Anh. illustrieren, inwieweit der Anteil an organischem Lösungsmittel Einfluss auf die Trennung der Enantiomeren nimmt. Da der Trennmechanismus der PM- γ -CD Säule nach dem Reversed Phase (RP) Modus verläuft, nimmt die Elutionskraft mit sinkender Polarität des Eluenten zu. Dies bedeutet in diesem Fall, dass mit ansteigendem Anteil an organischem Lösungsmittel, die Analyten schneller von der Säule eluiert werden. Es ist ersichtlich, dass sich durch die kürzeren Retentionszeiten die Auflösung verschlechtert. Ein ausreichend zufriedenstellendes Ergebnis wurde mit isokratischer HPLC nicht erreicht.

5. PM- γ -Cyclodextrin Säule

mobile Phase A: 20mM NaH₂PO₄; pH = 3,4
mobile Phase B: ACN/mobile Phase A; (2+1, v+v)

linearer Gradient: 5% mobile Phase B, unterschiedliche Gradienten Steigungen (0,1%, 0,25%, 0,375% und 0,5 % Steigung)

Fluss: 1,0 mL/min

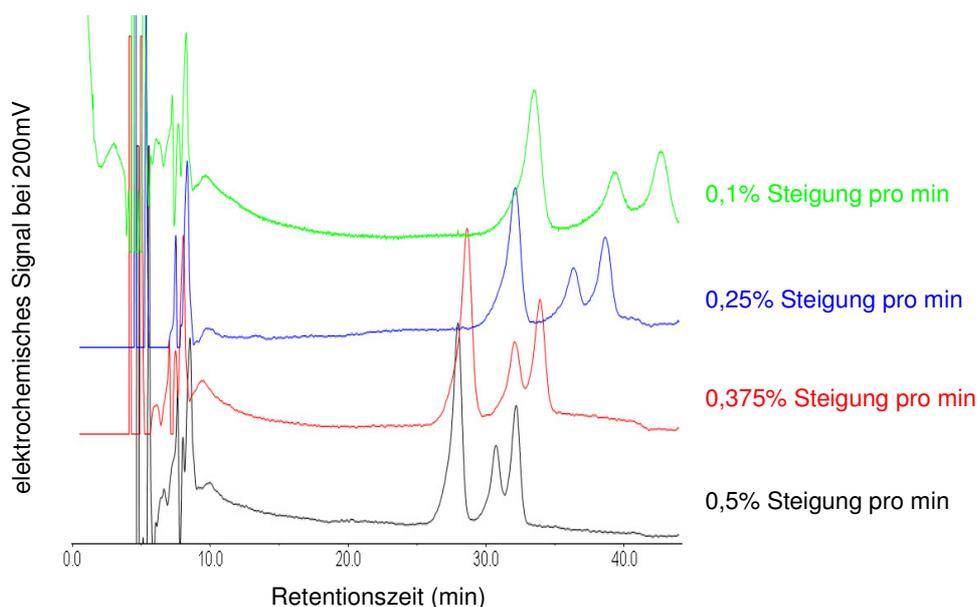


Abbildung VII Anh. HPLC-CEAD Chromatogramme der chiralen Trennung eines (+)/(-)-Catechin und (-)-Epicatechin Standardgemisches ($c = 250 \text{ ng/mL}$) gemessen auf einer PM- γ -CD-Säule unter Verwendung linearer Gradienten mit unterschiedlicher Steigung

Mit zunehmender Steigung des Gradienten verkürzen sich die Retentionszeiten und die erhaltenen Signale werden höher und schmaler. Im Gegensatz zu den Versuchen unter isokratischen Bedingungen, finden in diesem Fall trotz abnehmender Retentionszeiten keine signifikanten Verluste bei den Peakaufösungen statt (Tabelle VI Anh.).

Tabelle VII Anh. Peakauflösung (R_S) und Trennfaktor (α) berechnet für die chirale Trennung von (+)/(-)-Catechin und (-)-Epicatechin bei unterschiedlichen linearen Gradienten mit divergierender Steigung

Steigung der linearen Gradienten	Trennfaktor α zwischen (-)-EC/(+)-C	Peakauflösung R_S zwischen (-)-EC/(+)-C	Trennfaktor α zwischen (+)-C/(-)-C	Peakauflösung R_S zwischen (+)-C/(-)-C
0,1%	1,17	23,55	1,08	18,80
0,25%	1,13	23,39	1,06	19,48
0,375%	1,14	20,35	1,06	18,45
0,5%	1,13	20,20	1,05	15,13

6. PM- γ -Cyclodextrin Säule

mobile Phase A: 20mM NaH₂PO₄; pH = 3,4

mobile Phase B: ACN/mobile Phase A; (2+1, v+v)

zusammengesetzte Gradienten: siehe Tabelle VII Anh. und Tabelle VIII Anh.

Fluss: 1,0 mL/min

Tabelle VIII Anh. Bedingungen eines Gradienten zur Verbesserung der chiralen Trennung von (+)/(-)-Catechin und (-)-Epicatechin

Zeit (min)	% Eluent B
0	5
29	28
40	31
41	100
45	100
46	5
50	5

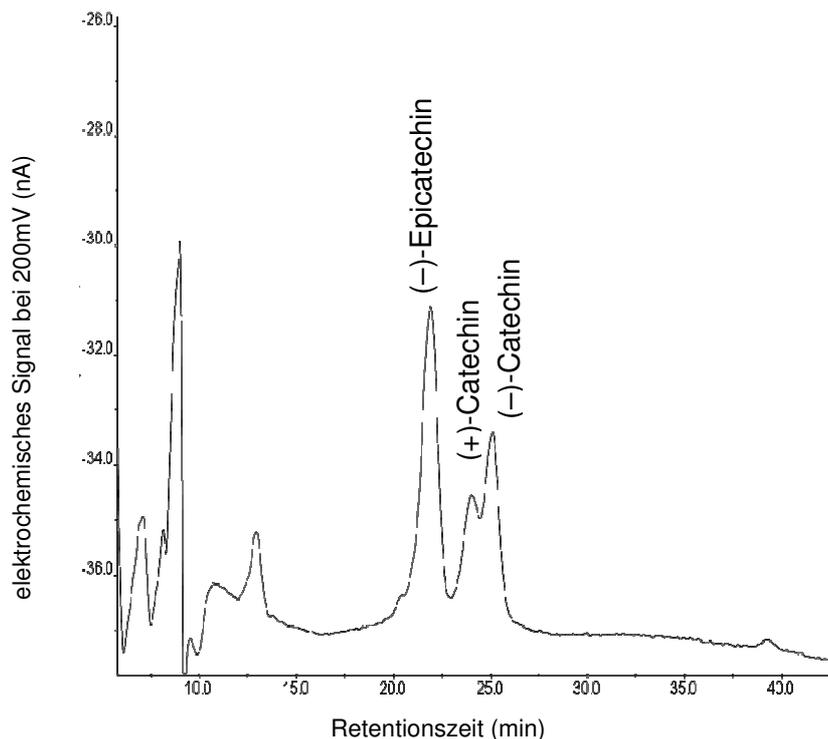


Abbildung VIII Anh. HPLC –CEAD Chromatogramm der chiralen Trennung eines (+)/(-)-Catechin und (-)-Epicatechin Standardgemisches ($c = 250 \text{ ng/mL}$) gemessen auf einer PM- γ -CD-Säule unter Verwendung eines zusammengesetzten Gradienten

Tabelle IX Anh. Bedingungen eines zweiten Gradienten zur Verbesserung der chiralen Trennung von (+)/(-)-Catechin und (-)-Epicatechin

Zeit (min)	% Eluent B
0	5
25	22
35	45
36	100
41	100
42	5
50	5

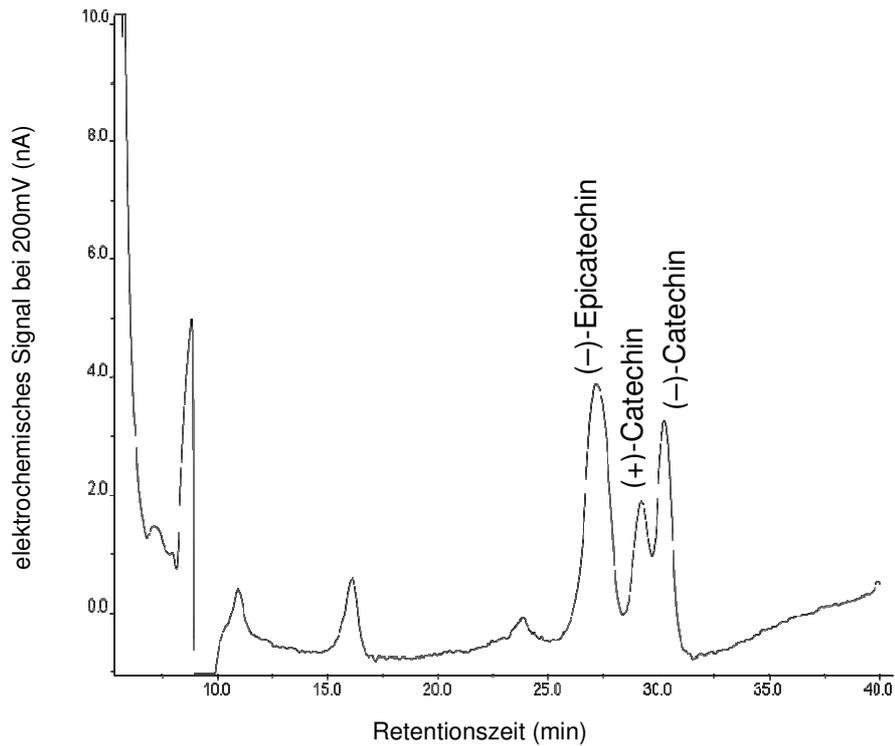


Abbildung IX Anh. HPLC-CEAD Chromatogramm der chiralen Trennung eines (+)/(–)-Catechin und (–)-Epicatechin Standardgemisches ($c = 250 \text{ ng/mL}$) gemessen auf einer PM- γ -CD-Säule unter Verwendung eines Gradienten

Durch weitere Modifizierungen des Gradienten und reduzieren des Flusses auf 0,6 mL/min gelang eine vollständige Trennung von (+)/(–)-Catechin und (–)-Epicatechin (siehe Ergebnisse und Diskussionen S.96)

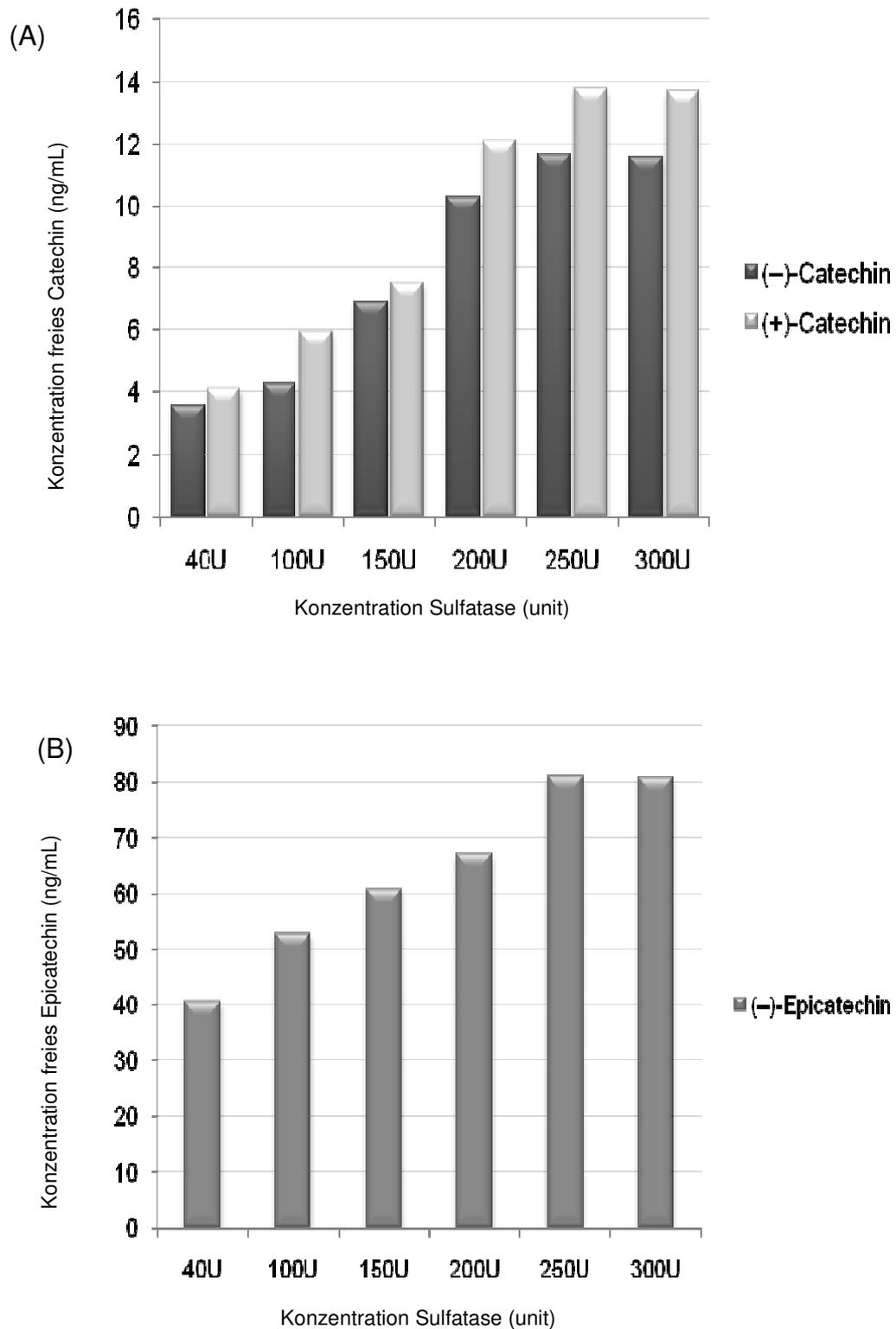


Abbildung X Anh. *Effekt der Sulfatase-Konzentration auf den Gehalt an freiem (+)- und (-)-Catechin (A) sowie auf den Gehalt an freiem (-)-Epicatechin (B)*

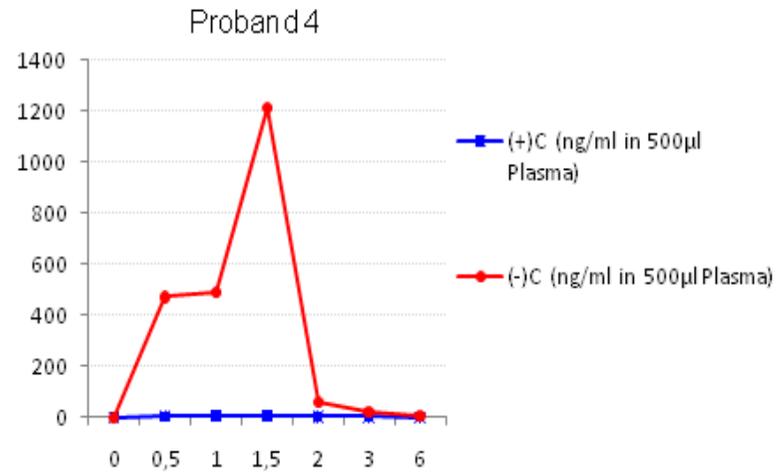
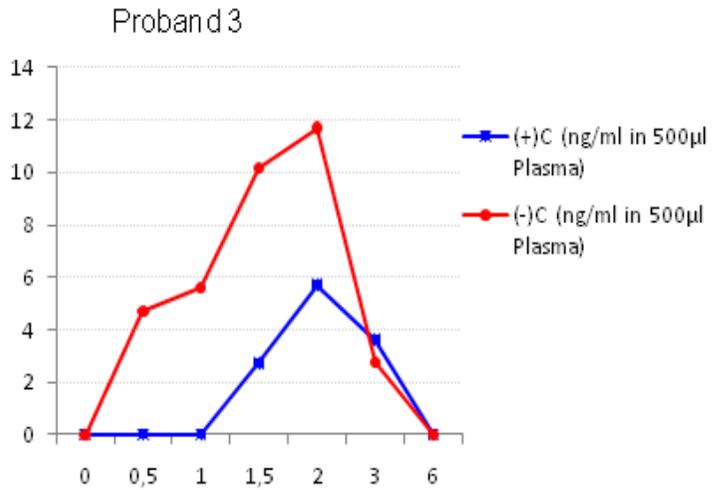
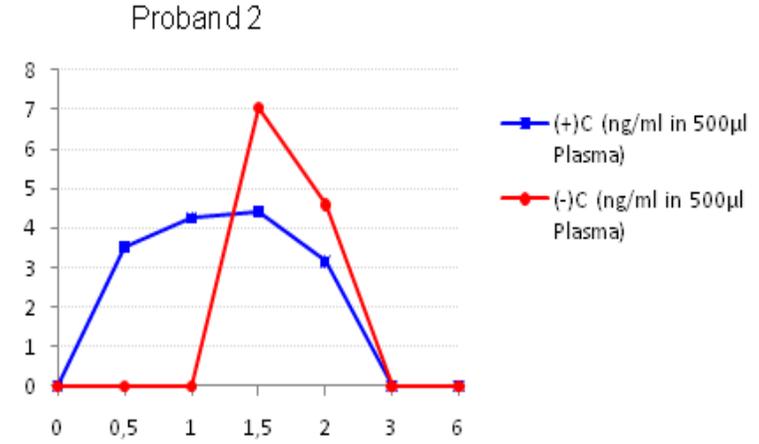
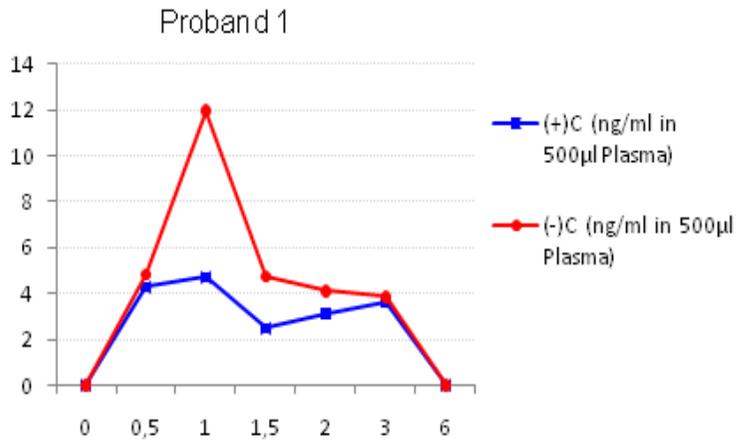


Abbildung XI Anh. Konzentrationsverlauf von (+)/(–)-Catechin in Humanplasma über einen Zeitraum von 6 Stunden bei allen 12 Probanden der Cross-over-Studie

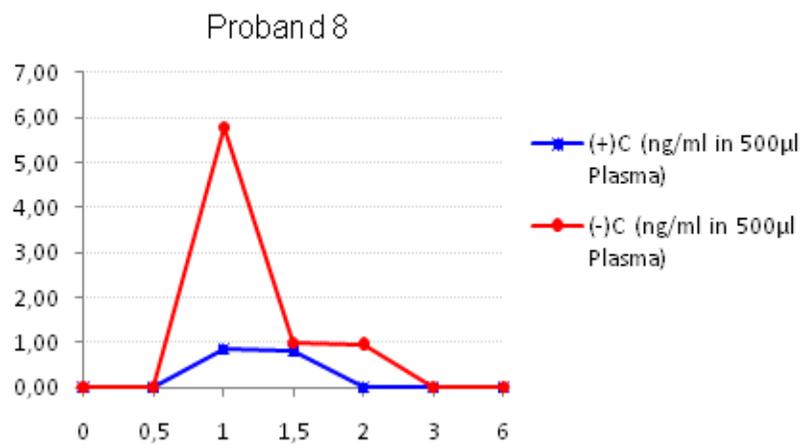
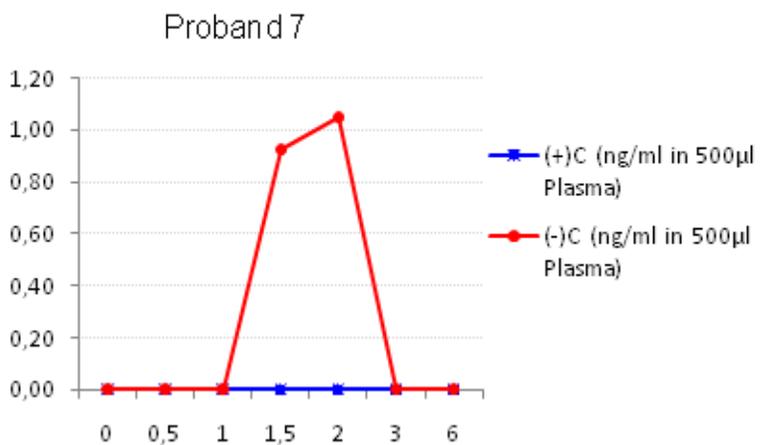
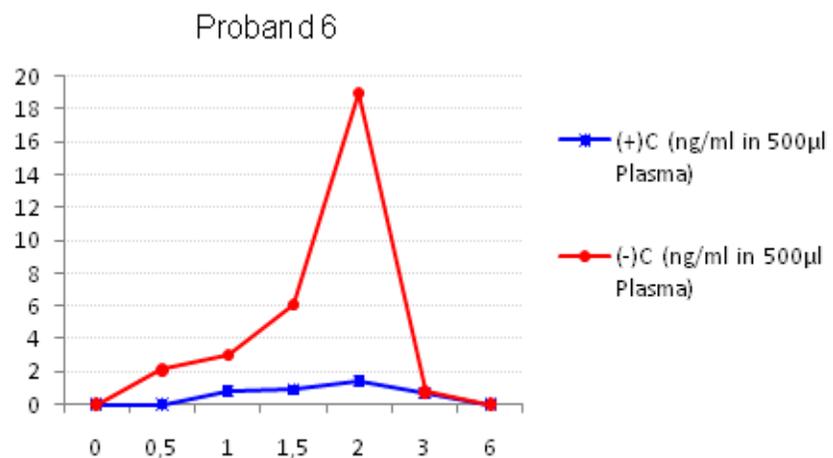
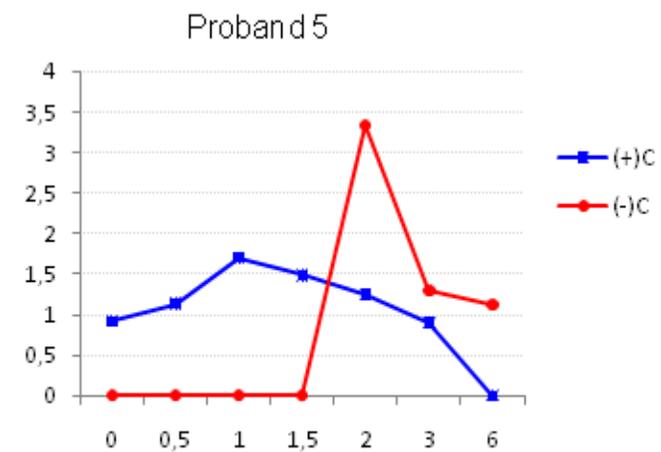


Abbildung XI Anh. Konzentrationsverlauf von (+)/(-)-Catechin in Humanplasma über einen Zeitraum von 6 Stunden bei allen 12 Probanden der Cross-over-Studie

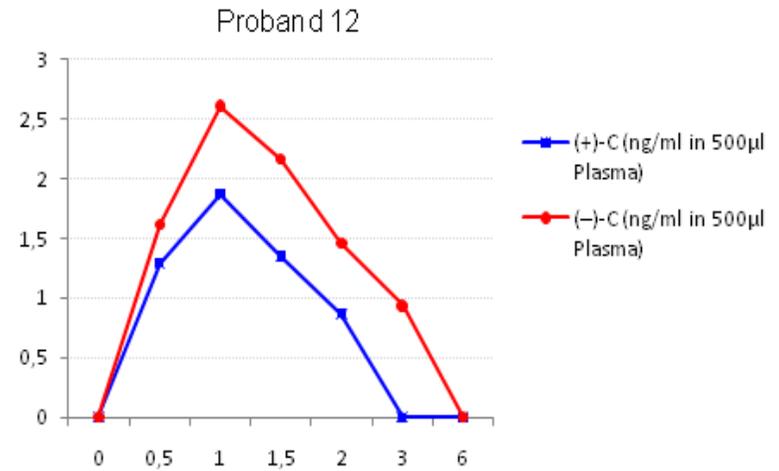
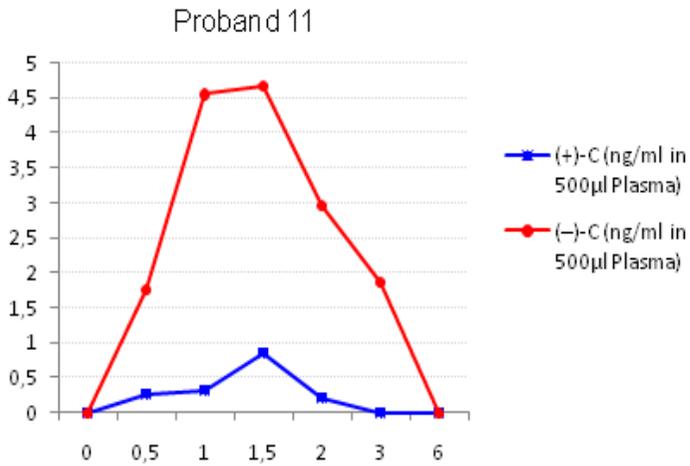
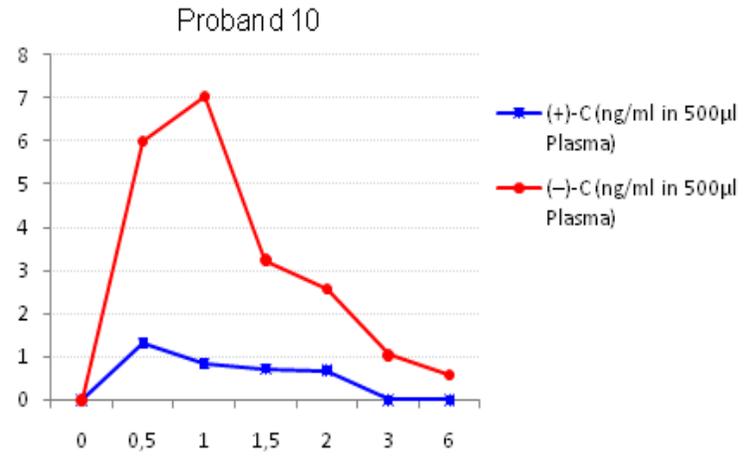
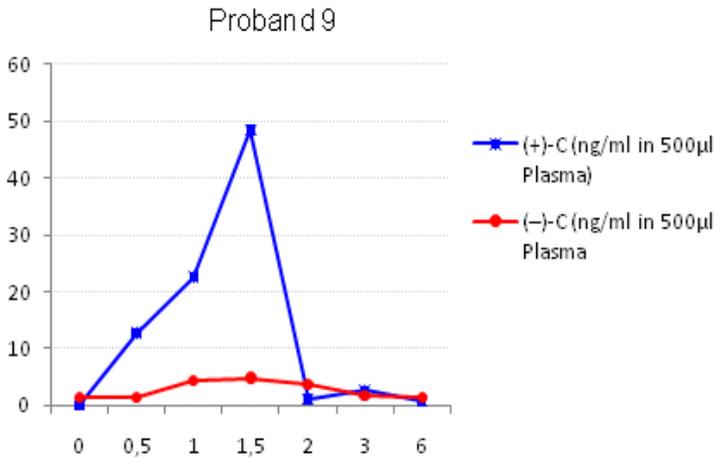


Abbildung XI Anh. Konzentrationsverlauf von (+)/(–)-Catechin in Humanplasma über einen Zeitraum von 6 Stunden bei allen 12 Probanden der Cross-over-Studie

- [1] **Abd El Mohsen MM, et al. 2002.** *Free Radic Biolog Med*, Bd. 33, 12, S. 1693-1702
- [2] **Abrahamse SL, Kloots WJ und van Amelsvoort JMM, 2005.** *Nutr Res*, Bd. 25, S. 305-317
- [3] **Aaby K, Hvattum E, Skrede G, 2004.** *J Agric Food Chem*, Bd.52, S. 4595-4603
- [4] **Aaby K, Ekeberg D, Skrede G, 2007.** *J Agric Food Chem*, Bd.55, S. 4395-4406
- [5] **Achilli G, Cellerino GP, Gamache PH, 1993.** *J Chromatogr*, Bd. 632, S. 111-117
- [6] **Acworth IN und Bowers M, 1997.** "Coulometric Electrode Array Detectors for HPLC". Utrecht : Acworth IN, Naoi M, Parvez H, Parvez S VSP 6:51-74, 1997
- [7] **Acworth IN und Gamache PH, 1996.** *Am Lab*, Bd. 28, S. 33-38
- [8] **Adamson GE, et al. 1999.** *J Agr Food Chem*, Bd. 47, S. 4184-4188
- [9] **Akiyama H, et al. 2000.** *Neurobiol Aging*, Bd. 21, 3, S. 383-421
- [10] **Amarowicz R, et al. 2009.** *Molecular Nutrition & food research*, Bd. 53 Suppl 2, S. 151-183
- [11] **Andrade P, et al. 1997.** *Food Chem.* 1997, Bd. 60, 1, S. 79-84.
- [12] **Andrés-Lacueva C, et al. 2008.** *J Agric Food Chem*, Bd. 56, S. 3111-3117
- [13] **Armstrong DW, University of Texas, Arlington, USA,** mündliche Absprache
- [14] **Arts ICW, 2008.** *J Nutr*, Bd. 138, S. 725-731
- [15] **Arts ICW, 2008.** *J Nutr*, Bd. 138, S. 1548S-1553S
- [16] **Arts ICW, Van de Putte B und Hollman PCH, 2000.** *J Agric Food Chem*, Bd. 48, S. 1752-1757
- [17] **Baba S, et al. 2001.** *J Nutr*, Bd. 131, S. 2885-2891
- [18] **Baltes W, 2000.** *Lebensmittelchemie 5. vollständig überarbeitete Auflage.* Berlin : Springer Verlag S. 381
- [19] **Beckett ST, 2000.** *The Science of chocolate.* Cambridge UK: the Royal society of Chemistry S. 31-47

- [20] **Belitz H-D, Grosch W und Schieberle P, 2007.** *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 5. vollständig überarbeitete Auflage. Heidelberg: Springer Verlag
- [21] **Bell J-RC, et al. 2000.** *Am J Clin Nutr*, Bd. 71, S. 103-108
- [22] **Bilitewski U, 1998.** "Prinzipien und Einsatzmöglichkeiten von Enzymelektroden" *Analytiker Taschenbuch Band 17*. Berlin : Springer Verlag
- [23] **Birch A, Clark-Lewis J und Robertson A, 1957.** *J Chem Soc*, S. 3586-3594
- [24] **Bolarinwa A, Linseisen J, 2005.** *J Chromatogr B*, Bd. 823, S. 143-151
- [25] **Brachmann S, Rodrigues RB, Marx F, Stehle P, Galensa R, 2006.** *Proc Germ Nutr Soc*, Bd. 8, S. 34
- [26] **Brenes M, et al. 2000.** *J Agric Food Chem*, Bd. 48, 11, S. 5178-5183
- [27] **Bronner WE und Beecher GR, 1995.** *J Chromatogr*, Bd.705, S.247-256
- [28] **Bundesgesetzblatt I (BGBl.I).** s.l. : *Bundesanzeiger Verlag*, 2009. S. 3222
- [29] **Canalon PF, 1999.** *J AOAC Int*, Bd. 82, 1, S. 95-106
- [30] **Carando, S, Teissedre P-L und Cabanis J-C, 1998.** *J Chromatogr B*, Bd. 707, S. 195-201
- [31] **Chankvetadze B, 1997.** *Capillary electrophoresis in chiral analysis*, Chichester, England, John Wiley & Sons
- [32] **Chankvetadze, B, 1997a.** *Review J Chromatogr A*, Bd. 792, S. 269-295
- [33] **Chankvetadze B und Blaschke G, 2001.** *J Chromatogr A*, Bd. 906, S. 309-363
- [34] **Chankvetadze B, Frost M und Blaschke G, 1999.** *Pharmazie in unserer Zeit*, Bd. 28, 4, S. 186-196
- [35] **Cherkaoui S, et al. 2001.** *Electrophoresis*, Bd. 22, S. 3308-3315
- [36] **Chu KO, et al. 2004.** *Anal Chim Acta*, Bd. 510, S. 69
- [37] **Cooper KA, et al. 2007.** *J Agric Food Chem*, Bd. 55, S.2841-2847

- [38] **Counet C und Collins S, 2003.** *J Agric Food Chem*, Bd. 51, S. 6816-6822
- [39] **Crespy V, et al. 2001.** *J Nutr*, Bd. 131, S. 2109-2114
- [40] **Das NP und Sothy SP, 1971.** *Biochem J*, Bd. 125, S. 417-423
- [41] **DIN 32645** Ausgabe 1994-05. (1994) *chemische Analytik; Nachweis-, Erfassungs-, Bestimmungsgrenze; Ermittlung unter Wiederholbedingungen; Begriffe, verfahren, Auswertung*
- [42] **Donovan JL, Crespy V, Manach C, Morand C, Besson C, Scalbert A, Rémésy C, 2001.** *J Nutr*, Bd. 131, S. 1753-1757
- [43] **Donovan JL, et al. 1999.** *J Nutr*, Bd. 129, S. 1662-1668
- [44] **Donovan JL, et al. 2006.** *Free Rad Res*, Bd. 40, 10, S. 1029-1034
- [45] **Dubey N, et al. 2009.** *Asian J Research Chem*, Bd. 2, 1, S. 66-69
- [46] **Durrani AI, et al. 2007.** *J Pharmaceut Biomed anal*, Bd. 45, S. 694-699
- [47] **Ellis C, Yeap FL und Porter L, 1983.** *Phytochem*, Bd. 22, 2, S. 483-487
- [48] **Engelhardt H, Beck W und Schmitt T, 1994.** *Kapillarelektrophorese Methoden und Möglichkeiten*. Braunschweig/Wiesbaden : Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH
- [49] **Engelhardt U und Galensa R, 1997.** *Analytiker Taschenbuch Band 15*. Berlin/Heidelberg : Springer Verlag
- [50] **Erlund I, Alfthan G, Siren H, Ariniemi K, Aro A, 1999.** *J Chromatogr B*, Bd. 727, S. 179-189
- [51] **Fielden PR, et al. 1994.** *Analyst*, Bd. 119, S. 953-958
- [52] **Fillet M, et al. 1996.** *J High resol Chromatogr*, Bd. 19, S. 669-673
- [53] **Fischer T, 2005.** Fachtagung "Gentechnik für Umwelt und Verbraucherschutz". [Online] 2005.
<http://www.lgl.bayern.de/aktuell/veranstaltungen/archiv_2004_2005/doc/gentechnik_fachtagung_oktober05.pdf>
- [54] **Foret F, Krivánková L und Bocek P, 1993.** *"Capillary Zone Electrophoresis"*. Weinheim : Radola BJ (Hrsg.) Electrophoresis Library VCH

- [55] **Forkmann G und Heller W, 1999.** *Biosynthesis of Flavonoids*. 713-748. In: Barton, D, Nakanishi K, Meth-Cohn, O (Hrsg.). *Comprehensive Natural Products Chemistry*. Amsterdam: Elsevier
- [56] **Frazier RA, Ames JM und Nursten HE, 2000.** Cambridge UK : Royal Society of Chemistry
- [57] **Gaffield W und Lundin RE, 1975.** *Bioorg Chem*, Bd. 4, S. 259-269
- [58] **Gamache P, Ryan E, Acworth IN, 1993.** *J Chromatogr*, Bd. 635, S. 143-150
- [59] **Gel-Moretó N, 2003.** Dissertation. *Chirale Trennung von Polyphenolen in Citrus mittels Kapillarelektrophorese (CE) und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)*. Universität Bonn, NRW
- [60] **Gel-Moretó N, Streich R und Galensa R, 2003.** *Electrophoresis*, Bd. 24, S. 2716-2722
- [61] **Gel-Moretó N, Streich R und Galensa R, 2001.** *J Chromatogr A*, Bd. 925, S. 279-289
- [62] **Gerbl U, et al. 2004.** *J Chromatogr B*, Bd. 802, 1, S. 107-113
- [63] **Gotti R, et al. 2006.** *J Chromatogr A*, Bd. 1112, S. 345-352
- [64] **Grimbleby RH und Ntalianas HA, 1961.** *Nature*, Bd. 189, S. 835-836
- [65] **Hackmann RM, et al. 2008.** *Phytochem Rev*, Bd. 7, S. 195-208
- [66] **Harada M, et al. 1999.** *Biosci Biotechnol Biochem*, Bd. 63, 6, S. 973-977
- [67] **Harborn JB (Hrsg), 1988.** *The Flavonoids: Advances in Research since 1980*, London, Chapman and Hall
- [68] **Harborn JB (Hrsg), 1994a.** *The Flavonoids: Advances in Research since 1986*, London, Chapman and Hall
- [69] **Haslam E, et al. 1975.** *Chapman and Hall: London, Proanthos*, Bd. 10, S. 550-553
- [70] **Heiger DN, Kaltenbach P und Sievert H-JP, 1994.** *Elektrophoresis*, Bd. 15, S. 1234-1247
- [71] **Henning SM, et al. 2005.** *J Nutr Biochem*, Bd. 16, S. 610-616
- [72] **Higdon JV und Frei B, 2003.** *Critical Rev Food Sci Nutr*, Bd. 43(1), S. 89-143

- [73] **Hoffstetter-Kuhn S, et al. 1991.** *Electrophoresis Anal Chem*, Bd. 63, S. 1541-1547
- [74] **Holt RR, et al. 2002a.** *Am J Clin Nutr*, Bd. 76(4), S. 798-804
- [75] **Ishizu T, Kintsu K, Yamamoto H, 1999.** *J Phys Chem B*, Bd. 103, S. 8992-8997
- [76] **Jullian C, Miranda S, et al. 2007.** *Bioorg Med Chem*, Bd. 15, S. 3217-3224
- [77] **Keen CL, Holt RR, Oteiza PI, et al. 2005.** *Am J Clin Nutr*, Bd. 81(suppl), S.2985-3035
- [78] **Kennedy JA, et al. 1984.** *Aust J Chem*, Bd. 37, S. 885-892
- [79] **Keogh JB, McInerney, J und Clifton, PM, 2007.** *J Food Sci*, Bd. 72(3), S. S230-S233
- [80] **Kitagawa M, et al. 1987.** *Carbohydr Res*, S. 163 C1
- [81] **Klejdus B, et al. 2004.** *J Chromatogr B*, Bd. 806, S.101-111
- [82] **Kodama S, et al. 2007.** *J Agric Food Chem*, Bd. 55(16), S. 6547-6552
- [83] **Kodama S, et al. 2004.** *Electrophoresis*, Bd. 25, S. 2892-2898
- [84] **Kofink M, 2009.** Enantiomerentrennung von Polyphenolen mittels Kapillarelektrophorese. *Dissertation, Universität Bonn, Bereich Lebensmittelchemie.* Bonn, NRW
- [85] **Kofink M, Papagiannopolous M und Galensa R, 2007.** *Molecules*, Bd. 12, S. 1274-1288
- [86] **Kofink M, Papagiannopoulos M und Galensa R, 2007.** *Eur Food Res Technol*, Bd. 225, S. 569-577
- [87] **Koskela A, et al. 2008.** *J Agric Food Chem*, Bd. 56, S. 7678-7681
- [88] **Koskela A, et al. 2007.** *Clin Chem*, Bd. 53, 7, S. 1380-1383
- [89] **Krause M und Galensa R, 1991a.** *J Chromatogr*, Bd. 588, S. 41-45
- [90] **Krause M und Galensa R, 1990.** *J Chromatogr*, Bd. 514, S. 147-159
- [91] **Krause M und Galensa R, 1991b.** *Chromatographia*, Bd. 32, 1/2, S. 69-72
- [92] **Kuhn R und Hoffstetter-Kuhn S, 1993.** *"Capillary Electrophoresis: Principles and Practice"*. berlin/Heidelberg/New York : Springer Verlag

- [93] **Kuhnle G, et al. 2000.** *Biochem Biophys Res Commun*, Bd. 277, S. 507-512
- [94] **Kuriyama S, 2008.** *J Nutr*, Bd. 138, S. 1548S-1553S
- [95] **Lambert J und Yang C, 2003.** *Mutat Res*, Bd. 523/524, S. 201-208
- [96] **Larcher R, et al. 2008.** *Anal Chimica Acta*, Bd. 609, S. 235-240
- [97] **Lattanzio V, et al. 2001.** *J Agric Food Chem*, Bd. 49, 12, S. 5817-5821
- [98] **Lee M-J, Wang ZY, Li H, et al. 1995.** *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prevention*, Bd.4, S. 393-399
- [99] **Lee M-J, et al. 2000.** *Anal Biochem*, Bd. 279, S. 164
- [100] **Lee MJ, et al. 2002.** *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prevention*, Bd. 11, S. 1025-1032
- [101] **Leenen R, Roodenburg AJ, et al. 2000.** *Eur J Clin Nutr*, Bd. 54(1), S. 87-92
- [102] **Leitzmann C und Watzl B, 2005.** *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*. Stuttgart : Hippocrates Verlag
- [103] **Long H, et al. 2001.** *J Chromatogr B*, Bd. 763, S. 47-51
- [104] **Lotito SB und Fraga CG, 2000.** *Biol Res*, Bd. 33, 2, S. 151
- [105] **Lotito SB und Frei B, 2006.** *Free radical Biol Med*, Bd. 41, S. 1727-1746
- [106] **Lurie IS, et al. 1994.** *Anal Chem*, Bd. 66, S. 4019-4026
- [107] **Ma L, et al. 2007.** *J Chromatogr B*, Bd. 846, S. 139-146
- [108] **Maiani G, et al. 1997.** *J Chromatogr B*, Bd. 692, S. 311-317
- [109] **Manach C, et al. 2001.** *Am J Clin Nutr*, Bd. 81, S. 230-242
- [110] **Marais JPJ, et al. 2006.** The Stereochemistry of Flavonoids. Grotewold, E. (Hrsg.), The Science of flavonoids. Springer Verlag: New York, 1-47
- [111] **Masukawa Y, et al. 2006.** *J Chromatogr B*, Bd. 834, 1-2, S. 26-34
- [112] **Matson WR, et al. 1987.** *Life Sci*, Bd. 41, S. 905-908
- [113] **Matson WR, et al. 1984.** *Clin Chem*, Bd. 30, S. 1477-1488
- [114] **McMurrough I, Baert T, 1994.** *J Inst Brew*, Bd. 100, S. 409-416

- [115] **McMurrrough I, Madigan D, 1996.** *J Agric Food Chem*, Bd. 44, S. 1731-1735
- [116] **Melby MK, et al. 2005.** *J Chromatogr B*, Bd. 826, S. 81-90
- [117] **Mellenthin O und Galensa R, 1999.** *J Agric Food Chem*, S. 594-602
- [118] **Milbury PE; Chen C-Y, Dolnikowski GG, Blumberg JB, 2006.** *J Agric Food Chem*, Bd. 54, S. 5027-5033
- [119] **Miyashita N, Kotani A und Kusu F, 2001.** *Anal Sci*, Bd. 17(suppl), S. a145-a148
- [120] **Monache D, et al. 1972.** *Phytochem*, S. 2333-2335
- [121] **Monagas M, et al. 2003.** *J Agric Food Chem*, Bd. 51, S. 6475-6481
- [122] **Morin P DM, 1993.** *J Chromatogr*, Bd. 628, S. 153-160
- [123] **Müllner C und Sontag G, 1999.** *Fresenius J Anal Chem*, Bd. 364, S. 261-265
- [124] **Natsume M, et al. 2000.** *Biosci Biotechnol Biochem*, Bd. 64, 12, S. 2581-2587
- [125] **Natsume N, Osakabe N und Oyama M, 2003.** *Free radic Biol Med*, Bd. 34, S. 840-849
- [126] **Nicolosi E, et al. 2004.** *Theoretical Appl Genetics*, Bd. 100, 8, S. 1155-1166
- [127] **Oda RP und Landers JP, 1997.** *Handbook of Capillary Electrophoresis 2.Auflage.* s.l. : Landers JP (Hrsg.) Boca Raton: CRC
- [128] **Pálmarsdóttir S und Edholm E-L, 1994.** *J Chromatogr*, Bd. 666, S. 337-350
- [129] **Paologgi F, et al. 2007.** *Plant Physiol*, Bd. 143, S. 504-516
- [130] **Papagiannopoulos M, 2007.** Optimierte Analyse von Flavonoiden mit HPLC-MS. *Dissertation, Universität Bonn, Bereich Lebensmittelchemie.* Bonn, NRW
- [131] **Penalvo JL und Nurmi T, 2006.** *J Pharmaceut Biochem Anal*, Bd. 41, S. 1497-1507
- [132] **Pfister MK-H und Dehne LI, 1999.** *BgVV-Heft 07/1999*
- [133] **Pfister MK-H, et al. 2001.** *Lit Rev BgVV-Heft 03/2001*

- [134] **Pietta P, Gardana C und Mauri P, 1992.** *J High Resolut Chromatogr*, Bd. 15, S. 136-139
- [135] **Piskula MK, Terao J, 1998.** *J Nutr*, Bd. 128, S. 1172-1178
- [136] **Quin B-L, et al. 1996.** *Crit Rev Food Sci Nutr*, Bd. 36, 6, S. 603-627
- [137] **Rechner AR, et al. 2002.** *Free Rad Biolog Med*, Bd. 33, 2, S. 220-235
- [138] **Rein D, et al. 2000.** *J Nutr*, Bd. 130, S. 2109S-2114S
- [139] **Revilla I und Gonzáles-SanJosé ML, 2003.** *Food Chem*, Bd. 80, S. 205-214
- [140] **Richelle M, et al. 1999.** *Eur J Clin Nutr*, Bd. 53, S. 22-26
- [141] **Richelle M, Tavazzi I und Offord E, 2001.** *J Agric Food Chem*, Bd. 49, S. 3438-3442
- [142] **Rios LY, et al. 2002.** *Am J Clin Nutr*, Bd. 76, S. 1106-1110
- [143] **Ritter C, Zimmermann BF, und Galensa R, 2010.** *Anal Bioanal Chem*, Bd. 397, S.723-730
- [144] **Roberts K, et al. 1997.** *J Sci Food Agric*, Bd. 75, S.87-101
- [145] **Roura E, et al. 2007.** *Ann Nutr Metab*, Bd. 51, S. 493-498
- [146] **Rouseff RL, 1988.** In: Nagy S, Attaway JA und Rhodes ME, (Hrsg), *Adulteration of fruit Juices Beverages*, New York, Marcel Dekker, Inc
- [147] **Saint-Cricq de Gaulejac N, Provost C und Vivas N, 1999.** *J Agric Food Chem*, Bd. 47, S. 425-431
- [148] **Scalbert A und Williamson J, 2000.** *J Nutr*, Bd. 130, S. 2073S-2085S
- [149] **Scalbert A, et al. 2002.** *Biomed Pharmacother*, Bd. 56, S. 276-282
- [150] **Schroeter H, Heiss C, et al. 2006.** *PNAS*, Bd. 103(4), S. 1024-1029
- [151] **Schurig V, 2001.** *J Chromatogr A*, Bd. 906, S. 275
- [152] **Schwartz H und Sontag G, 2006.** *J Chromatogr B*, Bd. 838, S. 78-85
- [153] **Serafini M, et al. 1996.** *Eur J Clin Nutr*, Bd. 50(1), S. 28-32
- [154] **Sicoli G, et al. 2005.** *Angew Chem Int Ed*, Bd. 117, S. 4161-4164
- [155] **Smith VK, Ndou TT, Warner IM, 1994.** *J Phys Chem*, Bd. 98, S. 8627-8631

- [156] **Sontag G, Kral K, 1981.** *Fresenius Z Anal Chem*, Bd. 309, S. 109-113
- [157] **Spencer JP, Abd El Mohsen MM und Rice-Evans C, 2004.** *Arch Biochem Biophys*, Bd. 423, S. 148-161
- [158] **Spencer JP, et al. 1999.** *FEBS Lett*, Bd. 458, S. 224-23
- [159] **Spencer JP, et al. 2001.** *Biochem Biophys Res Com*, Bd. 285, S. 588-593
- [160] **Stark T und Hofmann T, 2006.** *J Agric Food Chem*, Bd. 54, S. 9510-9521
- [161] **Stote KS und Baer DJ, 2008.** *J Nutr*, Bd. 138, S. 1578S-1583S
- [162] **Summa C, et al. 2006.** *Eur Food Res Technol*, Bd. 222, S. 368-375
- [163] **Surmann P, 1983.** *Fresenius Z Analy Chem*, Bd. 316, S. 373-381
- [164] **Svendson CN, 1993.** *Analyst*, Bd. 118, S. 123-129
- [165] **Takei H, et al. 1998.** *Electrophoresis Anal Sci*, Bd. 14, S. 1165-1168
- [166] **Tanner G, et al. 2003.** *J Biol Chem*, Bd. 34, S. 31647-31656
- [167] **Terabe S, et al. 1984.** *Anal Chem*, Bd. 56, S. 111-113
- [168] **Tomás-Barberán FA und Clifford MN, 2000.** *J Sci Food Agric*, Bd. 80, S. 1073-1080
- [169] **Tsang C, et al. 2005.** *Brit J Nutr*, Bd. 94, S. 170-181
- [170] **Tscheuschner H-D, 2004.** *Grundzüge der Lebensmitteltechnik.* Hamburg : B.Behr's verlag GmbH & CoKG.
- [171] **Unno T, Sagesaka YM, Kakuda T, 2005.** *J Agric Food Chem*, Bd. 53, S. 9885-9889
- [172] **Vaidyanathan JB und Walle T, 2002.** *Drug Metab Dispos*, Bd. 30, S. 897-903
- [173] **Van het Hof KH, Kivitis GAA, Weststrate JA und Tijburg LBM, 1998.** *Eur J Clin Nutr*, Bd. 52, S. 356-359
- [174] **Vijayakumar C, et al. 2005.** *Ann Nutr Metab*, Bd. 49, S. 189-195
- [175] **Walle T, 2004.** *Free radical Biol Med*, Bd. 36, 7, S. 829-837
- [176] **Wang H und Helliwell K, 2000.** *Food Chem*, Bd. 70, S. 337-344

- [177] **Wätzig H, Degenhardt M und Kunkel A, 1998.** *Electrophoresis*, Bd. 19, S. 2695-2752
- [178] **Wiese S und Kulling SE, 2009.** *Lebensmittelchemie*, Bd. 63, S. 113-144
- [179] **Winkel BSJ, 2006.** *The Science of Flavonoids*. Chapter 3, the Biosynthesis of Flavonoids, S. 71-95, New York: Springer Verlag
- [180] **Wollgast J und Anklam E, 2000.** *Food Res Int*, Bd. 33, S. 423-447
- [181] **Xie D, et al. 2003.** *Science*, Bd. 299, S. 396-399
- [182] **Yan C, Xiu Z, Li X, Hao C, 2007.** *J Mol Graph Model*, Bd. 26, S. 420-428
- [183] **Yáñez JA, Andrews PK und Davies NM, 2007.** *J Chromatogr B*, Bd. 848, S. 159-181
- [184] **Yao LH, et al. 2004.** *Plant Foods hum Nutr*, Bd. 59:3, S. 113-122
- [185] **Yue H, et al. 2009.** *Inter J Pharmaceut*, Bd. 375, S. 33-40
- [186] **Zhao F, Zhang X und Gan Y, 2004.** *J Chromatogr A*, Bd. 1055, S. 109-114
- [187] **Zimmermann BF, Galensa R, 2006.** *Eur Food Res Technol*, Bd. 24, S. 385-393
- [188] **Zimmermann BF, et al. 2009.** *J Chromatogr B*, Bd. 877, S. 823-826