

Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften (IEL)

Fachbereich Lebensmittelchemie

Analyse technologisch bedingter Veränderungen phenolischer
Verbindungen in Kakao und Kakaoprodukten mit LC-MS und
Kapillarelektrophorese

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des Grades

Doktor der Ernährungs- und Haushaltswissenschaft
(Dr.oec.troph.)

der

Landwirtschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt am 22. Juli 2013

von

Lisa Kothe

aus Köln

Referent: Prof. Dr. Rudolf Galensa

Korreferentin: Prof. Dr. Sabine Ellinger

Tag der mündlichen Prüfung: 20.09.2013

Erscheinungsjahr: 2013

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung.....	iv
Abstract	vi
Veröffentlichungen	viii
1 Theoretische Grundlagen	1
1.1 Kakao und Kakaoerzeugnisse.....	1
1.1.1 Geschichte und Konsum.....	1
1.1.2 Anbau, Botanik und Wirtschaft.....	2
1.1.3 Kakaoverarbeitung	3
1.2 Phenolische Verbindungen in Kakao	8
1.2.1 Flavanole	9
1.2.2 <i>N</i> -Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren	13
1.2.3 Quercetinglykoside.....	14
1.3 Bioverfügbarkeit phenolischer Verbindungen aus Kakao	15
1.4 Potentielle physiologische Effekte im Menschen.....	18
2 Ergebnisse und Diskussion.....	22
2.1 Probenaufarbeitung und Analytik	22
2.1.1 Kakaovermahlung	23
2.1.2 Beschleunigte Lösungsmittlextraktion	24
2.1.3 Automatisierte Festphasenextraktion	28
2.1.4 Reproduzierbarkeit der Probenaufarbeitung	33
2.1.5 Quantifizierung.....	34
2.1.5.1 Flüssigchromatographie mit UV-DAD	34
2.1.5.2 Enantioselektive Trennung der Catechine mit Kapillarelektrophorese	36
2.1.5.3 Enantioselektive Trennung der Catechine mit Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie	37
2.2 LC-MS-Untersuchung des Substanzprofils fermentierter Kakaobohnen	39
2.2.1 Ergebnisse der Analyse mit Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz- und Ionenfallen-Massenspektrometrie.....	42
2.2.1.1 Flavanole und Flavanolglykoside	44
2.2.1.2 <i>N</i> -Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren.....	64
2.2.1.3 Quercetin und Quercetinglykoside	71
2.2.1.4 Anthocyane	72
2.3 Einfluss der Verarbeitung auf phenolische Verbindungen in Kakao	74
2.3.1 Unfermentierte und fermentierte Kakaobohnen.....	74
2.3.1.1 Fazit der unfermentierten und fermentierten Kakaobohnen	79
2.3.2 Kakaoröstung	80

Inhaltsverzeichnis

2.3.2.1	Stabilitätsvergleich von Flavanolen, <i>N</i> -Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetinglykosiden	81
2.3.2.2	Epimerisierung von dimeren und trimeren Procyanidinen	86
2.3.2.3	Röstungen verschiedener Temperatur-Zeit-Kombinationen	91
2.3.2.4	Röstungen verschiedener Kakaobohnenchargen	94
2.3.2.5	Fazit der Kakaoröstung	96
2.3.3	Schokoladenherstellung	98
2.3.3.1	Fazit der Schokoladenherstellung	99
2.3.4	Alkalisierung von Kakao	99
2.3.4.1	Fazit der Alkalisierung von Kakao	104
2.4	Einfluss der Konzentratherstellung auf Flavanoglykosid-Diastereomere in Orangensäften	105
3	Zusammenfassung und Ausblick	111
4	Material und Methoden	113
4.1	Probenmaterial	113
4.1.1	Kakaoproben	113
4.1.2	Orangensäfte und Konzentrate	114
4.2	Chemikalien und weitere Materialien	114
4.3	Methoden und Geräte	116
4.3.1	Kakaovermahlung	116
4.3.2	Beschleunigte Lösungsmittlextraktion	116
4.3.2.1	ASE-Parameter zur Entfettung der Kakaoproben	118
4.3.2.2	Kakaovermahlung	118
4.3.2.3	Extraktionslösungsmittel	118
4.3.2.4	Extraktionszeit	119
4.3.2.5	Extraktionszyklen	119
4.3.2.6	Extraktionsmethode für die Kakao-Verarbeitungsproben	119
4.3.3	Automatisierte Festphasenextraktion	120
4.3.3.1	Verschiedene Kartuschenmaterialien und Elutionsmittel	120
4.3.3.2	Polyamid - Kartuschenkapazität	121
4.3.3.3	Polyamid - Maximal möglicher Acetongehalt in der Probenlösung	121
4.3.3.4	Polyamid - Elutionsvolumina	122
4.3.3.5	Wiederfindung	123
4.3.4	Probenaufarbeitung der Kakao-Verarbeitungsproben	123
4.3.5	Probenaufarbeitung Orangensäfte und Konzentrate	124
4.3.6	Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie	125
4.3.6.1	HPLC-UV-DAD	125
4.3.6.2	HPLC-UV-DAD-Ionenfallen-Massenspektrometrie	126

Inhaltsverzeichnis

4.3.6.3	HPLC-UV-DAD-Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometrie	128
4.3.6.4	UHPLC-UV-DAD-Triple-Quadrupol-MS	129
4.3.7	Kapillarelektrophorese	130
4.3.7.1	Enantiomerentrennung der Catechine in Kakao und Kakaoprodukten.....	130
4.3.7.2	Diastereomerentrennung der Flavanoglykoside in Orangenprodukten ..	130
Anhang	131
A1:	Literaturübersicht phenolischer Verbindungen in Kakao	131
A2:	Abbildungen - Probenaufarbeitung.....	134
A3:	FT-ICR-MS Massenspuren	136
A4:	Abbildungen - Anthocyane	153
A5:	Kakao-Verarbeitungsproben	154
A6:	Abbildungen und Tabellen der Kakao-Verarbeitungsproben.....	158
Abkürzungen	173
Abbildungsverzeichnis	175
Tabellenverzeichnis	179
Literaturverzeichnis	182

Kurzfassung

Kakao und Kakaoprodukte zeichnen sich durch besonders hohe Gehalte an phenolischen Verbindungen aus. Diese sind insbesondere geprägt von monomeren (Catechine) und oligomeren Flavanolen (Procyanidine). Der Verzehr von Kakaoprodukten wird mit diversen positiven physiologischen Effekten auf den menschlichen Organismus verbunden, welche meistens in Bezug zum Herz-Kreislauf-System stehen. In dieser Hinsicht werden zahlreiche experimentelle Studien an Mensch und Tier durchgeführt. Zudem wird mit den positiven Effekten von Kakao vielfach geworben. Durch die technologischen Prozesse bei der Kakaoverarbeitung wird das Spektrum der phenolischen Verbindungen stark verändert. Die Veränderungen beinhalten Konzentrationsänderungen und strukturelle Modifikationen, wodurch möglicherweise ein Einfluss auf die Bioverfügbarkeit der betreffenden Substanzen resultiert. Die Zusammenhänge zwischen der Prozessführung und den Veränderungen der phenolischen Verbindungen sind noch wenig untersucht und waren Forschungsziel dieser Arbeit.

Ein fermentierter Kakao wurde mit zwei verschiedenen massenspektrometrischen Systemen (Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz- und Ionenfallen-Massenspektrometrie) analysiert, um die Komplexität des gesamten Spektrums an phenolischen Verbindungen aufzuzeigen. Die Abhängigkeit der Veränderungen der phenolischen Verbindungen von den technologischen Parametern wurde in verschiedenen Verarbeitungsstufen von Kakao für drei Substanzgruppen (Flavanole, *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetinglykoside) mit Flüssigchromatographie und Kapillarelektrophorese analysiert. Dafür wurden im Technikumsmaßstab hergestellte Proben von Kakaoröstungen verschiedener Temperatur-Zeit-Kombinationen und Proben einer Schokoladenherstellung untersucht. Weitere Proben waren unfermentierte und fermentierte Kakaobohnen sowie Kakaopulver unterschiedlicher Alkalisierungsgrade. Dabei sollten die jeweils kritischen Prozessschritte identifiziert und Unterschiede in der Stabilität (Konzentrationsänderung, Deoligomerisierung, Epimerisierung), innerhalb und zwischen den verschiedenen Verbindungsklassen, aufgezeigt werden. Die Untersuchung der Epimerisierungsreaktion der Catechine war dabei von besonderem Interesse und wurde auf weitere Substanzen ausgeweitet. Dahingehend wurde eine Auswahl der Röstproben auf mögliche Epimerisierungsprodukte von Procyanidinen mit UHPLC-Triple-Quadrupol-Massenspektrometrie analysiert.

Die massenspektrometrische Analyse des Spektrums phenolischer Verbindungen von fermentierten Kakaobohnen aus Java führte zur Charakterisierung von insgesamt 216 verschiedenen Substanzen. Insbesondere in der Gruppe der Flavanole (195 Verbindungen) konnten diverse Substanzen aus der Literatur bestätigt aber auch neue vorläufig identifiziert werden. Das Vorhandensein von Prodelphinidinen, Propelargonidinen, Ethyl(epi)catechinen und dimeren bis trimeren Flavanol-C-Glykosiden konnte dabei erstmals in Kakao aufgezeigt

werden. In dieser Hinsicht könnten weitere Analysen klären, ob diese Substanzen für Kakaobohnen bestimmter Sorten oder Herkünfte spezifisch sind.

In den verschiedenen Proben der Kakaoverarbeitung wurden zwischen den phenolischen Substanzklassen unterschiedliche Stabilitäten in Bezug auf die Verarbeitungsprozesse festgestellt. Dabei zeigen Flavanole, sowohl in qualitativer als auch in quantitativer Hinsicht, die größten Veränderungen. Der Polymerisationsgrad von Flavanolen verändert sich zugunsten geringer polymerisierter Oligomere und Monomere. Zudem wurden für dimere und trimere Procyanidine Profilverschiebungen, analog zur Epimerisierung der Catechine, festgestellt. Damit ist auch bei Procyanidinen von einer Epimerisierung auszugehen. Die Deoligomerisierungen und Epimerisierungen können das Flavanolprofil im resultierenden Kakaoprodukt maßgeblich verändern. Der Einfluss dieser Veränderungen auf die Bioverfügbarkeit dieser Substanzen ist unklar und bedarf weiterer Forschung.

Die Untersuchung der verschiedenen Kakaoröstungen zeigt, dass das Ausmaß der Epimerisierung beeinflusst werden kann. Die verschiedenen Röstungen weisen darauf hin, dass neben der Wahl der Röstparameter auch die Auswahl der Kakaobohnen zu großen Unterschieden in dieser Hinsicht führen kann. Auch die Konzentrationsänderungen der Flavanole können bei verschiedenen Kakaobohnen sehr unterschiedlich ausfallen. So wiesen beispielsweise die Kakaobohnen von der Elfenbeinküste kaum Verluste in den analysierten Flavanolen auf. Zur Identifizierung ursächlicher Faktoren sind weitere Untersuchungen mit einer größeren Anzahl an vollständig charakterisierten Proben (z.B. Herkunft, Sorte, chemische Zusammensetzung) notwendig.

N-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren zeigen durch die Kakaoverarbeitung auch Verluste, jedoch bleiben die Konzentrationsverhältnisse der Substanzen zueinander (Substanzprofil) während der Röstung, der Schokoladenherstellung und der Alkalisierung unverändert. So ist mit dieser Verbindungsklasse möglicherweise eine Prüfung auf Authentizität von Kakaoprodukten, z.B. in Hinblick auf die Auslobung einer bestimmten Herkunft, möglich.

Abstract

Cocoa and cocoa products are distinguished by particularly high levels of phenolic compounds. These are mainly characterized by monomeric (catechins) and oligomeric flavanols (procyanidins). The consumption of cocoa products is associated with various positive physiological effects on the human organism, which are mostly related to the cardiovascular system. In this regard, numerous experimental studies are carried out on humans and animals. Cocoa is also often advertised for its positive effects. Due to the technological cocoa processing the composition of the phenolic compounds is greatly altered. The alterations include changes in concentration and structural modifications, which may have an influence on the bioavailability of the substances concerned. The relationships between the process parameters and the alterations of the phenolic compounds are still poorly studied and were research objective of this work.

A fermented cocoa was analyzed using two different mass spectrometry systems (Fourier-transform ion cyclotron resonance and Ion trap mass spectrometry) to demonstrate the complexity of the phenolic compounds. The dependency between the changes and the technological parameters was analyzed in various stages of the cocoa processing for three classes of compounds (flavanols, *N*-phenylpropenoyl-L-amino acids, and quercetin glycosides) by liquid chromatography and capillary electrophoresis. Therefore, in pilot plant scale prepared samples of roastings with different temperature-time combinations and samples of chocolate production were examined. Additional samples were fermented and unfermented cocoa beans and cocoa powders with different degrees of alkalization. Critical process steps and differences in stability (changes in concentration, deoligomerization, epimerization), within and between the classes of compounds, should be identified. The investigation of the epimerization of the catechins was of particular interest and has been extended to other substances. Therefore, a selection of the roasting samples was examined by UHPLC-triple quadrupole mass spectrometry in order to detect possible epimerization products of procyanidins.

The mass spectrometric analysis of the phenolic compounds from fermented cocoa beans from Java, led to the characterization of a total of 216 different substances. In particular in the group of flavanols (195 compounds) several components, which are already described in literature, and also new compounds could be tentatively identified. The presence of prodelphinidins, propelargonidins, ethyl(epi)catechins and dimeric to trimeric flavanol-C-glycosides could be shown in cocoa for the first time. In this regard, further analysis could clarify whether these substances are specific to certain varieties of cocoa beans or origins.

Different stabilities between the phenolic compound classes in relation to the processing were determined by analyzing the various samples of the cocoa processing. Flavanols show the biggest changes, in both qualitative and quantitative terms. The degree of polymerization of

flavanols changed in favor of less polymerized oligomers and monomers. In addition, profiles of dimeric and trimeric procyanidins revealed same shifts (decreases and increases in concentration) similar to the epimerization of the catechins. Thus, epimerization is also assumed for procyanidins. Deoligomerizations and epimerizations can significantly alter the profile of flavanols in the resulting cocoa products. The impact of these changes on the bioavailability of these compounds is unclear and requires further research.

The study of various cocoa roasting samples shows that the amount of epimerization can be influenced. The different roastings indicate that, beside the choice of the roasting parameters the cocoa bean selection can lead to large differences in this regard. The changes in flavanol concentration can also vary between different cocoa beans. For example, for the cocoa beans from the Ivory Coast no losses of the analyzed flavanols could be detected. To identify causing reasons further studies with higher sample amounts of fully characterized cocoa beans (e.g. origin, variety, chemical composition) is needed.

The contents of *N*-phenylpropenoyl-L-amino acids are also reduced due to the cocoa processing, but the concentration ratios of the substances remains unchanged during roasting, chocolate production and the alkalization process. This class of compounds may be used to proof authenticity of cocoa products, with regard to the awarding of a certain origin.

Veröffentlichungen

Einige Ergebnisse aus dieser Arbeit wurden bereits in folgenden Beiträgen veröffentlicht:

Zeitschriftenbeiträge

Kothe, L.; Zimmermann, B.F.; Galensa, R.: Temperature influences epimerization and composition of flavanol monomers, dimers and trimers during cocoa bean roasting, *Food Chemistry*, 2013, 141: 3656-3663

Boner, M.; Färber, H.; Galensa, R.; Kothe, L.; Marx, N.; Memmesheimer, A.; Rieth, W.; Sprenger, C.; Wollseifen, H.R.: Entwicklung einer Datenbank zur Wareneingangskontrolle von Blutorangendirektsäften und weiteren Orangensaftprodukten, *Flüssiges Obst*, 2012, 12: 470-477

Theisen, S.; Hänsch, R.; Kothe, L.; Leist, U.; Galensa, R.: A fast and sensitive HPLC method for sulfite analysis in food based on a plant sulfite oxidase biosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 26: 175-181

Posterbeiträge auf Tagungen

Kothe, L.; Santiago-Schübel, B.; Thiele, B.; Galensa, R.: Flavonols in Cocoa are more complex than often thought, *ISANH Polyphenols*, Bonn, 6.-7. Juni, 2013

Kothe, L.; Wagner, N.; Zimmermann, B.F.; Galensa, R.: Cocoa roasting trials show evidence for epimerization reaction of procyanidin dimers, *Chocotec*, Köln, 4.-6. Dezember, 2012

Kothe, L.; Mechler, K.; Galensa, R.: Identifizierung von Polyphenolen aus Kakao mittels fraktionierter Festphasenextraktion und HPLC-UVDAD-MSⁿ, Jahrestagung des Regionalverbandes Nordrhein-Westfalen der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Wuppertal, 23. März 2011

Mechler, K.; Kothe, L.; Galensa, R.: Isolierung von Procyanidinen aus Kakao mittels High-Speed Counter-Current Chromatography, Jahrestagung des Regionalverbandes Nordrhein-Westfalen der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Wuppertal, 23. März 2011, Abstract: *Lebensmittelchemie*, 2011, 65/5: 141

Kothe, L.; Ritter, C.; Galensa, R.: Flavanole und ihre Veränderungen bei der technologischen Verarbeitung zu Kakaoprodukten, 39. Deutscher Lebensmittelchemiker Tag, Stuttgart, 20.-22. September 2010, Abstract: *Lebensmittelchemie*, 2010, 65/2: 33

Kothe, L.; Ritter, C.; Galensa, R.: Welchen Einfluss hat die Röstung auf die Flavanole im Kakao?, Jahrestagung des Regionalverbandes Nordrhein-Westfalen der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Münster, 17. März 2010, Abstract: *Lebensmittelchemie*, 2010, 64/5: 141

Theisen S.; Kothe L.; Galensa R.: HPLC-IMER as a sensitive method for analysis of SO₂ in fruit juices, 27th International Symposium on Chromatography, Münster, 21.-25. September 2009

1 Theoretische Grundlagen

1.1 Kakao und Kakaoerzeugnisse

1.1.1 Geschichte und Konsum

Der Kakaobaum (*Theobroma cacao* L., Malvaceae) stammt ursprünglich aus den feuchten Tropen Südamerikas und findet sich heute entlang des gesamten Äquatorgürtels (Colombo et al., 2012). Theobromin- und Koffeinrückstände in Gefäßen von frühen mesoamerikanischen Kulturen datieren erste Nutzungen von Kakao auf etwa 1800 bis 1000 vor Christus zurück (Powis et al., 2011).

Im 19. Jahrhundert machte die Kakaoverarbeitung in Europa große Fortschritte, angefangen mit der Entwicklung der Kakaopresse im Jahr 1828 durch den Niederländer van Houten. Ebenfalls in den Niederlanden entwickelt wurde die Alkalisierung von Kakao (auch als Dutching bekannt) zur besseren Dispergierbarkeit von Kakaopulver und zur Einstellung von Farbe und Aroma. Eine weitere wichtige Erfindung zur Kakaoveredelung folgte im Jahr 1880 mit der Conche von Rodolphe Lindt aus der Schweiz (Beckett, 2008). Schließlich kamen erste Schokoladenriegel von Fry's, Nestlé und Lindt auf den Markt und Kakaoprodukte wurden Bestandteil der westlichen Ernährung (McShea et al., 2011). Im Jahr 2008 wurden in Deutschland pro Person durchschnittlich etwa 9,3 kg Schokoladenwaren konsumiert (Rhosius et al., 2010), womit der Verzehr von Schokolade maßgeblich zur Aufnahme phenolischer Verbindungen (insbesondere Flavanole) beiträgt (Ding et al., 2006).

Bereits zwischen dem 16. und dem frühen 20. Jahrhundert wurden über 100 Manuskripte zur medizinischen Nutzung von Kakao veröffentlicht (Dillinger et al., 2000). Heute wird die Ursache für den Gesundheitsnutzen meist mit den phenolischen Inhaltsstoffen von Kakao und Kakaoprodukten verbunden. Vor dem Hintergrund der positiven Effekte von flavanolreichen Kakaoprodukten entwickeln einige Firmen spezielle Verfahren zum Erhalt bzw. zur Steigerung des Polyphenolgehaltes (Acticoa von Barry Callebaut, Cocopro von Mars, Cocaox von Natraceutical). Diese Produkte werden neben dem Verkauf auch für Tier- und Humanstudien zur Wirkungsprüfung von Kakao eingesetzt (Bisson et al., 2008; Cienfuegos-Jovellanos et al., 2009; Holt et al., 2002).

Fermentierte und getrocknete Kakaosamen enthalten neben hohen Polyphenolgehalten weitere ernährungsphysiologisch bedeutende Komponenten wie Fettsäuren (~54%), Proteine (~11%), Mineralstoffe (Mg, Cu, K, Fe), Ballaststoffe und Methylxanthine (Theobromin 1,2%, Koffein 0,2%) (Belitz et al., 2008a; Katz et al., 2011).

1.1.2 Anbau, Botanik und Wirtschaft

Die Anbauregionen des Kakaobaumes erstrecken sich in Gebieten zwischen 20° nördlicher und 20° südlicher Breite entlang des Äquators in Höhen bis 700 m. Der Kakaobaum benötigt ein feucht warmes Klima mit Niederschlägen von 1500 bis 2500 mm und Temperaturen um die 27 °C im Jahresmittel (Beckett, 2008).

Für die Herstellung von Kakao- und Schokoladenprodukten werden hauptsächlich die Varietäten Criollo, Forastero und Trinitario verwendet (Colombo et al., 2012). Die Kakaotypen unterscheiden sich in Erträgen und Aroma. Samen des Criollo-Typ haben eine weiße Farbe und ein besonderes Aroma, sind jedoch weniger ertragreich und anfälliger für Krankheiten. Der Forastero gilt als robust und liefert hohe Erträge, seine Samen sind violett mit einem kräftigen Geschmack (Beckett, 2008).

Der Kakaobaum wird sowohl in Mischkulturen mit Bananen- oder Kokospalmen zum Schutz vor Sonne und Wind, als auch auf Plantagen in Monokultur angebaut (Lieberei, 2006). Ein Baum entwickelt in seiner Hauptertragszeit etwa 20 bis 50 Früchte, die in der Regel zweimal jährlich über 2-4 Wochen hinweg (da nicht alle Kakaoschoten zur gleichen Zeit reif sind) geerntet werden (Beckett, 2008).

Die Kakaoschote ist 15-25 cm lang und 7-10 cm dick (Belitz et al., 2008a). Je nach Kakaotyp variiert die Schote in Farbe, Form und Oberfläche (Abbildung 1.1). Unter der harten Fruchtschale befindet sich das süß-säuerliche Fruchtmus (10% Zucker, 1% Pektin, 1-2% Zitronensäure) und darin eingebettet etwa 25-50 Kakaosamen (Bernaert et al., 2011).



Abbildung 1.1: Kakaoschoten verschiedener Kakaotypen (modifizierte Darstellung nach Rhosius et al., 2010).

Kakaosamen sind oval, abgeflacht, etwa 2 cm lang und 1 cm breit. Darin enthalten ist das Keimwürzelchen, umgeben von zwei Keimblättern, den Kotyledonen (Belitz et al., 2008a). Kotyledonen bestehen aus zwei Arten von Zellen, den Lipid-Protein- und den Polyphenol-speicherzellen, letztere machen etwa 10% des Kakaosamens aus und sind gleichmäßig darin

verteilt (Bernaert et al., 2011). Je nach Kakaotyp ist das Innere der Kakaobohne weiß, graubraun bis tief violett gefärbt, bedingt durch Unterschiede in den gespeicherten Polyphenolen und insbesondere durch die Anthocyane (Belitz et al., 2008a).

Hauptproduzenten sind die westafrikanischen Länder. Im Erntejahr 2009/2010 produzierten allein die Elfenbeinküste (1.242.000 t) und Ghana (632.000 t) 34% und 17% des weltweiten Kakaorohstoffes (3.631.000 t) (Matissek et al., 2012). Der als Konsumkakao eingeordnete Kakaotyp Forastero macht davon mehr als 90% der gesamten Welternte aus (Tomás-Barbéran et al., 2011). Die Kakaoproduktion auf den westafrikanischen Plantagen ist, mit durchschnittlich 3-4 Hektar Größe und einer Produktionsmenge von etwa 1 Tonne pro Jahr, kleinbetrieblich organisiert. Vor Ort werden die Ernten zu größeren Chargen vermischt und an die Hauptimporteure in Europa und Nordamerika verkauft. Zwischen den Produzenten und den Importeuren besteht nur wenig Austausch und es fehlen einheitliche Standards, weshalb die Rohware Kakao stark in ihrer Qualität variieren kann (Saltini et al., 2013).

Entlang der Äquatorzone sind mehr als 1000 Genotypen zu finden, größtenteils Kreuzungen aus Forastero und Trinitario, sodass auch auf den Plantagen meist Mischungen verschiedener Varietäten angebaut werden. Dies führt dazu, dass Kakaobohnen meist nicht unter ihrer Sortenbezeichnung in den Handel gelangen, sondern nach ihrer Herkunft bezeichnet werden (Bernaert et al., 2011). Ebenfalls nach Herkunftsland wird in Edel- und Konsumkakao unterschieden (Edelkakaoanbauer sind z.B. Ecuador, Indonesien, Venezuela; Konsumkakaobauer sind z.B. Elfenbeinküste und Ghana) (ICCO, 2010). Als Grundlage der Einteilung in Edel- bzw. Konsumkakao wird das Kakaoaroma angegeben, welches hauptsächlich durch die Auswahl des Kakaotyps beeinflusst wird, aber auch durch variierende Umweltfaktoren und Unterschiede in den Nacherntebehandlungsverfahren. Es gibt auch neuere Trends für Kakaoprodukte, die eine bestimmte Plantagenherkunft mit besonderer Qualität und Sorte auszeichnen (Lieberei, 2006).

1.1.3 Kakaoverarbeitung

FrISCHE unfermentierte Kakaobohnen sind adstringierend und bitter. Das kakaotypische Aroma entfaltet sich erst durch Fermentation, Trocknung und Röstung. Die grundlegenden Verarbeitungsprozesse bis hin zu Schokolade oder Kakaopulver sind bekannt. Technologische Besonderheiten, insbesondere zur Schokoladenherstellung, sind jedoch Betriebsinterna (McShea et al., 2011). Die Abfolge der einzelnen Prozessschritte der Kakaoverarbeitung kann variieren, so ist z.B. die Röstung von ganzen Bohnen, von Kakaonibs oder von Kakaomassen möglich. Gleiches gilt für die Alkalisierung von Kakao.

Fermentation und Trocknung

Die Fermentation von Kakao ist essentiell zur Entwicklung des typischen Kakaoaromas bzw. von Aromavorstufen. Nach der Ernte werden die Kakaofrüchte geöffnet und die Samen mit Resten von Schale und Pulpa aufgeschichtet. Durch die vorhandenen Mikroorganismen (Hefen, Essig- und Milchsäurebakterien) kommt es zur spontanen Fermentation. Ein optimaler Ablauf der Fermentation ist entscheidend. Sowohl unreife und überreife Früchte, als auch Über- oder Unterfermentation beeinträchtigen das Kakaoaroma. Die Fermentation dauert, abhängig vom Kakaotyp oder der Fermentationsmethode, zwei bis sieben Tage (Bernaert et al., 2011).

Zunächst liegt der pH-Wert aufgrund des Zitronensäuregehaltes der Pulpa bei etwa 3,9. Das saure Milieu und das anaerobe Klima begünstigen das Wachstum von Hefen. Die Hefen wandeln den Zucker der Pulpa zu Ethanol und CO₂ um und sekretieren pektinolytische Enzyme, wodurch sich die Pulpa verflüssigt und ein aeroberes Milieu entsteht (Schwan, 1998). Die Anzahl der Milchsäurebakterien steigt, welche gegenüber Ethanol und niedrigen pH-Werten tolerant sind. Die Milchsäurebakterien wandeln Zucker und Zitronensäure um (Camu et al., 2007). Zudem vermehren sich Essigsäurebakterien, diese oxidieren Ethanol zu Essigsäure und weiter zu CO₂ und Wasser. Durch die exotherme Reaktion steigen die Temperaturen auf etwa 45-55 °C an und der Kakaosamen stirbt ab (Belitz et al., 2008a; Bernaert et al., 2011). Die Essigsäure und die erhöhten Temperaturen führen zur Zerstörung der Zellstrukturen, wodurch Polyphenole aus den Speicherzellen austreten. Die Polyphenoloxidaseaktivität wird bereits zu Beginn der Fermentation stark reduziert, dennoch ist die verbleibende Aktivität ausreichend, um einen Teil der Polyphenole zu oxidieren (Hansen et al., 1998; Saltini et al., 2013). Die Polyphenoloxidase oxidiert Flavanole und Anthocyane zu hochreaktiven Chinonen, die wiederum kondensieren untereinander und mit Polyphenolen, Proteinen oder Peptiden zu sogenannten Phlobaphenen. Diese enzymatischen und nicht-enzymatischen Prozesse bewirken eine Bräunung und Milderung des bitteren und adstringierenden Geschmacks der Kakaobohne (Hansen et al., 1998). Neben den ablaufenden Oxidations- und Kondensationsprozessen wird ein großer Teil des Polyphenolverlustes während der Fermentation auf die abfließenden Zellsäfte zurückgeführt (Hansen et al., 1998). Das Ausmaß der Polyphenolreduzierung im Fermentationsprozess variiert erheblich mit 60 bis 90% und ist hauptsächlich abhängig von der Fermentationsdauer (Aikpokpodion und Dongo, 2010; Elwers et al., 2009; Kim und Keeney, 1984).

Die Fermentation und die Oxidationsprozesse werden mit der anschließenden Trocknung auf einen Wassergehalt von 6-8% gestoppt. Nach der Trocknung erfolgen die Reinigung von Fremdkörpern (mit Aspirateuren und Magnetbändern) und das Abfüllen der nun lager- und transportfähigen Kakaobohnen (Belitz et al., 2008a). In der Kakaoverarbeitung werden verschiedene Chargen von Kakaobohnen vermischt, um eine gleichbleibende Qualität im Endprodukt zu erhalten (Saltini et al., 2013).

Röstung und Schalenabtrennung

Die Röstung von Kakao ist ein wichtiger Prozessschritt zur Ausbildung des charakteristischen Aromas. Durch die Röstung, mit der dabei ablaufenden Maillard-Reaktion, entstehen eine Vielzahl von Verbindungen, die für die braune Farbe und die Aromen des Röstens verantwortlich sind. An dieser nicht-enzymatischen Bräunung sind hunderte von Reaktionen beteiligt, die zu unzähligen Aromakomponenten führen (Beckett, 2008; Ziegleder, 1991). Während der Fermentation wurde ein Großteil dieser Aromavorstufen gebildet, z.B. freie Aminosäuren und Peptide aus dem Proteinabbau durch Proteinasen (Hansen et al., 1998).

Die Temperatur bei der Röstung entfernt auch geschmacklich unerwünschte flüchtige Verbindungen (z.B. Essigsäure von der Fermentation). Neben der Aromabildung hat die Röstung zudem die Ziele, den Wassergehalt weiter zu senken (<3%) und Mikroorganismen abzutöten (Belitz et al., 2008a).

Je nach Hersteller, Kakaotyp oder resultierendem Produkt werden ganze Bohnen, Kakaonibs oder Kakaomassen geröstet, dafür werden Chargenröster oder kontinuierliche Röster verwendet (Beckett, 2008). Eine thermische Vorbehandlung in Form einer kurzen Infrarotröstung (~160 °C/~2 min) kann vor der eigentlichen Röstung ebenfalls eingesetzt werden. Dadurch löst sich die Schale von den Kotyledonen und kann anschließend leicht abgetrennt werden. Das Abtrennen der Schalen und des Keimwürzelchens erfolgt nach dem Brechen durch Ausnutzen des Dichteunterschiedes von Schale und Kotyledonen, z.B. in Rüttelmaschinen oder durch einen starken Luftstrom (Beckett, 2008). Die Röstung ganzer Kakaobohnen hat den Nachteil, dass Größenunterschiede zwischen den Bohnen zu abweichenden Röstgraden führen können. Die Röstung von Nibs oder Massen führt demnach zu einem einheitlicheren Röstergebnis. Angaben zu Dauer und Temperatur der Kakaoröstung variieren stark, mit Temperaturen von 120-150 °C für 5-120 min (Krysiak et al., 2013; Wollgast und Anklam, 2000). Die jeweils angewendete Kombination von Rösttemperatur und -zeit hängt von vielen Faktoren ab, z.B. vom Kakaotyp (Forastero wird in der Regel stärker geröstet als Criollo), dem Kakaomaterial (Bohnen, Nibs oder Masse) und dem resultierenden Endprodukt (dunkle Schokoladen werden meist stärker geröstet als Milkschokoladen) (Wollgast und Anklam, 2000).

Phenolische Verbindungen und insbesondere Flavanole sind hitzeempfindliche Komponenten, aus diesem Grund führt die Röstung zu einer weiteren Reduzierung der Polyphenolgehalte (Mazor Jolić et al., 2011). Da Röstungen mit sehr unterschiedlichen Temperatur- und Zeit-Kombinationen durchgeführt werden, variieren die Polyphenolverluste, mit Angaben zwischen 30 bis 70%. Teilweise werden auch steigende Konzentrationen durch die Röstung beschrieben (Hurst et al., 2011; Mazor Jolić et al., 2011; Payne et al., 2010).

Schokoladenherstellung

Nach dem Rösten und der Schalenabtrennung werden die Bohnen bzw. Nibs zur Kakaomasse zermahlen. Durch mehrere Mahlvorgänge wird dabei die Korngröße auf 20-30 µm verringert. Die Korngröße ist entscheidend, um einen sandigen Eindruck der Schokoladenprodukte zu vermeiden. Die feine Vermahlung zerstört die Zellwände, die Kakaobutter tritt aus und eine homogene, fließfähige Masse entsteht (Beckett, 2008). Die Kakaomasse wird je nach Schokoladensorte zu unterschiedlichen Anteilen mit weiteren Zutaten vermischt und erneut zerrieben. Zutaten neben der Kakaomasse sind: Kakaobutter, Zucker, Lecithin (0,1-0,3%) und gegebenenfalls Milchpulver für Milch-Schokoladen (Abbildung 1.2) (Roth, 2005). Lebensmittelrechtliche Vorschriften für den Mindestgehalt an Gesamtkakaotrockenmasse sind 35% für Schokoladen und 25% für Milch-Schokoladen. In Bezug auf den Flavanolgehalt ist jedoch die fettfreie Kakaotrockenmasse ausschlaggebend, die für Schokoladen auf mindestens 14% und für Milch-Schokoladen auf mindestens 2,5% festgelegt ist (KakaoV, 2003).

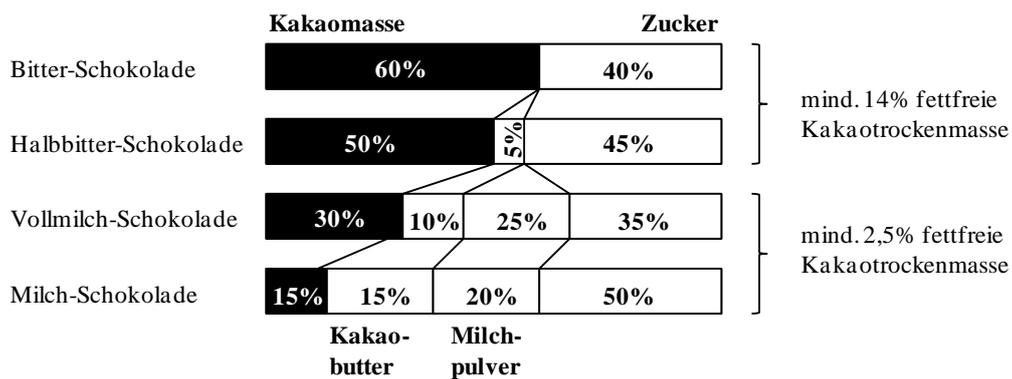


Abbildung 1.2: Zusammensetzung verschiedener Schokoladentypen (nach Roth, 2005 und KakaoV, 2003).

Nach dem Vermischen der Zutaten folgt das Conchieren, dabei wird die Schokoladenmasse unter ständigem Rühren und Reiben in Geschmack und Textur veredelt. Unerwünschte flüchtige Verbindungen und die Restfeuchte werden entfernt (Wollgast und Anklam, 2000). Die Kakaobutter umhüllt die in der Masse enthaltenen Partikel und eine fließfähige Suspension entsteht. Je nach Schokoladensorte und Qualität unterscheiden sich Zeit und Temperatur (Milch-Schokoladen ~50 °C, dunkle Schokoladen ~70 °C) des Conchierprozesses (Beckett, 2008).

Das Abkühlen und Formen der Schokoladenmasse ist entscheidend für den Glanz, die Festigkeit und den Schmelzpunkt des Schokoladenproduktes. Die Kakaobutter kann in verschiedenen Formen auskristallisieren (Polymorphie). Der Kristallisationsprozess wird mit

Temperiermaschinen gesteuert, damit die Kakaobutter in der gewünschten stabilen β -Modifikation erstarrt (Belitz et al., 2008a).

Herstellung von Kakaopulver

Kakaopulver für Kakaogetränke werden in der Regel alkalisiert. Durch den Alkalisierungsprozess wird der Geschmack gemildert, die Farbe vertieft und die Suspensionsfähigkeit des Kakaopulvers verbessert. Die Alkalisierung kann, wie auch die Röstung, zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Verarbeitungsprozess erfolgen. Dazu werden Kakaonibs oder -massen mit Kaliumcarbonat- oder Natriumhydroxyd-Lösungen vermischt, sodass der pH-Wert angehoben wird. Durch die Alkalikonzentration, Einwirkzeit und Temperatur unterscheiden sich die Alkalisierungsgrade des Kakaos (Beckett, 2008).

Flavane sind gegenüber alkalischen pH-Werten instabil und ihre Gehalte werden je nach Alkalisierungsgrad um 40 bis 80% reduziert (Andrés-Lacueva et al., 2008; Gu et al., 2006; Miller et al., 2008). Neben den Flavanolverlusten sind auch molekulare Modifikationen zu beobachten, dabei kommt es zu Epimerisierungen, wodurch sich das ursprüngliche Verhältnis von Catechin zu Epicatechin verändert (Gotti et al., 2006; Kofink et al., 2007a). Alkalisierte Kakaopulver weisen von allen Kakaoprodukten die geringsten Konzentrationen (bezogen auf die fettfreie Kakaotrockenmasse) an phenolischen Verbindungen auf (Gu et al., 2006).

Der hohe Fettgehalt von Kakao von etwa 54% wird auf 20-22% für schwach entölte und 10-12% für stark entölte Kakaopulver herabgesetzt. Die Kakaobutter wird mit hydraulischen Pressen, bei Temperaturen zwischen 80 und 100 °C abgepresst. Der entstandene Presskuchen wird anschließend zerkleinert und fein vermahlen (Beckett, 2008; Belitz et al., 2008a).

1.2 Phenolische Verbindungen in Kakao

Phenolische Verbindungen bzw. Polyphenole sind aromatische Strukturen mit einer (Phenole) oder mehreren (Polyphenole) daran gebundenen Hydroxylgruppen (Quideau et al., 2011). Durch diese weit gefasste Definition ist eine große Vielfalt gegeben und es sind mehr als 8000 verschiedene pflanzliche polyphenolische Strukturen in der Literatur beschrieben (Crozier A. et al., 2009). Polyphenole sind in eine Vielzahl an Untergruppen unterteilt, die sich in Struktur und Vorkommen unterscheiden. Pflanzenarten unterscheiden sich in der Zusammensetzung der Polyphenole. Dadurch ergeben sich charakteristische Polyphenolprofile, welche zur Authentizitätsbestimmung pflanzlicher Lebensmittel genutzt werden können (Zimmermann und Galensa, 2006). In der Regel kommen Polyphenole in Pflanzen als Minor Komponenten vor. Einige Pflanzenteile zeichnen sich aber durch besonders hohe Konzentrationen aus, hierzu gehören unter anderem Tee, Rotwein, einige Apfelsorten und Kakao (Hammerstone et al., 2000; Lee et al., 2003). Polyphenolkonzentrationen können stark schwanken (siehe z.B. Procyanidingehalte verschiedener Lebensmittel in Abbildung 1.3). Bereits in unverarbeiteten Lebensmitteln sind, bedingt durch Sorte oder Anbaubedingungen, große Gehaltsunterschiede festzustellen (siehe z.B. Apfel in Abbildung 1.3) (Hammerstone et al., 2000). In Kakao-Produkten variieren die Gehalte zudem aufgrund unterschiedlich hoher Kakaoanteile und der angewandten technologischen Prozesse (Gu et al., 2006).

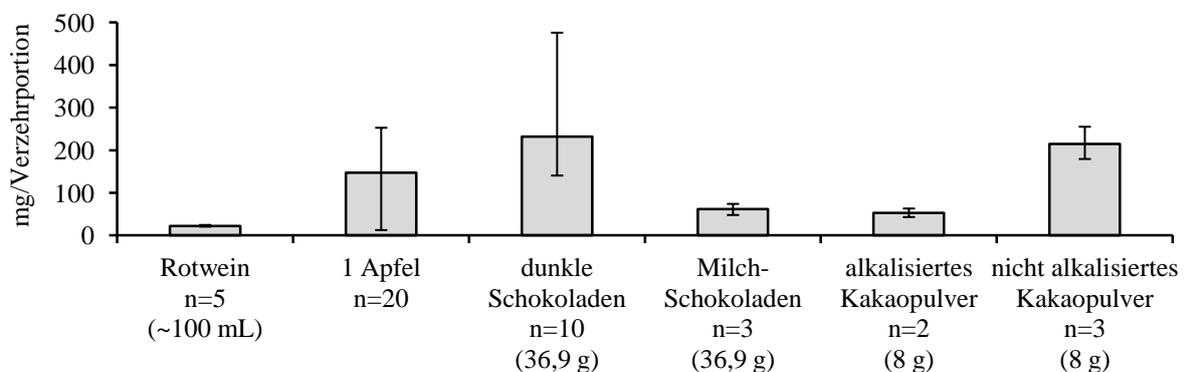


Abbildung 1.3: Durchschnittliche Procyanidingehalte (Monomere bis Decamere) mit Schwankungsbreiten (minimaler und maximaler Wert von n Proben) von verschiedenen Lebensmitteln je Verzehrportion (modifizierte Darstellung nach Gu et al., 2006 und Hammerstone et al., 2000).

Frische unfermentierte Kakaobohnen enthalten 15-20% lösliche Polyphenole und noch etwa 6-8% sind nach der Fermentation enthalten (Angaben für fettfreie Trockenmasse) (Cooper et al., 2007; Crozier S.J. et al., 2011). Phenolische Verbindungen in Kakao sind hauptsächlich von Flavanolen geprägt (Kapitel 1.2.1). Weitere Verbindungsklassen sind *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren (Kapitel 1.2.2) und Quercetinglykoside (Kapitel 1.2.3). Je nach Kakaotyp und

Verarbeitungsgrad sind auch Anthocyane enthalten, diese überdauern jedoch nicht die Fermentation. Außerdem sind in Kakao, jedoch in geringeren Gehalten, weitere Flavonol-, Flavon- und Flavanonglykoside sowie Phenolcarbonsäuren und Stilbene beschrieben (Tomás-Barbéran et al., 2011).

Eine tabellarische Darstellung der bisher in der Literatur beschriebenen phenolischen Inhaltsstoffe in Kakao, bzw. Kakaoprodukten befindet sich im Anhang (S. 131).

1.2.1 Flavanole

Catechine und Procyanidine (Flavanole) sind die Hauptpolyphenole in Kakao. Die Catechine machen dabei etwa 5-10% der Gesamtpolyphenole aus und die Procyanidine bis über 90% (Andrés-Lacueva et al., 2008). Als Catechine werden die Epimere Catechin und Epicatechin zusammengefasst. An Position C2 und C3 des C-Rings besitzen alle Flavan-3-ole (u.a. (Epi)catechin, (Epi)gallocatechin, (Epi)afzelechin) als strukturelles Merkmal zwei nebeneinander liegende Stereozentren, wodurch sie in jeweils zwei enantiomeren Formen vorliegen können (Abbildung 1.4). (+)- und (-)-Epicatechin sind an den Positionen C2 und C3 *cis*-konfiguriert und (+)- und (-)-Catechin sind *trans*-konfiguriert.

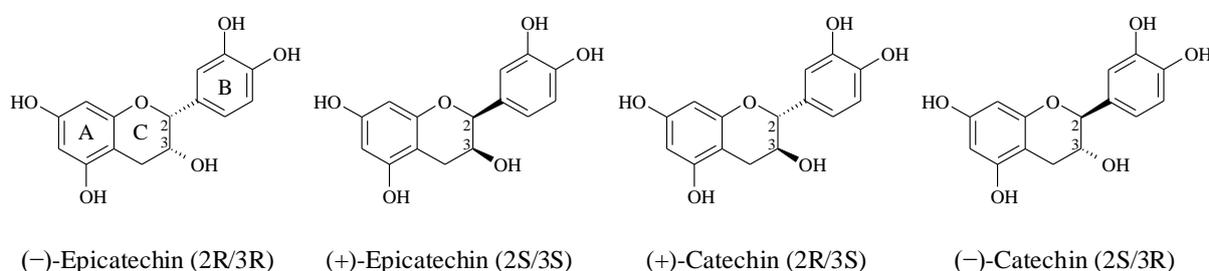


Abbildung 1.4: Strukturformeln der Catechine.

In der Natur kommen Catechine fast ausschließlich 2R-konfiguriert vor (siehe (+)-Catechin und (-)-Epicatechin in Abbildung 1.4) (Xie und Dixon, 2005). Das erste Flavonoidmolekül in der Biosynthese ist das 2S-Enantiomer von Naringenin. Der Ringschluss aus der Chalkonvorstufe wird stereoselektiv durch die Chalkonisomerase katalysiert, wobei am C2 des C-Rings ein chirales Zentrum gebildet wird. Über weitere enzymatische Umwandlungen (B-Ring-Hydroxylierung an C4', C-Ring-Hydroxylierung an C3 und Reduktion an C4) entsteht die gemeinsame Ausgangssubstanz (2R,3S,4S-Leucocyanidin) von Catechin und Epicatechin, welche zwei Chiralitätszentren in der *trans*-Konfiguration aufweist. (+)-Catechin entsteht daraus direkt durch die Reduktion an Position C4. Die Biosynthese von (-)-Epicatechin

verläuft über das nicht chirale Anthocyan Cyanidin. Im nächsten Schritt erfolgt die erneute Bildung von zwei Stereozentren an den Positionen C2 und C3, in der *cis*-konfigurierten Ausrichtung (Dixon et al., 2005; Pfeiffer et al., 2006).

Da Enzyme in der Regel stereoselektiv synthetisieren, werden über diese Biosynthesewege nur die 2R-Catechine gebildet. Für wenige Pflanzenarten sind die untypischen 2S-konfigurierten Vertreter beschrieben, deren Entstehung in der Pflanze jedoch nicht eindeutig geklärt ist (Delle Monache et al., 1972; Geiss et al., 1995; Kofink et al., 2007b). Die Verarbeitung von Lebensmitteln, insbesondere unter dem Einfluss hoher Temperaturen und alkalischer pH-Werte, führt ebenfalls zur Umwandlung in die jeweiligen Epimere, von (-)-Epicatechin zu (-)-Catechin und von (+)-Catechin zu (+)-Epicatechin (Gotti et al., 2006). Diese sogenannte Epimerisierungsreaktion kann von Nutzen sein, den Grad der Verarbeitung eines Lebensmittels zu bestimmen. Enantioselektive Analysen von Schokoladen und Kakao-pulvern identifizierten alle vier enantiomeren Formen der Catechine (Cooper et al., 2007; Gotti et al., 2006; Kofink et al., 2007a).

Als Umwandlungsmechanismus der 2R- zu den 2S-Catechinen wird die Öffnung des C-Ring an Position C2 angenommen. Diese erfolgt möglicherweise aufgrund einer Deprotonierung am B-Ring, welche in der Folge von Protonenverschiebung zur Ringöffnung führt (Abbildung 1.5). Beim erneuten Zusammenlagern des Moleküls entsteht das Epimer. In der Pflanze wird ein C2-Epimerase-Enzymkomplex als Katalysator der Epimerisierungsreaktion vermutet (Ellis et al., 1983). In der Lebensmittelverarbeitung ist diese Reaktion bei alkalischem pH-Wert begünstigt und wird durch hohe Temperaturen beschleunigt (Kofink et al., 2007a).

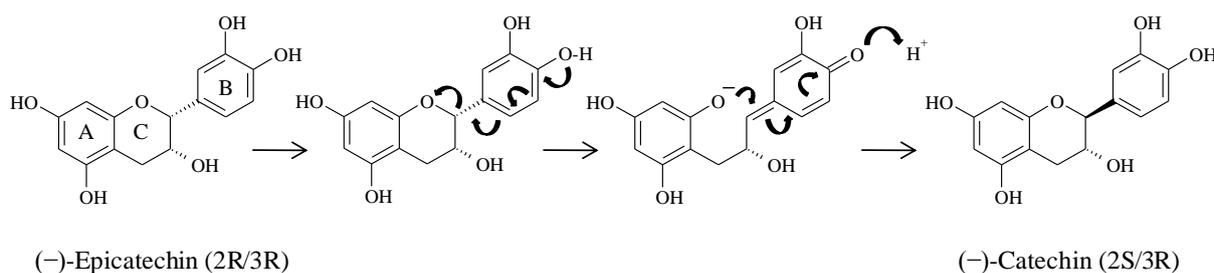


Abbildung 1.5: Vorgeschlagener Mechanismus der enzymatisch katalysierten oder pH-Wert bzw. Temperatur induzierten Epimerisierungsreaktion von (-)-Epicatechin zu (-)-Catechin (Ellis et al., 1983).

Die Catechine und andere monomere Flavanole stellen die Grundbausteine für Proanthocyanidine dar. Dabei handelt es sich um eine Verbindungsklasse unterschiedlich polymerisierter Flavan-3-ole, die nach dem Hydroxylierungsgrad an den B-Ringen weiter unterteilt wird (z.B. Procyanidine, Prodelphinidine und Propelargonidine). Proanthocyanidine sind vielfältig, sie

können im Polymerisationsgrad, den Interflavanbindungen, sowie in der Stereochemie der Monomereinheiten variieren. Bei Procyanidinen bestehen die monomeren Einheiten ausschließlich aus Catechin und Epicatechin, welche meist C4→C8 und seltener C4→C6 oder doppelt verknüpft sind. Einfach verknüpfte Proanthocyanidine werden als B-Typen bezeichnet. A-Typen sind durch eine zusätzliche C2→O7 Bindung doppelt verknüpft (Aron und Kennedy, 2008). In der Biosynthese entstehen Proanthocyanidine durch Kondensation aus Flavan-3-olen und/oder deren Vorläufern, den Flavan-3,4-diole (z.B. 2R,3S,4S-Leucocyanidin). Der Mechanismus der Polymerisierung und die verantwortlichen Enzyme sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Da jedoch die Vorläufersubstanzen bereits alle in der 2R-Konfiguration vorliegen, sind somit auch die Proanthocyanidin-Untereinheiten in der 2R-Form konfiguriert (He et al., 2008).

Aufgrund der Vielzahl der Proanthocyanidine wurde zur besseren Übersichtlichkeit von Hemingway et al. (1982) ein Nomenklatorsystem analog zu Oligo- und Polysacchariden vorgeschlagen. Die Bezeichnung beginnt mit der Nennung der oberen Moleküleinheit, gefolgt von Position und stereochemischer Konfiguration der Verknüpfung mit der nächsten Einheit (α : unterhalb bzw. β : oberhalb der Ringebene) (Hemingway et al., 1982). Die zuletzt genannte Einheit (untere Einheit) stellt dabei das Startmolekül der Biosynthese dar (Xie und Dixon, 2005). Für einige Proanthocyanidine existieren parallel auch Trivialnamen zur Substanzbezeichnung (Weinges et al., 1968).

Die Hauptprocyanidine von Kakao sind die Procyanidin Dimere B2 ((-)-Epicatechin-(4 β →8)-(-)-Epicatechin) und B5 ((-)-Epicatechin-(4 β →6)-(-)-Epicatechin), das Trimer C1 ((-)-Epicatechin-(4 β →8)₂-(-)-Epicatechin) und das Tetramer D ((-)-Epicatechin-(4 β →8)₃-(-)-Epicatechin) (Abbildung 1.6) (Cooper et al., 2007; Porter et al., 1991; Tomás-Barberán et al., 2007).

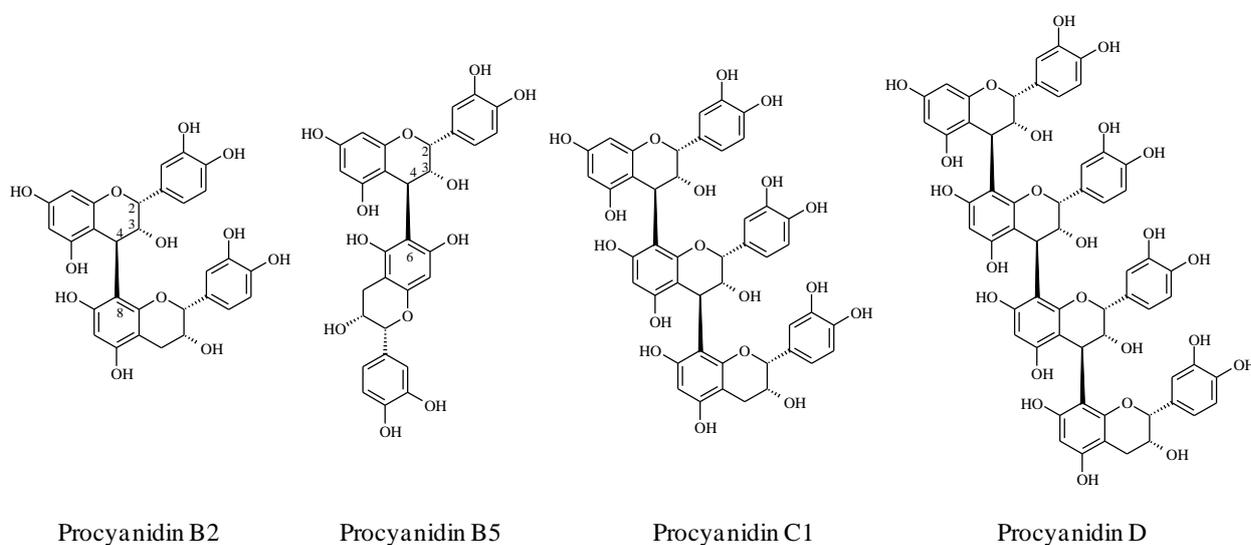


Abbildung 1.6: Strukturformeln der mengenmäßig dominanten Procyanidine in Kakao.

Verglichen mit anderen Lebensmitteln, wie z.B. Tee oder Trauben, sind die Proanthocyanidine in Kakao vergleichsweise homolog zusammengesetzt. Sie bestehen neben einigen C4→C6 verbundenen Epicatechineinheiten (Procyanidin B5) hauptsächlich aus C4→C8 (Procyanidin B2, C1, D und höher polymerisierte Procyanidine) verknüpften Catechinen (Lazarus et al., 2001). Kakao enthält auch in geringerem Maße A-Typ Procyanidine. Pereira-Caro et al. (2013) detektierten mit Normalphasenchromatographie gekoppelt an Massenspektrometrie in einem Kakaoextrakt B-Typ Procyanidine bis zu Pentadecameren und A-Typ Procyanidine bis zu Hexameren. Flavanole kommen in der Natur im Vergleich zu anderen Flavonoidgruppen selten als Glykoside vor. In Kakao sind dennoch einige monomere Flavanol-C-glykoside (Stark und Hofmann, 2006) und dimere und trimere A-Typ-O-arabinside sowie -O-galactoside beschrieben (Hatano et al., 2002; Porter et al., 1991).

1.2.2 *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren

N-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren (NPA), auch bekannt als Hydroxyzimtsäureamide, sind eine homologe Substanzgruppe aus Phenylpropenoylsäuren verknüpft mit Aminosäuren, wobei beide Bindungspartner variieren können. Sanbongi et al. (1998) identifizierten mit *trans*-Kaffeensäurehydroxytyrosin (Clovamid, aus dem Englischen für Clover, da erstmals in Klee identifiziert) und *trans*-*p*-Coumarsäuretyrosin (Deoxyclovamid) die ersten *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren in Kakao. Insgesamt 15 verschiedene NPA sind mittlerweile für Kakao beschrieben, diese setzen sich aus vier verschiedenen Hydroxyzimtsäuren (Kaffee-, *p*-Coumar-, Zimt- und Ferulasäure) und fünf verschiedenen Aminosäuren (Asparaginsäure, Glutaminsäure, Tryptophan, Tyrosin und Hydroxytyrosin) als mögliche Verknüpfungspartner zusammen (Stark und Hofmann, 2005; Stark et al., 2006b). In Abbildung 1.7 sind die sieben mengenmäßig bedeutendsten NPA aus Kakao dargestellt, welche auch in dieser Arbeit untersucht wurden.

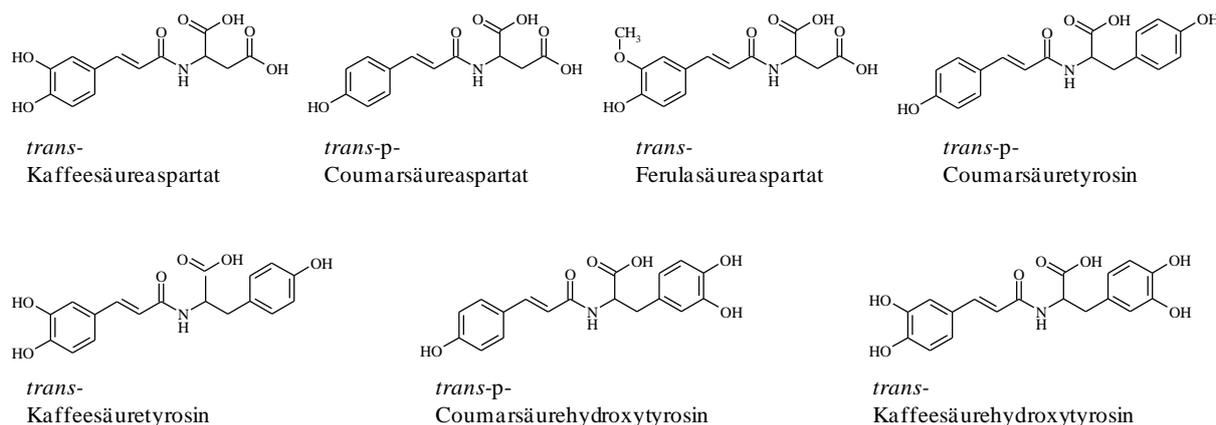


Abbildung 1.7: Strukturformeln der mengenmäßig dominanten *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren in Kakao.

1.2.3 Quercetinglykoside

Kakao enthält hauptsächlich die Quercetinglykoside Quercetinarabinosid, -glucosid und -galactosid (Abbildung 1.8), sowie in geringeren Konzentrationen Quercetin (Griffiths, 1958; Rohan und Connell, 1964; Sanbongi et al., 1998; Sánchez-Rabaneda et al., 2003). Selten wurden Quercetinglucuronid und -rutinosid beschrieben, diese sind jedoch ebenfalls in geringen Konzentrationen enthalten (Andrés-Lacueva et al., 2000; Ortega et al., 2008; Wollgast, 2005).

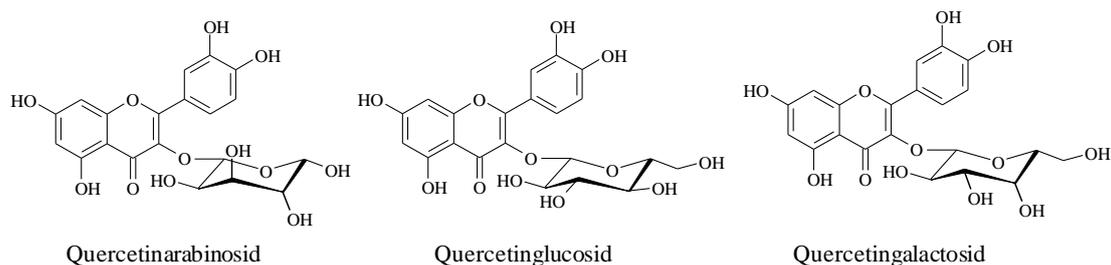


Abbildung 1.8: Strukturformeln der Quercetinglykoside in Kakao.

In Relation zu Flavanolen oder *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren sind die Gehalte der Quercetinglykoside in Kakao gering, verglichen mit anderen Lebensmitteln aber dennoch nennenswert. In Kakaopulvern wurden Quercetinglucosidgehalte zwischen 0,03 mg/g (Urpí-Sarda et al., 2009) und 0,23 mg/g (Lamuela-Raventós et al., 2001) quantifiziert. Andere als quercetinglykosidreich geltende Lebensmittel wie z.B. Aroniabeeren oder Zwiebel enthalten ~0,42 mg/g und ~0,3-0,4 mg/g (Price und Rhodes, 1997; Zheng und Wang, 2003). Der bisherigen Literatur zu Quercetinglykosidgehalten in Kakao widerspricht eine aktuelle Studie, wonach in reifen unfermentierten Kakaobohnen Flavonolglykosidgehalte von ~47 mg/g quantifiziert wurden. Somit überstiegen diese Gehalte sogar die der ebenfalls quantifizierten Flavane (bis Pentadecamere) von ~29,5 mg/g (Pereira-Caro et al., 2013).

Freies Quercetin ist in Kakao mit Konzentrationen von ~0,02 mg/g enthalten. Wollgast (2005) analysierte eine Zunahme von Quercetin im Laufe der Kakaoverarbeitung und vermutete eine Deglykosylierung der Quercetinglykoside.

1.3 Bioverfügbarkeit phenolischer Verbindungen aus Kakao

Absorption und Metabolismus von Catechinen

Nach Verzehr von Kakaoprodukten sind die Stoffwechselmetabolite von Catechin und Epicatechin in menschlichem Plasma und Urin nachweisbar. Der Nachweis erfolgt in der Regel nach Spaltung der Metabolite, durch Glucuronidasen und Sulfatasen, in ihre Aglykone (Wang et al., 2000). Die Absorptionsrate der Catechine variiert (in Tierversuchen) zwischen 22 und 50% (Lamuela-Raventós et al., 2005). Catechine werden im Jejunum aufgenommen und ihre Metabolite gelangen bereits 30 min nach Verzehr der Kakaoprodukte in die Blutbahn. Da Flavan-3-ole in der Regel nicht glykosyliert vorliegen, diffundieren sie direkt in die Darmwand und werden dort sulfatiert, glucuronidiert und methyliert. Anschließend werden die Metabolite über die Pfortader zur Leber transportiert (Murphy et al., 2003; Tomás-Barbéran et al., 2011). Im Blut zirkulierende Catechin-Metabolite werden schließlich von den Nieren aufgenommen und mit dem Urin ausgeschieden (Neilson und Ferruzzi, 2011). Nach zwei bis zweieinhalb Stunden ist das Konzentrationsmaximum im Plasma erreicht und innerhalb von acht Stunden sind die Catechine wieder weitestgehend abgebaut (Baba et al., 2000; Richelle et al., 1999; Schramm et al., 2003; Wang et al., 2000).

In vitro Untersuchungen zur Stabilität von (-)-Epicatechin und (+)-Catechin gegenüber gastrischen Verdauungssäften zeigen keine Verluste im sauren Magenmilieu (Epicatechin <1,6%, Catechin <0,2%) (Neilson et al., 2007; Zhu et al., 2002). Während der Verdauung bis zur Magenentleerung konnte zudem keine Veränderung im Monomerenprofil festgestellt werden. Das Verhältnis von Catechin zu Epicatechin blieb konstant, eine Epimerisierung der Monomere im sauren pH des Magens wurde somit ausgeschlossen (Rios et al., 2002).

Eine zweistündige Inkubation von Catechinen in simulierten intestinalen Verdauungssäften führte bei pH 7,2 zu Verlusten von bis zu 10% (Epicatechin 7,6-10,3%, Catechin 7,0-8,2%) (Neilson et al., 2007) und bei pH 7,4 zu Verlusten von bis zu 20% (Epicatechin ~20%, Catechin ~15%) (Zhu et al., 2002). Die *in vitro* Inkubation von (-)-Epicatechin und (+)-Catechin unter intestinalen Bedingungen mit einem pH-Wert von 8,5 dagegen, zeigte die Entstehung der jeweiligen Epimere. Eine Bestätigung der möglichen Epimerisierungsreaktion durch eine enantioselektive Analyse der Enantiomere erfolgte in dieser Studie nicht (Zhu et al., 2002). In einer Humanstudie wurden flavanolarme Kakaotränke jeweils gemeinsam mit einem der vier Catechine verabreicht, weder im Urin noch im Plasma konnten Epimerisierungsprodukte nachgewiesen werden (Ottaviani et al., 2011).

Akkumulationen der Flavan-3-ole im Plasma finden nicht statt. Bei täglichem Konsum über einen Zeitraum von 18 Wochen wurde zwischen Beginn und Ende der Intervention kein Unterschied in der Plasma-Kinetik festgestellt (Taubert et al., 2007b).

Absorption der Catechine in Abhängigkeit der Stereochemie

Catechine besitzen zwei Chiralitätszentren, an den Positionen C2 und C3, wodurch sie als Epimere bzw. Enantiomere vorkommen. Die Stereochemie von Substanzen beeinflusst viele Vorgänge im Organismus. Enantioselektive und nicht enantioselektive Analysen weisen auf Unterschiede in der Absorption in Abhängigkeit der Stereochemie hin. Demnach werden die ursprünglich in Kakao vorkommenden Catechine, (-)-Epicatechin und (+)-Catechin, im Vergleich zu denen, die durch die Epimerisierung entstehen können, (-)-Catechin und (+)-Epicatechin, bevorzugt absorbiert (Holt et al., 2002; Ottaviani et al., 2011; Ritter et al., 2010a).

Die Absorption von Epicatechin im menschlichen Organismus, nach Aufnahme eines Kakaogetränks mit einem Verhältnis von Epicatechin zu Catechin von 1:1, war im Vergleich zu Catechin bevorzugt. Catechin erreichte nur 10% der Epicatechinkonzentration im Humanplasma (Holt et al., 2002). Erste enantioselektive Analysen der Catechin Enantiomere in menschlichem Plasma, sowohl nach Verzehr von Kakao als auch aus einem reinen Standardgemisch, zeigten, dass das (+)-Catechin Isomer bevorzugt in das Plasma absorbiert wird (Ritter et al., 2010a). Jedoch wurden in den genannten Studien nicht die Metabolite selbst analysiert, sondern die Aglykone nach enzymatischer Spaltung durch Glucuronidasen und Sulfatasen, sodass nicht alle Metabolite (z.B. methylierte Metabolite) erfasst wurden.

Eine weitere Studie untersuchte die Absorption aller Enantiomere von Catechin und Epicatechin im Menschen. Als Verzehrbasis diente ein flavanolarmes Kakaogetränk, welches jeweils mit einem der vier Catechine versetzt wurde. Folgende Rangfolge für die Absorption der Epimere bzw. Enantiomere in das Plasma konnte dabei ermittelt werden: (-)-Epicatechin > (+)-Epicatechin = (+)-Catechin > (-)-Catechin. Auch die Ausscheidung mit dem Urin war für (-)-Catechin geringer, während der Unterschied der anderen Flavan-3-ole nicht signifikant war (Ottaviani et al., 2011). In dieser Studie wurde auch das Methylierungsmuster der vier Catechine in den Plasma- und Urinproben untersucht. Nach enzymatischer Hydrolyse mit Glucuronidase und Sulfatase wurden die nicht-methylierten, die 3'-O-methylierten und die 4'-O-methylierten Fraktionen bestimmt. Dabei konnte ein Unterschied zwischen Catechin und Epicatechin im Methylierungsmuster festgestellt werden sowie ein statistisch signifikanter Unterschied im Methylierungsmuster der Epicatechin-Enantiomere. Das (-)-Enantiomer lag dabei im Vergleich zum (+)-Isomer zu einem größeren Anteil nicht-methyliert im Plasma vor. Allgemein waren aber bei allen vier Catechinen die nicht-methylierten Verbindungen dominant.

Absorption und Metabolismus von Procyanidinen

Im Gegensatz zu den Catechinen gelangt der größte Teil der Procyanidine hauptsächlich in den Dickdarm. Nach mikrobiellem Abbau zu phenolischen Säuren und Phenyl-Lacton-Derivaten werden die Metabolite in die Epithelzellen absorbiert und über den Urin wieder ausgeschieden (Manach et al., 2005; Rios et al., 2003; Williamson und Manach, 2005).

Die Absorption der Procyanidine im oberen Dünndarm ist gering und wird vermutlich durch das Molekulargewicht bestimmt. Im Tierversuch und *in vitro* konnte die Absorption bis Procyanidin Trimere nachgewiesen werden (Deprez et al., 2001; Tsang et al., 2005). Für die Absorption von Procyanidin B2 nach Kakaokonsum in das Plasma des Menschen wurde eine mit den Catechinen vergleichbare Kinetik von Konzentrationsmaximum und Abbau festgestellt. Die Absorptionsrate war jedoch verglichen mit den Monomeren etwa 100-fach geringer (Holt et al., 2002). Ebenso konnte Procyanidin B2 nach Kakaoverzehr im Urin detektiert werden (Urpi-Sarda et al., 2009).

Daten zur Stabilität der Procyanidine in gastrischen und intestinalen Verdauungssäften sind kontrovers. Einige *in vitro* Studien beschreiben die Spaltung der Procyanidine, im sauren Milieu des Magens, zu monomeren und geringer polymerisierten Flavanolen (Spencer et al., 2000; Zhu et al., 2002). Rios et al. (2002) untersuchten ebenfalls die Stabilität der Procyanidine *in vivo* bis zur Magenentleerung und konnten keine Veränderungen im Polymerisationsgrad, zugunsten geringer polymerisierter Flavanole, feststellen.

Absorption und Metabolismus von N-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren

Studien zur Bioverfügbarkeit von NPA sind kaum vorhanden. Eine Humanstudie beschäftigt sich mit der Absorption von NPA nach Verzehr eines Kakaotränkes anhand von Urinproben. Unabhängig von ihrer Struktur hatten alle im Urin detektierten NPA nach zwei Stunden ihr Konzentrationsmaximum erreicht. Es wurden zwölf mit dem Urin ausgeschiedene NPA untersucht und ihr Profil unterschied sich signifikant von dem des Kakaotränkes, wonach eine Verstoffwechslung im Organismus anzunehmen ist. Die im Kakao dominanten Kaffeesäure-Konjugate waren kaum zu detektieren, während die p-Coumarsäure-Derivate die höchsten Gehalte zeigten. Die höchste Wiederfindung im Urin hatten p-Coumarsäureglutamat und Ferulasäuretyrosin. Um mögliche Metabolisierungswege im Körper zu identifizieren wurden die Urinproben mit β -Glucuronidasen und Sulfatasen versetzt. Eine Glucuronidierung und Sulfatierung entsprechend den Flavanolen wurde ausgeschlossen, da nach der Enzymbehandlung keine hydrolysierten NPA im Urin detektiert werden konnten (Stark et al., 2008).

Absorption und Metabolismus von Quercetinglykosiden

Zur Absorption von Quercetinglykosiden aus Kakao liegen keine Untersuchungen vor, jedoch aus anderen Lebensmitteln, z.B. nach Verzehr von Zwiebeln. Quercetinglykoside werden innerhalb der Enterozyten des Dünndarms deglykosyliert und die weitere Verstoffwechslung führt dazu, dass glucuronidierte, sulfatierte und methylierte Metabolite in Plasma und Urin nachgewiesen werden können. Das Konzentrationsmaximum der Hauptmetabolite im Plasma wird dabei in weniger als einer Stunde nach Verzehr der Zwiebeln erreicht und innerhalb von acht Stunden sind die meisten Metabolite über den Urin ausgeschieden. Die Analyse mittels LC-MS, ohne vorherige enzymatische Freisetzung des Aglykons, führte dazu, dass auch Unterschiede im Metabolisierungsmuster zwischen den Metaboliten in Plasma und Urin festgestellt werden konnten (Crozier A. et al., 2010; Mullen et al., 2006).

1.4 Potentielle physiologische Effekte im Menschen

Epidemiologische Studien deuten darauf hin, dass sich ein regelmäßiger Kakaokonsum positiv auf den menschlichen Organismus auswirkt. Die Auswertung verschiedener Kohorten- und Querschnittsstudien ergab, dass ein hoher Kakao- bzw. Schokoladenkonsum das Risiko, Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu entwickeln um 37% verringert. Allerdings wurde der hohe Konsum je Studie sehr verschieden definiert (z.B. Kakao- bzw. Schokoladenkonsum von einmal und häufiger in der Woche, mehr als fünfmal in der Woche oder täglich 7,5 g) (Buitrago-Lopez et al., 2011).

Deutliche Hinweise zur positiven physiologischen Wirkung von Kakao stammen auch von Beobachtungen einer Gruppe von Inselbewohnern, den Kuna-Indianern nahe der Küste von Panama. Bei ihnen wurde eine vergleichsweise geringe Sterberate für koronare Herzkrankungen festgestellt, jedoch nicht bei ihren auf dem Festland lebenden genetischen Verwandten (Bayard et al., 2007). Die Ursache könnte möglicherweise in den Ernährungsgewohnheiten begründet sein, da die Inselbewohner täglich bis zu fünf Tassen eines hausgemachten Kakaogetränkes zu sich nahmen (Hollenberg et al., 2009; McCullough et al., 2006).

Mögliche Ursachen der potentiell kardioprotektiven Wirkung von Kakao werden mit blutdrucksenkenden, antioxidativen, antiinflammatorischen und antithrombotischen Effekten assoziiert, sowie der positiven Beeinflussung von Blutlipiden und des Insulinstoffwechsels (Khawaja et al., 2011; Monahan, 2012). Diese Effekte stehen im Zusammenhang mit einem verminderten Risiko der Entstehung von Arteriosklerose. Diese entzündliche Erkrankung der Blutgefäße, welche in der Folge einer chronischen Dysfunktion des Endothels entsteht, wird durch verschiedene Risikofaktoren wie Tabakkonsum, Übergewicht, Hyperlipoproteinämie, Bluthochdruck oder Diabetes mellitus induziert. Diese Dysfunktion des Blutgefäßendothels

ist durch ein Ungleichgewicht zwischen der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) bzw. oxidativem Stress und deren Beseitigung gekennzeichnet (Leopold und Loscalzo, 2009).

Eine zentrale Rolle für die kardioprotektive Wirkung von Kakao scheint eine Beeinflussung der Bioverfügbarkeit von endothelalem Stickstoffmonoxid (NO) zu spielen. NO reguliert die Endothelfunktionen über verschiedene Mechanismen, unter anderem durch die Relaxation der glatten Muskulatur sowie dem Schutz vor Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion am Endothel und wirkt demnach blutdrucksenkend, antiinflammatorisch und antithrombotisch (Corti et al., 2009). Nach regelmäßigem bzw. hohem Kakaokonsum sind vermehrt NO Biomarker in Urin und Plasma festzustellen (Jiménez et al., 2012; Taubert et al., 2007b). Die Verabreichung der reinen (-)-Epicatechin-Standardsubstanz zeigte ebenfalls eine gefäß-erweiternde Wirkung durch die Erhöhung von NO und die Senkung von Endothelin-1, das gefäßverengend wirkt (Loke et al., 2008).

Blutdrucksenkende Effekte: Verschiedene Meta-Analysen bestätigen die blutdrucksenkende Wirkung nach regelmäßigem Konsum von Kakao oder Schokolade über Zeiträume von fünf Tagen bis zu 18 Wochen aus randomisiert kontrollierten Studien (Desch et al., 2009; Ellinger et al., 2012; Hooper et al., 2008; Ried et al., 2010; Taubert et al., 2007a). Die Studienergebnisse bzw. das Ausmaß der Blutdrucksenkung ist dabei sehr unterschiedlich, vermutlich aufgrund der Heterogenität der durchgeführten Studien (Intervenierungszeitraum, verabreichte Dosis, Gesundheitszustand der Studienteilnehmer). Ellinger et al. (2012) untersuchten den Zusammenhang zwischen der mit Kakaoprodukten aufgenommenen Epicatechin-Dosis und den Effekt auf den Blutdruck. Demnach scheint zwischen der aufgenommenen Menge an Epicatechin und dem Ausmaß der Blutdrucksenkung ein Zusammenhang zu bestehen. Die blutdrucksenkende Wirkung von Kakaoprodukten ist je nach aufgenommener Dosis von Epicatechin als klinisch relevant einzustufen. Eine tägliche Aufnahme von 25 mg Epicatechin, welche über den Verzehr von 25-30 g Halbbitter-Schokolade (50% Kakaoanteil) möglich ist, führt zu einer signifikanten Senkung des Blutdrucks (Ellinger et al., 2012).

Ottaviani et al. (2011) untersuchten die gefäß-erweiternde Wirkung der Catechine auf die Oberschenkelarterien von Ratten in Abhängigkeit der Stereochemie. In dieser Studie konnte nur für das (-)-Epicatechin-Enantiomer ein vasodilatatorischer Effekt nachgewiesen werden und nicht für die anderen Isomere der Catechine (Ottaviani et al., 2011).

Antiinflammatorische Effekte: Viele *in vitro* Studien und Tierversuche deuten auf durch Kakaoflavanole induzierte antiinflammatorische Effekte hin. Kakaoflavanole wirken möglicherweise hemmend auf proinflammatorische Zytokine und Chemokine, welche zu Beginn der chronischen Veränderungen des Endothels produziert werden (Mao et al., 2000). Weitere diskutierte Mechanismen sind neben der bereits erwähnten NO Regulation, Einflüsse auf die Eicosanoidsynthese und die Aktivierung von Thrombozyten (Selmi et al., 2008).

Jedoch gibt es bisher wenige *in vivo* Studien am Menschen zur antiinflammatorischen Wirkung von Kakao, mit teilweise widersprüchlicher Ergebnislage (Guiseppe et al., 2008; Mathur et al., 2002; Monagas et al., 2009).

Antioxidative Effekte: Flavanole zeigen *in vitro* starke antioxidative Eigenschaften, diese basieren auf der Möglichkeit Elektronen aufzunehmen und damit Radikale zu reduzieren und diese im Ringsystem zu stabilisieren (Rice-Evans et al., 1997). *In vivo* werden verschiedene durch Flavanole induzierte Wirkmechanismen vorgeschlagen: die direkte Neutralisation von ROS (Wang et al., 2000), die Hemmung von ROS produzierenden Enzymen (Katz et al., 2011), das Komplexieren von ROS-Reaktionen beschleunigenden Metall-Ionen (Fraga, 2007) und das Regulieren bzw. Aufrechterhalten der endogenen Radikalabwehr durch induzieren antioxidativ wirkender Enzyme (Ramiro-Puig und Castell, 2009). Scheid et al. (2010) werteten 19 kontrollierte Interventionsstudien zu direkten *ex vivo* und *in vivo* antioxidativen Effekten auf den Menschen nach einmaligem oder regelmäßigem Konsum von Kakao auf ausgewählte Marker für oxidativen Stress aus. Danach konnten keine ausreichend belegten Hinweise zur Verbesserung der direkten antioxidativen Abwehr durch Kakaokonsum festgestellt werden, mit Ausnahme eines positiven Effektes auf die Lipoprotein-Oxidation (Scheid et al., 2010). Die antioxidative Wirkung von Kakao wird demnach eher den indirekten Mechanismen, durch Eingreifen in prooxidative Prozesse, über hemmen prooxidativer und induzieren antioxidativer Enzyme, zugeschrieben (Schewe et al., 2008).

In den meisten Studien werden die physiologischen Effekte mit den in Kakao enthaltenen Flavanolen und insbesondere mit Epicatechin verbunden, da Plasma-Peak-Konzentrationen der Epicatechin-Metabolite mit den untersuchten physiologischen Effekten korrelieren und auch allein verabreichtes Epicatechin ähnliche Effekte zeigt (Schroeter et al., 2006).

Potentielle Effekte durch N-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren: Neben den Flavanolen in Kakao scheinen auch die NPA möglicherweise positive Effekte auf den menschlichen Organismus auszuüben. Bisher wurden hauptsächlich *in vitro* Untersuchungen durchgeführt und diese meist zur Wirkung von Clovamid (*trans*-Kaffeensäurehydroxytyrosin). Clovamid ist *in vitro* ein starkes Antioxidanz (Arlorio et al., 2008; Sanbongi et al., 1998). Clovamid und Deoxyclovamid (*trans*-p-Coumarsäurehydroxytyrosin) zeigen *in vitro* auch antiinflammatorische und antithrombotische Wirkungen (Park, 2006; Zeng et al., 2011).

NPA stehen ebenfalls in Verdacht, der Anheftung von *Helicobacter pylori* in der Magenschleimhaut entgegenzuwirken (Hensel et al., 2007; Niehues et al., 2011). Unterschiede in der Aktivität gegenüber *Helicobacter pylori* waren dabei in Abhängigkeit der Molekülstruktur festzustellen. Die Aktivität stieg mit dem Hydroxylierungsgrad der Hydroxycinnaminsäure, sowie mit polaren und sauren Aminosäuren (Niehues et al., 2011).

Zu **Quercetinglykosiden** und potentiellen physiologischen Wirkungen durch den Konsum von Kakao sind bisher keine Daten in der Literatur veröffentlicht. Studien zur Wirkungsprüfung von Quercetinglykosiden wurden aber mit quercetinglykosidreichen Lebensmitteln wie beispielsweise Zwiebeln durchgeführt.

2 Ergebnisse und Diskussion

2.1 Probenaufarbeitung und Analytik

Für die Probenaufarbeitung wurden folgende Parameter optimiert: die Kakaovermahlung, die Entfettung und die Extraktion der Analyten mit beschleunigter Lösungsmittlextraktion, sowie die automatisierte Festphasenextraktion zur Aufreinigung und Aufkonzentrierung des Extraktes. Hierbei wurde eine Probenaufarbeitungsmethode entwickelt, die für unfermentierte und fermentierte Kakaobohnen, Schokoladen und Kakaopulver anwendbar ist und somit den direkten Vergleich aller Proben ermöglicht. Die Aufarbeitung der Proben wurde auf drei Substanzklassen (Tabelle 2.1) abgestimmt, aus denen in dieser Arbeit insgesamt 17 Verbindungen quantifiziert wurden. Die Überprüfung der einzelnen Parameter erfolgte anhand von fermentierten Kakaobohnen (Java1) mittels chromatographischer Analyse (siehe Methode RP-103 in Kapitel 4.3.6.1) über den Vergleich der Peakflächen von Leitsubstanzen aus den jeweiligen Substanzklassen. Die optimierte Methode wurde auf die weiteren Kakaoproben über die Einwaage unter Berücksichtigung von Verarbeitungsgrad und Fettgehalt angepasst. Abschließend wurde die Probenaufarbeitung über die Bestimmung der Reproduzierbarkeit validiert.

Tabelle 2.1: Übersicht der quantifizierten Verbindungen aus drei Substanzgruppen, mit den in dieser Arbeit verwendeten Kurzbezeichnungen.

Substanzgruppe	Substanz	Kurzbezeichnung
Flavanole	Epicatechin	Epicat
	Catechin	Cat
	Procyanidin Dimer B2	proc B2
	Procyanidin Dimer B5	proc B5
	Procyanidin Trimer C1	proc C1
	Procyanidin Trimer 1 ^a	proc Tri1
	Procyanidin Tetramer D	proc D
<i>N</i> -Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren	<i>trans</i> -Kaffeesäureaspartat	K-asp
	<i>trans</i> - <i>p</i> -Coumarsäureaspartat	<i>pC</i> -asp
	<i>trans</i> -Ferulasäureaspartat	F-asp
	<i>trans</i> -Kaffeesäurehydroxytyrosin	K-OHtyr
	<i>trans</i> -Kaffeesäuretyrosin	K-tyr
	<i>trans</i> - <i>p</i> -Coumarsäurehydroxytyrosin	<i>pC</i> -OHtyr
	<i>trans</i> - <i>p</i> -Coumarsäuretyrosin	<i>pC</i> -tyr
Quercetinglykoside	Quercetinglucosid	Q-glc
	Quercetingalactosid	Q-gal
	Quercetinarabinosid	Q-arab

^a Die genaue Struktur dieses Procyanidin Trimers ist nicht bekannt.

2.1.1 Kakaovermahlung

Für die möglichst vollständige und reproduzierbare Extraktion ist eine homogene und feine Partikelgrößenverteilung notwendig. Diese wurde mit einer Kugelmühle erreicht. Die Proben wurden vor der Vermahlung in flüssigem Stickstoff gekühlt, um Wärmeentwicklung zu vermeiden und Veränderungen der Inhaltsstoffe durch die Probenaufarbeitung auszuschließen (Friedrich et al., 2000). Vor der Kugelmühlen-Vermahlung wurden die Kakaobohnen mit einer Schlagmühle, ebenfalls unter Kühlung mit Trockeneis, vorzerkleinert. Verarbeitete Kakao-Produkte wie Kakaomassen und Schokoladen mussten nur grob gemahlen werden, da die Korngröße während der Kakaoverarbeitung bereits ausreichend verringert wurde (Lazarus et al., 2001). Vier Methoden unterschiedlicher Zeiten und Amplituden wurden mit der Kugelmühle verglichen (Tabelle 2.2 sowie Kapitel 4.3.1 zur exakten Durchführung). Die vorzerkleinerten Kakaobohnen (M0) waren Ausgangspunkt der Überprüfung. Der Extraktgehalt von M0 wurde auf 100% festgelegt und die prozentualen Extraktgehalte der Kugelmühlen-Vermahlungen damit verglichen.

Tabelle 2.2: Verschiedene Vermahlungsmethoden mit prozentualen Extraktgehalten (bezogen auf M0=100%) und den relativen Standardabweichungen.

Mahlmethode	Mahlamplitude	Mahldauer	Extraktgehalt% ^a	rel. SD (%) ^a	
M0	Vorzerkleinerung		100	6,7 - 9,3	
M0+M1	Vermahlung mit Kugelmühle	80	4 min	109 - 114	1,2 - 5,1
M0+M2	Vermahlung mit Kugelmühle	100	4 min	109 - 123	3,6 - 12
M0+M3	Vermahlung mit Kugelmühle	100	2 min	115 - 124	1,1 - 3,5
M0+M4	Vermahlung mit Kugelmühle	100	zweimal 2 min	111 - 125	0,7 - 4,2

^a Prozentuale Extraktgehalte (bezogen auf M0) und relative Standardabweichungen (rel. SD %) der verschiedenen Vermahlungen. Die Spannweiten ergeben sich aus den verschiedenen Werten der untersuchten Substanzen. Die untersuchten Substanzen waren: Epicat, proc B2, proc C1, K-asp und pC-asp. Jede Vermahlung wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt und jeweils in Doppelbestimmung aufgearbeitet (n=4).

Durch die Vermahlung mit der Kugelmühle wird der Extraktgehalt generell erhöht und die Reproduzierbarkeit verbessert (Tabelle 2.2). Die Spannweiten von Extraktgehalt und relativer Standardabweichung ergeben sich aus den jeweiligen Einzelwerten der folgenden hier untersuchten Substanzen: Epicat, proc B2, proc C1, K-asp und pC-asp.

Die Vermahlungsamplitude wirkt sich stärker auf die Extraktausbeute aus als die Vermahlungszeit (vgl. M0+M1 und M0+M3). Die Kühlwirkung des Stickstoffs begrenzt die Vermahlungszeit, da bei einer Vermahlungsdauer von 4 min und einer Amplitude von 100 (M0+M2) Reibungswärme in der Probe entstand, wodurch die Kakaobutter schmolz und den Kakao verklebte. Dadurch ist die Probe nicht mehr homogen zerkleinert und die Reproduzierbarkeit verschlechtert sich. Die Vermahlung in zwei Zyklen mit einer erneuten

Kühlung dazwischen (M0+M4) verhinderte die Wärmeentstehung, jedoch wurden Extraktgehalt und Reproduzierbarkeit nicht nennenswert erhöht bzw. verbessert (Tabelle 2.2, S. 23). Auf der Grundlage der Extraktgehalte und Reproduzierbarkeiten wurde zur Probenaufarbeitung eine 2 minütige Vermahlung mit Amplitude 100 gewählt (M0+M3).

2.1.2 Beschleunigte Lösungsmittlextraktion

Die Entfettung und die anschließende Extraktion der phenolischen Verbindungen erfolgten unmittelbar nacheinander mittels beschleunigter Lösungsmittlextraktion (PLE: Pressurized Liquid Extraction). Dafür wird die Probe mit Diathomerde (zur Probenverteilung und zum Verringern des Lösungsmittelverbrauchs) vermischt und in die Extraktionszelle gefüllt. Dann werden die programmierten Methoden für die Entfettung und die Extraktion nacheinander durchgeführt. In Kapitel 4.3.2 sind genauere Angaben zur PLE und zur Durchführung der Extraktion gegeben. Die PLE unter hohem Druck verbessert das Durchdringen der Probe mit dem Lösungsmittel und erhöht die Extraktausbeute bei geringem Zeiteinsatz und Lösungsmittelverbrauch gegenüber Extraktionsmethoden wie z.B. Soxhlet-Extraktion (Mustafa und Turner, 2011). Es besteht auch die Möglichkeit mit hohen Temperaturen bis 200 °C zu extrahieren. Da jedoch insbesondere Flavanole hitzeempfindlich sind, wurde die Extraktion bei Raumtemperatur durchgeführt (Palma et al., 2001). Im gesamten System wurde Luft durch Stickstoff ersetzt, um mögliche Oxidationsvorgänge der Polyphenole zu verhindern.

Entfettung der Kakaoproben

Kakao bzw. Kakaoprodukte enthalten einen erheblichen Fettgehalt (Kakaobohnen ~54%, Schokoladen ~40%, Kakaopulver 10-22%), dieser stört die Analytik (Adamson et al., 1999) und verkürzt z.B. die Lebensdauer von HPLC-Säulen. Kakao und Kakaoprodukte werden üblicherweise in drei Extraktionsschritten mit Hexan entfettet (Payne et al., 2009; Payne et al., 2010). Diese Methode wurde für die ASE übernommen und die Kakaoproben wurden dreimal jeweils fünf Minuten lang mit Hexan entfettet. Eine weitere Optimierung der Entfettung war nicht notwendig, da keine Störungen in der weiteren Aufarbeitung und Analytik auftraten. Die Parameter der Entfettungsmethode sind in Kapitel 4.3.2.1 aufgeführt.

Extraktion phenolischer Verbindungen

Extraktionslösungsmittel

Die in der Literatur am häufigsten verwendeten Lösungsmittel zur Extraktion phenolischer Verbindungen aus Kakao, Aceton und Methanol bzw. deren wässrige Mischungen, wurden mit der beschleunigten Lösungsmittelextraktion für die drei Substanzklassen untersucht (Abbildung 2.1). Dabei sollte das Lösungsmittel mit den allgemein höchsten Extraktgehalten und das je Substanzgruppe optimale Extraktionsmittel identifiziert werden. Vor jeder Extraktion erfolgte eine Entfettung. Alle Extraktionen wurden in Doppelbestimmung unter gleichen Bedingungen durchgeführt (siehe Kapitel 4.3.2.3) und das Lösungsmittel zur Extraktion wurde entsprechend variiert.

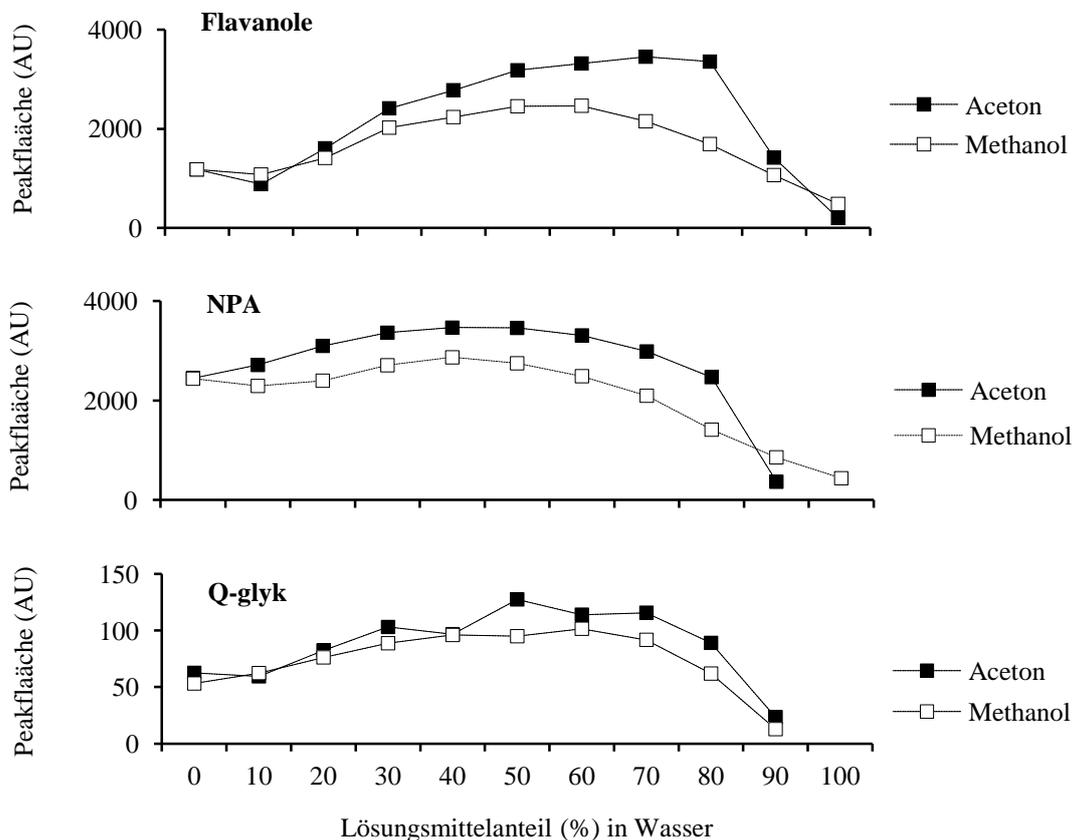


Abbildung 2.1: Extraktgehalte von Flavanolen, *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetinglykosiden in Aceton und Methanol bzw. deren wässrige Mischungen.

Alle drei Substanzgruppen haben die höchsten Extraktgehalte mit Aceton-Wasser-Mischungen. Die in Abbildung 2.1 dargestellten Extraktionskurven von Aceton entsprechen den je Substanzklasse überprüften Einzelsubstanzen. Methanol und Aceton werden in Bezug

auf die zu extrahierende Matrix unterschiedliche Qualitäten zugeschrieben. Aceton eignet sich besonders zur Spaltung von Polyphenol-Protein-Komplexen (Escribano-Bailón und Santos-Buelga, 2003). Kakao enthält etwa 11% Proteine, zudem sind Komplexbildungen zwischen Polyphenolen und Proteinen bzw. Aminosäuren, z.B. während der Fermentation, bekannt (Hansen et al., 1998). Die höheren Extraktgehalte in den Aceton-Wasser-Mischungen könnten unter anderem in der Spaltung dieser Komplexe begründet sein.

Das optimale Extraktionsmittel für Flavanole ist 70% Aceton. Dies bestätigt die bisherige Literatur für Procyanidine (Adamson et al., 1999; Gotti et al., 2006; Gu et al., 2006; Hurst et al., 2011; Miller et al., 2008; Radojic Redovnikovic et al., 2009), widerspricht aber den Angaben für monomere Flavanole, die häufig mit 50-80% Methanol extrahiert werden (Andrés-Lacueva et al., 2008; Cienfuegos-Jovellanos et al., 2009; Payne et al., 2010). Für die Methanol-Wasser-Mischungen sind Extraktionsunterschiede von Flavanolon nach ihrem Polymerisationsgrad festzustellen. Für Catechine eignen sich 60% und für Procyanidine 50% Methanol zur Extraktion. *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren erzielen mit 40-50% Aceton die höchsten Extraktgehalte. Die bisherigen Literaturangaben zur Extraktion von NPA variieren stark, da aus Kakao sowohl mit 70% Aceton als auch mit purem Methanol extrahiert wird (Arlorio et al., 2008; Lechtenberg et al., 2012; Stark et al., 2008) und aus anderen Matrices (z. B. Kaffee, *Arabidopsis thaliana*) mit Methanol-Wasser-Mischungen (70-80%) (Clifford und Knight, 2004; Handrick et al., 2010). Für die Extraktion von Quercetinglykosiden aus Kakao werden ebenfalls wässrige Methanol- (80%) und Aceton-Mischungen (70%) verwendet (Andrés-Lacueva et al., 2008; Sánchez-Rabaneda et al., 2003). In dieser Untersuchung wurden die Quercetinglykoside mit 50% Aceton optimal aus Kakao extrahiert.

Die generell höchsten Extraktgehalte wurden mit 50 und 60% Aceton in der Extraktionslösung erzielt (Abbildung A 1, S. 134). Ein geringer Anteil an Säure zum Extraktionsmittel stabilisiert die extrahierten phenolischen Verbindungen (Counet und Collin, 2003; Gu et al., 2003b), sodass zur Extraktion der Kakaoanalyten in dieser Arbeit ein Aceton/Wasser/Essigsäure-Gemisch in der folgenden Zusammensetzung: 49,5/49,5/1,0 (v+v+v), verwendet wurde.

Extraktionszeit und Zyklen

Die Extraktionszeit übt je nach Substanzgruppe einen unterschiedlich großen Einfluss auf den Extraktgehalt aus (Versuchsdurchführung siehe Kapitel 4.3.2.4). Insbesondere für die Gruppe der Quercetinglykoside (stellvertretend mit Q-arab überprüft) war die Dauer der Extraktion entscheidend (Abbildung 2.2, S. 27), da eine Verlängerung der Extraktionszeit von 10 auf 20 Minuten zu einer Steigerung des Extraktgehaltes um 17% führte. Je nach untersuchter

Ergebnisse und Diskussion

Substanz kann die Extraktausbeute, durch eine Verlängerung der Extraktionszeit, um 7-17% gesteigert werden.

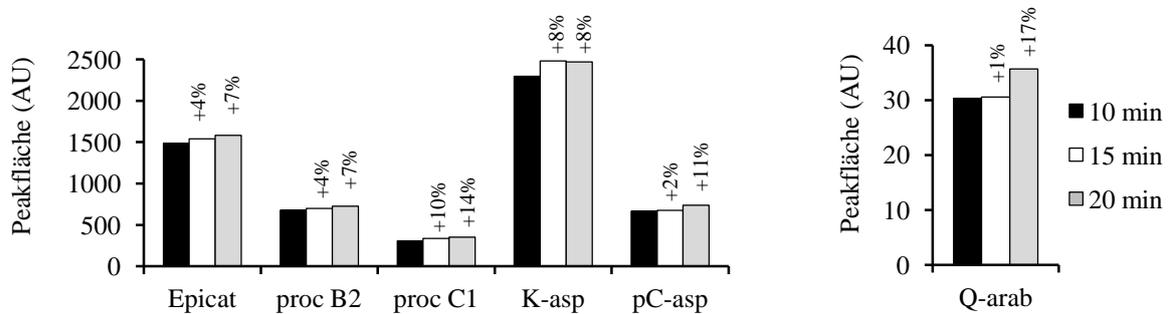


Abbildung 2.2: Extraktgehalte der Extraktionen von 10, 15 und 20 Minuten und prozentuale Steigerung des Extraktgehaltes, bezogen auf den Extraktgehalt von 10 min.

Der Einfluss von einem zweiten Extraktionszyklus auf die Extraktausbeute wurde ebenfalls untersucht (siehe Kapitel 4.3.2.5). Mit Ausnahme der Quercetinglykoside werden die Analyten in einem Extraktionsschritt nicht quantitativ extrahiert. Die Flavanole werden im ersten Extraktionsschritt mit mindestens 95% der Analyten (bezogen auf die Summe aus den beiden durchgeführten Extraktionsschritten) extrahiert (siehe Epicat, proc B2 und proc C1 in Abbildung 2.3). Bei den NPA sind es mindestens 92% (siehe K-asp und pC-asp in Abbildung 2.3). Mit einem Extraktionszyklus beträgt die Ausbeute der Substanzen demzufolge mindestens 92% des Extraktgehaltes (bezogen auf zwei Extraktionszyklen).

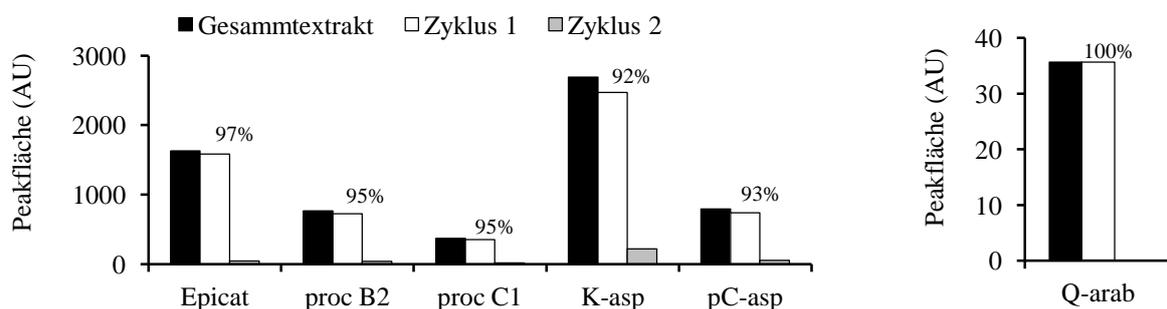


Abbildung 2.3: Extraktgehalte von zwei Extraktionszyklen und der daraus summierte Gesamtextrakt.

Die Extraktion der Kakao-Verarbeitungsproben wurde jeweils mit einem 20 minütigen Extraktionszyklus durchgeführt. So konnte das Extraktvolumen und damit die verbrauchte Lösungsmittelmenge in der Extraktionslösung gering gehalten werden. Der Anteil des

organischen Lösungsmittels ist ein wichtiger Faktor für die nachfolgende Festphasenextraktion. Zu hohe organische Anteile in der Probenlösung führen zu Analytverlusten bei der Festphasenextraktion und müssen gegebenenfalls vorab entfernt bzw. reduziert werden (Papagiannopoulos, 2008; Wollseifen, 2010).

2.1.3 Automatisierte Festphasenextraktion

Die Optimierung der Festphasenextraktion (SPE) und die Untersuchung der Kakao-Verarbeitungsproben erfolgten mittels automatisierter Festphasenextraktion (ASPEC XLi Gilson). Eine Aufreinigung und Aufkonzentrierung der Analyten war notwendig, zur Erhöhung der Signalintensitäten und zum Entfernen von störenden Substanzen, wie z.B. Zucker in den Schokoladenproben oder die Methylxanthine (Koffein und Theobromin) generell. Zudem sollten auch phenolische Verbindungen, wie z.B. Catechin in unfermentierten Kakaoproben, mögliche Epimerisierungsprodukte oder Quercetinglykoside untersucht werden, die teilweise in sehr geringen Konzentrationen vorliegen. Zunächst wurden drei verschiedene SPE-Kartuschenmaterialien für die Analyse der phenolischen Substanzen im Kakao getestet. Die Materialien waren Polyamid, eine C-18 Phase und ein organisches Harz (Polystyrol-Divinylbenzol, HR-X).

Mit der Polyamidphase können die Methylxanthine selektiv von den Analyten abgetrennt werden. Theobromin und Koffein haben eine geringe Affinität zur Polyamidphase und werden durch das Waschen der Kartusche mit bidest. Wasser größtenteils eluiert. Die Polyamidphase wurde demzufolge für die Analytik ausgewählt. Die entsprechenden Chromatogramme des Elutionsprofils der verschiedenen Kartuschenmaterialien (Elutionsmittel: Dimethylsulfoxid/Ameisensäure, DMSO/HCOOH; 99,9/0,1; v+v) sind im Anhang in Abbildung A 3 auf S. 135 dargestellt.

Optimierung der Festphasenextraktion der Kakaoanalyten an Polyamid

Elutionsmittel

Die Aufarbeitung der Kakaoproben wurde für die Polyamidphase (Chromabond PA 6mL/1000mg) optimiert. Zunächst wurden die Eluatgehalte verschiedener Lösungsmittel bzw. Lösungsmittel mit Säurezusatz verglichen (Abbildung 2.4, S. 29). Von den untersuchten Elutionsmitteln hat Dimethylsulfoxid mit Ameisensäurezusatz die stärkste Elutionskraft für die drei Verbindungsgruppen. Für die Substanzgruppe NPA ist der Säurezusatz entscheidend (vgl. reines DMSO und DMSO/HCOOH). Durch die pH-Einstellung des Elutionsmittels werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Carboxylgruppen der NPA und der

Polyamidphase aufgehoben und die Elution ermöglicht. Bei verarbeiteten Kakaoprodukten, insbesondere bei alkalisierten Kakaopulvern, muss der pH-Wert nach der Extraktion bzw. vor der SPE zusätzlich geprüft werden und gegebenenfalls auf den für Kakao üblichen pH-Wert ($\text{pH} < 5,8$, vergleiche pH-Werte in Tabelle A 1, S. 154) eingestellt werden, da ansonsten der Ameisensäurezusatz des Elutionsmittels zur vollständigen Elution zu gering ist.

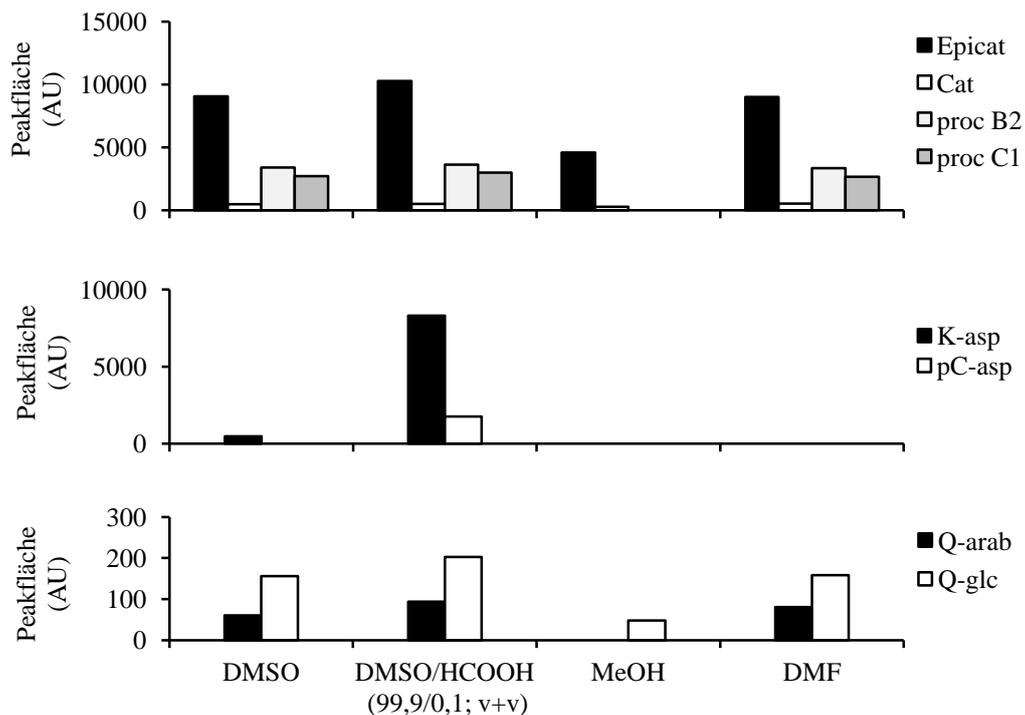


Abbildung 2.4: Eluatgehalte von Flavanolen, *N*-Phenylpropenoyl-*L*-Aminosäuren und Quercetinglykosiden verschiedener Lösungsmittel von der Polyamidkartusche.

Die Optimierung der Festphasenextraktion der Kakaoproben erfolgte für die Polyamidphase und DMSO mit Ameisensäurezusatz (99,9/0,1; v+v) als Elutionsmittel.

Kartuschenkapazität

Die Kapazität der Polyamidkartusche für die phenolischen Verbindungen wurde überprüft. Bei zu hohen Extraktgehalten ist die Kapazität des Kartuschenmaterials nicht ausreichend zur Retention aller Analyten. Dies führt zu Verlusten während der Probenaufgabe und damit zu schlechten Reproduzierbarkeiten. Hierfür wurde ein Extrakt der Kakaoprobe hergestellt. Davon wurden verschiedene Volumina, entsprechend einer Kakaoeinwaage von 0,4 bis 3,2 g

nicht entfettetem Kakao, auf die Kartuschen aufgetragen. Die genauen Angaben zur Versuchsdurchführung sind in Kapitel 4.3.3.2 aufgeführt.

Die Peakflächen der Eluate wurden zum Vergleich auf eine Einwaage von 1 g normiert. In Abbildung 2.5 (S. 30) sind die Ergebnisse für Epicat, proc B2, K-asp und Q-glc dargestellt. Die Ergebnisse gelten für eine Polyamid-SPE-Kartusche mit 6 mL Materialvolumen bzw. 1000 mg Materialgewicht.

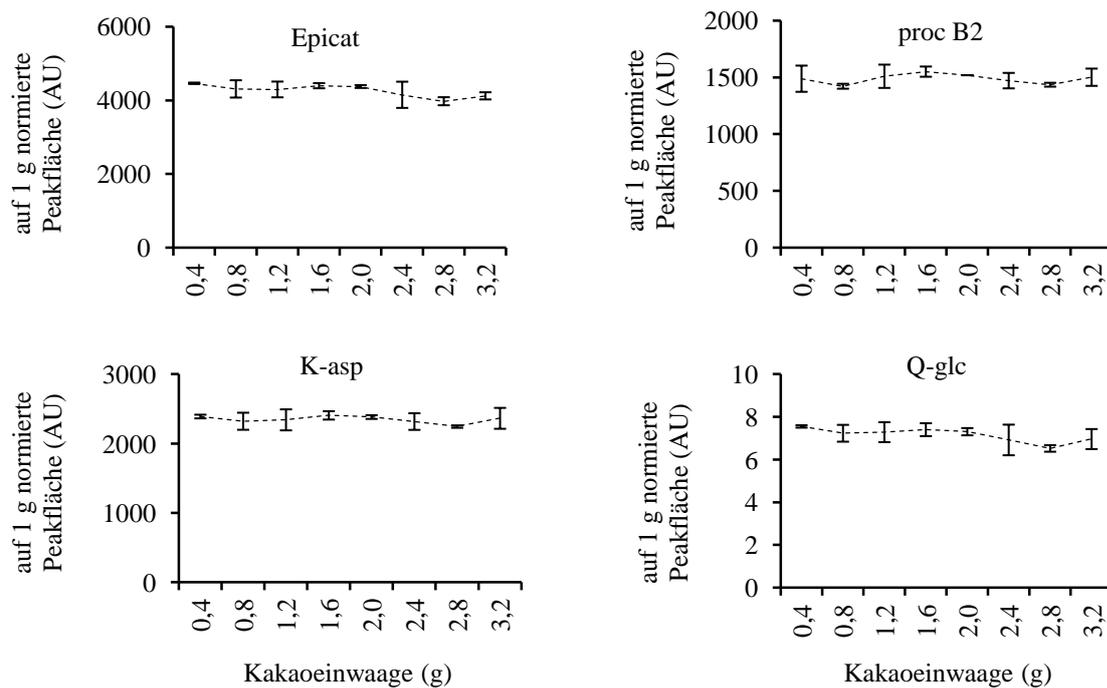


Abbildung 2.5: Kapazität der Polyamidkartusche (1000 mg/6 mL) für Epicat, proc B2, K-asp und Q-glc.

Die Extraktgehalte zeigen, dass der hier untersuchte fermentierte Kakao bis etwa 2 g Einwaage keine Analytverluste aufweist. Bei einer Einwaage von mehr als 2 g dieser Probe ist eine leichte Abnahme der Peakflächen für Epicat und Q-glc zu erkennen. Hier ist zu beachten, dass es sich um nicht entfetteten Kakao handelt. Bei vorab entfetteten Kakaoproben muss die Einwaage dementsprechend um etwa die Hälfte reduziert werden (Fettgehalt ~54%), da sich die phenolischen Verbindungen im fettfreien Kakaoanteil befinden. Auf der Grundlage der Ergebnisse wurden die Einwaagen der Proben aus anderen Verarbeitungsstufen angepasst, in Abhängigkeit von Fettgehalt und Verarbeitungsgrad. Die in dieser Arbeit verwendeten Einwaagen der Kakao-Verarbeitungsproben sind in Kapitel 4.3.2 aufgeführt.

Maximal möglicher Acetongehalt in der Probelösung

Bei zu hohen Anteilen von organischem Lösungsmittel im Extrakt ist die vollständige Retention der Analyten am Kartuschenmaterial nicht gegeben, da die Elutionskraft des Lösungsmittels die Retention an der Polyamidphase übersteigt. Im folgenden Versuch wurde daher der maximal mögliche Acetongehalt in der Probelösung untersucht. Dafür wurde ein Kakaoextrakt hergestellt und mit verschiedenen Acetonkonzentrationen von 5% Schritten bis zu 45% der organischen Komponente vermischt (Kapitel 4.3.3.3).

Je nach Substanzgruppe sind unterschiedlich hohe organische Anteile in der Probelösung tolerierbar. In Abbildung 2.6 sind die Extraktgehalte, in Abhängigkeit des organischen Anteils in der Probelösung, für Epicat, proc B2, K-asp und Q-glc dargestellt. Die entsprechenden Kurven der Substanzen Cat, proc C1, pC-asp und Q-arab sind in Abbildung A 2 auf S. 134 dargestellt.

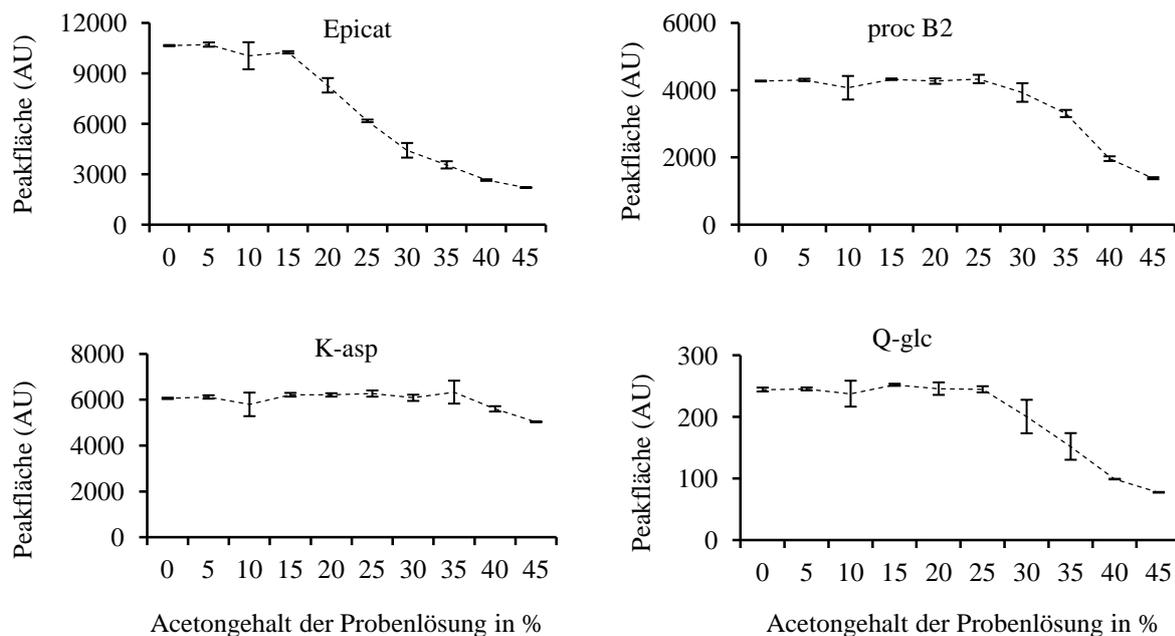


Abbildung 2.6: Extraktgehalte von Epicat, proc B2, K-asp und Q-glc, in Abhängigkeit des Acetongehaltes der Probelösung.

Für die monomeren Flavane ist maximal ein Acetonanteil von 15% tolerierbar, bei höheren Anteilen des Lösungsmittels ist eine Abnahme der Konzentration im Eluat zu erkennen. Mit steigendem Polymerisationsgrad ist bei den Flavanolinen eine Erhöhung des Lösungsmittelanteils möglich (proc B2 max. 25%, proc C1 max. 35%). Für die NPA wurden K-asp und pC-asp untersucht. Beide Substanzen werden bis maximal 35% Aceton in der Probelösung vollständig am Polyamid retiniert. Q-glc und Q-arab zeigen bis maximal 25% keine Abnahme

der Konzentration im Eluat. Der Acetonanteil in der Probenlösung wurde auf der Grundlage dieser Ergebnisse vor der SPE jeweils mit bidest. Wasser auf ~12% verdünnt.

Benötigte Volumina für die Elution der Kakaoanalyten von der Polyamidkartusche

Abschließend wurden die zur Elution der Kakaoanalyten von der Polyamidkartusche benötigten Elutionsvolumina überprüft. Dafür wurden fraktionierte Elutionen mit verschiedenen Volumina des Elutionsmittel (DMSO/HCOOH; 99,9/0,1; v+v) durchgeführt (Kapitel 4.3.3.4). Abbildung 2.7 stellt die Extraktgehalte der einzelnen Fraktionen als Balkendiagramme dar.

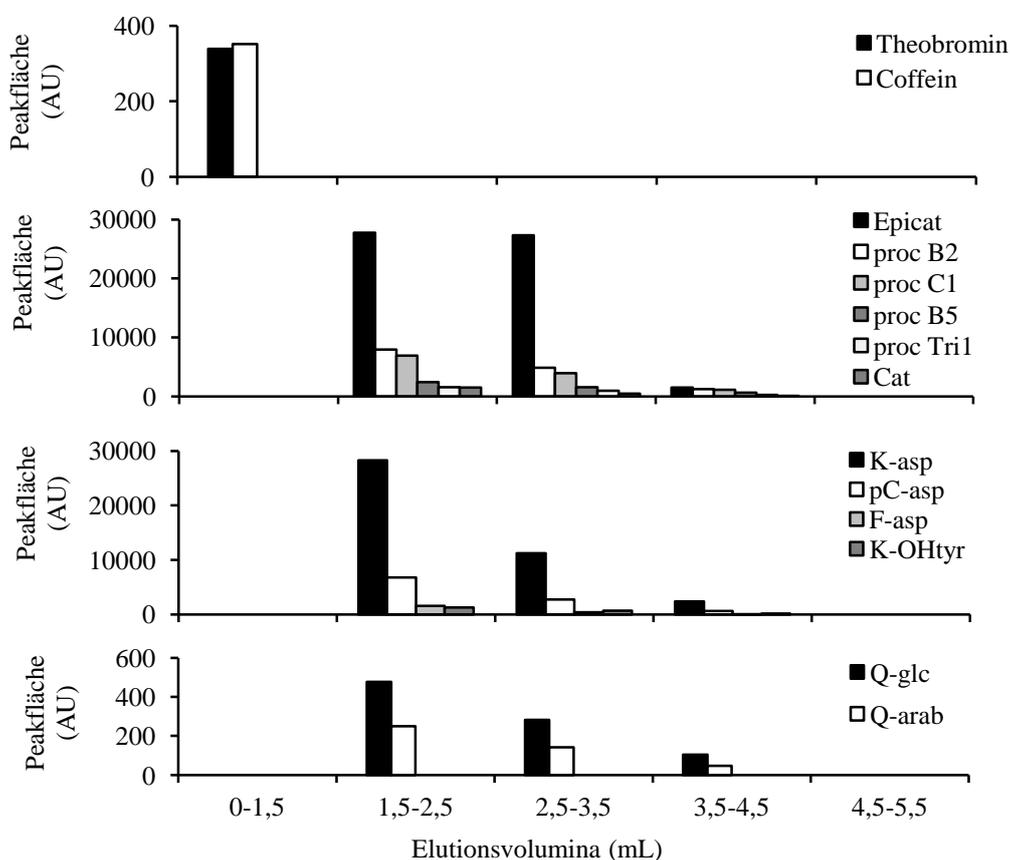


Abbildung 2.7: Lösungsmittelvolumina zur Elution der Kakaoanalyten von der Polyamidkartusche (1000 mg/6 mL).

Mit den ersten 1,5 mL des Elutionsmittels werden die noch auf der Kartusche absorbierten Methylxanthine eluiert. Es ist auch zu erkennen, dass kein Durchbruch der Flavanole, NPA und Q-glyk stattfindet, da sich keine der Substanzen in dieser Fraktion befindet. Demzufolge wurden die ersten 1,5 mL verworfen. Der Hauptteil der Analyten befindet sich in den nächsten

beiden Fraktionen von jeweils 1 mL Eluat. Mit 3 mL waren alle Analyten vollständig von der Kartusche eluiert. Zur Elution der Analyten der Kakao-Verarbeitungsproben wurden jeweils die ersten 1,5 mL verworfen. Um sicher zu stellen, dass die Analyten vollständig von der Kartusche eluiert werden, wurden zur Extraktion 4 mL Eluat aufgefangen.

Wiederfindung

Die Wiederfindung der Analyten nach der Festphasenextraktion wurde untersucht. Dafür wurden die auf 1 g normierten Peakflächen von Proben ohne und nach einer Festphasenextraktion auf der Polyamidphase verglichen. In Tabelle 2.3 sind die prozentualen Substanzgehalte in den Proben der SPE verglichen mit den Gehalten des Rohextraktes aufgeführt. Für Q-gal konnte keine Wiederfindung ermittelt werden, da diese Substanz in den Kakaobohnen Java1 nicht quantifizierbar ist. Q-arab zeigt eine Wiederfindung von 123%. Q-arab ist in den Java1 Kakaobohnen in geringen Konzentrationen enthalten, wodurch möglicherweise die hohe Wiederfindung nach der SPE zu erklären ist.

Tabelle 2.3: Prozentuale Extraktgehalte nach der Aufreinigung und Aufkonzentrierung mit Polyamid-Festphasenextraktion verglichen mit dem Rohextrakt.

	Cat	Epicat	proc B2	proc B5	proc C1	proc Tri1	proc D	K- asp	pC- asp	F- asp	K- OHtyr	pC- OHtyr	K- tyr	pC- tyr	Q- glc	Q- arab
%	102	99	104	98	105	105	101	97	98	99	105	106	98	109	99	123

2.1.4 Reproduzierbarkeit der Probenaufarbeitung

Die Probenaufarbeitung der quantifizierten Verbindungen wurde durch die Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Konzentrationen (über den Peakflächenvergleich) und Retentionszeiten validiert. Dafür wurden drei Aufarbeitungen innerhalb eines Tages und drei Aufarbeitungen innerhalb von drei aufeinanderfolgenden Wochen ausgewertet. Die entsprechenden relativen Standardabweichungen sind in der nachfolgenden Tabelle 2.4 (S. 34) aufgeführt.

Tabelle 2.4: Relative Standardabweichungen der Retentionszeiten und Peakflächen der quantifizierten Substanzen, aus drei Probenaufarbeitungen innerhalb eines Tages sowie von drei aufeinanderfolgenden Wochen.

Substanzen	Retentionszeit rel. SD (%) innerhalb eines Tages	Peakfläche rel. SD (%) innerhalb eines Tages	Retentionszeit rel. SD (%) innerhalb von drei Wochen	Peakfläche rel. SD (%) innerhalb von drei Wochen
Flavanole				
Cat	0,4	0,4	0,1	1,8
Epicat	0,2	1,2	0,3	0,9
proc B2	0,3	2,5	0,1	1,8
proc B5	0,7	2,1	0,2	3,5
proc C1	0,2	1,3	0,3	1,7
proc Trimer1	0,3	2,0	0,1	6,2
proc D	0,1	2,4	0,3	6,3
N-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren				
K-Asp	0,4	1,1	0,1	1,9
pC-Asp	0,3	0,8	0,1	0,5
F-asp	0,3	1,2	0,3	2,3
K-OHtyr	0,1	3,7	0,3	0,3
K-tyr	0,1	0,9	0,2	0,8
pC-OHtyr	0,1	1,7	0,2	3,0
pC-tyr	0,1	1,9	0,3	0,4
Quercetinglykoside^a				
Q-glc	0,1	1,6	0,2	2,2
Q-arab	0,1	2,6	0,1	4,2

^a Für die Substanz Quercetingalactosid konnte keine Validierung erfolgen, da sie in den Kakaoproben Java1 nicht quantifizierbar ist.

2.1.5 Quantifizierung

2.1.5.1 Flüssigchromatographie mit UV-DAD

Die Quantifizierung der Analyten in den Kakao-Verarbeitungsproben erfolgte mit der chromatographischen Trennmethode RP-100 (Kapitel 4.3.6.1). Abbildung 2.8 (S. 35) stellt die Chromatogramme des Extraktes der fermentierten Kakaobohnen Java1 dar. Die vorläufige Identifizierung der Substanzen (über Molekülmasse, Fragmentierungsmuster und UV-DAD-Spektren) für die keine Referenzverbindungen vorhanden waren, erfolgte anhand einer vergleichenden Messung der Methode RP-100 mittels LC-MS (Geräteparameter siehe Kapitel 4.3.6.2).

Ergebnisse und Diskussion

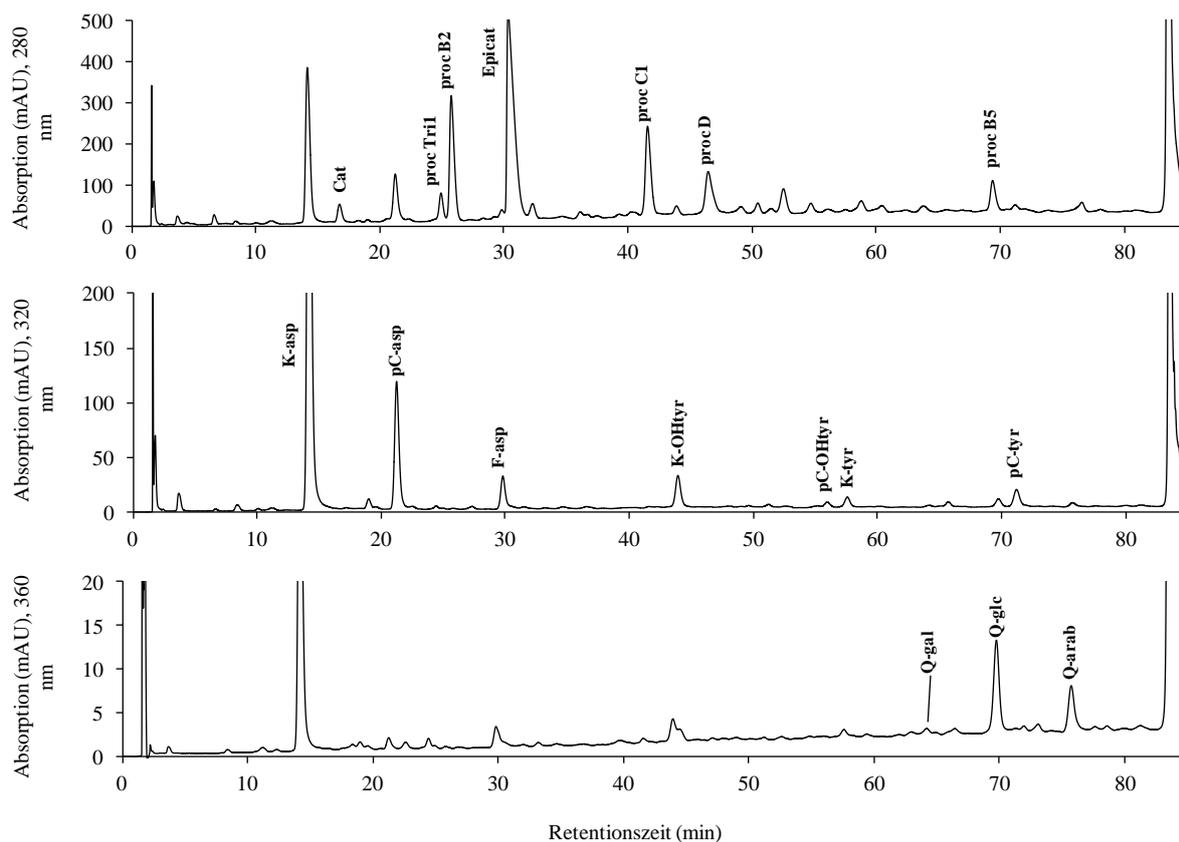


Abbildung 2.8: Zur Quantifizierung verwendete HPLC-Trennung eines Extraktes der fermentierten Kakaobohnen Java1.

Die Substanzen wurden mit externer Kalibrierung über Referenzsubstanzen quantifiziert. Die Quantifizierung der Flavanole erfolgte dabei als Epicatechinäquivalente bei 280 nm. Die auf die molare Masse bezogene Extinktion ist für die Catechine und B-Typ Procyanidine identisch. Die Extinktion ergibt sich als Summe der Absorption der monomeren Einheiten und wird durch die B-Typ-Bindung im Molekül nicht beeinflusst (Lea, 1978). Dadurch ist es möglich B-Typ Procyanidine ebenso wie die Monomere mit Epicatechin zu quantifizieren. Die Quantifizierung der NPA erfolgte als Äquivalente von Kaffeesäure (für K-asp, F-asp, K-OHtyr und K-tyr bzw. p-Coumarsäure (für pC-asp, pC-OHtyr und pC-tyr) bei 320 nm. Die Quercetinglykoside wurden als Äquivalente von Quercetin-3-O-glucosid bei 360 nm quantifiziert. Dabei wurden die Ergebnisse von Q-arab über die molare Masse korrigiert, da es sich hier um ein Pentosid anstelle eines Hexosids handelt. Die quantifizierten Gehalte werden in mg/g fettfreie Trockenmasse (ff TM) angegeben. Die Angaben für die Gesamtgehalte (Flavanole, NPA, Q-glyk) beziehen sich auf die Summe aller in der jeweiligen Gruppe quantifizierten Leitsubstanzen.

2.1.5.2 Enantioselektive Trennung der Catechine mit Kapillarelektrophorese

Die Enantiomere von Catechin und Epicatechin wurden ebenfalls quantifiziert. Dafür wurde eine enantioselektive Trennung mittels Kapillarelektrophorese (CE-DAD) angewendet, basierend auf Vorarbeiten von Kofink und Ritter (Kofink et al., 2007a; Ritter, 2010b) aus dem eigenen Arbeitskreis (Methodenparameter siehe Kapitel 4.3.7.1).

Die kapillarelektrophoretische Trennung beruht auf unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten von Substanzen in einem elektrischen Feld. Da sich Enantiomere ausschließlich in der sterischen Ausrichtung im Molekül unterscheiden, ist die elektro-phoretische Mobilität identisch. Zur Enantiomerentrennung werden daher dem Puffer chirale Selektoren zugesetzt, die eine Trennung ermöglichen. Für die enantioselektive Trennung der Catechine wurde Hydroxypropyl- γ -Cyclodextrin verwendet. Cyclodextrine sind ebenfalls chirale Moleküle, welche die Erkennung und damit die Trennung chiraler Analyten ermöglichen. Die Catechine komplexieren mit den Cyclodextrinen in der Pufferlösung, wobei Diastereomerenkomplexe entstehen. Aufgrund von unterschiedlichen Komplexbildungskonstanten (je nach sterischer Ausrichtung resultieren unterschiedlich starke Wechselwirkungen zwischen Analyten und Cyclodextrinen) und/oder unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten der Diastereomerenkomplexe werden die Enantiomere voneinander getrennt (Chankvetadze und Blaschke, 2001). Abbildung 2.9 stellt das Trennergebnis in einem Extrakt der fermentierten Kakaobohnen Java1 dar.

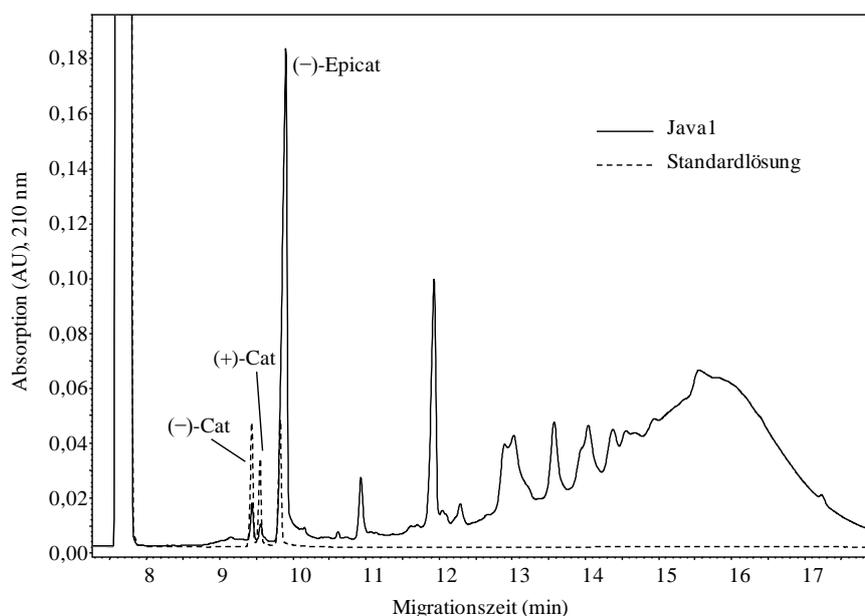


Abbildung 2.9: Elektropherogramme eines Extraktes der fermentierten Kakaobohnen Java1 und der Standardverbindungen (-)/(+)-Catechin und (-)-Epicatechin.

Die Quantifizierung der Enantiomere erfolgte über eine externe Kalibrierung der jeweiligen Referenzsubstanzen. In fast allen untersuchten Proben konnten (+)- und (-)-Catechin, sowie (-)-Epicatechin detektiert und quantifiziert werden. Für das Vorhandensein von (+)-Epicatechin konnten in keiner der Proben Hinweise gefunden werden. (+)-Epicatechin ist nicht als Referenzsubstanz erhältlich, wodurch eine eindeutige Zuordnung zusätzlich erschwert war.

2.1.5.3 Enantioselektive Trennung der Catechine mit Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie

Zusätzlich zur Enantiomerentrennung der Catechine mit CE-DAD wurde eine enantioselektive HPLC-Methode entwickelt, die mit Massenspektrometrie zu koppeln ist. Ausgangspunkt war die enantioselektive HPLC-Methode mit elektrochemischer Detektion nach Ritter et al. (2010a). Dabei werden die Catechin-Enantiomere über eine mit Cyclodextrinen modifizierte HPLC-Säule (Nucleodex PM- γ -Cyclodextrin) getrennt. In der Methode nach Ritter et al. (2010a) werden die Analyten elektrochemisch detektiert, demzufolge sind Puffersalze (NaH_2PO_4) im Fließmittel notwendig. Diese nichtflüchtigen Puffersalze sind jedoch nicht mit Massenspektrometern kompatibel, da während der Ionisierung das Lösungsmittel verdunstet und sich die Salze im System ablagern. Das hier verwendete massenspektrometrische System ist zusätzlich mit einem UV-Diodenarray-Detektor ausgestattet, weshalb Puffersalze hier nicht nötig sind. Zur enantioselektiven Analyse wurde daher ein Lösungsmittelsystem aus bidest. Wasser und Acetonitril jeweils mit Essigsäurezusatz (99/1; v+v) verwendet. Abbildung 2.10 (S. 38) zeigt die Massenspuren der Catechine (m/z 289) der enantioselektiven Trennung der Extrakte von fermentierten (Java1) und gerösteten (150 °C/30 min) Kakaobohnen.

Ergebnisse und Diskussion

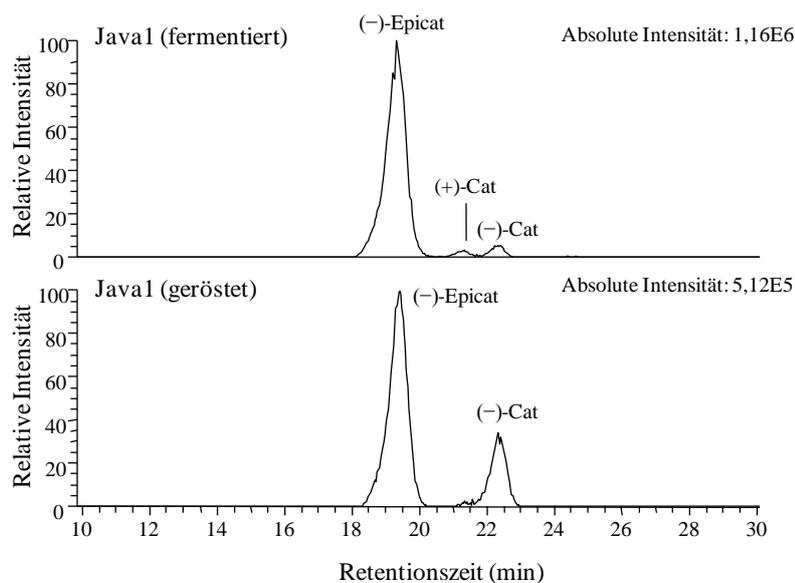


Abbildung 2.10: Massenspur m/z 289 von Catechin und Epicatechin der enantioselektiven LC-MS-Trennung von Extrakten der ungerösteten und gerösteten Kakaobohnen Java1.

Die enantioselektive LC-MS bestätigt die Ergebnisse der CE-Analyse, dass (+)- und (-)-Catechin, sowie (-)-Epicatechin in den untersuchten Kakaoproben vorhanden ist. Hinweise für das Vorhandensein von (+)-Epicatechin konnten auch mit der LC-MS-Analyse in diesen Proben nicht gefunden werden. Der Einsatz der enantioselektiven LC-MS Trennung wäre in Hinblick auf Bioverfügbarkeitsstudien einsetzbar. Die Metabolite könnten dabei direkt enantioselektiv analysiert werden und nicht erst nach enzymatischer Hydrolyse. Die Kopplung mit Massenspektrometrie könnte eine Substanzcharakterisierung der Metabolite ermöglichen, für die Referenzverbindungen fehlen. Cyclodextrin-Trennsäulen im UHPLC-Maßstab wären zudem durch eine Erhöhung der Trennstufen vorteilhaft, da durch die enantioselektive Analyse die Anzahl an Analyten erhöht wird.

2.2 LC-MS-Untersuchung des Substanzprofils fermentierter Kakaobohnen

Phenolische Verbindungen werden typischerweise mit Umkehrphasen-Chromatographie (RP-HPLC) gekoppelt mit UV-Diodenarray-Detektion (UV-DAD) und Massenspektrometrie analysiert. Dabei erfolgt zunächst die Trennung der einzelnen Verbindungen mit RP-HPLC (Wollgast et al., 2001). Für die Auftrennung der Kakaoanalyten in dieser Arbeit wurde eine C-18 HPLC-Säule mit polarem endcapping verwendet (Aqua, Phenomenex), welche für Procyanidine aus Kakao und anderen Lebensmittelmatrizes eine gute sterische Selektivität aufweist (Papagiannopoulos, 2008). Auch die Normalphasen- und die Diolphasen-Chromatographie werden zur Analytik von Polyphenolen genutzt. Diese eignen sich jedoch zur Trennung von Proanthocyanidinen nach ihrem Polymerisationsgrad und weniger zur Analyse einzelner Verbindungen (Hammerstone et al., 1999; Kelm et al., 2006). Im Anschluss an die Chromatographie folgt die massenspektrometrische Analyse, und es werden die Molekülmasse und gegebenenfalls das Muster der Fragmentierung als weitere Daten zur Substanzcharakterisierung erhalten.

Das Elutionsverhalten in der Chromatographie (z.B. Polaritätsunterschiede), die UV-DAD-Spektren (verschiedene Absorptionsbanden je Molekülaufbau), die Molekülmasse (Summenformel), das Fragmentierungsmuster (charakteristische Molekülbrüche je Substanz bzw. Substanzklasse) und der Vergleich mit Literaturdaten ermöglichen die vorläufige Identifizierung von Substanzen. Referenzsubstanzen für die Identifizierung standen nur für sechs Verbindungen zur Verfügung (Protocatechusäure, Catechin, Epicatechin, Procyanidin B1, B2 und Quercetin-3-O-glucosid). Eine Substanzisolierung mit anschließender Strukturaufklärung wurde nicht durchgeführt. Demnach handelt es sich bei allen, nicht über Referenzsubstanzen abgesicherte Verbindungen, um eine vorläufige Identifizierung.

Für die Untersuchung der phenolischen Verbindungen standen ein Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometer (FT-ICR-MS) und ein Massenspektrometer mit einer linearen Ionenfalle (IT-MS von Ion trap) zur Verfügung, beide gekoppelt an ein flüssigchromatographisches System mit UV-DAD. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte mit einem Extrakt von fermentierten Kakaobohnen der Herkunft Java (Java1). Für die Untersuchung wurde eine fermentierte Kakaoprobe gewählt, da Oxidationsvorgänge während der Fermentation zur Bildung neuer Verbindungen führen können und fermentierter Kakao zudem das Ausgangsprodukt der weiteren Verarbeitung darstellt. Der Extrakt dieser Probe wurde jeweils mit den beiden genannten Massenspektrometern, im Anschluss an die unter gleichen Bedingungen durchgeführte Chromatographie (Kapitel 4.3.6.2, Methode RP-150) analysiert. Die Analysenergebnisse der FT-ICR-MS und der IT-MS wurden miteinander kombiniert. Dabei wurden mit der hochauflösenden FT-ICR-MS die exakten Massen gemessen. Die maximale Abweichung der experimentell analysierten Masse von der theoretischen Masse wurde dabei auf 2 ppm festgelegt. Mit den Daten der Fragmentierungsmuster der IT-MS-Analyse konnten einige dieser Verbindungen näher charakterisiert werden.

Massenspektrometrie

In der massenspektrometrischen Analyse werden zunächst Ionen in der Gasphase erzeugt, welche die Bestimmung der Molekülmasse durch Auftrennen nach dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) ermöglichen. Die Ladung ist Voraussetzung zur gezielten Manipulation (z.B. Beschleunigung) der Substanzen und damit die Auftrennung und Messung von m/z . Bei beiden verwendeten massenspektrometrischen Systemen wurde die Elektrospray-Ionisierung (ESI) genutzt, welche sich gut für hitzeempfindliche, polare Moleküle aus wässrigen Lösungen eignet. Ein weiteres Merkmal der ESI ist, dass Moleküle einfach oder mehrfach geladen werden können, wodurch auch Verbindungen mit einem höheren Molekulargewicht von bis zu einigen Kilodalton analysiert werden können (Fenn et al., 1990), dies ist insbesondere für die höher polymerisierten Verbindungen aus der Gruppe der Flavanole vorteilhaft. In der vorliegenden Arbeit wurde, aufgrund der leichteren Deprotonierbarkeit der Hydroxylgruppen der phenolischen Verbindungen (mit Ausnahme der Anthocyane, welche positiv ionisiert werden), die negative Ionisierung gewählt (Fulcrand et al., 2008). Bei der ESI wird der Eluentenstrom der HPLC in viele kleine Tröpfchen versprüht. Diese Tröpfchen tragen auf ihrer Oberfläche Ladung, die je nach der an der Kapillare angelegten Spannung positiv oder negativ ist. Durch die Oberflächenvergrößerung aufgrund der Versprühung und durch die hohen Temperaturen verdampft der Eluent und es verbleiben die zu analysierenden Molekülonen (Molekülanionen bei negativer Ionisierung $[M-H]^-$), die nach m/z aufgetrennt und bestimmt werden. Bei mehrfach geladenen Molekülen ergibt sich m/z analog dazu wie folgt: $[M-2H]^{2-}$, $[M-3H]^{3-}$, etc. (Fenn et al., 1990). Die Ionisierungsparameter wurden bei beiden Massenspektrometern vor der Analyse auf die Substanz Epicatechin optimiert, da Flavanole die Hauptsubstanzgruppe in Kakao sind und im Fokus der Analytik standen. Die entsprechenden Parameter der Ionisierung sind in den Kapiteln 4.3.6.2 und 4.3.6.3 für die IT-MS- und die FT-ICR-MS-Analyse aufgeführt.

Die FT-ICR-MS bietet derzeit die höchste Massenauflösung und damit eine Bestimmung der Summenformel. Wegen der hohen Kosten ist diese Technik aber wenig verbreitet. Nicht hochauflösende Massenspektrometer bestimmen Massen mit Genauigkeiten von etwa 1 Da, mit der FT-ICR-MS ist eine Analyse bis zur 4. Nachkommastelle möglich (Marshall und Hendrickson, 2008). Fragmentierungsdaten der IT-MS können dagegen Strukturelemente der Substanzen näher charakterisieren. Beispielsweise können Verbindungen mit gleicher Summenformel aufgrund der Fragmentierung unterschieden werden (Gu et al., 2003a).

Die hohe Massengenauigkeit der FT-ICR-MS beruht darauf, dass Auftrennung und Detektion von m/z nicht getrennt voneinander ablaufen, sondern gleichzeitig über die Analyse der Zyklotronfrequenz (=Umlauffrequenz) erfolgen. Dafür werden die Ionen in die ICR-Zelle überführt. Darin herrscht ein konstantes Magnetfeld, das die Ionen auf bestimmte Kreisbahnen zwingt. Die Umlauffrequenz der Ionen ist dabei umgekehrt proportional zu m/z . Zur Detektion werden Ionen gleicher Masse, jeweils mit einem Wechselstromimpuls mit

passender Frequenz, beschleunigt. Dadurch vergrößern sich die Kreisbahnen der Ionen, aber die Umlauffrequenz bleibt gleich. Die Ionen verursachen durch den vergrößerten Radius Wechselstrom an den Detektorplatten der ICR-Zelle. Dabei stellt die Resonanz des erzeugten Wechselstroms ein Maß für die Konzentration dar und die Frequenz des Wechselstroms ist charakteristisch für m/z . Mit Hilfe der Fouriertransformation ist es möglich, die gemessenen Zeit-Signale (Umlaufzeit) aller auftretenden Ionen in Frequenz zu übersetzen, welche gleich m/z ist und es resultiert das Massenspektrum (Marshall et al., 1998). Ein entscheidender Parameter für die Genauigkeit der FT-ICR-MS-Analyse ist die Stärke des Magneten. Der Magnet des in dieser Arbeit verwendeten FT-ICR-MS des Forschungszentrum Jülich hat eine Stärke von 7 Tesla.

2.2.1 Ergebnisse der Analyse mit Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz- und Ionenfallen-Massenspektrometrie

Mit der LC-MS-Analyse (FT-ICR-MS und IT-MS) konnten in den fermentierten Kakaobohnen Java1 insgesamt 216 Substanzen aus hauptsächlich drei Verbindungsklassen (195 Flavanole, 17 *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetin sowie 3 Quercetinglykoside) detektiert werden. Insbesondere in der Gruppe der Flavanole wurden diverse bereits für Kakao beschriebene Verbindungen bestätigt und neue Substanzen (z.B. Prodelphinidine, Propelargonidine, Flavanolglykoside und Fermentationsprodukte) vorläufig identifiziert. Im HPLC-UV-Chromatogramm der IT-MS-Analyse des Extraktes der Kakaobohnen Java1 (Abbildung 2.11, S. 43) konnten 53 Substanzpeaks zugeordnet werden (Tabelle 2.5). Darunter sind Protocatechusäure, 38 Flavanole und Flavanolderivate, zehn *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetin sowie drei Quercetinglykoside. Die Erläuterungen und Angaben zur vorläufigen Identifizierung folgen unterteilt in die verschiedenen Verbindungsgruppen.

Tabelle 2.5: Substanzzuordnung der phenolischen Verbindungen in den HPLC-UV-Chromatogrammen der IT-MS-Analyse eines Extraktes der Kakaobohnen Java1.

Nr. ^a	Substanz	Nr. ^a	Substanz
1	Procyanidin B-Typ Trimer	28	Procyanidin B-Typ Trimer
2	Protocatechusäure	29	Procyanidin B-Typ Pentamer
3	<i>cis</i> -Kaffeensäureaspartat	30	Procyanidin B-Typ Tetramer
4	Prodelphinidin A-Typ Trimer	31	<i>trans</i> -p-Coumarsäurehydroxytyrosin
5	Procyanidin B1	32	<i>trans</i> -Kaffeensäuretyrosin
6	<i>trans</i> -Kaffeensäureaspartat	33	Procyanidin B-Typ Heptamer
7	Catechin	34	Procyanidin B-Typ Hexamer
8	Propelargonidin A-Typ Dimer-hexosid	35	Procyanidin B-Typ Heptamer
9	<i>trans</i> -Kaffeensäureglutamat	36	Procyanidin A-Typ Dimer
10	<i>trans</i> -p-Coumarsäureaspartat	37	Quercetingalactosid
11	Procyanidin B-Typ Dimer-hexosid	38	Ethyl(epi)catechin Trimer
12	Procyanidin B-Typ Trimer	39	Procyanidin B5
13	Procyanidin B2	40	Quercetinglucosid
14	<i>trans</i> -Coumarsäureglutamat	41	<i>trans</i> -p-Coumarsäuretyrosin
15	Dehydrocatechin B-Typ Dimer	42	Ethyl(epi)catechin Dimer
16	<i>trans</i> -Ferulasäureaspartat	43	Procyanidin B-Typ Trimer
17	Epicatechin	44	Quercetinarabinosid
18	Procyanidin B-Typ Tetramer	45	Procyanidin A-Typ Dimer
19	Procyanidin B-Typ Trimer-hexosid	46	Procyanidin B-Typ Pentamer
20	Dehydrocatechin B-Typ Dimer	47	Dehydrocatechin B-Typ Dimer
21	Dehydrocatechin B-Typ Dimer	48	Procyanidin B-Typ Tetramer
22	Procyanidin A-Typ Trimer	49	Ethyl(epi)catechin Dimer
23	Procyanidin C1	50	Quercetin
24	<i>trans</i> -Kaffeensäurehydroxytyrosin	51	Dehydrocatechin A-Typ Dimer
25	Procyanidin D	52	Ethyl(epi)catechin Dimer
26	Procyanidin B-Typ Tetramer	53	Ethyl(epi)catechin Dimer
27	Procyanidin B-Typ Pentamer		

^a Nr. beziehen sich auf die HPLC-UV-Chromatogramme in Abbildung 2.11, S. 43.

Ergebnisse und Diskussion

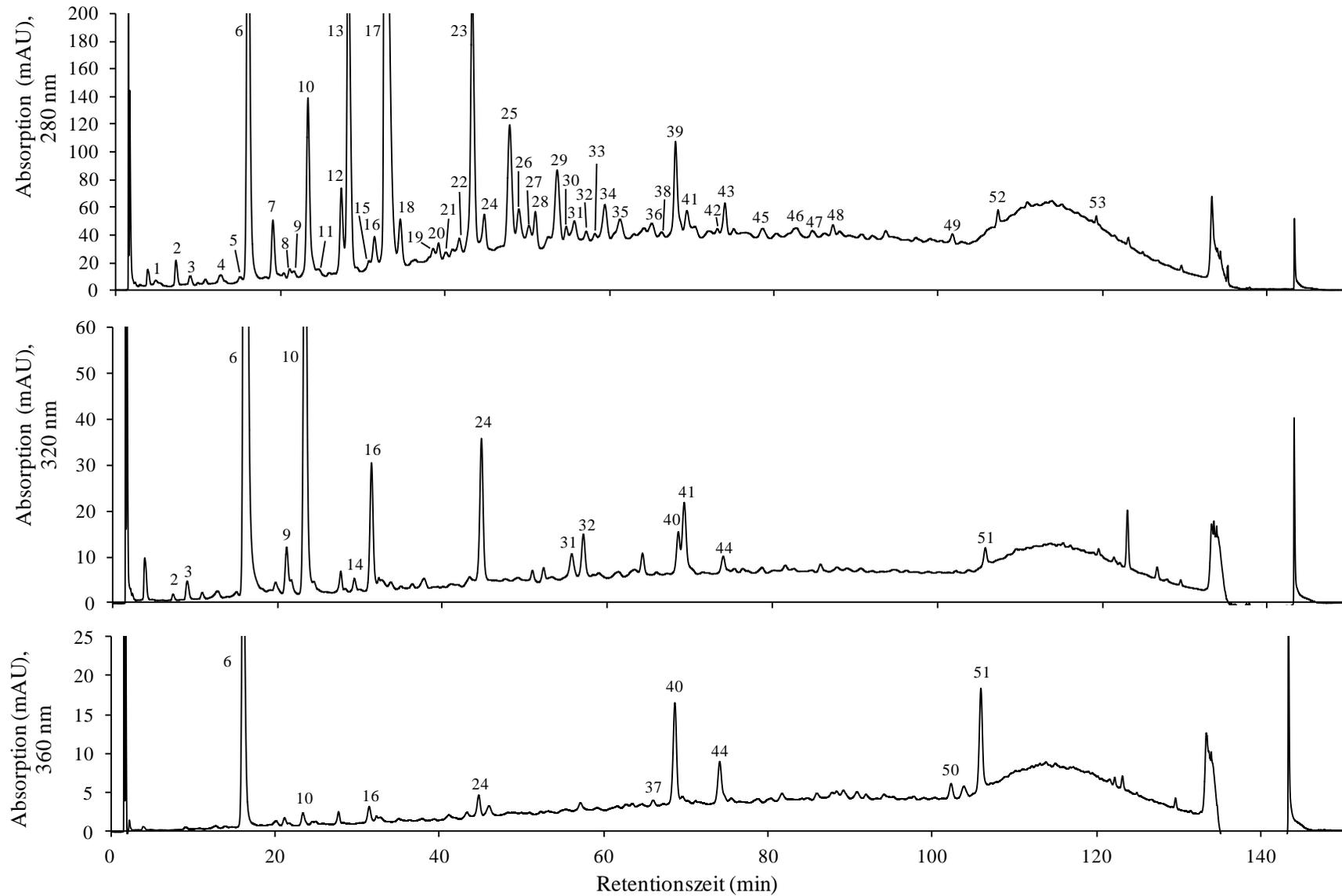


Abbildung 2.11: HPLC-UV-Chromatogramme eines Extraktes der fermentierten Kakaobohnen Java1 bei 280, 320 und 360 nm. Die Nummerierung der Substanzpeaks bezieht sich auf Tabelle 2.5, S. 42.

2.2.1.1 Flavanole und Flavanolglykoside

Die Messung der akkuraten Masse mit FT-ICR-MS detektierte insgesamt 195 mögliche Isomere von 34 verschiedenen Summenformeln aus der Gruppe der Flavanole und Flavanolderivate. Diese summieren sich aus 2 monomeren Flavanolen, 55 B-Typ Procyanidinen, 33 A-Typ Procyanidinen, 18 A- bzw. B-Typ Prodelphinidinen, 17 A- bzw. B-Typ Propelargonidinen, 45 Flavanolglykosiden und 25 Ethyl(epi)catechinen (Tabelle 2.7, S. 45). Einige der hier vorläufig identifizierten Verbindungen sind verglichen mit den bisher für Kakao beschriebenen Flavanolen nur in relativ geringen Konzentrationen vorhanden. Aus diesem Grund sind teilweise auch keine Fragmentierungsdaten zur weiteren Charakterisierung vorhanden. Die Ergebnisse werden nachfolgend, unterteilt nach den verschiedenen Untergruppen der Flavanole bzw. Flavanolderivate, dargestellt.

Monomere Flavanole

Catechin und **Epicatechin** wurden über das UV-DAD-Spektrum, die Fragmentierungsdaten der IT-MS-Analyse und die exakte Molekülmasse m/z 289,0718 für die Summenformel $C_{15}H_{14}O_6$ zugeordnet (FT-ICR-MS, Massenspur **2**, S. 136). In Abbildung 2.12 ist das entsprechende UV-DAD-Spektrum mit den zwei Absorptionsmaxima bei etwa 228 und 280 nm dargestellt. Dieses Spektrum gilt, mit Ausnahme von einer Verbindung, für alle hier analysierten Flavanole bzw. -derivate.

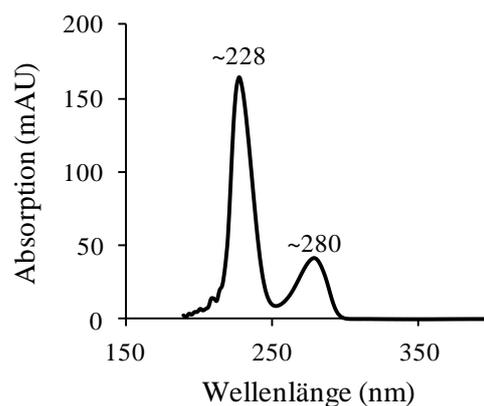


Abbildung 2.12: UV-Absorptionsspektrum von Flavanolen (Bindungstypabhängig).

Die Molekülbrüche zur Charakterisierung der Catechine entsprechen den von Wollersen (2004) detailliert beschriebenen. Über die Retentionszeit der Referenzverbindungen wurden Catechin (Nr. 7) und Epicatechin (Nr. 17) abgesichert.

Tabelle 2.6: IT-MS- und UV-DAD-Daten von Catechin und Epicatechin im Extrakt der fermentierten Kakaobohnen Java1.

Nr. ^a	RT (min)	Substanz	UV-DAD λ_{max} (nm)	[M-H] ⁻	MS ² Fragmente m/z	MS ³ Fragmente m/z
7	19,10	Catechin	228, 279	289	[289] 245, 205, 179	[245] 203, 227, 187, 161
17	32,66	Epicatechin	231, 279	289	[289] 245, 205, 179	[245] 203, 227, 187, 161

^a Nr. beziehen sich auf die HPLC-UV-Chromatogramme in Abbildung 2.11, S. 43.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 2.7: FT-ICR-MS-Daten von Flavanolen und Flavanolderivaten im Extrakt der fermentierten Kakaobohnen Java1. Mit einem Stern gekennzeichnete Verbindungen konnten zusätzlich mit IT-MS-Daten, für mindestens ein Isomer, charakterisiert werden.

Substanz	Summenformel ^a	theoretische Masse m/z	Anzahl an Isomeren	Abweichung ppm
Catechine			2	
(Epi)catechin*	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	298,0718	2	<0,06
B-Typ Procyanidine			55	
Procyanidin B-Typ Dimer*	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577,1351	12	0,1-1,9
Procyanidin B-Typ Trimer*	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	865,1985	10	0,03-1,3
Procyanidin B-Typ Tetramer*	C ₆₀ H ₅₀ O ₂₄	1153,2619	10	1,3-2,0
Procyanidin B-Typ Pentamer*	C ₇₅ H ₆₂ O ₃₀	1441,3253 / 720,1590 ^b	10	0,2-1,9
Procyanidin B-Typ Hexamer*	C ₉₀ H ₇₄ O ₃₆	1729,3882 / 864,1907 ^b	7	0,2-1,4
Procyanidin B-Typ Heptamer*	C ₁₀₅ H ₈₆ O ₄₂	1008,7263 ^b	5	0,1-0,4
Procyanidin B-Typ Octamer	C ₁₂₀ H ₉₈ O ₄₈	767,8336 ^c	1	0,4
A-Typ Procyanidine			33	
Procyanidin A-Typ Dimer*	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂	575,1195	12	0,5-1,9
Procyanidin A-Typ Trimer*	C ₄₅ H ₃₄ O ₁₈	861,1672	7	0,6-1,6
Procyanidin A-Typ Trimer*	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₈	863,1829	11	1,0-2,0
Procyanidin A-Typ Tetramer*	C ₆₀ H ₄₈ O ₂₄	1151,2463	1	1,5
Procyanidin A-Typ Pentamer	C ₇₅ H ₆₀ O ₃₀	719,1512 ^b	2	1,5-1,9
A- und B-Typ Prodelphinidine			18	
Prodelphinidin A-Typ Dimer	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₃	591,1144	3	0,3-1,9
Prodelphinidin B-Typ Dimer	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	593,1301	4	0,4-0,8
Prodelphinidin A-Typ Trimer	C ₄₅ H ₃₄ O ₁₉	877,1622	5	1,0-1,8
Prodelphinidin A-Typ Trimer*	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₉	879,1778	1	0,3
Prodelphinidin B-Typ Trimer*	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₉	881,1935	4	0,4-1,4
Prodelphinidin A-Typ Tetramer	C ₆₀ H ₄₈ O ₂₅	1167,2412	1	1,9
A- und B-Typ Propelargonidine			17	
Propelargonidin A-Typ Dimer	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₁	559,1246	5	0,8-1,2
Propelargonidin B-Typ Dimer*	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₁	561,1402	5	1,2-1,4
Propelargonidin A-Typ Trimer	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₇	847,1880	3	1,6-1,8
Propelargonidin B-Typ Trimer	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₇	849,2036	4	1,4-1,8
Flavanolglykoside			45	
(Epi)afzelechinhexosid*	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀	435,1297	3	0,7-1,0
(Epi)catechinhexosid*	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	451,1246	7	0,4-1,4
Procyanidin A-Typ Dimer-pentosid	C ₃₅ H ₃₂ O ₁₆	707,1618	5	0,3-1,6
Procyanidin B-Typ Dimer-pentosid	C ₃₅ H ₃₄ O ₁₆	709,1774	3	1,1-1,4
Procyanidin A-Typ Dimer-hexosid	C ₃₆ H ₃₄ O ₁₇	737,1723	7	0,4-1,9
Procyanidin B-Typ Dimer-hexosid*	C ₃₆ H ₃₆ O ₁₇	739,1880	10	0,5-1,5
Procyanidin B-Typ Trimer-hexosid*	C ₅₁ H ₄₈ O ₂₃	1027,2514	3	1,0-1,8
Propelargonidin A-Typ Dimer-hexosid*	C ₃₆ H ₃₄ O ₁₆	721,1774	7	0,7-1,0
Ethyl(epi)catechine			25	
Ethyl(epi)catechin Dimer*	C ₃₂ H ₃₀ O ₁₂	605,1664	4	0,8-1,1
Ethyl(epi)catechin A-Typ Trimer	C ₄₇ H ₄₀ O ₁₈	891,2142	8	1,2-1,8
Ethyl(epi)catechin Trimer*	C ₄₇ H ₄₂ O ₁₈	893,2298	13	1,6-1,9

^a Die Summenformeln entsprechen den ungeladenen Molekülen. ^{b,c} m/z des zweifach bzw. dreifach ionisierten Moleküls.

In der Literatur werden weitere monomere Flavanole in Kakaobohnen, -pulvern und Schokoladen beschrieben. Diese sind (Epi)gallocatechin, (Epi)catechingallat und (Epi)gallocatechingallat (Mursu et al., 2009; Mursu et al., 2004; Radojic Redovnikovic et al., 2009; Taubert et al., 2007b). Die vorliegende Analyse konnte keine dieser Substanzen in den fermentierten Kakaobohnen bestätigen. Mit FT-ICR-MS wurden zwei mögliche Isomere von (Epi)gallocatechinen mit m/z 305,0667 (Summenformel $C_{15}H_{14}O_7$; Massenspur **3**, S. 136) und drei mögliche Isomere von (Epi)catechingallaten mit m/z 441,0827 (Summenformel $C_{22}H_{18}O_{10}$; Massenspur **4**, S. 137) detektiert. Es konnte jedoch keine dieser Substanzen einem Peak im HPLC-UV-Chromatogramm zugeordnet werden, noch konnten Fragmentierungsdaten aufgenommen werden. Die FT-ICR-MS-Analyse lieferte auch Daten für zwei mögliche Isomere von (Epi)afzelechinen mit m/z 273,0768 (Summenformel $C_{15}H_{14}O_5$; Massenspur **1**, S. 136). Es konnten jedoch ebenfalls keine Fragmentierungsdaten zur weiteren Bestätigung hinzugezogen werden. Hinweise für (Epi)gallocatechingallate konnten weder mit der FT-ICR- noch mit der IT-MS- Analyse gefunden werden.

B-Typ Procyanidine und Dehydrocatechin Dimere mit m/z 577

Mit der FT-ICR-MS-Analyse konnten insgesamt 55 Isomere von sieben verschiedenen Summenformeln bis zu octameren B-Typ Procyanidinen detektiert werden (Tabelle 2.7, S. 45). Tabelle 2.8 listet die IT-MS- und UV-DAD-Daten der B-Typ Procyanidine und Dehydrocatechine auf, mit denen die Substanzen im HPLC-UV-Chromatogramm bei 280 nm (Abbildung 2.11, S. 43) zugeordnet werden konnten. Dabei handelt es sich um 23 B-Typ Procyanidine bzw. Dehydrocatechine bis zu einem Polymerisationsgrad von sieben Monomereinheiten (Procyanidin Heptamere).

Tabelle 2.8: IT-MS- und UV-DAD-Daten von B-Typ Procyanidinen und Dehydrocatechinen im Extrakt der fermentierten Kakaobohnen Java1.

Nr. ^a	RT (min)	Substanz	UV-DAD λ_{max} (nm)	[M-H] ⁻	MS ² Fragmente m/z	MS ³ Fragmente m/z
1	4,89	B-Typ Trimer	228, 281	865	[865] 739, 575, 407	[739] 449, 587, 695, 289, 407
5	15,11	Procyanidin B1	230, 281	577	[577] 425, 407, 451, 289	[425] 407
12	27,40	B-Typ Trimer	228, 280	865	[865] 695, 739, 577, 407	[695] 543, 677, 451
13	28,24	Procyanidin B2	230, 280	577	[577] 425, 407, 451, 289	[425] 407
15	30,77	Dehydrocatechin B-Typ Dimer	226, 280	577	[577] 393, 425, 559, 533, 439, 269, 289	[393] 269, 375, 161, 213; [425] 407
18	34,56	B-Typ Tetramer	228, 280	1153	[1153] 983, 1027, 865, 1135, 575, 739	[983] 965, 831, 813, 693, 739
20	39,20	Dehydrocatechin B-Typ Dimer	228, 281	577	[577] 393, 559, 425, 439, 533, 269, 289	[559] 541, 515, 421, 393, 289, 269

Ergebnisse und Diskussion

21	40,09	Dehydrocatechin B-Typ Dimer	227, 280	577	[577] 425, 559, 407, 533, 393, 289	[425] 407; [559] 541, 515, 421, 393, 289, 269
23	43,29	Procyanidin C1	230, 280	865	[865] 695, 739, 577, 713, 575, 407	[695] 543, 677, 451, 405, 289
25	47,83	Procyanidin D	229, 280	1153	[1153] 983, 865, 1027, 1135, 575, 739	[865] 695, 739, 847, 577, 451
26	48,95	B-Typ Tetramer	228, 280	1153	[1153] 1027, 865, 983, 1135	[1027] 857, 901, 739, 737, 449
27	50,18	B-Typ Pentamer	228, 279	1441	[1441] 1423, 1315, 865, 1271, 1153, 575	[1423] 1405, 1135, 1271, 845, 1027, 865
28	50,96	B-Typ Trimer	228, 280	865	[865] 695, 577, 739, 713, 575	[695] 543, 677, 525, 451, 405, 289
29	53,60	B-Typ Pentamer	229, 280	1441	[1441] 1423, 1315, 865, 1271, 1153, 575	[1423] 1405, 1135, 1271, 845, 971
30	54,70	B-Typ Tetramer	228, 280	1153	[1153] 863, 983, 1027, 577, 1135, 1001, 739	[983] 965, 813, 831, 693, 739
33	58,20	B-Typ Heptamer	228, 280	1008 ^b	[1008] 863, 923, 1151, 1439	[863] 575, 701, 1151, 737
34	59,41	B-Typ Hexamer	228, 280	864 ^b	[864] 779, 1151, 719, 575, 788, 287	[779] 694, 703, 770, 981, 634, 407
35	61,25	B-Typ Heptamer	228, 280	1008 ^b	[1008] 923, 863, 1151, 1439, 945, 577	[863] 575, 701, 1151, 287, 737
39	68,00	Procyanidin B5	229, 280	577	[577] 425, 407, 451, 289	[289] 245, 205
43	74,01	B-Typ Trimer	228, 279	865	[865] 695, 739, 713, 587, 577, 543, 407	[695] 543, 407, 525, 569
46	82,67	B-Typ Pentamer	227, 281	1441		
47	84,62	Dehydrocatechin B-Typ Dimer	228, 279	577	[577] 289, 425, 451, 559	[425] 407
48	87,16	B-Typ Tetramer	227, 280	1153	[1153] 983, 1027, 865, 739, 1135	[983] 831, 813, 857, 695, 407

^a Nr. beziehen sich auf die HPLC-UV-Chromatogramme in Abbildung 2.11, S. 43. ^b m/z des zweifach ionisierten Moleküliions.

Fragmentierung von Flavanolen

Flavanole zerfallen hauptsächlich durch drei Fragmentierungswege, der Spaltung der Interflavanbindung (QM: von Quinone-Methide), die Retro-Diels-Alder-Reaktion (RDA) und die Heterozyklische Ringspaltung (HRF: Heterocyclic Ring Fission). Diese Hauptfragmentierungswege dienen der Charakterisierung der meisten vorläufig identifizierten Substanzen aus der Gruppe der Flavanole. Am Beispiel von Procyanidin B2 (Nr. 13) werden die Fragmentierungswege nachfolgend dargestellt und erläutert (Abbildung 2.13, S. 48).

Bei der **Spaltung der Interflavanbindung** entstehen im Falle von B-Typ Dimeren mit den Molekülionen m/z 577 (bestehend aus zwei einfach verknüpften (Epi)catechineinheiten) die Fragmentionen m/z 289 und m/z 287. In der oberen Moleküleinheit kommt es zur Ausbildung einer Doppelbindung, wodurch die um 2 Da geringere Pseudomolekularmasse eines Monomers mit m/z 287 gemessen wird. Bei Heterooligomeren (z.B. Prodelphinidinen und

Propelargonidinen) eignen sich Interflavanbindungsbrüche auch zur Aufklärung der Monomerenabfolge im Molekül (Papagiannopoulos, 2008). Es entstehen z.B. bei Prodelphinidinen die Fragmentationen m/z 305 bzw. m/z 303 für (Epi)gallocatechin als untere bzw. obere Einheit und für Propelargonidine dementsprechend m/z 273 bzw. m/z 271 für (Epi)afzelechin. Das Fragment m/z 425 resultiert aus der **Retro-Diels-Alder-Reaktion** unter Abspaltung des B-Rings, mit einem Neutralverlust von 152 Da. Die weitere Fragmentierung dieses Moleküls, durch Abspaltung von Wasser, führt zu einem Fragmentation von m/z 407 und einem Neutralverlust von 170 Da. Anhand der Neutralverluste dieser Reaktion sind andere Substituierungen des B-Rings zu erkennen. Bei (Epi)gallocatechinen resultiert ein Neutralverlust von 168 Da (bzw. 186 Da) oder bei (Epi)afzelechinen ein Neutralverlust von 136 Da (bzw. 154 Da) (Friedrich et al., 2000). Die **Heterozyklische Ringspaltung** ist eine weitere für Proanthocyanidine typische Fragmentierung. Hierbei kommt es zum Aufbrechen des Heterozyklen, wodurch der A-Ring als Neutralverlust von 126 Da abgespalten wird und ein Fragmentation von m/z 451 entsteht. Mit dieser Reaktion kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich um verzweigt oder linear verknüpfte Moleküle handelt. Bei linear verknüpften Proanthocyanidinen ist die Abspaltung des A-Rings nur einmal möglich. Bei verzweigten Molekülen mit mehr als zwei endständigen Monomereinheiten kann die HRF-Spaltung mehr als einmal auftreten. Sowohl die RDA- als auch die HRF-Spaltung können in allen Monomereinheiten stattfinden, jedoch sind Brüche in den oberen Einheiten energetisch bevorzugt (Gu et al., 2003a).

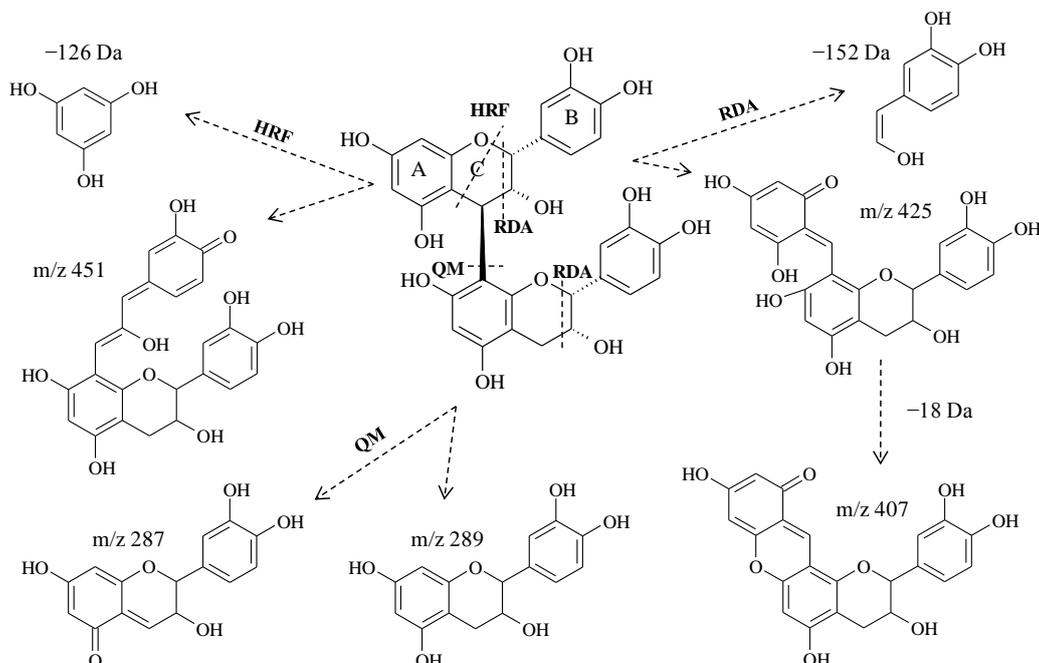


Abbildung 2.13: Fragmentierung von Procyanidin B2 (modifizierte Darstellung nach Gu et al., 2003a).

Procyanidin B-Typ Dimere: Anhand der FT-ICR-MS-Analyse wurden zwölf Isomere des Moleküls m/z 577,1351 für Procyanidin B-Typ Dimere detektiert (Massenspur 5, S. 137). Für sieben dieser Isomere konnten zusätzlich Fragmentierungsdaten mit der Ionenfalle aufgezeichnet werden und eine Zuordnung im HPLC-UV-Chromatogramm erfolgen (Peak Nr. 5, 13, 15, 20, 21, 39 und 47 in Abbildung 2.11, bzw. Tabelle 2.8). Drei verschiedene Fragmentierungsmuster für m/z 577 wurden dabei festgestellt, sodass hier trotz gleicher Summenformel ($C_{30}H_{26}O_{12}$) verschiedene Verbindungsgruppen anzunehmen sind. Die MS^2 -Fragmentspektren führten zur Zuordnung von bereits in Kakao beschriebenen Procyanidin B-Typ Dimeren. Zudem gaben die Fragmentspektren Hinweise auf Oxidationsprodukte (Dehydrocatechine), die aus der Kondensation von monomeren Flavanolen entstehen können.

Die Fragmentspektren von Procyanidin B1 (Nr. 5), B2 (Nr. 13) und B5 (Nr. 39) zeigen die Produktionen der drei beschriebenen Fragmentierungswege mit den charakteristischen Fragmentintensitäten (Abbildung 2.14, A). Procyanidin B1 und B2 wurden anhand von Referenzsubstanzen identifiziert. Procyanidin B5 wurde aufgrund der Konzentration zugeordnet, da es nach Procyanidin B2 das mengenmäßig häufigste Dimer in Kakao ist (Cooper et al., 2007). Das Retentionsverhalten unterstützt diese Annahme. Procyanidin B5 eluiert aufgrund der C4→C6 Interflavanbindung später als die anderen in Kakao bekannten B-Typ Dimere (Santos-Buelga et al., 2003). Die Dimere B1, B2 und B5 wurden in Kakao bereits mehrfach beschrieben (Hatano et al., 2002; Mazor Jolić et al., 2011; Porter et al., 1991; Tomás-Barberán et al., 2007).

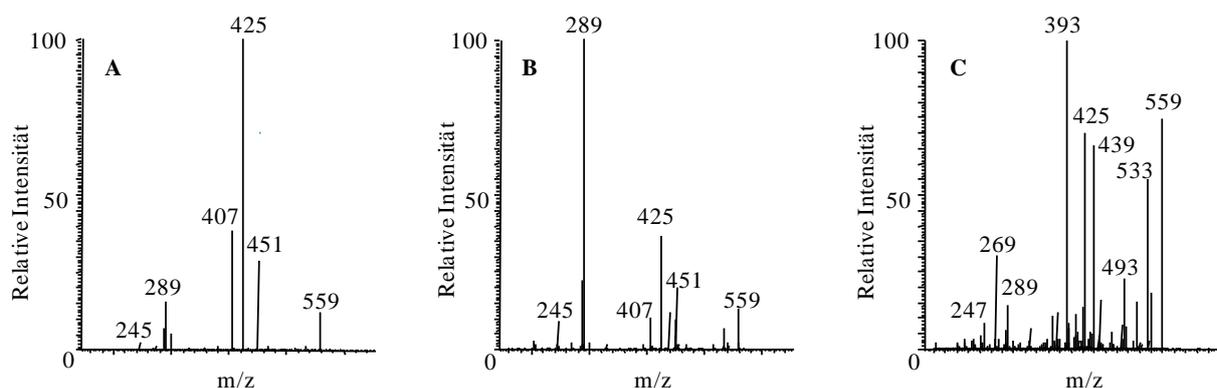


Abbildung 2.14: IT-MS-Fragmentspektren von Procyanidin B-Typ Dimeren (A) und dimeren B-Typ Dehydrocatechinen (B, C).

Dehydrocatechin B-Typ Dimere: Die Dimere Nr. 15, 20 und 21 fragmentieren nur teilweise über die genannten Molekülbrüche (Tabelle 2.8, Abbildung 2.14, C). Neben den Fragmenten der QM-Spaltung (m/z 289) und der RDA-Reaktion (m/z 425) wurden weitere Produktionen detektiert, welche für B-Typ Dehydrocatechine beschrieben wurden. Diese farblosen Kondens-

sationsprodukte aus (Epi)catechinen wurden in Wein und Trauben nach der Fermentation durch die Polyphenoloxidase identifiziert (Guyot et al., 1996). Die Interflavanbindungen von Dehydrocatechinen befinden sich zwischen der aromatischen Hydroxylgruppe an C6' und den Positionen C6 oder C8 der anderen Einheit. Sun und Miller (2003) untersuchten die Fragmentierung dieser Oxidationsprodukte und stellten Produktionen zur Unterscheidung von den natürlich vorkommenden Procyanidinen fest. Die Ionen m/z 439, 393 und 269 sind charakteristisch für Dehydrocatechine, genauso wie die Abwesenheit von m/z 451.

Bei Dimer Nr. 47 handelt es sich möglicherweise ebenfalls um ein Oxidationsprodukt der Fermentation, welches bereits für Trauben beschrieben wurde. Es weist die gleichen Fragmente auf wie die Procyanidine B1, B2 und B5, jedoch mit anderen Intensitäten der Ionen (Abbildung 2.14, B). Zudem eluiert dieses Dimer später als Procyanidin B5, wonach eine für B-Typ Procyanidine untypische Verknüpfung der Monomere im Molekül anzunehmen ist. Die hohe Intensität des Fragmentions m/z 289 spricht für eine C-O Verknüpfung der Monomere im Molekül, da hier die Spaltung der Interflavanbindung stärker ausgeprägt ist (Guyot et al., 1996).

Procyanidin B-Typ Trimere: Mit der FT-ICR-MS-Analyse konnten zehn Isomere des Molekülions m/z 865,1985 detektiert werden, welche der Summenformel $C_{45}H_{38}O_{18}$ für einfach negativ geladene Procyanidin B-Typ Trimere entspricht (Massenspur 6, S. 137). Fünf dieser Verbindungen konnten aufgrund der Fragmentierung vorläufig als Procyanidin B-Typ Trimere identifiziert und im HPLC-UV-Chromatogramm in Abbildung 2.11 (S. 43) zugeordnet werden (Peak Nr. 1, 12, 23, 28 und 43). Für diese Verbindungen waren jeweils die entsprechenden Fragmente der QM-, RDA- und der HRF-Spaltung im MS^2 detektierbar (Tabelle 2.8, S. 46). Die QM-Spaltung führt zu den Ionen m/z 575 und m/z 577, welche den oberen und unteren Fragmentionen entsprechen. Durch die Abspaltung des B-Rings und die weitere Abspaltung eines H_2O -Moleküls werden die Fragmente m/z 713 ($[M-152-H]^-$) und 695 ($[M-170-H]^-$) detektiert. Das Produktion m/z 739 resultiert aus der Spaltung des heterozyklischen Rings ($[M-126-H]^-$) (Tomás-Barberán et al., 2007). Strukturell aufgeklärt für Kakao ist nur das mengenmäßig dominante Trimer Procyanidin C1 (Nr. 23) (Hatano et al., 2002; Porter et al., 1991). Das Vorkommen von bis zu vier weiteren Trimeren wurde in den Arbeiten von Tomás-Barberán et al. (2007) und Wollgast (2005) bereits beschrieben.

Procyanidin B-Typ Tetramere: Zehn Isomere mit m/z 1153,2619, entsprechend der Summenformel $C_{60}H_{50}O_{24}$ für Procyanidin B-Typ Tetramere, wurden mit FT-ICR-MS detektiert (Massenspur 7, S. 138). Bisherige Literaturdaten beschreiben das Vorkommen von vier Procyanidin B-Typ Tetrameren in Kakaopulver bzw. Kakaomasse (Tomás-Barberán et al., 2007; Wollgast, 2005). Im HPLC-UV-Chromatogramm wurden über die Molekül- und Fragmentionen fünf Substanzpeaks (Peak Nr. 18, 25, 26, 30 und 48) vorläufig als B-Typ Tetramere identifiziert. Durch die Fragmentierung wurden im MS^2 die Fragmentionen m/z 865 ($[M-288-H]^-$) der Interflavan-, m/z 983 ($[M-170-H]^-$) der RDA- und m/z 1027

($[M-126-H]^-$) der HRF-Spaltung für alle fünf Verbindungen detektiert. Das mengenmäßig dominante Tetramer in Kakao, Procyanidin D (Nr. 25), wurde von Hatano et al. (2002) identifiziert. In dieser Arbeit wurde das Procyanidin D ebenfalls dem am höchsten konzentrierten Tetramer zugeordnet.

Procyanidin B-Typ Pentamere: Ab fünf (Epi)catechineinheiten lassen sich Procyanidine mit RP-HPLC weniger gut voneinander trennen, weswegen oligomere und polymere Procyanidine in der Regel mit Normalphasen- bzw. Diolphasen-Chromatographie analysiert werden (Hammerstone et al., 1999; Kelm et al., 2006). In Abbildung 2.15 ist zu erkennen, dass die drei größten Pentamere ebenfalls kaum getrennt sind und gemeinsam eluieren. Dennoch führte die RP-chromatographische Trennung in dieser Arbeit dazu, dass mit der FT-ICR-MS-Analyse zehn Isomere detektiert werden konnten.

Bei höher polymerisierten Procyanidinen treten häufiger sowohl einfach als auch doppelt geladene Ionen auf (Abbildung 2.15). Mit m/z 1441,3253 ($[M-H]^-$) und m/z 720,1590 ($[M-2H]^{2-}$) konnten die einfach und die doppelt geladenen Ionen der entsprechenden Summenformel $C_{75}H_{62}O_{30}$ für B-Typ Pentamere detektiert werden.

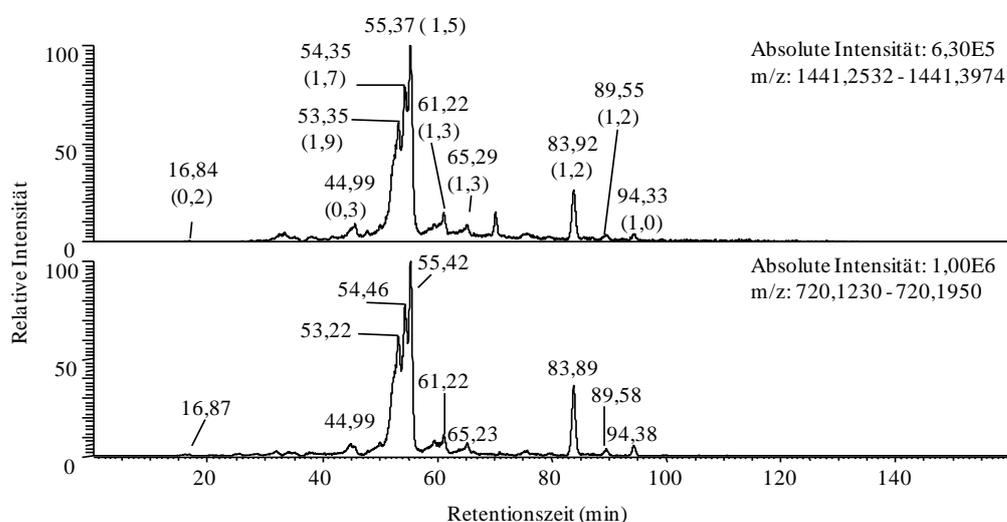


Abbildung 2.15: FT-ICR-Massenspektren der einfach (oben, $[M-H]^-$ 1441,3253) und zweifach (unten, $[M-2H]^{2-}$ 720,1590) geladenen Procyanidin B-Typ Pentamere.

Drei Peaks im HPLC-UV-Chromatogramm wurden anhand der IT-MS-Analyse die Molekülionen m/z 1441 zugeordnet (Nr. 27, 29 und 46), wovon für zwei Verbindungen (Nr. 27 und 29) die typischen Fragmentierungswege für B-Typ Pentamere aufgenommen werden konnten. Dabei resultieren die Fragmentionen m/z 1153, 865 und 575 aus den QM-Spaltungen, m/z 1271 aus der RDA-Reaktion und m/z 1315 aus der HRF-Spaltung.

Procyanidin B-Typ Hexamere, Heptamere und Octamere: Mit FT-ICR-MS konnten sieben Procyanidin Hexamere (Massenspur **9**, S. 138, $[M-2H]^{2-}$ 864,1907), fünf Heptamere (Massenspur **10**, S. 139, $[M-2H]^{2-}$ 1008,7263) und ein Octamer (Massenspur **11**, S. 139, $[M-3H]^{3-}$ 767,8336) detektiert werden. Abbildung 2.16 stellt die Isotopenverteilung eines zweifach geladenen heptameren und eines dreifach geladenen octameren Procyanidins dar. Zur Bestimmung der Summenformel eines Moleküls ist es wichtig, die Molekülladung zu kennen. Die Molekülladung kann durch den Abstand zwischen den Isotopenpeaks festgestellt werden. Aufgrund des Vorkommens von ^{13}C Isotopen werden Peaks detektiert in denen alle C-Atome die Masse von 12 Da aufweisen und solche, in denen sich ein oder mehr ^{13}C Atome befinden. Bei einfach geladenen Molekülen beträgt der Abstand zwischen den Isotopenpeaks 1 Da. Bei mehrfach geladenen Ionen verringert sich der Abstand zwischen den Isotopenpeaks entsprechend des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses. So beträgt der Abstand zwischen den Isotopenpeaks bei doppelt geladenen Molekülonen 0,5 Da und bei dreifach geladenen 0,33 Da.

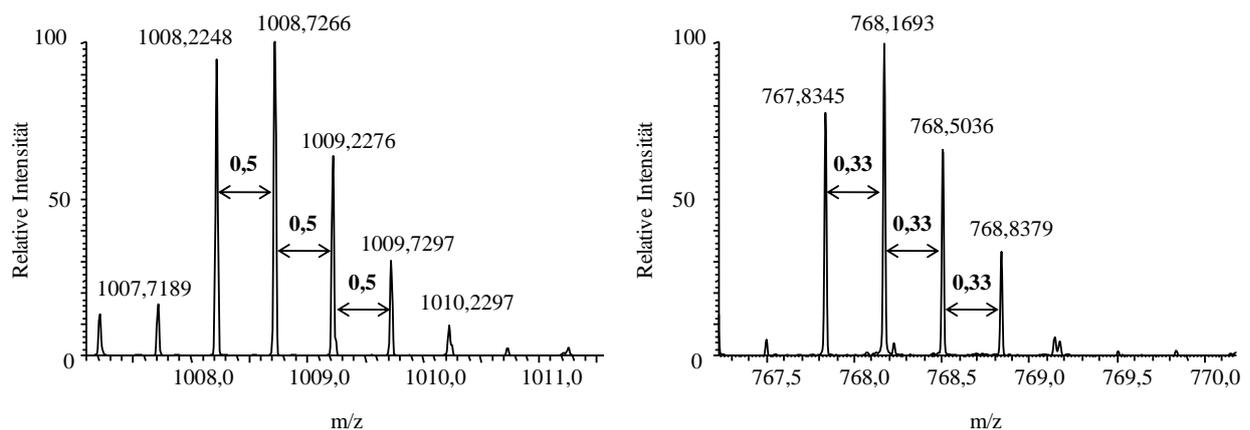


Abbildung 2.16: Isotopenverteilung eines zweifach ionisierten heptameren (links $[M-2H]^{2-}$ 1008,7263) und eines dreifach ionisierten octameren (rechts $[M-3H]^{3-}$ 767,8336) B-Typ Procyanidins (FT-ICR-MS-Analyse).

Wollgast (2005) detektierte 2 Isomere über die Massenspur m/z 1729 für einfach negativ geladene Hexamere. Weitere RP-chromatographische Untersuchungen zu Procyanidinen mit einem Polymerisationsgrad größer als sechs Monomereinheiten sind für Kakao bisher nicht veröffentlicht. Die Identität von einem Hexamer (Nr. 34) und zwei Heptameren (Nr. 33 und 35) konnte mit der IT-MS-Analyse im HPLC-UV-Chromatogramm über die Molekülonen und Fragmentierungen vorläufig bestätigt werden (Abbildung 2.11, S. 43). Bei der Fragmentierung von Hexameren und Heptameren war die Spaltung der Interflavanbindungen dominant, sodass für das Hexamer die Fragmentionen m/z 287, 575 und 1151 und für die Heptamere die Fragmentionen m/z 577, 863, 1151 und 1439 detektiert werden konnten.

(Tabelle 2.8, S. 46). Für das Octamer konnten über die Analyse mit IT-MS keine Daten erhalten werden.

A-Typ Procyanidine und Dehydrocatechin Dimere mit m/z 575

Über die FT-ICR-MS-Analyse wurden insgesamt 33 Isomere von fünf verschiedenen Summenformeln A-Typ verknüpfter Procyanidine mit bis zu fünf Monomereinheiten detektiert (Tabelle 2.7, S. 45). Pereira-Caro et al. (2013) veröffentlichten Hinweise für A-Typ Procyanidine in unfermentierten Kakaobohnen (mit jeweils einer A-Typ Verknüpfung im Molekül) bis zu einem Polymerisationsgrad von Hexameren. Die chromatographische Trennung erfolgte dabei mit einer Diolphase. A-Typ Procyanidine sind verglichen zu den B-Typ verknüpften in geringeren Konzentrationen in Kakao vorhanden, deshalb konnten über die Molekülionen mit entsprechenden Fragmentierungsdaten nur vier Substanzpeaks dieser Gruppe im HPLC-UV-Chromatogramm zugeordnet werden. Für zwei weitere A-Typ Procyanidine konnten Fragmentierungsdaten aufgenommen werden (Tabelle 2.9). Zudem wurden erstmals Oxidationsprodukte mit der Pseudomolekularmasse m/z 575 sowie zweifach A-Typ verknüpfte Trimere vorläufig identifiziert. Die A-Typ verknüpften Procyanidine weisen, mit Ausnahme des möglicherweise während der Fermentation entstandenen Dimers (Nr. 51), das entsprechende UV-DAD-Spektrum für Flavanole mit den Absorptionsmaxima um ~228 und ~280 nm auf.

Tabelle 2.9: IT-MS- und UV-DAD-Daten von A-Typ Procyanidinen und Dehydrocatechinen im Extrakt der fermentierten Kakaobohnen Java I.

Nr. ^a	RT (min)	Substanz	UV-DAD λ_{\max} (nm)	[M-H] ⁻	MS ² Fragmente m/z	MS ³ Fragmente m/z
MS-RT ^b	12,37	A-Typ Tetramer	n.d.	1151	[1151] 863, 711, 1025, 531, 981, 999	
22	41,73	A-Typ Trimer	227, 280	863	[865] 711, 411, 451, 472, 289	[711] 692, 559, 541, 407
36	65,13	A-Typ Dimer	228, 279	575	[575] 449, 423, 287, 539, 407, 453	[449] 287
MS-RT ^b	75,22	A-Typ Trimer	n.d.	861	[861] 735, 575, 825, 353, 405	
45	78,59	A-Typ Dimer	228, 281	575	[575] 449, 423, 539, 289	[449] 287, 431, 313, 243
51	105,89	Dehydrocatechin A-Typ Dimer	228, 257, 279, 383	575	[575] 449, 287, 431, 394, 531	[449] 431, 287

^a Nr. beziehen sich auf die HPLC-UV-Chromatogramme in Abbildung 2.11, S. 43. ^b MS-RT entspricht der Retentionszeit im Massenspektrometer, da Substanz nicht im UV detektierbar ist.

Procyanidin A-Typ Dimere: Mittels FT-ICR-MS wurden zwölf Isomere der Molekülonen für Procyanidin A-Typ Dimere mit m/z 575,1195 und der entsprechenden Summenformel $C_{30}H_{24}O_{12}$ analysiert (Massenspur 12, S. 139). Den Substanzpeaks Nr. 36 und 45 konnten die Ionen m/z 575 mit den charakteristischen Fragmentierungen für Procyanidin A-Typ Dimere zugeordnet werden. A-Typ Procyanidine sind durch zwei Bindungen verknüpft, demnach ist die Masse des Molekülonen (je A-Typ Verknüpfung) um 2 Da geringer als die von B-Typen. Die Fragmentierungswege entsprechen denen der B-Typen, jedoch resultieren Fragmente bzw. Neutralverluste, die um 2 Da geringer sind (Gu et al., 2003a). So führt die HRF-Spaltung ($[M-126-H]^-$) bei A-Typ Dimeren zu einer Fragmentierung von m/z 449 (bei B-Typen: m/z 451) und die RDA-Reaktion zu m/z 423 (bei B-Typen m/z 425). Aus der Interflavanspaltung im MS^3 resultiert aus dem Fragmentierung m/z 449 der HRF-Spaltung das Ion m/z 287 für die untere Monomereinheit, die aufgrund der doppelten Verknüpfung im Molekül um 2 Da geringer ist als die von B-Typen mit m/z 289 (Li, S. et al., 2012).

Dehydrocatechin A-Typ Dimer: Der Substanzpeak Nr. 51 weist ein m/z 575, sowie die Fragmentionen m/z 449 und m/z 287 aus der HRF- und QM-Spaltungen auf, jedoch wurden weitere, untypische Fragmente (m/z 394, 431 und 531) detektiert (Tabelle 2.9, S. 53). Zudem hat Peak Nr. 51 im UV-DAD-Spektrum bei ~ 257 und ~ 383 nm zusätzliche Absorptionsbanden (Abbildung 2.17). Die Fragmentionen und die UV-Absorption stimmen mit einem von Guyot et al. (1996) beschriebenen Kondensationsprodukt aus monomeren Catechinen überein, welches katalysiert durch die Polyphenoloxidase während der Fermentation entsteht.

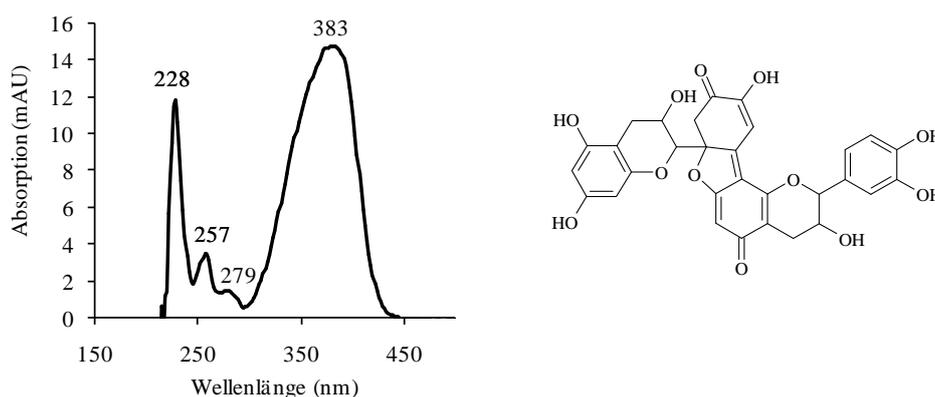


Abbildung 2.17: Absorptionsspektrum und mögliche Strukturformel des A-Typ Dehydrocatechins.

Procyanidin A-Typ Trimere: Anhand der FT-ICR-MS-Analyse wurden elf Isomere von Trimeren mit einer und sieben Isomere von Trimeren mit zwei A-Typ Verknüpfungen im Molekül detektiert (Massenspuren **13** und **14**, S. 140). Die exakten Massen der Molekülonen sind m/z 861,1672 ($C_{45}H_{34}O_{18}$) und 863,1829 ($C_{45}H_{36}O_{18}$). Peak Nr. 22 wurde im HPLC-UV-Chromatogramm mit m/z 863 als Trimer mit einer A-Typ Verknüpfung im Molekül zugeordnet. Das Fragment m/z 711 ($[M-152-H]^-$) im MS^2 resultiert aus der RDA-Reaktion, welches im MS^3 wiederum durch eine RDA-Reaktion zu den Fragmenten m/z 559 ($[M-152-H]^-$) und m/z 541 ($[M-170-H]^-$) gespalten wird (Tabelle 2.9, S. 53). Aufgrund der Anwesenheit von m/z 289 im MS^2 für (Epi)catechin als untere Monomereinheit kann vermutet werden, dass sich bei diesem Isomer die A-Typ Verknüpfung zwischen der mittleren und der oberen Einheit im Molekül befindet (Appeldoorn et al., 2009; Li, S. et al., 2012). Im HPLC-UV-Chromatogramm der IT-MS-Analyse konnte kein Peak einem zweifach A-Typ verknüpften Trimer zugeordnet werden. Dennoch konnten mit der IT-MS-Analyse die Fragmentationen m/z 735 ($[M-126-H]^-$) und 575 ($[M-286-H]^-$) aus der HRF- und der QM-Spaltung zur vorläufigen Identifizierung detektiert werden (vgl. MS-RT 75,22 min, Tabelle 2.9) (Appeldoorn et al., 2009).

Procyanidin A-Typ Tetramere und Pentamere: Die FT-ICR-MS-Analyse ergab ein Isomer mit m/z 1151,2463 (Massenspur **15**, S. 140, $C_{60}H_{48}O_{24}$) und zwei Isomere mit m/z 719,1512 (Massenspur **16**, S. 141, $[M-2H]^{2-}$; $C_{75}H_{60}O_{30}$). Diese Molekülonen entsprechen den einfach bzw. zweifach ionisierten Molekülen von Tetrameren und Pentameren mit jeweils einer A-Typ Verknüpfung. Fragmentierungsdaten der Ionenfalle konnten nur für das Tetramer detektiert werden (vgl. MS-RT 12,37, Tabelle 2.9). Dabei zerfällt das Ion m/z 1151 über die Fragmentierungswege von HRF-, QM- und RDA-Spaltung zu den Produktionen m/z 1025 ($[M-126-H]^-$), m/z 863 ($[M-288-H]^-$), m/z 711 ($[M-288-152-H]^-$), m/z 981 ($[M-170-H]^-$) und m/z 999 ($[M-152-H]^-$) (Appeldoorn et al., 2009; Li, S. et al., 2012).

A -und B-Typ Prodelphinidine

Prodelphinidine sind bisher nicht für Kakao beschrieben worden. Mit der FT-ICR-MS-Analyse konnten in den fermentierten Kakaobohnen aus Java jedoch insgesamt 18 Isomere von sechs verschiedenen Summenformeln für A- und B-Typ Prodelphinidine bis zu einem Polymerisationsgrad von vier Monomereinheiten vorläufig identifiziert werden (Tabelle 2.7, S. 45). Hierbei handelt es sich um Verbindungen mit (Epi)catechinen und jeweils einem (Epi)gallo catechin im Molekül. Aufgrund relativ niedriger Konzentrationen waren nur wenige zusätzliche charakterisierende Daten über die IT-MS-Analyse messbar.

Prodelphinidin A- und B-Typ Dimere: Die FT-ICR-MS-Analyse konnte die Moleküle von drei A-Typ (Massenspur **17**, S. 141, $C_{30}H_{24}O_{13}$, m/z 591,1144) und vier B-Typ (Massenspur **18**, S. 141, $C_{30}H_{26}O_{13}$, m/z 593,1301) verknüpften Prodelphinidin Dimeren detektieren. Diese Verbindungen konnten nicht anhand von Fragmentierungsdaten weiter bestätigt werden.

Prodelphinidin A- und B-Typ Trimere: Für Prodelphinidin Trimere wurden mittels FT-ICR-MS drei verschiedene Summenformeln analysiert. Dabei handelt es sich um vier Isomere von B-Typ Trimeren mit m/z 881,1935 (Massenspur **21**, S. 142, $C_{45}H_{38}O_{19}$), ein Trimer mit einer A-Typ Verknüpfung mit m/z 879,1778 (Massenspur **20**, S. 142, $C_{45}H_{36}O_{19}$) und fünf Isomere von zweifach A-Typ verknüpften Trimeren mit m/z 877,1622 (Massenspur **19**, S. 142, $C_{45}H_{34}O_{19}$). Im HPLC-UV-Chromatogramm konnte das Prodelphinidin A-Typ Trimer mit m/z 879 (Nr. 4) und den charakteristischen Fragmentationen m/z 727 ($[M-152-H]^-$), 709 ($[M-170-H]^-$), 591 ($[M-288-H]^-$), 861 ($[M-18-H]^-$) im MS^2 zugeordnet werden (Tabelle 2.10) (Esatbeyoglu und Winterhalter, 2010; Souza et al., 2008).

Tabelle 2.10: IT-MS- und UV-DAD-Daten von A- und B-Typ Prodelphinidinen im Extrakt der fermentierten Kakaobohnen Java1.

Nr. ^a	RT (min)	Substanz	UV-DAD λ_{max} (nm)	$[M-H]^-$	MS^2 Fragmente m/z	MS^3 Fragmente m/z
4	12,77	Prodelphinidin A-Typ Trimer	226, 279	879	[879] 727, 709, 547, 591, 861	[727] 709, 575, 557, 421
MS-RT ^b	38,88	Prodelphinidin Trimer	n.d.	881	[881] 755, 593, 863, 577, 303, 711, 425	[755] 465, 603, 585, 737, 303

^a Nr. beziehen sich auf die HPLC-UV-Chromatogramme in Abbildung 2.11, S. 43. ^b MS-RT entspricht der Retentionszeit im Massenspektrometer, da Substanz nicht im UV detektierbar ist.

Die Identität eines B-Typ Prodelphinidin Trimers konnte über das Molekülion m/z 881 und die anschließenden Fragmentierungen im MS^2 (HRF: m/z 755; RDA: m/z 711; QM: m/z 593 und 303) und MS^3 (RDA: 755→603, 585; QM: 755→465, 303) vorläufig bestätigt werden (Tabelle 2.10, MS-RT: 38,88 min).

Prodelphinidin A-Typ Tetramere: Eine Verbindung mit m/z 1167,2412 eines Prodelphinidin Tetramers mit einer A-Typ Verknüpfung ($C_{60}H_{48}O_{25}$) konnte mittels FT-ICR-MS gefunden werden (Massenspur **22**, S. 143). Diese Verbindungen konnten nicht anhand von Fragmentierungsdaten weiter bestätigt werden.

A- und B-Typ Propelargonidine

Mit der FT-ICR-MS-Analyse konnten erstmals Hinweise für Propelargonidine in fermentierten Kakaobohnen gefunden werden. Insgesamt wurden 17 Isomere von A- und B-Typ verknüpften Dimeren und Trimeren mit vier verschiedenen Summenformeln mit jeweils einer (Epi)afzelecheneinheit im Molekül detektiert (Tabelle 2.7, S. 45).

Propelargonidin A- und B-Typ Dimere: Jeweils fünf Isomere von A-Typ verknüpften Dimeren mit m/z 559,1246 (Massenspur **23**, S. 143, $C_{30}H_{24}O_{11}$) und B-Typ verknüpften Dimeren mit m/z 561,1402 (Massenspur **24**, S. 143, $C_{30}H_{26}O_{11}$) wurden durch die FT-ICR-MS-Analyse detektiert. Für ein B-Typ verknüpftes Propelargonidin Dimer konnte die Identität anhand von Fragmentierungsdaten der Ionenfalle im MS^2 zusätzlich bestätigt und eine Aussage über die Monomerenabfolge im Molekül getroffen werden (Abbildung 2.18). Das Molekülion m/z 561 fragmentiert dabei über die gleichen Molekülbrüche, wie bereits für Procyanidin B2 in Abbildung 2.13 (S. 48) dargestellt. Aus der Interflavanspaltung geht hervor, dass (Epi)catechin die untere (m/z 289, Starteinheit der Biosynthese) und (Epi)afzelechin die obere Einheit (m/z 271, Extensionseinheit) im Molekül ist. Auch die RDA-Reaktion zeigt mit dem Neutralverlust von 136 Da und dem Fragment m/z 425 das (Epi)afzelechin im Molekül. Gleiches gilt für die HRF-Spaltung, nach dem Neutralverlust von 126 Da wird das Fragment m/z 435 detektiert. Dieses Fragment hat eine um 16 Da geringere Pseudomolekularmasse als das Fragment m/z 451 bei Procyanidin B2, da eine OH-Gruppe weniger am B-Ring gebunden ist (Gu et al., 2003a; Gu et al., 2003b). Anhand der vorliegenden Informationen kann, wie bei allen diskutierten Verbindungen, keine Aussage über die stereochemische Ausrichtung der Monomere im Molekül getroffen werden, sodass es sich bei der Substanz in Abbildung 2.18 um eine beispielhafte Darstellung handelt.

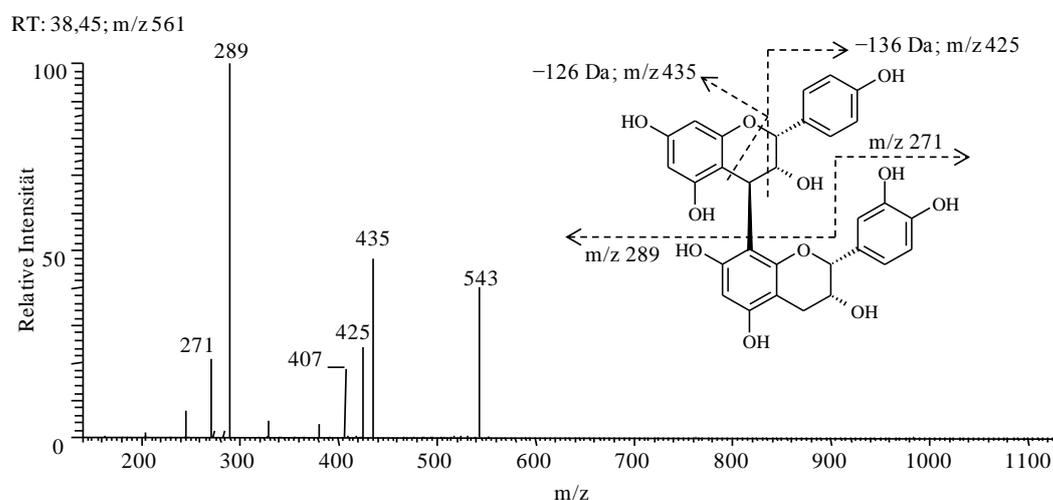


Abbildung 2.18: IT-MS-Fragmentspektrum von $[M-H]^-$ 561 und Darstellung der Struktur eines möglichen B-Typ Propelargonidin Dimers und mögliche Fragmentierungen.

Propelargonidin A- und B-Typ Trimere: Anhand der FT-ICR-MS-Analyse wurden ebenfalls die Moleküle für trimere A- und B-Typ Propelargonidine detektiert. Dabei handelt es sich um vier B-Typ Trimere mit m/z 849,2036 (Massenspur **26**, S. 144) und der Summenformel $C_{45}H_{38}O_{17}$ sowie drei Trimere mit einer A-Typ Verknüpfung mit m/z 847,1880 (Massenspur **25**, S. 144) und der Summenformel $C_{45}H_{36}O_{17}$. Die Analyse mit IT-MS konnte die Vermutung jedoch nicht weiter bestärken, da keine Fragmentierungsdaten für Propelargonidin Trimere detektiert wurden.

Flavanolglykoside

Die Analyse der exakten Masse mit FT-ICR-MS konnte 45 Isomere von acht verschiedenen Summenformeln für Flavanolglykoside detektieren (Tabelle 2.7, S. 45). In der Literatur sind bisher (Epi)catechin-C-hexoside und A-Typ Procyanidin-O-glykoside bis zu einem Polymerisationsgrad von drei (Epi)catechineinheiten für Kakao beschrieben (Hatano, et al., 2002; Porter et al., 1991; Stark und Hofmann, 2006). Bei den in dieser Probe detektierten Flavanolglykosiden, die über Fragmentspektren näher charakterisiert werden konnten, handelt es sich hauptsächlich um C-Glykoside. In den fermentierten Kakaobohnen aus Java wurden neben Glykosiden mit (Epi)catechinen erstmals die exakten Massen für Glykoside mit (Epi)afzelechinen detektiert.

Monomere Flavanolglykoside: Mittels FT-ICR-MS wurden sieben Isomere von (Epi)-catechinhexosiden mit m/z 451,1246 (Massenspur **28**, S. 145) mit der entsprechenden Summenformel $C_{21}H_{24}O_{11}$ detektiert. Die Analyse ergab auch drei (Epi)afzelechinhexosid-Isomere der Summenformel $C_{21}H_{24}O_{10}$ mit m/z 435,1297 (Massenspur **27**, S. 144). Die von Stark und Hofmann (2006) in Kakaopulver beschriebenen (Epi)catechin-6-C,8-C-diglykoside konnten in dieser Analyse jedoch nicht nachgewiesen werden.

Mit der IT-MS-Analyse wurden jeweils für ein (Epi)afzelechin- und ein (Epi)catechinhexosid Fragmentierungsdaten erhalten, wodurch diese Substanzen näher charakterisiert werden konnten. Die Fragmentierungswege der vorläufig als **(Epi)afzelechin-C-hexosid** identifizierten Verbindung weisen auf eine C-glykosidische Bindung zwischen der Hexose und dem Aglykon hin. Fragmentierungsstudien zu C-Glykosiden zeigen, dass die Molekülbrüche bevorzugt im Zuckerteil stattfinden (Cuyckens und Claeys, 2004). In Abbildung 2.19 (S. 59) ist ein Molekülvorschlag für $[M-H]^-$ 435 mit den vermuteten Fragmentbrüchen dargestellt. Die Neutralverluste von 90 und 120 Da resultieren aus der Spaltung der Hexose. Auch die Abspaltung eines Wassermoleküls ($[M-H_2O-H]^-$) ist typisch für C-Glykoside, wodurch das Fragment m/z 417 detektiert wird. C-glykosidische Verknüpfungen zwischen Zuckern und Flavonoiden befinden sich in der Regel an den Positionen C6 und/oder C8 des Aglykons. Die relative Intensität des Fragments m/z 417 aus

der Wasserabspaltung kann dabei möglicherweise zur Unterscheidung zwischen 6-C- und 8-C-Glykosiden genutzt werden. Bei 6-C-Glykosiden ist dieses Fragment relativ ausgeprägt, da die Wasserabspaltung sowohl an C5 als auch an C7 des Aglykons erfolgen kann. Da das Fragment m/z 417 hier nur von geringer Intensität ist, wird hier eine 8-C-glykosidische Verknüpfung vorgeschlagen (Cuyckens und Claeys, 2004; Ferreres et al., 2007).

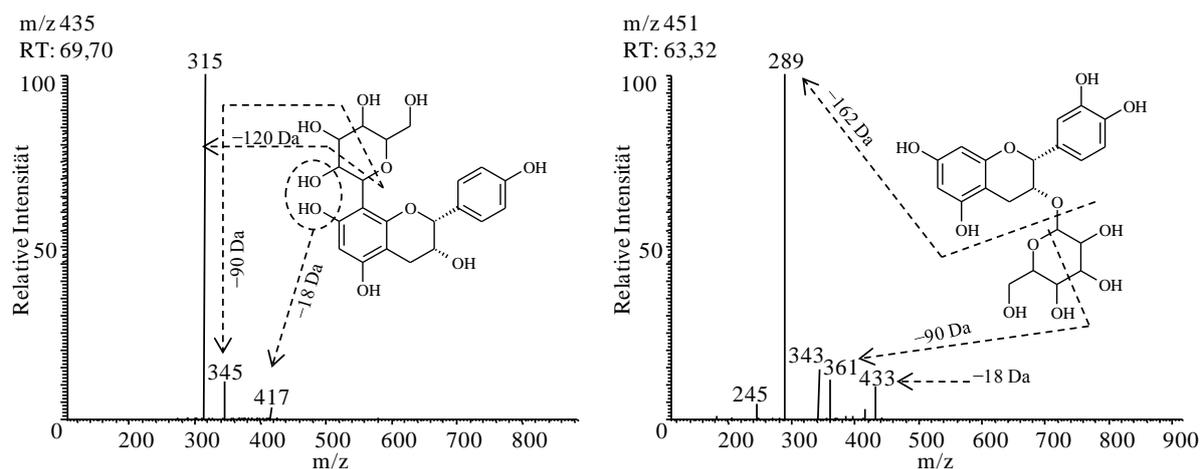


Abbildung 2.19: IT-MS-Fragmentspektren von monomeren Flavanolglykosiden mit $[M-H]^-$ 435 und $[M-H]^-$ 451 sowie Molekülverschlüsse und mögliche Fragmentierungen.

In Kakao bzw. Kakaoprodukten (Kakaomasse, alkalisiertes und nicht alkalisiertes Kakaopulver) sind bisher sieben (Epi)catechin-C-hexoside beschrieben. Diese setzen sich aus (-)-Epicatechin oder (-)-Catechin verknüpft mit Glucose oder Galactose an den Positionen C6 oder C8 zusammen (Hatano et al., 2002; Stark und Hofmann, 2006). Mit den Fragmentierungsdaten der IT-MS-Analyse kann die genaue Molekülstruktur nicht definiert werden. Zudem kann für die Hexose keine Aussage getroffen werden, ob es sich z.B. um Glucose oder Galactose handelt, aber es kann zwischen O- und C-Glykosiden differenziert werden. Das in dieser Arbeit vorläufig als **(Epi)catechin-O-hexosid** identifizierte Molekül mit m/z 451 fragmentiert unter Abspaltung der Hexose und bildet dabei das Fragmention m/z 289 des (Epi)catechin-Aglykons im MS^2 (Abbildung 2.19). Die Abspaltung des Zuckerrestes als Neutralverlust (-162 Da, $[M-Hexose(-H_2O)-H]^-$) ist typisch für O-Glykoside (Cuyckens und Claeys, 2004). Es wurden auch Ionen mit m/z 361 und m/z 433 mit den Neutralverlusten von 90 Da und 18 Da detektiert, welche für C-Glykoside beschrieben sind. Jedoch ist die Intensität von m/z 289 aus der Spaltung der glykosidischen Bindung dominant, weswegen hier ein O-Hexosid angenommen wird. Die weitere Fragmentierung von m/z 289 im MS^3 zeigt deutlich die Fragmentionen m/z 245, 205 und 247 eines (Epi)catechinmoleküls.

Procyanidinglykoside: Mit FT-ICR-MS wurden fünf verschiedene Summenformeln für Procyanidinglykoside analysiert (Tabelle 2.7, S. 45). Dies waren fünf Isomere von A-Typ Dimer-pentosiden (Massenspur **29**, S. 145; m/z 707,1618), drei Isomere von B-Typ Dimer-pentosiden (Massenspur **30**, S. 145; m/z 709,1774), sieben A-Typ Dimer-hexoside (Massenspur **32**, S. 146; m/z 737,1723), zehn B-Typ Dimer-hexoside (Massenspur **33**, S. 146; m/z 739,1880) und drei B-Typ Trimer-hexoside (Massenspur **34**, S. 136; m/z 1027,2541).

Aufgrund der geringen Konzentrationen der Flavanolglykoside konnten nur zwei Procyanidinglykoside aus dieser Gruppe im HPLC-UV-Chromatogramm zugeordnet werden (Tabelle 2.11). Diese Procyanidinglykoside zeigen im Gegensatz zu den bisher in Kakao identifizierten A-Typ-O-glykosiden charakteristische Fragmentierungen von B-Typ-C-glykosiden.

Tabelle 2.11: IT-MS- und UV-DAD-Daten von Procyanidin- und Propelargonidinglykosiden im Extrakt der fermentierten Kakaobohnen Javal.

Nr. ^a	RT (min)	Substanz	UV-DAD λ_{\max} (nm)	[M-H] ⁻	MS ² Fragmente m/z	MS ³ Fragmente m/z
8	20,43	Propelargonidin A-Typ Dimer-hexosid	226, 278	721	[721] 631, 569, 703, 431, 551	[569] 551, 417; [631] 479, 461
11	24,61	Procyanidin B-Typ Dimer-hexosid	234, 281	739	[739] 619, 649, 449, 587, 287	[619] 467, 451, 329, 289; [449] 287, 329, 359, 431
19	38,54	Procyanidin B-Typ Trimer-hexosid	227, 279	1027	[1027] 907, 937, 1009, 577, 739, 449	[907] 577, 737, 889, 739

^a Nr. beziehen sich auf die HPLC-UV-Chromatogramme in Abbildung 2.11, S. 43.

Peak Nr. 11 im HPLC-UV-Chromatogramm mit [M-H]⁻ 739 konnte einem dimeren **Procyanidin B-Typ-C-hexosid** zugeordnet werden. Die Fragmente m/z 619 ([M-120-H]⁻) und 649 ([M-90-H]⁻) resultieren aus den Molekülbrüchen im Zucker (Cuyckens und Claeys, 2004; Ferreres et al., 2007; Rodrigues et al., 2007; Song et al., 2011). Der sonst für Procyanidine übliche Neutralverlust von 126 Da nach Abspaltung des A-Ring (HRF) wird nicht detektiert. Statt dieses Neutralverlustes kann m/z 287 ([162+126-H]⁻) als Fragment aus der HRF-Spaltung vermutet werden. Das m/z 449 ([M-290-H]⁻) aus der QM-Spaltung definiert die Position der Hexose in der oberen Monomereinheit. Dabei entspricht m/z 449 dem um 2 Da geringeren Fragmentation eines (Epi)catechinhexosids (m/z 451). Die weitere Fragmentierung von m/z 449 im MS³ zeigt wiederum die Bindung der Hexose über ein C-Atom. Die Produktionen m/z 329 ([M-290-120-H]⁻) und m/z 359 ([M-290-90-H]⁻) resultieren aus Fragmentierungen in der Hexose (Rodrigues et al., 2007).

Die Molekülonen und Fragmentierungen der IT-MS führen ebenfalls zur vorläufigen Identifizierung eines **trimeren Procyanidin B-Typ-C-hexosid** (Abbildung 2.11, Nr. 19). Auch hier resultieren die Fragmente m/z 907 ($[M-120-H]^-$) und 937 ($[M-90-H]^-$) aus den Molekülbrüchen im Zucker. Die Produktionen m/z 577 ($[M-450-H]^-$) und m/z 449 ($[M-578-H]^-$) sind Fragmente der QM-Spaltung und zeigen, dass der Zucker am oberen (Epi)catechinmolekül gebunden ist.

Propelargonidin A-Typ Dimer-hexoside: Sieben Isomere der Molekülonen m/z 721,1774 der entsprechenden Summenformel $C_{36}H_{34}O_{16}$ (Massenspur **31**, S. 146) wurden mit FT-ICR-MS detektiert. Eine dieser Verbindungen wurde vorläufig über die Fragmente der IT-MS-Analyse im HPLC-UV-Chromatogramm als ein dimeres A-Typ Propelargonidin-C-hexosid identifiziert (Nr. 8, Abbildung 2.11 und Tabelle 2.11). Das Produktion m/z 631 ($[M-90-H]^-$) weist auf eine C-glykosidische Bindung der Hexose hin (Cuyckens und Claeys, 2004) und m/z 569 und 551 resultieren aus der RDA-Reaktion. Aus der QM-Spaltung geht das Fragmentation m/z 431 ($[M-290-H]^-$) hervor. Demnach befindet sich die Hexose an der oberen Einheit, dem (Epi)afzelechin. Das (Epi)afzelechin-C-hexosid wird aufgrund des m/z 431 im oberen Molekülteil vermutet. Durch die A-Typ Verknüpfung (-2 Da) und dadurch, dass es sich um die obere Einheit im Molekül handelt (-2 Da aufgrund der QM-Spaltung), ist das Fragmentation um insgesamt 4 Da geringer als das bereits beschriebene (Epi)afzelechinhexosid mit m/z 435.

Ethyl(epi)catechine

Ethyl(epi)catechine sind bisher noch nicht in Kakao oder Kakaoprodukten beschrieben worden. Bei diesen Substanzen handelt es sich um Flavanole, die miteinander über eine Ethylbrücke verbunden sind. In Trauben und Wein wurden diese Verbindungen als Alterungsprodukte identifiziert. Sie entstehen durch die Kondensation von monomeren Flavanolen über eine Acetaldehyd vermittelte Reaktion zu polymeren Verbindungen (Saucier et al., 1997a; Saucier et al., 1997b). Acetaldehyd entsteht während der Kakaofermentation ebenso wie bei der Weinherstellung als Nebenprodukt der Hefegärung und steht damit als Substrat zur Bildung von Ethyl(epi)catechinen zur Verfügung. Zum Zeitpunkt der Fermentation ist die Polymerisation über das Actaldehyd aufgrund des niedrigen pH-Wertes begünstigt (siehe Kapitel 1.1.3, Abschnitt Fermentation). Dabei können die Catechine an den elektronenreichen Positionen C6 und C8 eine nucleophile Substitution mit Acetaldehyd eingehen (Saucier et al., 1997a; Saucier et al., 1997b). Im späteren Kakaoverarbeitungsprozess wird dieser flüchtige und unerwünschte Aromastoff durch die Kakaoveredelung während der Röstung und beim Conchieren entfernt.

In den fermentierten Kakaobohnen aus Java wurden insgesamt 25 Isomere von drei verschiedenen Summenformeln von dimeren und trimeren Ethyl(epi)catechinen gefunden.

Ethyl(epi)catechin Dimere: Mit der FT-ICR-MS-Analyse wurden vier dimere Ethyl(epi)catechine mit der Summenformel $C_{32}H_{30}O_{12}$ (Massenspur **35**, S. 147, exakte Masse: m/z 605,1664) detektiert. Alle vier Verbindungen konnten ebenfalls im HPLC-UV-Chromatogramm über die Molekülmasse und Fragmentierungsdaten der IT-MS-Analyse zugeordnet werden (Tabelle 2.12 und Abbildung 2.11, Nr. 42, 49, 52 und 53).

Tabelle 2.12: IT-MS- und UV-DAD-Daten von Ethyl(epi)catechinen im Extrakt der fermentierten Kakaobohnen Java1.

Nr.	RT	Substanz	UV-DAD λ_{max} (nm)	[M-H] ⁻	MS ² Fragmente m/z	MS ³ Fragmente m/z
38	66,34	Ethyl(epi)catechin Trimer	228, 280	893	[893] 603, 577, 451, 425	[603] 451, 433, 289
42	73,09	Ethyl(epi)catechin Dimer	227, 280	605	[605] 315, 289, 453	[315] 229, 271, 205, 191, 151
49	101,70	Ethyl(epi)catechin Dimer	229, 280	605	[605] 315, 289, 453	[315] 229, 271, 205, 191, 151
52	107,25	Ethyl(epi)catechin Dimer	228, 280	605	[605] 315, 289, 453	[315] 229, 271, 205, 191, 151
53	119,21	Ethyl(epi)catechin Dimer	228, 281	605	[605] 315, 289, 453	[315] 229, 271, 205, 191, 151

^a Nr. bezieht sich auf die HPLC-UV-Chromatogramme in Abbildung 2.11, S. 43.

Das entsprechende Fragmentspektrum inklusive einer möglichen Molekülstruktur ist in Abbildung 2.20 (S. 63) dargestellt. Die Fragmentionen m/z 289 und 315 im MS² resultieren aus der Spaltung der Ethylbrücke, dabei entstehen sowohl die Ionen eines (Epi)catechins als auch eines (Epi)catechins mit Vinylrest der Ethylbrücke (siehe Vinyl(epi)catechin in Abbildung 2.20). Zusätzlich konnte auch das Fragment aus der für Procyanidine üblichen RDA-Spaltung (m/z 453, [M-152-H]⁻), bei allen vier Verbindungen detektiert werden.

Die exakte Molekülstruktur kann anhand der vorliegenden Daten nicht definiert werden. Da jedoch die Ethyl-Verknüpfungen in der Literatur nur für C6 und C8 beschrieben sind und Epicatechin die vorherrschende Monomereinheit ist, können folgende Verbindungen vorgeschlagen werden: Epicat-(6-Ethyl-6)-Epicat, Epicat-(6-Ethyl-8)-Epicat, Epicat-(8-Ethyl-6)-Epicat und Epicat-(8-Ethyl-8)-Epicat. Demnach ist zu vermuten, dass die C8-Ethyl-C8 verknüpfte Verbindung (siehe Abbildung 2.20) aufgrund der kompakten Molekülstruktur, analog zur beschriebenen Elutionsreihenfolge der Procyanidine B2 und B5, zuerst eluiert (Es-Safi et al., 1999). Ebenso kann vermutet werden, dass das zuletzt eluierende Ethyl(epi)catechin Dimer C6-Ethyl-C6 verknüpft ist.

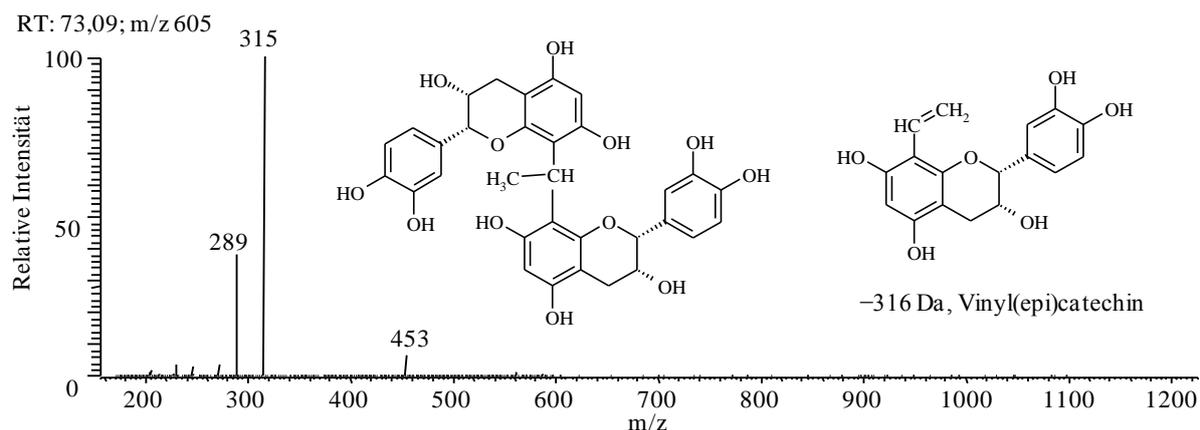


Abbildung 2.20: IT-MS-Fragmentspektrum von $[M-H]^-$ 605 mit einer möglichen Molekülstruktur und Vinyl(epi)catechinfragment (dargestellt als Neutralverlust von 316 Da).

Ethyl(epi)catechin Trimere: Anhand der FT-ICR-MS-Analyse konnten 13 trimere Ethyl(epi)catechine der Summenformel $C_{47}H_{42}O_{18}$ (Massenspur **37**, S. 148; m/z 893,2298) detektiert werden. Eine dieser Verbindungen konnte ebenfalls über die IT-MS-Analyse zugeordnet werden (Tabelle 2.12, S. 62, Nr. 38). Zudem wurden acht Isomere mit der Summenformel $C_{47}H_{40}O_{18}$ (Massenspur **36**, S. 147; m/z 891,2142) detektiert, welche trimere Ethyl(epi)catechine mit einer A-Typ Verknüpfung entspricht. Zu den Verbindungen dieser Summenformel wurden jedoch keine Fragmentierungsdaten zur Substanzcharakterisierung erhalten.

Die Fragmentierung des Ethyl(epi)catechin Trimer mit m/z 893 zeigt ein entsprechendes Spektrum, wie auch von Rockenbach et al. (2012) beschrieben. Die Interflavanspaltung führt zu den Produktionen m/z 603 und 577 im MS^2 . Danach ist davon auszugehen, dass sich die Ethyl-Verknüpfung zwischen der oberen und mittleren Monomereinheit befindet, da das entsprechende Ethyl(epi)catechin Dimer eine um 2 Da geringere Pseudomolekularmasse aufzeigt. Die weiteren Molekülbrüche des Fragmentions m/z 603 im MS^3 sind ebenfalls für diese Substanz charakteristisch. Es entstehen die Fragmente m/z 451 ($[603-152-H]^-$) und 433 ($[603-152-18-H]^-$) aus der RDA-Reaktion und das Fragment m/z 289 aus einer erneuten QM-Spaltung. Die entsprechenden Neutralverluste von 314 Da charakterisieren das Vinyl(epi)catechin-Fragment (-2 Da aufgrund der vorangegangenen QM-Spaltung).

2.2.1.2 *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren

17 mögliche Verbindungen mit zehn verschiedenen Summenformeln konnten mit der FT-ICR-MS-Analyse für die Gruppe der *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren (NPA) detektiert werden (Massenspuren ab S. 148). Tabelle 2.13 fasst die Ergebnisse der FT-ICR-MS-Analyse zusammen. Zehn dieser Verbindungen konnten mit der IT-MS-Analyse näher charakterisiert und im HPLC-UV-Chromatogramm auf S. 43 bei 320 nm zugeordnet werden. Die entsprechenden UV- und Fragmentierungsdaten der IT-MS-Analyse sind in Tabelle 2.14 (S. 67) und Tabelle 2.15 (S. 69) aufgeführt.

Tabelle 2.13: FT-ICR-MS-Daten von *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren im Extrakt der fermentierten Kakaobohnen Java1. Mit einem Stern gekennzeichnete Verbindungen konnten zusätzlich mit IT-MS-Daten, für mindestens ein Isomer, charakterisiert werden.

Substanz	Summenformel ^a	theoretische Masse, m/z	Anzahl an Isomeren	Abweichung ppm
Zimtsäureaspartat	C ₁₃ H ₁₃ O ₅ N	262,0721	1	0,5
p-Coumarsäureaspartat*	C ₁₃ H ₁₃ O ₆ N	278,0670	2	0,1-0,3
p-Coumarsäureglutamat	C ₁₄ H ₁₅ O ₆ N	292,0721	1	0,5
Kaffeesäureaspartat*	C ₁₃ H ₁₃ O ₇ N	294,0619	2	0,1-0,3
Kaffeesäureglutamat*/ Ferulasäureaspartat*	C ₁₄ H ₁₅ O ₇ N	308,0776	2	0,4-0,6
p-Coumarsäuretyrosin*	C ₁₈ H ₁₇ O ₅ N	326,1034	2	0,3-0,7
p-Coumarsäurehydroxytyrosin*/ Kaffeesäuretyrosin*	C ₁₈ H ₁₇ O ₆ N	342,0983	2	0,9
Ferulasäuretyrosin	C ₁₉ H ₁₉ O ₆ N	356,1140	2	1,6-1,7
Kaffeesäurehydroxytyrosin*	C ₁₈ H ₁₇ O ₇ N	358,0932	3	0,7-0,9

^a Die Summenformeln entsprechen den ungeladenen Molekülen.

Die UV-DAD-Spektren der NPA sind zur Substanzcharakterisierung sehr hilfreich, da sie Aufschluss über die Hydroxyzimtsäure im Molekül geben. NPA mit Kaffeesäure und Ferulasäure haben ein charakteristisches UV-Maximum bei ~320 nm und NPA mit p-Coumarsäure bei ~308 nm.

Durch den Stickstoff im Molekül haben die NPA im Gegensatz zu den bisher erläuterten phenolischen Verbindungen ein geradzahliges m/z für die Molekülonen (Stickstoff-Regel). Diese Regel kann auch für die Interpretation der Fragmentionen genutzt werden. Bei der Fragmentierung von NPA entstehen sowohl geradzahlige als auch ungeradzahlige Molekülonen, diese können zur Unterscheidung der Fragmente nach Aminosäure und Hydroxyzimtsäure genutzt werden. Der Stickstoff der Aminosäure befindet sich demnach in dem Fragmention, das ein geradzahliges m/z aufweist. Ebenso enthalten ungeradzahlige Neutralverluste den Stickstoff.

Die Fragmentierungswege der NPA unterscheiden sich je nach Art der Aminosäure im Molekül. Bei NPA mit sauren Aminosäuren (Aspartat und Glutamat) ist die Spaltung zwischen der phenolischen Säure und der Aminosäure dominant, sodass jeweils die Fragmente von beiden Verknüpfungspartnern zugeordnet werden können. Bei NPA mit aromatischen Aminosäuren (Tyrosin und Hydroxytyrosin) erfolgt die Hauptfragmentierung dagegen innerhalb des Hydroxyzimtsäureteils.

UV- und Fragmentierungsdaten von Kaffeesäureaspartat als Beispiel für NPA mit sauren Aminosäuren (Aspartat und Glutamat)

Abbildung 2.21 zeigt das MS²-Spektrum von *trans*-Kaffeesäureaspartat. Durch die Molekülbrüche können sowohl die Fragmentionen der Aminosäure (m/z 132) als auch der Hydroxyzimtsäure (m/z 179) detektiert werden (Tomás-Barberán et al., 2007; Pereira-Caro et al., 2013). Das Fragmention m/z 132 ist geradzahlig und beinhaltet demnach den Stickstoff. Bei diesem Fragmention handelt es sich um die abgespaltene Aminosäure Aspartat, deren molare Masse 133 Da beträgt (Tabelle 2.14, S. 67). Für das Fragmention m/z 179 wird das Kaffeesäureanion vorgeschlagen. Im MS³ tritt das Fragment m/z 135 nach Decarboxylierung der Kaffeesäure auf ([M-179-44]⁻). Die Decarboxylierung ist generell eine für Hydroxyzimtsäuren charakteristische Fragmentierung (Clifford und Knight, 2004; Li W. et al., 2003). Der Neutralverlust von m/z 179 beträgt 115 Da. Dieser Neutralverlust besitzt eine ungerade nominale Masse und beinhaltet daher den Stickstoff der NPA. Weitere Fragmentionen resultieren aus der Abspaltung eines H₂O-Moleküls (m/z 276: [M-H₂O]⁻) und durch eine Decarboxylierung (m/z 250: [M-44-H]⁻).

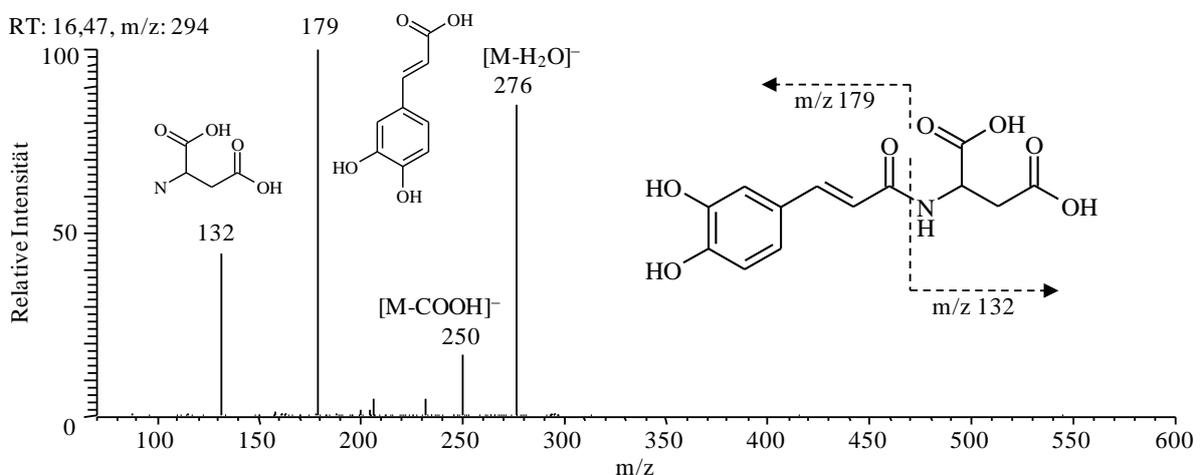


Abbildung 2.21: IT-MS-Fragmentspektren von *trans*-Kaffeesäureaspartat mit Strukturformel und möglicher Fragmentierung.

Die Massenspur m/z 294,0619 der FT-ICR-MS-Analyse zeigt die zwei Peaks der Stereoisomere von Kaffeesäureaspartat (Massenspur **41**, S. 149). Die *cis*- und *trans*-Isomere von Kaffeesäureaspartat weisen die gleichen Fragmente auf (Nr. 3 und 6 in Tabelle 2.14, S. 67). Eine Unterscheidung zwischen den Stereoisomeren ist über den Vergleich der UV-Absorptionsspektren möglich (Abbildung 2.22). Das *cis*-Isomer von Kaffeesäureaspartat zeigt entsprechend für *cis*-konfigurierte Hydroxyzimtsäuren eine Verschiebung der Absorption in den kurzwelligeren Bereich (Caccamese et al., 1979; Lin et al., 2000).

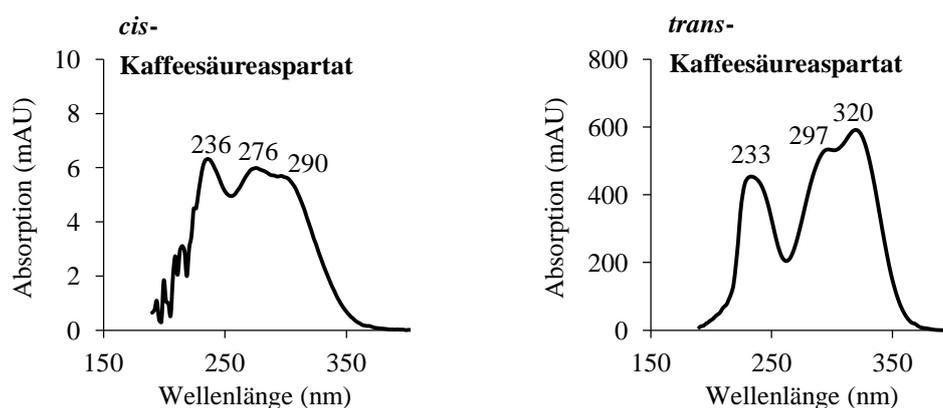


Abbildung 2.22: UV-Absorptionsspektren von *cis*- und *trans*-Kaffeesäureaspartat.

Anhand der UV-DAD-Spektren und der für Kaffeesäureaspartat erläuterten Fragmentierung konnten weitere NPA mit den Aminosäuren Aspartat und Glutamat vorläufig identifiziert werden. In Tabelle 2.14 (S. 67) sind die Daten der UV-DAD-Detektion sowie die Molekülonen und die Fragmentierungen aufgelistet. Die charakteristischen Fragmente der Hydroxyzimtsäure (fett) und der Aminosäure (unterstrichen) sind jeweils markiert.

Die FT-ICR-MS-Analyse ergab zwei Isomere des Molekülonen m/z 278,0670 der entsprechenden Summenformel $C_{13}H_{13}O_6N$ (Massenspur **39**, S. 148). Das in der Literatur beschriebene ***trans-p*-Coumarsäureaspartat** (Nr. 10) wurde mit dem UV-Maximum bei 308 nm und den Fragmentationen m/z 163 des Coumarsäureanions sowie m/z 132 der Aminosäure Aspartat vorläufig identifiziert (Stark und Hofmann, 2005). Für den kleinen Peak in der FT-ICR-MS-Massenspur wird das *cis*-Isomer angenommen.

Für das Molekülion m/z 308,0776 der Summenformel $C_{14}H_{15}O_7N$ wurden mit der FT-ICR-MS-Analyse zwei Peaks detektiert (Massenspur **42**, S. 149), diese entsprechen den Konstitutionsisomeren ***trans*-Kaffeesäureglutamat** (Nr. 9) und ***trans*-Ferulasäureaspartat** (Nr. 16). Über die Fragmente der IT-MS-Analyse sind auch diese beiden Substanzen zu unterscheiden (Tabelle 2.14, S. 67).

Tabelle 2.14: IT-MS- und UV-DAD-Daten von *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren mit Aspartat und Glutamat im Extrakt der fermentierten Kakaobohnen Java1.

Nr. ^a	RT	Substanz	UV-DAD λ_{max} (nm)	[M-H] ⁻	MS ² Fragmente m/z	MS ³ Fragmente m/z
3	9,04	<i>cis</i> -Kaffeensäureaspartat	236, 276, 290	294	[294] 179 , 276, <u>132</u> , 250	[179] 135
6	16,06	<i>trans</i> -Kaffeensäureaspartat	233, 297, 320	294	[294] 179 , 276, <u>132</u> , 250	[179] 135
9	21,14	<i>trans</i> -Kaffeensäureglutamat	244, 299, 318	308	[308] 179 , 290, <u>146</u> , 128, 246	[179] 135
10	23,35	<i>trans</i> - <i>p</i> - Coumarsäureaspartat	228, 308	278	[278] 163 , <u>132</u> , 234, 114, 260	[163] 119
14	29,35	<i>trans</i> - <i>p</i> - Coumarsäureglutamat	259, 309	292		
16	31,43	<i>trans</i> -Ferulasäureaspartat	237, 290, 319	308	[308] 193 , 246, 264, <u>132</u>	[193] 134, 149 , 178, 117

^a Nr. beziehen sich auf die HPLC-UV-Chromatogramme in Abbildung 2.11, S. 43. Die charakteristischen Fragmente der Hydroxyzimtsäuren sind fett markiert und die der Aminosäuren sind unterstrichen.

Die Substanz ***trans-p*-Coumarsäureglutamat** (Nr. 14) wurde anhand der UV-Absorption (309 nm) und des Molekülions m/z 292 mit der IT-MS-Analyse im HPLC-UV-Chromatogramm zugeordnet. Fragmentierungsdaten wurden, aufgrund der geringen Konzentration, nicht detektiert. Mit FT-ICR-MS wurde in der Massenspur (**40**, S. 149) des Molekülions m/z 292,0721 ebenfalls ein Peak der entsprechenden Summenformel C₁₄H₁₅O₆N detektiert.

Die Substanz ***trans*-Zimtsäureaspartat** mit dem Molekülion m/z 262,0721 der Summenformel C₁₃H₁₃O₅N konnte nur mit der FT-ICR-MS-Analyse detektiert werden (Massenspur **38**, S. 148).

UV- und Fragmentierungsdaten von Kaffeensäuretyrosin als Beispiel für NPA mit den Aminosäuren Tyrosin und Hydroxytyrosin

Die NPA mit Tyrosin und Hydroxytyrosin weisen andere Molekülbrüche auf, diese werden anhand der Fragmentierung von Kaffeensäuretyrosin erläutert und in Abbildung 2.23 (S. 68) dargestellt. Der dominante Molekülbruch erfolgt in der Hydroxyzimtsäure. Dabei wird ein Teil der Hydroxyzimtsäure, im Falle einer Kaffeensäure als Vinylcatechol mit m/z 135, abgespalten (siehe Fragment m/z 135 in Abbildung 2.23) (Arlorio et al., 2008). Das Fragmentation m/z 206 ([M-136]⁻) entspricht der Aminosäure Tyrosin mit einem Rest der Hydroxyzimtsäure.

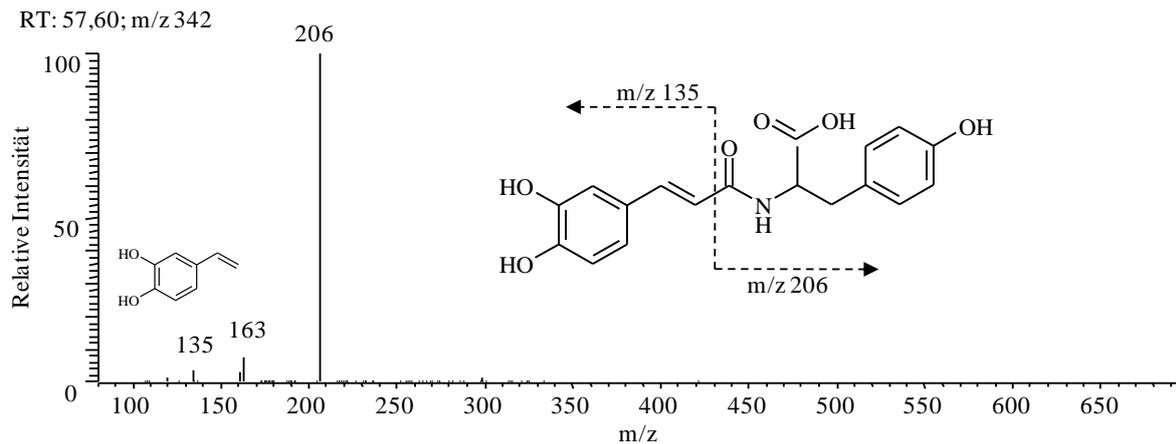


Abbildung 2.23: IT-MS-Fragmentspektren von *trans*-Kaffeensäuretyrosin mit Strukturformel und möglicher Fragmentierung.

Die Substanzen ***trans*-Kaffeensäuretyrosin** (Nr. 32) und ***trans*-p-Coumarsäurehydroxytyrosin** (Nr. 31) haben die gleiche Summenformel und demnach auch das gleiche Molekülion. Bei diesen Verbindungen handelt es sich um Konstitutionsisomere. Eine Unterscheidung zwischen den beiden Verbindungen kann anhand der Daten von UV-Absorption und Fragmentierung vorgenommen werden. Die Absorptionsspektren der UV-DAD-Detektion können *trans*-Kaffeensäuretyrosin und *trans*-p-Coumarsäurehydroxytyrosin eindeutig unterscheiden. In Abbildung 2.24 werden die verschiedenen Absorptionsmaxima der Kaffeensäure bei 320 nm von *trans*-Kaffeensäuretyrosin und der Coumarsäure bei 307 nm von *trans*-p-Coumarsäurehydroxytyrosin gezeigt.

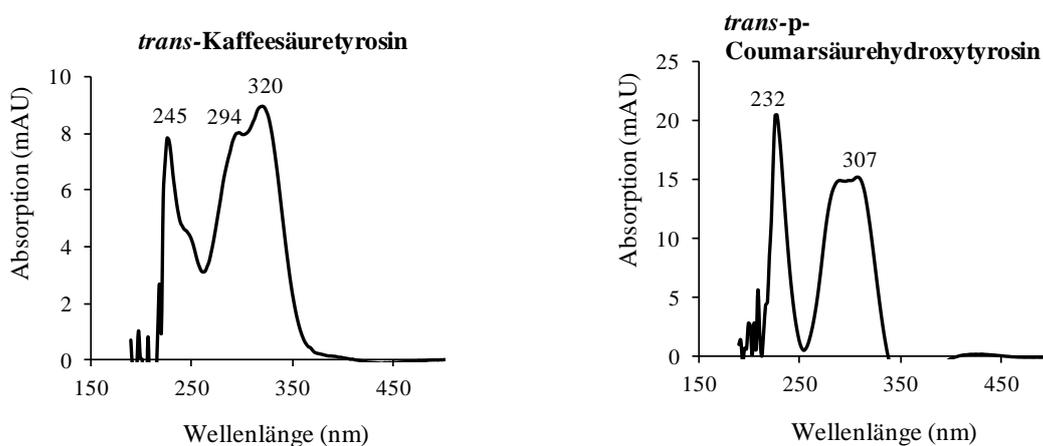


Abbildung 2.24: Absorptionsspektren von *trans*-Kaffeensäuretyrosin und *trans*-p-Coumarsäurehydroxytyrosin.

Auch die Fragmentierungsdaten der Ionenfalle eignen sich zur Unterscheidung. Die Fragmentierung von *trans*-*p*-Coumarsäurehydroxytyrosin führt zu einem Vinylphenolfragment mit *m/z* 119 entsprechend der Coumarsäure, da nur eine Hydroxylgruppe am aromatischen Ring gebunden ist (Clifford und Knight, 2004). Dementsprechend weist das Hauptfragment mit *m/z* 222 eine um 16 Da höhere Pseudomolekularmasse auf, da es sich um Hydroxytyrosin anstelle von Tyrosin handelt (Arlorio et al., 2008; Locatelli et al., 2013).

Anhand des beschriebenen Molekülbruchs können die anderen NPA mit Tyrosin bzw. Hydroxytyrosin ebenfalls vorläufig identifiziert werden (Clifford und Knight, 2004; Pereira-Caro et al., 2013). In Tabelle 2.15 sind die Daten von UV-Absorption, Massen der Molekülionen und Fragmentierung aufgelistet. Die charakteristischen Fragmente der Hydroxyzimtsäure (fett) und der Aminosäure (unterstrichen) sind jeweils markiert.

Tabelle 2.15: IT-MS- und UV-DAD-Daten von *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren mit Tyrosin und Hydroxytyrosin im Extrakt der fermentierten Kakaobohnen Java1.

Nr. ^a	RT	Substanz	UV-DAD λ_{max} (nm)	[M-H] ⁻	MS ² Fragmente m/z	MS ³ Fragmente m/z
24	44,76	<i>trans</i> -Kaffeensäurehydroxytyrosin	245, 294, 320	358	[358] <u>222</u> , 178, 161, 135	[222] 178
31	55,70	<i>trans-p</i> -Coumarsäurehydroxytyrosin	232, 282, 307	342	[342] <u>222</u> , 178, 145, 119	[222] 178
32	57,14	<i>trans</i> -Kaffeensäuretyrosin	227, 296, 321	342	[342] <u>206</u> , 163, 135	[206] 163, 119
41	69,39	<i>trans-p</i> -Coumarsäuretyrosin	228, 289, 308	326	[326] 282, <u>206</u> , 147, 239	[282] 119, 145, 162, 134

^a Nr. beziehen sich auf die HPLC-UV-Chromatogramme in Abbildung 2.11, S. 43. Die charakteristischen Fragmente der Hydroxyzimtsäure sind fett markiert und die der Aminosäure sind unterstrichen.

Die Substanz ***trans*-Kaffeensäurehydroxytyrosin** (Nr. 24) wurde anhand der UV-Absorption (320 nm) und des Molekülions *m/z* 358 über die IT-MS-Analyse zugeordnet. Die Ionen im MS² zeigen die entsprechenden Fragmente der Kaffeensäure (*m/z* 135) und des Hydroxytyrosins (*m/z* 222) (Tabelle 2.15). Für das Molekülion *m/z* 358,0932 der Summenformel C₁₈H₁₇O₇N wurden mit der FT-ICR-MS-Analyse drei Peaks detektiert (Massenspur **46**, S. 151). Dafür ist anzunehmen, dass neben dem mengenmäßig vorherrschenden *trans*-Isomer auch die *cis*-Form vertreten ist. Eine Erklärung für eine mögliche Struktur des dritten Isomers kann an dieser Stelle nicht gegeben werden.

Peak Nr. 41 im HPLC-UV-Chromatogramm wurde ***trans-p*-Coumarsäuretyrosin** zugeordnet. Das UV-DAD-Spektrum mit einem UV-Maxima bei 308 nm und das Fragmention *m/z* 206 des Tyrosins führten dabei zur vorläufigen Identifizierung (Tabelle 2.15). Die FT-ICR-MS-

Analyse ergab auch für diese Substanz (m/z 326,1034, $C_{18}H_{17}O_5N$) zwei Peaks in der Massenspur, wofür die *cis*- und *trans*-Isomere angenommen werden (Massenspur **43**, S. 150).

Für die Substanz mit dem Molekülion m/z 356,1140, entsprechend der Verbindung ***trans*-Ferulasäuretyrosin**, konnten zwei Substanzpeaks mit FT-ICR-MS detektiert werden (Massenspur **45**, S. 150). Es fehlen jedoch, aufgrund geringer Konzentrationen, weitere substanzcharakterisierende Daten von UV- und Fragmentspektren.

Für einige NPA wurden mehr als ein Isomer detektiert. Neben den mengenmäßig vorherrschenden *trans*-Formen, welche auch in der Literatur beschrieben sind, wird angenommen, dass es sich dabei um das jeweilige *cis*-Isomer handelt. Das Vorhandensein der *trans*- und der *cis*-Form ist bisher nur für Kaffeesäureaspartat beschrieben.

Mit Ausnahme von NPA mit der Aminosäure Tryptophan wurden alle bisher in Kakao bzw. Kakaoprodukten beschriebenen NPA in den Kakaobohnen aus Java detektiert (siehe Literaturübersicht ab S. 131). Die NPA mit Tryptophan (*trans*-Kaffeesäure-, *trans*-*p*-Coumarsäure- und *trans*-Ferulasäuretryptophan) weisen innerhalb der Gruppe der NPA die geringsten Konzentrationen auf (Stark et al., 2008). Dennoch wären mit der FT-ICR-MS-Analyse aufgrund der hohen Empfindlichkeit auch geringe Konzentrationen detektierbar. Hier wäre eine Untersuchung interessant, ob NPA mit Tryptophan bestimmten Kakaosorten vorbehalten sind.

2.2.1.3 Quercetin und Quercetinglykoside

Den Substanzpeaks 37, 40 und 44 im HPLC-UV-Chromatogramm bei 360 nm (Abbildung 2.11 und Tabelle 2.16) konnten die Hauptquercetinglykoside in Kakao, Quercetingalactosid, Quercetinglucosid und Quercetinarabinosid, zugeordnet werden (Andrés-Lacueva et al., 2008; Lamuela-Raventós et al., 2005; Ortega et al., 2008; Sanbongi et al., 1998; Sánchez-Rabaneda et al., 2003). Alle drei Substanzen weisen das typische UV-DAD-Spektrum für Quercetinglykoside mit einem Maximum um ~354 nm auf. Im MS² wurde jeweils das Produktion m/z 301, nach der Abspaltung des Zuckers, für das Aglykon Quercetin detektiert. Die Neutralverluste von 162 Da für Hexosen (Nr. 37 und 40) bzw. 132 Da für Pentosen (Nr. 44) führen zur Charakterisierung des Zuckers (Sánchez-Rabaneda et al., 2003). Quercetinglucosid und Quercetinarabinosid zeigen neben m/z 301 zusätzlich das Fragmentation m/z 300 im Massenspektrum (MS²). Dabei handelt es sich um das Radikalanion des Aglykons, welches aus der homolytischen Spaltung der glykosidischen Bindung hervorgeht und typischerweise für Quercetinglykoside detektiert wird (Cuyckens und Claeys, 2004). Die MS³ Fragmente, m/z 179, 151, 271, 257 und 107 bestätigen Quercetin als Aglykon (Hvattum, 2002). Quercetinglucosid wurde über den Vergleich mit der Referenzsubstanz identifiziert und machte dadurch auch die Zuordnung von Quercetingalactosid möglich (Sánchez-Rabaneda et al., 2003). Die Analyse der exakten Massen (FT-ICR-MS) bestätigt die Summenformeln C₂₁H₂₀O₁₂ für die Quercetinhexoside (Massenspur **49**, S. 152, m/z 463,0882) und C₂₀H₁₈O₁₁ für das Quercetinpentosid (Massenspur **48**, S. 151, m/z 433,0776).

Tabelle 2.16: IT-MS- und UV-DAD-Daten von Quercetin und Quercetinglykosiden im Extrakt der fermentierten Kakaobohnen Java I.

Nr. ^a	RT	Substanz	UV-DAD λ _{max} (nm)	[M-H] ⁻	MS ² Fragmente m/z	MS ³ Fragmente m/z
37	65,99	Quercetingalactosid	256, 354	463	[463] 301	[301] 271, 276, 257, 255, 179, 151, 271, 257, 107
40	68,65	Quercetinglucosid	256, 354	463	[463]: 301, 300	[301] 271, 276, 257, 255, 179, 151, 271, 257, 107
44	74,10	Quercetinarabinosid	229, 278, 354	433	[433] 300, 300	[300] 271, 255, 179, 151
50	102,26	Quercetin	259, 378	301		

^a Nr. beziehen sich auf die HPLC-UV-Chromatogramme in Abbildung 2.11, S. 43.

Für Quercetin konnte die Masse des Molekülions m/z 301,0354 mit FT-ICR-MS detektiert werden (Massenspur **47**, S. 151). Geringe Mengen von Quercetin in Kakao wurden in der Literatur beschrieben (Andrés-Lacueva et al., 2008; Ortega et al., 2008; Tomás-Barberán et al., 2007). Über die IT-MS-Analyse konnte anhand der detektierten Pseudomolekularmasse und des UV-DAD-Spektrums (Tabelle 2.16) der entsprechende Substanzpeak für Quercetin im

HPLC-UV-Chromatogramm (Nr. 50) zugeordnet werden. Fragmentierungsdaten konnten mit der IT-MS-Analyse, aufgrund der geringen Konzentration, nicht aufgenommen werden.

In Kakao wurde auch das Vorkommen von Quercetinglucuronid und -rutinosid beschrieben (Andrés-Lacueva et al., 2008; Ortega et al., 2008). In der in dieser Arbeit durchgeführten Analyse konnte für das entsprechende Molekülion m/z 477,0675 des Quercetinglucuronids mit der Summenformel $C_{21}H_{18}O_{13}$ anhand der FT-ICR-MS-Analyse ein Substanzpeak detektiert werden (Massenspur **50**, S. 152). Weitere substanzcharakterisierende UV- oder Fragmentierungsdaten wurden, aufgrund geringer Konzentrationen, nicht detektiert. Für die Substanz Quercetinrutinosid konnten in den Kakaobohnen aus Java mit keinem der beiden massenspektrometrischen Systeme entsprechende Daten detektiert werden.

2.2.1.4 Anthocyane

Die Untersuchung der Anthocyane erfolgte nach der Methode von Wu und Prior (2005) in unfermentierten und fermentierten Kakaobohnen (Kapitel 4.3.6.2, Abschnitt Anthocyane). Die flüssigchromatographische Trennung erfordert einen höheren Zusatz von Säure im Fließmittel (hier 5% Ameisensäure in Fließmittel A der Gradientenelution), als dies für die Analyse der bisher beschriebenen Substanzen der Fall ist. In saurem pH-Wert sind Anthocyane weitgehend stabil, sodass pH-Wert abhängige Umlagerungsvorgänge verhindert werden, welche zu breiten Substanzpeaks führen. Aufgrund des pH-Wertes im Elutionsmittel der Chromatographie werden Anthocyane im Massenspektrometer im positiven Modus ionisiert (Detektion der $[M+H]^+$ -Ionen). Bei 520 nm können Anthocyane selektiv detektiert werden, da sie im Gegensatz zu den meisten Kakaoanalyten Licht im sichtbaren Bereich absorbieren.

Unfermentierte Kakaobohnen enthalten zwei mengenmäßig vorherrschende Anthocyane, Cyanidingalactosid und Cyanidinarabinosid, die erstmals von Forsyth und Quesnel (1957) identifiziert wurden. Zudem wurden zwei weitere Cyanidinglykoside von Cakirer (2003) identifiziert, Cyanidinrutinosid und ein weiteres Cyanidinpentosid. Diese konnten in den unfermentierten Kakaobohnen über die UV-Absorption, die Molekülionen und die Fragmentierung, zugeordnet werden (Abbildung 2.25, S. 73).

Die Anthocyane, Cyanidinarabinosid und -galactosid, konnten im Gesamtionenstrom mit anschließender Fragmentierung (Fullscan-Modus) zugeordnet werden (Tabelle 2.17, S. 73). Cyanidinarabinosid und -galactosid fragmentieren unter Abspaltung des Zuckers (-132 Da für Pentosen, hier Arabinose und -162 Da für Hexosen, hier Galactose). Das Aglykonion m/z 287 des Cyanidins kann im MS^2 detektiert werden (Giusti et al., 1999). Im MS^3 wird Cyanidin über die entsprechenden Fragmente ebenfalls bestätigt (Hayasaka und Asenstorfer, 2002; Ha et al., 2010).

Ergebnisse und Diskussion

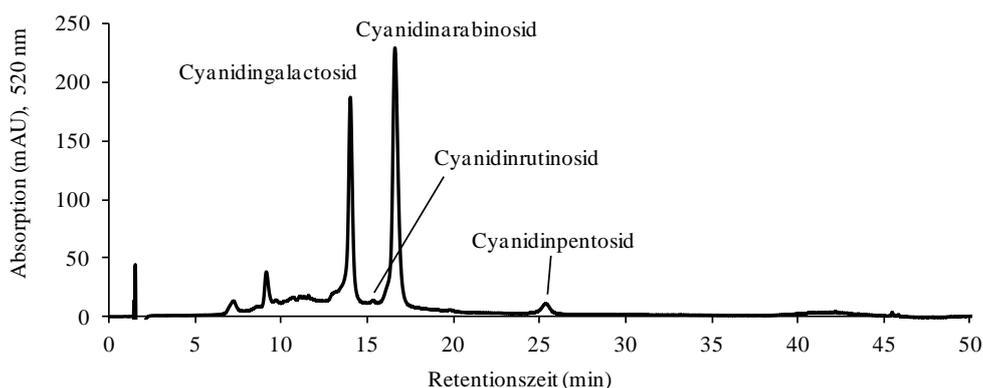


Abbildung 2.25: HPLC-VIS-Chromatogramm eines Extraktes unfermentierter Kakaobohnen, bei 520 nm.

Cyanidinrutosid und das nicht näher charakterisierte Cyanidinpentosid kommen in sehr geringen Konzentrationen vor, mit einem prozentualen Peakflächenanteil von <5% der 4 Anthocyane in der Summe. Aufgrund der niedrigen Konzentrationen und coeluiender Substanzen, die die Detektion stören, wurde der Nachweis dieser beiden Anthocyane im SRM-Modus durchgeführt. Dabei werden nur interessierende Molekülionen mit bestimmten Fragmentübergängen gemessen. Die Molekülionen mit den Fragmentübergängen sind in Tabelle 2.17 aufgeführt.

Tabelle 2.17: IT-MS- und UV-DAD-Daten von Anthocyanen im Extrakt unfermentierter Kakaobohnen.

Substanz	RT	UV-DAD λ_{\max} (nm)	[M+H] ⁺	MS ² Fragmente m/z	MS ³ Fragmente m/z
Cyanidingalactosid ^a	13,98	516	449	[449] 287	[287] 213, 231, 259, 241, 175, 189, 137
Cyanidinrutosid ^b	15,30	517	595	[595] 287	
Cyanidinarabinosid ^a	16,57	280, 517	419	[419] 287	[287] 213, 231, 259, 189, 175
Cyanidinpentosid ^b	25,33	517	419	[419] 287	

^a Im Fullscan-Modus analysiert. ^b Im SRM-Modus analysiert.

Die **fermentierten Kakaobohnen** aus Java (Java1 und Java2) und von der Elfenbeinküste wurden ebenfalls auf das Anthocyanprofil untersucht. Wie zu erwarten, wurden in den Extrakten der fermentierten Kakaobohnen nur sehr geringe Konzentrationen gefunden, bzw. in den Java1 Kakaobohnen konnten keine Anthocyane nachgewiesen werden (Abbildung A 4, S. 153).

2.3 Einfluss der Verarbeitung auf phenolische Verbindungen in Kakao

Die Auswirkung der technologischen Verarbeitung auf die phenolischen Verbindungen in Kakao wurde in Proben von Kakaoröstungen verschiedener Temperatur-Zeit-Kombinationen sowie in Proben einer Schokoladenherstellung untersucht. Diese Proben wurden im Technikumsmaßstab in den Laboren der Zentralfachschule der Deutschen Süßwarenwirtschaft (ZDS) hergestellt. Weitere Proben waren unfermentierte und fermentierte Kakaobohnen sowie Kakaopulver unterschiedlicher Alkalisierungsgrade. Auf Seite 113 in Tabelle 4.1 befindet sich eine zusammenfassende Übersicht der untersuchten Kakao-Verarbeitungsproben, eine detailliertere Darstellung ist im Anhang in Tabelle A 1 (S. 154).

Insgesamt wurden 17 Substanzen aus den Verbindungsklassen Flavanole, *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren (NPA) und Quercetinglykoside (Q-glyk) quantifiziert (Kapitel 4.3.6.1, Methode RP-100). Die monomeren Flavanole, Catechin und Epicatechin, wurden in den Kakao-Verarbeitungsproben auch enantioselektiv mit Cyclodextrin modifizierter Kapillarelektrophorese analysiert (Kapitel 4.3.7.1). Eine Auswahl der Röstversuchsproben wurde zudem zur Untersuchung möglicher Epimerisierungsprodukte von B-Typ Procyanidinen mit UHPLC-Triple-Quadrupol-MS (Kapitel 4.3.6.4) untersucht. Die absoluten Gehalte der NPA sind nur eingeschränkt mit den Daten der Literatur zu vergleichen, da die Quantifizierung, aufgrund fehlender Referenzsubstanzen, als Coumar- bzw. Kaffeesäure-Äquivalente erfolgte, sodass hier nur die relativen Veränderungen betrachtet werden können.

2.3.1 Unfermentierte und fermentierte Kakaobohnen

In dieser Arbeit wurden keine Fermentationsversuche durchgeführt, dennoch sind voneinander unabhängige unfermentierte und fermentierte Kakaobohnen (KB) auf ihre Gehalte an Flavanolen, NPA und Q-glyk untersucht worden. Mit diesen Daten ist jedoch nur bedingt eine Aussage über Veränderungen der phenolischen Verbindungen durch die Fermentation möglich.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl in unfermentierten als auch in fermentierten KB in allen drei Substanzklassen enorme Konzentrationsunterschiede bestehen (Tabelle 2.18, S. 75 bzw. Abbildung A 7 und Abbildung A 8 im Anhang, S. 158 und 160). Große Variationen werden auch in der Literatur beschrieben, da Polyphenolkonzentrationen durch viele Faktoren, wie Sorte, Herkunft oder Nacherntebehandlungsverfahren stark beeinflusst werden (Cooper et al., 2007). Die Gehalte von allen drei Substanzklassen waren in den fermentierten KB niedriger als in den unfermentierten. Für Flavanole sind in der Literatur, große Konzentrationsverluste durch die Fermentation ausreichend belegt (Aikpokpodion und Dongo, 2010; Elwers et al., 2009; Kim und Keeney, 1984). Die Auswirkung der Fermentation auf die Gehalte von NPA und Q-glyk wurde bisher jedoch noch kaum untersucht.

Tabelle 2.18: Konzentrationen von Flavanolen, *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetinglykosiden als Mittelwerte mit Spannweiten von unfermentierten und fermentierten Kakaobohnen. Prozentualer Vergleich der Mittelwerte von fermentierten zu unfermentierten Kakaobohnen.

	unfermentierte Kakaobohnen (n=18)		fermentierte Kakaobohnen (n=4)		% Vergleich
	MW (mg/g ff TM)	Min - Max ^b (mg/g ff TM)	MW (mg/g ff TM)	Min - Max ^b (mg/g ff TM)	
Flavanole^a	31,4	15,7 - 42,0	5,4	2,3 - 10,6	17
Epicat	17,8	9,6 - 21,1	2,4	1,0 - 4,7	13
Cat	0,8	0,4 - 1,6	0,2	0,07 - 0,28	20
proc B2	4,9	2,1 - 7,2	1,0	0,37 - 1,9	20
proc B5	1,5	0,6 - 2,4	0,3	0,12 - 0,53	20
proc C1	3,8	1,1 - 6,1	0,8	0,4 - 1,67	22
proc Tri1	0,7	0,4 - 0,9	0,2	0,08 - 0,4	32
proc D	2,0	0,2 - 4,5	0,5	0,26 - 1,15	27
NPA^a	9,6	6,3 - 12,8	4,3	2,2 - 6,9	44
K-asp	6,9	4,4 - 9,9	2,9	1,1 - 5,1	42
pC-asp	1,1	0,5 - 2,3	0,58	0,27 - 0,89	54
F-asp	0,12	n.q. - 0,19	0,13	0,12 - 0,14	110
K-OHtyr	0,92	0,5 - 2,0	0,22	0,11 - 0,31	22
pC-OHtyr	0,10	0,04 - 0,37	0,14	0,03 - 0,21	149
K-tyr	0,24	0,14 - 0,75	0,28	0,1 - 0,31	115
pC-tyr	0,30	0,11 - 0,86	0,08	0,04 - 0,17	26
Q-glyk^a	0,32	0,19 - 0,46	0,077	0,047 - 0,115	24
Q-gal	0,041	0,021 - 0,064	0,008	n.q. - 0,011	18
Q-glc	0,12	0,08 - 0,18	0,038	0,023 - 0,047	31
Q-arab	0,16	0,09 - 0,23	0,033	0,014 - 0,057	21

^a Die Gesamtgehalte beziehen sich jeweils auf die Summe der je Verbindungsklasse quantifizierten Substanzen.
^b Min - Max = minimaler und maximaler quantifizierter Wert in den untersuchten KB. n.q.: Gehalte waren nicht quantifizierbar.

Flavanole

Der Vergleich von unfermentierten KB mit denen von fermentierten KB zeigt, dass die Gesamtflavanolgehalte im Mittel in den fermentierten Proben nur 17% der Gehalte von unfermentierten KB entsprechen (Tabelle 2.18). In Fermentationsstudien von Kakao wurden drastische Verluste von Epicat und/oder den Gesamtpolyphenolen analysiert, welche in Größenordnungen zwischen 60 bis 95% lagen (Aikpokpodion und Dongo, 2010; Elwers et al., 2009; Kim und Keeney, 1984).

Die Epicat-Konzentrationen in den unfermentierten KB der vorliegenden Analyse liegen im Mittel bei 17,8 mg/g ff TM, mit einer Spannweite von 9,6 bis 21,1 mg/g ff TM. Vergleichende Literaturdaten ermittelten entsprechende Gehalte, jedoch teilweise auch höhere Konzentrationen. Für unfermentierte KB werden Epicat-Konzentrationen von 7,8 bis über 40 mg/g ff

TM beschrieben (Elwers et al., 2009; Hurst et al., 2011; Kim und Keeney, 1984; Niemenak et al., 2006; Pereira-Caro et al., 2013).

In den fermentierten KB wurden Epicat-Konzentrationen im Mittel von 2,4 mg/g ff TM mit einer Spannweite von 1,0 bis 4,7 mg/g ff TM quantifiziert. In der Literatur sind für fermentierte KB Epicat-Gehalte zwischen 1,2 und 3,7 mg/g ff TM zu finden (Hurst et al., 2011; Kim und Keeney, 1984; Mazor Jolić et al., 2011). Die hier analysierten fermentierten KB enthalten im Mittel nur etwa 13% der Epicat-Konzentrationen von unfermentierten KB (Tabelle 2.18, S. 75).

Für Catechin wurden, in Übereinstimmung mit den Daten der Literatur, relativ geringe Gehalte in den KB quantifiziert (Elwers et al., 2009; Hurst et al., 2011; Payne et al., 2010). Diese lagen in unfermentierten KB im Mittel bei 0,8 mg/g ff TM (0,4-1,6 mg/g) und in fermentierten KB bei 0,2 mg/g ff TM (0,07-0,28 mg/g). Die Cat-Konzentrationen der fermentierten KB entsprechen nur 20% der Konzentration von unfermentierten KB. In verschiedenen Fermentationsstudien wurden teilweise widersprüchliche Veränderungen der Cat-Konzentrationen festgestellt. Während Elwers et al. (2009) durch die Fermentation Cat-Verluste von über 99% quantifizierten, analysierten Aikpokpodion und Dongo (2010) eine gleichbleibende Cat-Konzentration.

Enantioselektive Analyse der monomeren Flavanole

Die enantioselektive Analyse der monomeren Flavanole in den unfermentierten KB konnte neben den in der pflanzlichen Biosynthese gebildeten Enantiomeren (–)-Epicat und (+)-Cat in fast allen Proben auch geringe Mengen an (–)-Cat quantifizieren (Tabelle A 2, S. 159). Die (–)-Cat-Konzentrationen lagen dabei im Mittel bei 0,15 mg/g ff TM, während die von (+)-Cat bei 0,53 mg/g ff TM lagen. Hurst et al., (2011) und Kofink et al. (2007a) analysierten ebenfalls unfermentierte KB enantioselektiv und konnten kein (–)-Cat detektieren. Eine Epimerisierung während der Probenaufarbeitung kann weitestgehend ausgeschlossen werden. Selbst unter extremen Bedingungen, wie UV-Licht und Sauerstoffexposition für 24 Stunden konnten Kofink et al. (2007a) keine Epimerisierung der vorhandenen Enantiomere feststellen. Da die in dieser Arbeit analysierten Proben weder Hitze noch UV-Licht ausgesetzt waren, ist davon auszugehen, dass während der Probenaufarbeitung keine Epimerisierung stattgefunden hat. Neben der Möglichkeit, dass bereits in den unfermentierten KB geringfügig Epimerisierungen stattgefunden haben, kann auch die Comigration mit anderen Flavanolen hier nicht ausgeschlossen werden. Die meisten Flavanole weisen die gleiche UV-Absorption auf und sind demnach nicht über das UV-DAD-Spektrum zu unterscheiden.

Zwei der unfermentierten Kakaoproben zeichnen sich durch verhältnismäßig hohe Cat-Konzentrationen aus. Die enantioselektive Analyse zeigt, dass der hohe Cat-Gehalt

maßgeblich von (+)-Cat bestimmt ist (Tabelle A 2, S. 159). Zudem haben diese beiden Proben die niedrigsten Gesamtflavanolgehalte (Proben 13 und 17, Abbildung A 7, S. 158). Derartige Unterschiede in der Zusammensetzung der Flavanole könnten möglicherweise durch Sorte, Herkunft oder Reifegrad bedingt sein. Zu den unfermentierten Kakaobohnen waren diesbezüglich jedoch keine Angaben vorhanden.

In fermentiertem Kakao ist (-)-Cat bereits nachgewiesen worden (Hurst et al., 2011). Der Temperaturanstieg während der Fermentation (45-55 °C) ist vermutlich für die Entstehung von (-)-Cat aus (-)-Epicat verantwortlich. So finden bereits bei der Fermentation von Kakao Epimerisierungen der Catechine statt. In den fermentierten Kakaoproben aus dieser Arbeit überstiegen die (-)-Cat-Konzentrationen jeweils die von (+)-Cat (Tabelle 2.19). Hurst et al. (2011) untersuchten KB verschiedener Fermentationsgrade. Im Falle von stark fermentierten KB überstiegen die (-)-Cat-Gehalte die von (+)-Cat. Möglicherweise handelt es sich bei den in dieser Arbeit untersuchten fermentierten KB ebenfalls um stark fermentierte Proben.

Tabelle 2.19: Konzentrationen von (-)-Epicatechin, (+)-Catechin und (-)-Catechin in fermentierten Kakaobohnen.

	Java1 MW ± SD (mg/g ff TM)	Java2 MW ± SD (mg/g ff TM)	Elfenbeinküste MW ± SD (mg/g ff TM)	Ghana MW ± SD (mg/g ff TM)
(-)-Epicatechin	4,8 ± 0,08	2,9 ± 0,13	1,2 ± 0,3	1,4 ± 0,15
(+)-Catechin	0,09 ± 0,017	0,05 ± 0,01	0,01 ± 0,002	0,01 ± 0,002
(-)-Catechin	0,18 ± 0,025	0,25 ± 0,015	0,02 ± 0,003	0,03 ± 0,001

N-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren

In den fermentierten KB wurden K-asp-Konzentrationen quantifiziert, die im Mittel um 58% geringer waren als die der unfermentierten Proben (Tabelle 2.18, S. 75). Bisher ist nur die Veränderung von K-asp in einer Fermentationsstudie untersucht worden. Dabei wurden Verluste von 67% des Ursprungsgehaltes festgestellt. Weiterhin wurde festgestellt, dass die Gehaltsverluste von K-asp durch die Fermentation verglichen mit den Flavanolen weniger drastisch ausfielen (Elwers et al., 2009). Die in dieser Arbeit quantifizierten NPA-Konzentrationen in den fermentierten KB entsprechen 44% der Gehalte von unfermentierten KB. Die Gehalte der Flavanole sind dagegen in den fermentierten KB nur 17% verglichen mit den von unfermentierten KB (Tabelle 2.18, S. 75). So zeigen auch diese Proben möglicherweise, dass NPA gegenüber der Fermentation stabiler sind als Flavanole.

Generell variieren die Gehalte der NPA sowohl in den unfermentierten als auch in den fermentierten KB stark (siehe Spannweiten in Tabelle 2.18, S. 75). Elwers et al. (2009) ermittelten in unfermentierten KB ebenfalls stark schwankende K-asp-Konzentrationen. Dabei wurden K-asp-Gehalte bis 6,6 mg/g ff TM quantifiziert (als Chlorogensäureäquivalente), während in anderen Proben kein K-asp enthalten war. Bezüglich anderer NPA als K-asp liegen für unfermentierten Kakao keine vergleichenden Literaturdaten vor.

In fermentierten KB stellten Arlorio et al. (2008) Unterschiede in den K-OHtyr-Konzentrationen (mit synthetisiertem K-OHtyr quantifiziert) fest und führten diese auf verschiedene Herkünfte zurück. Demnach waren in KB aus Ghana die höchsten Gehalte zu finden (0,0026 mg/g ff TM), gefolgt von KB von der Elfenbeinküste (0,0022 mg/g ff TM). Die niedrigsten Konzentrationen wurden in Arriba-KB (0,0014 mg/g TM) quantifiziert. Die in dieser Arbeit ermittelten Gehalte bestätigen die Unterschiede für die Herkunft Ghana (0,21 mg/g ff TM) und Elfenbeinküste (0,11 mg/g ff TM). Zudem zeigen die Ergebnisse, dass die KB aus Java (Java1 0,31 mg/g ff TM, Java2 0,19 mg/g ff TM) diese Gehalte noch übersteigen (quantifiziert als Kaffeesäureäquivalente) (Fett markiert in Tabelle A 7, S. 167 und Tabelle A 9, S. 169). Elwers et al. (2009) quantifizierten die höchsten K-asp-Gehalte in Criollo-KB (unfermentierte KB). Der Kakaotyp der in dieser Arbeit analysierten fermentierten KB aus Java war nicht bekannt. Kakao aus Indonesien wird jedoch aufgrund des besonderen Aromas den Edelkakaos zugeordnet, welches wiederum dem Kakaotyp Criollo zugeschrieben wird (ICCO, 2010).

In allen unfermentierten und fermentierten KB zeigen die Konzentrationsverhältnisse der NPA zueinander (Substanzprofil) ein tendenzielles Muster dahingehend, dass K-asp mengenmäßig vorherrscht, gefolgt von pC-asp und K-OHtyr (Abbildung A 7, S. 158 und Abbildung A 8, S. 160). Lechtenberg et al. (2012) untersuchten K-asp, pC-asp, K-OHtyr, K-tyr und pC-tyr in fermentierten KB verschiedener Herkünfte und stellten trotz absoluter Gehaltsunterschiede die gleiche Reihenfolge in den Konzentrationen zueinander fest.

Quercetinglykoside

Fermentierte KB weisen mit 0,08 mg/g ff TM im Mittel (Spannweite 0,05-0,12 mg/g ff TM) nur 24% der Quercetinglykosidkonzentrationen von unfermentierten KB auf (MW 0,32 mg/g ff TM, Spannweite 0,19-0,46 mg/g ff TM, Tabelle 2.18, S. 75). Die Verluste der Quercetinglykoside durch die Fermentation liegen damit in einer ähnlichen Größenordnung wie die von Flavanolen, wofür in den fermentierten KB verglichen mit den von unfermentierten KB nur 17% der Gehalte quantifiziert werden konnten (Tabelle 2.18, S. 75).

Vergleichende Literaturdaten zu Konzentrationen von Quercetinglykosiden in unfermentierten KB liegen kaum vor. In einem „mit Polyphenolen angereicherten Kakaopulver“, hergestellt

aus unfermentierten KB (unfermentierte KB wurden zur Inaktivierung der Polyphenoloxidase blanchiert, anschließend folgte die Trocknung im Ofen und die Vermahlung zu Kakaopulver) wurden 0,25 mg/g ff TM für Q-glc und 0,3 mg/g ff TM für Q-arab quantifiziert (Tomás-Barberán et al., 2007). Pereira-Caro et al. (2013) ermittelten extrem hohe Werte in unfermentierten KB von 8,2 mg/g ff TM für Q-gal, 16,3 mg/g ff TM für Q-glc und 16,4 mg/g ff TM für Q-arab. Dabei überstiegen die Gehalte der Quercetinglykoside sogar die der ebenfalls quantifizierten Flavanole.

Trotz absoluter Unterschiede zeigen die unfermentierten KB alle ein einheitliches Profil mit folgender Reihenfolge in den Konzentrationen: Q-arab > Q-glc > Q-gal (Abbildung A 7, S. 158). Dieses Profil gilt ebenfalls für die fermentierten KB mit der Herkunft Elfenbeinküste und Ghana. Bei den beiden KB aus Java ist dagegen Q-glc das mengenmäßig vorherrschende Quercetinglykosid (Abbildung A 8, S. 160).

2.3.1.1 Fazit der unfermentierten und fermentierten Kakaobohnen

Die Gehalte von Flavanolen, *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetinglykosiden in unfermentierten und fermentierten Kakaobohnen variieren stark. In den unfermentierten Kakaobohnen konnten zwischen den niedrigsten und den höchsten quantifizierten Werten 2 bis 2,6-fache Konzentrationsunterschiede gemessen werden. Die Gehalte von fermentierten Kakaobohnen unterschieden sich sogar noch stärker mit 2,5 bis 4,6-fachen Konzentrationsunterschieden zwischen den niedrigsten und den höchsten Werten. Demnach ist die Auswahl der Kakaobohnen ein entscheidender Aspekt für den Gehalt an phenolischen Verbindungen in den resultierenden Kakaoprodukten.

2.3.2 Kakaoröstung

Im Technikumsmaßstab wurden verschiedene Röstungen mit KB durchgeführt (Tabelle A 1, S. 154, listet alle Röstungen auf). Für die Röstversuche wurden drei unterschiedliche Chargen von KB verwendet. Zwei der Chargen hatten die Herkunft Java (Java1 und Java2) und eine stammte von der Elfenbeinküste (CIV). Die KB Java1 wurden mit unterschiedlichen Temperaturen und Zeiten geröstet, um die Veränderungen der phenolischen Verbindungen in Abhängigkeit dieser Röstparameter zu untersuchen. Die KB Java2 und CIV wurden jeweils einer vergleichenden Röstung unterzogen. Je angegebener Temperatur-Zeit-Kombination wurden zwei voneinander unabhängige Röstungen mit jeweils 5 kg KB durchgeführt. Im Anhang sind die für die Röstversuche verwendeten Kakaobohnen sowie der verwendete Röster abgebildet (Abbildung A 5, S. 156 und Abbildung A 6, S. 157).

Reproduzierbarkeit der Röstung

Die Veränderungen der phenolischen Verbindungen sind direkt von den Bedingungen der Röstung abhängig. Im Abstand von einem halben Jahr wurden die KB Java1 jeweils zweimal mit dem gleichen Röster für 30 min bei 150 °C geröstet. Das Ausmaß der Veränderungen der quantifizierten Substanzen aus den drei Verbindungsgruppen (Flavanole, NPA und Q-glyk) war dabei in engen Grenzen vergleichbar. Tabelle 2.20 stellt die relativen Standardabweichungen der Substanzen in den vier Röstproben (150 °C/30 min) dar, von denen jeweils zwei an einem Termin durchgeführt wurden. Zusätzlich befindet sich im Anhang eine vergleichende grafische Darstellung (Abbildung A 9, S. 161).

Tabelle 2.20: Relative Standardabweichungen (rel. SD %) der quantifizierten Substanzen von insgesamt vier Röstungen (150 °C/30 min) an zwei verschiedenen Terminen.

Substanz	rel. SD %	Substanz	rel. SD %
Epicat	5,3	K-asp	2,8
Cat	13,3	pC-asp	8,2
proc B2	4,8	F-asp	1,3
proc B5	5,8	K-OHtyr	6,3
proc C1	7	pC-OHtyr	8,3
proc Tri1	4,5	K-tyr	5,8
proc D	16,6	pC-tyr	16,6
(-)-Epicat	9,6		
(-)-Cat	21,4	Q-glc	2,7
(+)-Cat	3,2	Q-arab	18,1

2.3.2.1 Stabilitätsvergleich von Flavanolen, *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetinglykosiden

Die KB Java1 wurden jeweils für 30 min mit verschiedenen Temperaturen zwischen 100 und 160 °C geröstet, um den Einfluss der Temperatur auf die drei verschiedenen Substanzklassen zu untersuchen. Die zur Kakaoröstung verwendeten Zeiten und Temperaturen hängen von vielen Faktoren ab, wie dem Kakaomaterial (Bohnen, Nibs oder Masse), dem Endprodukt (dunkle Schokolade oder Milch-Schokolade) oder der Sorte (Criollo oder Forastero) (siehe Röstung in Kapitel 1.1.3). Verluste der Flavanole durch die Röstung von Kakao sind sowohl anhand von Summenparameteren (Gesamtphenol- oder Gesamtprocyanidingehalte) als auch von Einzelsubstanzen bereits beschrieben worden (Mazor Jolić et al., 2011). Auch die Epimerisierung der Catechine in KB wurde anhand verschiedener Röstungen von Hurst et al. (2011) in enantioselektiven Analysen aufgezeigt. Die Veränderungen von NPA und Q-glyk sind bisher kaum untersucht. Nachfolgend werden die Auswirkungen der Röstung innerhalb und zwischen den verschiedenen Substanzgruppen miteinander verglichen. Im Anhang sind die in den Röstversuchsproben quantifizierten Substanzgehalte aufgeführt (Tabelle A 3 bis Tabelle A 7, S. 164-167).

KB werden bei Temperaturen von 130 bis 150 °C für 15 bis 45 min geröstet (Krysiak et al., 2013). Durch diese großen Unterschiede in der Röstzeit und -temperatur ist ein Vergleich mit den in der Literatur beschriebenen Konzentrationsänderungen teilweise problematisch. Zudem werden verschiedene Röstapparaturen verwendet. Es werden z.B. Kaffeeröster, übliche Backofen oder konventionelle Röster angegeben, wodurch ein Vergleich zusätzlich erschwert ist.

Konzentrationsänderungen

In allen drei Substanzgruppen sinken die Konzentrationen stetig bei steigenden Temperaturen (Abbildung 2.26, S. 82). Flavanole, NPA und Q-glyk zeigen jedoch Stabilitätsunterschiede. Die Verluste von Q-glyk und NPA liegen in einer vergleichbaren Größenordnung (vgl. Prozentangaben). Bei Temperaturen bis 120 °C nehmen die Gehalte der NPA und Q-glyk nur wenig ab. Die Verluste sind dabei geringer als 7% des ursprünglichen Gehaltes. Auch nach einer Röstung bei 160 °C für 30 min, verbleiben 67% der NPA und 61% der Q-glyk erhalten.

Die vergleichende Literatur zu Konzentrationsänderungen der NPA durch die Röstung stellt sich widersprüchlich dar. Für K-OHtyr wurden sowohl Verluste zwischen 31 und 50% berichtet (Arlorio et al., 2008, Röstparameter: 130 °C/keine Angabe zur Röstzeit), als auch nur geringe Verluste zwischen 12 und 16%, bzw. gar keine Verluste (Lechtenberg et al., 2012, Röstparameter: 200-220 °C/7-9 min). Bezüglich der Gesamtsumme der quantifizierten NPA

(Summe aus K-asp, pC-asp, K-OHtyr, K-tyr und pC-tyr) stellten Lechtenberg et al. (2012) keine wesentliche Veränderung im Gehalt fest.

In den in Abbildung 2.26 aufgeführten Röstungen sind die Flavanole in allen Temperaturbereichen instabiler als NPA und Q-glyk. In einem Temperaturbereich von 100 bis 140 °C sinken die Gehalte auf 37% der Ausgangskonzentration ab. Bei höheren Temperaturen (140 bis 160 °C) stellt sich dann ein relativ gleichbleibendes Niveau mit einem Restgehalt zwischen 30 bis 40% ein. Hurst et al. (2011) rösteten KB bei 163 °C für 13, 20 und 25 min und erhielten ähnliche Ergebnisse für Epicat, da die Verluste der 20 und 25 minütigen Röstungen vergleichbar waren.

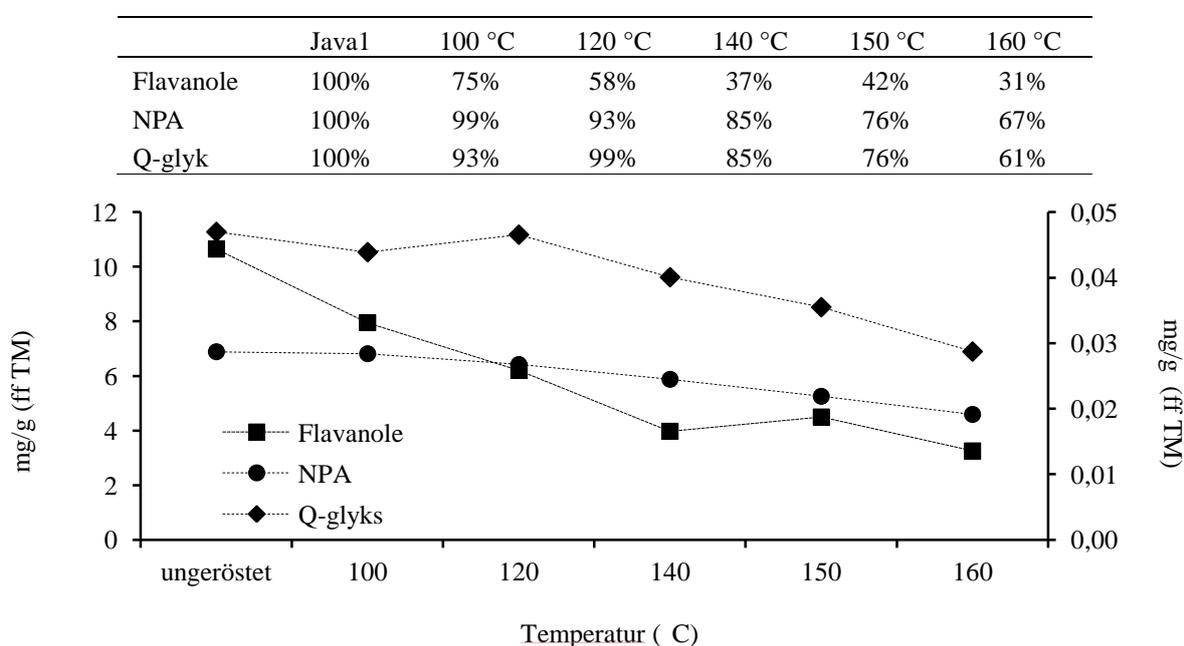


Abbildung 2.26: Konzentrationen von Flavanolen, *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetinglykosiden (Sekundärachse) von ungerösteten und bei verschiedenen Temperaturen gerösteten Kakaobohnen Java1 sowie prozentuale Anteile (bezogen auf die ungerösteten KB).

Auch die Einzelsubstanzen der Flavanole zeigen Unterschiede in den Konzentrationsänderungen (Tabelle A 3, S. 164). Nach einer Röstung bei 160 °C für 30 min sind noch 33% der Anfangskonzentration von Epicat in den KB enthalten. Der Cat-Gehalt nimmt mit den verschiedenen Röstungen kontinuierlich zu. Durch die Epimerisierung steigt der Cat-Gehalt, in der stärksten Röstung auf 236% der Anfangskonzentration an. Die Gehalte der Dimere entsprechen noch 29% (proc B2) und 28% (proc B5) der Konzentrationen von ungerösteten KB. Das Trimer proc C1 ist durch die Röstung auf einen Restgehalt von 10% und proc Tri1 auf 22% gesunken. Für proc D konnten in den gerösteten KB nur noch 8% der ursprünglichen Konzentration quantifiziert werden. Mazor Jolić et al. (2011) stellten ebenfalls Unterschiede in den Verlusten durch die Kakaoröstung nach dem Polymerisationsgrad fest. Nach einer

Röstung bei 140-150 °C für 20 min (konventioneller Röster) waren die Konzentrationen von Epicat um 27%, die von proc B2 um 30% und die von proc B1 sogar um 57% gesunken.

Substanzprofile

Die Konzentrationsverhältnisse der Substanzen zueinander (Substanzprofile) bleiben in den Gruppen NPA und Q-glyk bei allen durchgeführten Röstungen in einer Spanne von 100 bis 160 °C (jeweils 30 min) konstant (Abbildung 2.27). Damit ist davon auszugehen, dass zwischen den einzelnen Substanzen in diesen Verbindungsklassen keine unterschiedlichen Stabilitäten in Abhängigkeit zur Rösttemperatur bestehen.

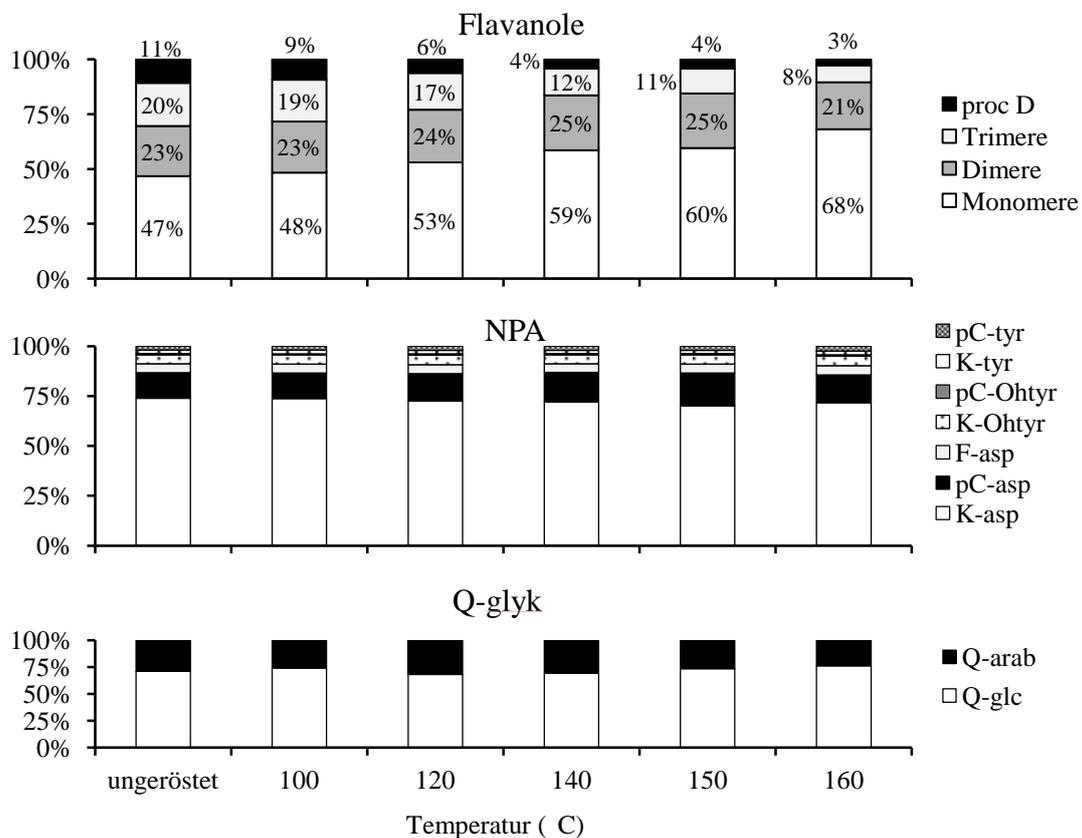


Abbildung 2.27: Substanzgruppen-Profile der Flavanole (nach Polymerisationsgrad), *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetinglykoside von ungerösteten und bei verschiedenen Temperaturen gerösteten Kakaobohnen Java1.

Das Flavanolprofil verändert sich sukzessive durch die Röstung. In Abbildung 2.27 ist die relative Zusammensetzung der Flavanole nach ihrem Polymerisationsgrad dargestellt. Die ungerösteten KB haben einen Monomerenanteil von 47% der hier quantifizierten Flavanole.

Nach einer starken Röstung (160 °C/30 min) ist der Anteil der Monomere auf 68% angestiegen. Die Anteile der Dimere bleiben über die verschiedenen Temperaturen der Röstungen relativ konstant. Die Trimere proc C1 und proc Tri1 sowie das Tetramer proc D nehmen prozentual an den quantifizierten Flavanolen am stärksten ab. Diese Änderungen im Polymerisationsgrad entsprechen den im Abschnitt Konzentrationsänderungen beschriebenen Verlusten bzw. Zunahmen.

Die Verschiebung des Flavanolprofils zeigt, dass der Polymerisationsgrad einen Einfluss auf die Stabilität von Flavanolen hat, bzw. die Röstung zu einer Verringerung des Polymerisationsgrades führt. Die Molekülgröße kann dabei für eine größere Instabilität verantwortlich sein. Es kann auch vermutet werden, dass während der Röstung die Interflavanbindungen der Procyanidine aufbrechen und zur Entstehung von geringer polymerisierten Procyanidinen bzw. zu monomeren Bruchstücken führen. Auch die Interflavanbindungen höher polymerisierter Procyanidine, welche nicht in dieser Arbeit untersucht wurden, brechen vermutlich auf und bilden wiederum geringer polymerisierte Moleküle. In Bezug auf die Bioverfügbarkeit ist eine Erhöhung des Monomerenanteils möglicherweise von Vorteil. Die Absorption von Procyanidin Dimeren in das Plasma nach Konsum von Kakao konnte im Menschen zwar nachgewiesen werden, die Absorptionsrate war jedoch verglichen mit den Monomeren 100-fach geringer (Holt et al., 2002).

Epimerisierungsreaktion der monomeren Flavanole

Die Epimerisierungsreaktion durch die Röstungen bei verschiedenen Temperaturen kann anhand von enantioselektiven und nicht enantioselektiven Daten gezeigt werden. Dabei nehmen die Gehalte der ursprünglich durch die Biosynthese gebildeten Enantiomere (-)-Epicat und (+)-Cat kontinuierlich ab, während (-)-Cat zunimmt.

Nicht enantioselektive Analyse mit HPLC-DAD: In den fermentierten KB sind 4,7 mg/g ff TM Epicat enthalten. Nach einer 30 minütigen Röstung bei 160 °C ist der Gehalt von Epicat auf 1,56 mg/g ff TM gesunken, dies entspricht einem Restgehalt von 33%. Die Konzentration von Cat in den fermentierten KB liegt bei 0,28 mg/g ff TM und steigt durch die Röstung bei 160 °C auf 236% (0,66 mg/g ff TM) des Anfangsgehaltes an (Abbildung 2.28, S. 85 und Tabelle A 3, S. 164). Dieser gegensätzliche Verlauf von Epicat und Cat wurde auch von Payne et al. (2010) in Röstungen von KB bei verschiedenen Temperaturen gezeigt.

Enantioselektive Analyse mit Cyclodextrin modifizierter Kapillarelektrophorese: Die enantioselektive Analyse zeigt ebenfalls die stetig sinkende (-)-Epicat-Konzentration von 4,77 mg/g ff TM auf 1,68 mg/g ff TM (35%). Ebenso sinkt der (+)-Cat-Gehalt auf 33% des ursprünglichen Gehaltes, von 0,09 auf 0,03 mg/g ff TM (Abbildung 2.28, S. 85 und Tabelle A 5, S. 166). Der Anstieg von Cat in den verschiedenen Röstungen wird demnach nur durch die

Zunahme von (-)-Cat aus der Epimerisierungsreaktion verursacht. In den ungerösteten Kakaobohnen sind 0,18 mg/g ff TM (-)-Cat enthalten, nach der Röstung bei 160 °C für 30 min ist dieser Gehalt auf 439% angestiegen (0,79 mg/g ff TM). Die fortschreitende Epimerisierungsreaktion wurde von Hurst et al. (2011) ebenfalls anhand von enantio-selektiven Analysen verschiedener Röstungen aufgezeigt. Dort führte eine starke Röstung (163 °C/25 min, 300 g Nibs im Backofen) dazu, dass (-)-Epicat und (-)-Cat in fast gleichen Konzentrationen vorlagen.

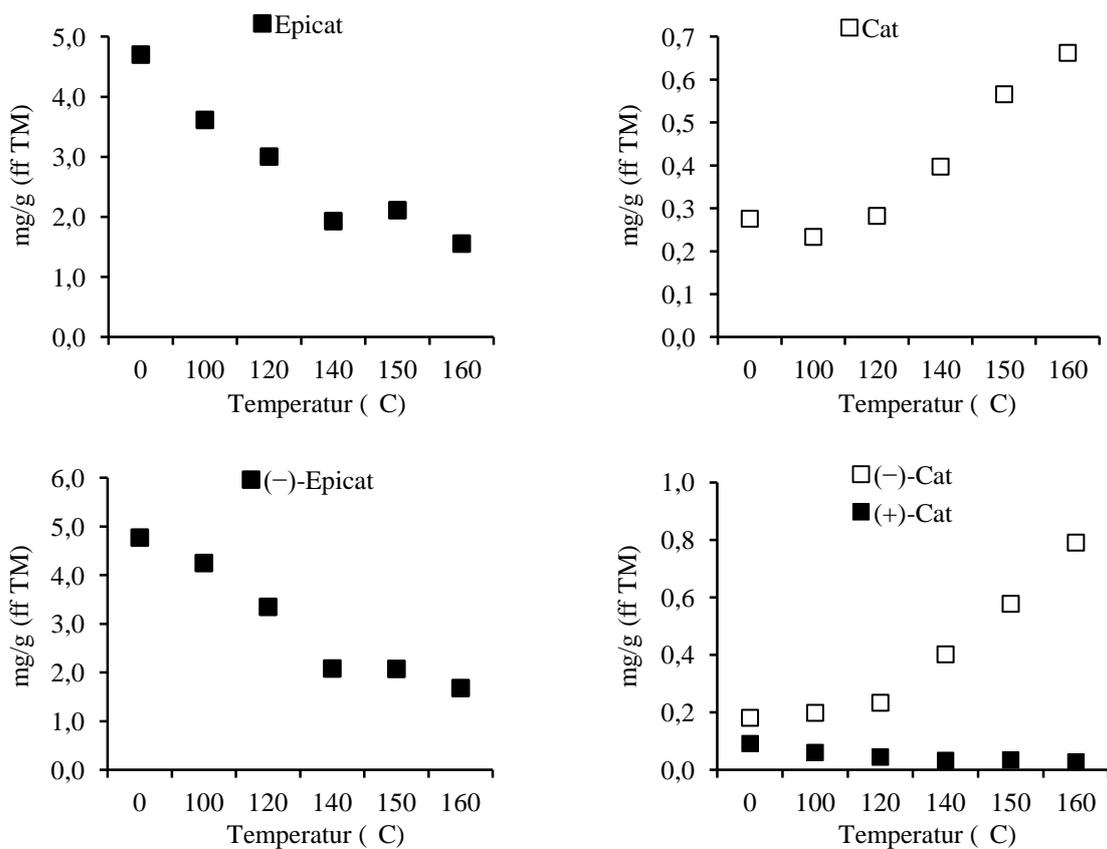


Abbildung 2.28: Konzentrationen von Epicatechin und Catechin der enantioselektiven (unten) und nicht enantioselektiven (oben) Analyse von ungerösteten und bei verschiedenen Temperaturen gerösteten Kakaobohnen Java1.

Die enantioselektive Analyse zeigt, dass nach der Röstung von Kakao der Catechingehalt maßgeblich von (-)-Catechin bestimmt wird und nicht von dem ursprünglich in der Biosynthese gebildetem (+)-Enantiomer von Catechin. Die Ergebnisse der enantioselektiven und nicht enantioselektiven Analyse der Monomere zeigen die gleichen Konzentrationsänderungen aufgrund der verschiedenen Temperaturen der Röstungen. Damit können die Veränderungen durch die Epimerisierungsreaktion in den verschiedenen Röstungen, sowohl

über das Verhältnis von Cat zu Epicat als auch von (-)-Cat zu (-)-Epicat dargestellt werden (Abbildung 2.29).

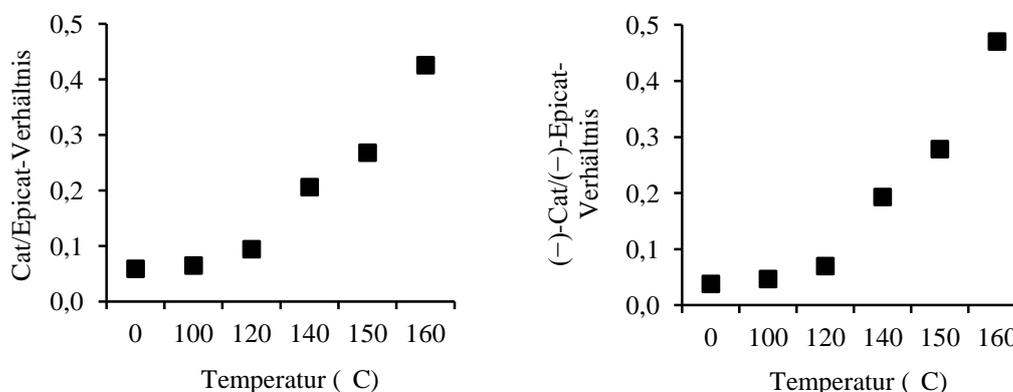


Abbildung 2.29: Konzentrationsverhältnisse von Catechin zu Epicatechin und von (-)-Catechin zu (-)-Epicatechin von ungerösteten und bei verschiedenen Temperaturen gerösteten Kakaobohnen Java1.

2.3.2.2 Epimerisierung von dimeren und trimeren Procyanidinen

Für die Untersuchung von möglichen Epimerisierungsprodukten von oligomeren Procyanidinen wurden die ungerösteten und die jeweils für 30 min bei Temperaturen zwischen 100 und 160 °C gerösteten KB Java1 untersucht. Zusätzlich wurden die ungerösteten und gerösteten KB Java2 und CIV analysiert, um eventuelle Unterschiede zwischen verschiedenen KB festzustellen.

Die Epimerisierung der monomeren Flavanole durch die Röstung von Kakao ist durch Analysen dieser Arbeit und bereits vorhandene Literaturdaten ausreichend belegt (Hurst et al., 2011; Kofink et al., 2007a). Stark und Hofmann (2006) fanden zudem Hinweise, dass auch C-Glykoside der monomeren Flavanole epimerisieren. Sie untersuchten Epicatechin- und Catechin-C-hexoside in alkalisiertem und nicht alkalisiertem Kakaopulver und stellten eine Verschiebung im Profil fest. Die Gehalte der Catechin-C-hexoside stiegen relativ an, während die Gehalte der Epicatechin-C-hexoside mit der Alkalisierung sanken.

Da Procyanidine aus verknüpften Epicatechin- bzw. Catechineinheiten aufgebaut sind, besteht auch in diesen Molekülen theoretisch die Möglichkeit einer Epimerisierung an den Chiralitätszentren. Die Procyanidin Dimere B2 und B5 (bzw. alle Dimere) weisen fünf Chiralitätszentren auf (siehe Abbildung 1.6, S. 11). Davon befinden sich jeweils zwei in den beiden Monomereinheiten an den Positionen C2 und C3 sowie eine weitere an der

Interflavanbindung an Position C4 der oberen Einheit. In der Literatur und in dieser Arbeit konnte die Epimerisierung am Chiralitätszentrum C2 gezeigt werden (Hurst et al., 2011). Der dabei vermutete Mechanismus ist in Kapitel 1.2.1 beschrieben und in Abbildung 1.5 auf S. 10 dargestellt. Umlagerungen an den anderen Chiralitätszentren sind nicht bekannt. Demnach besitzt jedes Dimer zwei mögliche Epimerisierungszentren, woraus jeweils drei Produkte entstehen können. Die Moleküle die dadurch entstehen beinhalten ein oder zwei der atypischen (-)-Cat- bzw. (+)-Epicat-Einheiten (siehe Tabelle 2.21). Da nicht alle Stereozentren gespiegelt sind, handelt es sich dabei um Diastereomere, wodurch zur Analyse keine enantioselektive Trennmethode notwendig ist. Eine Trennung ist somit mit den üblichen C-18 LC-Säulenmaterialien durchführbar, wie auch für die Procyanidin Dimere B1 bis B8 (Santos-Buelga et al., 2003).

Tabelle 2.21: Theoretisch mögliche Epimerisierungsprodukte der Dimere B1, B2 und B5.

proc B1: (-)-Epicat-(4β→8)-(+)-Cat	proc B2: (-)-Epicat-(4β→8)-(-)-Epicat	proc B5: (-)-Epicat-(4β→6)-(-)-Epicat
(-)-Cat-(4 β →8)-(+)-Epicat	(-)-Cat-(4 β →8)-(-)-Cat	(-)-Cat-(4 β →6)-(-)-Cat
(-)-Cat-(4 β →8)-(+)-Cat	(-)-Cat-(4 β →8)-(-)-Epicat	(-)-Cat-(4 β →6)-(-)-Epicat
(-)-Epicat-(4 β →8)-(+)-Epicat	(-)-Epicat-(4 β →8)-(-)-Cat	(-)-Epicat-(4 β →6)-(-)-Cat

Zur Untersuchung von möglichen Epimerisierungsprodukten aus B-Typ Procyanidinen wurde eine UHPLC gekoppelt an ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (TQD-MS) verwendet (siehe Kapitel 4.3.6.4 und Kothe et al., 2013). Die chromatographische Trennung mittels UHPLC führt zu einer verbesserten Trenneffizienz (Ortega et al., 2010). Die Analyse mit Massenspektrometrie ermöglicht hier zudem die Klärung der Identität der untersuchten Substanzen, da entsprechende Referenzverbindungen fehlen. Mit dem TQD-MS ist über die Massenspur der Procyanidine auch die Quantifizierung der relativen Veränderungen zwischen den ungerösteten und gerösteten KB möglich. So können auch geringere Procyanidinkonzentrationen relativ (Vergleich der Peakflächen der Extrakte von ungerösteten zu gerösteten KB) quantifiziert bzw. verglichen werden.

In den Proben wurden Cat, Epicat, die dimeren Procyanidine B1, B2 und B5 sowie zwei Dimere (proc Di1 und proc Di2), deren exakte Strukturen nicht bekannt sind, quantifiziert. Die Quantifizierung erfolgte über die UV-Absorption mit einer externen Kalibrierung bei 280 nm als Epicatechinäquivalente. In Tabelle A 4 (S. 165) sind die mit UHPLC-UV-DAD-TQD-MS quantifizierten Gehalte aufgelistet.

Die Identität der Procyanidin Dimere Di1 und Di2 wurde mittels Produktionenscan geprüft. Die Massenspektren zeigen die typischen Fragmente der Interflavanspaltung (m/z 289), der Retro-Diels-Alder-Reaktion (m/z 425, 407) und der Spaltung des heterozyklischen Rings (m/z

451) für B-Typ Dimere (siehe Kapitel 2.2.1.1, Abschnitt B-Typ Procyanidine). Die Intensitäten in den Fragmentspektren sind eindeutig der Fragmentierung von B-Typ Dimeren zuzuordnen und entsprechen denen von proc B2 und B5 (Abbildung A 10, S. 162).

Quantifizierung der Epimerisierungsreaktion von Procyanidin B-Typ Dimeren über die UV-Absorption

Alle mit UV quantifizierten Substanzen (Epicat, Cat, proc B1, proc B2, proc B5, Di1 und Di2) zeigen stufenweise Konzentrationsänderungen in Abhängigkeit der verwendeten Rösttemperatur. Die bereits im vorangegangenen Kapitel gezeigte und durch enantioselektive Analysen bestätigte Epimerisierungsreaktion der Catechine wird auch durch die UHPLC-UV-DAD Analyse belegt (siehe Konzentrationsänderungen von Epicat und Cat, Abbildung 2.30).

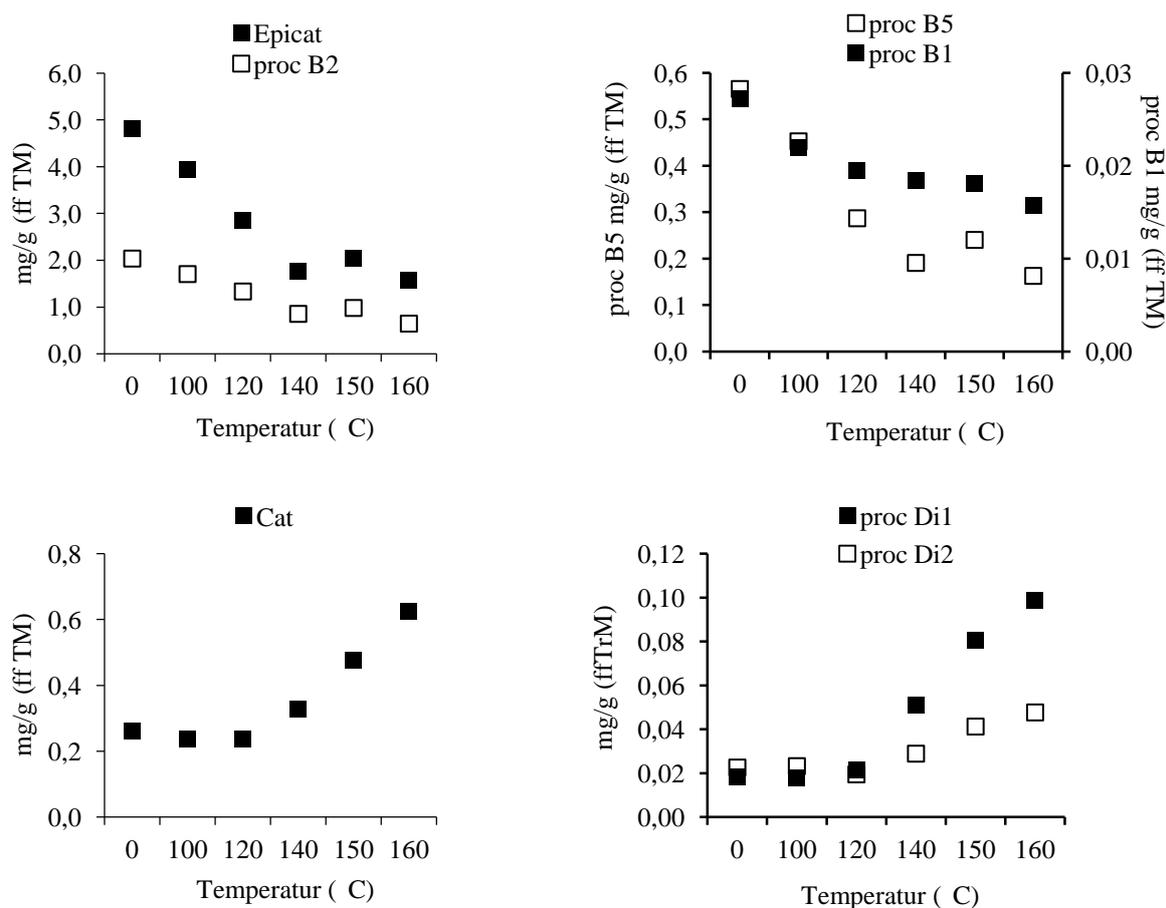


Abbildung 2.30: Konzentrationen von monomeren und dimeren Flavanolen von ungerösteten und bei verschiedenen Temperaturen gerösteten Kakaobohnen Java1.

Die über die UV-Absorption quantifizierten Procyanidin B-Typ Dimere zeigen, analog zu den Monomeren, ebenfalls eine gegensätzliche Entwicklung in Bezug zur Temperatur. Während die Konzentrationen von proc B1, B2 und B5 umso stärker abnehmen, je höher die Rösttemperatur ist, steigen die Gehalte von proc Di1 und Di2. In den ungerösteten KB sind die Gehalte von proc Di1 und Di2 in etwa der selben Größenordnung wie die Gehalte von proc B1. Nach der stärksten Röstung (160 °C/30 min), verglichen mit den ungerösteten KB, sind nur noch 58% des Gehaltes von B1, 32% von B2 und 29% von B5 enthalten. Die Konzentrationen von Di1 und Di2 sind dagegen in der selben Röstung um 541% bzw. 211% angestiegen. Diese Zunahme ist vergleichbar mit der von Catechin (Anstieg um 240%) (Tabelle A 4, S. 165).

Der Produktionenscan identifizierte proc Di1 und Di2 vorläufig als B-Typ Procyanidin Dimere. Genauere Informationen zur exakten Struktur können an dieser Stelle jedoch nicht gegeben werden. Aus den in der pflanzlichen Biosynthese gebildeten Dimeren proc B1, B2 und B5 sind theoretisch neun Epimerisierungsprodukte möglich (Tabelle 2.21, S. 87). Es ist nicht bekannt, welche dieser stereochemischen Konfiguration proc Di1 und Di2 besitzen oder vor der hier vermuteten Epimerisierung besaßen.

Relative Quantifizierung der Epimerisierungsreaktion von dimeren und trimeren B-Typ Procyanidinen über die Massenspuren

Über die UV-Absorption konnten zwei dimere Epimerisierungsprodukte von Procyanidinen quantifiziert werden. Es sind jedoch weitere dimere und auch höher polymerisierte Epimerisierungsprodukte möglich. Anhand der UV-Absorption konnten jedoch keine weiteren Verbindungen detektiert werden, deren Gehalte mit der Röstung zunahmen. Im Chromatogramm befinden sich viele coeluiierende Procyanidine, welche die Quantifizierung von geringer konzentrierten Verbindungen erschweren.

Für Epimerisierungsprodukte mit einem höheren Polymerisationsgrad als zwei Monomereinheiten werden zudem geringere Konzentrationen vermutet. So besitzen z.B. Trimere drei Chiralitätszentren, an denen Epimerisierungen stattfinden können. Diese können zu sieben möglichen Epimerisierungsprodukten aus einem einzigen Molekül führen. Je mehr Epimerisierungsprodukte möglich sind, desto geringer sind vermutlich die zu erwartenden Konzentrationen der einzelnen Produkte.

Zur Klärung, ob weitere Dimere oder auch höher polymerisierte Procyanidine (z.B. Trimere) aus der Epimerisierungsreaktion hervorgehen, wurden die Massenspuren von B-Typ Dimeren und Trimeren vor und nach der Röstung verglichen. Hierfür wurden die ungerösteten und gerösteten (150 °C/30 min) KB von der Elfenbeinküste (CIV) gewählt, da in diesen Proben

das Ausmaß der Epimerisierungsreaktion der Monomere und Dimere am größten war (weitere Ergebnisse zu Unterschieden zwischen den verschiedenen KB folgen in Kapitel 2.3.2.4).

Die relative Quantifizierung der Procyanidine in den KB vor und nach der Röstung erfolgte im SRM-Modus. Dabei wurden die Fragmentübergänge der Interflavanspaltung mit m/z 577→289 für Dimere und m/z 865→577 für Trimere gemessen (Abbildung 2.31). Substanzpeaks von dimeren und trimeren Procyanidinen, die sich überlagerten, wurden nicht in die Auswertung aufgenommen. Bereits die Ionisierung kann in geringem Maße zu Molekülbrüchen führen und so würden z.B. Fragmente aus der Interflavanspaltung von Trimeren fälschlich als Dimere analysiert werden.

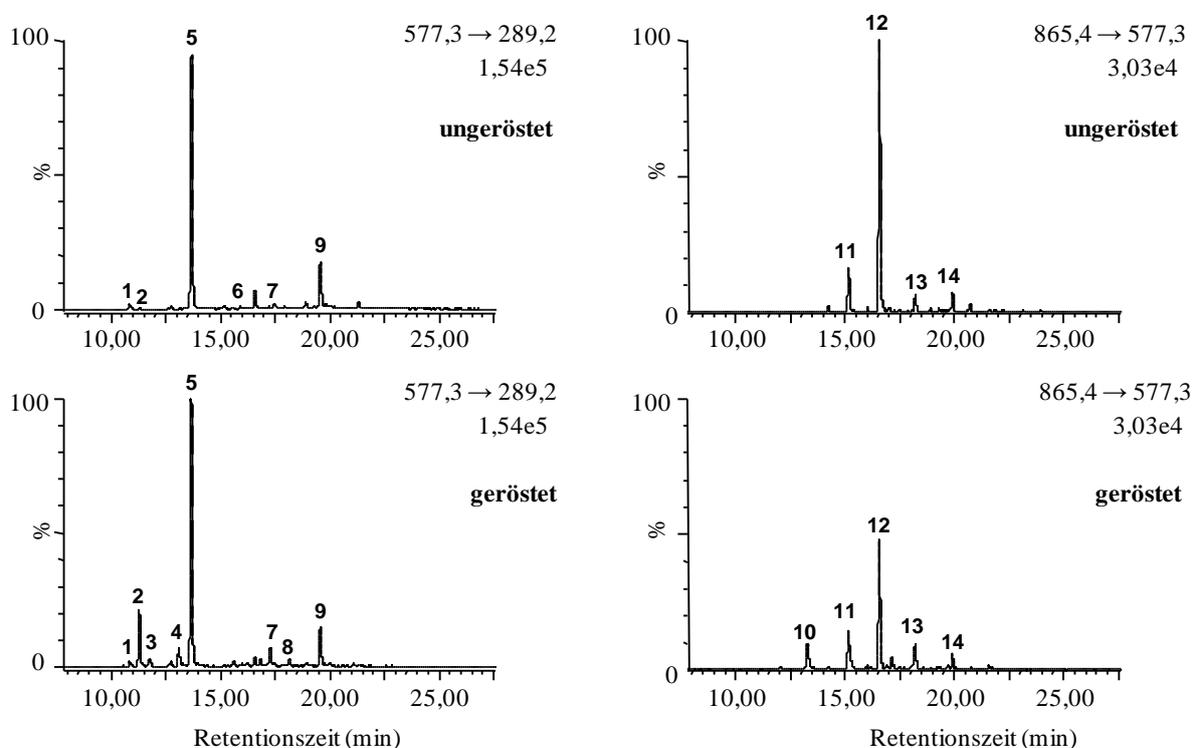


Abbildung 2.31: SRM-Massenspektren (m/z 577→289, m/z 865→577) von ungerösteten und gerösteten KB von der Elfenbeinküste. Peaknummern beziehen sich auf Tabelle 2.22, S. 91.

Insgesamt konnten Veränderungen von neun dimeren und fünf trimeren Procyanidinpeaks ausgewertet werden. Neben den bereits mit UV quantifizierten Dimeren proc Di1 und Di2 (Peak Nr. 2, 7) zeigte Dimer Nr. 4 ebenfalls einen Anstieg der Peakfläche. Zwei weitere Dimere waren erst nach der Röstung zu detektieren (Peak Nr. 3, 8, Tabelle 2.22, S. 91).

Die Massenspektren der Trimere vor und nach der Röstung zeigten ebenfalls sowohl abnehmende als auch zunehmende Peakflächen, allerdings waren die Unterschiede weniger

intensiv. Die Peakflächen von Procyanidin C1 (Peak Nr. 12) und von zwei weiteren Trimeren (Peak Nr. 11, 14) wurden mit der Röstung geringer. Die Peakfläche von einem Trimer nahm fast um das Doppelte zu (Peak Nr. 13). Ein weiteres Trimer war erst nach der Röstung detektierbar (Peak Nr. 10, Tabelle 2.22).

Tabelle 2.22: Peakflächen von dimeren und trimeren Procyanidinen in ungerösteten und gerösteten Kakaobohnen von der Elfenbeinküste.

Nr. ^a	RT (min)	Substanz	ungeröstet Peakfläche MW ± SD ^b	geröstet (150 °C/30 min) Peakfläche MW ± SD ^b	Veränderung in % ^c
Procyanidin B-Typ Dimere					
1	10,84	proc B1	265 ± 6	315 ± 23	119
2	11,28	proc Di1	50 ± 9	2536 ± 489	5122
3	11,75	B-Typ Dimer	n.d.	434 ± 120	
4	13,09	B-Typ Dimer	38 ± 8	845 ± 136	2224
5	13,67	proc B2	14847 ± 748	15531 ± 628	105
6	15,89	B-Typ Dimer	162 ± 10	257 ± 49	159
7	17,25	proc Di2	112 ± 1	821 ± 103	736
8	17,98	B-Typ Dimer	n.d.	328 ± 100	
9	19,59	proc B5	2733 ± 188	2180 ± 12	80
Procyanidin B-Typ Trimere					
10	13,27	B-Typ Trimer	n.d.	230 ± 39	
11	15,19	B-Typ Trimer	494 ± 1	469 ± 19	95
12	16,52	proc C1	3110 ± 119	1526 ± 108	50
13	18,20	B-Typ Trimer	199 ± 28	341 ± 35	191
14	19,92	B-Typ Trimer	256 ± 33	151 ± 6	65

^a Die Nr. beziehen sich auf Abbildung 2.31, S. 90. ^b Peakflächenmittelwerte der MS-Analyse der im SRM-Modus aufgenommenen Massenspuren von m/z 577→289 und m/z 865→577. ^c Die prozentualen Veränderungen ergeben sich aus dem Vergleich der Peakflächen der gerösteten KB zu den ungerösteten KB.

2.3.2.3 Röstungen verschiedener Temperatur-Zeit-Kombinationen

Die verschiedenen Temperaturen, der jeweils 30 minütigen Röstungen, haben einen entscheidenden Einfluss auf die quantitative und qualitative Zusammensetzung der Flavanole (Abbildung 2.32, S. 92). Bis zu einer Temperatur von 140 °C nehmen die hier quantifizierten Flavanole kontinuierlich ab. Bei starken Röstungen (140-160 °C) stellt sich ein gleich bleibender Restgehalt der Flavanole ein. In Kapitel 2.3.2.1 konnte bereits die Verschiebung im Polymerisationsprofil aufgezeigt werden. Die konstant bleibenden Flavanolgehalte der Röstungen bei Temperaturen ab 140 °C bis 160 °C sind dabei vermutlich auf die Deoligomerisierung von Procyanidinen zurückzuführen.

Ergebnisse und Diskussion

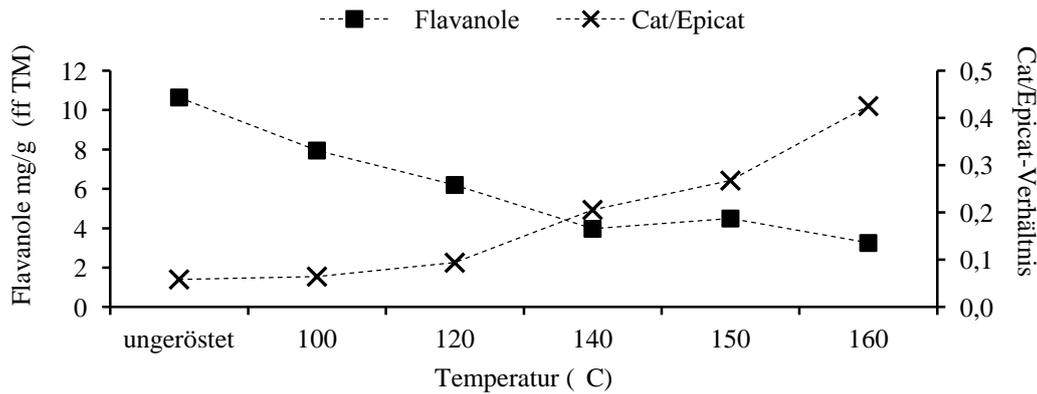


Abbildung 2.32: Flavanolkonzentrationen und Cat/Epicat-Verhältnisse (Sekundärachse) von ungerösteten und bei verschiedenen Temperaturen gerösteten Kakaobohnen Java1.

Bei höheren Temperaturen (ab 140 °C) verändern sich die Flavanole hauptsächlich in ihrem Monomerenverhältnis (siehe Cat/Epicat-Verhältnis in Abbildung 2.32). Damit ist festzustellen, dass die Flavanolverluste und die Epimerisierungen bei den verschiedenen Röstungen nicht gleichermaßen ablaufen. Eine Beschleunigung der Epimerisierungsreaktion der Catechine bei höheren Temperaturen ist sehr wahrscheinlich. Zudem kann auch ein Zusammenhang zwischen der Deoligomerisierung und dem starken Anstieg im Monomerenverhältnis vermutet werden. Die Untersuchung möglicher Epimerisierungsprodukte von Procyanidinen konnte auch Procyanidin Dimere und Trimere detektieren, deren Gehalte mit der Röstung zunahm. Demnach erfolgt die Epimerisierungsreaktion möglicherweise auch in den Chiralitätszentren von allen Procyanidinen. Durch die Deoligomerisierung werden vermutlich sowohl Monomere mit der stereochemischen Konfiguration der ursprünglich in Kakao enthaltenen Catechine freigesetzt, als auch solche, in denen bereits Epimerisierungen stattgefunden haben.

Die Unterschiede im Ausmaß der Flavanolverluste und der Epimerisierung konnten auch für Röstungen bei anderen Temperatur-Zeit-Kombinationen festgestellt werden. Abbildung 2.33 (S. 93) stellt die Flavanolgehalte und das Verhältnis von Cat zu Epicat in den ungerösteten KB und von zwei verschiedenen Röstproben dar. Diese beiden Röstungen führten bei unterschiedlichen Temperatur-Zeit-Kombinationen zu etwa den gleichen Flavanolverlusten, jedoch unterschieden sie sich im Ausmaß der Epimerisierungsreaktion. Nach den Ergebnissen dieser beiden Röstungen ist die Epimerisierung möglicherweise durch die Wahl der Temperatur-Zeit-Kombination zu beeinflussen. Eine Verlängerung der Röstzeit führt bei Herabsetzen der Rösttemperatur zu einem geringeren Ausmaß der Epimerisierung.

Ergebnisse und Diskussion

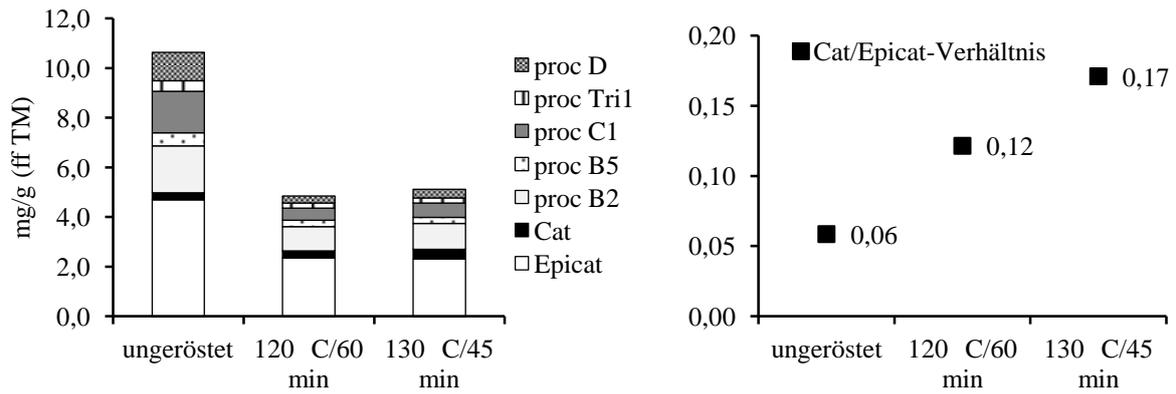


Abbildung 2.33: Flavanolkonzentrationen und Cat/Epicat-Verhältnisse von ungerösteten und bei verschiedenen Temperatur-Zeit-Kombinationen gerösteten KB Java1.

Die KB Java1 wurden insgesamt bei zwölf verschiedenen Temperatur-Zeit-Kombinationen geröstet (Tabelle A 1, S. 154). Abbildung 2.34 stellt graphisch den Zusammenhang zwischen den Flavanolgehalten und der Epimerisierungsreaktion (Cat/Epicat-Verhältnis) von allen Röstungen der KB Java1 dar.

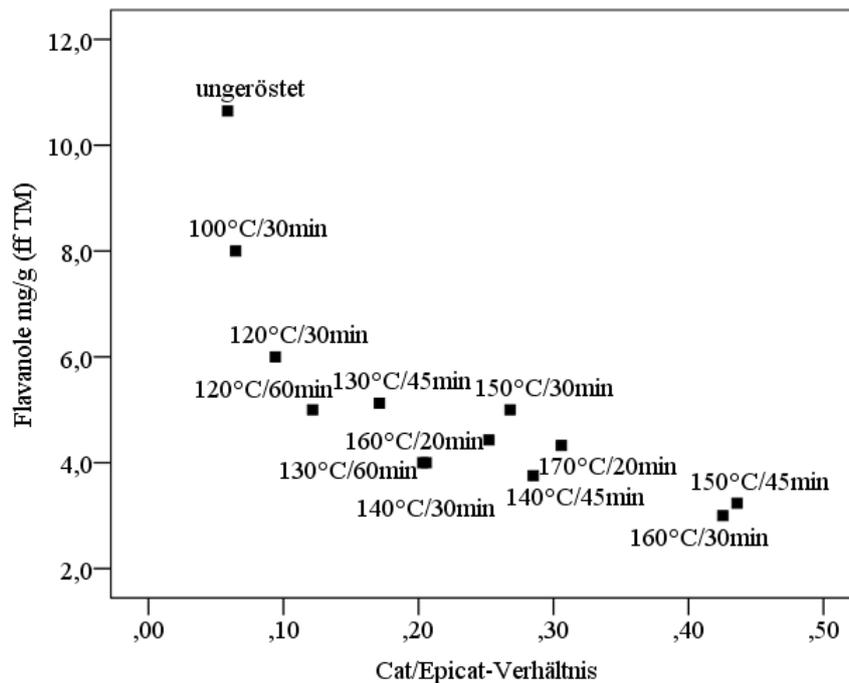


Abbildung 2.34: Zusammenhang der Flavanolkonzentrationen und des Cat/Epicat-Verhältnisses von ungerösteten und bei verschiedenen Temperaturen gerösteten Kakaobohnen Java1.

Die Veränderungen durch die Röstung werden sowohl von der Temperatur als auch von der Zeit der Röstung beeinflusst. Daher ist es kaum möglich, eine Temperatur anzugeben, bei der das Flavanolprofil möglichst unverändert bleibt. Jedoch ist zu erkennen, dass bei niedrigeren Temperaturen (bis etwa 120 °C) die Epimerisierung weniger ausgeprägt ist, trotz langer Röstzeiten von z.B. einer Stunde (z.B. 120 °C/60 min). Höhere Temperaturen führen nicht unbedingt zu größeren Verlusten (vgl. Abbildung 2.34, S. 93), jedoch steigt das Ausmaß der Epimerisierung.

2.3.2.4 Röstungen verschiedener Kakaobohnenchargen

Drei verschiedene Chargen KB (Java1, Java2 und CIV) wurden unter den gleichen Bedingungen bei 150 °C für 30 min geröstet. Dadurch sollte zum einen untersucht werden, ob die bereits festgestellten Veränderungen (Stabilitätsunterschiede, Substanzprofile, Deoligomerisierung und Epimerisierung) generell für die Röstung von Kakao gelten. Zudem sollten mögliche Unterschiede zwischen verschiedenen Kakaobohnen untersucht werden.

Die Substanzprofile der NPA und Q-glyk der drei verschiedenen Kakaobohnen bleiben in der relativen Zusammensetzung weitgehend konstant. Die Flavanole verändern sich im Polymerisationsgrad zugunsten von geringer polymerisierten Flavanolen (Abbildung A 11, S. 163). Damit entsprechen diese Daten denen aus Kapitel 2.3.2.1 und zeigen, dass diese Veränderungen bei allen drei untersuchten Kakaobohnenchargen festgestellt werden konnten.

Die Konzentrationsänderung durch die Röstung fiel zwischen den KB sehr unterschiedlich aus. Während die beiden Kakaobohnenchargen aus Java in etwa die gleichen Gehaltsverluste aufzeigten, waren die Verluste in allen drei Substanzklassen für die KB von der Elfenbeinküste geringer (Tabelle 2.23, S. 95). Die Unterschiede in den Verlusten der NPA- und Q-glyk-Konzentrationen zwischen den KB waren dabei nicht so groß wie die der Flavanole. In den CIV-KB waren nach der Röstung noch 93% der NPA und 90% der Q-glyk vorhanden. Für die KB aus Java lagen die Verluste in diesen beiden Substanzklassen bei ungefähr 20%. Bei den Flavanolen waren in den KB Java1 und Java2 nach der Röstung weniger als 50% der Ausgangskonzentration enthalten. In den CIV-KB dagegen konnten keine Verluste im Gehalt der hier quantifizierten Flavanole festgestellt werden.

Auch die Epimerisierung der Monomere unterschied sich zwischen den KB. Das Cat/Epicat-Verhältnis stieg in den KB aus Java etwa in der gleichen Größenordnung an. In den CIV-KB war das Ausmaß der Epimerisierung größer (Tabelle 2.23). Die Verluste von Epicat durch die Röstung lagen in den KB aus Java um 50%. Bei den CIV-KB waren die Verluste gering, nach der Röstung waren noch 92% der Ausgangskonzentration von Epicat vorhanden. Cat stieg in

den KB Java1 auf 205% und in den KB Java2 auf 176%. Mit den gleichen Röstbedingungen war für die CIV-KB dagegen eine enorme Zunahme auf 815% der Ausgangskonzentration zu verzeichnen (Tabelle A 3, S. 164).

Tabelle 2.23: Konzentrationen von Flavanolen, *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetinglykosiden sowie das Cat/Epicat-Verhältnis von drei ungerösteten und den jeweils gerösteten Kakaobohnen. Prozentuale Anteile (bezogen auf die ungerösteten KB).

	Java1 (mg/g ff TM)		Java2 (mg/g ff TM)		CIV (mg/g ff TM)	
	ungeröstet	150 °C/30 min	ungeröstet	150 °C/30 min	ungeröstet	150 °C/30 min
Flavanole	10,6	4,5 (42%)	5,5	2,6 (48%)	2,3	2,3 (100%)
NPA	6,9	5,3 (76%)	5,4	4,3 (79%)	2,1	1,97 (93%)
Q-glyk	0,047	0,035 (76%)	0,085	0,070 (83%)	0,060	0,054 (90%)
Cat/Epicat- Verhältnis	0,06	0,27	0,10	0,34	0,07	0,63

Payne et al. (2010) rösteten KB von der Elfenbeinküste und aus Papua Neu Guinea und stellten darin ebenfalls eine enorme Erhöhung der Cat-Konzentrationen durch die Röstung auf 650% und 640% fest. In der gleichen Studie sanken allerdings die Konzentrationen von Epicat auf 30% (Elfenbeinküste) bzw. 59% (Papua Neu Guinea). In den hier untersuchten CIV-KB blieben die Epicat-Konzentrationen dagegen relativ konstant. In einer weiteren Studie wurden die Epicat- und Cat-Gehalte von jeweils ungeröstet und gerösteten KB aus Ecuador, Ghana und Trinidad verglichen (Caligiani et al., 2007). Die Epicat-Verluste reichten von 56 bis 79%, während der Cat-Gehalt auf 273 bis 565% anstieg.

Diese Unterschiede in den Änderungen der Flavanolkonzentrationen bzw. Zunahmen durch die Epimerisierung waren auch bei der Untersuchung von Epimerisierungen der Procyanidine festzustellen (Abbildung 2.35, S. 96). Die Summe der in der in den CIV-KB quantifizierten Flavanole (Epicat, Cat, proc B1, B2, B5, Di1 und Di2) stieg durch die Röstung auf 131% an. Dieser Anstieg resultierte dabei aus der Zunahme der Epimerisierungsprodukte, während die Gehalte von Epicatechin und den Procyanidinen B1, B2 und B5 nahezu konstant blieben (Tabelle A 4, S. 165). Auch die Konzentrationen von proc Di1 (670%) und Di2 (271%) stiegen verglichen mit denen der Java KB (Java1: proc Di1 441% und proc Di2 183%, Java2: proc Di1 274% und proc Di2 128%) stärker an (Abbildung 2.35, S. 96).

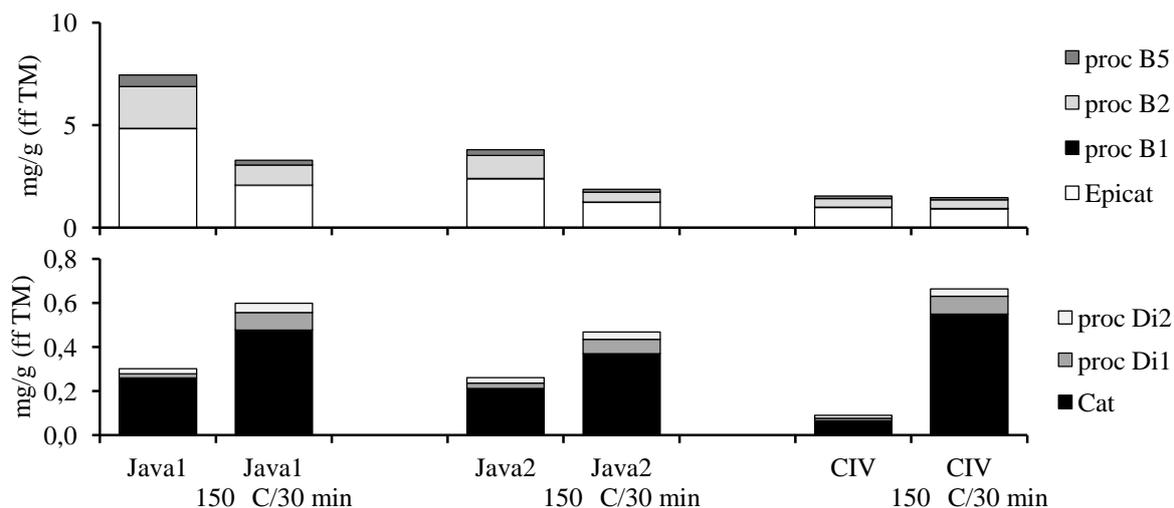


Abbildung 2.35: Konzentrationen von monomeren und dimeren Flavanolen von drei ungerösteten und den jeweils gerösteten Kakaobohnen (Ergebnisse der Analyse mit UHPLC-UV-DAD-TQD-MS, Kapitel 2.3.2.2).

2.3.2.5 Fazit der Kakaoröstung

Flavanole sind in allen Temperaturbereichen instabiler als *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetinglykoside. Zwar sinken die Konzentrationen der *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und der Quercetinglykoside ebenfalls stetig mit steigenden Temperaturen, doch die Flavanole zeigen eine steilere Verlustkurve, die sich dann bei höheren Temperaturen auf ein relativ gleichbleibendes Niveau einstellt.

Bei den *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und den Quercetinglykosiden werden die Konzentrationsverhältnisse der einzelnen Substanzen zueinander (Substanzprofile) durch die Röstung nicht beeinflusst. Die Substanzprofile bleiben bei den verschiedenen Rösttemperaturen bestehen. Bei den Flavanolen wird dagegen mit der Röstung der Polymerisationsgrad verändert. Je höher die Rösttemperatur ist, desto geringer ist der durchschnittliche Polymerisationsgrad der Flavanole. Eine Begründung dafür könnten Interflavanbindungsbrüche in den Procyanidinmolekülen sein, die zu geringer polymerisierten und monomeren Bruchstücken führen. Ab einer Temperatur von 140 °C stellen sich die Flavanolgehalte auf ein gleichbleibendes Niveau ein, damit ist davon auszugehen, dass das Ausmaß der Interflavanbindungsbrüche die generellen Verluste durch den Temperatureinfluss ausgleicht.

Die Ergebnisse der enantioselektiven und nicht enantioselektiven Analyse der Monomere zeigen die gleichen Konzentrationsänderungen aufgrund der verschiedenen Temperaturen der Röstungen. Als Marker der Epimerisierung können sowohl die Ergebnisse von nicht

enantioselektiven als auch von enantioselektiven Analysen genutzt werden, da die Gehalte der Flavanolmonomere von den Enantiomeren (–)-Epicatechin und (–)-Catechin bestimmt sind. Die Darstellung der Epimerisierung als Verhältniswert ermöglicht gegebenenfalls das Abschätzen des Verarbeitungsgrades von verschiedenen Kakaoproben. Da die absoluten Gehalte stark schwanken, wie bereits für nicht fermentierte und fermentierte KB gezeigt wurde, können absolute Konzentrationen allein nur bedingt eine Aussage über den Grad der Verarbeitung eines Kakaoproduktes ermöglichen.

Mit UHPLC-UV-DAD-Triple-Quadrupol-MS konnte auch für dimere und trimere B-Typ Procyanidine die gegensätzliche Entwicklung, analog zur Epimerisierung der Catechine, in Abhängigkeit der Temperatur analysiert werden. Für zwei dimere B-Typ Procyanidine wurde eine Konzentrationszunahme durch die Röstung über die UV-Absorption quantifiziert. Die Epimerisierung von weiteren Dimeren und von Trimeren war zudem über den Vergleich der Massenspuren der Kakaobohnen (von der Elfenbeinküste) vor und nach der Röstung möglich. Für den eindeutigen Beweis einer Epimerisierungsreaktion von Procyanidinen fehlen an dieser Stelle die Daten von Strukturaufklärungen. Jedoch kann aufgrund dieser Ergebnisse vermutet werden, dass eine Epimerisierung generell an den entsprechenden Chiralitätszentren von Flavanolen stattfindet und nicht nur auf die bereits bekannte Epimerisierung der Monomere beschränkt ist.

Durch die Wahl der Temperatur-Zeit-Kombination bei der Kakaoröstung kann möglicherweise die Epimerisierungsreaktion beeinflusst werden. Eine Verlängerung der Röstzeit führt bei Herabsetzen der Rösttemperatur zu einem geringeren Ausmaß der Epimerisierung. Eine Beeinflussung der Flavanolgehalte mit der Wahl der Temperatur-Zeit-Kombination der Röstung ist weniger möglich, da bereits bei Rösttemperaturen bis 120 °C die Verluste erheblich sind.

Auch bei gleichen Röstbedingungen kann das Ausmaß der Flavanolverluste und der Epimerisierungsreaktion sehr unterschiedlich ausfallen. So ist durch die Röstung je nach KB auch eine Zunahme von monomeren und dimeren Flavanolen möglich. Die Konzentrationszunahmen resultieren dabei aus den Epimerisierungsprodukten. Dies wiederum kann das Flavanolprofil nach der Röstung beeinflussen und damit das Profil im Endprodukt. Gründe für diese Unterschiede sind noch unklar, aber die Auswahl des Kakaos vor der Röstung hat einen großen Einfluss. Um mögliche Ursachen für diese Unterschiede zwischen verschiedenen KB zu identifizieren, sind weitere Untersuchungen mit einer größeren Anzahl an vollständig charakterisierten Proben (z.B. Herkunft, Sorte, Fermentationsgrad, chemische Zusammensetzung, pH-Wert, Feuchtegehalt) notwendig.

2.3.3 Schokoladenherstellung

Mit Kakaobohnen aus Ghana wurde im Technikumsmaßstab eine Schokolade produziert und nach jedem Verarbeitungsschritt eine Probe gezogen. Die einzelnen Verarbeitungsschritte der Schokoladenherstellung sind in Tabelle A 1 (S. 154) aufgelistet und die quantifizierten Substanzgehalte sind in Tabelle A 8 bis Tabelle A 11 (S. 169-170) aufgeführt.

Bei der Schokoladenherstellung wurden teilweise Konzentrationszunahmen der Flavanole, NPA und Q-glyk festgestellt (Abbildung A 12, S. 168). Diese sind vermutlich auf folgende Ursachen zurückzuführen: Die Gehalte wurden jeweils auf die fettfreie Trockenmasse bezogen und bei den Röstungen (Infrarotröstung und die eigentliche Röstung) wird der Wassergehalt herabgesetzt. Durch die Röstungen werden die Zellwände der KB aufgebrochen, wodurch die Extraktion der phenolischen Verbindungen verbessert werden kann. Nach der Herstellung von Nibs sind die Kakaoschalen entfernt. Die phenolischen Verbindungen befinden sich hauptsächlich in den Kotyledonen. Die Zerkleinerungsvorgänge während der Schokoladenherstellung (Zerreißung der Nibs) führen zu einer Verringerung der Korngröße, welche wiederum die Extraktion der phenolischen Verbindungen verbessert.

Die unterschiedlichen Stabilitäten bei den drei Substanzklassen, die bereits bei der Röstung von Kakao festgestellt wurden, gelten für die gesamte Schokoladenherstellung. Die Profile der NPA und Q-glyk bleiben konstant. Für Flavanole sind Veränderungen im Polymerisationsgrad zu erkennen. Neben der Röstung führen auch die weiteren Schritte der Schokoladenherstellung, mit Temperaturen ab 60 °C (Zermahlung der Nibs und Conchieren), zu einer Verschiebung des Polymerisationsgrad, zugunsten geringer polymerisierter Flavanole (Abbildung A 13, S. 168).

In Abbildung 2.36 (S. 99) sind die Gehalte der Flavanole und das Cat/Epicat-Verhältnis in verschiedenen Proben der Schokoladenherstellung dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass nicht nur die Kakaoröstung für die Veränderungen verantwortlich ist. Während die Flavanolgehalte durch die Zerreißung der Nibs und durch das Conchieren nur leicht sinken, steigt das Verhältnis von Cat zu Epicat kontinuierlich an.

In verschiedenen Kakao-Verarbeitungsproben (KB, geröstete KB, Kakaomasse, Schokolade) einer anderen Studie, bei denen nicht eindeutig definiert war, ob es sich dabei um voneinander abhängige Proben handelte, wurden Epicat, Cat und proc B2 quantifiziert (Mazor Jolić et al., 2011). Die Gehalte von Epicat und proc B2 waren mit zunehmendem Verarbeitungsgrad niedriger und das Cat/Epicat-Verhältnis veränderte sich zugunsten von Cat. Die Zermahlung der Nibs und das Conchieren (keine Angaben zu Temperatur und Zeit) zeigten vergleichbare Veränderungen, wie sie auch in der dieser Arbeit festgestellt wurden.

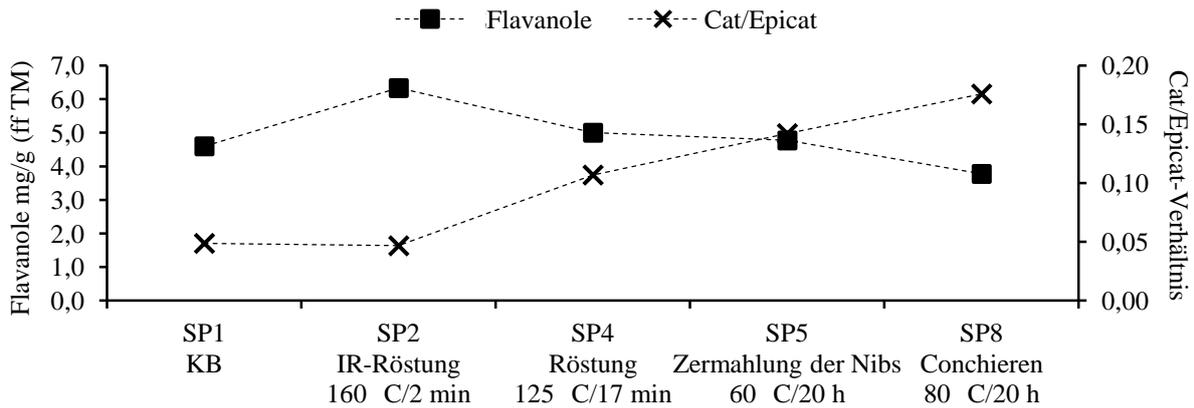


Abbildung 2.36: Flavanolkonzentrationen und Cat/Epicat-Verhältnisse (Sekundärachse) in verschiedenen Proben einer Schokoladenherstellung.

2.3.3.1 Fazit der Schokoladenherstellung

Über den gesamten Prozess der Schokoladenherstellung bleiben die Konzentrationsverhältnisse der Substanzen zueinander in den Verbindungsklassen *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetinglykoside unverändert. Flavanole deoligomerisieren jedoch nicht nur bei der Röstung, sondern auch bei der Zermahlung der Nibs und dem Conchieren. Demnach führen auch relativ niedrige Temperaturen von 60 und 80 °C zu Verlusten und Epimerisierungen, wenn das Kakaogut diesen über einen längeren Zeitraum, z.B. von 20 Stunden, ausgesetzt ist.

2.3.4 Alkalisierung von Kakao

Zur Untersuchung der Veränderungen von phenolischen Verbindungen durch die Alkalisierung von Kakao standen folgende Proben zur Verfügung: Ein nicht alkalisiertes und das korrespondierende alkalisierte Kakaopulver sowie vier Kakaopulver, für die vom Hersteller unterschiedliche Alkalisierungsgrade bzw. pH-Werte angegeben wurden (Proben S7, S75, SR7, S8) (siehe Tabelle A 1, S. 154 für genauere Angaben).

Der Vergleich der Flavanol-, NPA- und Q-glyk-Gehalte des nicht alkalisierten und daraus hergestellten alkalisierten Kakaopulvers zeigt, dass die Alkalisierung zu großen Verlusten in allen drei untersuchten Substanzgruppen führt. Nach der Alkalisierung sind noch 24% der Flavanole, 27% der NPA und 38% der Q-glyk vorhanden (Tabelle 2.24, S. 100).

Tabelle 2.24: Konzentrationen von Flavanolen, *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetinglykosiden sowie Cat/Epicat-Verhältnisse eines nicht alkalisierten Kakaopulvers und von unterschiedlich stark alkalisierten Kakaopulvern.

Proben (pH-Wert)	nicht alkalisiertes KP (5,8)	alkalisiertes KP (7,2)	S7 (6,9)	S75 (7,3)	SR7 (7,5)	S8 (7,6)
Flavanole (mg/g ff TM)	4,71	1,13 (24%)	1,73	1,51 (87%)	0,85 (49%)	1,81 (105%)
NPA (mg/g ff TM)	1,87	0,5 (27%)	1,27	0,97 (76%)	0,87 (68%)	1,19 (93%)
Q-glyk (mg/g ff TM)	0,14	0,053 (38%)	0,062	0,055 (89%)	0,040 (65%)	0,066 (106%)
Cat/Epicat- Verhältnis	0,3	1,1	0,9	1,2	1,7	0,9

Bei den vier Kakaopulvern mit unterschiedlichen Alkalisierungsgraden sind die Verluste bzw. Unterschiede zwischen den Proben nicht so groß, da hier nicht die Proben vor und nach der Alkalisierung verglichen wurden. Zudem ist zu erkennen, dass die Probe S8, trotz eines höheren pH-Wertes, in der Gruppe der Flavanole und Q-glyk höhere Konzentrationen aufweist als die Proben S7, S75 und SR7. Das Cat/Epicat-Verhältnis ist geringer als das der Proben S75 und SR7. Hier ist zu vermuten, dass die Probe S8 nicht aus der gleichen Charge stammt, mit einer anderen Charge vermischt wurde oder andere Alkalisierungsparameter verwendet wurden. Zur weiteren Interpretation der Ergebnisse, in Hinblick auf eine Veränderung durch den Alkalisierungsprozess, ist die Probe S8 daher nicht geeignet.

Flavanole

Nach der Alkalisierung sind nur noch 24% des Flavanolgehaltes zu quantifizieren, verglichen mit den Flavanolgehalten des nicht alkalisierten Kakaopulvers. Auch der Alkalisierungsgrad beeinflusst den Flavanolgehalt. Mit steigender Alkalikonzentration bzw. mit steigendem pH-Wert sinken die Flavanolkonzentrationen (Proben S7, S75 und SR7 in Tabelle 2.24), wie auch von Payne et al. (2010) bereits für Epicat beschrieben. In den alkalisierten Kakaopulvern waren nur Cat, Epicat und proc B2 quantifizierbar (Abbildung 2.37, S. 101). In dem nicht alkalisierten Kakaopulver war zusätzlich noch proc C1 zu quantifizieren.

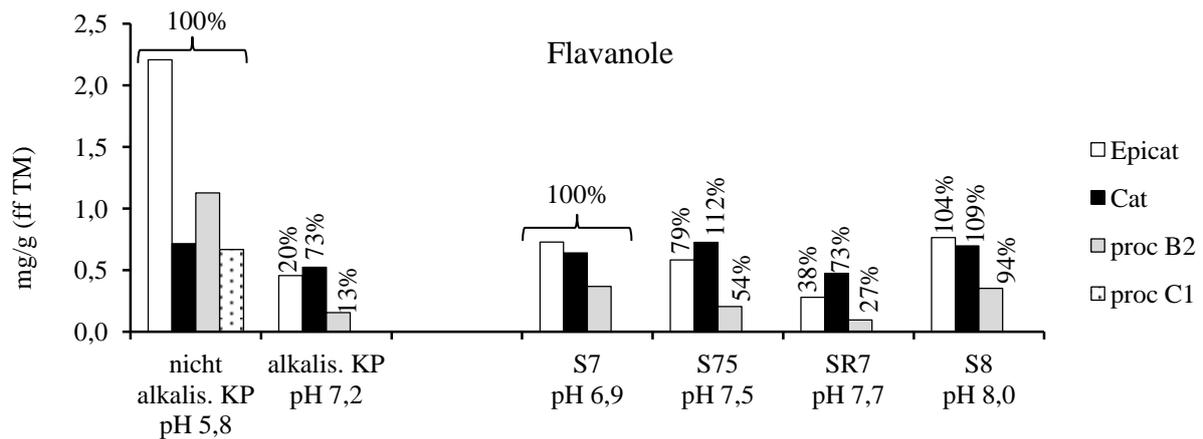


Abbildung 2.37: Flavanolkonzentrationen und prozentuale Veränderungen eines nicht alkalisierten Kakaopulvers und von unterschiedlich stark alkalisierten Kakaopulvern.

Die Alkalisierungsproben zeigen unterschiedliche Stabilitäten in Abhängigkeit des Polymerisationsgrades. Nach der Alkalisierung sind noch 20% des Gehaltes von Epicat und 13% des Gehaltes von proc B2 enthalten (vgl. nicht alkalisiertes und alkalisiertes KP). In den Proben S75 und SR7 sind die Verluste für proc B2 ebenfalls größer als die von Epicat. Jedoch spiegeln vergleichende Literaturdaten diese Annahme nicht unbedingt wider. In einer Alkalisierungsstudie wurden für Epicat und proc B1 Verluste um 64% bzw. 60% und für proc B2 Verluste um 80% quantifiziert (Mazor Jolić et al., 2011). Andrés-Lacueva et al. (2008) quantifizierten für Epicat, proc B2 und C1 vergleichbare Verluste mit 67-69% und für das Tetramer proc D nur einen Verlust von 38%.

Epimerisierung

Die Alkalisierung von Kakao führt in den untersuchten Proben zu den höchsten Werten des Cat/Epicat-Verhältnisses. In einigen der alkalisierten Kakaopulvern (alkalisiertes KP, S7 und S75) übersteigt der Cat-Gehalt jeweils den von Epicat (Abbildung 2.37). Der maßgebliche Einfluss einer Alkalisierung auf das Monomerenverhältnis ist bereits in früheren Forschungsarbeiten festgestellt worden (Hurst et al., 2011; Kofink et al., 2007a; Miller et al., 2008).

Die hier durchgeführten Analysen zeigen, dass die Röstung auch zu einer Epimerisierung führt, jedoch nicht im gleichen Maße wie die Alkalisierung. Die Erhöhung des pH-Wertes bei der Alkalisierung beschleunigt die Reaktion, sodass in den alkalisierten Kakaopulvern für das Cat/Epicat-Verhältnis Werte von >1 (der Cat-Gehalt übersteigt den von Epicat) analysiert wurden (Tabelle 2.24, S. 100). Die stärkste Röstung (150 °C/45 min) der Java1 KB führte zu einem Cat/Epicat-Verhältnis von 0,44 (vgl. Abbildung 2.34, S. 93). Auch das Cat/Epicat-

Verhältnis der KB von der Elfenbeinküste, die das größte Ausmaß der Epimerisierungsreaktion aufzeigten, stieg durch die Röstung (150 °C/30 min) nur auf einen Wert von 0,6.

Nachfolgend sind die Cat/Epicat-Verhältnisse der hier untersuchten Kakao-Verarbeitungsproben zusammengefasst (Tabelle 2.25). Neben den bereits beschriebenen Kakao-Verarbeitungsproben wurden zudem noch Schokoladen und Kakaopulver aus dem Handel auf das Cat/Epicat-Verhältnis analysiert.

Tabelle 2.25: Cat/Epicat-Verhältnisse verschiedener Verarbeitungsgrade.

Verarbeitungsgrad	KB nicht fermentiert	KB fermentiert	Röstproben	nicht alkalisiertes Kakaopulver	alkalisierte Kakaopulver	Schokoladen
Cat/Epicat MW	0,05	0,07	0,24	0,32	1,1	0,24
Cat/Epicat Min-Max	0,02 - 0,16	0,05 - 0,1	0,06 - 0,63		0,6 - 1,8	0,17 - 0,36

Nach diesen Ergebnissen wäre das Cat/Epicat-Verhältnis möglicherweise ein Marker für eine Alkalisierung, da nur die alkalisierten Kakaopulver Cat/Epicat-Verhältniswerte von >1 aufweisen.

Jedoch sind in der Literatur auch Röstungen beschrieben, in denen die Cat-Gehalte die von Epicat überstiegen (Payne et al., 2010). In einer Studie, in denen KB von der Elfenbeinküste geröstet wurden, sind Cat-Gehalte von 0,52 mg/g und Epicat-Gehalte von 0,50 mg/g quantifiziert worden. Somit führte diese Röstung zu einem Cat/Epicat-Verhältnis von 1,04. Zur durchgeführten Röstung wurde allerdings keine Zeit angegeben. Die KB wurden dem Kaffeeröster entnommen, nachdem sie eine Temperatur von 120 °C erreicht hatten (Payne et al., 2010). Danach wäre das Cat/Epicat-Verhältnis kein eindeutiger Parameter zur Feststellung einer Alkalisierung.

N-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren

Die Konzentrationen der N-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren sind durch die Alkalisierung um 73% gesunken (nicht alkalisiertes und alkalisiertes KP in Tabelle 2.24, S. 100). Die unterschiedlich alkalisierten Kakaopulver (S7, S75 und SR7) zeigen zudem sinkende NPA-Konzentrationen mit steigendem Alkalisierungsgrad bzw. höherem pH-Wert. Diese Daten widersprechen denen aus einer anderen Studie, in der NPA in Kakaopulvern vor und nach einer Alkalisierung untersucht wurden. In dieser Studie wurden keine Verluste festgestellt. Die Analyse erfolgte jedoch anhand einer Geschmacksverdünnungsanalyse von NPA enthaltenden

Fraktionen (Stark und Hofmann, 2006). Hier könnten vergleichende Analysen über die UV-Absorption und mit Geschmacksverdünnungsanalyse klären, ob sich beide Methoden gleichermaßen zur Quantifizierung der Substanzen eignen.

Abbildung 2.38 stellt die NPA-Profile der Kakaopulver dar. Durch die Alkalisierung wird das NPA-Profil nicht wesentlich verändert. Alle untersuchten Kakao-Verarbeitungsproben, die direkt voneinander abhängig waren (Röstproben verschiedener KB, Schokoladenherstellung, Alkalisierungsproben), zeigen demnach, dass das bestehende NPA-Profil während der Verarbeitung erhalten bleibt. Mit dieser Verbindungsklasse ist möglicherweise eine Prüfung auf Authentizität von Kakaoprodukten möglich, z.B. in Hinblick auf die Auslobung von bestimmten Plantagenschokoladen. Die Analyse der unfermentierten und fermentierten KB zeigte zwar ein relativ einheitliches Profil (K-asp > pC-asp > K-OHtyr, vergleiche Kapitel 2.3.2.1, Abschnitt Substanzprofile), dennoch sind in dieser Substanzgruppe insbesondere bei den NPA, die geringere Konzentrationen aufweisen, auch erkennbare Unterschiede in den Verhältnissen festzustellen (Abbildung A 7, S. 158 und Abbildung A 8, S. 160).

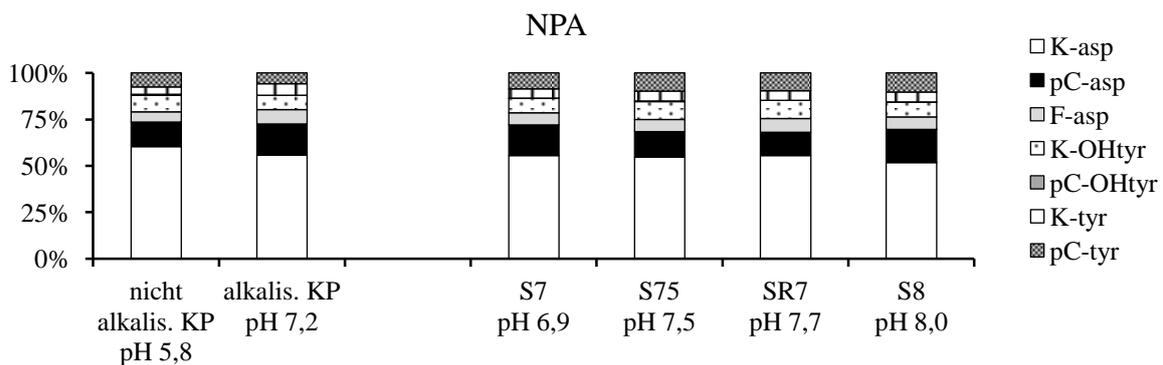


Abbildung 2.38: Substanzgruppen-Profil von *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren eines nicht alkalisierten Kakaopulvers und von unterschiedlich stark alkalisierten Kakaopulvern.

Quercetinglykoside

In den verschiedenen Kakaopulvern variieren die Quercetinglykosid-Gehalte von 0,4 bis 0,14 mg/g ff TM (Tabelle 2.24, S. 100). Andrés-Lacueva, et al. (2008) quantifizierten in verschiedenen nicht alkalisierten und alkalisierten Kakaopulvern Q-arab-Gehalte von 0,002-0,040 mg/g und Q-glc-Gehalte von 0,004-0,043 mg/g, womit die Gehalte mit denen aus dieser Arbeit vergleichbar sind (Q-arab 0,02-0,072; Q-glc 0,014-0,05).

Auch die Ergebnisse für die Verluste der Quercetinglykoside durch die Alkalisierung decken sich. In dem alkalisierten Kakaopulver sind nur noch 38% der Quercetinglykoside im Vergleich zum nicht alkalisierten Kakaopulver enthalten (Tabelle 2.24, S. 100).

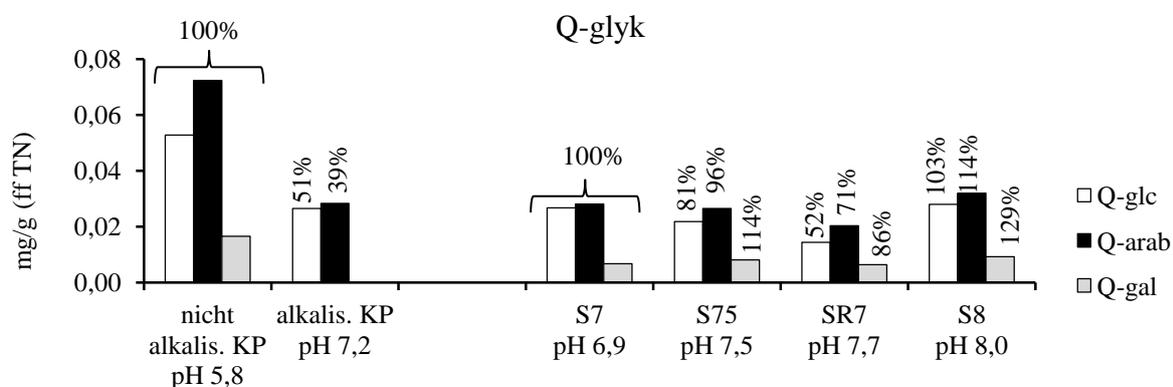


Abbildung 2.39: Quercetinglykosid-Konzentrationen und prozentuale Veränderungen eines nicht alkalisierten Kakaopulvers und von unterschiedlich stark alkalisierten Kakaopulvern.

Die Verluste von Q-glc liegen bei 49% und die von Q-arab bei 61% (Abbildung 2.39). Q-gal war nach der Alkalisierung nicht mehr quantifizierbar. Die von Andrés-Lacueva et al. (2008) festgestellten Verluste von Q-glc und Q-arab lagen bei 61% und 62%. Weitere Literaturdaten zur Veränderung der Q-glyk durch die Alkalisierung von Kakao sind nicht bekannt.

Die unterschiedlich alkalisierten Kakaopulver (S7, S75 und SR7) zeigen auch sinkende Konzentrationen von Q-glc und Q-arab mit steigendem Alkalisierungsgrad bzw. höherem pH-Wert.

2.3.4.1 Fazit der Alkalisierung von Kakao

In alkalisierten Kakaopulvern sind die niedrigsten Flavanolgehalte von allen untersuchten Kakao-Verarbeitungsproben zu quantifizieren. Das Ausmaß der Epimerisierung ist bei alkalisierten Kakaoprodukten am größten. Auch die *N*-Phenylpropenoyl-*L*-Aminosäuren und die Quercetinglykoside sind gegenüber der Alkalisierung ähnlich instabil wie die Flavanole. Die Konzentrationsverhältnisse der Substanzen zueinander in der Gruppe der *N*-Phenylpropenoyl-*L*-Aminosäuren bleiben auch bei der Alkalisierung unverändert. Damit blieb bei dieser Substanzgruppe, in allen untersuchten Stufen der Kakaoverarbeitung, das Substanzprofil bestehen. Dies könnte möglicherweise zur Prüfung auf Authentizität von Kakaoprodukten genutzt werden, z.B. in Hinblick auf die Auslobung einer bestimmten Herkunft.

2.4 Einfluss der Konzentratherstellung auf Flavanonglykosid-Diastereomere in Orangensäften

Neben den technologisch bedingten Veränderungen phenolischer Verbindungen in Kakao wurde, in einem weiteren Forschungsprojekt, der Einfluss der Konzentratherstellung auf die Flavanonglykosid-Diastereomere in Orangensäften untersucht. Die Parallele zu den Kakao-Verarbeitungsproben bestand darin herauszufinden, ob auch bei anderen flavonoiden Verbindungen in anderen Lebensmitteln durch die Verarbeitung Epimerisierungsreaktionen stattfinden.

Forschungsprojekt zur Authentizitätsprüfung von Orangensäften

Im Rahmen eines Projektes zur „Entwicklung einer Datenbank zur Wareneingangskontrolle von Blutorangendirektsäften und weiteren Orangensaftprodukten“ wurden definierte Orangensaftproben untersucht (Boner et al., 2012). Für das Projekt standen insgesamt 83 Proben von Orangen, Direktsäften und Konzentraten zur Verfügung, die teilweise mit Herkunft, Sorte und Jahrgang gekennzeichnet waren. In Kapitel 4.1.2 befindet sich eine tabellarische Zusammenfassung der untersuchten Proben des Projektes (Tabelle 4.2, S. 114). Die Untersuchungsparameter waren Substanzen aus mehreren Polyphenolklassen, Isotopenverhältnisse des Wassers (D/H, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) und verschiedene Elementgehalte. Aus diesen Analysen sollten Kennzahlen für erntejahrgangsunabhängige Mengenverhältnisse zur Authentizitätsprüfung von Herkunft, Sorte und Verarbeitungsgrad im Wareneingang identifiziert werden. Hierfür eignen sich z.B. Polyphenolverhältnisse, da sie in Struktur und Vorkommen je Pflanzenart charakteristisch sind und ein spezielles Profil aufweisen (Bronner, 1996; Jungfer et al., 2012; Zimmermann und Galensa, 2006).

Polyphenole in Orangen (*Citrus sinensis* L.) sind hauptsächlich Flavanone und Flavone bzw. deren Glykoside, sowie polymethoxylierte Flavone und Phenolcarbonsäuren (Gil-Izquierdo et al., 2002; Kelebek et al., 2008; Mouly et al., 1998). In Blutorangen sind zusätzlich die farbgebenden Anthocyane enthalten (Lo Scalzo et al., 2004).

Unterscheidung von Direktsäften und Säften aus Konzentrat

Eine mögliche Unterscheidung zwischen Direktsäften und Säften aus Konzentrat war ein weiteres Forschungsziel des Projektes. Hierfür standen drei Orangensäfte aus Brasilien mit den korrespondierenden Konzentraten zur Verfügung, welche jeweils vor und nach der Konzentratherstellung in einem Orangensaft produzierenden Betrieb entnommen wurden.

Fruchtsaftkonzentrat wird durch Eindampfen mit Fallstrom- oder Dünnschichtverdampfern gewonnen, bei Temperaturen bis 100 °C für 3-8 min. Dabei entstehen sowohl das Saft- als

auch das Aromakonzentrat, diese werden zur späteren Fruchtsaftgewinnung wieder gemeinsam verdünnt (Belitz et al., 2008b). Durch die thermische Belastung während der Pasteurisierung und der Konzentratherstellung von Orangensäften besteht die Möglichkeit, dass das ursprüngliche Diastereomerenverhältnis der Flavanonglykoside verändert wird (Asztemborska und Żukowski, 2006; Gel-Moreto et al., 2003b).

Flavanone besitzen an Position C2 des C-Rings (Abbildung 2.40) ein chirales Zentrum. In frischen Orangensäften liegen die Flavanonglykoside in einem bestimmten Diastereomerenverhältnis vor (Gel-Moreto et al., 2003b). Die Biosynthese von 2S-Naringenin in der Pflanze erfolgt stereoselektiv durch eine Chalkonisomerase, welche die Zyklisierung der Chalkonvorstufe zum ersten Flavonoid katalysiert. Das 2S-Naringenin ist die zentrale Ausgangssubstanz der Flavonoidbiosynthese, aus der durch Hydroxylierung, Methoxylierung und/oder Glykosylierung die Flavanonglykoside hervorgehen (Winkel-Shirley, 2001). In Orangen liegen die Flavanonglykoside zunächst alle in der 2S-Konfiguration vor.

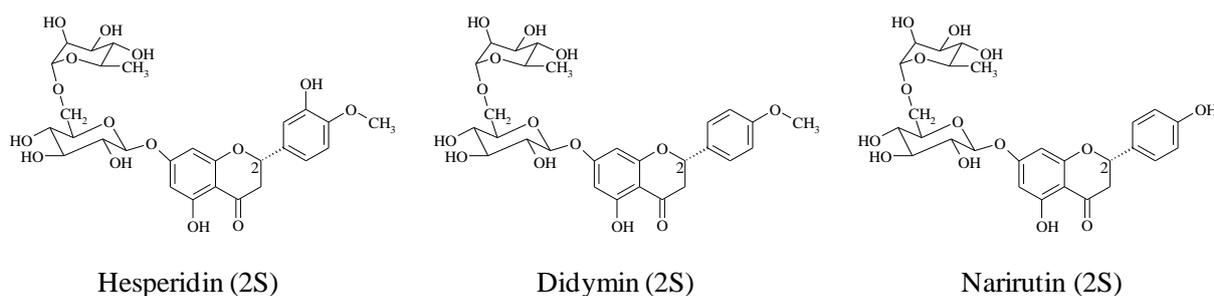


Abbildung 2.40: Strukturformeln der Flavanonglykoside in Orangensäften.

Bereits während der Fruchtreifung verändern sich die Diastereomerenverhältnisse durch nicht-enzymatische Racemisierungen (Krause und Galensa, 1991a). Gaffield et al. (1975) belegten die Verschiebung des Verhältnisses von 2S-Naringenin zur 2R-Form in Grapefruits verschiedener Reifegrade. Der vermutete Mechanismus der Epimerisierung der Flavanonglykoside erfolgt wie bei den Flavan-3-olen über ein Chalkonintermediat durch die Öffnung des heterozyklischen C-Ring am Stereozentrum (C2) des Aglykons. Die Racemisierungstendenz der Flavanondiastereomere ist je nach Substituierung am B-Ring und je nach pH-Wert unterschiedlich (Krause und Galensa, 1991b). Freie Hydroxylgruppen, insbesondere an Position C4' (siehe Narirutin) und eine Glykosylierung an C7 erleichtern die Ringöffnung, während Methoxygruppen am B-Ring diese erschweren (Miles und Main, 1988).

Analytik - Diastereomerentrennung der Flavanonglykoside

Die Diastereomerentrennung der Flavanonglykoside erfolgte mit enantioselektiver Kapillarelektrophorese. Eine Trennung der Diastereomere ist über ein nicht enantioselektives Trennsystem möglich, da es sich hierbei nicht um Enantiomere handelt. Jedoch ist der Unterschied in der räumlichen Struktur zwischen den 2S und 2R-Molekülen sehr gering. Durch den Zusatz von Cyclodextrinen als chirale Selektoren wird die Trennung ermöglicht. In Vorarbeiten des eigenen Arbeitskreises wurden bereits verschiedene Parameter der Trennmethode, wie pH-Wert, die Kombination verschiedener Cyclodextrine und das Aufkonzentrieren der Probe am Kapillaranfang (sample stacking) optimiert (Gel Moretó, 2003a; Ritter, 2010b). Darauf aufbauend wurde die Trennmethode nach Ritter (2010b) in einer modifizierten Form verwendet (Kapitel 4.3.7.2). Folgende Parameter wurden verändert: die Puffermolarität (von 200 mM auf 500 mM), der Kapillarinne Durchmesser (von 75 μm auf 50 μm), die Kapillarlänge (von 70 cm auf 115 cm) und infolge dessen die Trennungsspannung (von 18 kV auf 30 kV). Die Puffermolarität wurde erhöht, dadurch erhöht sich die Viskosität, wodurch sich der elektroosmotische Fluss (EOF) verlangsamt, was wiederum die Trennung beeinflusst. Die Kapillarverlängerung verbessert die Peakauflösung durch die längere Trennstrecke. Ein geringerer Kapillarinne Durchmesser führt zu einer gleichmäßigeren Kühlung des Puffers, wodurch die Migrationsunterschiede geringer werden und damit die Trenneffizienz erhöht wird (Engelhardt et al., 1994). Die modifizierte Methode führt (trotz erhöhter Trennungsspannung) zu einer Verlängerung der Analysenzeit. Jedoch ist eine weitgehende Basislinientrennung erreicht worden, um Peakflächenverhältnisse bilden zu können. Die Entwicklung und Durchführung der Probenaufarbeitung der Orangensäfte und Konzentrate (Kapitel 4.3.5) erfolgte durch Wollseifen und ist in Boner et al. (2012) beschrieben.

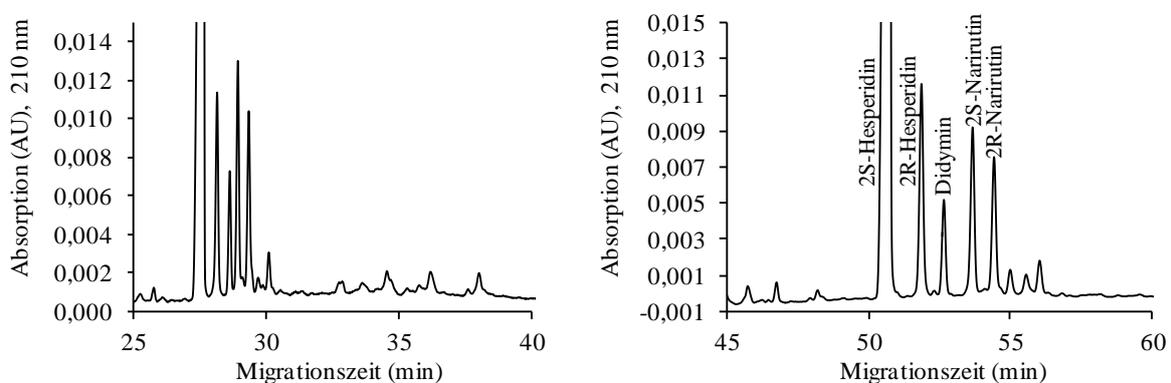


Abbildung 2.41: Trennung der Flavanonglykosid-Diastereomere in einem Orangensaftextrakt nach Ritter (2010b) (links) und nach der für diese Arbeit modifizierten Trennmethode (rechts).

Abbildung 2.41 (S. 107) zeigt den entsprechenden Abschnitt eines Elektropherogramms mit den gekennzeichneten Flavanonglykosiden in einem Extrakt aus Orangensaft. Die Identifizierung erfolgte für Hesperidin, Narirutin und Didymin mit Referenzsubstanzen über den Migrationszeitenvergleich, durch Dotierung der reinen Standardsubstanzen und den Vergleich von UV-DAD-Spektren. Die Zuordnung der 2S- bzw. 2R-Diastereomere von Hesperidin und Narirutin erfolgte über den Vergleich von Literaturdaten, da in Orangen und Orangensaftprodukten die 2S-Diastereomere überwiegen (Gel-Moreto, 2003a). Dies war in allen untersuchten Proben jeweils für das zuerst migrierende Diastereomer der Fall.

Diastereomerenprofile und Epimerisierung von Flavanonglykosiden

Das Diastereomerenprofil aller untersuchten Orangen, Direktsäfte und Säften aus Konzentrat stimmt mit den in der Literatur beschriebenen Racemisierungstendenzen der Flavanonglykosid-Diastereomere überein (Krause und Galensa, 1991b; Miles und Main, 1988). Während Narirutin (OH-Gruppe an Position C4') nahezu in einem Diastereomergleichgewicht vorliegt, liegt Hesperidin (Methoxygruppe an C4' und OH-Gruppe an Position C3') nur zu einem geringen Anteil in der 2R-Form vor, sodass die 2S-Form weiterhin vorherrscht. Für Didymin (Methoxygruppe an C4') wurde bisher noch keine Diastereomerisierung beschrieben. Dafür konnten in dieser Arbeit ebenfalls keine Hinweise gefunden werden, da ein mögliches zweites Isomer nicht zugeordnet werden konnte.

Untersuchungen aus dem eigenen Arbeitskreis von Orangen, Direktsäften und Säften aus Konzentrat zeigten eine Tendenz zur Epimerisierung von Hesperidin durch die Orangensaftverarbeitung. Die mittels enantioselektiver Kapillarelektrophorese analysierten 2S/2R-Verhältnisse von Hesperidin waren 19,4 in Orangen (n=2), 13,1 in Direktsäften (n=3) und 10,4 in Säften aus Konzentrat (n=3). Die Analyse derselben Proben mit enantioselektiver HPLC bestätigte diese Tendenz (Orangen: 20,7; Direktsäfte: 14,2; Säften aus Konzentrat: 12,3) (Gel-Moreto, 2003a). Die von Gel-Moreto (2003a) untersuchten Proben waren jedoch nicht unmittelbar voneinander abhängig. Eine Aussage darüber, ob eine Diastereomerisierung durch die Verarbeitung stattgefunden hat, ist demnach nur bedingt möglich. Asztemborska und Żukowski (2006) stellten mittels enantioselektiver HPLC ebenfalls Unterschiede im Diastereomerenverhältnis von Hesperidin in frisch gepressten und in handelsüblichen Säften fest. Das H₂S/H₂R-Verhältnis eines frisch gepressten Orangensaftes war 17,9 und das von drei kommerziell erhältlichen Säften lag zwischen 3,2 und 4,6. Demnach unterschieden sich diese Werte noch stärker voneinander als die von Gel-Moreto (2003a). Es handelte sich allerdings auch nicht um voneinander abhängige Proben, zudem gab es keine genaueren Angaben zu den Säften (ob aus Konzentrat oder nicht).

In dieser Arbeit standen direkt voneinander abhängige Handelsproben aus einer Produktionslinie von vor und nach der Konzentratherstellung zur Verfügung. In den drei Säften und den korrespondierenden Konzentraten konnte eine Verschiebung des Diastereomerenverhältnis von Hesperidin zu Gunsten des 2R-Diastereomers festgestellt werden (Abbildung 2.42). Jedoch war das Ausmaß nicht in der von Asztemborska und Żukowski (2006) und Gel-Moreto (2003a) ermittelten Größenordnung. Das H₂S/H₂R-Verhältnis in den Säften lag in der vorliegenden Untersuchung zwischen 13,4 und 14,0. Nach der Konzentratherstellung ist es auf Werte zwischen 11,1 und 12,2 gesunken.

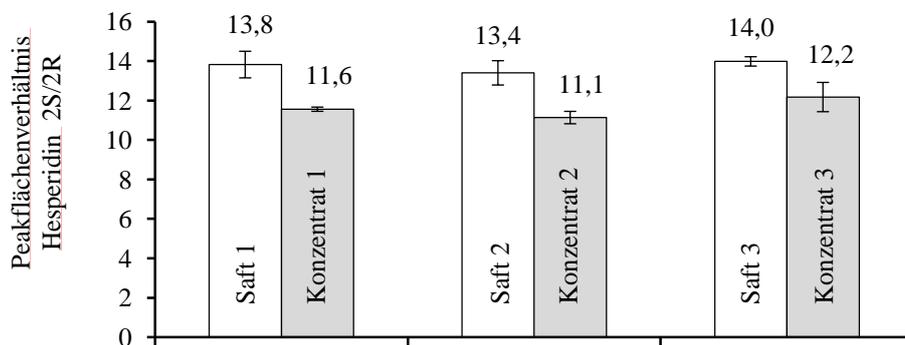


Abbildung 2.42: Mittelwerte der Peakflächenverhältnisse von Hesperidin 2S/2R der drei Direktsäfte und der korrespondierenden Konzentrate (n=3).

Verglichen mit der Epimerisierungsreaktion der Catechine in Kakao ist das Ausmaß der Diastereomerisierung von Hesperidin im Orangensaft gering. Dafür sind neben der Molekülstruktur möglicherweise die technologischen Bedingungen der Konzentratherstellung (Temperatur und Zeit der Hitzeeinwirkung sind geringer als bei der Kakaoröstung) und der niedrigere pH-Wert ausschlaggebend.

Anhand der gesamten Orangensaftproben des Projektes wurde untersucht, ob sich das Diastereomerenverhältnis von Hesperidin tatsächlich zur Identifizierung von Säften aus Konzentrat eignet (Abbildung 2.43, S. 110). Das H₂S/H₂R-Verhältnis aller Proben variierte von 9,1 bis 20,3. Im Mittel zeigen die Werte von Orangen, Säften und Konzentraten aber ebenfalls eine Tendenz zur Diastereomerisierung von Hesperidin durch die Verarbeitung. Jedoch ist das H₂S/2R-Verhältnis mit 13,7-20,1 bereits bei Orangen sehr variabel. Gleiches gilt für Direktsäfte (9,5-20,3) und Konzentrate (9,1-14,8). Die Fehlerbalken der Boxplot-Verteilung von Orangen, Direktsäften und Konzentraten überschneiden sich dementsprechend. Dennoch werden zwei als Direktsäfte deklarierte Proben aufgrund ihres 2S/2R-Verhältnisses in der Verteilung in Abbildung 2.43 als Ausreißer eingeordnet.

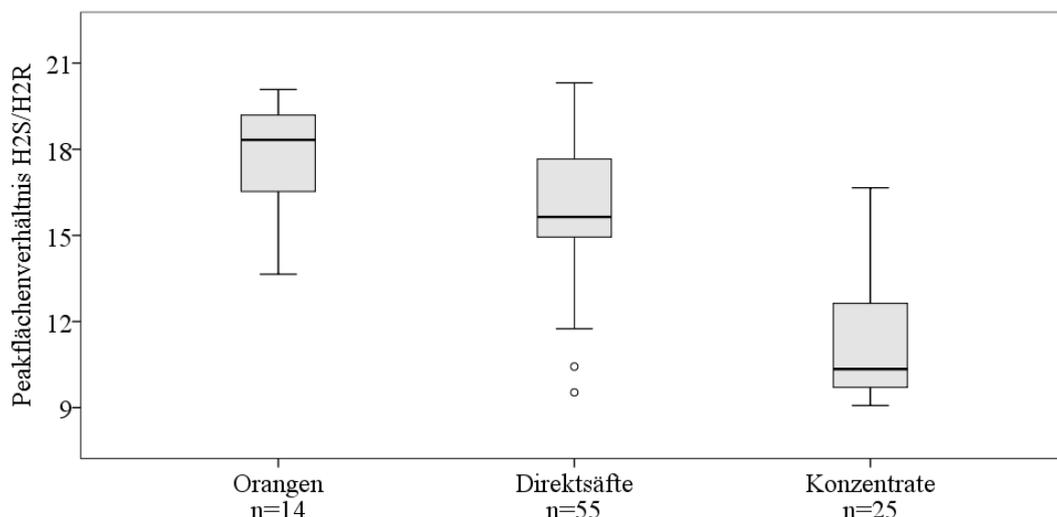


Abbildung 2.43: Peakflächenverhältnis Hesperidin 2S/2R der Orangen, Säfte und Konzentrate. (Box: Bereich zwischen 25. und 50. Perzentil, getrennt von Median. Fehlerbalken stellen den größten und den kleinsten Wert dar, der nicht Ausreißer ist. ○ Ausreißer, der mehr als 1,5 Boxlängen vom oberen bzw. unteren Quartilswert entfernt ist.)

Die Ergebnisse aller Diastereomerenverhältnisse der Datenbankproben zeigen keinen bestimmten Grenzwert, bei dem ein Saft eindeutig als Saft aus Konzentrat erkannt werden kann. Jedoch können auffällige Proben gegebenenfalls identifiziert und mit weiteren Untersuchungsparametern des Projektes verglichen werden. So zeigte z.B. eine der Proben, die als Ausreißer eingestuft wurde, ebenfalls Auffälligkeiten in den Isotopenverhältnissen des Wassers (D/H, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$). Danach wichen die Daten von der vom Hersteller angegebenen Herkunft ab. Zur Absicherung der Diastereomerenverhältnisse von Hesperidin als Parameter für den Verarbeitungsgrad von Orangen sind weitere definierte Verarbeitungsproben notwendig.

3 Zusammenfassung und Ausblick

Kakao und Kakaoprodukte zeichnen sich durch besonders hohe Gehalte an phenolischen Verbindungen aus. Diese sind insbesondere geprägt von monomeren (Catechine) und oligomeren Flavanolen (Procyanidine). Der Verzehr von Kakaoprodukten wird mit diversen positiven physiologischen Effekten auf den menschlichen Organismus verbunden, welche meistens in Bezug zum Herz-Kreislauf-System stehen. Durch die technologischen Prozesse bei der Kakaoverarbeitung wird das Spektrum der phenolischen Verbindungen stark verändert. Die Veränderungen beinhalten Konzentrationsänderungen und strukturelle Modifikationen, wodurch möglicherweise ein Einfluss auf die Bioverfügbarkeit der betreffenden Substanzen resultiert.

Forschungsziel dieser Arbeit war es, die Zusammenhänge zwischen der Prozessführung und den Veränderungen der phenolischen Verbindungen während der Kakaoverarbeitung zu untersuchen. Dafür wurden im Technikumsmaßstab hergestellte Proben von verschiedenen Kakaoröstungen und Proben einer Schokoladenherstellung sowie weitere Proben verschiedener Verarbeitungsstufen (unfermentierte und fermentierte Kakaobohnen, Kakaopulver verschiedener Alkalisierungsgrade und Schokoladen) analysiert. Zudem wurde in einem weiteren Forschungsprojekt untersucht, ob vergleichende Reaktionen auch bei anderen flavonoiden Verbindungen (Flavanonglykoside) in anderen Lebensmitteln während der Verarbeitung erfolgen (Konzentratherstellung von Orangensaft).

Ein fermentierter Kakao wurde mit Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz- und Ionenfallen-Massenspektrometrie analysiert, um die Komplexität des gesamten Spektrums an phenolischen Verbindungen aufzuzeigen. In den fermentierten Kakaobohnen aus Java konnten 216 verschiedene Substanzen charakterisiert werden. Insbesondere in der Gruppe der Flavanole konnten diverse Substanzen aus der Literatur bestätigt aber auch neue vorläufig identifiziert werden. Insgesamt wurden 195 Flavanolisomere von 34 verschiedenen Summenformeln detektiert. Dabei konnte das Vorhandensein von Prodelphinidinen, Propelargonidinen, Ethyl(epi)catechinen, Dehydrocatechinen und dimeren bis trimeren Flavanol-C-Glykosiden erstmals in Kakao aufgezeigt werden. In dieser Hinsicht könnten weitere Analysen klären, ob die hier neu beschriebenen Substanzen für Kakaobohnen bestimmter Sorten oder Herkünfte spezifisch sind.

Die Abhängigkeit der Veränderungen von den technologischen Parametern wurde in verschiedenen Verarbeitungsstufen von Kakao für die Substanzgruppen Flavanole, *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetinglykoside mit Flüssigchromatographie und Kapillarelektrophorese analysiert. Bereits in unfermentierten und fermentierten Kakaobohnen variieren die Gehalte von Flavanolen, *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetinglykosiden stark. Demnach stellt die Auswahl der Kakaobohnen einen wesentlichen Aspekt für den Gehalt an phenolischen Verbindungen in Kakaoprodukten dar.

In Bezug auf die technologischen Prozesse bei der Verarbeitung wurden zwischen und innerhalb der phenolischen Verbindungsklassen unterschiedliche Stabilitäten festgestellt. Dabei zeigen Flavanole in qualitativer und in quantitativer Hinsicht die größten Veränderungen. Flavanole verändern sich in ihrem Polymerisationsgrad zugunsten geringer polymerisierter Oligomere bzw. zu Monomeren. Neben der bekannten Epimerisierung der Catechine wurde auch für dimere und trimere Procyanidine eine vergleichbare Verschiebung im Profil (Konzentrationsabnahmen und -zunahmen) festgestellt. Aufgrund dieser Ergebnisse ist auch bei Procyanidinen von einer Epimerisierung auszugehen. Durch die Deoligomerisierungen und Epimerisierungen kann das Flavanolprofil im resultierenden Kakaoprodukt maßgeblich verändert werden. Der Einfluss dieser Veränderungen auf die Bioverfügbarkeit von Flavanolen ist unklar und bedarf der Untersuchung in weiteren Humanstudien.

Das Ausmaß der Epimerisierung und der Flavanolverluste kann möglicherweise beeinflusst werden. Röstungen verschiedener Temperatur-Zeit-Kombinationen zeigen, dass die Epimerisierungsreaktion mit Herabsetzen der Rösttemperatur, trotz Verlängerung der Röstzeit, einzuschränken ist. Die Konzentrationsänderungen der Flavanole können bei verschiedenen Kakaobohnen sehr unterschiedlich ausfallen. So wiesen beispielsweise die Kakaobohnen von der Elfenbeinküste im Gegensatz zu den Kakaobohnen aus Java, bei gleichen Röstbedingungen, kaum Verluste in den analysierten Flavanolen auf. Zur Identifizierung von Ursachen für diese Unterschiede sind weitere Analysen mit einer größeren Anzahl an vollständig charakterisierten Kakaoproben (z.B. Herkunft, Sorte, chemische Zusammensetzung, Fermentationsgrad) notwendig. Zudem kann festgehalten werden, dass auch relativ niedrige Temperaturen, beispielweise 60 °C bei der Zermahlung von Nibs und 80 °C beim Conchieren, zu Verlusten und Epimerisierungen führen, wenn das Kakaogut diesen über einen längeren Zeitraum (20 Stunden) ausgesetzt ist.

Die Konzentrationsverhältnisse der einzelnen *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren zueinander blieben in allen direkt voneinander abhängigen Verarbeitungsproben (Röstung, gesamte Schokoladenherstellung, Alkalisierung) bestehen. Hierfür ist in weiteren Untersuchungen zu prüfen, ob sich diese Verbindungsklasse möglicherweise zur Authentizitätsprüfung von Kakaoprodukten z.B. in Hinblick auf eine Auslobung bestimmter Herkünfte eignet.

Anhand der kapillarelektrophoretischen Analyse von Orangensäften und den korrespondierenden Konzentraten, welche jeweils vor und nach der Konzentratherstellung entnommen wurden, konnten Epimerisierungen von Hesperidin nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Hesperidin-Diastereomerenverhältnisse von insgesamt 83 Orangen, Orangensäften und Konzentraten zeigen jedoch keinen bestimmten Grenzwert, bei dem ein Saft eindeutig als Saft aus Konzentrat erkannt werden kann. In dieser Hinsicht sind in weiteren Forschungsarbeiten zusätzliche Parameter zur Unterscheidung von Direktsäften und Säften aus Konzentrat zu identifizieren.

4 Material und Methoden

4.1 Probenmaterial

4.1.1 Kakaoproben

Tabelle 4.1: Zusammenfassende Übersicht der untersuchten Kakaoproben verschiedener Verarbeitungsstufen.^a

Verarbeitungsstufe	Probenanzahl	Charakterisierung	Bezugsquelle
Nicht fermentierte Kakaobohnen	18	Entfettet und gemahlen (Korngröße <50 µm)	
Fermentierte Kakaobohnen	4	Herkunft: Java (zwei verschiedene Chargen), Elfenbeinküste, Ghana	ZDS Solingen
Geröstete Kakaobohnen	14	Herkunft: Java und Elfenbeinküste Alle Röstungen wurden mit 5 kg Kakaobohnen, jeweils zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. Java1: 12 verschiedene Temperatur-Zeit-Kombinationen geröstet. Eine Temperatur-Zeit-Kombination wurde im Abstand von etwa 1/2 Jahr erneut durchgeführt. Java2, Elfenbeinküste: Jeweils eine Temperatur-Zeit-Kombination geröstet.	ZDS Solingen
Proben einer Schokoladenherstellung	9	Herkunft: Ghana Proben vor Verarbeitung und nach jedem Verarbeitungsschritt bis zur fertigen Schokolade.	ZDS Solingen
Schokoladen	5	Kakaoanteil: 54-85%	aus dem Handel
Nicht alkalisiertes Kakaopulver und verschieden alkalisierte Kakaopulver	4 2	pH: 6,9; 7,3; 7,5 und 7,6 Nicht alkalisiert (pH: 5,8) und alkalisiert (pH: 7,2)	Schokinag, Mannheim Kakaoverarbeitung, Berlin
Kakaopulver	5	pH: 6,5-7,6 10-11% Fett, stark entölt	aus dem Handel

^a Eine vollständige Liste mit weiteren Angaben zur Charakterisierung der Proben befindet sich im Anhang in Tabelle A 1 auf Seite 154.

4.1.2 Orangensäfte und Konzentrate

Tabelle 4.2: Zusammenfassung der 83 definierten Orangensaft- und Konzentrat-Proben.

Probenart	Probenanzahl	Sorten	Herkünfte	Jahrgänge
Blutorangen, selbst gepresst	11	Moro (5 Proben) Tarocco (4 Proben) Sanguinello (2 Proben)	Italien, einmal Sanguinello aus Marokko	2011 und 2012, für alle Sorten
Blutorangendirektsäfte	38		Italien	2010 und 2011
Blutorangensaftkonzentrat	2		Italien	2010 und 2012
Orangen, selbst gepresst	2	Cara Cara	Italien, Spanien	2011
Orangendirektsäfte	7		Spanien, Brasilien	2011
Orangensaftkonzentrate	23		Italien, Brasilien, Mexiko, Griechenland, Paraguay	2011 und 2012

4.2 Chemikalien und weitere Materialien

Für die Chromatographie ohne massenspektrometrische Detektion wurden Chemikalien mit LC Reinheit und bei Kopplung mit Massenspektrometrie Chemikalien mit LC-MS Reinheit verwendet. Bidest. Wasser wurde von einer Millipore Direct-Q® 3UV Anlage mit Pumpe bereitgestellt (Molsheim, Deutschland) und für alle Analysen und Probenaufarbeitungen verwendet, mit Ausnahme der UHPLC-MS Messungen, hierfür wurde UHPLC-Wasser verwendet. Nachfolgend werden alle Referenzsubstanzen, verwendete Chemikalien sowie weitere verwendete Materialien und Geräte aufgelistet.

Verwendete Referenzsubstanzen

Referenzsubstanz (Reinheitsangabe)	Hersteller
(-)-Epicatechin (> 97%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
(+)-Catechin Hydrat (> 98%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
(±)-Catechin Hydrat (> 98%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Procyanidin B2 (> 90%)	Extrasynthese, Genay, France
Procyanidin B1 (> 80%)	Extrasynthese, Genay, France
Quercetin-3-O-glucosid (> 99,9%)	Extrasynthese, Genay, France
para-Coumarsäure (> 99%)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Kaffeensäure (> 95%)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ferulasäure (> 95%)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Protocatechusäure (> 97%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Hesperidin (> 80%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Narirutin (> 99 %)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Didymin (> 98%)	Fluka, St. Gallen, Schweiz

Verwendete Chemikalien

Chemikalie (Reinheitsangabe)	Hersteller
Aceton (mind. 99,5%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Acetonitril (LC-Grade)	Fischer Scientific, Loughborough, England
Acetonitril (LC-MS-Grade, mind. 99,9%)	Fischer Scientific, Loughborough, England
Ameisensäure (98-100%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Borsäure (p.a.)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Carboxymethyl- γ -Cyclodextrin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylformamid (p.a.)	Fischer Scientific, Loughborough, England
Dimethylsulfoxid (mind. 99,9%)	Merck, Darmstadt, Deutschland
di-Natriumtetraborat (p.a.)	KMF Laborchemie, St. Augustin, Deutschland
Essigsäure (LC Grade, mind. 99,9%)	Fischer Scientific, Loughborough, England
Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin	Wacker-Chemie, Burghausen, Deutschland
Hydroxypropyl- γ -Cyclodextrin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Methanol (LC-Grade)	J. T. Baker, München, Deutschland
Natronlauge (p.a.)	Bernd Kraft Laborchemie, Duisburg, Deutschland
n-Hexan (p.a.)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure (p.a., 37%)	Th. Geyer GmbH & Co KG, Lohmar, Deutschland
UHPLC-Wasser	VWR, Leuven, Belgien

Weitere verwendete Materialien und Geräte

Material	Hersteller
C18 Chromabond, 500 mg, 3 mL	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Cellulose Filter (ASE)	Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland
Cellulose Spritzen-Filter, 0,45 μ m	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Diathomerde, HM-N	Biotage, Uppsala, Schweden
Fused Silica Kapillare, 50 μ m i.D., 5 m	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Fused Silica Kapillare, 75 μ m i.D., 5 m	Beckman Coulter, Fullerton, USA
HRX Chromabond (Polystyrol-Divinylbenzol), 500 mg, 3 mL	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Karl-Fischer-Titration	Metrohm, Deutschland
pH-Meter	Model 761 von Knick, Berlin, Deutschland
Polyamid Chromabond, 1000 mg, 6 mL	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Polyamid Chromabond, 500 mg, 3 mL	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
CHS Chromabond (Cyclohexyl), 500 mg, 3 mL	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland

4.3 Methoden und Geräte

4.3.1 Kakaovermahlung

Die Aufarbeitung der Vermahlungsproben erfolgte mit beschleunigter Lösungsmittel-extraktion nach Methode 4.3.2.1 für die Entfettung und Methode 4.3.2.2 für die Extraktion.

M0: Vorzerkleinerung der Kakaobohnen mittels Schlagmühle und Trockeneis

Schlagmühle: Grindomix 200 (Retsch, Haan, Deutschland). Bei der Vermahlung mit Trockeneis ist es notwendig, ein kleines Loch in den Deckel zu stechen, damit das CO₂ entweichen kann.

Vermahlungsprozedur: 50 g Kakaobohnen wurden mit 80 g Trockeneis (3 mm Pellets, Cleanas, www.trockeneis-direkt.de) 30 s lang gemahlen (Speed 0,5). Nach erneuter Zugabe von 80 g Trockeneis werden weitere 2 min gemahlen (Speed 0,5). Zur Entfernung des CO₂ verbleiben die Proben über Nacht im Abzug.

Vermahlung mit Kugelmühle und flüssigem Stickstoff

Kugelmühle: MM 200 (Retsch, Haan, Deutschland).

Vermahlungsprozedur: Jeweils 6 g vorzerkleinertes Kakaopulver wurden in zwei Mahlbecher gefüllt, etwa 4 min in flüssigem Stickstoff gekühlt und nach den folgenden Methoden vermahlen. Zwischen zwei Vermahlungszyklen (M4) wurde erneut 4 min in flüssigem Stickstoff gekühlt.

Parameter der durchgeführten Vermahlungen mit Kugelmühle.

Vermahlung	Amplitude	Vermahlungszeit in min
M1	80	4
M2	100	4
M3	100	2
M4	100	zweimal 2

4.3.2 Beschleunigte Lösungsmittlextraktion

Apparatur für die beschleunigte Lösungsmittlextraktion: ASE[®] 200 (Accelerated Solvent Extractor, Dionex, Idstein, Deutschland). Dabei handelt es sich um eine programmierbare Extraktionsapparatur (Steuerungssoftware: Modulware 3.10 und Bios 30.00) mit variablen Einstellungen, befüllbar mit 24 Stahlextraktionszellen verschiedener Volumina (hier wurden Extraktionszellen mit 11 mL Volumen verwendet).

Allgemeine Aufarbeitungsprozedur für die Extraktion: Die Probe wird mit Diathomerde (Hydromatrix HM-N) vermischt, in die Extraktionszelle gefüllt und zusammengedrückt. Das Restvolumen der Extraktionszelle wird ebenfalls mit Hydromatrix aufgefüllt. Die Enden der Extraktionszelle werden, zum Schutz der Stahlritzen, mit Cellulosefiltern bestückt. Die gefüllten Extraktionszellen werden in die Apparatur eingehängt und die programmierten Methoden können ausgeführt werden. Die Methoden der beschleunigten Lösungsmittel-extraktion können durch verschiedene Parameter variiert werden. Das statische Ventil wird während der Extraktion geschlossen, damit der programmierte Druck auf das Zellinnere ausgeübt werden kann. Im gesamten System kann die Luft durch Stickstoff ersetzt werden. Der Stickstoff wird dazu genutzt, das Lösungsmittel nach der Extraktion aus der Zelle zu befördern (Höfler, 2000). Für weitere Informationen zu Handhabung und Apparatur sei auf die Arbeiten von Papagiannopoulos (2008), Wollseifen (2010) und Höfler (2000) verwiesen.

Variable Parameter der beschleunigten Lösungsmittel-extraktion mit ASE[®] 200.

Druck	0-199,9 bar
Lösungsmittel	4 Positionen für Lösungsmittel, diese können automatisch gemischt werden
Lösungsmittelmenge	50-150% Spülvolumen des Zellvolumens
Extraktionstemperatur	40-200 °C, bzw. Raumtemperatur
Zeit zum Vorheizen der Zelle	0-99 min
statische Extraktionszeit	0-99 min
Extraktionszyklen	1-5 Zyklen
Stickstoffmenge zur Entfernung des Lösungsmittels	Stickstoffstrom mit einer Dauer von 0-300 s
Druck	0-199,9 bar

Für die Extraktion der Polyphenole aus Kakao in der vorliegenden Arbeit wurden die Parameter - Lösungsmittel, Extraktionszeit und Extraktionszyklen - untersucht. Der Druck wurde für alle Extraktionen bei 199,9 bar belassen. Aufgrund der Temperaturempfindlichkeit der Analyten wurden die Extraktionen bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Parameter Lösungsmittelmenge und Stickstoffmenge zur Entfernung des Lösungsmittels wurden für alle Analysen bei 50% und 60 s belassen.

Konstant gehaltene Parameter der beschleunigten Lösungsmittel-extraktion.

Druck	Lösungsmittelmenge	Extraktionstemperatur	Dauer des Stickstoffstroms
199 bar	50% Spülvolumen	Raumtemperatur	60 s

Die Probeneinwaage wurde jeweils an die Kakaoprobe, unter Berücksichtigung von Verarbeitungsgrad und Fettgehalt angepasst. Die Proben wurden mit etwa 3,5 g Hydromatrix

vermischt, in die Extraktionszelle überführt und zusammengedrückt. Das Restvolumen der Zelle wurde mit Hydromatrix aufgefüllt.

Probeneinwaagen der verschiedenen Kakaoproben.

Verarbeitungsgrad:	unfermentiert	fermentiert	fermentiert und geröstet	Schokoladen und Kakaomassen	Kakaopulver
Probenmenge (g):	0,20	1,0	1,0	1,0	0,5

4.3.2.1 ASE-Parameter zur Entfettung der Kakaoproben

Parameter der beschleunigten Lösungsmittlextraktion für die Entfettung.

Lösungsmittel	Extraktionszyklen	Extraktionszeit
Hexan	3	5 min

4.3.2.2 Kakaovermahlung

Proben: Mahlproben M0-M4, siehe 4.3.1

Einwaage: ca. 1 g (vermischt mit etwa 3,5 g Diathomerde)

Die verschiedenen Mahlproben wurden jeweils in Doppelbestimmung aufgearbeitet. Zunächst wurden die Proben entfettet (siehe 4.3.2.1) und anschließend nach folgender ASE-Methode extrahiert. Das Aceton des Lösungsmittlextraktes wurde mittels Stickstoffstrom entfernt, der Extrakt in einen 10 mL Meßkolben überführt und mit bidest. Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Vor der HPLC-UV-DAD Analyse wurden die Proben membranfiltriert.

Parameter der beschleunigten Lösungsmittlextraktion für die Proben der Kakaovermahlung.

Lösungsmittel	Extraktionszyklen	Extraktionszeit
70% Aceton in Wasser	1	10 min

4.3.2.3 Extraktionslösungsmittel

Etwa 1g Kakaoprobe wurde mit ca. 3,5 g Diathomerde vermischt. Die Entfettung erfolgte nach Methode 4.3.2.1. Die Probenaufarbeitung wurde jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt. Das Lösungsmittel wurde nach der Extraktion mittels Stickstoffstrom entfernt, der Extrakt in einen 20 mL Meßkolben überführt und mit bidest. Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Vor der HPLC-UV-DAD Analyse wurden die Proben membranfiltriert.

Verschiedene geprüfte Lösungsmittel für die beschleunigte Lösungsmittlextraktion.

Lösungsmittel	Extraktionszyklen	Extraktionszeit
0-100% Aceton bzw. Methanol in Wasser in 10% Schritten	1	10 min

4.3.2.4 Extraktionszeit

Die Probenaufarbeitung erfolgte jeweils in Doppelbestimmung, wie unter 4.3.2.3 beschrieben.

Parameter der beschleunigten Lösungsmittlextraktion.

Lösungsmittel	Extraktionszyklen	Extraktionszeiten
50% Aceton in Wasser	1	10, 15 und 20 min

4.3.2.5 Extraktionszyklen

Die Probenaufarbeitung erfolgte jeweils in Doppelbestimmung, wie unter 4.3.2.3 beschrieben.

Parameter der beschleunigten Lösungsmittlextraktion.

Lösungsmittel	Extraktionszyklen	Extraktionszeit
50% Aceton in Wasser	2, Extrakt jeweils separat aufgefangen	20 min

4.3.2.6 Extraktionsmethode für die Kakao-Verarbeitungsproben

Die Probenaufarbeitung erfolgte jeweils in Doppelbestimmung, wie unter 4.3.2.3 beschrieben.

Parameter der beschleunigten Lösungsmittlextraktion für die Kakao-Verarbeitungsproben.

Lösungsmittel	Extraktionszyklen	Extraktionszeit
50% Aceton in Wasser	1	20 min

4.3.3 Automatisierte Festphasenextraktion

Apparatur für die automatisierte Festphasenextraktion: ASPEC XLi mit einer Spritzenpumpe 402 (Volumen: 1 mL, 25 mL), Software 735 V 4.03 (Gilson, Bad Camberg, Deutschland).

4.3.3.1 Verschiedene Kartuschenmaterialien und Elutionsmittel

Für die Untersuchung wurde ein Extrakt aus 20 g Kakao hergestellt. Dieser wurde manuell zunächst dreimal mit Hexan entfettet und zweimal mit 180 mL 50% Aceton in Wasser extrahiert. Nach entfernen des Lösungsmittels wurde das Volumen auf 200 mL aufgefüllt. 1 mL des Extraktes entspricht 0,1 g nicht entfettetem Kakao.

Untersuchte Kartuschenmaterialien.

Polyamid	500 mg/3 mL, Chromabond von Macherey-Nagel
C18	500 mg/3 mL, Chromabond von Macherey-Nagel
HRX, Polystyrol-Divinylbenzol	500 mg/3 mL, Chromabond von Macherey-Nagel

Jeweils 5 mL (entsprechend 0,5 g nicht entfettetem Kakao) wurden mit 15 mL bidest. Wasser vermischt und als Probenlösung verwendet. Die automatisierte Festphasenextraktion wurde mit nachfolgender Methode durchgeführt. Die verschiedenen Kartuschen wurden jeweils in Doppelbestimmung getestet.

SPE-Methode zur Untersuchung der verschiedenen Kartuschenmaterialien.

Konditionieren	3 mL DMSO/Ameisensäure (99,1/0,1; v+v) 10 mL bidest. Wasser
Probe auftragen und waschen der Kartusche	20 mL Probenlösung 10 mL bidest. Wasser
Elution	3 mL DMSO/Ameisensäure (99,1/0,1; v+v)

Für die Polyamidphase wurden verschiedene Lösungsmittel untersucht: Methanol, DMSO, DMSO/Ameisensäure (99,1/0,1; v+v) und DMF. Die Untersuchung erfolgte mit der oben aufgeführten SPE-Methode und das Lösungsmittel zum Konditionieren und Eluieren wurde entsprechend variiert. Die verschiedenen Lösungsmittel wurden jeweils in Doppelbestimmung getestet.

4.3.3.2 Polyamid - Kartuschenkapazität

Die Optimierung der SPE-Methode der Kakaoanalyten erfolgte für die Polyamidphase (PA) mit 6 mL bzw. 1000 mg Kartuschen.

Für die Untersuchung wurde ein Extrakt aus 40 g Kakao hergestellt. Dieser wurde manuell zunächst dreimal mit Hexan entfettet und zweimal mit 400 mL 50% Aceton extrahiert. Nach entfernen des Lösungsmittels wurde das Volumen auf 500 mL aufgefüllt. 1 mL des Extraktes entspricht ~0,08 g nicht entfettetem Kakao.

Auf die SPE-Kartusche (PA 1000 mg/6 mL) aufgetragene Extraktvolumina sowie die entsprechende Menge an nicht entfettetem Kakao.

Extrakt (mL):	5	10	15	20	25	30	35	40
entsprechende Menge Kakao (g):	~0,4	~0,8	~1,2	~1,6	~2,0	~2,4	~2,8	~3,2

Die oben aufgeführten Volumina wurden jeweils auf ein Gesamtvolumen von 60 mL aufgefüllt und als Probenlösung zur Untersuchung des maximalen Extraktgehaltes verwendet. Die verschiedenen konzentrierten Probenlösungen wurden in Doppelbestimmung hergestellt und getestet. Mit nachfolgender Methode erfolgte die automatisierte Festphasenextraktion.

SPE-Methode (PA 1000 mg/6 mL) zur Überprüfung des maximal möglichen Extraktgehaltes.

Konditionieren	6 mL DMSO/Ameisensäure (99,1/0,1; v+v) 10 mL bidest. Wasser	
Probe auftragen und waschen der Kartusche	20 mL Probe 10 mL bidest. Wasser	} dreimal durchführen
Elution	6 mL DMSO/Ameisensäure (99,1/0,1; v+v)	

4.3.3.3 Polyamid - Maximal möglicher Acetongehalt in der Probenlösung

Für die Untersuchung des maximal möglichen Acetongehaltes in der Probenlösung wurde ein Extrakt aus 40 g Kakao hergestellt. Dieser wurde manuell zunächst dreimal mit Hexan entfettet und zweimal mit 180 mL 50% Aceton in Wasser extrahiert. Nach entfernen des Lösungsmittels wurde das Volumen auf 200 mL aufgefüllt. 1 mL des Extraktes entspricht ~0,2 g nicht entfettetem Kakao.

Die Probenlösungen mit den unterschiedlichen Acetonkonzentrationen wurden nach dem folgenden Pipettier-Schema, jeweils in Doppelbestimmung, hergestellt.

Pipettier-Schema der Probenextrakte zur Überprüfung des maximal möglichen Acetongehaltes in der Probenlösung.

Aceton% in Wasser	Probenextrakt (mL)	Aceton (mL)	Bidest. Wasser (mL)	Probenlösung gesamt (mL)
0	5	0	25,0	30
5	5	1,5	23,5	30
10	5	3,0	22,0	30
15	5	4,5	20,5	30
20	5	6,0	19,0	30
25	5	7,5	17,5	30
30	5	9,0	16,0	30
35	5	10,5	14,5	30
40	5	12,0	13,0	30
45	5	13,5	11,5	30

SPE-Methode (PA 1000 mg/6 mL) zur Überprüfung des maximal möglichen Acetongehaltes in der Probenlösung.

Konditionieren	6 mL DMSO/Ameisensäure (99,1/0,1; v+v) 10 mL bidest. Wasser
Probe auftragen und waschen der Kartusche	15 mL Probe 10 mL bidest. Wasser } zweimal durchführen
Elution	6 mL DMSO/Ameisensäure (99,1/0,1; v+v)

4.3.3.4 Polyamid - Elutionsvolumina

1 g der fermentierten Kakaoprobe wurde nach 4.3.2.1 entfettet und nach 4.3.2.6 extrahiert. Der Probenextrakt wurde auf ein Volumen von 60 mL aufgefüllt und nach folgender Methode aufgetragen und gewaschen:

SPE-Methode (PA 1000 mg/6 mL) zur Überprüfung der benötigten Elutionsvolumina.

Konditionieren	6 mL DMSO/Ameisensäure (99,1/0,1; v+v) 10 mL bidest. Wasser
Probe auftragen und waschen der Kartusche	20 mL Probe 10 mL bidest. Wasser } dreimal durchführen

Die Analyten wurden anschließend in mehreren Versuchsreihen mit DMSO/Ameisensäure (99,1/0,1; v+v) fraktioniert eluiert. Zunächst in 0,5 mL Schritten, um das zu verwerfende Lösungsmittelvolumen (in dem noch keine Analyten enthalten sind) zu identifizieren. Danach in 1 mL Schritten, um das Volumen zu identifizieren, das zur Elution aller Analyten benötigt wird.

4.3.3.5 Wiederfindung

1 g der fermentierten Kakaoprobe wurde nach 4.3.2.1 entfettet und nach 4.3.2.6 extrahiert. Bei den Rohextraktproben wurde das Lösungsmittel mittels Stickstoffstrom entfernt und der Extrakt auf ein Volumen von 10 mL aufgefüllt. Die SPE-Proben wurden mit der optimierten Methode (siehe nachfolgendes Kapitel 4.3.4) über die Polyamidphase aufgereinigt und aufkonzentriert. Die Peakflächen wurden zum Vergleich auf 1 g normiert.

4.3.4 Probenaufarbeitung der Kakao-Verarbeitungsproben

Aus den Voruntersuchungen zur Probenaufarbeitung wurde folgende Methode zur Aufarbeitung der Kakao-Verarbeitungsproben ausgewählt:

Vermahlung: Vorzerkleinerung wie in Kapitel 4.3.1 beschrieben und wenn notwendig, die weitere Vermahlung mit der Kugelmühle nach Methode M3.



Probeneinwaage entsprechend des Verarbeitungsgrades beachten.



Parameter zur **Entfettung** mit beschleunigter Lösungsmittlextraktion.

Lösungsmittel	Extraktionszyklen	Extraktionszeit
Hexan	3	5 min

Parameter zur **Extraktion** mit beschleunigter Lösungsmittlextraktion.

Lösungsmittel	Extraktionszyklen	Extraktionszeit
50% Aceton in Wasser	1	20 min



pH-Wert bei verarbeiteten Kakaoprodukten prüfen und wenn nötig mit Essigsäure auf <5,8 einstellen. Acetongehalt mit bidest. Wasser auf ~12% verdünnen (entspricht einem Gesamtvolumen von 60 mL).



Parameter der **automatisierten Festphasenextraktion** (PA 1000 mg/6 mL).

Konditionieren	6 mL DMSO/Ameisensäure (99,1/0,1; v+v) 10 mL bidest. Wasser	
Probe auftragen und waschen der Kartusche	20 mL Probe 10 mL bidest. Wasser	} dreimal durchführen
Verwerfen	1,5 mL	
Elution	4 mL DMSO/Ameisensäure (99,1/0,1; v+v)	

4.3.5 Probenaufarbeitung Orangensäfte und Konzentrate

Beschleunigte Lösungsmittlextraktion

Probenmenge: Orangensäfte 5 mL, Konzentrate 2 mL

Prozedur: Die Probe wird mit 1,5 g Hydromatrix vermischt, in die Stahlextraktionszelle überführt und zusammengedrückt. Das Restvolumen wird mit Hydromatrix aufgefüllt.

Parameter der beschleunigten Lösungsmittlextraktion für Orangensäfte und Konzentrate.

Lösungsmittel	Extraktions- temperatur	Extraktionszyklen	Extraktionszeit	Spülvolumen	Dauer des Stickstoffstroms
50% DMSO in Wasser	80 °C	2	20 min	50%	60 s

Automatisierte Festphasenextraktion

SPE-Kartusche: Chromabond Cyclohexyl (3 mL, 0,5 g, Macherey-Nagel)

Extrakt der beschleunigten Lösungsmittlextraktion auf 60 mL auffüllen.

Parameter der automatisierten Festphasenextraktion für Orangensäfte und Konzentrate.

Konditionieren	3 mL DMSO 5 mL bidest. Wasser	
Probe auftragen und waschen der Kartusche	20 mL Probe 10 mL bidest. Wasser	} dreimal durchführen
Elution	2 mL DMSO	

4.3.6 Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie

4.3.6.1 HPLC-UV-DAD

Die Analysen ohne massenspektrometrische Detektion (Überprüfung der Probenaufarbeitung, Quantifizierung der Kakaoproben) wurden mit folgendem HPLC-System durchgeführt.

HPLC-UV-DAD Anlage „System Gold“ (Beckman Coulter, Unterschleißheim, Deutschland).

Pumpe	Modul 125, Beckman Coulter
Probengeber	Modul 507, Beckman Coulter
Säulenofen	LC-Ofen 50913, W.O.Electronics, Langenzersdorf, Österreich
Detektor	Diodenarraydetektor Modul 168, Beckman Coulter
Steuerung der Daten	Software „32 Karat“, Version 7.0, Beckman Coulter

Methode RP-103, Methodenparameter zur Optimierung der Probenaufarbeitung.

Injektionsvolumen	10 µL
Analytische Säule	Aqua RP18, Phenomenex, Partikelgröße: 3 µm, Säulendimension: 2 mm/150 mm, Porengröße: 125 Å
Vorsäule	Aqua RP18, Phenomenex, 3 µm, 4 x 3 mm, 125 Å
Säulentemperatur	25 °C
Flussrate	0,3 mL/min
Lösungsmittelsystem	Mobile Phase A: Bidest. Wasser/Essigsäure (99/1; v+v) Mobile Phase B: Acetonitril/Essigsäure (99/1; v+v)
Lösungsmittelgradient	0 min 6% B, 40 min 10% B, 56 min 12% B, 81 min 16% B, 82 min 100% B, 92 min 100% B, 93 min 6% B, 103 min 6%
Detektionswellenlängen	Flavanole: 280 nm, <i>N</i> -Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren: 320 nm, Quercetinglykoside: 360 nm

Methode RP-100, Methodenparameter zur Quantifizierung der Veränderungen der phenolischen Verbindungen durch die Verarbeitung.

Injektionsvolumen	10 µL
Analytische Säule	Aqua RP18, Phenomenex, Partikelgröße: 3 µm, Säulendimension: 2 mm/150 mm, Porengröße: 125 Å
Vorsäule	Aqua RP18, Phenomenex, 3 µm, 4 x 3 mm, 125 Å
Säulentemperatur	35 °C
Flussrate	0,3 mL/min
Lösungsmittelsystem	Mobile Phase A: Bidest. Wasser/Essigsäure (99/1; v+v) Mobile Phase B: Acetonitril/Essigsäure (99/1; v+v)
Lösungsmittelgradient	0 min 4% B, 80 min 15% B, 81 min 100% B, 90 min 100% B, 91 min 4% B, 100 min 4% B
Detektionswellenlängen	Flavanole: 280 nm, <i>N</i> -Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren: 320 nm, Quercetinglykoside: 360 nm

4.3.6.2 HPLC-UV-DAD-Ionenfallen-Massenspektrometrie

HPLC-UV-DAD-MSⁿ Anlage.

Pumpe	P-580 A HPG, Dionex
Degasser	Degasys DG-1310, Uniflows
Probengeber	ASI-100 T, Dionex
Säulenofen	STH-585, Dionex
Detektor	UltiMate 3000 (RS), Dionex
Steuerung der LC-Daten	Chromeleon (6.8 SR 5)
Massenspektrometer	Ionenfallen-Massenspektrometer LTQ-XL (Thermo Scientific, Whatman, MA, USA)
Pumpe für Methanol	Modul 116, Beckman Coulter
Steuerung der MS-Daten	Xcalibur, Version 1.2 SP1

Methode RP-150, Methodenparameter für die Identifizierung der phenolischen Verbindungen.

Injektionsvolumen	10 µL
Analytische Säule	Aqua RP18, Phenomenex, Partikelgröße: 3 µm, Säulendimension: 2 mm/150 mm, Porengröße: 125 Å
Vorsäule	Aqua RP18, Phenomenex, 3 µm, 4 x 3 mm, 125 Å
Säulentemperatur	35 °C
Flussrate	0,3 mL/min
Lösungsmittelsystem	Mobile Phase A: Bidest. Wasser/Essigsäure (99/1; v+v) Mobile Phase B: Acetonitril/Essigsäure (99/1; v+v)
Lösungsmittelgradient	0 min 4% B, 100 min 20% B, 130 min 35% B, 131 min 100% B, 140 min 100% B, 141 min 4% B, 150 min 4% B
Detektionswellenlängen	Flavanole: 280 nm, <i>N</i> -Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren: 320 nm, Quercetinglykoside: 360 nm

Parameter der Ionisierung und massenspektrometrischen Detektion (LTQ XL).

Polarität	Negativ	Amplifier Multipole 00 Offset	6,40 V
Source Type	ESI	Lens 0 Offset	5,50 V
Capillary Temperature	300 °C	Multipole 0 Offset	5,70 V
Sheat Gas Flow	73 arb	Lens 1 Voltage	18 V
Auxiliary Gas Flow	56 arb	Gate Lens Offset	68 V
Sweep Gas Flow	1 arb	Multipole 1 Offset	17 V
Source Voltage	5 kV	Front Lens	47 V
Source Current	100 µA	Isolation Width	2 m/z
Capillary Voltage	-50 V	Norm. Coll. Energy	35%
Tube Lens	-78 V	Fragmentation time	30 ms
Skimmer Offset	0,00 V	Activation Q	0,25
Multipole RF	350 Vp-p	Scan range	150 - 2000 Da
Zudosage von Methanol zum Eluenten im Verhältnis 1:3			

Enantioselektive HPLC-UV-DAD-Ionenfallen-Massenspektrometrie

Methodenparameter der enantioselektiven HPLC-UV-DAD-MSⁿ.

Injektionsvolumen	10 µL
Analytische Säule	Nucleodex PM-γ-Cyclodextrin, Macherey-Nagel, 5 µm, 4 x 200 mm
Vorsäule	Aqua RP18, Phenomenex, 3 µm, 4 x 3 mm
Säulentemperatur	30 °C
Flussrate	0,6 mL/min
Lösungsmittelsystem	Mobile Phase A: Bidest. Wasser/Essigsäure (99/1; v+v) Mobile Phase B: Acetonitril/Essigsäure (99/1; v+v)
Lösungsmittelgradient	0 min 5% B; 1 min 5% B, 61 min 25% B; 81 min 60% B, 86 min 100% B; 96 min 100% B; 100 min 5% B, 110 min 5%
Detektionswellenlängen	Flavanole: 280 nm

Parameter der Ionisierung und massenspektrometrischen Detektion (LCQ Classic).

Polarität	Negativ	Interoctapole Lens	30 V
Source Type	ESI	Second Octapole Offset	2 V
Source Voltage	5 kV	Trap DC Offset	5
Sheat Gas	90 arb	Isolation Width	2 m/z
Auxiliary Gas	5 arb	Norm. Coll. Energy	40 %
Capillary Voltage	10 V	Fragmentation time	30 ms
Capillary Temperature	300 °C	Activation Q	0,25
Tube Lens Offset	20 V	Scan range	150 - 2000 Da
First Octapole Offset	4 V		

Zudosage von Methanol zum Eluenten im Verhältnis 1:3

HPLC-UV-DAD-Ionenfallen-Massenspektrometrie für Anthocyane

Methodenparameter der HPLC-UV-DAD-MSⁿ für Anthocyane.

Injektionsvolumen	10 µL
Analytische Säule	Zorbax StableBond Analytical SB-C18, Agilent Technologies, 5 µm, 4.6 x 250 mm
Vorsäule	Aqua RP18, Phenomenex, 3 µm, 4 x 3 mm
Säulentemperatur	35 °C
Flussrate	1 mL/min
Lösungsmittelsystem	Mobile Phase A: Bidest. Wasser/Ameisensäure (95/5; v+v) Mobile Phase B: Methanol
Lösungsmittelgradient	0 min 5% B; 2 min 5% B, 10 min 20% B, 15 min 20% B, 30 min 25% B, 35 min 25% B, 50 min 33% B, 55 min 33% B, 65 min 36% B, 70 min 45% B, 75 min 53% B, 80 min 55% B, 84 min 70% B, 88 min 5% B, 90 min 5% B
Detektionswellenlängen	Anthocyane: 520 nm

Parameter der Ionisierung und massenspektrometrischen Detektion (LTQ XL).

Polarität	Positiv	Amplifier Multipole 00 Offset	4,70 V
Source Type	ESI	Lens 0 Offset	3,60 V
Capillary Temperature	300 °C	Multipole 0 Offset	3,90 V
Sheat Gas Flow	53 arb	Lens 1 Voltage	11 V
Auxiliary Gas Flow	30 arb	Gate Lens Offset	67 V
Sweep Gas Flow	4 arb	Multipole 1 Offset	11 V
Source Voltage	5 kV	Front Lens	68 V
Source Current	100 µA	Isolation Width	2 m/z
Capillary Voltage	-1,5 V	Norm. Coll. Energy	35%
Tube Lens	-53 V	Fragmentation time	30 ms
Skimmer Offset	0,00 V	Activation Q	0,25
Multipole RF	630 Vp-p	Scan range	150 - 2000 Da
Zudosage von Methanol zum Eluenten im Verhältnis 1:3			

4.3.6.3 HPLC-UV-DAD-Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometrie

Für die FT-ICR-MS-Analyse wurde ein Agilent HPLC-System 1200 (Santa Clara, CA, USA), ausgestattet mit einem Diodenarray-Detektor, verwendet. Bis auf den Säurezusatz zum Fließmittel waren die chromatographischen Parameter wie bei Methode RP-150 aus Kapitel 4.3.6.2. Die Essigsäure wurde durch Ameisensäure ausgetauscht (Acetonitril/Ameisensäure; 99,9/0,1; v+v).

FT-ICR-MS-System und Parameter der Ionisierung und massenspektrometrischen Detektion.

FT-ICR-MS	LTQ-FT Ultra Hybrid Massenspektrometer, Thermo Fischer Scientific, Bremen
Polarität	Negativ
Source Type	ESI
Capillary Temperature	300 °C
Sheat Gas (Stickstoff)	40 arb
Source Voltage	3,3 kV
Capillary Voltage	-137
Tube Lense Offset	-218 V
Scan range	200 - 2000 Da
Steuerung/Daten	Xcalibur Software Version 2.0

4.3.6.4 UHPLC-UV-DAD-Triple-Quadrupol-MS

Die Untersuchung der Epimerisierungsprodukte von Procyanidinen erfolgte mit einem UHPLC-UV-DAD-Triple-Quadrupol-MS von Waters (Acquity-Anlage, Milford, MA, USA). Zur Steuerung der Daten wurde die Software MassLynx 4.1 von Waters verwendet.

Methodenparameter der UHPLC-UV-DAD-Triple-Quadrupol-MS zur Untersuchung der Epimerisierungsprodukte von Procyanidinen.

Injektionsvolumen	2 µL/min
Autosampler Temperatur	20 °C
Analytische Säule	Acquity BEH Shield RP18, Waters, Partikelgröße: 1,7 µm, Säulendimension: 2.1 x 150 mm, Porengröße: 125 Å
Vorsäule	Aqua RP18, Phenomenex, 3 µm, 4 x 3 mm, 125 Å
Säulentemperatur	40 °C
Flussrate	0,3 mL/min
Lösungsmittelsystem	Mobile Phase A: Bidest. Wasser/Ameisensäure (99,9/0,1; v+v) Mobile Phase B: Acetonitril/Ameisensäure (99,9/0,1; v+v)
Lösungsmittelgradient	0 min 2% B, 28 min 24% B, 29 min 100% B, 31 min 100% B, 33 min 2% B, 35 min 2% B
Detektionswellenlängen	Flavanole: 280 nm
MS Detektion (SRM)	SRM-Modus: m/z 577→289; m/z 865→577
MS Identifizierung	Produktionenscan von m/z 577

Parameter der Ionisierung und massenspektrometrischen Detektion (TQD-MS).

Steuerung/Daten	MassLynx 4.1 Software	<u>Übergänge des SRM-Modus:</u>
Polarität	Negativ	m/z 577→289, 407, 425, 451
Source Type	ESI	m/z 865→287, 289, 575, 577, 695, 739
		Extractor Voltage 2,0 V
<u>Produktionenscan:</u>		RF Voltage 0,2 V
Collision Gas	0,3 mL/min, Argon	Desolvation Temperature 450 °C
Collision Energy	20 und 40 V	Cone Gas 50 L/h, Stickstoff
		Desolvation Gas 800 L/h, Stickstoff

4.3.7 Kapillarelektrophorese

Die kapillarelektrophoretischen Analysen erfolgten mit einem P/ACE MDQ der Firma Beckman Coulter (Unterschleißheim, Deutschland), ausgestattet mit einem Diodenarray-Detektor (Scanbereich 190-600 nm). Zur Steuerung und Datenauswertung wurde Version 7.0 der Software „32 Karat“ von Beckman Coulter verwendet.

4.3.7.1 Enantiomerentrennung der Catechine in Kakao und Kakaoprodukten

Kapillare	Fused Silica, 75 µm Innendurchmesser
Kapillarlänge	Gesamtlänge: 70 cm, Effektivlänge 60 cm
Puffersystem	Borat 200 mM/L, pH 8,5
Chiraler Selektor	Hydroxypropyl-γ-Cyclodextrin 15 mM/L
Kapillartemperatur	18 °C
Kapillare spülen, vorbereiten der Messung	NaOH: 20 psi/3 min, Puffer in die Kapillare füllen: 20 psi/5 min
Injektion	hydrodynamisch: 0,5 psi/5 s
Trennspannung	normal (+ → -): 22 kV, mit Spannungsaufbau in 0,3 min
Trennzeit	18 min
Detektionswellenlänge	280 nm
Ablauf der Methode	-Kapillare spülen, vorbereiten der Messung - Kapillar-Inlet in bidest. Wasser tauchen – Injektion - Kapillar-Inlet in bidest. Wasser tauchen - Trennung

Das Puffersystem inklusive chiraalem Selektor wird vor der Verwendung filtriert (0,45 µm Cellulose Spritzenfilter).

4.3.7.2 Diastereomerentrennung der Flavanonglykoside in Orangenprodukten

Kapillare	Fused Silica, 50 µm Innendurchmesser
Kapillarlänge	Gesamtlänge: 115 cm, Effektivlänge 105 cm
Puffersystem	Borat 500 mM/L, pH 9,0
Chirale Selektoren	Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin 15 mM/L, Carboxymethyl-γ-Cyclodextrin 15 mM/L
Kapillartemperatur	15 °C
Kapillare spülen, vorbereiten der Messung	NaOH: 20 psi/2 min, Puffer in die Kapillare füllen: 20 psi/8 min
Injektion	hydrodynamisch: 0,5 psi/5 s
Sample Stacking zur Aufkonzentrierung der Probe	Injektion von Puffer: 0,5 psi/5 s, Spannung: umgekehrt (- → +): 5 kV/0,4 min, mit Spannungsaufbau in 0,17 min
Trennspannung	normal (+ → -): 30 kV, mit Spannungsaufbau in 0,3 min
Trennzeit	70 min
Detektionswellenlänge	210 nm
Ablauf der Methode	-Kapillare spülen, vorbereiten der Messung - Kapillar-Inlet in bidest. Wasser tauchen - Injektion - Kapillar-Inlet in bidest. Wasser tauchen - Sample Stacking - Trennung

Das Puffersystem inklusive chiraalem Selektor wird vor der Verwendung filtriert (0,45 µm Cellulose Spritzenfilter).

Anhang

A1: Literaturübersicht phenolischer Verbindungen in Kakao

Substanz	Literaturquellen
Monomere Flavanole	
Epicatechin	Griffiths, 1958; Jalal und Collin, 1977; Kim und Keeney, 1984; Porter et al., 1991; Rohan, 1958
Catechin	., 2009; Jalal und Collin, 1977; Porter et al., 1991; Rohan, 1958
Epigallocatechin	., 2009; Forsyth, 1955; Griffiths, 1960; Mazor Jolić et al., 2011; Mursu et al., 2004; Ortega et al., 2008; Rohan, 1958; Tokusoglu und Ünal, 2002
Gallocatechin	Forsyth, 1955; Griffiths, 1960; Mursu et al., 2004; Radojic Redovnikovic et al., 2009; Rohan, 1958
Epicatechingallat	Mursu et al., 2004; Taubert et al., 2007b; Tokusoglu und Ünal, 2002
Catechingallat	Mursu et al., 2004
Epigallocatechingallat	Mursu et al., 2004; Tokusoglu und Ünal, 2002
B-Typ Procyanidine	
Procyanidin B1	., 2009; Mazor Jolić et al., 2011; Porter et al., 1991; Tomás-Barberán et al., 2007
Procyanidin B2	., 2009; Hatano et al., 2002; Mazor Jolić et al., 2011; Porter et al., 1991; Tomás-Barberán et al., 2007
Procyanidin B3	Borchers et al., 2000
Procyanidin B4	Borchers et al., 2000; Mursu et al., 2004
Procyanidin B5	Hatano et al., 2002; Porter et al., 1991
Procyanidin C1	., 2009; Hatano et al., 2002; Porter et al., 1991
Procyanidin D	Hatano et al., 2002
Procyanidin Pentamere bis Pentadecamere,	Chromatographie mit NP-LC: Kelm et al., 2006; Ortega et al., 2008; Pereira-Caro et al., 2013; Chromatographie mit RP-LC, bis Hexamere: Tomás-Barberán et al., 2007; Wollgast, 2005
A-Typ Procyanidine	
Procyanidin A1	Hatano et al., 2002
Procyanidin A2	Hatano et al., 2002
Bis Hexamere, mit jeweils einer A-Typ Verknüpfung	Chromatographie mit NP-LC: Pereira-Caro et al., 2013
Procyanidin Gallate	
Procyanidin Dimergallat	Taubert et al., 2007b
Procyanidin Trimergallat	Taubert et al., 2007b
Flavanolglykoside	
Epicatechin-8-C-galactosid	Hatano et al., 2002
(Epi)catechin-C-hexoside, 6 Isomere	Stark und Hofmann, 2006
(Epi)catechin-6-C,8-C-dihexoside, 4 Isomere	Stark und Hofmann, 2006
Procyanidin A-Typ Dimer-galactosid	Hatano et al., 2002; Porter et a., 1991
Procyanidin A-Typ Dimer-arabinosid	Hatano et al., 2002
Procyanidin A-Typ Trimer-arabinosid	Hatano et al., 2002
Procyanidin A-Typ Trimer-galactosid	Hatano et al., 2002

Flavonole und Flavonolglykoside	
Kämpferol	Taubert et al., 2007b
Dihydroxykämpferol	Ortega et al., 2008
Quercetin	Andrés-Lacueva et al., 2000; Griffiths, 1958; Ortega et al., 2008; Rohan und Connell, 1964; Taubert et al., 2007b; Tomás-Barberán et al., 2007
Dihydroxyquercetin	Ortega et al., 2008
Isorhamnetin	Taubert et al., 2007b
Myricetin	Ortega et al., 2008; Taubert et al., 2007b
Quercetin-3-O-arabinosid	Sanbongi et al., 1998; Sánchez-Rabaneda et al., 2003; Tomás-Barberán et al., 2007
Quercetin-3-O-glucosid, Isoquercetin	Jalal und Collin, 1977; Ortega et al., 2008; Rohan und Connell, 1964; Sanbongi et al., 1998; Sánchez-Rabaneda et al., 2003
Quercetin-3-O-galactosid, Hyperosid	Jalal und Collin, 1977; Ortega et al., 2008; Sanbongi et al., 1998; Sánchez-Rabaneda et al., 2003
Quercetin-3-O-glucuronid	Andrés-Lacueva et al., 2000; Wollgast, 2005
Quercetinrutinosid	Ortega et al., 2008
Kämpferol-3-O-glucosid	Andrés-Lacueva et al., 2000
Kämpferolrutinosid	Ortega et al., 2008; Pereira-Caro et al., 2013
Myricetinglucosid	Ortega et al., 2008
Isorhamnetin-3-O-glucosid	Andrés-Lacueva et al., 2000
Flavone und Flavonglykoside	
Apigenin	Ortega et al., 2008; Sánchez-Rabaneda et al., 2003; Taubert et al., 2007b
Luteolin	Ortega et al., 2008; Sánchez-Rabaneda et al., 2003
Apigenin-6-C-glucosid, Isovitexin	Sánchez-Rabaneda et al., 2003
Apigenin-8-C-glucosid, Vitexin	Sánchez-Rabaneda et al., 2003
Apigenin-7-O-glucosid	Jalal und Collin, 1977
Luteolin-3-O-glucosid	Ortega et al., 2008; Stark et al., 2005
Luteolin-7-O-glucosid	Sánchez-Rabaneda et al., 2003
Luteolin-6-C-glucosid, Isoorientin	Sánchez-Rabaneda et al., 2003
Luteolin-8-C-glucosid, Orientin	Sánchez-Rabaneda et al., 2003
Flavanone und Flavanoglykoside	
Naringenin	Ortega et al., 2008; Sánchez-Rabaneda et al., 2003
Naringenin-7-O-glucosid, Prunin	Sánchez-Rabaneda et al., 2003; Stark et al., 2005
Naringenin-7-O-galactosid	Stark et al., 2006a
Anthocyane	
Cyanidinpentosid	Cakirer, 2003
Cyanidin-3-O-arabinosid	Forsyth und Quesnel, 1957; Griffiths, 1958; Rohan, 1958
Cyanidin-3-O-galactosid	Forsyth und Quesnel, 1957; Griffiths, 1958; Rohan, 1958
Cyanidindiglykosid	Rohan, 1958
Cyanidinrutinosid	Cakirer, 2003
N-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren	
<i>trans</i> -Kaffeesäurespartat	Pereira-Caro et al., 2013; Stark und Hofmann, 2005; Stark et al., 2008; Tomás-Barberán et al., 2007
<i>cis</i> -Kaffeesäurespartat	Tomás-Barberán et al., 2007
<i>trans</i> -Kaffeesäureglutamat	Stark und Hofmann, 2005; Stark et al., 2008
<i>trans</i> -Kaffeesäuretyrosin	Stark und Hofmann, 2005; Stark et al., 2006b; Stark et al., 2008; Tomás-Barberán et al., 2007; Wollgast, 2005
<i>trans</i> -Kaffeesäurehydroxytyrosin, Clovamid	Arlorio et al., 2008; Pereira-Caro et al., 2013; Sanbongi et al., 1998; Stark und Hofmann, 2005; Stark et al., 2006b; Tomás-Barberán et al., 2007

Anhang

<i>trans</i> -Kaffeesäuretryptophan	Stark et al., 2006b; Stark et al., 2008
<i>trans</i> -p-Coumarsäureaspartat	Pereira-Caro et al., 2013; Stark und Hofmann, 2005; Stark et al., 2006b; Stark et al., 2008; Tomás-Barberán et al., 2007
<i>trans</i> -p-Coumarsäureglutamat	Stark und Hofmann, 2005; Stark et al., 2008
<i>trans</i> -p-Coumarsäuretyrosin	Pereira-Caro et al., 2013; Sanbongi et al., 1998; Stark und Hofmann, 2005; Stark et al., 2006b; Stark et al., 2008; Tomás-Barberán et al., 2007
<i>trans</i> -p-Coumarsäurehydroxytyrosin, Deoxyclovamid	Stark und Hofmann, 2005; Stark et al., 2008; Wollgast, 2005
<i>trans</i> -p-Coumarsäuretryptophan	Stark et al., 2006b; Stark et al., 2008
<i>trans</i> -Ferulasäureaspartat	Stark und Hofmann, 2005; Stark et al., 2006b; Stark et al., 2008
<i>trans</i> -Ferulasäuretyrosin	Stark et al., 2006b; Stark et al., 2008
<i>trans</i> -Ferulasäuretryptophan	Stark et al., 2006b
<i>trans</i> -Zimtsäureaspartat	Stark und Hofmann, 2005; Stark et al., 2008

Stilbene

<i>trans</i> -Resveratrol	Counet et al., 2006; Hurst et al., 2008; Jerkovic et al., 2010
<i>trans</i> -Piceid	Counet et al., 2006; Hurst et al., 2008; Jerkovic et al., 2010
<i>trans</i> -Resveratrolhexosid	Jerkovic et al., 2010

Phenolcarbonsäuren

Phenylelessigsäure	Quesnel, 1965
Hydroxybenzoesäure	Ortega, et al., 2008; Quesnel, 1965
Zimtsäure	Ortega, et al., 2008
p-Hydroxyphenylelessigsäure	Quesnel, 1965
o-Hydroxyphenylelessigsäure	Quesnel, 1965
Protocatechusäure	Ortega, et al., 2008; Quesnel, 1965
p-Coumarsäure	Griffiths, 1958; Jalal und Collin, 1977; Ortega, et al., 2008; Rohan und Connell, 1964
Phloretinsäure	Quesnel, 1965
Vanillinsäure	Ortega, et al., 2008; Quesnel, 1965
Gallussäure	Borchers et al., 2000; Taubert et al., 2007b; Tokusoglu und Ünal, 2002
Kaffeesäure	Griffiths, 1958; Ortega, et al., 2008; Rohan und Connell, 1964
Chinasäure	Elwers, 2008
Ferulasäure	Ortega, et al., 2008; Quesnel, 1965
Syringasäure	Ortega, et al., 2008; Quesnel, 1965
Chlorogensäure	Jalal und Collin, 1977; Ortega, et al., 2008; Rohan und Connell, 1964
Neochlorogensäure	Rohan, 1958; Rohan und Connell, 1964
Kaffeoylchinasäure	Jalal und Collin, 1977
p-Coumaroylchinasäure	Griffiths, 1958; Jalal und Collin, 1977

A2: Abbildungen – Probenaufarbeitung

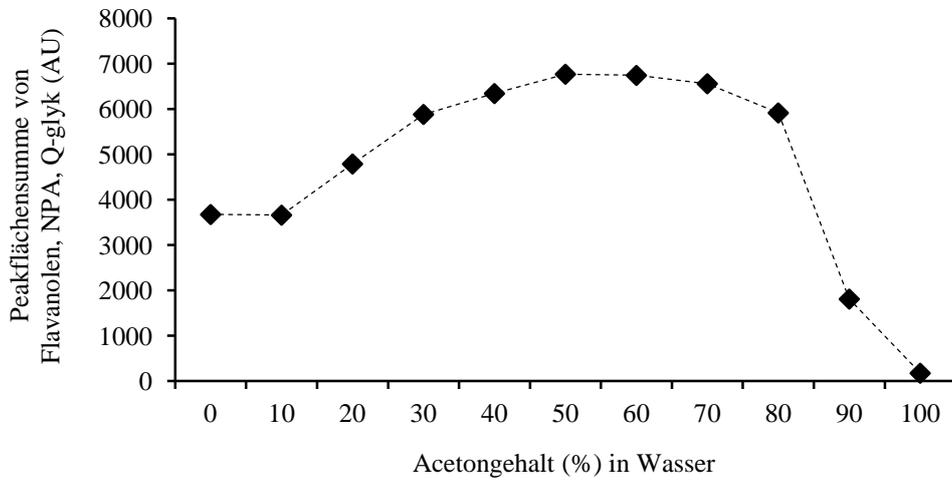


Abbildung A 1: Summierte Peakflächen von Flavanolen, *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetinglykosiden der Aceton-Wasser-Mischungen.

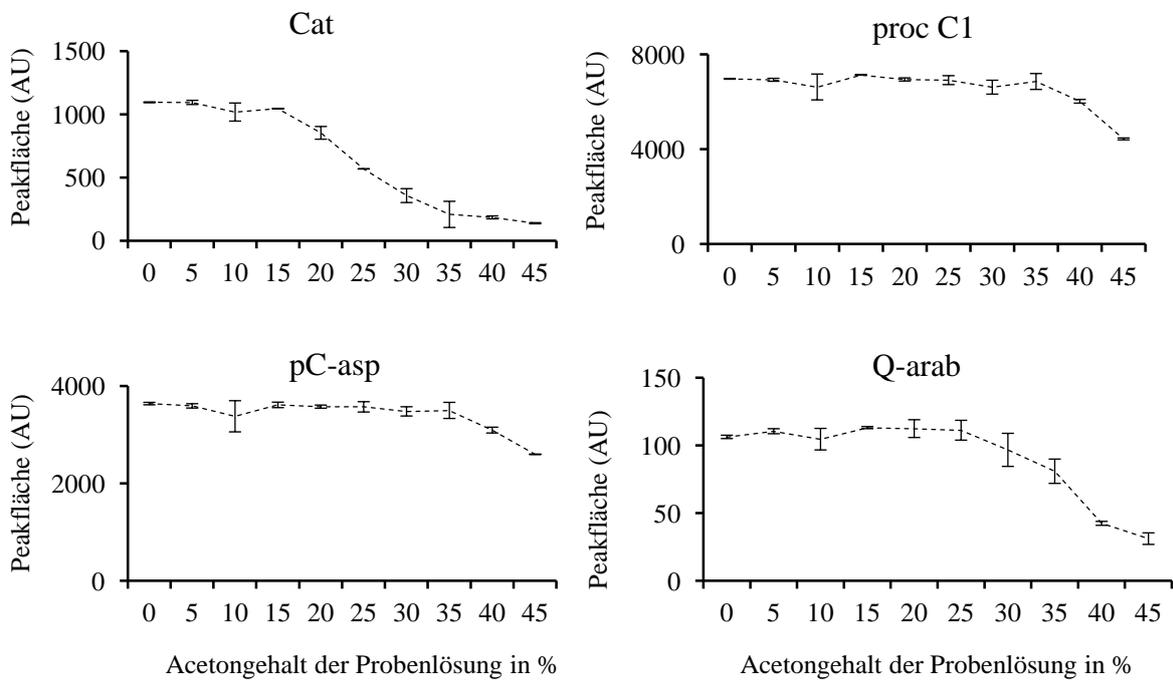


Abbildung A 2: Extraktgehalte von Cat, proc C1, pC-asp und Q-arab, in Abhängigkeit des Acetongehaltes der Probenlösung.

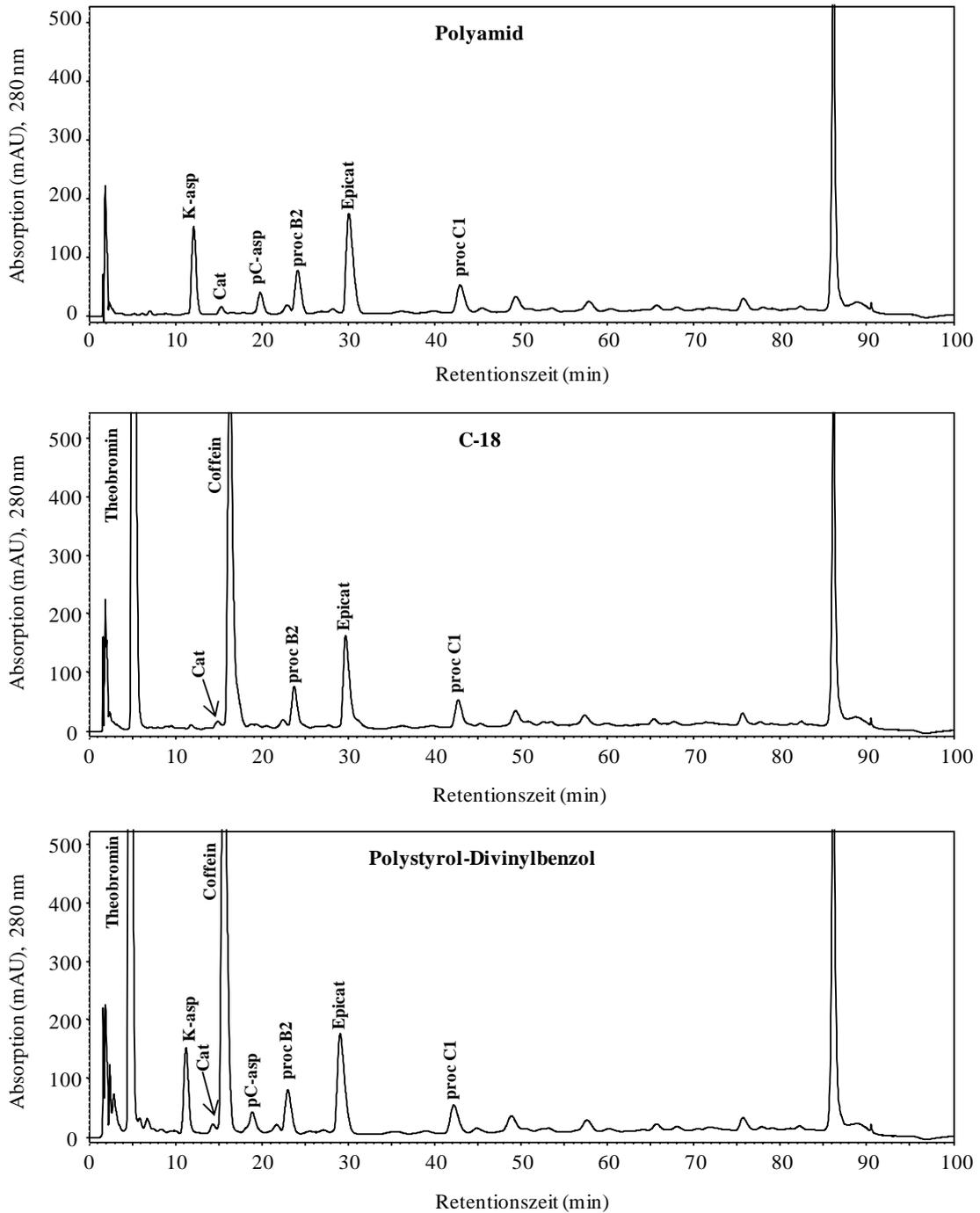


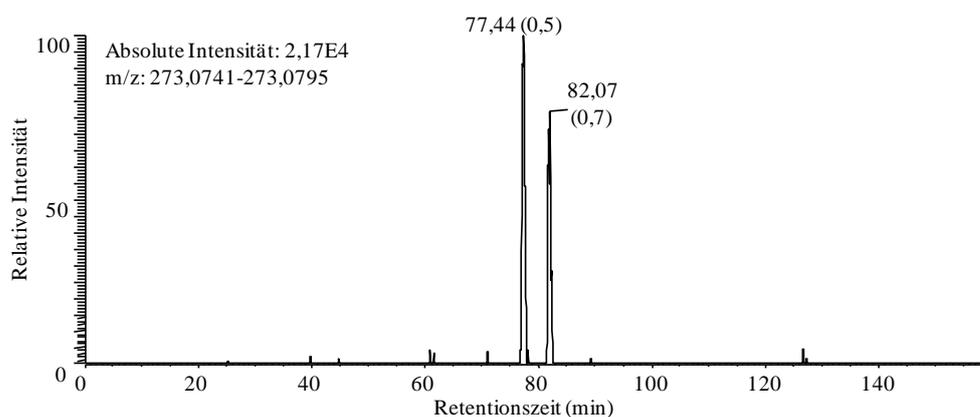
Abbildung A 3: Elutionsprofile verschiedener SPE-Kartuschenmaterialien eines Extraktes der fermentierten Kakaobohnen Java1 (Elutionsmittel: DMSO/HCOOH; 99,9/0,1; v+v).

A3: FT-ICR-MS Massenspuren

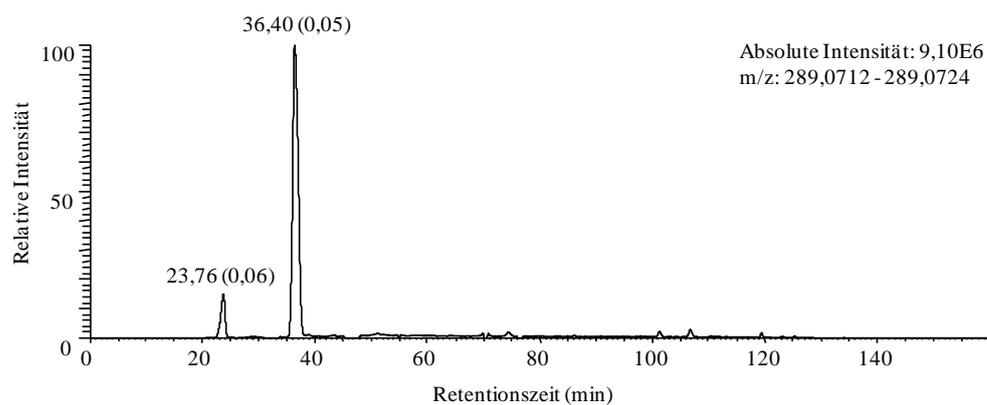
Die Darstellung der Massenspuren erfolgt mit Retentionszeiten und ppm-Abweichung in Klammern des jeweiligen Peaks.

Monomere Flavanole

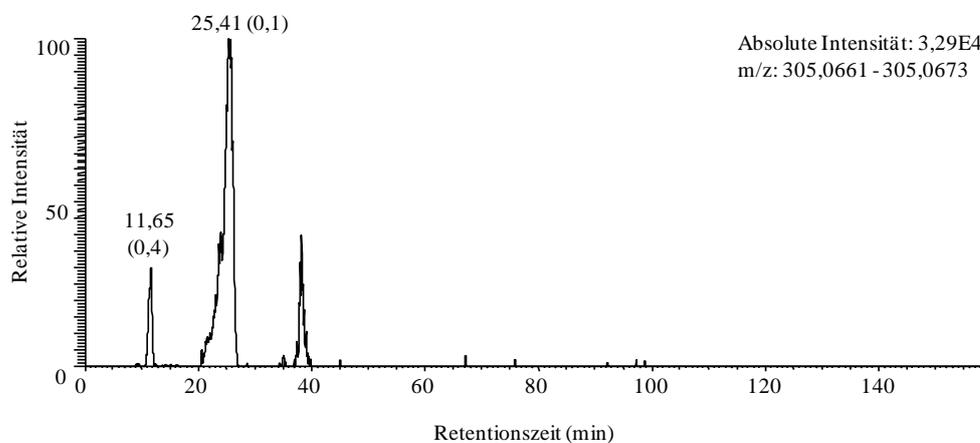
1: (Epi)afzelechine: $[M-H]^-$ 273,0768



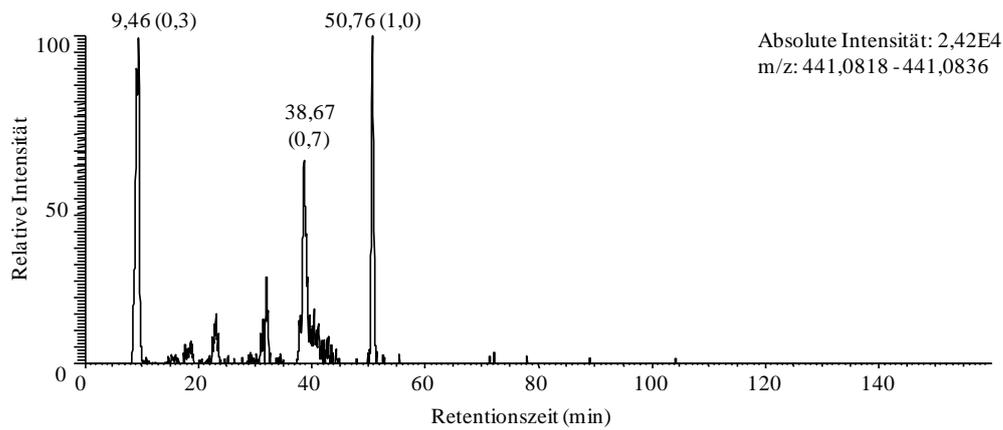
2: (Epi)catechine: $[M-H]^-$ 289,0718



3: (Epi)galocatechine: $[M-H]^-$ 305,0667

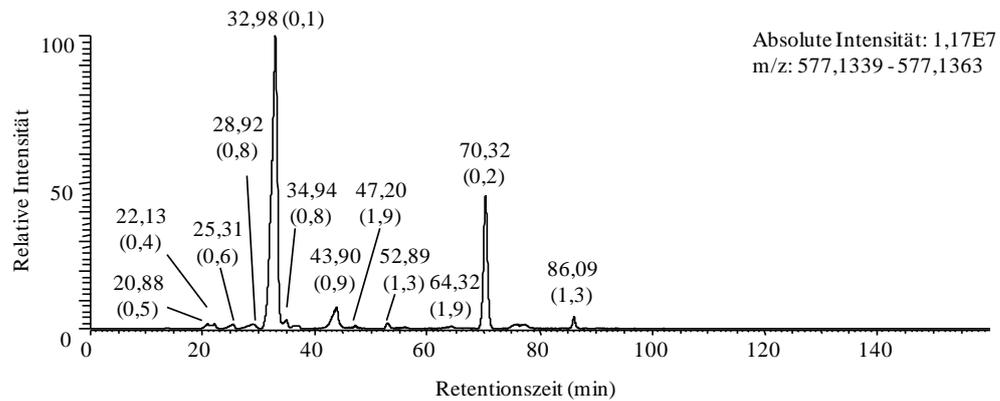


4: (Epi)catechingallate: $[M-H]^-$ 441,0827

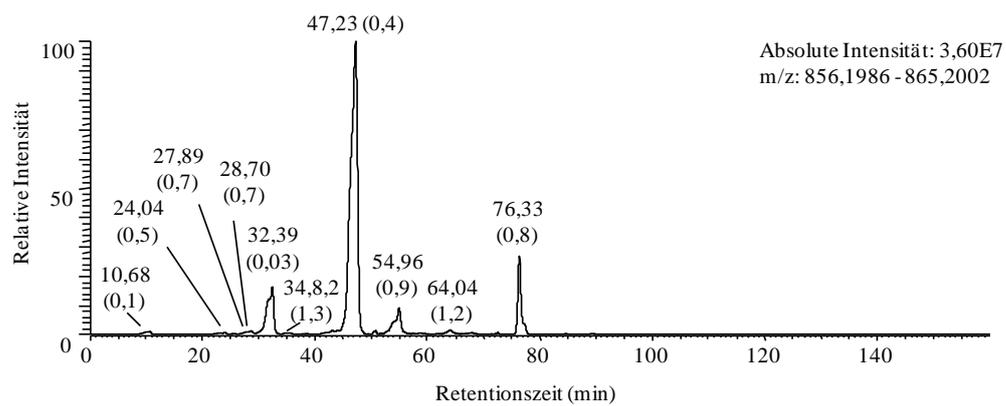


B-Typ Procyanidine

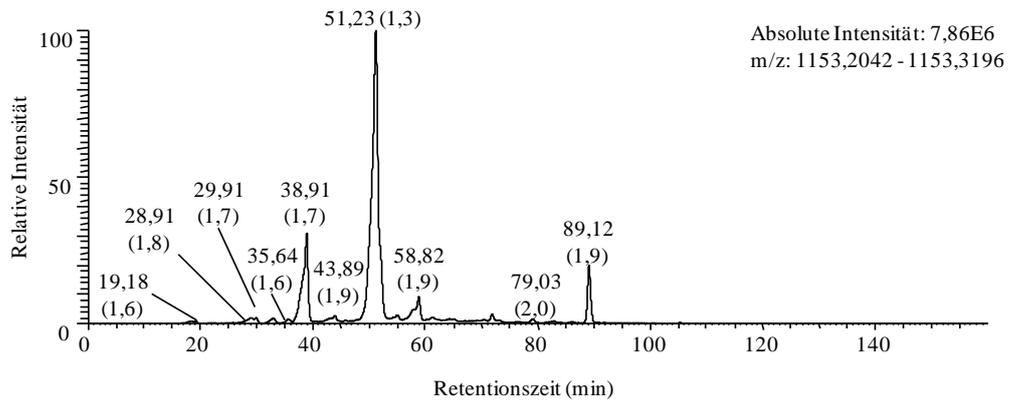
5: Procyanidin B-Typ Dimere: $[M-H]^-$ 577,1351



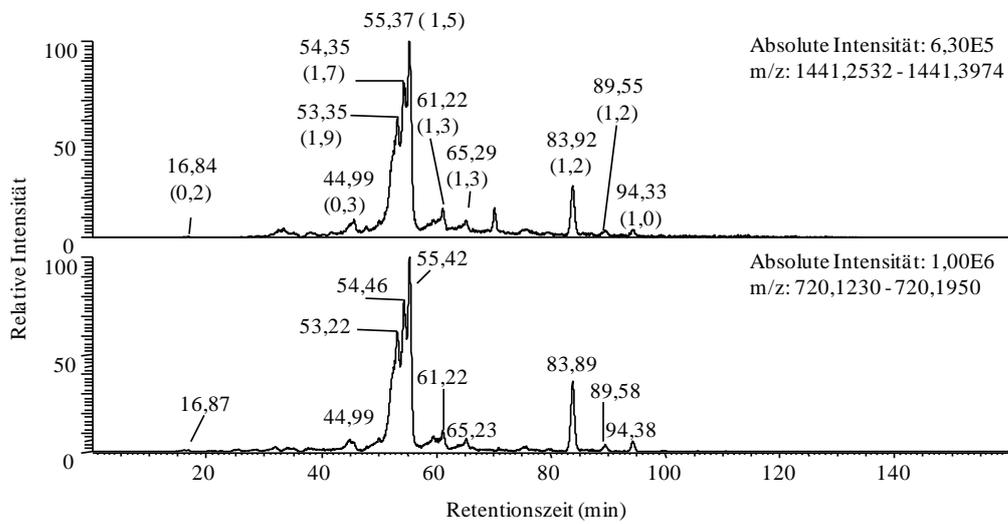
6: Procyanidin B-Typ Trimere: $[M-H]^-$ 865,1985



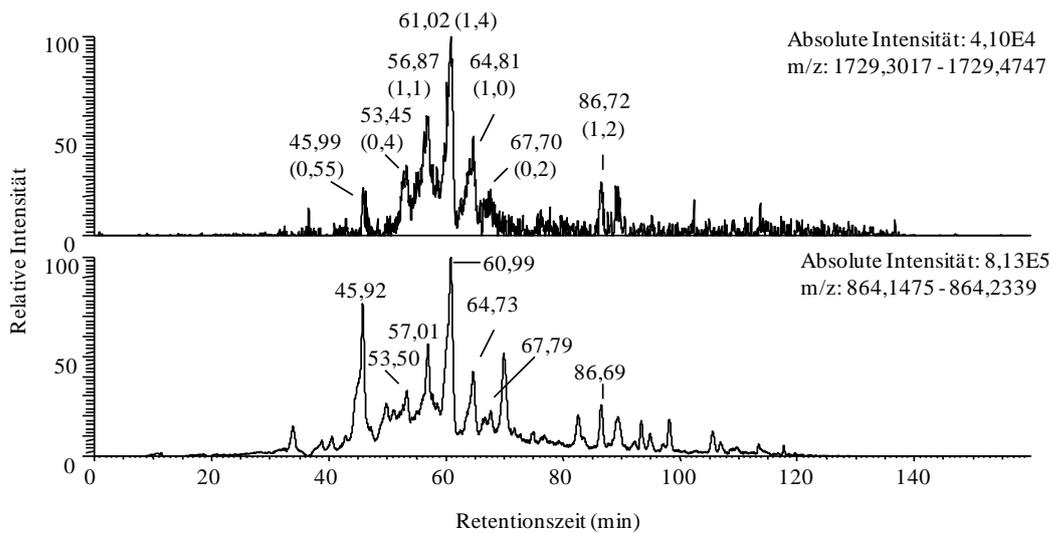
7: Procyanidin B-Typ Tetramere: $[M-H]^-$ 1153,2619



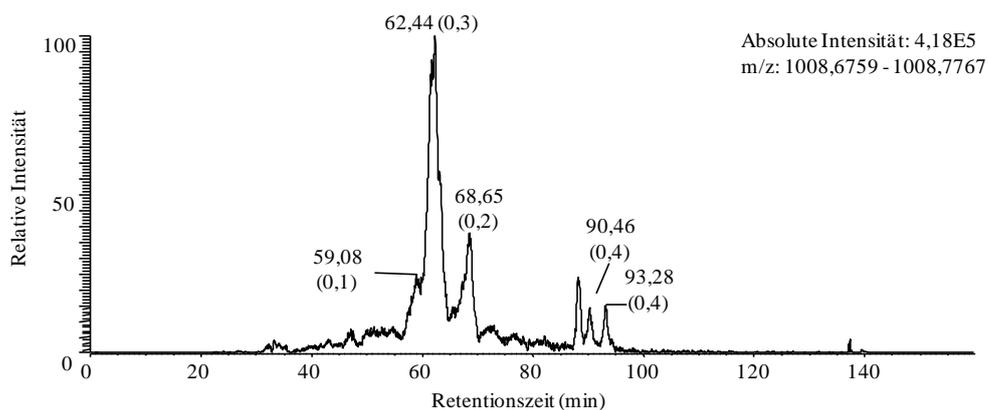
8: Procyanidin B-Typ Pentamere: $[M-H]^-$ 1441,3253; $[M-2H]^{2-}$ 720,1590



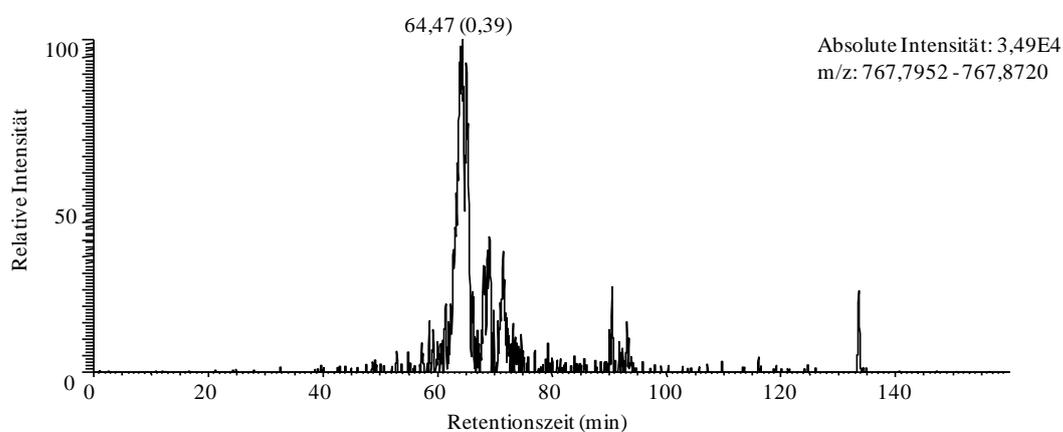
9: Procyanidin B-Typ Hexamere: $[M-H]^-$ 1729,3882; $[M-2H]^{2-}$ 864,1970



10: Procyanidin B-Typ Heptamere: $[M-2H]^{2-}$ 1008,7263

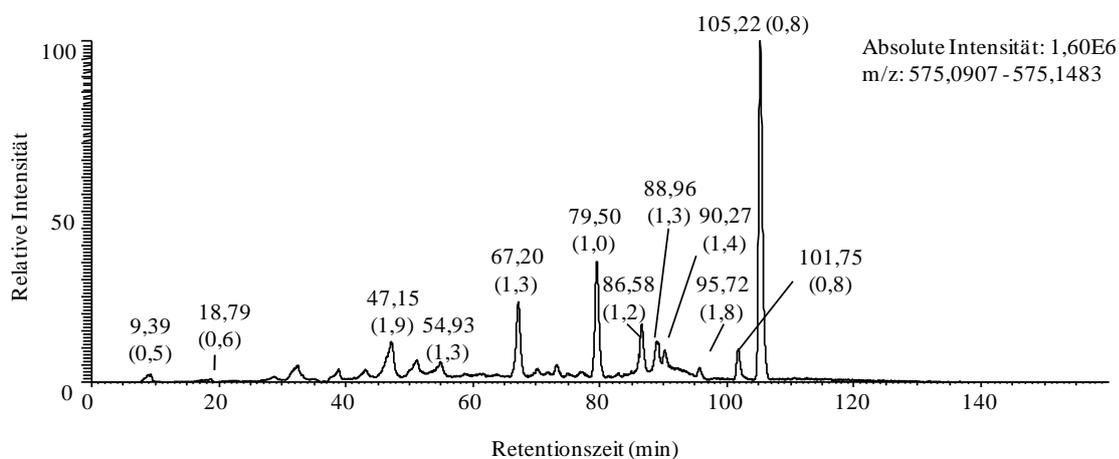


11: Procyanidin B-Typ Octamere: $[M-3H]^{3-}$ 767,8336

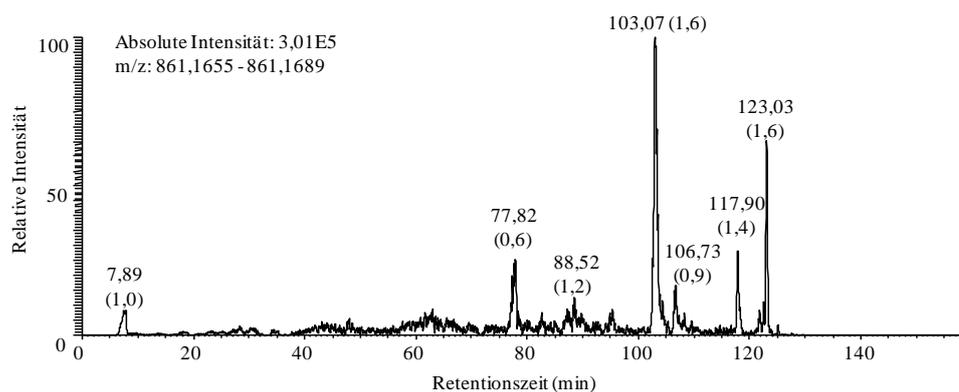


A-Typ Procyanidine

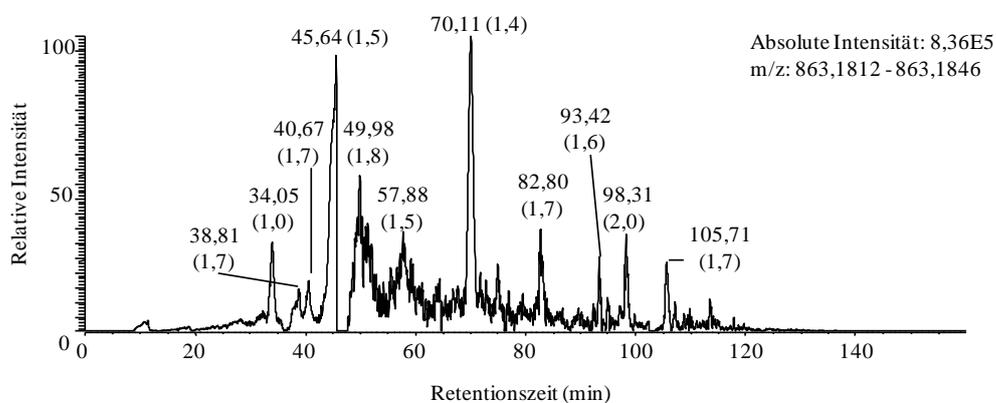
12: Procyanidin A-Typ Dimere: $[M-H]^{-}$ 575,1195



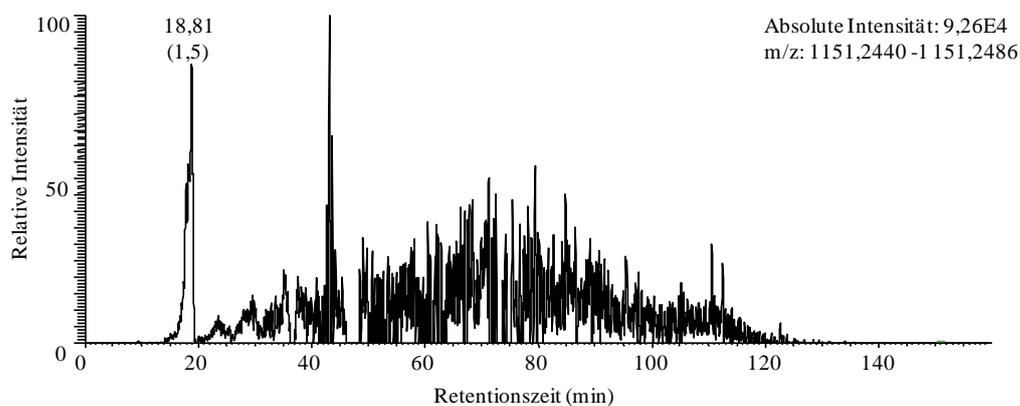
13: Procyanidin A-Typ Trimere, zweimal A-Typ verknüpft: $[M-H]^-$ 861,1672



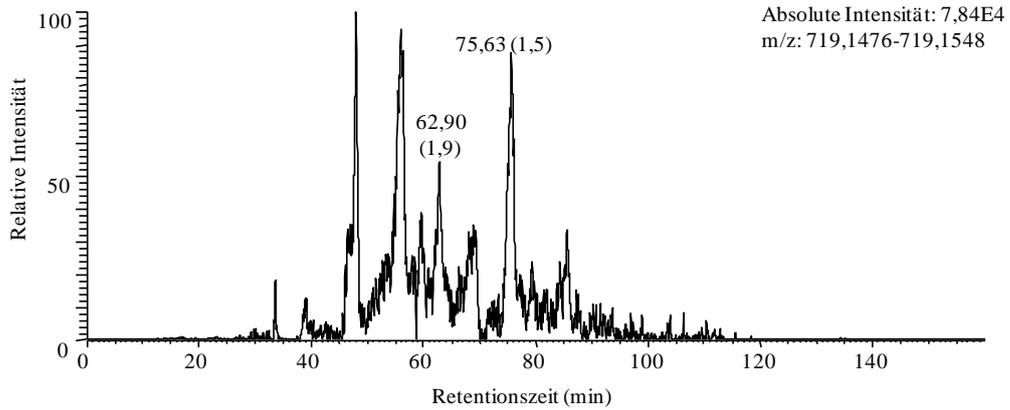
14: Procyanidin A-Typ Trimere, einmal A-Typ verknüpft: $[M-H]^-$ 863,1829



15: Procyanidin A-Typ Tetramere, einmal A-Typ verknüpft: $[M-H]^-$ 1151,2463

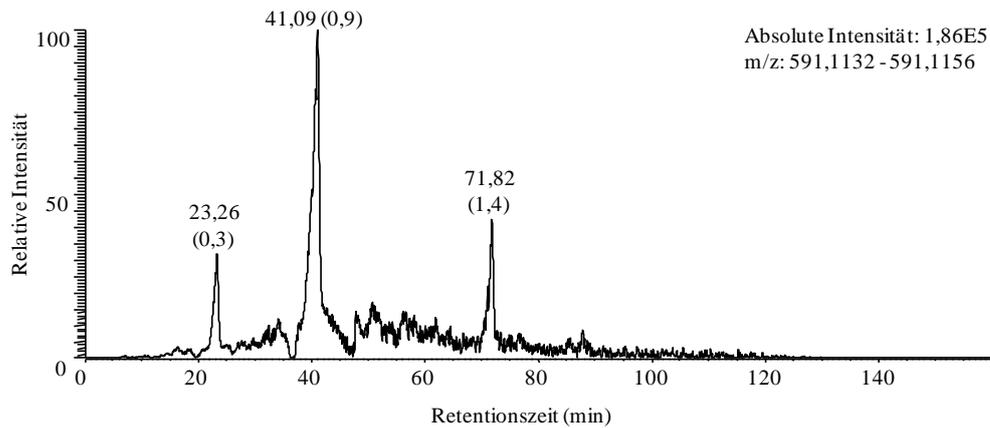


16: Procyanidin A-Typ Pentamere, einmal A-Typ verknüpft: $[M-H]^{2-}/2$ 719,1512

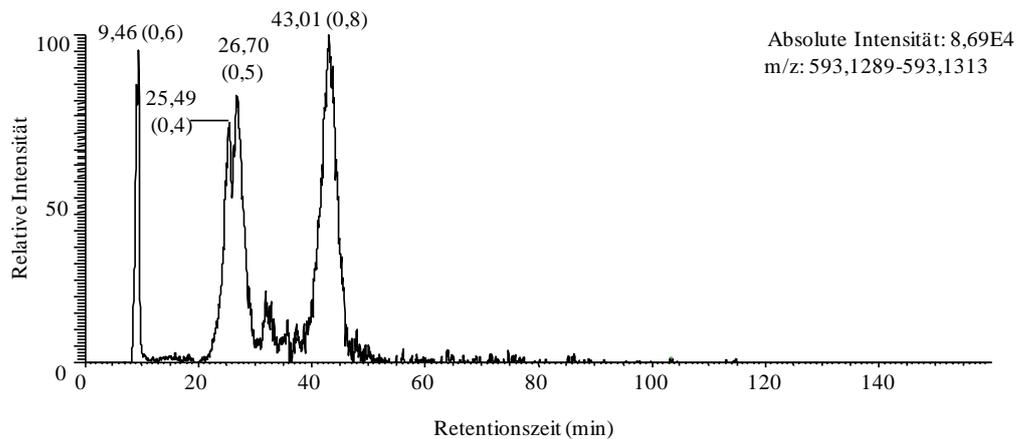


A- und B-Typ Prodelphinidine

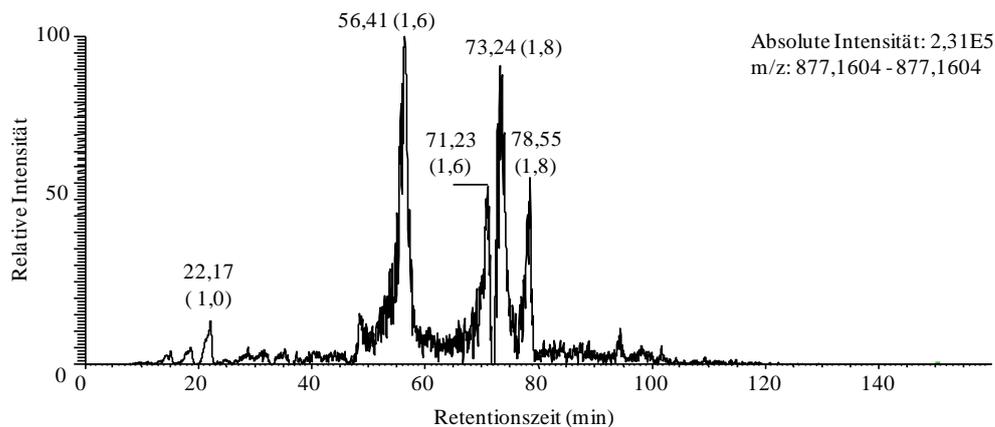
17: Procyanidin A-Typ Dimere, einmal (Epi)gallocatechin: $[M-H]^-$ 591,1144



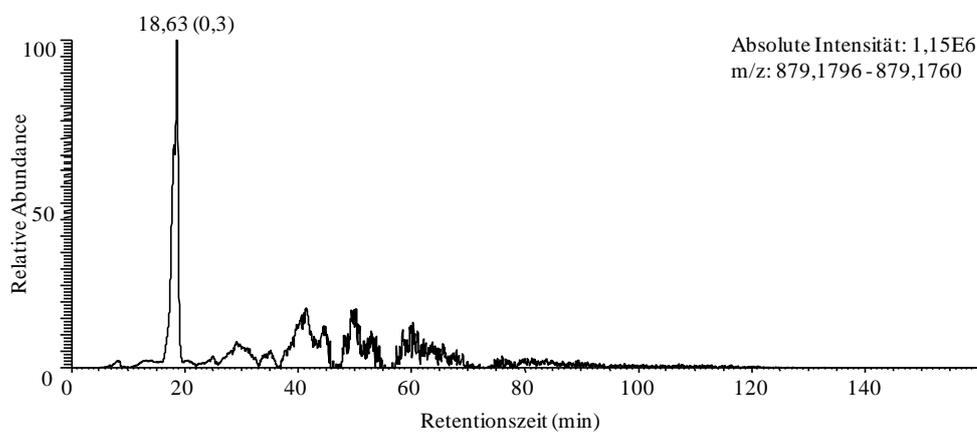
18: Prodelphinidin B-Typ Dimere, einmal (Epi)gallocatechin: $[M-H]^-$ 593,1301



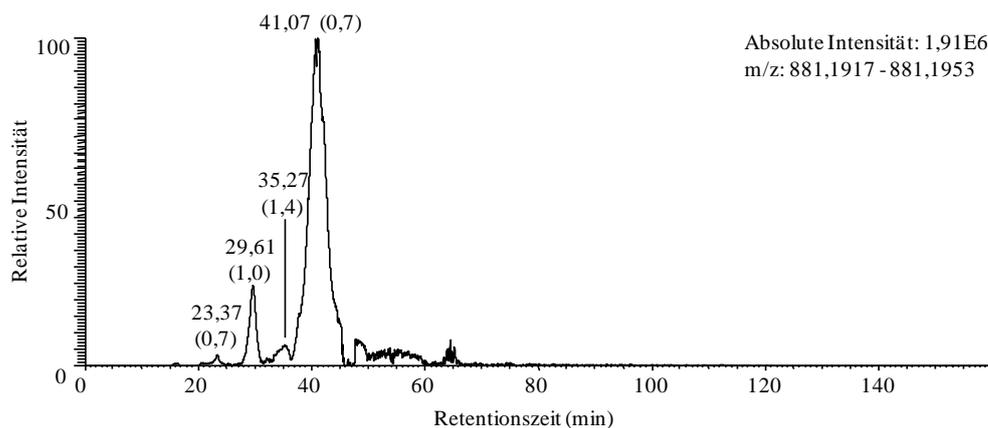
19: Prodelphinidin A-Typ Trimere, einmal (Epi)gallocatechin, zweimal A-Typ verknüpft:
 $[M-H]^-$ 877,1622



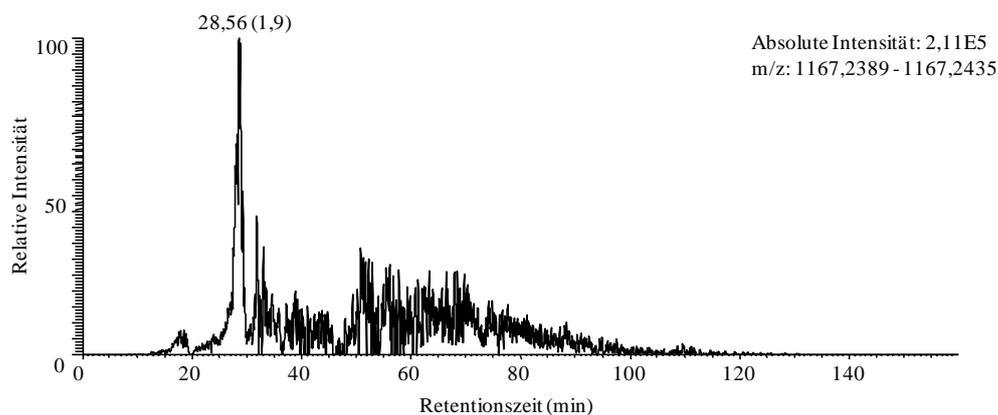
20: Prodelphinidin A-Typ Trimere, einmal (Epi)gallocatechin, einmal A-Typ verknüpft:
 $[M-H]^-$ 879,1778



21: Prodelphinidin B-Typ Trimere, einmal (Epi)gallocatechin: $[M-H]^-$ 881,1935

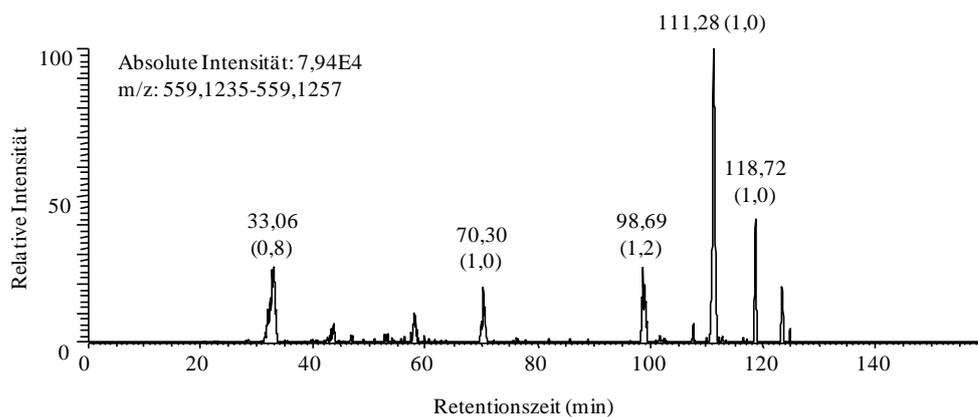


22: Prodelphinidin A-Typ Tetramere, einmal (Epi)galocatechin, einmal A-Typ verknüpft: $[M-H]^-$ 1167,2412

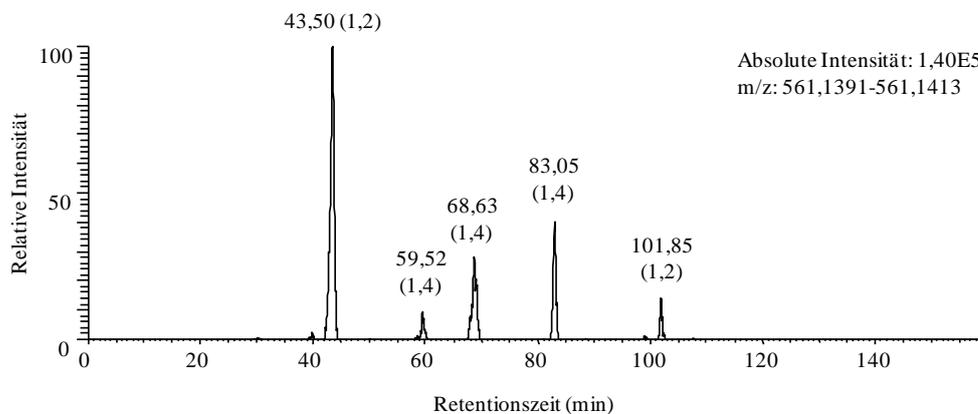


A- und B-Typ Propelargonidine

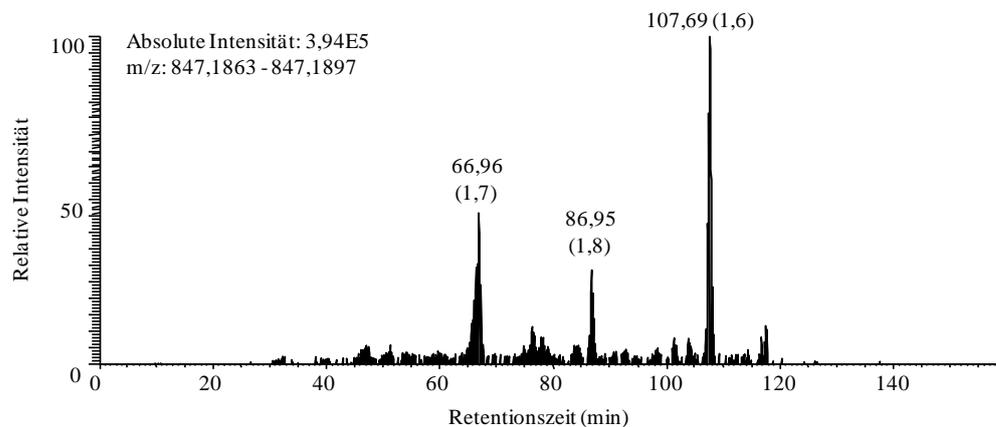
23: Propelargonidin A-Typ Dimere, einmal (Epi)afzelechin, einmal A-Typ verknüpft: $[M-H]^-$ 559,1246



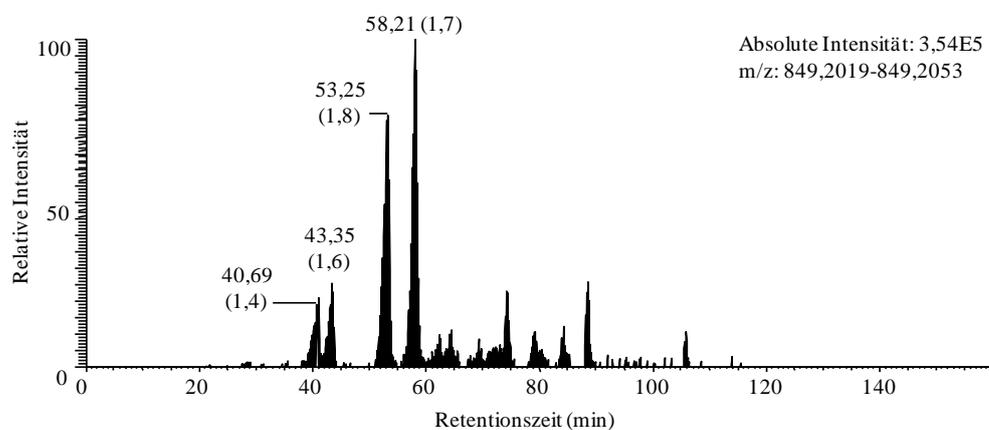
24: Propelargonidin B-Typ Dimere, einmal (Epi)afzelechin: $[M-H]^-$ 561,1402



25: Propelargonidin A-Typ Trimere, einmal (Epi)afzelechin, einmal A-Typ verknüpft: $[M-H]^-$ 847,1880

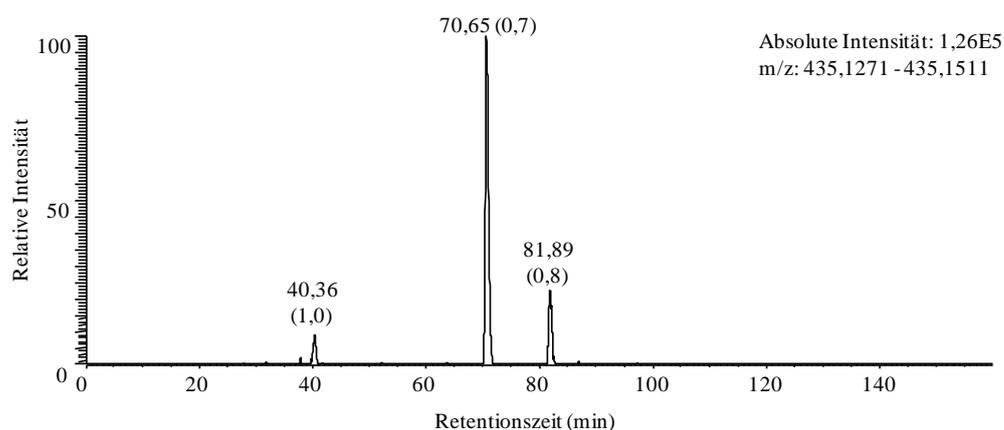


26: Propelargonidin B-Typ Trimere, einmal (Epi)afzelechin: $[M-H]^-$ 849,2036

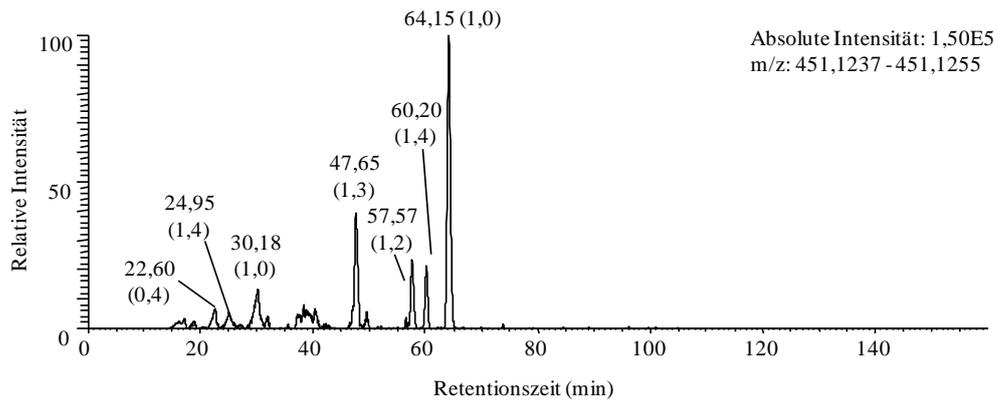


Flavanolglykoside

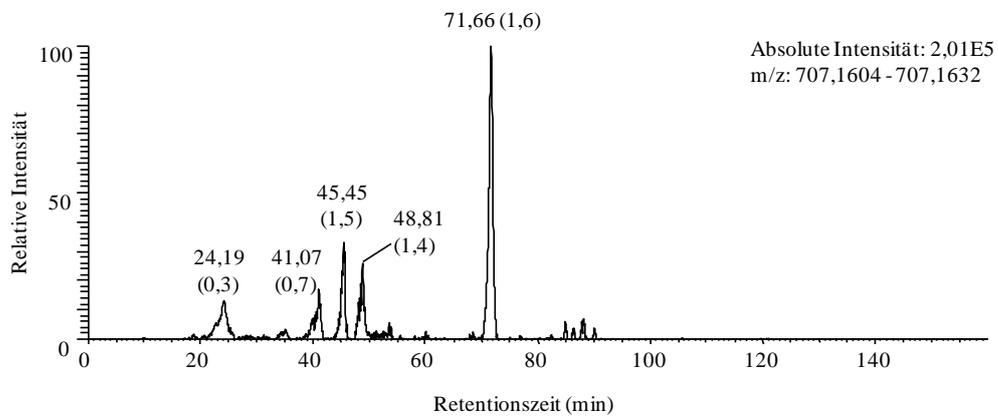
27: (Epi)afzelechinhexoside: $[M-H]^-$ 435,1297



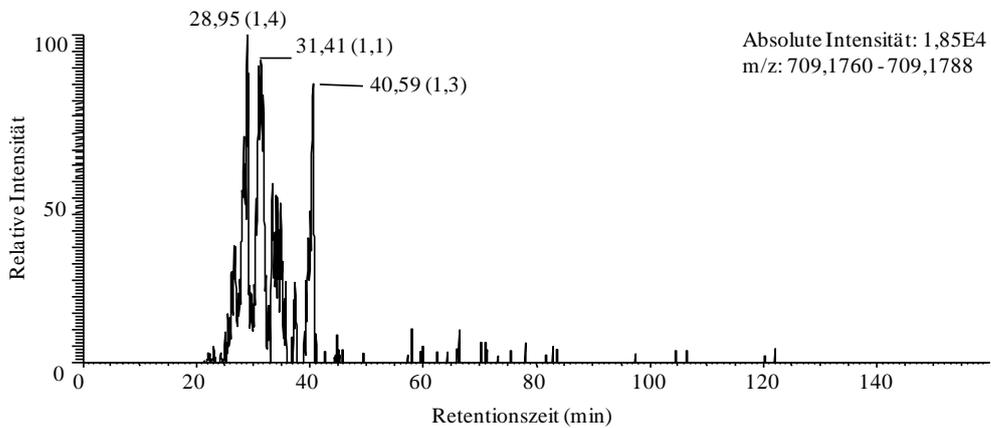
28: (Epi)catechinhexoside: $[M-H]^-$ 451,1246



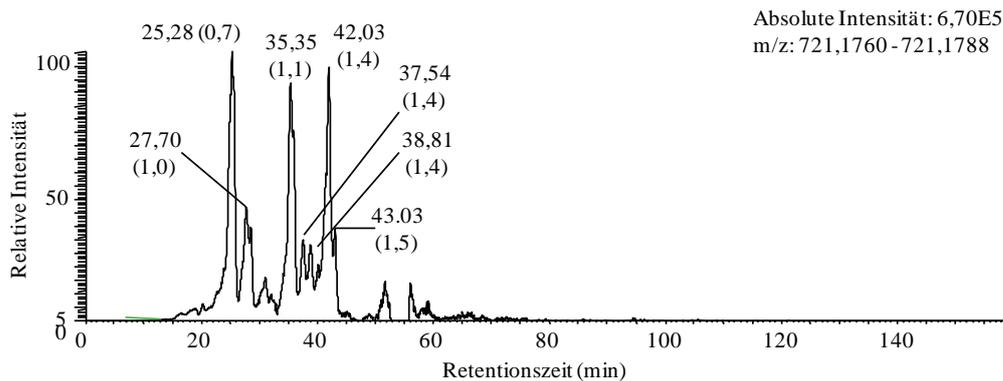
29: Procyanidin A-Typ Dimer-pentose: $[M-H]^-$ 707,1618



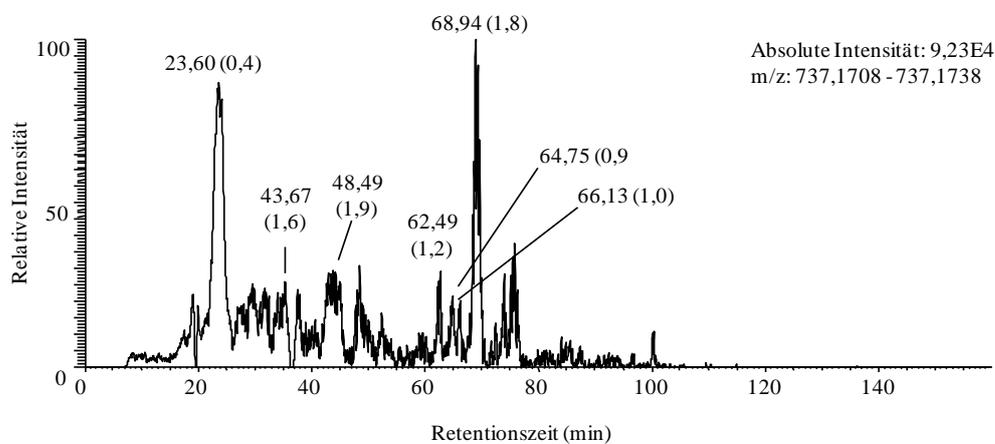
30: Procyanidin B-Typ Dimer-pentose: $[M-H]^-$ 709,1774



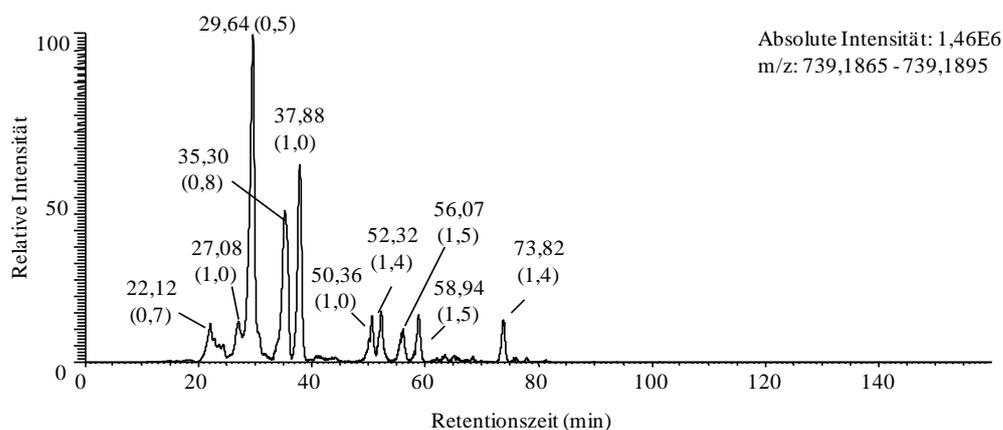
31: Propelargonidin A-Typ Dimer-hexoside: [M-H]⁻ 721,1774



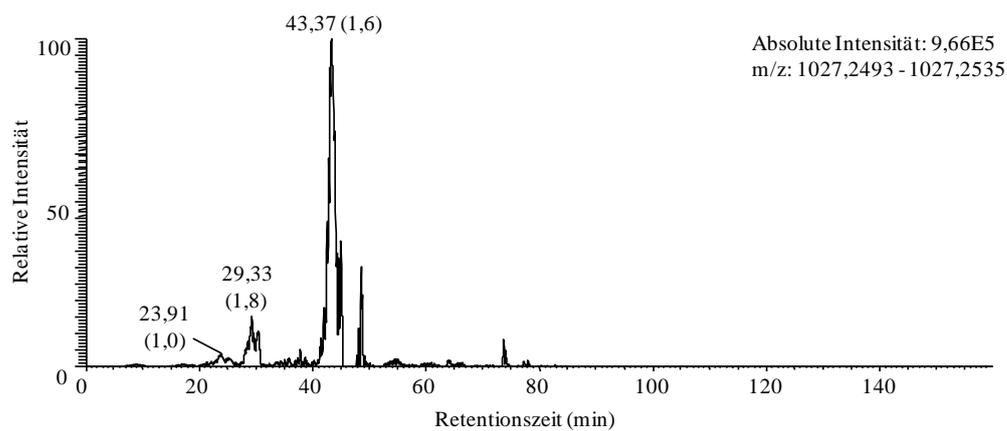
32: Procyanidin A-Typ Dimer-hexoside: [M-H]⁻ 737,1723



33: Procyanidin B-Typ Dimer-hexoside: [M-H]⁻ 739,1880

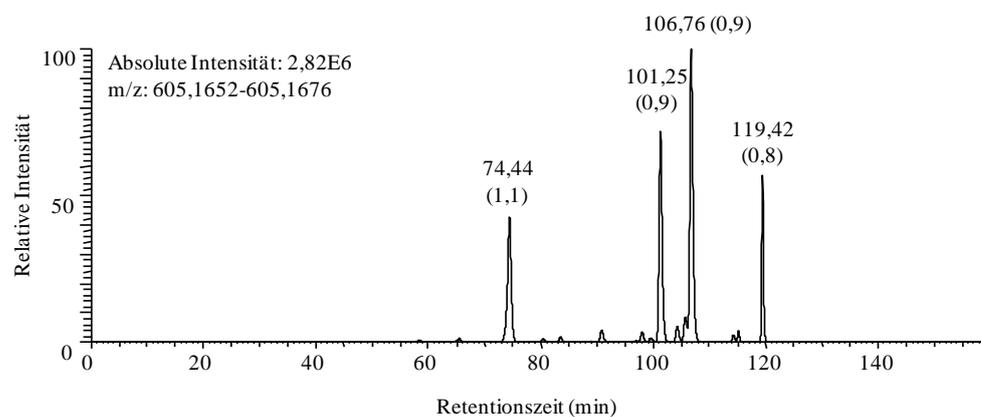


34: Procyanidin B-Typ Trimer-hexoside: $[M-H]^-$ 1027,2514

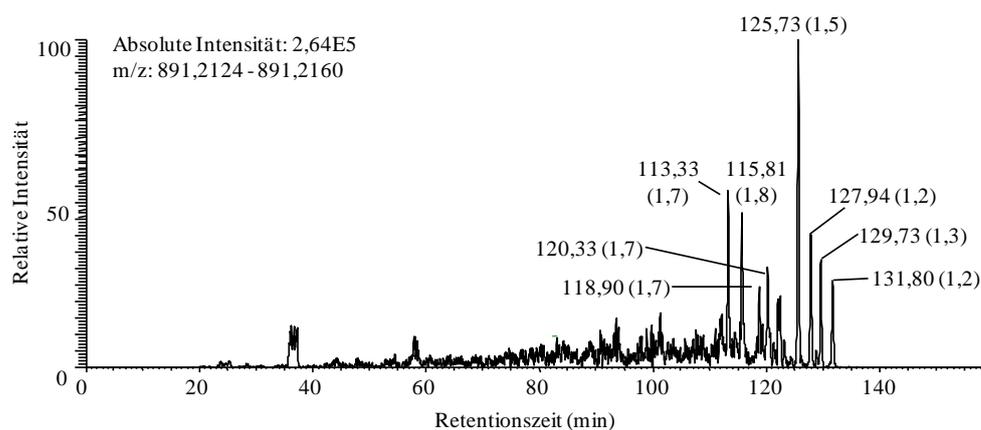


Ethyl(epi)catechine

35: Ethyl(epi)catechin Dimere: $[M-H]^-$ 605,1664

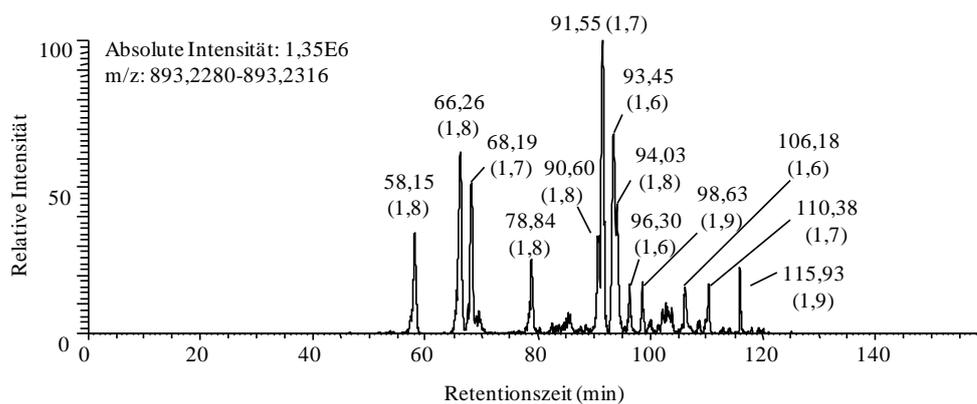


36: Ethyl(epi)catechin A-Typ Trimere: $[M-H]^-$ 891,2142



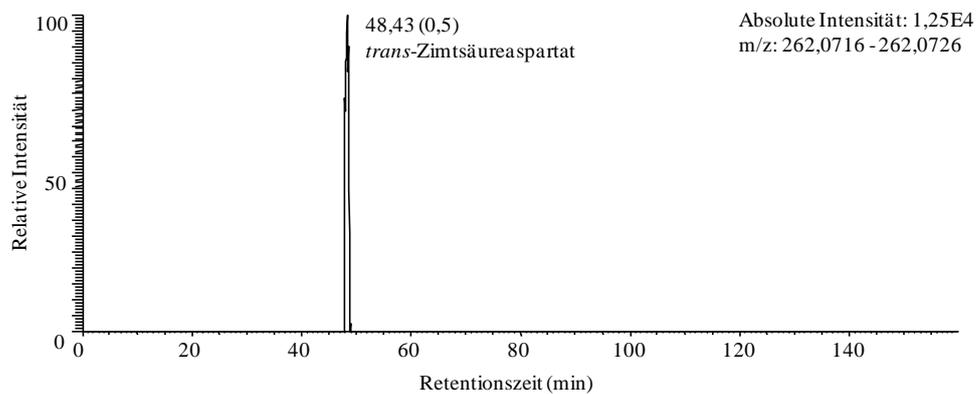
Anhang

37: Ethyl(epi)catechin Trimere: $[M-H]^-$ 893,2298

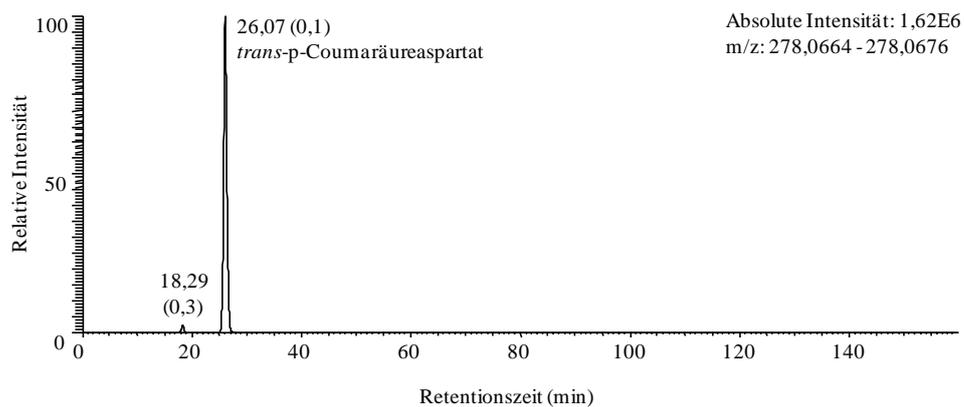


N-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren

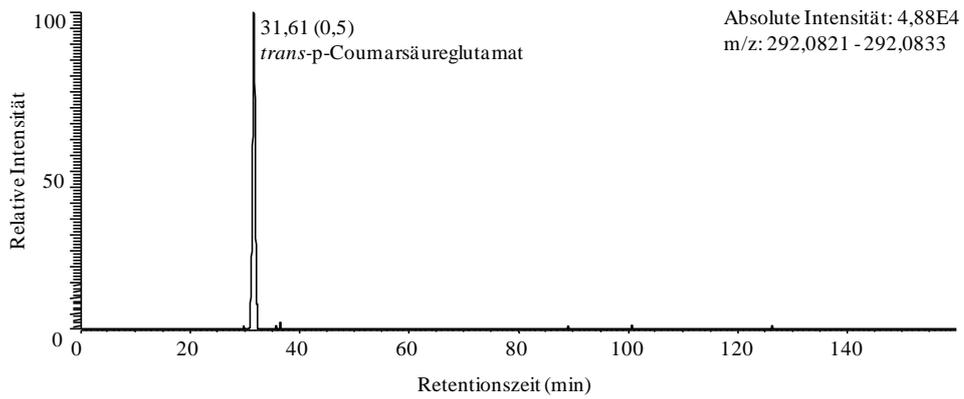
38: Zimtsäureaspartat: $[M-H]^-$ 262,0721



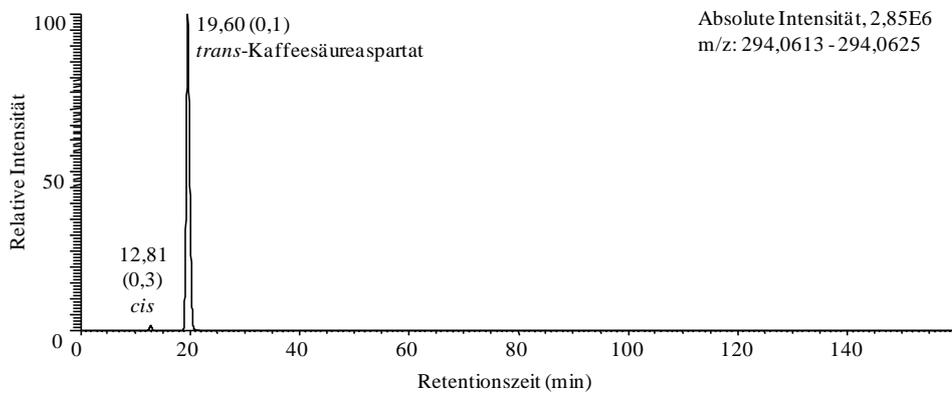
39: p-Coumarsäureaspartat: $[M-H]^-$ 278,0670



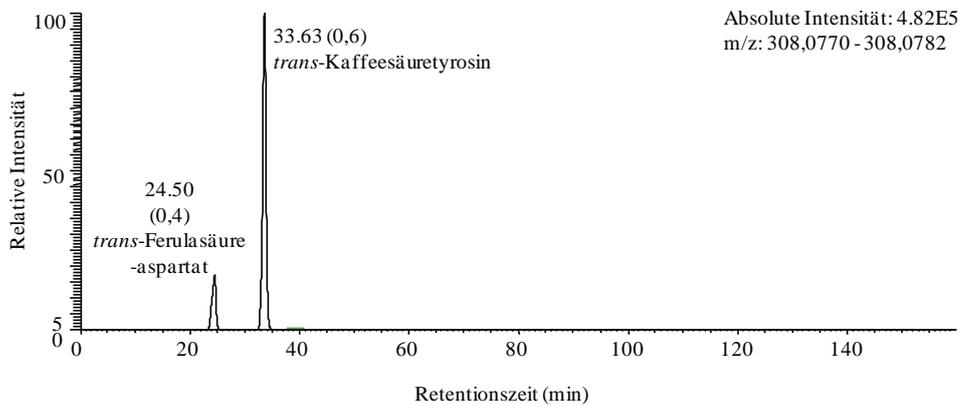
40: p-Coumarsäureglutamat: $[M-H]^-$ 292,0721



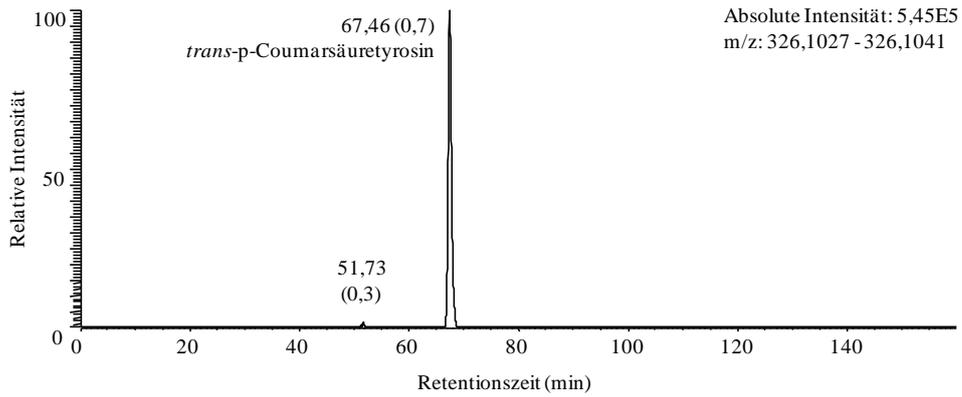
41: Kaffeesäureaspartat $[M-H]^-$ 294,0619



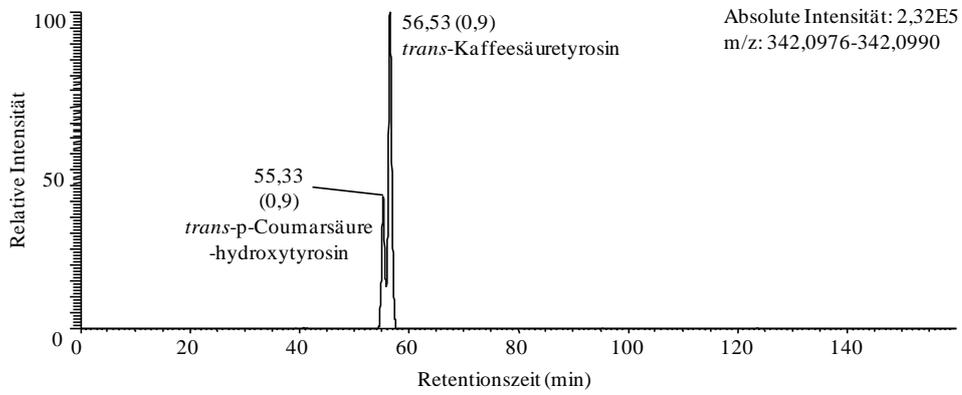
42: Kaffeesäureglutamat und Ferulasäureaspartat: $[M-H]^-$ 308,0776



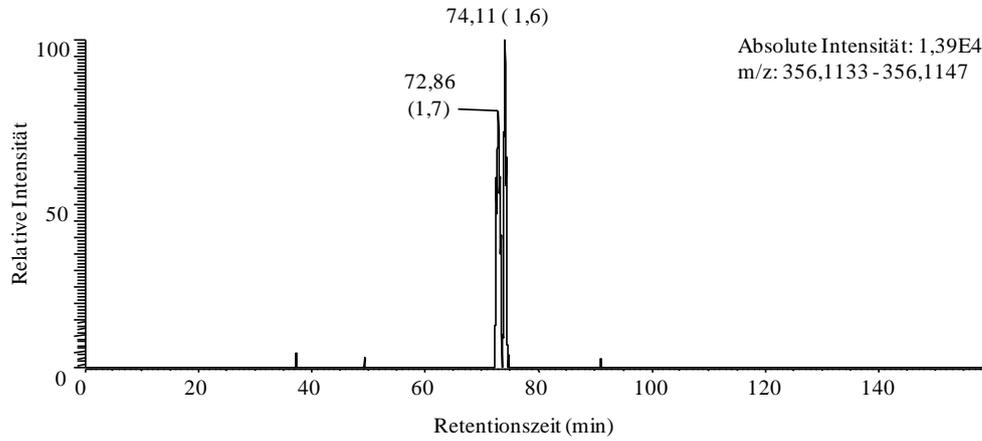
43: p-Coumarsäuretyrosin: $[M-H]^-$ 326,1034



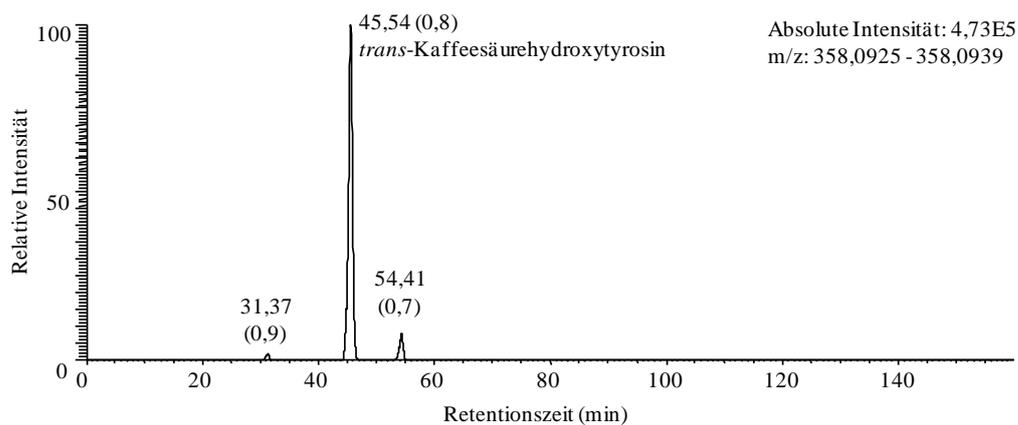
44: Kaffeesäuretyrosin und Coumarsäurehydroxytyrosin: $[M-H]^-$ 342,0983



45: Ferulasäuretyrosin: $[M-H]^-$ 356,1140

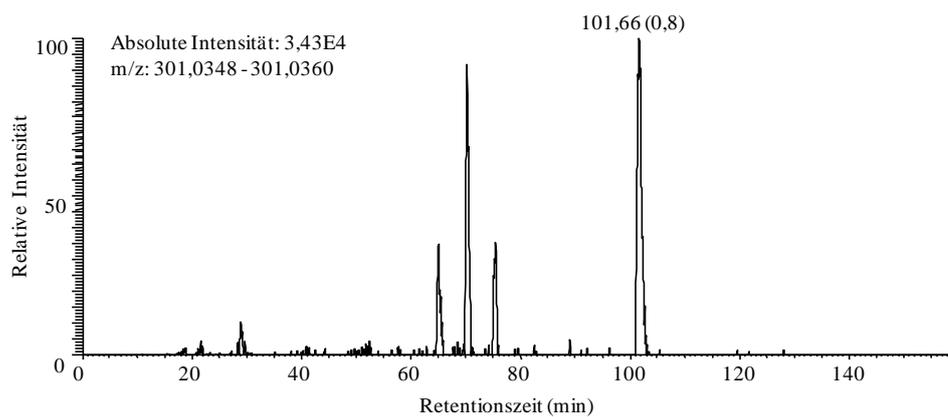


46: Kaffeesäurehydroxytyrosin: $[M-H]^-$ 358,0932

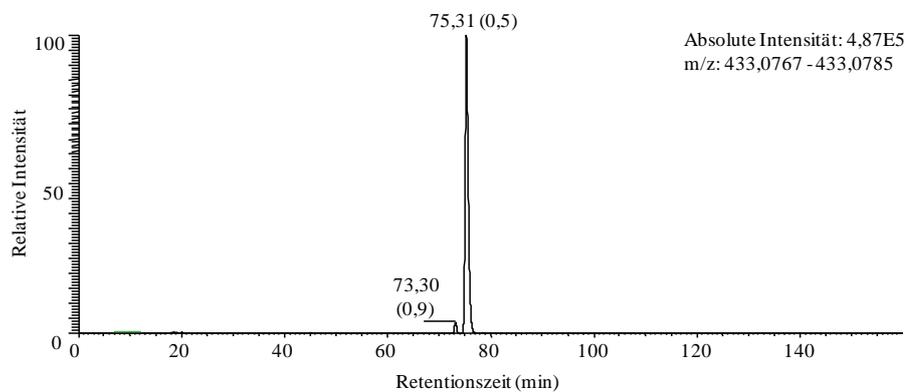


Quercetin und Quercetinglykoside

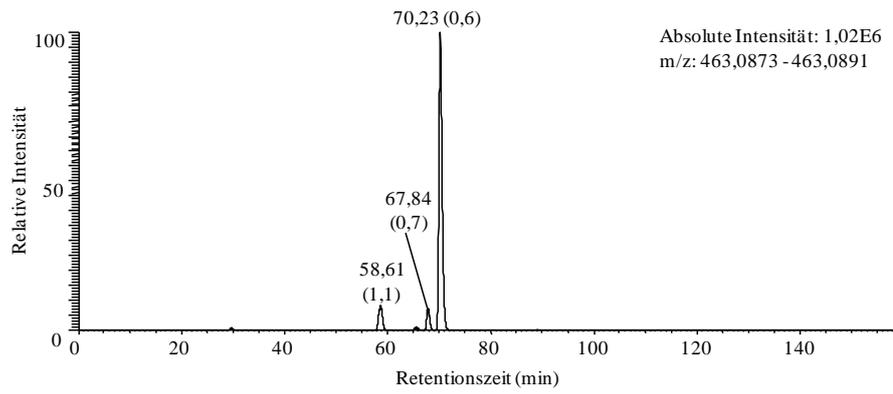
47: Quercetin: $[M-H]^-$ 301,0354



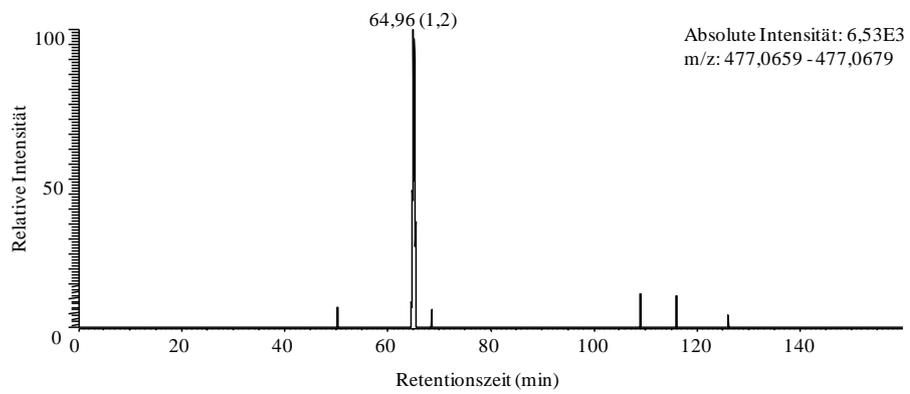
48: Quercetinpentoside: $[M-H]^-$ 433,0776



49: Quercetinhexoside: $[M-H]^-$ 463,0882



50: Quercetinglucuronid: $[M-H]^-$ 477,0675



A4: Abbildungen - Anthocyane

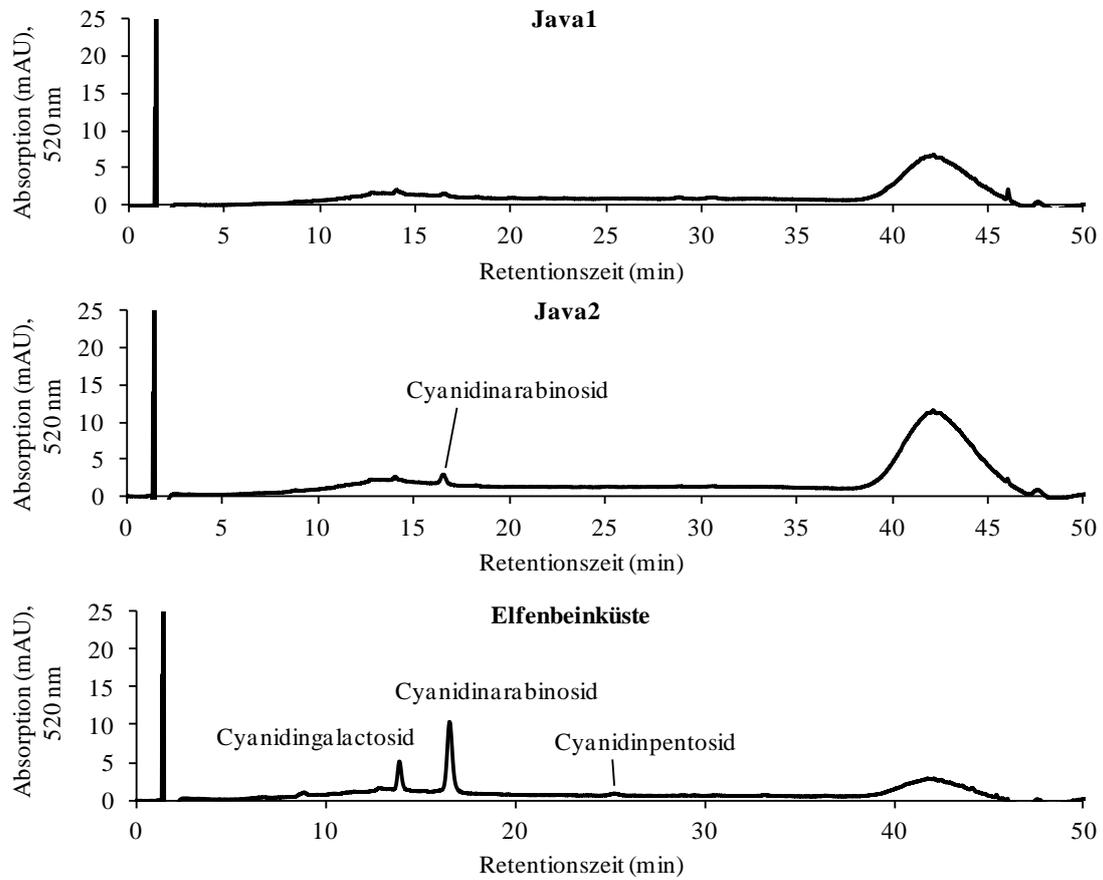


Abbildung A 4: HPLC-VIS-Chromatogramme der Extrakte von drei fermentierten Kakaobohnen (Java1, Java2 und Elfenbeinküste) bei 520 nm.

A5: Kakao-Verarbeitungsproben

Tabelle A 1: Vollständige Liste der Kakao-Verarbeitungsproben mit Angaben zur Charakterisierung der Proben.

Bezeichnung der Proben	Herkunft, Lieferant oder Hersteller	Bemerkungen	Fett% ^a	Wasser% ^b	pH-Wert ^c
Unfermentierte Kakaobohnen					
1	keine Informationen vorhanden			3,1	
2				3,1	
3				3,0	
4				2,5	
5				2,7	
6				3,0	
7				1,5	
8				1,5	
9				1,3	
10				1,5	
11				2,2	
12				2,4	
13				3,2	
14				3,9	
15				3,5	
16				3,0	
17				2,8	
18				3,6	
Fermentierte Kakaobohnen					
Java1	Java1, ZDS, Solingen	fermentiert und getrocknet	47	6,1	5,3
Java2	Java2, ZDS, Solingen	fermentiert und getrocknet	49	6,5	5,3
CIV	Elfenbeinküste, ZDS, Solingen	fermentiert und getrocknet	52	6,7	5,6
Ghana	Ghana, ZDS, Solingen	fermentiert und getrocknet	50	6,0	
Röstungen					
Java1 160 °C/20 min	Java, Indonesien, ZDS	geröstet 160 °C/20 min, 2x	46	1,8	
Java1 170 °C/20 min	Java, Indonesien, ZDS	geröstet 170 °C/20 min, 2x	47		
Java1 100 °C/30 min	Java, Indonesien, ZDS	geröstet 100 °C/30 min, 2x	48	3,2	5,2
Java1 120 °C/30 min	Java, Indonesien, ZDS	geröstet 120 °C/30 min, 2x	48	3,1	5,2
Java1 140 °C/30 min	Java, Indonesien, ZDS	geröstet 140 °C/30 min, 2x	48	2,4	5,1
Java1 150 °C/30 min	Java, Indonesien, ZDS	geröstet 150 °C/30 min, 4x	50	2,5	5,1
Java1 160 °C/30 min	Java, Indonesien, ZDS	geröstet 160 °C/30 min, 2x	50	2,3	5,1
Java1 130 °C/45 min	Java, Indonesien, ZDS	geröstet 130 °C/45 min, 2x	49	2,1	
Java1 140 °C/45 min	Java, Indonesien, ZDS	geröstet 140 °C/45 min, 2x	46	1,7	
Java1 150 °C/45 min	Java, Indonesien, ZDS	geröstet 150 °C/45 min, 2x	48	1,5	
Java1 120 °C/60 min	Java, Indonesien, ZDS	geröstet 120 °C/60 min, 2x	50	2,8	
Java1 130 °C/60 min	Java, Indonesien, ZDS	geröstet 130 °C/60 min, 2x	48	3,2	
Java2 150 °C/30 min	Java, Indonesien, ZDS	geröstet 130 °C/30 min, 2x	49	2,6	5,2
CIV 150 °C/30 min	Elfenbeinküste, ZDS	geröstet 150 °C/30 min, 2x	52	2,5	5,4

Anhang

Bezeichnung der Proben	Herkunft, Lieferant oder Hersteller	Bemerkungen	Fett% ^a	Wasser% ^b	pH-Wert ^c
Schokoladenherstellung					
SP1, Ghana	Ghana, ZDS, Solingen	fermentierte Kakaobohnen	50	6,0	
SP2	Ghana, ZDS, Solingen	nach Infrarotröstung, 160 °C/2 min			
SP3	Ghana, ZDS, Solingen	zu Nibs gebrochen			
SP4	Ghana, ZDS, Solingen	geröstete Nibs, 125 °C/17 min			
SP5	Ghana, ZDS, Solingen	nach Zermahlung der Nibs, 60 °C/20 h			
SP6	Ghana, ZDS, Solingen	nach Zugabe von Zucker und Vanillin, 40 °C/5 min, 48,9% Kakaoanteil			
SP7	Ghana, ZDS, Solingen	nach Walzen auf < 20 µm, 25-50 °C/1 min			
SP8	Ghana, ZDS, Solingen	nach Conchieren, 80 °C/20 h			
SP9	Ghana, ZDS, Solingen	nach Zugabe von Kakaobutter und Lecithin, 43,5% Kakaoanteil			
Kakaopulver					
nicht alkalisiertes KP	Kakaoverarbeitung Berlin		10	< 5	5,8
alkalisiertes KP	Kakaoverarbeitung Berlin		10	< 5	7,2
S7	Schokinag, Mannheim		11	< 5	6,9
S75	Schokinag, Mannheim		11	< 5	7,3
SR7	Schokinag, Mannheim		11	< 5	7,5
S8	Schokinag, Mannheim		11	< 5	7,6
KP1	„cebe“ Wilhelm Reuss GmbH	K ₂ CO ₃ , NaOH	20		7,4
KP2	„Belbake“ Wilhelm Reuss GmBH, Westafrika	K ₂ CO ₃ , NaOH	20,7		7,6
KP3	„Bensdorp“ Unilever Deutschland	K ₂ CO ₃ , NaOH	20		7,4
KP4	Krüger GmbH	K ₂ CO ₃ , NaOH	20		7,4
KP5	gepa „Kakao Afrika“, Elfenbeinküste, Ghana	K ₂ CO ₃	21		6,5
Schokoladen					
S1	Sarotti (PUR PUR)	Kakaoanteil 78%	44,0		5,8
S2	Lindt (Edelbitter)	Kakaoanteil 85%			5,8
S3	Equador,, J.D.Gross	Kakaoanteil 70%, Arriba, Nacional	42,1		7,1
S4	Van d'Or, (Edelbitter)	Kakaoanteil 70%	39,7		5,8
S5	Lidl (Fairglobe)	Kakaoanteil 70%, Ghana	40,2		5,8

^a Fettbestimmung erfolgte nach Weibull-Stoldt. ^b Bestimmung des Wassergehaltes erfolgte mittels Karl-Fischer-Titration. ^c Die Bestimmung des pH-Wertes erfolgte nach Miller et al. (2008).

Anhang



Abbildung A 5: Kakaobohnen (Java1, Java2 und Elfenbeinküste) der Röstversuche.

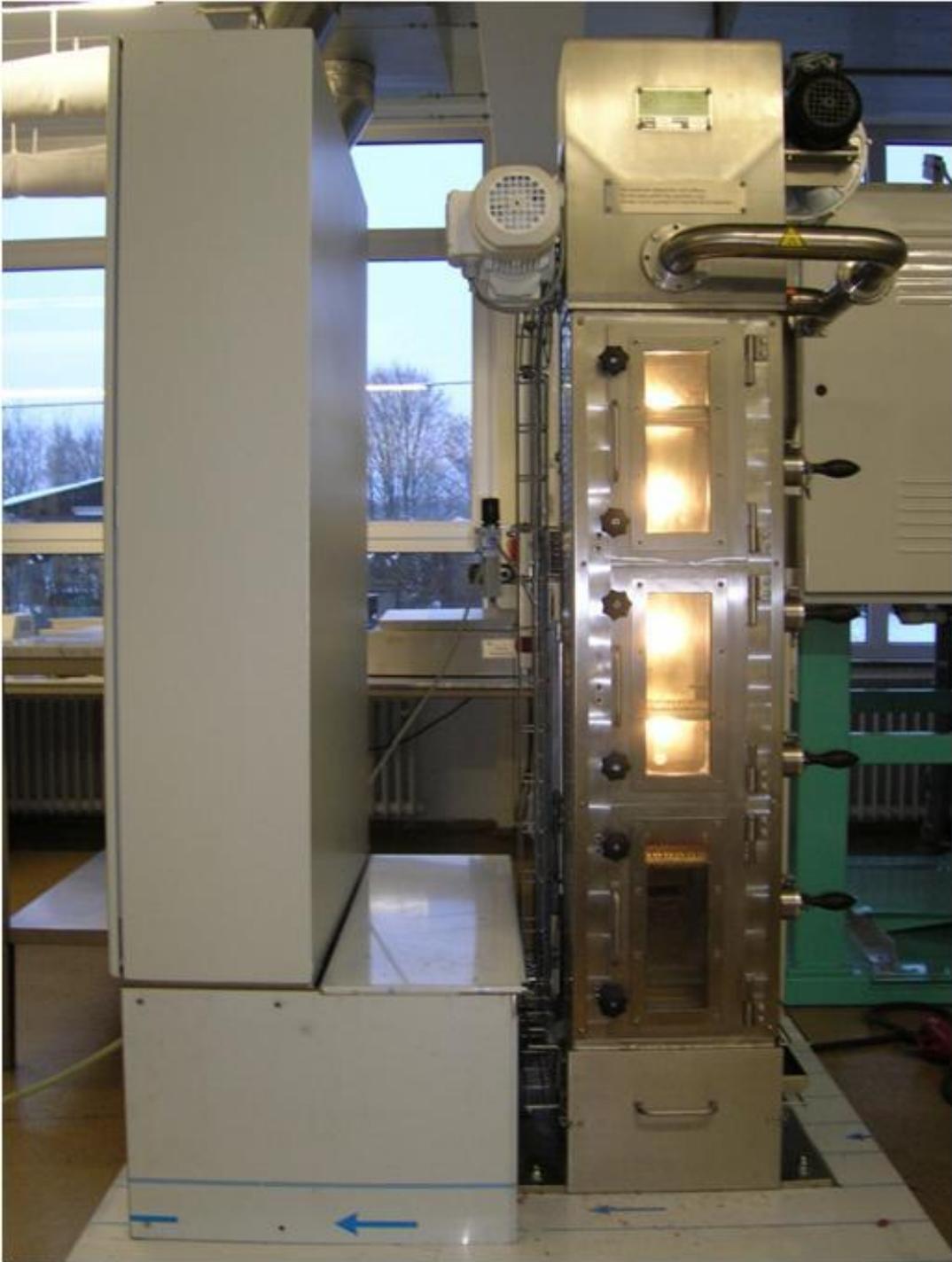


Abbildung A 6: Chargenröster im Labormaßstab der Maschinenfabrik F.B. Lehmann.

A6: Abbildungen und Tabellen der Kakao-Verarbeitungsproben

Unfermentierte Kakaobohnen

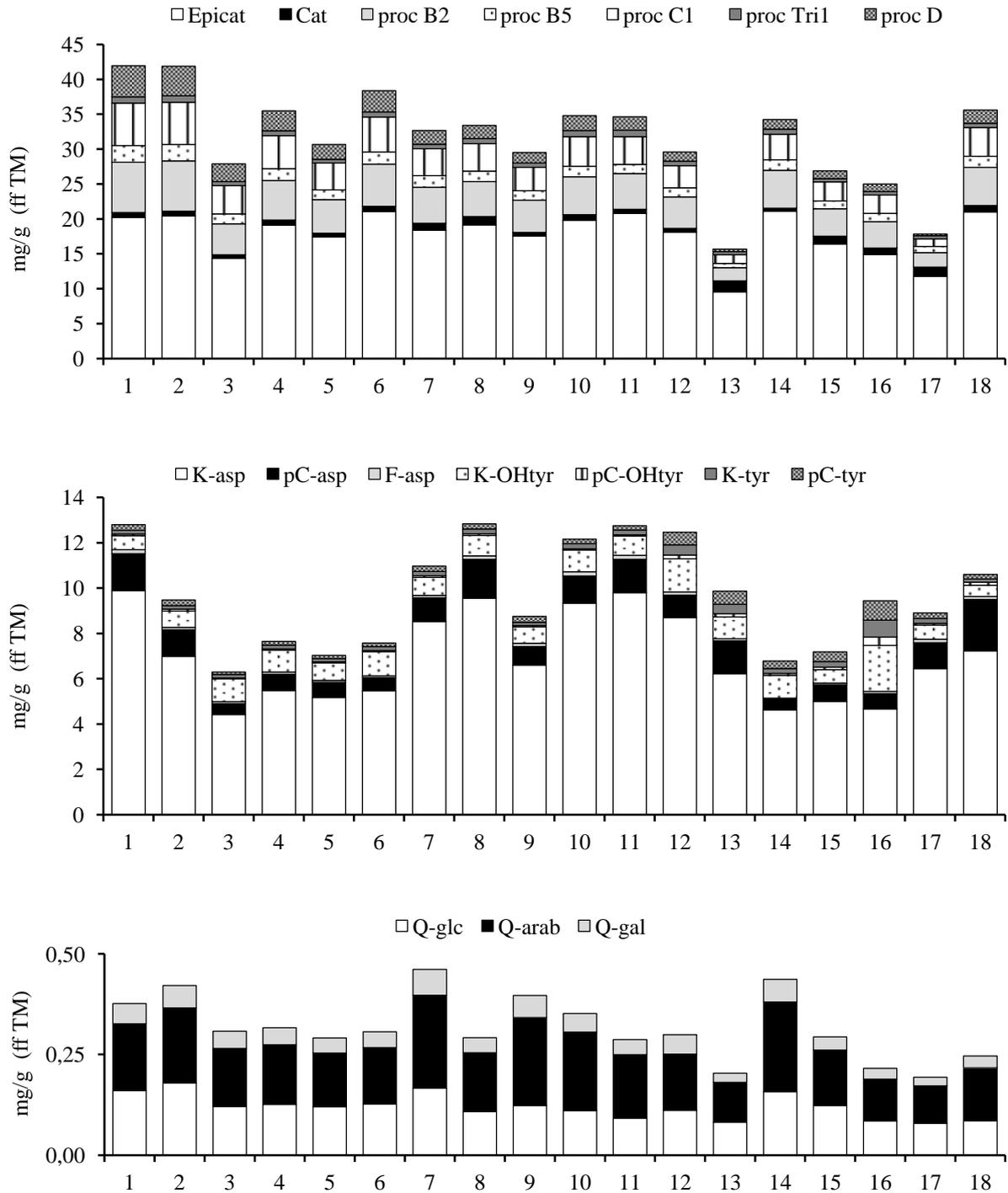


Abbildung A 7: Konzentrationen von Flavanolen, *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetinglykosiden in unfermentierten Kakaobohnen.

Anhang

Tabelle A 2: Konzentrationen von (-)-Epicatechin, (-)-Catechin und (+)-Catechin in unfermentierten Kakaobohnen der enantioselektiven Analyse mit Kapillarelektrophorese.

	(-)-Epicat mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	(-)-Cat mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	(+)-Cat mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)
1	21,6 ± 1,0 (5)	0,13 ± 0,003 (2)	0,40 ± 0,02 (4)
2	23,7 ± 2,5 (10)	0,14 ± 0,01 (7)	0,43 ± 0,03 (7)
3	11,1 ± 0,7 (6)	0,10 ± 0,008 (8)	0,25 ± 0,04 (15)
4	17,9 ± 1,7 (9)	0,12 ± 0,007 (6)	0,40 ± 0,05 (11)
5	17,9 ± 3,0 (17)	0,13 ± 0,01 (9)	0,35 ± 0,03 (9)
6	20,2 ± 0,3 (2)	0,14 ± 0,002 (1)	0,38 ± 0,04 (10)
7	20,7 ± 1,9 (9)	0,16 ± 0,03 (16)	0,66 ± 0,03 (5)
8	18,3 ± 0,9 (5)	0,17 ± 0,004 (2)	0,88 ± 0,05 (6)
9	22,4 ± 1,1 (5)	0,17 ± 0,003 (2)	0,37 ± 0,06 (17)
10	22,9 ± 5,3 (23)	0,13 ± 0,02 (14)	0,59 ± 0,07 (12)
11	23,5 ± 0,9 (4)	0,15 ± 0,005 (3)	0,38 ± 0,05 (12)
12	22,4 ± 1,3 (6)	0,15 ± 0,007 (5)	0,39 ± 0,07 (17)
13	11,2 ± 1,0 (9)	0,16 ± 0,006 (4)	1,12 ± 0,04 (4)
14	27,0 ± 2,0 (7)	0,16 ± 0,01 (7)	0,29 ± 0,01 (4)
15	18,2 ± 2,7 (15)	0,16 ± 0,019 (12)	0,72 ± 0,03 (4)
16	14,3 ± 0,7 (5)	0,16 ± 0,002 (1)	0,88 ± 0,2 (17)
17	13,2 ± 0,3 (3)	0,16 ± 0,004 (3)	1,15 ± 0,2 (19)
18	22,2 ± 0,8 (3)	0,15 ± 0,01 (9)	0,78 ± 0,08 (10)
MW	19,4	0,15	0,6

Fermentierte Kakaobohnen

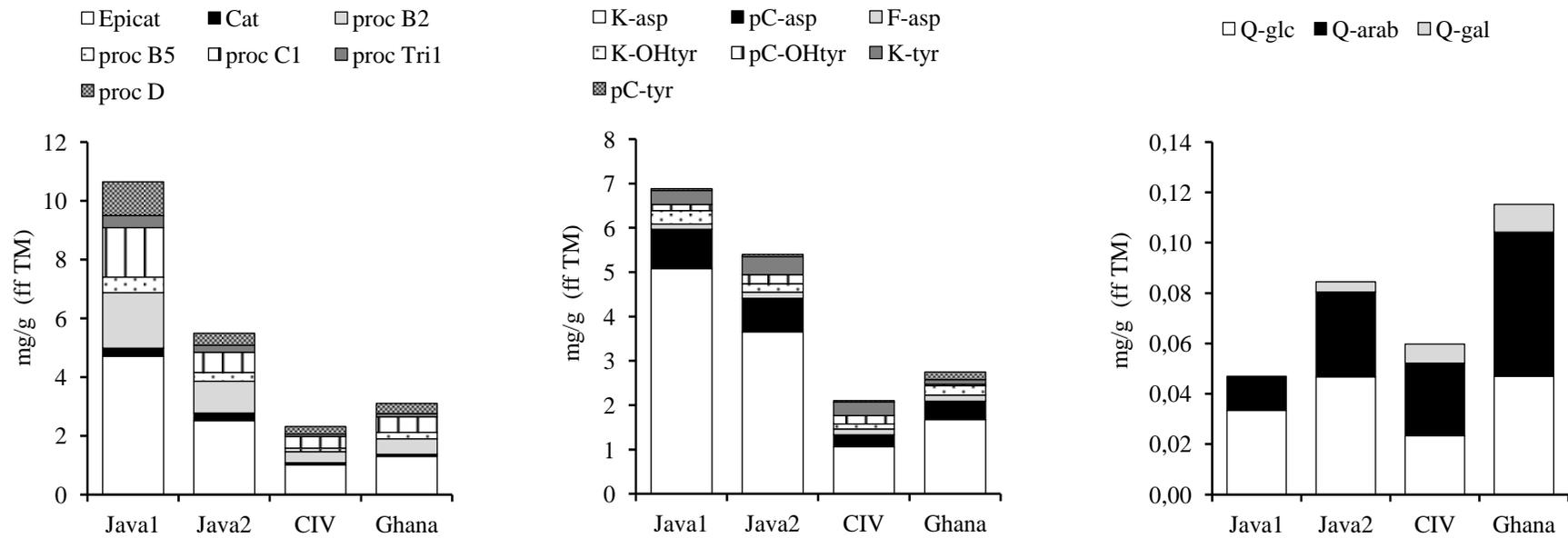


Abbildung A 8: Konzentrationen von Flavanolen, *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetinglykosiden in fermentierten Kakaobohnen.

Röstproben

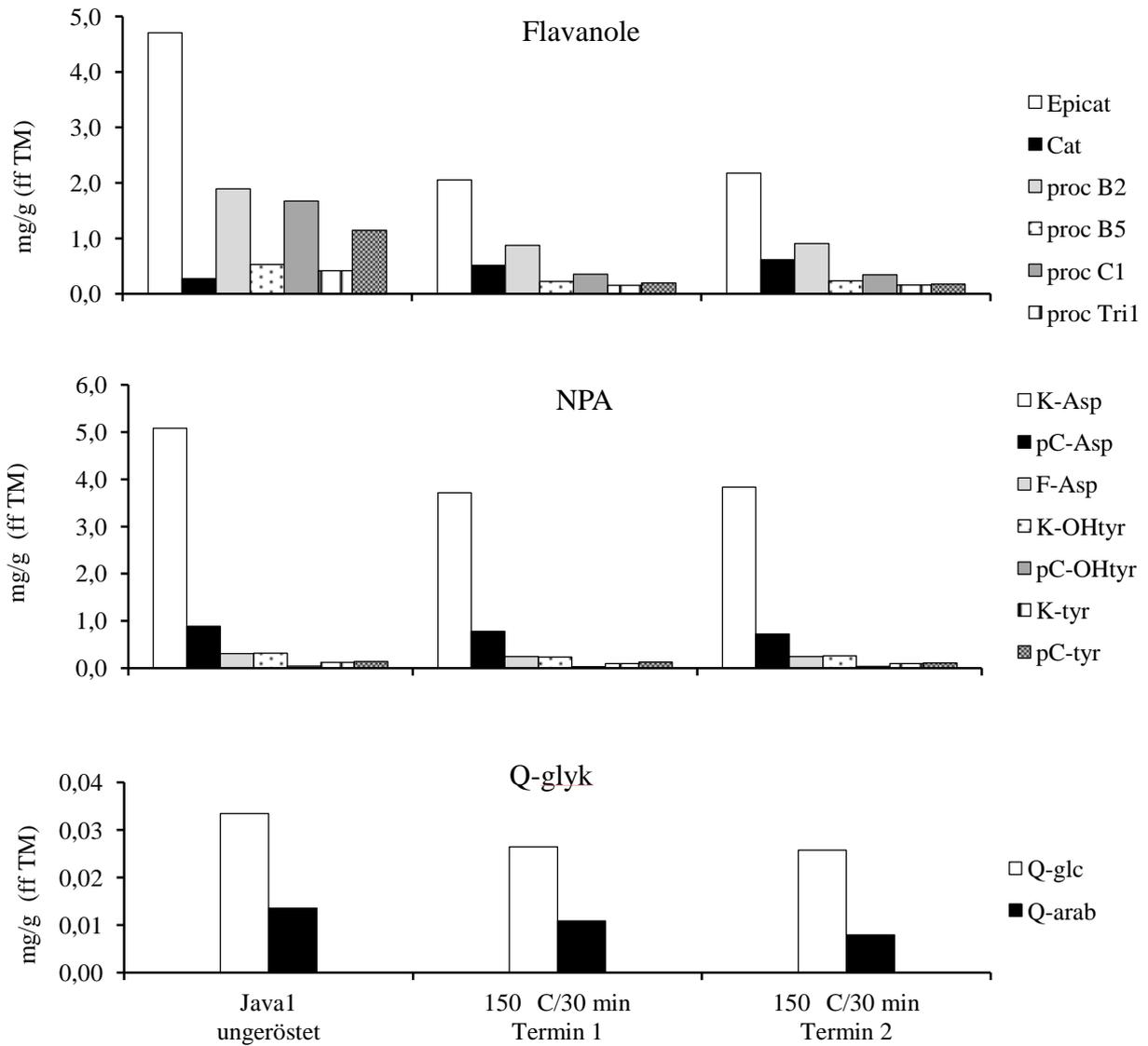


Abbildung A 9: Konzentrationen von Flavanolen, *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetinglykosiden in ungerösteten und den unter gleichen Bedingungen (150 °C/30 min) an zwei verschiedenen Terminen gerösteten Kakaobohnen.

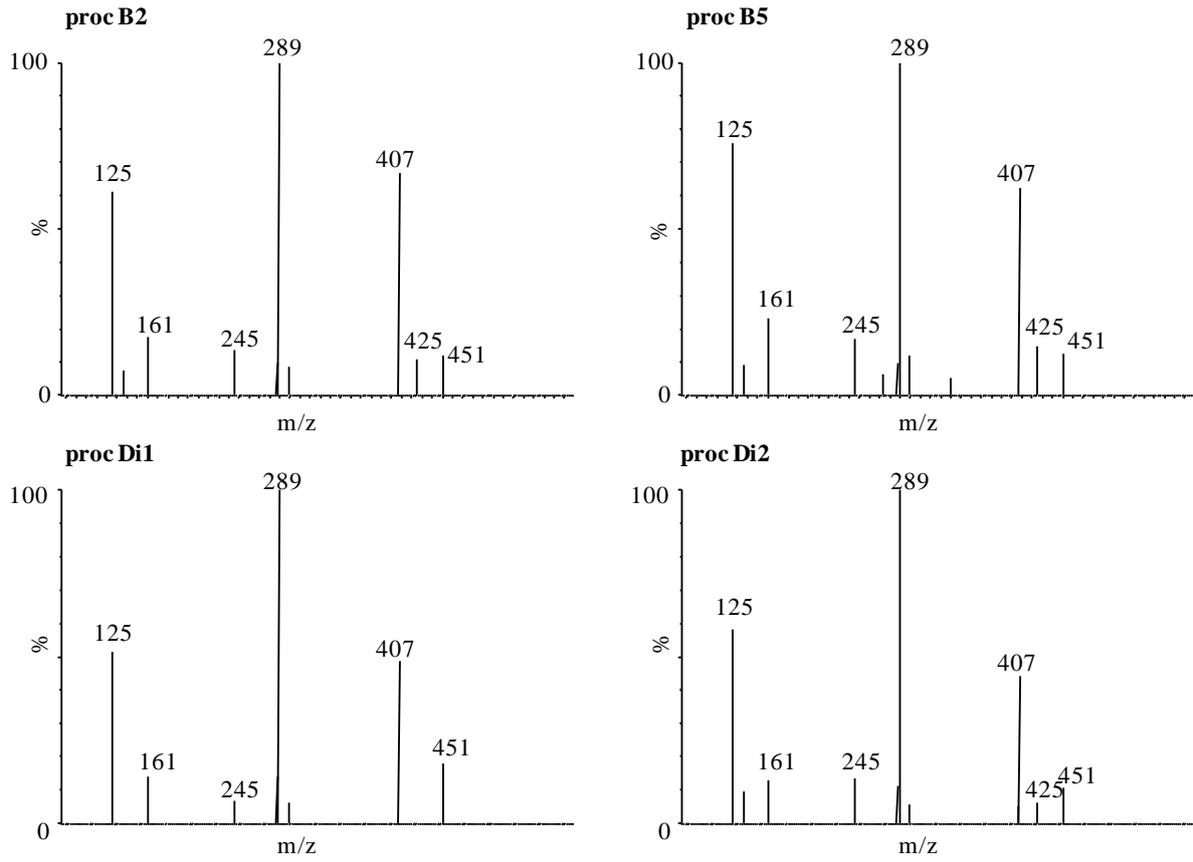


Abbildung A 10: TQD-MS-Fragmentspektren von $[M-H]^-$ 577 der Procyanidin Dimere B2, B5, Di1 und Di2 des Produktionenscans.

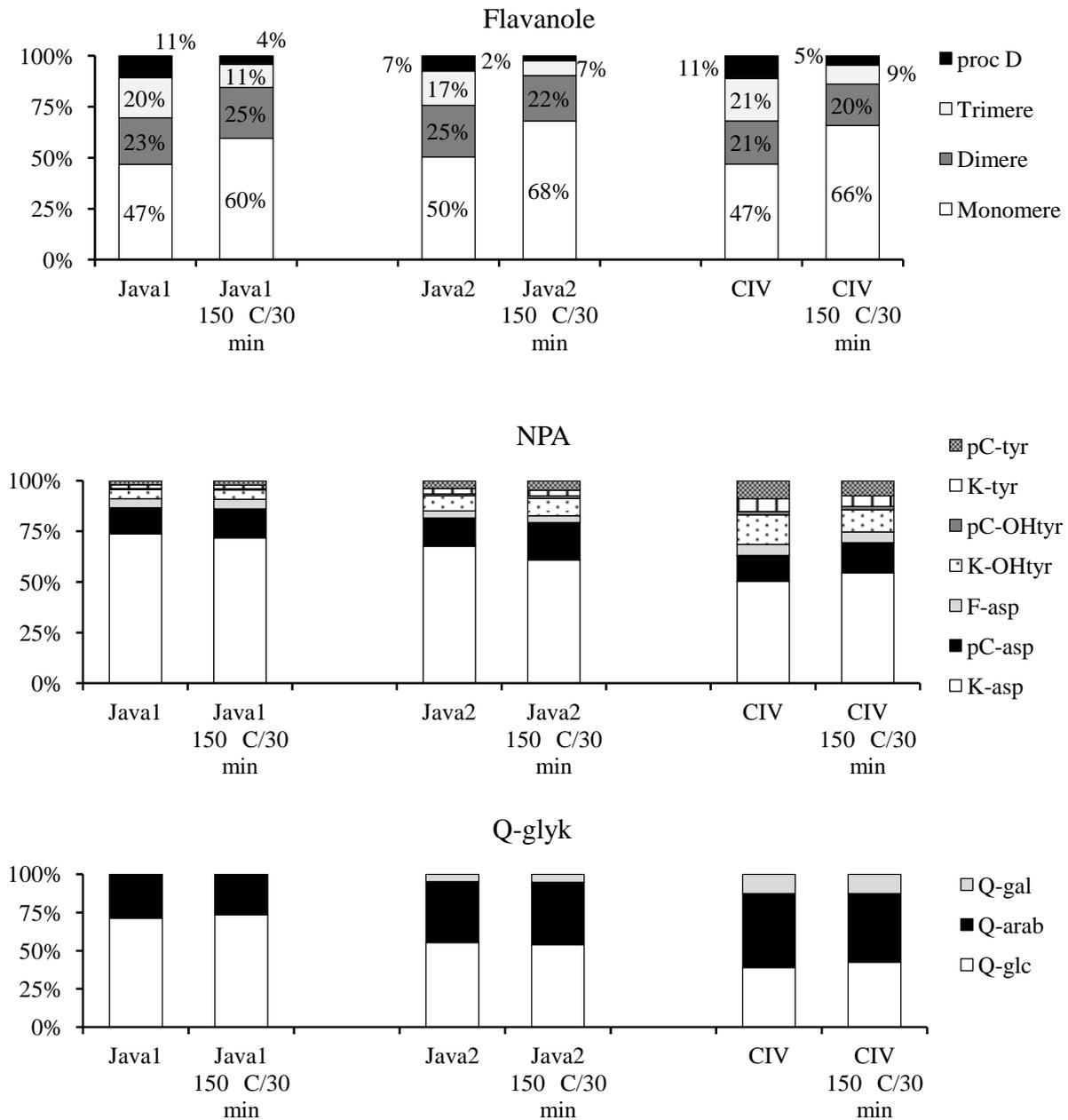


Abbildung A 11: Substanzgruppen-Profile von Flavanolen (nach Polymerisationsgrad), *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetinglykosiden von drei ungerösteten und den jeweils gerösteten Kakaobohnen.

Anhang

Tabelle A 3: Konzentrationen der Flavanole in den Kakaoproben der Röstversuche der HPLC-DAD-Analysen.

	Epicat mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	Cat mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	proc B2 mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	proc B5 mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	proc C1 mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	proc Tri1 mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	proc D mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	Flavanole
Java1	4,70 ± 0,75 (16)	0,28 ± 0,046 (16)	1,89 ± 0,23 (12)	0,53 ± 0,09 (17)	1,67 ± 0,30 (18)	0,42 ± 0,05 (12)	1,15 ± 0,22 (19)	10,65
Java1 160 °C/20 min	2,02 ± 0,24 (12)	0,51 ± 0,027 (5)	0,92 ± 0,09 (10)	0,20 ± 0,03 (12)	0,40 ± 0,04 (10)	0,16 ± 0,02 (10)	0,22 ± 0,01 (6)	4,43
Java1 170 °C/20 min	2,03 ± 0,27 (13)	0,62 ± 0,008 (1)	0,85 ± 0,18 (21)	0,20 ± 0,03 (16)	0,32 ± 0,09 (28)	0,14 ± 0,03 (19)	0,16 ± 0,05 (28)	4,33
Java1 100 °C/30 min	3,62 ± 0,067 (2)	0,23 ± 0,01 (4)	1,44 ± 0,01 (1)	0,41 ± 0,003 (1)	1,18 ± 0,05 (4)	0,32 ± 0,01 (4)	0,74 ± 0,10 (14)	7,95
Java1 120 °C/30 min	3,01 ± 0,18 (6)	0,28 ± 0,004 (1)	1,20 ± 0,07 (6)	0,29 ± 0,006 (2)	0,79 ± 0,09 (12)	0,24 ± 0,02 (8)	0,39 ± 0,07 (17)	6,20
Java1 140 °C/30 min	1,93 ± 0,07 (4)	0,40 ± 0,036 (9)	0,81 ± 0,10 (13)	0,19 ± 0,02 (9)	0,33 ± 0,02 (7)	0,15 ± 0,01 (9)	0,17 ± 0,004 (2)	3,98
Java1 150 °C/30 min	2,11 ± 0,11 (5)	0,57 ± 0,075 (13)	0,89 ± 0,04 (5)	0,23 ± 0,01 (6)	0,35 ± 0,03 (7)	0,16 ± 0,007 (5)	0,19 ± 0,03 (17)	4,50
Java1 160 °C/30 min	1,56 ± 0,08 (5)	0,66 ± 0,045 (7)	0,55 ± 0,04 (7)	0,15 ± 0,007 (4)	0,16 ± 0,02 (9)	0,09 ± 0,004 (5)	0,09 ± 0,007 (8)	3,26
Java1 130° C/45 min	2,32 ± 0,18 (8)	0,40 ± 0,056 (14)	1,03 ± 0,11 (10)	0,25 ± 0,02 (7)	0,57 ± 0,04 (8)	0,20 ± 0,02 (9)	0,35 ± 0,007 (2)	5,12
Java1 140 °C/45 min	1,73 ± 0,09 (5)	0,49 ± 0,007 (2)	0,69 ± 0,06 (10)	0,18 ± 0,005 (3)	0,31 ± 0,02 (6)	0,14 ± 0,02 (11)	0,20 ± 0,01 (6)	3,76
Java1 150 °C/45 min	1,48 ± 0,09 (6)	0,65 ± 0,048 (7)	0,53 ± 0,03 (6)	0,14 ± 0,008 (5)	0,20 ± 0,02 (11)	0,11 ± 0,01 (9)	0,12 ± 0,009 (7)	3,23
Java1 120 °C/60 min	2,36 ± 0,25 (11)	0,29 ± 0,005 (2)	0,97 ± 0,12 (12)	0,26 ± 0,01 (6)	0,50 ± 0,07 (14)	0,20 ± 0,02 (8)	0,28 ± 0,04 (13)	4,85
Java1 130 °C/60 min	1,90 ± 0,15 (8)	0,39 ± 0,028 (7)	0,79 ± 0,03 (4)	0,21 ± 0,02 (8)	0,34 ± 0,02 (7)	0,15 ± 0,001 (1)	0,17 ± 0,02 (12)	3,94
Java2	2,51 ± 0,006 (<1)	0,26 ± 0,002 (1)	1,08 ± 0,01 (1)	0,30 ± 0,002 (1)	0,68 ± 0,003 (<1)	0,24 ± 0,002 (1)	0,41 ± 0,001 (<1)	5,49
Java2 150 °C/30 min	1,34 ± 0,01 (1)	0,46 ± 0,030 (7)	0,45 ± 0,05 (11)	0,14 ± 0,005 (4)	0,12 ± 0,02 (19)	0,07 ± 0,008 (11)	0,06 ± 0,01 (17)	2,64
CIV	1,01 ± 0,02 (2)	0,07 ± 0,002 (2)	0,37 ± 0,01 (4)	0,12 ± 0,004 (4)	0,40 ± 0,01 (3)	0,08 ± 0,0003 (<1)	0,26 ± 0,01 (5)	2,31
CIV 150 °C/30 min	0,93 ± 0,01 (1)	0,59 ± 0,06 (10)	0,38 ± 0,01 (4)	0,09 ± 0,005 (6)	0,17 ± 0,02 (14)	0,05 ± 0,003 (5)	0,10 ± 0,001 (1)	2,31

Anhang

Tabelle A 4: Konzentrationen der Flavanole in den Kakaoproben der Röstversuche der UHPLC-UV-DAD-TQD-MS-Analysen.

	Epicat mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	Cat mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	proc B1 mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	proc B2 mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	proc B5 mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	proc Di1 mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	proc Di2 mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	Flavanole
Java1	4,82 ± 0,16 (3)	0,26 ± 0,01 (5)	0,027 ± 0,0003 (1)	2,03 ± 0,023 (1)	0,57 ± 0,02 (3)	0,018 ± 0,001 (4)	0,023 ± 0,003 (13)	7,75
Java1 100 °C/30 min	3,94 ± 0,57 (15)	0,24 ± 0,008 (3)	0,022 ± 0,006 (7)	1,70 ± 0,2 (14)	0,45 ± 0,03 (7)	0,018 ± 0,001 (6)	0,023 ± 0,001 (3)	6,40
Java1 120 °C/30 min	2,85 ± 0,16 (5)	0,24 ± 0,01 (5)	0,019 ± 0,0001 (1)	1,33 ± 0,04 (3)	0,29 ± 0,003 (1)	0,021 ± 0,001 (7)	0,019 ± 0,0002 (1)	4,77
Java1 140 °C/30 min	1,77 ± 0,30 (17)	0,33 ± 0,079 (24)	0,018 ± 0,002 (12)	0,85 ± 0,25 (29)	0,19 ± 0,04 (22)	0,051 ± 0,018 (35)	0,029 ± 0,005 (17)	3,24
Java1 150 °C/30 min	2,05 ± 0,15 (7)	0,48 ± 0,09 (20)	0,018 ± 0,0008 (5)	0,98 ± 0,07 (7)	0,24 ± 0,01 (6)	0,081 ± 0,016 (20)	0,041 ± 0,008 (19)	3,88
Java1 160 °C/30 min	1,56 ± 0,11 (7)	0,62 ± 0,03 (5)	0,016 ± 0,0006 (4)	0,64 ± 0,05 (8)	0,16 ± 0,01 (8)	0,099 ± 0,01 (11)	0,048 ± 0,004 (9)	3,16
Java2	2,37 ± 0,03 (1)	0,21 ± 0,002 (1)	0,020 ± 0,0005 (2)	1,1 ± 0,01 (1)	0,3 ± 0,07 (24)	0,024 ± 0,0003 (1)	0,026 ± 0,0001 (1)	4,06
Java2 150 °C/30 min	1,23 ± 0,07 (6)	0,37 ± 0,02 (4)	0,015 ± 0,001 (9)	0,5 ± 0,1 (18)	0,1 ± 0,01 (7)	0,066 ± 0,002 (3)	0,033 ± 0,002 (6)	2,33
CIV	0,97 ± 0,02 (2)	0,07 ± 0,002 (3)	0,018 ± 0,001 (7)	0,43 ± 0,01 (3)	0,12 ± 0,009 (7)	0,012 ± 0,001 (9)	0,012 ± 0,001 (5)	1,62
CIV 150 °C/30 min	0,91 ± 0,01 (2)	0,55 ± 0,06 (11)	0,019 ± 0,003 (17)	0,43 ± 0,02 (5)	0,10 ± 0,003 (3)	0,081 ± 0,01 (17)	0,033 ± 0,003 (10)	2,12

Anhang

Tabelle A 5: Konzentrationen von (-)-Epicatechin, (-)-Catechin und (+)-Catechin in den Kakaoproben der Röstversuche der enantioselektiven Analyse mit Kapillarelektrophorese.

	(-)-Epicat mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	(-)-Cat mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	(+)-Cat mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)
Java1	4,77 ± 0,08 (2)	0,18 ± 0,03 (14)	0,09 ± 0,02 (19)
Java1 160 °C/20 min	2,39 ± 0,11 (5)	0,61 ± 0,003 (1)	0,06 ± 0,005 (8)
Java1 170 °C/20 min	2,57 ± 0,11 (4)	0,80 ± 0,08 (10)	0,07 ± 0,008 (11)
Java1 100 °C/30 min	4,25 ± 0,001 (<1)	0,20 ± 0,007 (4)	0,06 ± 0,0002 (<1)
Java1 120 °C/30 min	3,35 ± 0,23 (7)	0,23 ± 0,04 (19)	0,04 ± 0,003 (8)
Java1 140 °C/30 min	2,08 ± 0,28 (13)	0,40 ± 0,07 (18)	0,03 ± 0,00004 (<1)
Java1 150 °C/30 min	2,08 ± 0,2 (10)	0,58 ± 0,12 (21)	0,03 ± 0,001 (3)
Java1 160 °C/30 min	1,68 ± 0,08 (4)	0,79 ± 0,04 (5)	0,03 ± 0,001 (3)
Java1 130° C/45 min	3,16 ± 0,34 (11)	0,58 ± 0,15 (26)	0,08 ± 0,02 (19)
Java1 140 °C/45 min	2,55 ± 0,20 (8)	0,98 ± 0,04 (4)	0,08 ± 0,01 (11)
Java1 150 °C/45 min	2,11 ± 0,003 (<1)	1,02 ± 0,02 (2)	0,06 ± 0,001 (2)
Java1 120 °C/60 min	2,94 ± 0,29 (10)	0,35 ± 0,07 (19)	0,07 ± 0,002 (2)
Java1 130 °C/60 min	2,33 ± 0,08 (3)	0,47 ± 0,003 (1)	0,04 ± 0,003 (6)
Java2	2,88 ± 0,1 (4)	0,25 ± 0,01 (6)	0,05 ± 0,001 (3)
Java2 150 °C/30 min	1,39 ± 0,10 (7)	0,53 ± 0,11 (22)	0,03 ± 0,003 (11)
CIV	1,16 ± 0,03 (2)	0,02 ± 0,003 (11)	0,01 ± 0,002 (30)
CIV 150 °C/30 min	1,02 ± 10,02 (2)	0,66 ± 0,07 (11)	0,04 ± 0,003 (8)

Tabelle A 6: Konzentrationen der Quercetinglykoside in den Kakaoproben der Röstversuche der HPLC-DAD-Analysen.

	Q-gal mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	Q-glc mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	Q-arab mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	Q-glyk
Java1		0,033 ± 0,002 (7)	0,014 ± 0,001 (8)	0,047
Java1 160 °C/20 min		0,027 ± 0,001 (5)	0,011 ± 0,002 (17)	0,038
Java1 170 °C/20 min		0,028 ± 0,002 (9)	0,010 ± 0,002 (25)	0,038
Java1 100 °C/30 min		0,032 ± 0,001 (3)	0,011 ± 0,001 (5)	0,044
Java1 120 °C/30 min		0,030 ± 0,003 (10)	0,014 ± 0,003 (21)	0,047
Java1 140 °C/30 min		0,028 ± 0,002 (7)	0,012 ± 0,0003 (3)	0,040
Java1 150 °C/30 min		0,026 ± 0,001 (3)	0,009 ± 0,002 (18)	0,035
Java1 160 °C/30 min		0,02 ± 0,0005 (2)	0,007 ± 0,0002 (2)	0,029
Java1 130° C/45 min		0,028 ± 0,001 (2)	0,010 ± 0,0003 (4)	0,038
Java1 140 °C/45 min		0,027 ± 0,001 (4)	0,008 ± 0,001 (10)	0,035
Java1 150 °C/45 min		0,021 ± 0,001 (4)	0,007 ± 0,001 (8)	0,028
Java1 120 °C/60 min		0,028 ± 0,003 (9)	0,011 ± 0,001 (11)	0,039
Java1 130 °C/60 min		0,026 ± 0,002 (6)	0,010 ± 0,0003 (3)	0,036
Java2	0,004 ± 0,0003 (7)	0,04 ± 0,00001 (<1)	0,03 ± 0,00001 (<1)	0,085
Java2 150 °C/30 min	0,004 ± 0,0003 (8)	0,038 ± 0,002 (4)	0,028 ± 0,002 (8)	0,070
CIV	0,008 ± 0,0004 (6)	0,023 ± 0,001 (3)	0,029 ± 0,0003 (1)	0,060
CIV 150 °C/30 min	0,007 ± 0,001 (15)	0,023 ± 0,003 (14)	0,024 ± 0,004 (15)	0,054

Anhang

Tabelle A 7: Konzentrationen der *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren in den Kakaoproben der Röstversuche der HPLC-DAD-Analysen.

	K-asp mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	pC-asp mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	F-asp mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	K-OHtyr mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	pC-OHtyr mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	K-tyr mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	pC-tyr mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	NPA
Java1	5,1 ± 0,32 (6)	0,89 ± 0,06 (7)	0,31 ± 0,01 (3)	0,31 ± 0,03 (8)	0,04 ± 0,01 (14)	0,12 ± 0,01 (7)	0,14 ± 0,01 (7)	6,9
Java1 160 °C/20 min	4,6 ± 0,29 (6)	0,97 ± 0,16 (16)	0,28 ± 0,01 (4)	0,28 ± 0,02 (8)	0,03 ± 0,002 (5)	0,10 ± 0,002 (2)	0,13 ± 0,01 (5)	6,4
Java1 170 °C/20 min	3,9 ± 0,25 (7)	0,75 ± 0,01 (1)	0,23 ± 0,01 (6)	0,23 ± 0,05 (22)	0,03 ± 0,004 (15)	0,09 ± 0,01 (9)	0,12 ± 0,01 (7)	5,3
Java1 100 °C/30 min	5,0 ± 0,18 (4)	0,86 ± 0,01 (1)	0,31 ± 0,01 (2)	0,31 ± 0,04 (13)	0,04 ± 0,004 (9)	0,12 ± 0,001 (1)	0,14 ± 0,01 (5)	6,8
Java1 120 °C/30 min	4,7 ± 0,26 (6)	0,87 ± 0,02 (2)	0,29 ± 0,02 (7)	0,31 ± 0,03 (10)	0,04 ± 0,001 (3)	0,12 ± 0,002 (1)	0,14 ± 0,005 (4)	6,4
Java1 140 °C/30 min	4,3 ± 0,37 (9)	0,82 ± 0,01 (2)	0,26 ± 0,01 (3)	0,27 ± 0,04 (13)	0,03 ± 0,005 (15)	0,10 ± 0,01 (13)	0,13 ± 0,01 (10)	5,9
Java1 150 °C/30 min	3,8 ± 0,10 (3)	0,75 ± 0,06 (8)	0,25 ± 0,003 (1)	0,25 ± 0,02 (6)	0,03 ± 0,003 (8)	0,09 ± 0,01 (6)	0,11 ± 0,02 (17)	5,3
Java1 160 °C/30 min	3,3 ± 0,52 (16)	0,63 ± 0,06 (10)	0,22 ± 0,04 (17)	0,22 ± 0,02 (10)	0,03 ± 0,001 (3)	0,09 ± 0,002 (2)	0,11 ± 0,01 (7)	4,6
Java1 130° C/45 min	5,1 ± 0,43 (8)	1,05 ± 0,2 (19)	0,30 ± 0,01 (5)	0,26 ± 0,02 (7)	0,04 ± 0,002 (6)	0,10 ± 0,01 (13)	0,12 ± 0,01 (12)	6,9
Java1 140 °C/45 min	4,0 ± 0,19 (5)	0,74 ± 0,02 (2)	0,25 ± 0,004 (1)	0,24 ± 0,03 (13)	0,04 ± 0,004 (11)	0,10 ± 0,01 (6)	0,13 ± 0,005 (4)	5,5
Java1 150 °C/45 min	3,5 ± 0,34 (10)	0,69 ± 0,09 (12)	0,22 ± 0,02 (7)	0,22 ± 0,02 (9)	0,03 ± 0,003 (10)	0,09 ± 0,01 (11)	0,12 ± 0,01 (12)	4,8
Java1 120 °C/60 min	4,5 ± 0,19 (4)	0,74 ± 0,05 (7)	0,28 ± 0,02 (6)	0,28 ± 0,02 (8)	0,03 ± 0,002 (6)	0,11 ± 0,01 (6)	0,15 ± 0,01 (5)	6,0
Java1 130 °C/60 min	3,7 ± 0,25 (7)	0,72 ± 0,03 (4)	0,24 ± 0,01 (2)	0,21 ± 0,01 (6)	0,02 ± 0,002 (8)	0,08 ± 0,002 (3)	0,10 ± 0,01 (9)	5,0
Java2	3,7 ± 0,07 (2)	0,76 ± 0,003 (<1)	0,19 ± 0,003 (2)	0,40 ± 0,01 (1)	0,06 ± 0,001 (2)	0,14 ± 0,005 (3)	0,21 ± 0,0003 (<1)	5,4
Java2 150 °C/30 min	2,6 ± 0,07 (2)	0,79 ± 0,14 (18)	0,14 ± 0,004 (3)	0,37 ± 0,03 (7)	0,05 ± 0,004 (8)	0,12 ± 0,01 (4)	0,20 ± 0,03 (14)	4,3
CIV	1,1 ± 0,04 (4)	0,27 ± 0,01 (5)	0,11 ± 0,003 (3)	0,31 ± 0,01 (3)	0,04 ± 0,001 (2)	0,13 ± 0,003 (2)	0,19 ± 0,0002 (<1)	2,1
CIV 150 °C/30 min	1,1 ± 0,02 (2)	0,30 ± 0,03 (9)	0,11 ± 0,01 (8)	0,21 ± 0,01 (3)	0,03 ± 0,003 (11)	0,10 ± 0,01 (9)	0,15 ± 0,03 (18)	2,0

Schokoladenherstellung

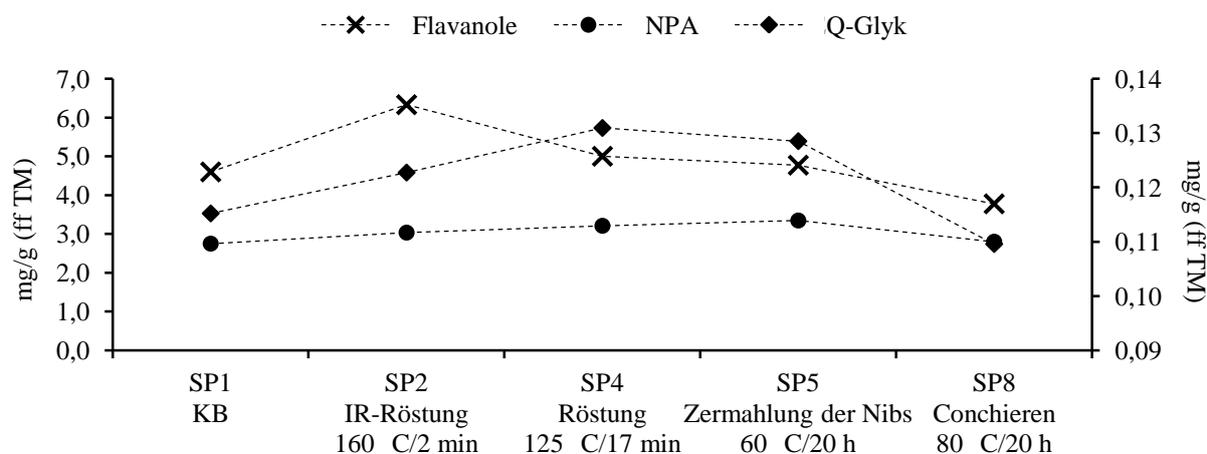


Abbildung A 12: Konzentrationen von Flavanolen, *N*-Phenylpropenoyl-*L*-Aminosäuren und Quercetinglykosiden (Sekundärachse) in verschiedenen Proben einer Schokoladenherstellung.

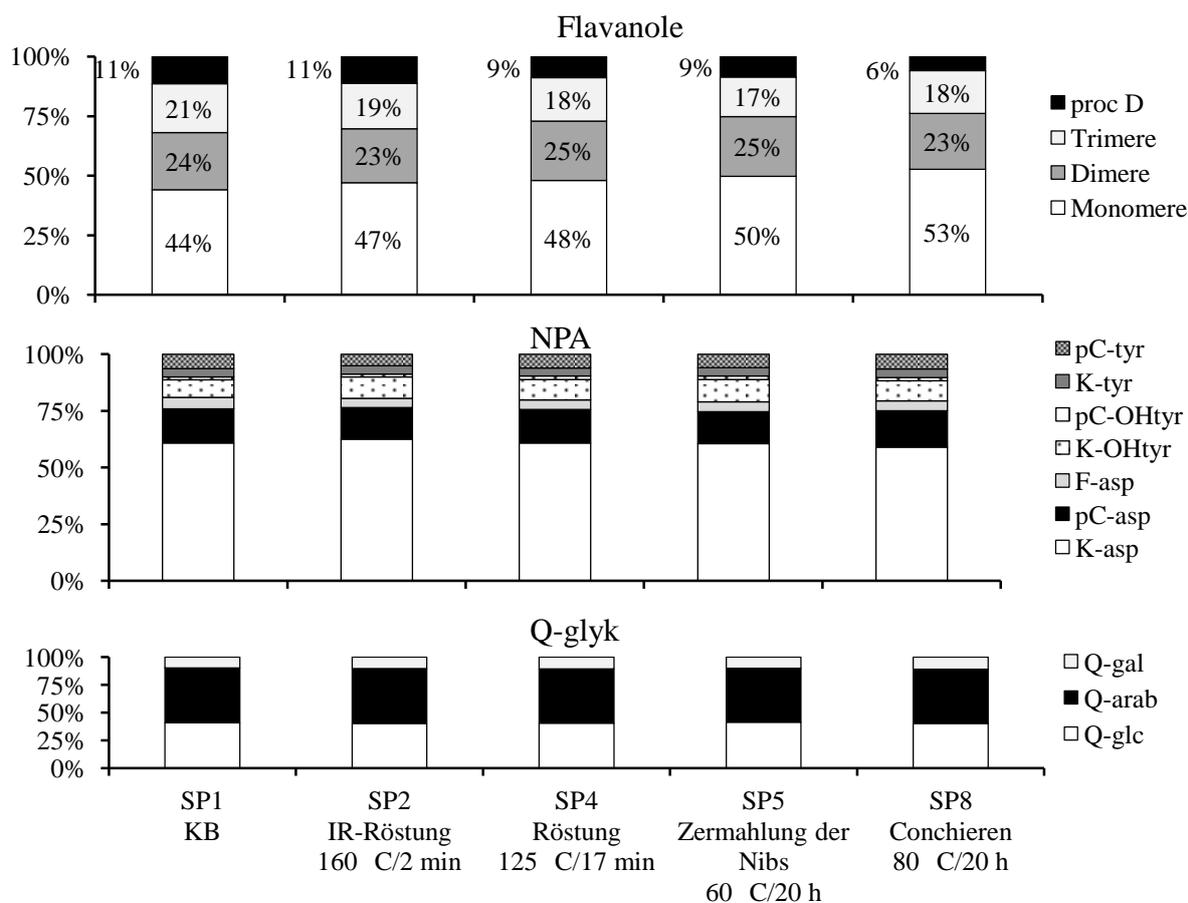


Abbildung A 13: Substanzgruppen-Profile von Flavanolen, *N*-Phenylpropenoyl-*L*-Aminosäuren und Quercetinglykosiden in verschiedenen Proben einer Schokoladenherstellung.

Anhang

Tabelle A 8: Konzentrationen der Flavanole in den Proben einer Schokoladenherstellung der HPLC-DAD-Analysen.

	Epicat mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	Cat mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	proc B2 mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	proc B5 mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	proc C1 mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	proc Tri1 mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	proc D mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	Flava- nole
Ghana/ SP1	1,94 ± 0,09 (5)	0,09 ± 0,004 (4)	0,79 ± 0,07 (9)	0,31 ± 0,00 (<1)	0,79 ± 0,02 (3)	0,15 ± 0,01 (6)	0,52 ± 0,05 (10)	4,60
SP2	2,85 ± 0,11 (4)	0,13 ± 0,003 (3)	1,07 ± 0,05 (5)	0,37 ± 0,08 (22)	0,98 ± 0,15 (15)	0,22 ± 0,02 (8)	0,71 ± 0,05 (7)	6,33
SP3	2,68 ± 0,14 (5)	0,13 ± 0,004 (3)	0,96 ± 0,09 (9)	0,36 ± 0,07 (20)	0,97 ± 0,09 (10)	0,21 ± 0,03 (12)	0,64 ± 0,06 (9)	5,95
SP4	2,17 ± 0,22 (10)	0,23 ± 0,005 (2)	0,90 ± 0,04 (4)	0,34 ± 0,04 (13)	0,75 ± 0,03 (4)	0,17 ± 0,02 (10)	0,44 ± 0,03 (6)	5,00
SP5	2,08 ± 0,06 (3)	0,30 ± 0,006 (2)	0,88 ± 0,02 (3)	0,32 ± 0,01 (2)	0,62 ± 0,05 (7)	0,17 ± 0,006 (3)	0,41 ± 0,004 (1)	4,77
SP6	1,82 ± 0,08 (4)	0,29 ± 0,01 (5)	0,75 ± 0,01 (1)	0,28 ± 0,05 (17)	0,53 ± 0,01 (3)	0,20 ± 0,01 (4)	0,28 ± 0,01 (3)	4,15
SP7	1,79 ± 0,11 (6)	0,30 ± 0,02 (6)	0,76 ± 0,01 (2)	0,28 ± 0,04 (15)	0,52 ± 0,02 (5)	0,34 ± 0,02 (6)	0,27 ± 0,04 (15)	4,27
SP8	1,69 ± 0,05 (3)	0,30 ± 0,02 (7)	0,62 ± 0,07 (11)	0,26 ± 0,073 (28)	0,47 ± 0,03 (5)	0,21 ± 0,01 (4)	0,22 ± 0,02 (10)	3,78
SP9	1,66 ± 0,07 (4)	0,30 ± 0,03 (10)	0,57 ± 0,08 (14)	0,25 ± 0,09 (34)	0,41 ± 0,03 (7)	0,22 ± 0,03 (11)	0,19 ± 0,04 (19)	3,59

Tabelle A 9: Konzentrationen der *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren in den Proben einer Schokoladenherstellung der HPLC-DAD-Analysen.

	K-asp mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	pC-asp mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	F-asp mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	K-OHtyr mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	pC-OHtyr mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	K-tyr mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	pC-tyr mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	NPA
Ghana/ SP1	1,7 ± 0,07 (4)	0,41 ± 0,01 (1)	0,14 ± 0,010 (7)	0,21 ± 0,003 (2)	0,035 ± 0,005 (14)	0,10 ± 0,005 (5)	0,17 ± 0,02 (9)	2,7
SP2	1,9 ± 0,12 (6)	0,42 ± 0,01 (1)	0,13 ± 0,0004 (<1)	0,28 ± 0,01 (4)	0,041 ± 0,005 (12)	0,11 ± 0,003 (3)	0,15 ± 0,01 (10)	3,0
SP3	2,1 ± 0,09 (4)	0,49 ± 0,003 (1)	0,14 ± 0,004 (3)	0,31 ± 0,03 (9)	0,054 ± 0,0005 (1)	0,13 ± 0,001 (1)	0,19 ± 0,02 (9)	3,4
SP4	2,0 ± 0,05 (2)	0,47 ± 0,01 (2)	0,14 ± 0,001 (1)	0,29 ± 0,03 (9)	0,050 ± 0,001 (2)	0,11 ± 0,005 (4)	0,19 ± 0,03 (16)	3,2
SP5	2,0 ± 0,03 (1)	0,47 ± 0,002 (<1)	0,14 ± 0,011 (7)	0,33 ± 0,01 (3)	0,051 ± 0,0005 (1)	0,12 ± 0,002 (2)	0,20 ± 0,01 (5)	3,3
SP6	1,6 ± 0,06 (4)	0,44 ± 0,01 (2)	0,12 ± 0,004 (3)	0,24 ± 0,04 (17)	0,043 ± 0,003 (8)	0,11 ± 0,002 (2)	0,17 ± 0,002 (1)	2,8
SP7	1,7 ± 0,02 (1)	0,46 ± 0,01 (2)	0,13 ± 0,003 (2)	0,26 ± 0,03 (11)	0,045 ± 0,003 (6)	0,11 ± 0,001 (1)	0,18 ± 0,001 (1)	2,9
SP8	1,7 ± 0,01 (1)	0,45 ± 0,01 (2)	0,12 ± 0,002 (2)	0,25 ± 0,01 (5)	0,041 ± 0,0003 (1)	0,11 ± 0,001 (1)	0,18 ± 0,01 (4)	2,8
SP9	1,6 ± 0,16 (10)	0,44 ± 0,03 (7)	0,13 ± 0,007 (6)	0,22 ± 0,02 (7)	0,041 ± 0,002 (5)	0,10 ± 0,007 (7)	0,19 ± 0,03 (16)	2,7

Anhang

Tabelle A 10: Konzentrationen der Enantiomere von (-)-Epicatechin, (-)-Catechin und (+)-Catechin in den Proben einer Schokoladenherstellung der enantioselektiven Analyse mit Kapillarelektrophorese.

	(-)-Epicat mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	(-)-Cat mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	(+)-Cat mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)
Ghana/SP1	1,4 ± 0,2 (10)	0,03 ± 0,001 (2)	0,030 ± 0,002 (7)
SP2	2,1 ± 0,3 (13)	0,04 ± 0,0001 (<1)	0,040 ± 0,003 (7)
SP3	2,1 ± 0,1 (4)	0,04 ± 0,001 (3)	0,044 ± 0,01 (22)
SP4	1,7 ± 0,1 (7)	0,12 ± 0,003 (2)	0,027 ± 0,003 (13)
SP5	1,7 ± 0,03 (2)	0,18 ± 0,004 (2)	0,028 ± 0,004 (14)
SP6	1,3 ± 0,1 (10)	0,20 ± 0,024 (12)	0,033 ± 0,004 (12)
SP7	1,3 ± 0,1 (6)	0,20 ± 0,01 (5)	0,033 ± 0,001 (4)
SP8	1,2 ± 0,1 (7)	0,21 ± 0,019 (9)	0,034 ± 0,003 (8)
SP9	1,1 ± 0,3 (23)	0,20 ± 0,046 (23)	0,034 ± 0,004 (11)

Tabelle A 11: Konzentrationen der Quercetinglykoside in den Proben einer Schokoladenherstellung der HPLC-DAD-Analysen.

	Q-gal mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	Q-glc mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	Q-arab mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	Q-glyk
Ghana/SP1	0,011 ± 0,0001 (1)	0,047 ± 0,00002 (<1)	0,057 ± 0,001 (3)	0,115
SP2	0,013 ± 0,0001 (1)	0,049 ± 0,003 (5)	0,061 ± 0,002 (3)	0,123
SP3	0,014 ± 0,0007 (5)	0,056 ± 0,0003 (1)	0,069 ± 0,0001 (<1)	0,138
SP4	0,014 ± 0,001 (8)	0,053 ± 0,0033 (6)	0,064 ± 0,002 (2)	0,131
SP5	0,013 ± 0,0001 (1)	0,053 ± 0,0008 (1)	0,062 ± 0,0001 (<1)	0,129
SP6	0,011 ± 0,002 (18)	0,049 ± 0,00004 (<1)	0,059 ± 0,002 (4)	0,119
SP7	0,014 ± 0,002 (11)	0,049 ± 0,0008 (2)	0,057 ± 0,003 (5)	0,119
SP8	0,012 ± 0,0001 (1)	0,044 ± 0,003 (6)	0,054 ± 0,003 (6)	0,110
SP9	0,011 ± 0,002 (13)	0,042 ± 0,004 (9)	0,052 ± 0,004 (9)	0,105

Alkalisierungsproben

Tabelle A 12: Konzentrationen der Flavanole eines nicht alkalisierten Kakaopulvers und von unterschiedlich stark alkalisierten Kakaopulvern der HPLC-DAD-Analysen.

	Epicat mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	Cat mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	proc B2 mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	proc C1 mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	Flavane nole
nicht alkalis. KP	2,21 ± 0,03 (2)	0,71 ± 0,01 (2)	1,13 ± 0,05 (4)	0,67 ± 0,03 (5)	4,71
alkalis. KP	0,45 ± 0,03 (7)	0,52 ± 0,001 (<1)	0,15 ± 0,008 (5)		1,13
S7	0,73 ± 0,09 (13)	0,64 ± 0,07 (11)	0,37 ± 0,039 (11)		1,73
S75	0,58 ± 0,03 (4)	0,72 ± 0,03 (4)	0,20 ± 0,003 (1)		1,51
SR7	0,28 ± 0,04 (16)	0,47 ± 0,08 (16)	0,10 ± 0,01 (11)		0,85
S8	0,76 ± 0,11 (15)	0,70 ± 0,07 (10)	0,35 ± 0,03 (9)		1,81

Tabelle A 13: Konzentrationen der Quercetinglykoside eines nicht alkalisierten Kakaopulvers und von unterschiedlich stark alkalisierten Kakaopulvern der HPLC-DAD-Analysen.

	Q-gal mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	Q-glc mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	Q-arab mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	Q-glyk
nicht alkalis. KP	0,017 ± 0,001 (4)	0,053 ± 0,004 (8)	0,072 ± 0,00005 (<1)	0,142
alkalis. KP		0,027 ± 0,002 (8)	0,028 ± 0,002 (5)	0,055
S7	0,007 ± 0,0002 (2)	0,027 ± 0,002 (8)	0,028 ± 0,001 (3)	0,062
S75	0,008 ± 0,0003 (4)	0,022 ± 0,002 (7)	0,027 ± 0,001 (4)	0,056
SR7	0,006 ± 0,001 (11)	0,014 ± 0,001 (4)	0,020 ± 0,001 (4)	0,041
S8	0,009 ± 0,001 (8)	0,028 ± 0,003 (9)	0,032 ± 0,001 (3)	0,069

Anhang

Tabelle A 14: Konzentrationen der *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren eines nicht alkalisierten Kakaopulvers und von unterschiedlich stark alkalisierten Kakaopulvern der HPLC-DAD-Analysen.

	K-asp mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	pC-asp mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	F-asp mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	K-OHtyr mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	pC-OHtyr mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	K-tyr mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	pC-tyr mg/g ff TM ± SD (rel. SD %)	NPA
nicht alkalis. KP	1,13 ± 0,01 (1)	0,25 ± 0,001 (<1)	0,10 ± 0,004 (4)	0,17 ± 0,002 (1)	0,009 ± 0,002 (22)	0,076 ± 0,0007 (1)	0,14 ± 0,003 (2)	1,87
alkalis. KP	0,28 ± 0,003 (1)	0,09 ± 0,0004 (<1)	0,04 ± 0,002 (4)	0,039 ± 0,002 (6)	n.q.	0,031 ± 0,001 (3)	0,03 ± 0,002 (8)	0,50
S7	0,70 ± 0,06 (8)	0,21 ± 0,014 (7)	0,08 ± 0,005 (6)	0,097 ± 0,006 (6)	0,002 ± 0,0003 (14)	0,064 ± 0,003 (5)	0,11 ± 0,017 (16)	1,27
S75	0,53 ± 0,02 (4)	0,13 ± 0,004 (3)	0,06 ± 0,001 (2)	0,092 ± 0,003 (3)	0,004 ± 0,0002 (7)	0,053 ± 0,0002 (<1)	0,09 ± 0,004 (5)	0,97
SR7	0,48 ± 0,05 (10)	0,11 ± 0,01 (10)	0,06 ± 0,005 (8)	0,085 ± 0,007 (8)	n.q.	0,046 ± 0,006 (13)	0,08 ± 0,001 (2)	0,87
S8	0,62 ± 0,03 (6)	0,21 ± 0,013 (6)	0,08 ± 0,003 (3)	0,094 ± 0,003 (3)	0,002 ± 0,0005 (21)	0,063 ± 0,004 (7)	0,12 ± 0,011 (9)	1,19

Abkürzungen

Kurzbezeichnungen für Substanzen und Substanzklassen

Flavanole	Summe aller quantifizierter Flavanole
NPA	Summe aller quantifizierter <i>N</i> -Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren
Q-glyk	Summe aller quantifizierter Quercetinglykoside
Cat	Catechin
Epicat	Epicatechin
proc B2	Procyanidin B2
proc B5	Procyanidin B5
proc C1	Procyanidin C1
proc Tri1	Procyanidin Trimer1, unbekannte Molekülstruktur
proc D	Procyanidin D
K-asp	<i>trans</i> -Kaffeensäureaspartat
pC-asp	<i>trans</i> -p-Coumarsäureaspartat
F-asp	<i>trans</i> -Ferulasäureaspartat
K-OHtyr	<i>trans</i> -Kaffeensäurehydroxytyrosin
pC-OHtyr	<i>trans</i> -p-Coumarsäurehydroxytyrosin
K-tyr	<i>trans</i> -Kaffeensäuretyrosin
pC-tyr	<i>trans</i> -p-Coumarsäuretyrosin
Q-arab	Quercetinarabinosid
Q-glc	Quercetinglucosid
Q-gal	Quercetingalactosid

Abkürzungen und Symbole

AU bzw. mAU	Absorption Units, Absorptionseinheiten
CE	Kapillarelektrophorese
CIV	Elfenbeinküste
Da	Dalton
DAD	Diodenarray-Detektor
DMSO	Dimethylsulfoxid
ESI	Elektrospray-Ionisierung
ff TM	fettfreie Trockenmasse
FT-ICR-MS	Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometer
HCOOH	Ameisensäure
HPLC, LC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, Flüssigchromatographie
HRF	Heterocyclic Ring Fission
IR-Röstung	Infrarotröstung
IT-MS	Ionenfallen-MS (Ion trap)
KB	Kakaobohne
KP	Kakaopulver
LC-MS	Kopplung von Chromatographie und Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
mM	milli Molar
MS	Massenspektrometrie
MS ²	Fragmentspektrum des Molekülions
MS ³	Fragmentspektrum eines Fragments

Abkürzungen und Symbole

MW	Mittelwert
n	Anzahl an Proben
n.q.	nicht quantifizierbar
NO	Stickstoffmonoxid
NP	Normalphasenchromatographie
PLE	Beschleunigte Lösungsmittlextraktion
QM	Quinone-Methide, Bruch der Interflavanspaltung
RDA	Retro-Diels-Alder
rel. SD	Relative Standardabweichung
PA	Polyamid
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RP	Umkehrphasenchromatographie
RT	Retentionszeit
SD	Standardabweichung
SPE	Festphasenextraktion
SRM	Selected Reaction Monitoring
TQD-MS	Triple-Quadrupol-Massenspektrometer
UHPLC	Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ZDS	Zentralfachschule der Deutschen Süßwarenwirtschaft
λ_{\max}	Absorptionsmaxima

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Kakaoschoten verschiedener Kakaotypen (modifizierte Darstellung nach Rhosius et al., 2010).....	2
Abbildung 1.2: Zusammensetzung verschiedener Schokoladentypen (nach Roth, 2005 und KakaoV, 2003).....	6
Abbildung 1.3: Durchschnittliche Procyanidingehalte (Monomere bis Decamere) mit Schwankungsbreiten (minimaler und maximaler Wert von n Proben) von verschiedenen Lebensmittel je Verzehrportion (modifizierte Darstellung nach Gu et al., 2006 und Hammerstone et al., 2000).....	8
Abbildung 1.4: Strukturformeln der Catechine.....	9
Abbildung 1.5: Vorgeschlagener Mechanismus der enzymatisch katalysierten oder pH-Wert bzw. Temperatur induzierten Epimerisierungsreaktion von (-)-Epicatechin zu (-)-Catechin (Ellis et al., 1983).....	10
Abbildung 1.6: Strukturformeln der mengenmäßig dominanten Procyanidine in Kakao.....	11
Abbildung 1.7: Strukturformeln der mengenmäßig dominanten <i>N</i> -Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren in Kakao.....	13
Abbildung 1.8: Strukturformeln der Quercetinglykoside in Kakao.....	14
Abbildung 2.1: Extraktgehalte von Flavanolen, <i>N</i> -Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetinglykosiden in Aceton und Methanol bzw. deren wässrige Mischungen.....	25
Abbildung 2.2: Extraktgehalte der Extraktionen von 10, 15 und 20 Minuten und prozentuale Steigerung des Extraktgehaltes, bezogen auf den Extraktgehalt von 10 min.....	27
Abbildung 2.3: Extraktgehalte von zwei Extraktionszyklen und der daraus summierte Gesamtextrakt.....	27
Abbildung 2.4: Eluatgehalte von Flavanolen, <i>N</i> -Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetinglykosiden verschiedener Lösungsmittel von der Polyamidkartusche.....	29
Abbildung 2.5: Kapazität der Polyamidkartusche (1000 mg/6 mL) für Epicat, proc B2, K-asp und Q-glc.....	30
Abbildung 2.6: Extraktgehalte von Epicat, proc B2, K-asp und Q-glc, in Abhängigkeit des Acetongehaltes der Probenlösung.....	31
Abbildung 2.7: Lösungsmittelvolumina zur Elution der Kakaoanalyten von der Polyamidkartusche (1000 mg/6 mL).....	32
Abbildung 2.8: Zur Quantifizierung verwendete HPLC-Trennung eines Extraktes der fermentierten Kakaobohnen Java1.....	35
Abbildung 2.9: Elektropherogramme eines Extraktes der fermentierten Kakaobohnen Java1 und der Standardverbindungen (-)/(+)-Catechin und (-)-Epicatechin.....	36
Abbildung 2.10: Massenspur m/z 289 von Catechin und Epicatechin der enantioselektiven LC-MS-Trennung von Extrakten der ungerösteten und gerösteten Kakaobohnen Java1.....	38
Abbildung 2.11: HPLC-UV-Chromatogramme eines Extraktes der fermentierten Kakaobohnen Java1 bei 280, 320 und 360 nm. Die Nummerierung der Substanzpeaks bezieht sich auf Tabelle 2.5, S. 42.....	43
Abbildung 2.12: UV-Absorptionsspektrum von Flavanolen (Bindungstypabhängig).....	44

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.13: Fragmentierung von Procyanidin B2 (modifizierte Darstellung nach Gu et al., 2003a).....	48
Abbildung 2.14: IT-MS-Fragmentspektren von Procyanidin B-Typ Dimeren (A) und dimeren B-Typ Dehydrocatechinen (B, C).....	49
Abbildung 2.15: FT-ICR-Massenspuren der einfach (oben, $[M-H]^-$ 1441,3253) und zweifach (unten, $[M-2H]^{2-}$ 720,1590) geladenen Procyanidin B-Typ Pentamere.....	51
Abbildung 2.16: Isotopenverteilung eines zweifach ionisierten heptameren (links $[M-2H]^{2-}$ 1008,7263) und eines dreifach ionisierten octameren (rechts $[M-3H]^{3-}$ 767,8336) B-Typ Procyanidins (FT-ICR-MS-Analyse).....	52
Abbildung 2.17: Absorptionsspektrum und mögliche Strukturformel des A-Typ Dehydrocatechins.	54
Abbildung 2.18: IT-MS-Fragmentspektrum von $[M-H]^-$ 561 und Darstellung der Struktur eines möglichen B-Typ Propelargonidin Dimers und mögliche Fragmentierungen.....	57
Abbildung 2.19: IT-MS-Fragmentspektren von monomeren Flavanolglykosiden mit $[M-H]^-$ 435 und $[M-H]^-$ 451 sowie Molekülvorschläge und mögliche Fragmentierungen.....	59
Abbildung 2.20: IT-MS-Fragmentspektrum von $[M-H]^-$ 605 mit einer möglichen Molekülstruktur und Vinyl(epi)catechinfragment (dargestellt als Neutralverlust von 316 Da).	63
Abbildung 2.21: IT-MS-Fragmentspektren von <i>trans</i> -Kaffeensäureaspartat mit Strukturformel und möglicher Fragmentierung.	65
Abbildung 2.22: UV-Absorptionsspektren von <i>cis</i> - und <i>trans</i> -Kaffeensäureaspartat.	66
Abbildung 2.23: IT-MS-Fragmentspektren von <i>trans</i> -Kaffeensäuretyrosin mit Strukturformel und möglicher Fragmentierung.	68
Abbildung 2.24: Absorptionsspektren von <i>trans</i> -Kaffeensäuretyrosin und <i>trans</i> -p-Coumar-säurehydroxytyrosin.	68
Abbildung 2.25: HPLC-VIS-Chromatogramm eines Extraktes unfermentierter Kakaobohnen, bei 520 nm.	73
Abbildung 2.26: Konzentrationen von Flavanolen, <i>N</i> -Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetinglykosiden (Sekundärachse) von ungerösteten und bei verschiedenen Temperaturen gerösteten Kakaobohnen Java1 sowie prozentuale Anteile (bezogen auf die ungerösteten KB).....	82
Abbildung 2.27: Substanzgruppen-Profile der Flavane (nach Polymerisationsgrad), <i>N</i> -Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetinglykoside von ungerösteten und bei verschiedenen Temperaturen gerösteten Kakaobohnen Java1.....	83
Abbildung 2.28: Konzentrationen von Epicatechin und Catechin der enantioselektiven (unten) und nicht enantioselektiven (oben) Analyse von ungerösteten und bei verschiedenen Temperaturen gerösteten Kakaobohnen Java1.	85
Abbildung 2.29: Konzentrationsverhältnisse von Catechin zu Epicatechin und von (-)-Catechin zu (-)-Epicatechin von ungerösteten und bei verschiedenen Temperaturen gerösteten Kakaobohnen Java1.....	86
Abbildung 2.30: Konzentrationen von monomeren und dimeren Flavanolen von ungerösteten und bei verschiedenen Temperaturen gerösteten Kakaobohnen Java1.....	88
Abbildung 2.31: SRM-Massenspuren (m/z 577→289, m/z 865→577) von ungerösteten und gerösteten KB von der Elfenbeinküste. Peaknummern beziehen sich auf Tabelle 2.22, S. 91.....	90

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.32: Flavanolkonzentrationen und Cat/Epicat-Verhältnisse (Sekundärachse) von ungerösteten und bei verschiedenen Temperaturen gerösteten Kakaobohnen Java1.	92
Abbildung 2.33: Flavanolkonzentrationen und Cat/Epicat-Verhältnisse von ungerösteten und bei verschiedenen Temperatur-Zeit-Kombinationen gerösteten KB Java1.	93
Abbildung 2.34: Zusammenhang der Flavanolkonzentrationen und des Cat/Epicat-Verhältnisses von ungerösteten und bei verschiedenen Temperaturen gerösteten Kakaobohnen Java1.....	93
Abbildung 2.35: Konzentrationen von monomeren und dimeren Flavanolen von drei ungerösteten und den jeweils gerösteten Kakaobohnen (Ergebnisse der Analyse mit UHPLC-UV-DAD-TQD-MS, Kapitel 2.3.2.2).....	96
Abbildung 2.36: Flavanolkonzentrationen und Cat/Epicat-Verhältnisse (Sekundärachse) in verschiedenen Proben einer Schokoladenherstellung.....	99
Abbildung 2.37: Flavanolkonzentrationen und prozentuale Veränderungen eines nicht alkalisierten Kakaopulvers und von unterschiedlich stark alkalisierten Kakaopulvern.	101
Abbildung 2.38: Substanzgruppen-Profil von <i>N</i> -Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren eines nicht alkalisierten Kakaopulvers und von unterschiedlich stark alkalisierten Kakaopulvern.	103
Abbildung 2.39: Quercetinglykosid-Konzentrationen und prozentuale Veränderungen eines nicht alkalisierten Kakaopulvers und von unterschiedlich stark alkalisierten Kakaopulvern.	104
Abbildung 2.40: Strukturformeln der Flavanoglykoside in Orangensäften.	106
Abbildung 2.41: Trennung der Flavanoglykosid-Diastereomere in einem Orangensaftextrakt nach Ritter (2010b) (links) und nach der für diese Arbeit modifizierten Trennmethode (rechts).....	107
Abbildung 2.42: Mittelwerte der Peakflächenverhältnisse von Hesperidin 2S/2R der drei Direktsäfte und der korrespondierenden Konzentrate (n=3).	109
Abbildung 2.43: Peakflächenverhältnis Hesperidin 2S/2R der Orangen, Säfte und Konzentrate. (Box: Bereich zwischen 25. und 50. Perzentil, getrennt von Median. Fehlerbalken stellen den größten und den kleinsten Wert dar, der nicht Ausreißer ist. ○ Ausreißer, der mehr als 1,5 Boxlängen vom oberen bzw. unteren Quartilswert entfernt ist.)	110

Abbildungen im Anhang

Abbildung A 1: Summierte Peakflächen von Flavanolen, <i>N</i> -Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetinglykosiden der Aceton-Wasser-Mischungen.....	134
Abbildung A 2: Extraktgehalte von Cat, proc C1, pC-asp und Q-arab, in Abhängigkeit des Acetongehaltes der Probenlösung.	134
Abbildung A 3: Elutionsprofile verschiedener SPE-Kartuschenmaterialien eines Extraktes der fermentierten Kakaobohnen Java1 (Elutionsmittel: DMSO/HCOOH; 99,9/0,1; v+v).....	135
Abbildung A 4: HPLC-VIS-Chromatogramme der Extrakte von drei fermentierten Kakaobohnen (Java1, Java2 und Elfenbeinküste) bei 520 nm.	153
Abbildung A 5: Kakaobohnen (Java1, Java2 und Elfenbeinküste) der Röstversuche.....	156
Abbildung A 6: Chargenröster im Labormaßstab der Maschinenfabrik F.B. Lehmann.	157
Abbildung A 7: Konzentrationen von Flavanolen, <i>N</i> -Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetinglykosiden in unfermentierten Kakaobohnen.	158

Abbildungsverzeichnis

Abbildung A 8: Konzentrationen von Flavanolen, <i>N</i> -Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetinglykosiden in fermentierten Kakaobohnen.	160
Abbildung A 9: Konzentrationen von Flavanolen, <i>N</i> -Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetinglykosiden in ungerösteten und den unter gleichen Bedingungen (150 °C/30 min) an zwei verschiedenen Terminen gerösteten Kakaobohnen.	161
Abbildung A 10: TQD-MS-Fragmentspektren von $[M-H]^-$ 577 der Procyanidin Dimere B2, B5, Di1 und Di2 des Produktionenscans.....	162
Abbildung A 11: Substanzgruppen-Profile von Flavanolen (nach Polymerisationsgrad), <i>N</i> -Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetinglykosiden von drei ungerösteten und den jeweils gerösteten Kakaobohnen.	163
Abbildung A 12: Konzentrationen von Flavanolen, <i>N</i> -Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetinglykosiden (Sekundärachse) in verschiedenen Proben einer Schokoladenherstellung.....	168
Abbildung A 13: Substanzgruppen-Profile von Flavanolen, <i>N</i> -Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetinglykosiden in verschiedenen Proben einer Schokoladenherstellung.	168

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Übersicht der quantifizierten Verbindungen aus drei Substanzgruppen, mit den in dieser Arbeit verwendeten Kurzbezeichnungen.	22
Tabelle 2.2: Verschiedene Vermahlungsmethoden mit prozentualen Extraktgehalten (bezogen auf M0=100%) und den relativen Standardabweichungen.	23
Tabelle 2.3: Prozentuale Extraktgehalte nach der Aufreinigung und Aufkonzentrierung mit Polyamid-Festphasenextraktion verglichen mit dem Rohextrakt.	33
Tabelle 2.4: Relative Standardabweichungen der Retentionszeiten und Peakflächen der quantifizierten Substanzen, aus drei Probenaufarbeitungen innerhalb eines Tages sowie von drei aufeinanderfolgenden Wochen.	34
Tabelle 2.5: Substanzzuordnung der phenolischen Verbindungen in den HPLC-UV-Chromatogrammen der IT-MS-Analyse eines Extraktes der Kakaobohnen Java1.	42
Tabelle 2.6: IT-MS- und UV-DAD-Daten von Catechin und Epicatechin im Extrakt der fermentierten Kakaobohnen Java1.	44
Tabelle 2.7: FT-ICR-MS-Daten von Flavanolen und Flavanolderivaten im Extrakt der fermentierten Kakaobohnen Java1. Mit einem Stern gekennzeichnete Verbindungen konnten zusätzlich mit IT-MS-Daten, für mindestens ein Isomer, charakterisiert werden.	45
Tabelle 2.8: IT-MS- und UV-DAD-Daten von B-Typ Procyanidinen und Dehydrocatechinen im Extrakt der fermentierten Kakaobohnen Java1.	46
Tabelle 2.9: IT-MS- und UV-DAD-Daten von A-Typ Procyanidinen und Dehydrocatechinen im Extrakt der fermentierten Kakaobohnen Java1.	53
Tabelle 2.10: IT-MS- und UV-DAD-Daten von A- und B-Typ Prodelphinidinen im Extrakt der fermentierten Kakaobohnen Java1.	56
Tabelle 2.11: IT-MS- und UV-DAD-Daten von Procyanidin- und Propelargonidinglykosiden im Extrakt der fermentierten Kakaobohnen Java1.	60
Tabelle 2.12: IT-MS- und UV-DAD-Daten von Ethyl(epi)catechinen im Extrakt der fermentierten Kakaobohnen Java1.	62
Tabelle 2.13: FT-ICR-MS-Daten von <i>N</i> -Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren im Extrakt der fermentierten Kakaobohnen Java1. Mit einem Stern gekennzeichnete Verbindungen konnten zusätzlich mit IT-MS-Daten, für mindestens ein Isomer, charakterisiert werden.	64
Tabelle 2.14: IT-MS- und UV-DAD-Daten von <i>N</i> -Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren mit Aspartat und Glutamat im Extrakt der fermentierten Kakaobohnen Java1.	67
Tabelle 2.15: IT-MS- und UV-DAD-Daten von <i>N</i> -Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren mit Tyrosin und Hydroxytyrosin im Extrakt der fermentierten Kakaobohnen Java1.	69
Tabelle 2.16: IT-MS- und UV-DAD-Daten von Quercetin und Quercetinglykosiden im Extrakt der fermentierten Kakaobohnen Java1.	71
Tabelle 2.17: IT-MS- und UV-DAD-Daten von Anthocyanen im Extrakt unfermentierter Kakaobohnen.	73
Tabelle 2.18: Konzentrationen von Flavanolen, <i>N</i> -Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetinglykosiden als Mittelwerte mit Spannweiten von unfermentierten und fermentierten Kakaobohnen. Prozentualer Vergleich der Mittelwerte von fermentierten zu unfermentierten Kakaobohnen.	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.19: Konzentrationen von (-)-Epicatechin, (+)-Catechin und (-)-Catechin in fermentierten Kakaobohnen.	77
Tabelle 2.20: Relative Standardabweichungen (rel. SD %) der quantifizierten Substanzen von insgesamt vier Röstungen (150 °C/30 min) an zwei verschiedenen Terminen.	80
Tabelle 2.21: Theoretisch mögliche Epimerisierungsprodukte der Dimere B1, B2 und B5.	87
Tabelle 2.22: Peakflächen von dimeren und trimeren Procyanidinen in ungerösteten und gerösteten Kakaobohnen von der Elfenbeinküste.....	91
Tabelle 2.23: Konzentrationen von Flavanolen, <i>N</i> -Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetinglykosiden sowie das Cat/Epicat-Verhältnis von drei ungerösteten und den jeweils gerösteten Kakaobohnen. Prozentuale Anteile (bezogen auf die ungerösteten KB).	95
Tabelle 2.24: Konzentrationen von Flavanolen, <i>N</i> -Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren und Quercetinglykosiden sowie Cat/Epicat-Verhältnisse eines nicht alkalisierten Kakaopulvers und von unterschiedlich stark alkalisierten Kakaopulvern.....	100
Tabelle 2.25: Cat/Epicat-Verhältnisse verschiedener Verarbeitungsgrade.	102
Tabelle 4.1: Zusammenfassende Übersicht der untersuchten Kakaoproben verschiedener Verarbeitungsstufen. ^a	113
Tabelle 4.2: Zusammenfassung der 83 definierten Orangensaft- und Konzentrat-Proben.....	114

Tabellen im Anhang

Tabelle A 1: Vollständige Liste der Kakao-Verarbeitungsproben mit Angaben zur Charakterisierung der Proben.....	154
Tabelle A 2: Konzentrationen von (-)-Epicatechin, (-)-Catechin und (+)-Catechin in unfermentierten Kakaobohnen der enantioselektiven Analyse mit Kapillarelektrophorese.....	159
Tabelle A 3: Konzentrationen der Flavanole in den Kakaoproben der Röstversuche der HPLC-DAD-Analysen.....	164
Tabelle A 4: Konzentrationen der Flavanole in den Kakaoproben der Röstversuche der UHPLC-UV-DAD-TQD-MS-Analysen.....	165
Tabelle A 5: Konzentrationen von (-)-Epicatechin, (-)-Catechin und (+)-Catechin in den Kakaoproben der Röstversuche der enantioselektiven Analyse mit Kapillarelektrophorese.	166
Tabelle A 6: Konzentrationen der Quercetinglykoside in den Kakaoproben der Röstversuche der HPLC-DAD-Analysen.....	166
Tabelle A 7: Konzentrationen der <i>N</i> -Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren in den Kakaoproben der Röstversuche der HPLC-DAD-Analysen.....	167
Tabelle A 8: Konzentrationen der Flavanole in den Proben einer Schokoladenherstellung der HPLC-DAD-Analysen.....	169
Tabelle A 9: Konzentrationen der <i>N</i> -Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren in den Proben einer Schokoladenherstellung der HPLC-DAD-Analysen.....	169
Tabelle A 10: Konzentrationen der Enantiomere von (-)-Epicatechin, (-)-Catechin und (+)-Catechin in den Proben einer Schokoladenherstellung der enantioselektiven Analyse mit Kapillarelektrophorese.....	170

Tabellenverzeichnis

Tabelle A 11: Konzentrationen der Quercetinglykoside in den Proben einer Schokoladenherstellung der HPLC-DAD-Analysen.....	170
Tabelle A 12: Konzentrationen der Flavanole eines nicht alkalisierten Kakaopulvers und von unterschiedlich stark alkalisierten Kakaopulvern der HPLC-DAD-Analysen.	171
Tabelle A 13: Konzentrationen der Quercetinglykoside eines nicht alkalisierten Kakaopulvers und von unterschiedlich stark alkalisierten Kakaopulvern der HPLC-DAD-Analysen.	171
Tabelle A 14: Konzentrationen der <i>N</i> -Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren eines nicht alkalisierten Kakaopulvers und von unterschiedlich stark alkalisierten Kakaopulvern der HPLC-DAD-Analysen.	172

Literaturverzeichnis

- Adamson, G. E., A., L. S., Mitchell, A. E., Prior, R. L., Cao, G., Jacobs, P. H., et al. (1999). HPLC Method for the Quantification of Procyanidins in Cocoa and Chocolate Samples and Correlation to Total Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, S. 4184–4188.
- Aikpokpodion, P. E., und Dongo, L. N. (2010). Effects of fermentation intensity on polyphenols and antioxidant capacity of cocoa beans. *International Journal of Sustainable Crop Production*, 5, S. 66-70.
- Andrés-Lacueva, C., Lamuela-Raventós, R. M., Jáuregui, O., Casals, I., Izquierdo-Pulido, M., und Permanyer, J. (2000). An LC Method for the Analysis of Cocoa Phenolics. *LC GC Europe*, 13, S. 902–904.
- Andrés-Lacueva, C., Monagas, M., Khan, N., Izquierdo-Pulido, M., Urpi-Sarda, M., Permanyer, J., et al. (2008). Flavanol and Flavonol Contents of Cocoa Powder Products: Influence of the Manufacturing Process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, S. 3111–3117.
- Appeldoorn, M. M., Vincken, J.-P., Sanders, M., Hollman, P. C., und Gruppen, H. (2009). Combined Normal-Phase and Reversed-Phase Liquid Chromatography/ESI-MS as a Tool To Determine the Molecular Diversity of A-type Procyanidins in Peanut Skins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, S. 6007–6013.
- Arlorio, M., Locatelli, M., Travaglia, F., Coisson, J.-D., Del Grosso, E., Minassi, A., et al. (2008). Roasting impact on the contents of clovamide (N-caffeoyl-L-DOPA) and the antioxidant activity of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *Food Chemistry*, 106, S. 967–975.
- Aron, P. M., und Kennedy, J. A. (2008). Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52, S. 79–104.
- Asztemborska, M., und Żukowski, J. (2006). Determination of diastereomerization barrier of some flavanones by high-performance liquid chromatography methods. *Journal of Chromatography A*, 1134, S. 95–100.
- Baba, S., Osakabe, N., Yasuda, A., Natsume, M., Takizawa, T., Nakamura, T., et al. (2000). Bioavailability of (-)-Epicatechin Upon Intake of Chocolate and Cocoa in Human Volunteers. *Free Radical Research*, 33, S. 635–641.
- Bayard, V., Chamorro, F., Motta, J., und Hollenberg, N. K. (2007). Does Flavanol Intake Influence Mortality from Nitric Oxide-Dependent Processes? Ischemic Heart Disease, Stroke, Diabetes Mellitus, and Cancer in Panama. *International Journal of Medical Science*, 4, S. 53–58.
- Beckett, S. T. (2008). *The Science of Chocolate, 2nd Edition*. Kapitel 1-3, S. 1-58. Cambridge, UK: RSC Publishing.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., und Schieberle, P. (2008a). *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Kapitel 21, S. 969-1003. Berlin: Springer.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., und Schieberle, P. (2008b). *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Kapitel 18, S. 831-888. Berlin: Springer.
- Bernaert, H., Blondeel, I., Allegaert, L., und Lohmueller, T. (2011). Industrial Treatment of Cocoa in Chocolate Produktion: Health Implications. In R. Paoletti, A. Poli, A. Conti, und F. Visoli, *Chocolate and Health*. Kapitel 2, S. 17-31, Mailand: Springer-Verlag.
- Bisson, J.-F., Nejdi, A., Rozan, P., Hidalgo, S., R., L., und Messaoudi, M. (2008). Effects of long-term administration of a cocoa polyphenolic extract (Acticoa powder) on cognitive performances in aged rats. *British Journal of Nutrition*, 100, S. 94–101.

- Crozier, A., Del Rio, D., und Clifford, M. N. (2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds Review. *Molecular Aspects of Medicine* , 31, S. 446–467.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., und Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Products Report* , 26, S. 1001–1043.
- Crozier, S. J., Preston, A. G., Hurst, W. J., Payne, M. J., Mann, J., Hainly, L., et al. (2011). Cacao seeds are a "Super Fruit": A comparative analysis of various fruit powders and products. *Chemistry Central Journal* , 5, S. 5.
- Cuyckens, F., und Claeys, M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry* , 39, S. 1–15.
- Delle Monache, F., Ferrari, F., Poce-Tucci, A., und Marini-Bettolo, G. B. (1972). Catechins with (+)-epi-configuration in nature. *Phytochemistry* , 11, S. 2333–2335.
- Deprez, S., Mila, I., Huneau, J.-F., Tome, D., und Scalbert, A. (2001). Transport of Proanthocyanidin Dimer, Trimer, and Polymer Across Monolayers of Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cells. *Antioxidants & Redox Signaling* , 3, S. 957–967.
- Desch, S., Schmidt, J., Kobler, D., Sonnabend, M., Eitel, I., Sareban, M., et al. (2009). Effect of Cocoa Products on Blood Pressure: Systematic Review and Meta-Analysis. *American Journal of Hypertension* , 23, S. 97–103.
- Dillinger, T. L., Barriga, P., Escárcega, S., Jimenez, M., Salazar Lowe, D., und Grivetti, L. E. (2000). Food of the Gods: Cure for Humanity? A Cultural History of the Medicinal and Ritual Use of Chocolate. *The Journal of Nutrition* , 130, S. 2057–2072.
- Ding, E. L., Hutfless, S. M., Ding, X., und Girotra, S. (2006). Chocolate and Prevention of Cardiovascular Disease: A Systematic Review. *Nutrition & Metabolism* , 3:2.
- Dixon, R. A., Xie, D.-Y., und Sharma, S. B. (2005). Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research? *New Phytologist* , 165, S. 9–28.
- Ellinger, S., Reusch, A., Stehle, P., und Helfrich, H.-P. (2012). Epicatechin ingested via cocoa products reduces blood pressure in humans: a nonlinear regression model with a Bayesian approach. *American Journal of Clinical Nutrition* , 95, S. 1365–1377.
- Ellis, C. J., Yeap Foo, L., und Porter, L. J. (1983). Enantiomerism: A characteristic of the proanthocyanidin chemistry of the monocotyledonae. *Phytochemistry* , 22, S. 483–487.
- Elwers, S., Zambrano, A., Rohsius, C., und Lieberei, R. (2009). Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (*Theobroma cacao* L.). *European Food Research and Technology* , 229, S. 937-948.
- Engelhardt, H., Beck, W., und Schmitt, T. (1994). *Kapillarelektrophorese, Methoden und Möglichkeiten*. Braunschweig: Vieweg.
- Esatbeyouglu, T., und Winterhalter, P. (2010). Preparation of Dimeric Procyanidins B1, B2, B5 and B7 from a Polymeric Procyanidin Fraction of Black Chokeberry (*Aronia melancocarpa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 58, S. 5147–5153.
- Escribano-Bailón, M. T., und Santos-Buelga, C. (2003). Polyphenol Extraction from Foods. In C. Santos-Buelga, und G. Williamson (Hrsg.), *Methods in Polyphenol Analysis*. Kapitel 1, S. 1-12, Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Es-Safi, N.-E., Fulcrand, H., Cheynier, V., und Moutounet, M. (1999). Competition between (+)-Catechin and (–)-Epicatechin in Acetaldehyde-Induced Polymerization of Flavanols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 47, S. 2088–2095.
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., und Whitehouse, C. M. (1990). Electrospray ionization - principles and practice. *Mass Spectrometry Reviews* , 9, S. 37–70.

- Ferrerres, F., Gil-Izquierdo, A., Andrade, P. B., Valentao, P., und Tomás-Barberán, F. A. (2007). Characterization of C-glycosyl flavones O-glycosylated by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1161, S. 214–223.
- Forsyth, W. G. (1955). Cacao Polyphenolic Substances. *Biochemical Journal*, 60, S. 108–111.
- Forsyth, W. G., und Quesnel, V. C. (1957). Cacao Polyphenolic Substances. 4. The Anthocyanin pigments. *Biochemical Journal*, 65 (1), S. 177-179.
- Fraga, C. G. (2007). Plant polyphenols: How to Translate their in vitro Antioxidant Actions to in vivo Conditions. *IUBMB Life*, 59, S. 308–315.
- Friedrich, W., Eberhardt, A., und Galensa, R. (2000). Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry. *European Food Research and Technology*, 211, S. 56–64.
- Fulcrand, H., Mané, C., Preys, S., Mazerolles, G., Bouchut, C., Mazauric, J.-P., et al. (2008). Direct mass spectrometry approaches to characterize polyphenol composition of complex samples. *Phytochemistry*, 69, S. 3131–3138.
- Gaffield, W., Lundin, R. E., Gentili, B., und Horowitz, R. M. (1975). C-2 Stereochemistry of Naringin and Its Relation to Taste and Biosynthesis in Maturing Grapefruit. *Bioorganic Chemistry*, 4, S. 259–269.
- Geiss, F., Heinrich, M., Hunkler, D., und Rimpler, H. (1995). Proanthocyanidins with (+)-epicatechin units from *Byrsonima crassifolia* bark. *Phytochemistry*, 39, S. 635–643.
- Gel-Moreto, N. (2003a). Chirale Trennung von Polyphenolen in Citrus mittels Kapillarelektrophorese (CE) und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). *Dissertation, Universität Bonn*.
- Gel-Moreto, N., Streich, R., und Galensa, R. (2003b). Chiral separation of diastereomeric flavanone-7-O-glycosides in citrus by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 24, S. 2716–2722.
- Gil-Izquierdo, A., Gil, M. I., und Ferreres, F. (2002). Effect of Processing Techniques at Industrial Scale on Orange Juice Antioxidant and Beneficial Health Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, S. 5107–5114.
- Giusti, M. M., Rodríguez-Saona, L. E., Griffin, D., und Wrolstad, R. E. (1999). Electrospray and Tandem Mass Spectroscopy As Tools for Anthocyanin Characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, S. 4657–4664.
- Gotti, R., Furlanetto, S., Pinzauti, S., und Cavrini, V. (2006). Analysis of catechins in *Theobroma cacao* beans by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1112, S. 345–352.
- Grassi, D., Desideri, G., und Ferri, C. (2010). Blood pressure and cardiovascular risk: What about cocoa and chocolate? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501, S. 112–115.
- Griffiths, L. A. (1960). A Comparative Study of the Seed Polyphenols of the Genus *Theobroma*. *Biochemical Journal*, 74, S. 362–365.
- Griffiths, L. A. (1958). Phenolic Acids and Flavonoids of *Theobroma cacao* L. - Separation and Identification by Paper Chromatography. *Biochemical Journal*, 70, S. 120–125.
- Gu, L., House, S. E., Wu, X., Ou, B., und Prior, R. L. (2006). Procyanidin and Catechin Contents and Antioxidant Capacity of Cocoa and Chocolate Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, S. 4057–4061.
- Gu, L., Kelm, M. A., Hammerstone, J. F., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., et al. (2003b). Screening of Foods Containing Proanthocyanidins and Their Structural Characterization Using LC-MS/MS and Thiolytic Degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, S. 7513–7521.

- Gu, L., Kelm, M. A., Hammerstone, J. F., Zhang, Z., Beecher, G., Holden, J., et al. (2003a). Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric studies of proanthocyanidins in foods. *Journal of Mass Spectrometry* , 38, S. 1272-1280.
- Guiseppe, R., Di Castelnuovo, A., Centritto, F., Zito, F., Curtis, A. d., Costanzo, S., et al. (2008). Regular Consumption of Dark Chocolate Is Associated with Low Serum Concentrations of C Reactive Protein in a Healthy Italian Population. *The Journal of Nutrition* , 138, S. 1939-1945.
- Guyot, S., Vercauteren, J., und Cheynier, V. (1996). Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from (+)-catechin coupling catalysed by grape polyphenoloxidase. *Phytochemistry* , 42, S. 1279-1288.
- Ha, T. J., Lee, M.-H., Jeong, Y. N., Lee, J. H., Han, S.-I., Park, C.-H., et al. (2010). Anthocyanins in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp. ssp. *unguiculata*]. *Food Science and Biotechnology* , 19, S. 821-826.
- Hammerstone, J. F., Lazarus, S. A., und Schmitz, H. H. (2000). Procyanidin Content and Variation in Some Commonly Consumed Foods. *The Journal of Nutrition* , 130, S. 2086-2092.
- Hammerstone, J. F., Lazarus, S. A., Mitchell, A. E., Rucker, R., und Schmitz, H. H. (1999). Identification of Procyanidins in Cocoa (*Theobroma cacao*) and Chocolate Using High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 47, S. 490-496.
- Handrick, V., Vogt, T., und Frolov, A. (2010). Profiling of hydroxycinnamic acid amides in *Arabidopsis thaliana* pollen by tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* , 398, S. 2789-2801.
- Hansen, C. E., Olmo, M. d., und Burri, C. (1998). Enzyme Activities in Cocoa Beans During Fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* , 77, S. 273-281.
- Hatano, T., Miyatake, H., Natsume, M., Osakabe, N., Takizawa, T., Ito, H., et al. (2002). Proanthocyanidin glycosides and related polyphenols from cacao liquor and their antioxidant effects. *Phytochemistry* , 59, S. 749-758.
- Hayasaka, Y., und Asenstorfer, R. E. (2002). Screening for Potential Pigments Derived from Anthocyanins in Red Wine Using Nano-electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 50, S. 756-761.
- He, F., Pan, Q.-H., Shi, Y., und Duan, C.-Q. (2008). Biosynthesis and Genetic Regulation of Proanthocyanidins in Plants. *Molecules* , 13, S. 2674-2703.
- Hemingway, R. W., Foo, L. Y., und Porter, I. J. (1982). Linkage isomerism in Trimeric and Polymeric 2,3-cis-procyanidins. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* , S. 1209-1216.
- Hensel, A., Deters, A. M., Müller, G., Stark, T., Wittschier, N., und Hofmann, T. (2007). Occurrence of N-Phenylpropenoyl-L-amino Acid Amides in Different Herbal Drugs and their Influence on Human Keratinocytes, on Human Liver Cells and on Adhesion of *Helicobacter pylori* to the Human Stomach. *Planta Medica* , 73, S. 142-150.
- Höfler, F. (2000). *Beschleunigte Lösemittelextraktion (ASE)*. Idstein: Dionex.
- Hollenberg, N. K., Fisher, N. D., und McCullough, M. L. (2009). Flavanols, the Kuna, cocoa consumption, and nitric oxide. *Journal of the American Society of Hypertension* , 3, S. 105-112.
- Holt, R. R., Lazarus, S. A., Sullards, M. C., Zhu, Q. Y., Schramm, D. D., und Hammerstone, J. F. (2002). Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4 β -8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *American Journal of Clinical Nutrition* , 76, S. 798-804.
- Hooper, L., Kroon, P. A., Rimm, E. B., Chon, J. S., Harvey, I., Le Cornu, K. A., et al. (2008). Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition* , 88, S. 38-50.

- Hurst, W. J., Glinski, J. A., Miller, K. B., Apgar, J., Davey, M. H., und Stuart, D. A. (2008). Survey of the trans-Resveratrol and trans-Piceid Content of Cocoa-Containing and Chocolate Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 56, S. 8374–8378.
- Hurst, W. J., Krake, S. H., Bergmeier, S. C., Payne, M. J., Miller, K. B., und Stuart, D. A. (2011). Impact of fermentation, drying, roasting and Dutch processing on flavan-3-ol stereochemistry in cacao beans and cocoa ingredients. *Chemistry Central Journal* , 5, S. 53.
- Hvattum, E. (2002). Determination of phenolic compounds in rose hip (*Rosa canina*) using liquid chromatography coupled to electrospray ionisation tandem mass spectrometry and diode-array detection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* , 16, S. 655–662.
- ICCO. (2010). *International Cocoa Agreement*. Abgerufen am 31. 01 2013 von <http://www.icco.org>: http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/2-icco-agreements-and-their-history/3-2010-international-cocoa-agreement.html
- Jalal, M. A., und Collin, H. A. (1977). Polyphenols of mature plant, seedlings and tissue cultures of *Theobroma Cacao*. *Phytochemistry* , 16, S. 1377–1380.
- han, M., Monnart, E., Nguyen, F., Nizet, S., und Collin, S. (2010). Stilbenic Profile of Cocoa Liquors from Different Origins Determined by RP-HPLC-APCI(+)-MS/MS. Detection of a New Resveratrol Hexoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 58, S. 7067–7074.
- Jiménez, R., Duarte, J., und Perez-Vizcaino, F. (2012). Epicatechin: Endothelial Function and Blood Pressure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 60, S. 8823–8830.
- Jungfer, E., Zimmermann, B. F., Ruttkat, A., und Galensa, R. (2012). Comparing Procyanidins in Selected *Vaccinium* Species by UHPLC-MS2 with Regard to Authenticity and Health Effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 60, S. 9688–9696.
- KakaoV. (2003). Verordnung über Kakao- und Schokoladenerzeugnisse vom 15. Dezember 2003 (BGBl. I S. 2738), zuletzt geändert durch Art. 2 VO zur Änd. lebensmittelrechtlicher Vorschriften vom 30.9.2008 (BGBl. I S. 1911).
- Katz, D. L., Doughty, K., und Ali, A. (2011). Cocoa and Chocolate in Human Health and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling* , 15, S. 2779–2811.
- Kelebek, H., Canbas, A., und Selli, S. (2008). Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of blood orange juices obtained from cvs. Moro and Sanguinello (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) grown in Turkey. *Food Chemistry* , 107, S. 1710–1716.
- Kelm, M. A., Johnson, J. C., Robbins, R. J., Hammerstone, J. F., und Schmitz, H. H. (2006). High-Performance Liquid Chromatography Separation and Purification of Cacao (*Theobroma cacao* L.) Procyanidins According to Degree of Polymerization Using a Diol Stationary Phase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 54, S. 1571–1576.
- Khawaja, O., Gaziano, J. M., und Djoussé, L. (2011). Chocolate and Coronary Heart Disease: A Systematic Review. *Current Atherosclerosis Reports* , 13, S. 447–452.
- Kim, H., und Keeney, P. G. (1984). (-)-Epicatechin Content in Fermented and Unfermented Cocoa Beans. *Journal of Food Science* , 49, S. 1090–1092.
- Kofink, M., Papagiannopoulos, M., und Galensa, R. (2007a). (-)-Catechin in Cocoa and Chocolate: Occurrence and Analysis of an Atypical Flavan-3-ol Enantiomer. *Molecules* , 12, S. 1274–1288.
- Kofink, M., Papagiannopoulos, M., und Galensa, R. (2007b). Enantioseparation of catechin and epicatechin in plant food by chiral capillary electrophoresis. *European Food Research and Technology* , 225, S. 569–577.
- Kothe, L., Zimmermann, B. F., und Galensa, R. (2013). Temperature influences epimerization and composition of flavanol monomers, dimers and trimers during cocoa bean roasting. *Food Chemistry* , 141, S. 3656–3663.

- Krause, M., und Galensa, R. (1991b). Analysis of Enantiomeric Flavanones in Plant Extracts by High-Performance Liquid Chromatography on a Cellulose Triacetate Based Chiral Stationary Phase. *Chromatographia* , 32, S. 69-72.
- Krause, M., und Galensa, R. (1991a). High-performance liquid chromatography of diastereomeric flavanone glycosides in Citrus on a β -cyclodextrin-bonded stationary phase (Cyclobond I). *Journal of Chromatography* , 588, S. 41-45.
- Krysiak, W., Adamski, R., und Żyżelewicz, D. (2013). Factors Affecting the Color of Roasted Cocoa Bean. *Journal of Food Quality* , 36, S. 21-31.
- Lamuela-Raventós, R. M., Andrés-Lacueva, C. P., und Izquierdo-Pulido, M. (2001). More Antioxidants in Cocoa. *Journal of Nutrition* , 131, S. 834.
- Lamuela-Raventós, R. M., Romero-Pérez, A. I., Andrés-Lacueva, C., und Tornero, A. (2005). Review: Health Effects of Cocoa Flavonoids. *Food Science and Technology International* , 11, S. 159-176.
- Lazarus, S. A., Hammerstone, J. F., Adamson, G. E., und Schmitz, H. H. (2001). High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis of Proanthocyanidins in Food and Beverages. *Methods in Enzymology* , 335, S. 46-57.
- Lea, A. G. (1978). The Phenolics of Ciders: Oligomeric and Polymeric Procyanidins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* , 29, S. 471-477.
- Lechtenberg, M., Henschel, K., Liefländer-Wulf, U., Quandt, B., und Hensel, A. (2012). Fast determination of N-phenylpropenoyl-L-amino acids (NPA) in cocoa samples from different origins by ultra-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Food Chemistry* , 135, S. 1676-1684.
- Lee, K. W., Kim, Y. J., Lee, H. J., und Lee, C. Y. (2003). Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 51, S. 7292-7295.
- Leopold, J. A., und Loscalzo, J. (2009). Oxidative risk for atherothrombotic cardiovascular disease. *Free Radical Biology and Medicine* , 47, S. 1673-1706.
- Li, S., Xiao, J., Chen, L., Hu, C., Chen, P., Xie, B., et al. (2012). Identification of A-series oligomeric procyanidins from pericarp of Litchi chinensis by FT-ICR-MS and LC-MS. *Food Chemistry* , 135, S. 31-38.
- Li, W., Sun, Y., Liang, W., Fitzloff, J. F., und van Breemen, R. B. (2003). Identification of caffeic acid derivatives in *Actea racemosa* (*Cimicifuga racemosa*, black cohosh) by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* , 17, S. 978-982.
- Lieberei, R. (2006). Die Vielfalt des Kakaos. *Moderne Ernährung heute* (2), S. 6-11.
- Lin, L.-Z., He, X.-G., Lindenmaier, M., Yang, J., Cleary, M., Qiu, S.-X., et al. (2000). LC-ESI-MS Study of the Flavonoid Glycoside Malonates of Red Clover (*Trifolium pratense*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 48, S. 354-365.
- Lo Scalzo, R., Iannocari, T., Summa, C., Morelli, R., und Rapisarda, P. (2004). Effect of thermal treatments on antioxidant and antiradical activity of blood orange juice. *Food Chemistry* , 85, S. 41-47.
- Locatelli, M., Travaglia, F., Giovannelli, L., Coisson, J. D., Bordiga, M., Pattarino, F., et al. (2013). Clovamide and phenolics from cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) inhibit lipid peroxidation in liposomal systems. *Food Research International* , 50, S. 129-134.
- Loke, W. M., Hodgson, J. M., Proudfoot, J. M., McKinley, A. J., Puddey, I. B., und Croft, K. D. (2008). Pure dietary flavonoids quercetin and (-)-epicatechin augment nitric oxide products and

- reduce endothelin-1 acutely in healthy men. *The American Journal of Clinical Nutrition* , 88, S. 1018–1025.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., und Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition* , 81, S. 230–242.
- Mao, T. K., Powell, J., Van de Water, J., Keen, C. L., Schmitz, H. H., Hammerstone, J. F., et al. (2000). The effect of cocoa procyanidins on the transcription and secretion of interleukin 1 β in peripheral blood mononuclear cells. *Life Sciences* , 66, S. 1377–1386.
- Marshall, A. G., und Hendrickson, C. L. (2008). High-Resolution Mass Spectrometers. *Annual Review of Analytical Chemistry* , 1, S. 579–599.
- Marshall, A. G., Hendrickson, C. L., und Jackson, G. S. (1998). Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: A primer. *Mass Spectrometry Reviews* , 17, S. 1–35.
- Mathur, S., Devaraj, S., Grundy, S. M., und Ishwarlal, J. (2002). Cocoa Products Decrease Low Density Lipoprotein Oxidative Susceptibility but Do Not Affect Biomarkers of Inflammation in Humans. *The Journal of Nutrition* , 132, S. 3663–3667.
- Matissek, R., Reinecke, J., von Hagen, O., und Manning, S. (2012). Sustainability in the cocoa sector - Review, challenges and approaches. *Moderne Ernährung heute* (1), S. 1-27.
- Mazor Jolić, S., Radojčić Redovniković, I., Marković, K., Ivanec Šipušić, D., und Delonga, K. (2011). Changes of phenolic compounds and antioxidant capacity in cocoa beans processing. *International Journal of Food Science and Technology* , 46, S. 1793-1800.
- McCullough, M. L., Chevaux, K., Jackson, L., Preston, M., Martinez, G., Schmitz, H. H., et al. (2006). Hypertension, the Kuna, and the Epidemiology of Flavanols. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* , 47, S. 103-109.
- McShea, A., Ramiro-Puig, E., Munro, S. B., Casadesus, G., Castell, M., und Smith, M. A. (2011). Clinical benefit and preservation of flavonols in dark chocolate manufacturing. *Nutrition Reviews* , 66, S. 630-641.
- Miles, C. O., und Main, L. (1988). The Kinetics and Mechanism, and the Equilibrium Position as a Function of pH, of the Isomerisation of Naringin and the 4'-rhamnoglucoside of 2',4,4',6'-Tetrahydroxychalcone. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* , S. 195-198.
- Miller, K. B., Hurst, W. J., Payne, M. J., Stuart, D. A., Apgar, J., Sweigart, D. S., et al. (2008). Impact of Alkalization on the Antioxidant and Flavanol Content of Commercial Cocoa Powders. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 56, S. 8527–8533.
- Monagas, M., Khan, N., Andres-Lacueva, C., Casas, R., Urpi-Sarda, M., Llorach, R., et al. (2009). Effect of cocoa powder on the modulation of inflammatory biomarkers in patients at high risk of cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition* , 90, S. 1144–1150.
- Monahan, K. D. (2012). Effect of cocoa/chocolate ingestion on brachial artery flow-mediated dilation and its relevance to cardiovascular health and disease in humans. *Archives of Biochemistry and Biophysics* , 527, S. 90–94.
- Mouly, P., Gaydou, E. M., und Auffray, A. (1998). Simultaneous separation of flavanone glycosides and polymethoxylated flavones in citrus juices using liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* , 800, S. 171–179.
- Mullen, W., Edwards, C. A., und Crozier, A. (2006). Absorption, excretion and metabolite profiling of methyl-, glucuronyl-, glucosyl- and sulpho-conjugates of quercetin in human plasma and urine after ingestion of onions. *British Journal of Nutrition* , 96, S. 107-116.

- Murphy, K. J., Chronopoulos, A. K., Singh, I., Francis, M. A., Moriarty, H., Pike, M. J., et al. (2003). Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. *The American Journal of Clinical Nutrition* , 77, S. 1466–1473.
- Mursu, J., Voutilainen, S., Nurmi, T., Rissanen, T. H., Virtanen, J. K., Kaikkonen, J., et al. (2004). Dark chocolate consumption increases HDL cholesterol concentration and chocolate fatty acids may inhibit lipid peroxidation in healthy humans. *Free Radical Biology and Medicine* , 37, S. 1351–1359.
- Mustafa, A., und Turner, C. (2011). Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta* , 703, S. 8–18.
- Neilson, A. P., und Ferruzzi, M. P. (2011). Influence of Formulation and Processing on Absorption and Metabolism of Flavan-3-Ols from Tea and Cocoa. *Annual Review of Food Science and Technology* , 2, S. 125–151.
- Neilson, A. P., Hopf, A. S., Cooper, B. R., Pereira, M. A., Bomser, J. A., und Ferruzzi, M. G. (2007). Catechin Degradation with Concurrent Formation of Homo- and Heterocatechin Dimers during in Vitro Digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 55, S. 8941–8949.
- Niehues, M., Stark, T., Keller, D., Hofmann, T., und Hensel, A. (2011). Antiadhesion as a functional concept for prevention of pathogens: N-Phenylpropenoyl-L-amino acid amides as inhibitors of the *Helicobacter pylori* BabA outer membrane protein. *Molecular Nutrition & Food Research* , 55, S. 1104–1117.
- Niemenak, N., Rohsius, C., Elwers, S., Omokolo Ndoumou, D., und Lieberei, R. (2006). Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *Journal of Food Composition and Analysis* , 19, S. 612–619.
- Ortega, N., Romero, M.-P., Macià, A., Reguant, J., Anglès, N., Morelló, J.-R., et al. (2010). Comparative study of UPLC-MS/MS and HPLC-MS/MS to determine procyanidins and alkaloids in cocoa samples. *Journal of Food Composition and Analysis* , 23, S. 298–305.
- Ortega, N., Romero, M.-P., Macià, A., Reguant, J., Anglès, N., Morelló, J.-R., et al. (2008). Obtention and Characterization of Phenolic Extracts from Different Cocoa Sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 56, S. 9621–9627.
- Ottaviani, J. I., Momma, T. Y., Heiss, C., und Kwik-Urbe, C. (2011). The stereochemical configuration of flavanols influences the level and metabolism of flavanols in humans and their biological activity in vivo. *Free Radical Biology and Medicine* , 50, S. 273–244.
- Palma, M., Piñeiro, Z., und Barroso, C. G. (2001). Stability of phenolic compounds during extraction with superheated solvents. *Journal of Chromatography A* , 921, S. 169–174.
- Papagiannopoulos, M. (2008). Optimierte Analyse von Flavonoiden mit HPLC-MS. *Dissertation, Universität Bonn* .
- Park, J. B. (2006). Clovamide-Type Phenylpropenoic Acid Amides, N-Coumaroyldopamine and N-Caffeoyldopamine, Inhibit Platelet-Leukocyte Interactions via Suppressing P-Selectin Expression. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* , 317, S. 813–819.
- Payne, M. J., Hurst, W. J., Miller, K. B., Rank, C., und Stuart, A. D. (2010). Impact of Fermentation, Drying, Roasting, and Dutch Processing on Epicatechin and Catechin Content of Cocoa Beans and Cocoa Ingredients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 58, S. 10518–10527.
- Pereira-Caro, G., Borges, G., Nagai, C., Jackson, M. C., Yokota, T., Crozier, A., et al. (2013). Profiles of Phenolic Compounds and Purine Alkaloids during the Development of Seeds of *Theobroma cacao* cv. Trinitario. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 61, S. 427–434.
- Pfeiffer, J., Kühnel, C., Brandt, J., Duy, D., Punyasiri, P. A., Forkmann, G., et al. (2006). Biosynthesis of flavan 3-ols by leucoanthocyanidin 4-reductases and anthocyanidin reductases in leaves of grape

- (*Vitis vinifera* L.), apple (*Malus x domestica* Borkh.) and other crops. *Plant Physiology and Biochemistry* , 44, S. 323–334.
- Porter, L. J., Ma, Z., und Chan, B. G. (1991). Cacao procyanidins: Major Flavonoids and identification of some minor metabolites. *Phytochemistry* , 30, S. 1657-1663.
- Powis, T. G., Cyphers, A., Gaikwad, N. W., Grivetti, L., und Cheong, K. (2011). Cacao use and the San Lorenzo Olmec. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 108, S. 8595–8600.
- Price, K. R., und Rhodes, M. J. (1997). Analysis of the Major Flavonol Glycosides Present in Four Varieties of Onion (*Allium cepa*) and Changes in Composition Resulting from Autolysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* , 74, S. 331–339.
- Quesnel, V. C. (1965). Chloroform-extractable aromatic acids of cocoa. *Journal of the Science of Food and Agriculture* , 16, S. 596–599.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., und Pouységu, L. (2011). Pflanzliche Polyphenole: chemische Eigenschaften, biologische Aktivität und Synthese. *Angewandte Chemie* , 123, S. 610–646.
- Radojčić Redovniković, I., Delonga, K., Mazor, S., Dragović-Uzelac, V., Caric, M., und Vorkapić-Furac, J. (2009). Polyphenolic Content and Composition and Antioxidative Activity of Different Cocoa Liquors. *Czech Journal of Food Science* , 27, S. 330-337.
- Ramiro-Puig, E., und Castell, M. (2009). Cocoa: antioxidant and immunomodulator. *British Journal of Nutrition* , 101, S. 931–940.
- Rhosius, C., Elwers, S., und Lieberei, R. (2010). Cocoa Atlas. *German Cocoa and Chocolate Foundation* .
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., und Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trend in plant science* , 2, S. 152–159.
- Richelle, M., Tavazzi, I., Enslin, M., und Offord, E. A. (1999). Plasma kinetics in man of epicatechin from black chocolate. *European Journal of Clinical Nutrition* , 53, S. 22–26.
- Ried, K., Sullivan, T., Fakler, P., Frank, O. R., und Stocks, N. P. (2010). Does chocolate reduce blood pressure? A meta-analysis. *BMC Medicine* , 8, S. 39.
- Rios, L. Y., Bennett, R. N., Lazarus, S. A., Révész, C., Scalbert, A., und Williamson, G. (2002). Cocoa procyanidins are stable during gastric transit. *American Journal of Clinical Nutrition* , 76, S. 1106–1110.
- Rios, L. Y., Gonthier, M.-P., Révész, C., Mila, I., Lapierre, C., Lazarus, S. A., et al. (2003). Chocolate intake increases urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acids in healthy human subjects. *American Journal of Clinical Nutrition* , 77, S. 912–918.
- Ritter, C. (2010). Methodenentwicklung zur enantioselektiven Trennung von Polyphenolen in unterschiedlichen Matrices. *Dissertation, Universität Bonn* .
- Ritter, C., Zimmermann, B. F., und Galensa, R. (2010). Chiral separation of (+)/(-)-catechin from sulfated and glucuronidated metabolites in human plasma after cocoa consumption. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* , 397, S. 723–730.
- Rockenbach, I. I., Jungfer, E., Ritter, C., Santiago-Schübel, B., Thiele, B., Fett, R., et al. (2012). Characterization of flavan-3-ols in seeds of grape pomace by CE, HPLC-DAD-MSn and LC-ESI-FTICR-MS. *Food Research International* , 48, S. 848–855.
- Rodrigues, C. M., Rinaldo, D., dos Santos, L. C., Montoro, P., Piacente, S., Pizza, C., et al. (2007). Metabolic fingerprinting using direct flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometry for the characterization of proanthocyanidins from the barks of *Hancornia speciosa*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* , 21, S. 1907–1914.

- Rohan, T. A. (1958). Processing of raw cocoa. I.—Small-scale Fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* , 9, S. 104–111.
- Rohan, T. A., und Connell, M. (1964). The Precursors of Chocolate Aroma: A Study of the Flavonoids and Phenolic Acids. *Journal of Food Science* , 29, S. 460–463.
- Roth, K. (2005). Von Vollmilch bis Bitter, edelste Polymorphie. *Chemie in unserer Zeit* , 39, S. 416–428.
- Saltini, R., Akkerman, R., und Frosch, S. (2013). Optimizing chocolate production through traceability: A review of the influence of farming practices on cocoa bean quality. *Food Control* , 29, S. 167–187.
- Sanbongi, C., Osakabe, N., Natsume, M., Takizawa, T., Gomi, S., und Osawa, T. (1998). Antioxidative Polyphenols Isolated from *Theobroma cacao*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 46, S. 454–457.
- Sánchez-Rabaneda, F., Jauregui, O., Casals, I., Andrés-Lacueva, C., Izquierdo-Pulido, M., und Lamuela-Raventós, R. M. (2003). Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *Journal of Mass Spectrometry* , 38, S. 35–42.
- Santos-Buelga, C., García-Viguera, C., und Tomás-Barbéran, F. A. (2003). On-line Identification of Flavonoids by HPLC Coupled to Diode Array Detection. In C. Santos-Buelga, und G. Williamson (Hrsg.), *Methods in polyphenol analysis*. Kapitel 5, S. 92-127, Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Saucier, C., Bourgeois, G., Vitry, C., Roux, D., und Glories, Y. (1997a). Characterization of (+)-Catechin–Acetaldehyde Polymers: A Model for Colloidal State of Wine Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 45, S. 1045–1049.
- Saucier, C., Guerra, C., Pianet, I., Laguerre, M., und Glories, Y. (1997b). (+)-Catechin-acetaldehyde condensation products in relation to wine-ageing. *Phytochemistry* , 46, S. 229–234.
- Scheid, L., Reusch, A., Stehle, P., und Ellinger, S. (2010). Antioxidant effects of cocoa and cocoa products ex vivo and in vivo: is there evidence from controlled intervention studies? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* , 13, S. 737–742.
- Schewe, T., Steffen, Y., und Sies, H. (2008). How do dietary flavanols improve vascular function? A position paper. *Archives of Biochemistry and Biophysics* , 476, S. 102–106.
- Schramm, D. D., Karim, M., Schrader, H. R., Holt, R. R., Kirkpatrick, N. J., Polagruto, J. A., et al. (2003). Food effects on the absorption and pharmacokinetics of cocoa flavanols. *Life Sciences* , 73, S. 857–869.
- Schroeter, H., Heiss, C., Balzer, J., Kleinbongard, P., Keen, C., und Hollenberg, N. (2006). (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 103, S. 1024–1029.
- Schwan, R. F. (1998). Cocoa Fermentation Conducted with a Defined Microbial Cocktail Inoculum. *Applied and Environmental Microbiology* , 64, S. 1477–1484.
- Selmi, C., Cocchi, C. A., Lanfredini, M., Keen, C. L., und Gershwin, M. E. (2008). Chocolate at heart: The anti-inflammatory impact of cocoa flavanols. *Molecular Nutrition & Food Research* , 52, S. 1340-1348.
- Song, L., Wang, X., Zheng, X., und Huang, D. (2011). Polyphenolic antioxidant profiles of yellow camellia. *Food Chemistry* , 129, S. 351–357.
- Souza, L. M., Cipriani, T. R., Iacomini, M., Gorin, P. A., und Sasaki, G. L. (2008). HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* , 47, S. 59–67.

- Spencer, J. P., Chaudry, F., Pannala, A. S., Srai, S. K., Debnam, E., and Rice-Evans, C. (2000). Decomposition of Cocoa Procyanidins in the Gastric Milieu. *Biochemical and Biophysical Research Communications* , 272, S. 236–241.
- Stark, T., und Hofmann, T. (2006). Application of a Molecular Sensory Science Approach to Alkalized Cocoa (*Theobroma cacao*): Structure Determination and Sensory Activity of Nonenzymatically C-Glycosylated Flavan-3-ols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 54, S. 9510–9521.
- Stark, T., und Hofmann, T. (2005). Isolation, Structure Determination, Synthesis, and Sensory Activity of N-Phenylpropenoyl-L-amino Acids from Cocoa (*Theobroma cacao*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 53, S. 5419–5428.
- Stark, T., Bareuther, S., und Hofmann, T. (2006a). Molecular Definition of the Taste of Roasted Cocoa Nibs (*Theobroma cacao*) by Means of Quantitative Studies and Sensory Experiments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 54, S. 5530–5539.
- Stark, T., Bareuther, S., und Hofmann, T. (2005). Sensory-Guided Decomposition of Roasted Cocoa Nibs (*Theobroma cacao*) and Structure Determination of Taste-Active Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 53, S. 5407–5418.
- Stark, T., Justus, H., und Hofmann, T. (2006b). Quantitative Analysis of N -Phenylpropenoyl-L-amino Acids in Roasted Coffee and Cocoa Powder by Means of a Stable Isotope Dilution Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 54, S. 2859–2867.
- Stark, T., Lang, R., Keller, D., Hensel, A., und Hofmann, T. (2008). Absorption of N-phenylpropenoyl-L-amino acids in healthy humans by oral administration of cocoa. *Molecular Nutrition & Food Research* , 52, S. 1201–1214.
- Sun, W., und Miller, J. M. (2003). Tandem mass spectrometry of the B-type procyanidins in wine and B-type dehydrodiccatechins in an autoxidation mixture of (+)-catechin and (-)-epicatechin. *Journal of Mass Spectrometry* , 38, S. 438–446.
- Taubert, D., Roesen, R., und Schömig, E. (2007a). Effect of Cocoa and tea Intake on Blood Pressure - A Meta-analysis. *Archives of Internal Medicine* , 167, S. 626–634.
- Taubert, D., Roesen, R., Lehman, C., Jung, N., und Schömig, E. (2007b). Effects of Low Habitual Cocoa Intake on Blood Pressure and Bioactive Nitric Oxide: A Randomized Controlled Trial. *The Journal of the American Medical Association* , 298, S. 49-60.
- Tokusoglu, Ö., und Ünal, K. M. (2002). Optimized method for simultaneous determination of catechin, gallic acid, and methylxanthine compounds in chocolate using RP-HPLC. *European Food Research and Technology* , 215, S. 340–346.
- Tomás-Barbéran, F. A., Borges, G., und Crozier, A. (2011). Phytochemicals in Cocoa and Flavan-3-ol Bioavailability. In A. Crozier, H. Ashihara, und F. Tomás-Barbéran, *Teas, Cocoa and Coffee: Plant Secondary Metabolites and Health* (S. 193–217). Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
- Tomás-Barberán, F. A., Cienfuegos-Jovellanos, E., Marín, A., Muguerza, B., Gil-Izquierdo, A., Cerdá, B., et al. (2007). A new Process To Develop a Cocoa Powder with Higher Flavonoid Monomer Content and Enhanced Bioavailability in Healthy Humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 55, S. 3926–3935.
- Tsang, C., Auger, C., Mullen, W., Bornet, A., Rouanet, J.-M., Crozier, A., et al. (2005). The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins following the ingestion of a grape seed extract by rats. *British Journal of Nutrition* , 94, S. 170-181.
- Urpi-Sarda, M., Monagas, M., Khan, N., Lamuela-Raventós, R. M., Santos-Buelga, C., Sacanella, E., et al. (2009). Epicatechin, procyanidins, and phenolic microbial metabolites after cocoa intake in humans and rats. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* , 394, S. 1545–1556.

- Wang, J. F., Schramm, D. D., Holt, R. R., Ensunsa, J. L., Fraga, C. G., Schmitz, H. H., et al. (2000). A Dose-Response Effect from Chocolate Consumption on Plasma Epicatechin and Oxidative Damage. *The Journal of Nutrition* , 130, S. 2115–2119.
- Weinges, K., Göritz, F. K., und Nader, F. (1968). Zur Kenntnis der Proanthocyanidine, Konfigurationsbestimmung von C₃₀H₂₆O₁₂ - Procyanidinen und Strukturaufklärung eines neuen Procyanidins. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* , 715, S. 164–171.
- Williamson, G., und Manach, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *American Journal of Clinical Nutrition* , 81, S. 243-255.
- Winkel-Shirley, B. (2001). Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiology* , 126, S. 485–493.
- Wollersen, H. (2004). Bestimmung und Identifizierung von Flavonoiden in Gerste mit HPLC-DAD-MS/MS. *Dissertation, Universität Paderborn* .
- Wollgast, J. (2005). The content and effects of polyphenols in chocolate. Justus-Liebig-Universität Giessen, Dissertation.
- Wollgast, J., und Anklam, E. (2000). Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International* , 33, S. 423–447.
- Wollgast, J., Pallaroni, L., Agazzi, M.-E., und Anklam, E. (2001). Analysis of Procyanidins in chocolate by reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometric and tandem mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* , 926, S. 211-220.
- Wollseifen, H. R. (2010). Flavonoidprofile in Früchten und Fruchtprodukten. *Dissertation, Universität Bonn* .
- Wu, X., und Prior, R. L. (2005). Systematic Identification and Characterization of Anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in Common Foods in the United States: Fruits and Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 53, S. 2589–2599.
- Xie, D.-Y., und Dixon, R. A. (2005). Proanthocyanidin biosynthesis – still more questions than answers? *Phytochemistry* , 66, S. 2127-2144.
- Zeng, H. W., Locatelli, M., Bardelli, C., Amoroso, A., Coisson, J. D., Travaglia, F., et al. (2011). Anti-inflammatory Properties of Clovamide and Theobroma cacao Phenolic Extracts in Human Monocytes: Evaluation of Respiratory Burst, Cytokine Release, NF-KB Activation, and PPAR γ Modulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 59, S. 5342–5350.
- Zheng, W., und Wang, S. Y. (2003). Oxygen Radical Absorbing Capacity of Phenolics in Blueberries, Cranberries, Chokeberries, and Lingonberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 51, S. 502–509.
- Zhu, Q. Y., Holt, R. R., Lazarus, S. A., Ensunsa, J. L., Hammerstone, J. F., Schmitz, H. H., et al. (2002). Stability of the Flavan-3-ols Epicatechin and Catechin and Related Dimeric Procyanidins Derived from Cocoa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 50, S. 1700–1705.
- Ziegleder, G. (1991). Composition of flavor extracts of raw and roasted cocoas. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung* , 192, S. 521–525.
- Zimmermann, B. F., und Galensa, R. (2006). One for all - all for one: proof of authenticity and tracing of foods with flavonoids. *European Food Research and Technology* , 224, S. 385–393.