

Bestimmung und Identifizierung von Flavonoiden in Gerste mit HPLC-DAD-MS/MS

Der Fakultät für Naturwissenschaften

Department Chemie

der Universität Paderborn

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

vorgelegte Dissertation

von Diplom-Chemikerin

Heike Wollersen

aus Hameln

Paderborn 2004

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 1999 bis April 2004 an der Universität Paderborn im Fach Anorganische und Analytische Chemie (Department Chemie, Fakultät für Naturwissenschaften) unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Grote in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. H. Hesecker, Fachgruppe Ernährung und Verbraucherbildung (Department Sport und Gesundheit, Fakultät für Naturwissenschaften).

Veröffentlichungen im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit:

H. Wollersen, M. Grote, H. Hesecker; *Methodenentwicklung zur Quantifizierung ausgewählter Flavonoide in Gerste mit HPLC und UV/EC-Detektion*, Posterpräsentation 5th International Symposium Extraction for Sample Preparation - SFE - (X)SE - SPME, Siegen, Book of Abstracts Vol.I, S. PA4/28, Mai 2001

H. Wollersen, M. Grote, H. Hesecker; *Method for quantification of selected flavonoids in barley by hplc with UV/EC detection*; Posterpräsentation 25th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations: HPLC 2001, Maastricht, Niederlande, Juni 2001

H. Wollersen, M. Grote, H. Hesecker; *Methodenentwicklung zur Quantifizierung ausgewählter Flavonoide in Gerste mit HPLC und UV/EC-Detektion*; *Lebensmittelchemie* **55** (2001) 65 - 66

H. Wollersen, M. Grote, H. Hesecker; *Methodenentwicklung, Identifizierung und Quantifizierung von Flavonoiden in Gerste mit HPLC/UV und LC-MS/MS*; Posterpräsentation DVG-LChG-Symposium "Lebensmittel - Mittel zum Leben", Münster, April 2002

H. Wollersen, M. Grote, H. Hesecker, *Einsatz der LC-MS/MS und der HPLC/UV zur Identifizierung und Quantifizierung von Flavonoiden in Gerste*; *Analytica*, 18. Internationale Fachmesse und Analytica Conference, München, April 2002

1. Referent: Prof. Dr. M. Grote

2. Referent: Prof. Dr. H. Hesecker

Eingereicht am 03.03.2004

Tag der mündlichen Prüfung: 16.04.2004

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. M. Grote danke ich sehr herzlich für die interessante Themenstellung, stete Diskussionsbereitschaft und für die engagierte Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. Heseke danke ich für die Zusammenarbeit, die Bereitstellung von Arbeitsmitteln und die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit sowie für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Der Warsteiner Brauerei möchte ich für die Bereitstellung von Probenmaterial sowie für ihre Hilfsbereitschaft danken.

Der Kommission für Forschung und wissenschaftlichen Nachwuchs der Universität Paderborn möchte ich für die finanzielle Unterstützung danken.

Herrn Dr. M. Stolz (Staatliches Veterinäruntersuchungsamt Detmold) möchte ich für die Bereitstellung von Arbeitsmitteln danken.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank all den jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreises Analytische und Anorganische Chemie wie auch der Fachgruppe Ernährung und Verbraucherbildung, insbesondere Markus Borges, Rolli Knaup, Claudia Markus, Dr. Almut Schmid, Birgit Schmidt, Dr. Detlef Schwarze und Andrea Vockel.

Mein ganz besonderer Dank gilt darüber hinaus allen, die außerhalb des Arbeitskreises in irgendeiner Form zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Hierbei möchte ich mich besonders bei meiner Familie, bei Tobias und allen Freunden, die immer für mich da waren, für ihre große Geduld und die vielfältige Unterstützung jeglicher Art bedanken.

„Let me entertain you...“

(Robert Peter Williams)

Meinen Eltern
in Dankbarkeit
gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG.....	4
3	STRUKTURELLER AUFBAU, PHARMAKOLOGISCHE WIRKUNG UND METABOLISMUS DER FLAVONOIDE.....	6
3.1	Struktureller Aufbau.....	6
3.1.1	Struktur und Nomenklatur der monomeren Flavonoide	6
3.1.2	Struktur und Nomenklatur der Proanthocyanidine	7
3.2	Pharmakologische Wirkung und Metabolismus beim Menschen.....	10
3.2.1	Pharmakologische Wirkung.....	10
3.2.2	Metabolismus	13
4	VORKOMMEN, BEDEUTUNG UND ANALYTIK VON FLAVONOIDEN IN BRAUPROZESSPROBEN.....	15
4.1	Flavonoide in Gerste.....	15
4.2	Die Rolle der Flavonoide im Brauprozess	18
4.3	Bestimmung von Flavonoiden in Brauprozessproben	22
4.3.1	Stand der Flavonoid-Analytik in Gerste und Malz	23
4.3.2	Stand der Flavonoid-Analytik in Proben des Brauprozesses.....	26
5	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	28
5.1	Versuche zur Darstellung von Procyanidin B3 als Referenzsubstanz	28
5.2	Bestimmung von (+)-Catechin in Gerste mittels HPLC-DAD.....	31
5.2.1	Mobile Phase.....	31
5.2.2	Einfluss des Lösemittels der (+)-Catechin-Messprobe.....	32
5.2.3	Vorauswahl der analytischen Säule	33
5.3	Bestimmung von Flavonoiden in Gerste mittels HPLC-DAD	38
5.3.1	Probenahme und Probenvorbereitung.....	38
5.3.1.1	Extraktion mit dem Ultra-Turrax.....	39
5.3.1.2	Mikrowellengestützte Extraktion (MSS).....	40
5.3.2	Optimierung der HPLC-DAD-Bedingungen.....	41
5.3.2.1	Optimierung des Gradientenverlaufes	41
5.3.2.2	Leistungsvergleich der analytischen Säulen	41
5.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der Methodenentwicklung	46
5.5	Validierung des entwickelten HPLC-DAD-Verfahrens	48

5.5.1	Wahl des Arbeitsbereiches	49
5.5.1.1	Essigsäure/Acetonitril-Gradient E2	49
5.5.1.2	Phosphatpuffer/Acetonitril-Gradient P2.....	50
5.5.2	Linearität.....	50
5.5.2.1	Essigsäure/Acetonitril-Gradient E2	51
5.5.2.2	Phosphatpuffer/Acetonitril-Gradient P2.....	54
5.5.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenze.....	54
5.5.3.1	Essigsäure/Acetonitril-Gradient E2	54
5.5.3.2	Phosphatpuffer/Acetonitril-Gradient P2.....	55
5.5.4	Stabilität.....	55
5.5.4.1	Stabilität von (+)-Catechin in Kalibrierlösungen.....	56
5.5.4.2	Stabilität von (+)-Catechin in Realproben.....	59
5.5.5	Spezifität.....	60
5.5.5.1	Spezifitätstest durch Vergleich der Retentionszeiten	60
5.5.5.2	Spezifitätstest durch Vergleich der UV-Spektren	62
5.5.5.3	Spezifitätstest durch Vergleich der Massenspektren (LC-ESI-MS).....	64
5.5.6	Präzision.....	65
5.5.6.1	Messpräzision.....	65
5.5.6.2	Methodenpräzision.....	66
5.5.6.3	Tag-zu-Tag-Präzision	67
5.5.7	Richtigkeit.....	68
5.5.7.1	Wiederfindung	68
5.5.8	Robustheit	69
5.5.8.1	Einfluss des Packungsmaterials der Trennsäule.....	69
5.5.8.2	Einfluss des pH-Wertes der mobilen Phase.....	70
5.5.9	Zusammenfassung der Validierungsergebnisse	71
5.6	Identifizierung in Gerste enthaltener Flavonoide mittels	
	LC-DAD-MS/MS-Kopplung	73
5.6.1	Kollisionsexperimente mit monomeren Flavonoiden	74
5.6.2	Precursor-Ion-Scan-Experimente mit Gerstenextrakten.....	77
5.6.3	Identifizierung einzelner Gersteninhaltsstoffe mittels MS ⁿ -Untersuchungen	84
5.6.3.1	Monomere Flavonoide	84
5.6.3.2	Dimere Flavonoide.....	85
5.6.3.3	Trimere Flavonoide.....	91
5.6.3.4	Tetramere Flavonoide.....	96
5.6.4	Zusammenfassung der LC-MS-Identifizierungsergebnisse:	
	Essigsäure/Acetonitril-Gradienten E2	97

5.6.5	Zusammenfassung der LC-MS-Identifizierungsergebnisse: Phosphatpuffer/Acetonitril-Gradienten P2.....	101
5.7	Bestimmung von Flavonoiden in Realproben.....	103
5.7.1	Bestimmung von Flavonoiden in Sommergersten mittels HPLC-DAD	104
5.7.2	Bestimmung von Flavonoiden in Brauprozessproben mittels LC-DAD-MS/MS	106
5.7.2.1	Kalibrierung des LC-DAD-MS/MS-Verfahrens	106
5.7.2.2	Bestimmung der Flavonoide in Brauprozessproben.....	108
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	118
7	EXPERIMENTELLER TEIL	123
7.1	Chemikalien	123
7.2	Geräte.....	123
7.2.1	HPLC-DAD-System	123
7.2.2	LC-DAD-MS/MS Ion-Trap-System.....	124
7.2.3	LC-MS/MS Triple-Quadrupol-System	124
7.2.4	NMR-Spektrometer.....	125
7.2.5	Spektrophotometer	125
7.2.6	Mikrowellen-System.....	125
7.2.7	pH-Meter	125
7.3	Lösungen.....	126
7.3.1	Mobile Phasen.....	126
7.3.2	(+)-Catechin-Stammlösung.....	126
7.4	Versuche zur Darstellung von Procyanidin B3	126
7.5	Methodenentwicklung.....	129
7.5.1	Entwicklung der HPLC-DAD-Bedingungen für (+)-Catechin	129
7.5.1.1	UV-Absorptionsmaximum	129
7.5.1.2	pKs-Wert	129
7.5.1.3	Mobile Phase	129
7.5.1.4	Lösemittel der Messprobe.....	130
7.5.1.5	Vorauswahl der analytischen Trennsäule.....	130
7.5.2	Optimierung der Probenvorbereitung.....	131
7.5.2.1	Extraktion mit dem Ultra-Turrax	131
7.5.2.2	Mikrowellengestützte Extraktion (MSS).....	132
7.5.3	Optimierung der HPLC-DAD-Bedingungen.....	132
7.5.3.1	Gradientenverlauf	132

7.5.3.2	Analytische Trennsäulen.....	133
7.5.3.3	Zusammenfassung der Methodenentwicklung: Allgemeingültige Vorgehensweise zur Bestimmung von Flavonoiden in Gerste	133
7.6	Validierung des HPLC-DAD-Verfahrens.....	134
7.6.1	Linearer Bereich	134
7.6.2	Kalibriergerade	134
7.6.3	Stabilität von (+)-Catechin in Kalibrierlösungen	134
7.6.4	Stabilität von (+)-Catechin in Realproben	135
7.6.5	Spezifität.....	135
7.6.5.1	Spezifitätstest durch Vergleich der Retentionszeiten	135
7.6.5.2	Spezifitätstest durch Vergleich der Massenspektren.....	135
7.6.6	Präzision.....	135
7.6.6.1	Messpräzision.....	135
7.6.6.2	Methodenpräzision.....	135
7.6.6.3	Tag-zu-Tag-Präzision	136
7.6.7	Wiederfindung	136
7.6.8	Robustheit	136
7.6.8.1	Einfluss des Packungsmaterials der Trennsäule.....	136
7.6.8.2	Einfluss des pH-Wertes der mobilen Phase.....	136
7.7	Identifizierung in Gerste enthaltener Flavonoide mittels LC-DAD-MS/MS- Kopplung.....	136
7.7.1	Kollisionsexperimente mit monomeren Flavonoiden	136
7.7.2	Precursor-Ion-Scan-Experimente mit Gerstenextrakten.....	137
7.7.3	Identifizierung einzelner Gersteninhaltsstoffe durch MS ⁿ -Untersuchungen....	137
7.8	Bestimmung von Flavonoiden in Realproben	137
7.8.1	Bestimmung von Flavonoiden in Sommergersten mittels HPLC-DAD	137
7.8.2	Bestimmung von Flavonoiden in Brauprozessproben mittels LC-DAD-MS/MS	137
7.8.2.1	Kalibrierung des LC-DAD-MS/MS-Verfahrens.....	137
7.8.2.2	Bestimmung der Flavonoide in Brauprozessproben.....	138
8	LITERATUR.....	141
A	ANHANG.....	A-1

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<i>a, b, c</i>	Koeffizienten aus Geradengleichungen
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
arb	relative Flussrate angegeben in arbitrary units
ASE	Accelerated Solvent Extraction
AU	Absorption Units
β	Massenkonzentration
β_0	Ausgangskonzentration
C	(+)-Catechin
c_0	Ausgangskonzentration der Lösung
c_i	Analyt-Konzentration der Lösung zum Zeitpunkt <i>i</i>
CGp	Catechin-Glucopyranosid (2R:3S-Catechin-7-O- β -D-glucopyranosid)
CID	Collision Induced Dissociation
d	Tag
d_c	Säulendurchmesser [mm]
d_i	Residuen
d_p	Teilchendurchmesser [μ m]
DAD	Dioden-Array-Detektor
DDQ	2,3-Dichlor-5,6-dicyan-p-benzochinon
DIN	Deutsche Industrie Norm
DMACA	4-Dimethylaminozimtaldehyd
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DS^2	Differenz der Varianzen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EpiC	(-)-Epicatechin
EpiGC	(-)-Epigallocatechin
ESI	Electrospray Ionisation
<i>f</i>	empirisch ermittelter Zahlenwert
F	Flussrate der mobilen Phase [mL/min]
FAB	Fast Atom Bombardment
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramm
GC	(-)-Gallocatechin
h	Stunde
<i>h</i>	reduzierte Trennstufenhöhe (dimensionslos)
hL	Hektoliter

HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (high performance liquid chromatography)
HR-MAS	High Resolution Magic Angle Spinning
ICH	International Conference on the Harmonisation of technical requirements for the registration of pharmaceuticals for human use
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
k. A.	keine Angabe
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
L	Liter
L_c	Säulenlänge [mm]
LAMMA	Impact Laser Spectroscopy
LDL	Lipoproteine geringer Dichte (low density lipoproteins)
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
MS	Massenspektrometrie
MSS	Microwave Solvent Supported Extraction
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
n	Anzahl
N	Bodenzahl
n. b.	nicht bestimmt
n. d.	nicht detektiert
NL	normalisierter Y-Achsen Modus
nm	Nanometer
v	reduzierte Fließgeschwindigkeit (dimensionslos)
P	Signifikanzniveau
PVP	Polvinylpyrrolidon
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
PW	Prüfwert
Q	berechneter Quotient aus der Peakbreite und der Retentionszeit
Q_{xx}	Koeffizient zur Berechnung der Geradengleichung 2. Ordnung
r	Wiederholdifferenz
R^2	Bestimmtheitsmaß
R_t	Retentionszeit [min]
rM	statistischer Tabellenwert für den GRUBBS-Test
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde

s	Standardabweichung
s_i^2	Varianz einer Datenserie
s_{rel}	relative Standardabweichung
S_{x_0}	Verfahrensstandardabweichung
s_{y1}	Reststandardabweichung, Geradengleichung 1. Ordnung
s_{y2}	Reststandardabweichung, Geradengleichung 2. Ordnung
SPE	Festphasenextraktion (solid phase extraction)
t	Zeit
TSP	Thermospray Interface
u. B.	unterhalb der Bestimmungsgrenze
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
V_{x_0}	relative Verfahrensstandardabweichung
w	Peakbreite [min]
x	Konzentration
\bar{x}	Mittelwert der Konzentrationen
x_p	Prüfwert für die Absicherung der unteren Arbeitsgrenze
y	Detektorsignal
y^*	Detektorsignal mit größter Differenz zum Mittelwert einer Serie
\bar{y}	Mittelwert der Detektorsignale
\hat{y}	aus Geradengleichung berechneter Messwert

1 Einleitung

In den letzten Jahren ist die Zahl der ernährungsbedingten Erkrankungen in den Industrieländern der Welt, wie z. B. Krebs, Diabetes Mellitus, kardiovaskuläre Erkrankungen, Hypertonie, Adipositas, Hypercholesterinämie und Hyperurikämie, deutlich angestiegen [1-4]. Zahlreiche Studien [5-9] belegen, dass eine Prävention dieser Krankheiten, die u. a. durch Umwelteinflüsse und veränderte Lebensbedingungen hervorgerufen sein können, durch ausreichende körperliche Bewegung aber auch durch eine „gesunde“ und ausgewogene Ernährung erreicht werden kann. In der Literatur existieren die unterschiedlichsten Ernährungsempfehlungen. Allen gemein ist aber, dass ein hoher Verzehr von Obst und Gemüse angeraten wird, um eine fettarme, ballaststoffreiche Nahrung reich an essentiellen Vitaminen und Mineralstoffen aufzunehmen [10]. In Obst und Gemüse finden sich darüber hinaus auch sekundäre Pflanzenstoffe, deren Wirkung im menschlichen Stoffwechsel lange Zeit unbekannt war, obwohl der Mensch sie täglich mit der Nahrung aufnimmt. Forschungsergebnisse der letzten zehn Jahre sowohl aus epidemiologischen als auch aus *in vitro*- und *in vivo*-Studien deuten darauf hin, dass diese sekundären Pflanzenstoffe präventiv wirksam sind [11-14].

Der Begriff der sogenannten bioaktiven sekundären Pflanzenstoffe wurde erstmals im Jahr 1910 von KOSSEL eingeführt [15]. Dabei handelt es sich um Stoffe, welche nicht unmittelbar im Energiestoffwechsel von Pflanzen erforderlich sind, sondern unterschiedlichste Funktionen im Sekundärstoffwechsel übernehmen. Sie können u. a. zur UV-Protektion [16], als Abwehrstoffe gegen Schädlinge und Krankheiten sowie als Wachstumsregulatoren dienen [15-18]. Weiterhin sind sie für wesentliche Eigenschaften wie Farbe oder Geschmack der jeweiligen Pflanze oder Frucht mitbestimmend. Obwohl bis heute weder eine einheitliche Definition der Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe noch eindeutige Kriterien für die Unterscheidung zwischen primären und sekundären Pflanzenstoffen bestehen, erfolgte durch die Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) eine Unterteilung in neun Gruppen: Carotinoide, Saponine, Glucosinoate, Polyphenole, Protease-Inhibitoren, Terpene, Phytosterine, Phytoöstrogene und Sulfide [19]. Insgesamt existieren etwa 60.000 - 100.000 dieser Substanzen, die auch als Phytochemicals bezeichnet werden [17, 20].

Eine wichtige Bedeutung kommt der Gruppe der Polyphenole und hier im besonderen den Flavonoiden zu. Sie stellen eine umfangreiche Stoffklasse mit bisher mehr als 5000 identifizierten Verbindungen dar [15, 21]. Die Entdeckung und Erforschung der Flavonoide ist historisch eng mit der der Ascorbinsäure und der Krankheit Skorbut verbunden [22, 23]. Im Jahr 1933 extrahierte und identifizierte SZENT-GYÖRGYI [24] Ascorbinsäure aus Zitronen. Zeitgleich entdeckte BEZSSONOFF et al. [25] in Zitronensaft zwei antiskorbutisch wirksame Substanzen. SZENT-GYÖRGYI postulierte, dass Skorbut auf einen doppelten Vitaminmangel zurückzuführen sei, der Unterversorgung an Ascorbinsäure, dem Vitamin C und einem sogenannten Vitamin C₂ bzw. Vitamin P (P für Permeabilität) [26]. Diesem Stoff wurde die Fähigkeit zugesprochen, die Permeabilität der Blutgefäße im menschlichen Körper zu unterdrücken [27, 28]. In den 50'er Jahren wurde die Zugehörigkeit der gefäßbeeinflussenden Substanzen zur Gruppe der Vitamine vom Joint Committee on Nomenclature of the Ameri-

can Society of Biological Chemists und vom American Institute of Nutrition (AIN) dementiert [29]. Untersuchungen zeigten, dass diese Stoffe eine Polyphenol-Struktur aufweisen und ein Großteil von ihnen zur Gruppe der Flavonoide (s. Kapitel 3.1.1) zuzuordnen ist. Ihre essenzielle Bedeutung für die menschliche Ernährung, vor allem aber ihre unterschiedlichen protektiven Wirkungsweisen im menschlichen Organismus und folglich ihre präventiven Eigenschaften bezüglich der Entstehung verschiedenster Krankheiten, wurden in den folgenden Jahren erkannt.

Trotz der ständig wachsenden Möglichkeiten in der organischen und analytischen Chemie besteht noch großer Untersuchungsbedarf auf dem Gebiet der Flavonoid-Forschung. In vielen Pflanzenarten [30] sind weder das genaue Flavonoid-Muster noch die Gehalte der einzelnen Verbindungen bzw. der Gesamtflavonoid-Gehalt vollständig geklärt. Dies hat zur Folge, dass in den daraus hergestellten Lebensmitteln ebenfalls nur begrenzte Aussagen über Art und Gehalt der Inhaltsstoffe getroffen werden können. Daher ist für ernährungsphysiologische Untersuchungen ihre Identifizierung und Quantifizierung in pflanzlichen Bestandteilen und in Lebensmitteln von großer Bedeutung [31]. Viele epidemiologische Verzehr-Studien sind nämlich fehlerbehaftet und die genauen Wirkmechanismen der Flavonoide im menschlichen Körper bisher unbekannt.

Die Gewinnung allgemeingültiger Daten über den Gehalt an Flavonoiden in Obst und Gemüse ist auf Grund verschiedener Einflussfaktoren aber schwierig. So unterscheiden sich z. B. Genotypen einer Art durch ihre Fähigkeit zur Bildung bzw. Akkumulation von Flavonoiden, woraus erhebliche Unterschiede der Gehalte zwischen Sorten einer Art resultieren. Weiterhin wird der Flavonoid-Gehalt auch von Umweltbedingungen beeinflusst, wobei insbesondere, neben dem Bodentyp, die Witterung während der Wachstumsphase eine Rolle spielt. Der Zeitpunkt der Ernte und auch die Lagerungsdauer des Obstes oder Gemüses haben ebenfalls einen Einfluss [30, 32-35]. Da Teile der Flavonoid-Biosynthese lichtinduziert ablaufen, wird ein erhöhter Anteil von Flavonoiden in den Randschichten und Blättern gefunden wird [36].

Neben der Bestimmung des Flavonoid-Gehaltes in Obst und Gemüse ist aber auch die Ermittlung der Gehalte in verarbeiteten pflanzlichen Lebensmitteln von großem Interesse. Die technologische Verarbeitung hat oft eine Verminderung der Flavonoid-Konzentration zur Folge, vor allem durch das Entfernen der Schale bzw. Haut von Gemüse und Früchten [37], sowie durch Erhitzen [38], Auspressen oder Lagerung [32]. Häufig führen aber auch Produktionsschritte wie das Zerkleinern und Fermentieren zu einer Oxidation oder Polymerisation der monomeren Inhaltsstoffe und damit zu einer Änderung des Flavonoid-Profiles des Endproduktes [39]. Eine Bilanzierung vom Rohprodukt über den Verarbeitungsprozess bis hin zum Endprodukt liefert wichtige Daten über die Zu- oder Abnahme der Flavonoide während der technologischen Verarbeitung und damit auch über Möglichkeiten, den Flavonoid-Gehalt des Endproduktes zu steigern.

In diesem Zusammenhang ist die Bestimmung von Flavonoiden in Gerste besonders bedeutsam, denn Gerste dient als Rohprodukt für viele verschiedene Lebensmittel wie Brot

oder Müsli, und sie ist neben Hopfen, Hefe und Wasser eine der vier Grundzutaten von Bier. Jährlich werden weltweit 150 Mio. Tonnen Gerste geerntet. 10 - 15 % dieser weltweiten Gerstenproduktion nimmt die Braugerste ein [40].

In Gerste sind bisher eine Vielzahl verschiedenartiger Flavonoide identifiziert worden. Hierbei handelt es sich zum einen um monomere Flavonoide, die sogenannten Catechine (s. Abbildung 1), welche ansonsten besonders in Tee, Früchten und daraus hergestellten Getränken enthalten sind. Zum anderen enthält Gerste auch eine Vielzahl oligomeren Flavonoide, die sogenannten Proanthocyanidine (s. Abbildung 3), die aus kondensierten Monomeren-Einheiten aufgebaut sind. Sie finden sich unter anderem in hoher Konzentration in Äpfeln und dunkler Schokolade, und ihr Vorkommen in Rotwein wird neben weiteren Faktoren unter Umständen für das sogenannte „French Paradox“ verantwortlich gemacht [41].

Sowohl die Proanthocyanidine als auch die Catechine können aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften und zahlreichen Reaktionsmöglichkeiten sowohl eine pharmakologische Wirkung beim Menschen (s. Kapitel 3.2.1), aber auch einen Einfluss auf den Prozess des Bierbrauens bzw. auf das Endprodukt Bier selber haben (s. Kapitel 4.2). So sollen sie beispielsweise im Bier einen Beitrag zur Geschmacksbildung hinsichtlich Adstringens und eventuell Bitterkeit ausüben. Weiterhin kann die Fähigkeit der Proanthocyanidine mit Proteinen Komplexe zu bilden zu unerwünschten Trübungserscheinungen im Bier führen. Aus diesem Grund ist die qualitative und quantitative Bestimmung der monomeren und oligomeren Flavonoide in Gerste und in Bier bzw. in verschiedenen Proben des Brauprozesses sowohl aus wirtschaftlicher als auch ernährungsphysiologischer Sicht von großem Interesse.

2 Problemstellung und Zielsetzung

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist kein vollständig validiertes HPLC-Verfahren zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Flavonoiden in Gerste bekannt. Als ein Grund hierfür ist die Tatsache zu sehen, dass, abgesehen von einigen monomeren Flavonoiden, keine der in Gerste bisher detektierten höhermolekularen Verbindungen, die Proanthocyanidine, kommerziell als Referenzsubstanzen erhältlich sind. In der Literatur werden verschiedene Ansätze zur Gewinnung von Referenzsubstanzen zum einen durch die Isolierung im präparativen Maßstab aus Gerste [42-45] oder durch die Synthese der Verbindungen ausgehend von den Monomeren beschrieben [46-48]. Da sie bisher aber nicht in einem größeren Maßstab zu Verfügung stehen, ist die Quantifizierung wie auch die Identifizierung der Analyten bei der HPLC durch Vergleich mit Referenzsubstanzen nicht oder nur schwer möglich.

Da sich die Proanthocyanidine nur durch Anzahl und Sequenz der monomeren Bausteine (+)-Catechin und (-)-Gallocatechin unterscheiden, sind zudem ihre UV-Spektren als auch ihr elektrochemisches Verhalten sehr ähnlich. Eine Unterscheidung mit den in der HPLC üblicherweise eingesetzten DAD- oder elektrochemischen Detektoren ist nicht bzw. nur sehr begrenzt möglich. Bis heute ist weder geklärt, welche Flavonoide überhaupt in Gerste vorliegen, noch besteht Einigkeit über den strukturellen Aufbau bereits nachgewiesener höhermolekularer Verbindungen [49-52].

Die bisher bekannten Verfahren zur Bestimmung in Gerste, Malz und verschiedenen Proben des Brauprozesses beschränken entweder auf die Ermittlung eines Polyphenol-Summenparameters z. B. zur Prozesskontrolle oder auf die Analyse der Monomeren. Die HPLC-Verfahren [53-57] sind jedoch vielfach mit chemisch-analytischen Defiziten behaftet. Dazu zählen eine fehlende oder zumeist ungenügende Überprüfung der einzelnen Arbeitsschritte des jeweiligen Verbundverfahrens (Probenahme, Probenvorbereitung und chromatographische Bestimmung mit der HPLC) hinsichtlich ihrer analytischen Zuverlässigkeit. Oft werden nur einzelne Validierungsparameter wie z. B. die Wiederfindung oder die Messpräzision untersucht, eine vollständige Validierung der Analysenmethode erfolgte bisher nicht.

Aus diesem Grund war das erste Ziel dieser Arbeit die Entwicklung und Validierung eines HPLC-DAD-Verfahrens (Probenahme, Probenvorbereitung und chromatographische Bestimmung) zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von (+)-Catechin in Gerste, welches sich durch einfache Handhabung in der Praxis sowie gute Wiederholbarkeit der Analyseergebnisse auszeichnen sollte. Die Entwicklung des chromatographischen Systems sollte hierbei so erfolgen, dass auch eine Detektion mittels Massenspektrometrie erfolgen konnte, da das zweite Ziel dieser Arbeit die Identifizierung der in Gerste enthaltenen Flavonoide war. Die relativ neue Möglichkeit des Einsatzes der Massenspektrometrie als Online-Detektor in der HPLC sollte hier durch Fragmentierungsexperimente sowohl die Sequenzermittlung der Substanzen als auch eine direkte Identifizierung der Verbindungen während der analytischen Bestimmung ermöglichen. Das abschließende Untersuchungsziel war die Anwendung des entwickelten Verfahrens zur Verfolgung des Flavonoid-Spektrums während eines Bierbrauprozesses. Zur Realisierung der gesetzten allgemeinen Untersuchungsziele

sollte wie folgt vorgegangen werden:

- Es sollte versucht werden, das dimere Flavonoid Procyanidin B3 als Referenzsubstanz zu synthetisieren.
 - Anschließend sollte ein HPLC-DAD-Verfahren mit (+)-Catechin als Modellsubstanz entwickelt und optimiert werden. Bei der Auswahl der mobilen Phase war hierbei zu beachten, dass die chromatographischen Bedingungen auf eine LC-DAD-MS/MS-Gerätekombination zur Identifizierung der Flavonoide in Gerste übertragbar sein sollten.
 - Basierend auf den für (+)-Catechin durchgeführten Voruntersuchungen, war geplant im nächsten Schritt ein HPLC-Verfahren (Probenahme, Probenvorbereitung und analytische Bestimmung) zur Bestimmung von Flavonoiden in Gerste entwickelt werden. Ziel der Optimierung der Probenvorbereitung war, die Analyten möglichst quantitativ, schonend, schnell und selektiv, d. h. ohne störende Begleitsubstanzen aus Gerste zu extrahieren. Zum Einsatz sollte hier neben einer klassischen Fest-Flüssig-Extraktion ein, bisher nicht für Flavonoide in Gerste angewandtes, mikrowellengestütztes Extraktionsverfahren (MSS) kommen. Weiterhin sollte das bereits für die Modellsubstanz (+)-Catechin entwickelte chromatographische System sowohl bezüglich der Auswahl einer geeigneten Trennsäule als auch eines Gradienten für die Detektion der Flavonoide in Gerste angepasst werden.
 - Zur Dokumentation der Zuverlässigkeit war beabsichtigt, das entwickelte und optimierte HPLC-DAD-Analysenverfahren einer ausführlichen Validierung anhand der Parameter Linearität, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Stabilität, Spezifität, Präzision, Richtigkeit und Robustheit zu unterwerfen.
 - Im nächsten Schritt war vorgesehen, in Gerste enthaltene Flavonoide durch massenspektrometrische Untersuchungen zu identifizieren. Der Einsatz einer Ionenfalle als Massendetektor (LC-DAD-MS/MS) sollte hier Möglichkeit einer gezielten Fragmentierung der detektierten Precursor-Ionen durch MS^n -Experimente eröffnen. Basierend auf Untersuchungen der monomeren Flavonoide sollten durch MS^n -Experimente mit Gerstenextrakt Rückschlüsse auf die Fragmentierungsmechanismen der detektierten di-, tri- und tetrameren Flavonoiden erhalten und somit eine Identifizierung dieser Verbindungen erreicht werden. Ziel war hierbei, neben der Identifizierung einzelner Substanzen, ein allgemeingültiges systematisches Vorgehensschema zur Zuordnung relevanter „Product-Ionen“ zu erarbeiten.
 - Um die Anwendbarkeit des entwickelten und validierten HPLC-DAD-Verfahrens zu demonstrieren, war geplant es abschließend zur Bestimmung der Flavonoid-Gehalte in verschiedenen Braugersten einzusetzen. Darüber hinaus sollte in einem exemplarisch durchgeführten Brauprozesses der Flavonoid-Fluss in verschiedenen Brauprozessesstufen mit LC-DAD-MS/MS verfolgt werden.
-

3 Struktureller Aufbau, Pharmakologische Wirkung und Metabolismus der Flavonoide

3.1 Struktureller Aufbau

3.1.1 Struktur und Nomenklatur der monomeren Flavonoide

Die Flavonoide, deren Name auf die Gelbfärbung dieser Verbindungen (*lat.* flavus = gelb) zurückgeht, bilden die größte Gruppe der Pflanzenphenole. Die Grundstruktur aller Flavonoide gründet sich auf ein Diphenylpropan- bzw. Flavangerüst ($C_6-C_3-C_6$ -Körper), dessen B-Ring biosynthetisch von einem Zimtsäurederivat abstammt [58, 59]. Aufgrund des Oxidationszustandes im mittleren Pyran-Ring des C_{15} -Gerüsts erfolgt eine Unterteilung der Flavonoide in verschiedene Untergruppen (s. Abbildung 1). Hierbei wird zwischen Flavanen, Catechinen, Flavanonen, Flavanonolen, Flavonen, Flavonolen, Flavandiolen, Anthocyanidinen und Chalkonen unterschieden [60, 61].

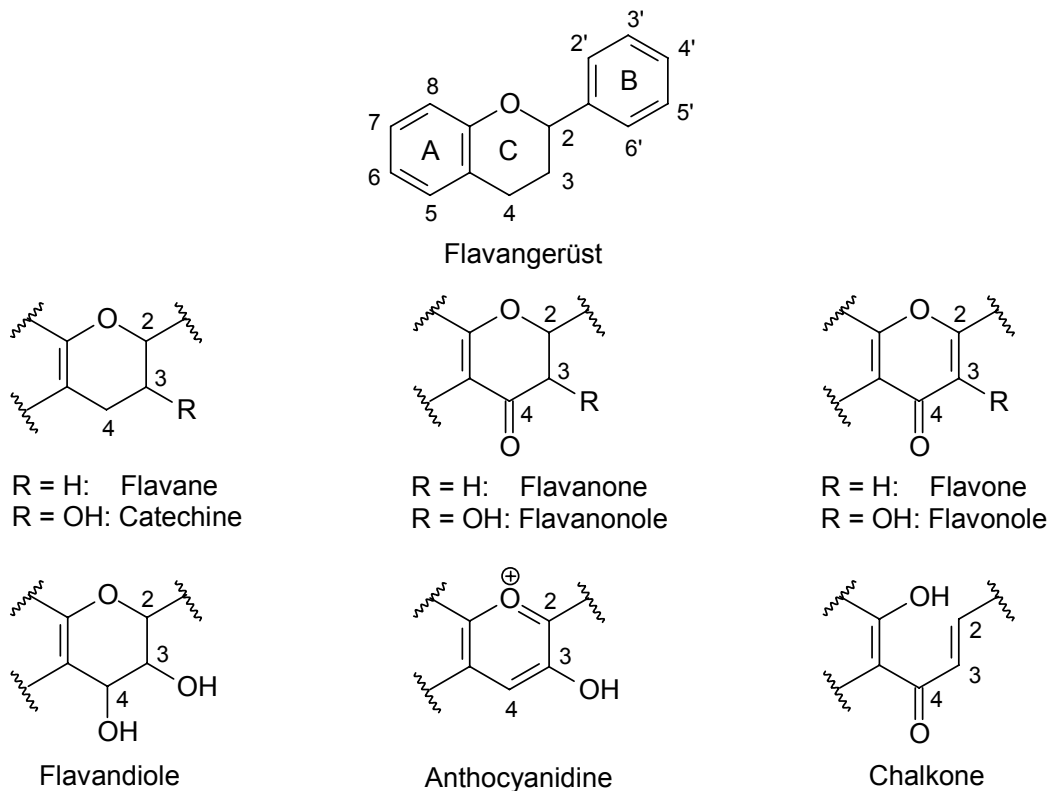


Abbildung 1: Struktureller Aufbau der einzelnen Flavonoid-Klassen

Bislang konnten über 5000 verschiedene Flavonoide nachgewiesen werden. Die große Zahl an Verbindungen ergibt sich durch die vielfältige Möglichkeit der Derivatisierung der jeweiligen Grundstruktur, dem sogenannten Aglykon, beispielsweise durch Glykosylierung, Hydroxylierung, Methylierung oder andere Modifizierungen [62]. Eine Übersicht über die verschiedenen Stoffklassen wird in dem mehrbändigen Werk von HARBORNE [49-52] gegeben.

3.1.2 Struktur und Nomenklatur der Proanthocyanidine

Zusätzlich zu den monomeren Flavonoiden finden sich im Pflanzenreich auch die sogenannten Proanthocyanidine. Diese entstehen durch Kondensation von Flavan-3-olen (Catechinen), Flavan-3,4-diolen oder Flavan-4-olen zu linearen oder verzweigten Ketten, die zwischen 2 und etwa 50 Flavan-Einheiten enthalten können, wobei die monomeren Bausteine in der Natur überwiegend in der 2R-Konfiguration vorliegen [63]. Die Bezeichnung „Proanthocyanidine“ leitet sich nicht von einer biochemischen Vorstufe der Anthocyanidine ab, sondern resultiert aus der Eigenschaft dieser Verbindungen, beim Erhitzen mit Säuren in die entsprechenden Anthocyanidine überzugehen. Es werden unterschiedliche Proanthocyanidin-Klassen abhängig von dem Substitutionsmuster des Monomeren-Bausteins definiert. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die bekanntesten Vertreter dieser Substanzklasse [64, 65].

Tabelle 1: Substitutionsmuster der bekanntesten Proanthocyanidine

Proanthocyanidin-Klasse	Monomeren-Einheit (2R:3S-Stereochemie)	Substitutionsmuster				
		5	7	3'	4'	5'
Procyanidin	Catechin	OH	OH	OH	OH	H
Prodelphinidin	Gallocatechin	OH	OH	OH	OH	OH
Propelargonidin	Afzelechin	OH	OH	H	OH	H
Profisetinidin	Fisetinidol	H	OH	OH	OH	H

Die Procyanidine sind die in der Natur am weitesten verbreiteten Vertreter der Proanthocyanidine. Bei ihren Monomeren-Bausteinen handelt es sich hauptsächlich um die Stereoisomeren (+)-Catechin und (-)-Epicatechin. Liegen zusätzlich im Molekül die Monomeren-Bausteine (-)-Gallocatechin oder (-)-Epigallocatechin vor, so werden die Verbindungen als Prodelphinidine bezeichnet (s. Abbildung 2) [66-68].

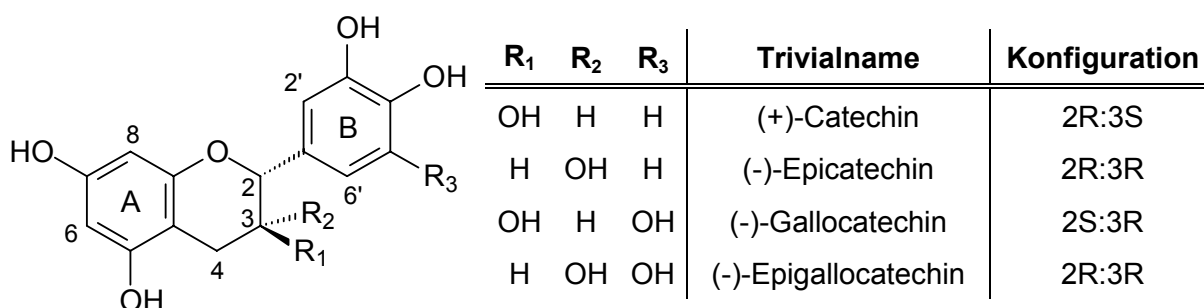


Abbildung 2: Struktur der Monomeren-Bausteine von Procyanidinen und Prodelphinidinen

Die einzelnen Verbindungen innerhalb einer Proanthocyanidin-Klasse können sich in ihrer Stereochemie, im Polymerisationsgrad sowie in der Art der Interflavanverknüpfung unter-

scheiden. Letztere bildet die Grundlage zur Differenzierung zwischen A-Typen (doppelt verknüpft) und B-Typen (einfach verknüpft) (s. Abbildung 3). Procyanidine vom A-Typ konnten bisher nur von wenigen Arbeitsgruppen isoliert werden [69]. Für die Procyanidine A1 und A2 wurde eine dimere zweiarmig verknüpfte Struktur nachgewiesen. Es wurden auch trimere, tetramere und pentamere Komponenten dieses Typs charakterisiert. Die Procyanidine vom B-Typ sind einfach 4,8- bzw. 4,6-verknüpfte Komponenten, die weitaus häufiger in der Natur vorkommen als die des A-Typs [70-72].

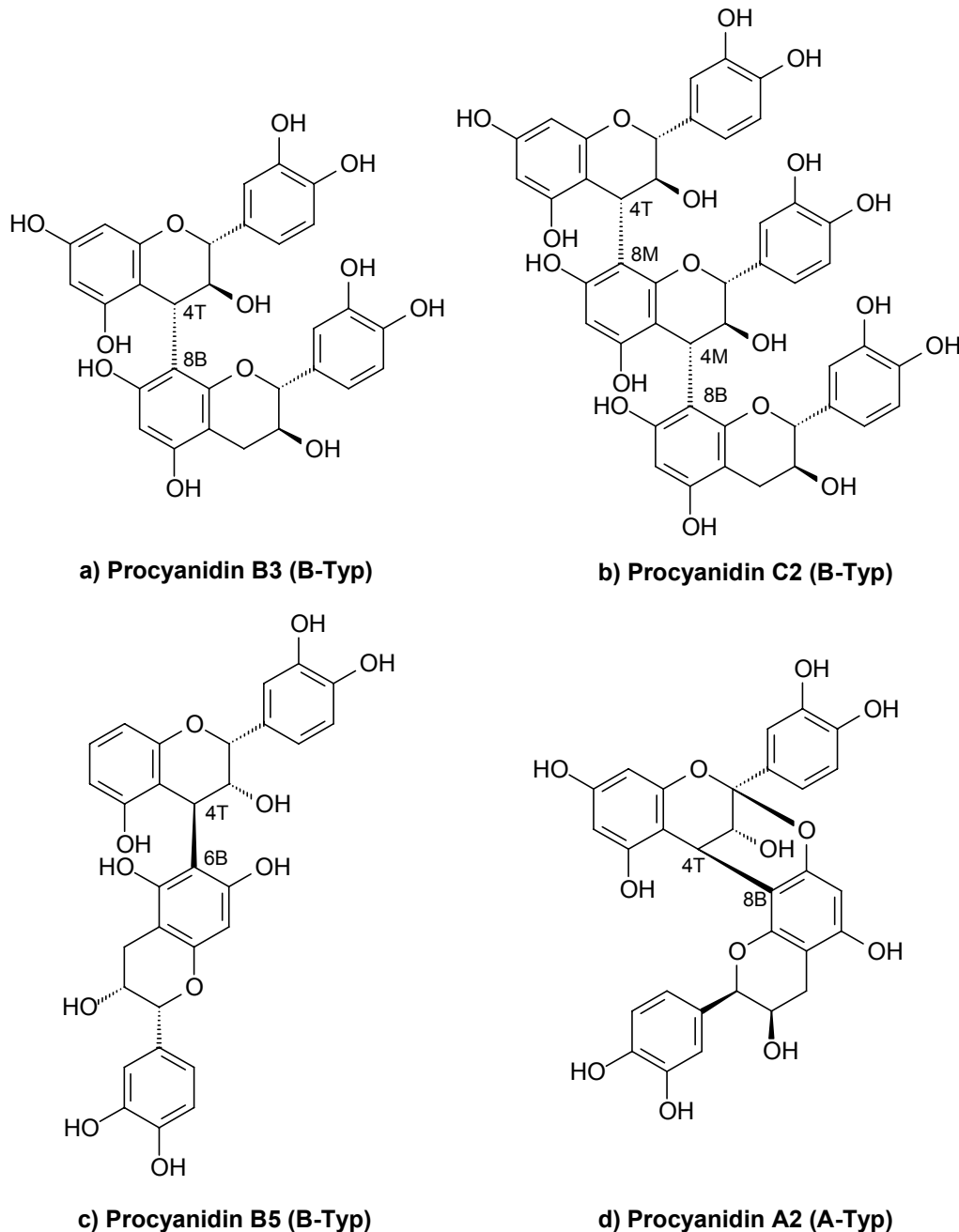


Abbildung 3: Strukturen dimerer und trimerer Procyanidine: **a)** Procyanidin B3 (Catechin-(4 α →8)-catechin); **b)** Procyanidin C2 (Catechin-(4 α →8)-catechin-(4 α →8)-catechin); **c)** Procyanidin B5 (Epicatechin-(4 β →6)-epicatechin); **d)** Procyanidin A2 (Epicatechin-(2 β →O→7), (4 β →8)-epicatechin); (T = top-unit, M = middle-unit, B = base-unit)

Aufgrund der steigenden Zahl der in Pflanzen identifizierten Verbindungen wurde 1988 von PORTER [65] eine einheitliche Nomenklatur der Procyanidine basierend auf den Ansätzen von HEMINGWAY [73] und HASLAM [74] entwickelt. Die Nomenklatur basiert auf der Nomenklatur für Kohlenhydrate und stellt eine sehr präzise Alternative zur systematischen IUPAC-Nomenklatur dar [75]. Die Monomeren-Einheiten werden, wenn sie in der 2R-Konfiguration vorliegen, mit ihren Trivialnamen (Catechin, Epicatechin) bezeichnet. Flavan-3-ol-Einheiten mit 2S-Konfiguration, die in der Natur allerdings sehr selten vorkommen, wird ein *enantio*-Präfix vorangestellt ((+)-Epicatechin = *ent*-Epicatechin). Die Interflavonoid-Bindung der einzelnen Monomere wird entsprechend dem System bei Polysacchariden gekennzeichnet: die Bindungsstelle und die Bindungsrichtung werden in einer Klammer angegeben. Die Konfiguration der Bindung wird analog der IUPAC-Nomenklatur [75] durch die Symbole α oder β definiert. In Tabelle 2 sind die Trivialnamen der bekanntesten Procyanidine gemäß der Nomenklatur nach PORTER [65] aufgeführt.

Um eine Unterscheidung der einzelnen Monomeren-Einheiten innerhalb einer Kettenstruktur zu ermöglichen, wurde von PORTER eine weitergehende Nomenklatur basierend auf der Substitution des A- und C-Ringes der Flavanol-Einheiten entwickelt. Erfolgt eine Verknüpfung einer Monomeren-Einheit ausschließlich an C-4, so wird diese Einheit als T-Unit (top) bezeichnet (s. Abbildung 3). Findet eine weitere zweite Verknüpfung an C-6 oder C-8 statt, handelt es sich um eine M-Unit (middle). Eine J-Unit liegt vor, sobald alle drei möglichen Positionen (C-4, C-6, C-8) im Molekül für eine Interflavan-Bindung genutzt werden. Eine Monomeren-Einheit mit nur einer Bindung an C-6 oder C-8 wird als B-Unit (base) bezeichnet [65, 67].

Tabelle 2: Trivialnamen der bekanntesten di- und trimeren Procyanidine nach der Nomenklatur von PORTER [65]

Trivialnamen	Nomenklatur nach PORTER
Procyanidin B1	Epicatechin-(4 β →8)-catechin
Procyanidin B2	Epicatechin-(4 β →8)-epicatechin
Procyanidin B3	Catechin-(4 α →8)-catechin
Procyanidin B4	Catechin-(4 α →8)-epicatechin
Procyanidin B5	Epicatechin-(4 β →6)-epicatechin
Procyanidin B6	Catechin-(4 α →6)-catechin
Procyanidin B7	Epicatechin-(4 β →6)-catechin
Procyanidin B8	Catechin-(4 α →6)-epicatechin
Procyanidin A1	Epicatechin-(2 β →O→7),(4 β →8)-catechin
Procyanidin A2	Epicatechin-(2 β →O→7),(4 β →8)-epicatechin
Procyanidin C1	Epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-epicatechin
Procyanidin C2	Catechin-(4 α →8)-catechin-(4 α →8)-catechin

3.2 Pharmakologische Wirkung und Metabolismus beim Menschen

3.2.1 Pharmakologische Wirkung

Wie bereits in Kapitel 1 erwähnt, existiert eine kaum zu überschauende Anzahl an Untersuchungen über gesundheitsfördernde Wirkungen von Flavonoiden im menschlichen Organismus. In zahlreichen epidemiologischen Studien werden dieser Substanzklasse präventive Wirkungen gegenüber der Entstehung verschiedenster Krankheiten, wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Atherosklerose, Diabetes, zentraler Ischämie, Alterungsprozesse, im besonderen aber auch vor verschiedenen Krebserkrankungen zugeschrieben [15]. Vielfache Beachtung finden die Flavonoide in letzter Zeit vor allen Dingen aufgrund ihrer möglichen präventiven Wirkung gegenüber Herz-Kreislauf-Erkrankungen. In diesem Zusammenhang wird diskutiert, ob neben einer moderaten Alkoholaufnahme [76, 77] und einem mediterranen Lebensstil [78] auch Flavonoide verantwortlich für das sogenannte „French Paradox“ sind [79-81].

Die vom Menschen täglich mit der Nahrung aufgenommene Flavonoidmenge ist aufgrund differierender Ernährungsgewohnheiten individuell sehr unterschiedlich. In einer internationalen epidemiologischen Langzeitstudie stellten HERTOOG et al. [82] 1995 fest, dass die Flavonoidzufuhr in Japan mit durchschnittlich 68 mg pro Tag, hervorgerufen durch einen hohen Teekonsum, weit über der in Finnland mit 2,6 mg pro Tag liegt. Die durchschnittliche Aufnahme von Flavonen und Flavonolen beträgt in den Niederlanden 26 mg pro Tag, wobei Tee, Zwiebeln und Äpfel die Hauptflavonoidquellen darstellen [83]. KÜHNNAU [58] postulierte für die USA eine tägliche Zufuhr von 1 g Flavonoidglykosiden pro Person. Durch Umrechnung dieses Wertes auf die von HERTOOG et al. [82] berechneten Flavon- und Flavonol-Aglyka ergibt sich eine Größenordnung von 115 mg pro Tag.

Diese signifikanten Unterschiede der Flavonoid-Aufnahme beim Menschen ergeben sich zum einen aus den landestypischen Ernährungsgewohnheiten sowie Verarbeitungsverfahren der Lebensmittel [84], zum anderen liegen sie auch in dem Mangel an zuverlässigen Analyseverfahren zur quantitativen und qualitativen Flavonoid-Bestimmung in Obst, Gemüse und den daraus gewonnenen Lebensmitteln begründet.

Die Ergebnisse vieler epidemiologischer *in vivo*-Studien sind aufgrund dieses Mangels, aber auch wegen fehlender oder nicht valider Bestimmungsmethoden von Flavonoiden im menschlichen Blutplasma kritisch zu betrachten. Hinzu kommt, dass die Resorption der Flavonoide bisher nur begrenzt aufgeklärt ist. Zudem lassen viele Autoren die Halbwertszeit und die Kumulation im menschlichen Körper, sowie die Ausscheidungsprodukte und -dauer in ihren Untersuchungen außer Acht. Daher und aufgrund der Vielzahl an Studien wird in diesem Kapitel in erster Linie auf jene pharmakologische Wirkungen von Catechinen und Proanthocyanidinen eingegangen, die diesen eindeutig zuzuordnen sind. Diese können selbstverständlich mit den Wirkungen anderer Flavonoide identisch sein. Für detaillierte Aussagen hinsichtlich der antioxidativen, antimutagenen und antiinflammatorischen Wirkun-

gen der anderen Flavonoid-Klassen, wird hier auf Übersichtsarbeiten in der Literatur verwiesen [15, 59, 61, 85-92].

Eine besondere Rolle in der präventiven Wirkung der Flavonoide gegenüber der Entstehung von Krankheiten spielt ihre **antioxidative Wirkung**, welche bereits vielfach in *in vitro*-Studien [93-98] und auch in einigen *in vivo*-Studien [99] nachgewiesen wurde. Der menschliche Körper unterliegt permanent dem Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies (z. B. H_2O_2 , OH^\bullet , $^1\text{O}_2$), die dem Körper von außen zugeführt oder von ihm selbst produziert werden können [100]. Diese können im Körper eine Schädigung verschiedenster Zellbestandteile hervorrufen. So unterliegt jede Zelle im Körper täglich etwa 10.000 mutagen wirkenden oxidativen Angriffen [101].

Freie Sauerstoffradikale können auch ungesättigte Fettsäuren der Zellmembran und Lipoproteine niedriger Dichte (LDL, low density lipoproteins) angreifen. Dies führt zu einer Veränderung der Fließeigenschaften, der Durchlässigkeit und Erregbarkeit der Zellmembran und damit zur Beeinträchtigung der Interaktion zwischen Zelle und Mikroumgebung. Weiterhin kann oxidiertes LDL wesentlich schneller und in größeren Mengen über den Acetyl-LDL-Rezeptor aufgenommen werden, welches zu Schaumzellen und letztendlich zur Bildung von Ablagerungen in den Arterien führt und damit zur Grundlage von Atherosklerose. Die Oxidationsangriffe reaktiver Sauerstoffspezies können also zur Entstehung und dem Fortschreiten verschiedenster Krankheiten führen und den Alterungsprozess des Menschen beschleunigen. Dies ist im besonderen zu erwarten, wenn die antioxidativen Abwehrmechanismen des Körpers überfordert sind („oxidativer Stress“) [102-104].

Flavonoide übernehmen durch ihre antioxidative Wirkung eine Schutzfunktion gegen diesen „oxidativen Stress“ und scheinen so vor allem in der Genese von Tumoren und arteriosklerotischen Gefäßveränderungen eine Rolle zu spielen. *In vitro*-Studien belegen, dass Flavonoide in der Lage sind, die Oxidation von LDL zu hemmen und damit die Entstehung von Atherosklerose zu unterdrücken oder zumindest zu vermindern (kardioprotektive Wirkung) [60, 105-108]. Allerdings steht der Nachweis durch entsprechende *in vivo*-Studien noch aus.

Studien belegen, dass die antioxidative Aktivität der in Bier enthaltenen phenolischen Verbindungen größer als die von Rotwein ist [109]. Übertroffen wird sie nur von schwarzem Tee. Bei vielen Studien blieb aber der absolute Gehalt der Polyphenole im Lebensmittel unberücksichtigt. Untersuchungen der *in vivo*-Serumaktivität führten zu gegensätzlichen Ergebnissen bei Wein und Tee. Die höhere Zufuhr an Polyphenolen in grünem und schwarzem Tee im Vergleich zu Wein führte zu geringen bis nicht-signifikanten Effekten auf die antioxidative Aktivität des Serums [110-112].

Strukturelle Voraussetzungen für den antioxidativen Wirkmechanismus von Flavonoiden sind in erster Linie orthoständige Hydroxylgruppen am B-Ring sowie eine Doppelbindung zwischen den C-Atomen 2 und 3 des C-Ringes. Eine Steigerung der Kapazität erfolgt durch eine Carbonylgruppe am C-Atom 4 und deren Wechselwirkung mit benachbarten Hydroxylgruppen [113].

In wässriger Phase liegt das Optimum für die antioxidative Wirkung bei 4 bis 6 Hydroxylgruppen im Flavonoid-Gerüst, wobei vor allem orthoständige Hydroxylgruppen eine stark

antioxidative Kapazität bedingen. Einen großen Einfluss hat auch das Vorhandensein einer freien Hydroxylgruppe in Position 3: Methylierung und Glykolysierungen an dieser OH-Gruppe führt zu einem extremen Verlust der antioxidativen Kapazität. Durch verschiedene Untersuchungen konnte auch gezeigt werden, dass in wässriger Phase oligomere Flavonoide gegenüber den monomeren Verbindungen eine deutlich höhere antioxidative Kapazität aufweisen [94, 114].

Während Catechine in wässriger Phase eine wesentlich geringere antioxidative Kapazität aufweisen als z. B. das häufig untersuchte Flavonol Quercetin, zeigen sie in lipophiler Phase vergleichbare Eigenschaften. Generell sind die strukturellen Voraussetzungen für eine starke antioxidative Kapazität in lipophiler Phase ähnlich denen in wässriger Phase. Zusätzlich bedingen orthoständige Hydroxylgruppen am A-Ring eine Steigerung der antioxidativen Wirkung. Trotz der Vielzahl an Untersuchungen ist der Zusammenhang zwischen der chemischen Struktur und der antioxidativen Aktivität nicht vollständig aufgeklärt. Für zusätzliche Verwirrung sorgen verschiedene Testsysteme, die gerade bei Catechin zu unterschiedlichen Ergebnissen führen [94, 97, 113].

Eine indirekte antioxidative Wirkung können die Flavonoide im menschlichen Körper durch Ihre Fähigkeit, prooxidativ wirkende Metall-Ionen zu chelatisieren, ausüben. In verschiedenen *in vitro*- und auch in *in vivo*-Untersuchungen zeigt Catechin eine hohe Affinität, mit Kupfer- [115, 116], Eisen- [117, 118] oder Aluminium-Ionen [119] **Chelat-Komplexe** zu bilden, und sie auf diese Weise als Prooxidans unwirksam zu machen. FERNANDEZ et. al [120] konnten dabei durch massenspektrometrische Studien sowohl Komplexe mit einer 1:1-Stöchiometrie als auch darüber hinaus mit 1:2-, 2:2- und 2:3-Stöchiometrie detektieren. Die Ausbildung der Komplexe erfolgt vermutlich bei pH-Werten zwischen 5 und 7 über die freien Hydroxylgruppen an C3 und C4 des B-Ringes. Im Sauren dagegen sind sie nicht stabil [121].

Ein weiterer interessanter Aspekt hinsichtlich der pharmakologischen Wirkung von Flavonoiden ist die **Wechselwirkung mit Ascorbinsäure**, einem für den menschlichen Organismus wichtigen wasserlöslichen Vitamin [122, 123]. Pflanzen mit einem hohen Ascorbinsäure-Gehalt weisen auch hohe Konzentrationen an Flavonoiden auf. Experimente zeigen, dass Flavonoide die Aufnahme von Ascorbinsäure im menschlichen Körper unterstützen und so zu einer erhöhten Ascorbinsäure-Konzentration in verschiedenen Organen führen. Zusätzlich sind Flavonoide in der Lage, durch Hemmung einiger Enzyme wie z. B. Ascorbat-Oxidase die Oxidation von Ascorbinsäure zu unterdrücken [113, 124, 125].

Die Ergebnisse epidemiologischer Studien in bezug auf die **antikanzerogene Wirkung** von Flavonoiden sind nicht eindeutig. Aus *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen ergeben sich jedoch zahlreiche Hinweise darauf, dass eine hohe Aufnahme an Flavonoiden durch verschiedene Obst- und Gemüsesorten mit einem geringeren Risiko, an Magen-, Dickdarm- und Brustkrebs zu erkranken, verbunden ist [59, 86, 126-129]. Des Weiteren stellten LE MARCHAND et al. [130] eine negative Korrelation zwischen der Entstehung von Lungen-Kanzerogenen und dem hohen Konsum von Zwiebeln und Äpfeln fest. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch KNEKT et al. [131].

Aus medizinischer Sicht wird angenommen, dass die Hemmung der Kanzerogenese über verschiedene Mechanismen ablaufen kann. Flavonoide können die Aktivität der Phase-I-Enzyme hemmen und damit die Umwandlung eines inaktiven in ein aktives Kanzerogen verhindern. Phase-I-Enzyme katalysieren Reaktionen, bei denen Substanzen mit Hydroxylgruppen angereichert werden, wodurch die daraus entstehenden hydrophilen Produkte leichter ausgeschieden werden können. Als Zwischenprodukte können dabei Kanzerogene entstehen. Phase-II-Enzyme wandeln diese aktiven Kanzerogene in inaktive um; ihre Wirkung wird durch die Aufnahme von Flavonoiden verstärkt [132]. Weiterhin können Flavonoide auch in direkte Wechselwirkung mit der menschlichen DNA treten. Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit Nucleotiden maskieren sie die Bindungsstelle für Kanzerogene und verhindern so das Wachstum DNA-geschädigter Zellen [92, 133, 134]. Durch ihre Fähigkeit zur Induktion von Apoptose wird in den Tumorzellen der programmierte Zelltod eingeleitet [135].

Eine weitere Fähigkeit, die den Flavonoiden zugeschrieben wird und sowohl einen hemmenden Einfluss auf die Kanzerogenese als auch auf dem gesamten menschlichen Organismus hat, ist ihre **immunmodulierende Wirkung**. Sie sind in der Lage, verschiedene Enzyme wie beispielsweise Proteinkinasen oder Phospholipasen zu inhibieren. Dabei kann die Bildung von Zellen der Immunabwehr, wie T-Lymphocyten oder Makrophagen, sowohl gehemmt als auch stimuliert werden [136-139].

Eine große Anzahl an Studien über **antivirale Effekte** von Flavonoiden legt nahe, dass einige Vertreter prophylaktische Wirkungen gegenüber bestimmten viralen Infektionen haben [139]. Durch die Bindung zu den viralen Proteinen können sie die Nuclein-Synthese indirekt unterbrechen. Es gibt sogar Hinweise in der Literatur, dass die Replikation des HIV-Virus beeinflusst wird [140, 141].

Weitere nachgewiesene pharmakologische Wirkungen von Flavonoiden werden auf ihre **antiinflammatorischen** [137], **antimikrobiellen** [142] und **blutdrucksenkenden Eigenschaften** [70] zurückgeführt.

3.2.2 Metabolismus

Die systematische Erforschung des Flavonoid-Metabolismus begann in den fünfziger Jahren. Trotz umfangreicher pharmakokinetischer Studien existiert bis heute jedoch zu keinem Flavonoid eine Untersuchung, in der vollständige Daten zur Resorptionsrate, zum Plasmaspiegel, zur Metabolisierung sowie zur Elimination an einem größeren Kollektiv bestimmt wurde [61].

In der Vergangenheit wurde besonders die Biotransformation von (+)-Catechin an verschiedenen Säugetieren untersucht. Dabei zeigte sich, dass abhängig von der Spezies unterschiedliche Verstoffwechslungen stattfinden. Beim Menschen konnten BELL et al. [143] und andere Autoren [144-147] nach Applikation von Rotwein, schwarzem oder grünem Tee sowohl im Blutplasma als auch im Urin die intakte Verbindung nachweisen. Daneben wurden auch Phase II-Konjugate, d. h. 3'-Methoxycatechin ebenso wie verschiedene Sulfat- und

Glucuronid-Konjugate im Plasma sowie im Urin humaner Probanden gefunden. Eine Ringspaltung des Catechins ist nur bei einer freien Hydroxylgruppe an C-3 möglich. Bemerkenswert ist der Nachweis von verschiedenen δ -Phenyl- γ -valerolactonen (s. Abbildung 4), einer Klasse von Metaboliten, die bei anderen Flavonoiden bisher nicht detektiert worden ist. Untersuchungen mit Antibiotika zeigten, dass Valerolactone Stoffwechselprodukte der gastrointestinalen Mikroflora darstellen, woraus sich auch die gefundene speziesabhängige Verstoffwechslung erklärt [61].

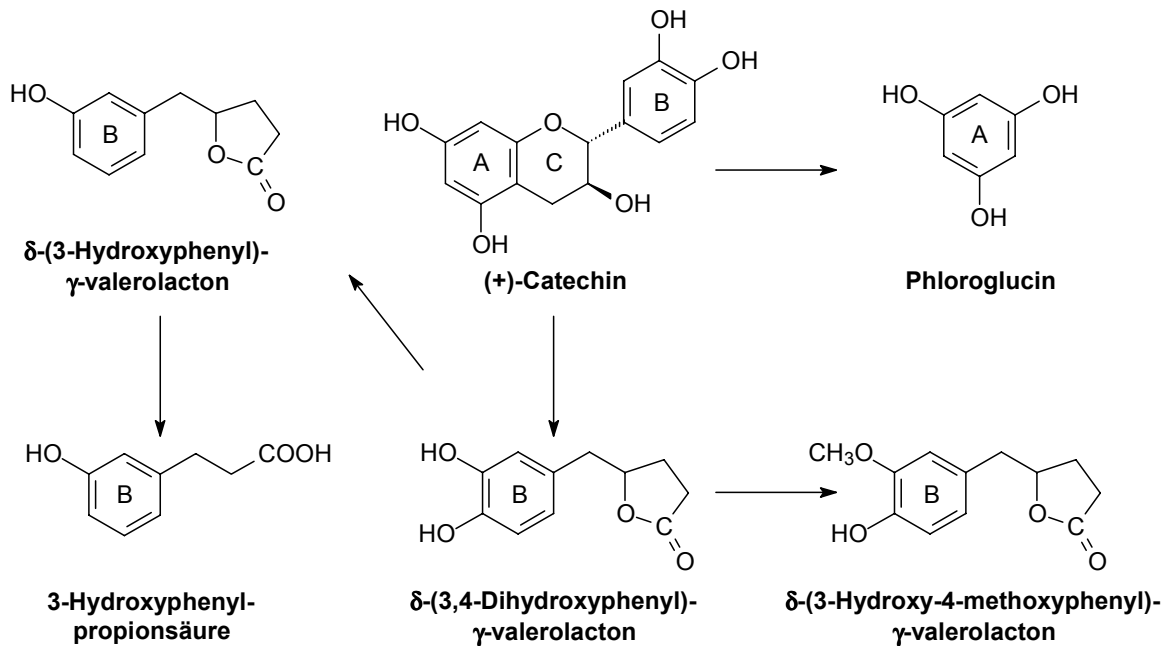


Abbildung 4: Mögliche Verstoffwechslung von (+)-Catechin beim Menschen durch Mikroorganismen des Gastrointestinaltraktes [61]

Die Verstoffwechslung der Proanthocyanidine durch Mikroorganismen des Gastrointestinaltraktes wurde bisher nur *in vitro* mit Procyanidin B3 untersucht. Nach Inkubation mit der Mikroflora aus Rattenfaeces konnten GROENEWOUD et al. [148] neben δ -(3-Hydroxyphenyl)- γ -valerolacton im wesentlichen Phenylpropionsäuren sowie unterschiedlich hydroxylierte Benzoensäuren nachweisen. Hieraus schlossen die Autoren, dass aus dem Procyanidin zuerst Catechin gebildet wird, welches dann auf dem in Abbildung 4 dargestellten Weg weiter verstoffwechselt wird. *In vivo*-Untersuchungen zur Verstoffwechslung von Proanthocyanidinen beschränken sich zumeist auf die Verfütterung von radioaktiv markierten Substanzgemischen ohne definierte Zusammensetzung an verschiedene Tierspezies [149]. Obwohl davon auszugehen ist, dass ein erheblicher Teil der Proanthocyanidine resorbiert wird, ist bis heute nicht geklärt, zu welchen Stoffwechselprodukten sie *in vivo* umgesetzt werden, in welchem Ausmaß eine Resorption der Stoffwechselprodukte oder sogar der intakten Verbindungen stattfinden kann und über welchen Ausscheidungsweg sie eliminiert werden [61].

4 Vorkommen, Bedeutung und Analytik von Flavonoiden in Brauprozessproben

4.1 Flavonoide in Gerste

Ein Gerstenkorn, schematisch dargestellt in Abbildung 5, ist aus einer Schale, dem Keimling und dem Mehlkörper aufgebaut.

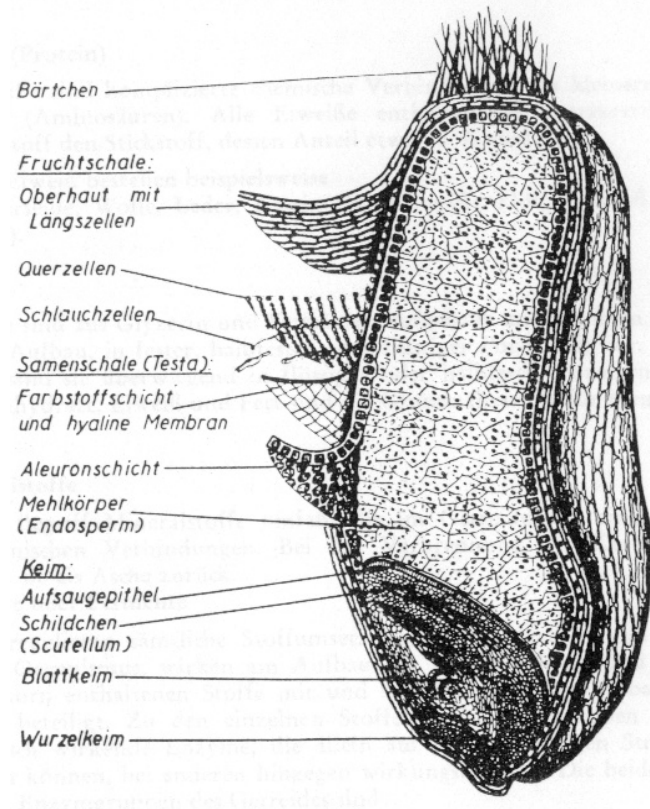


Abbildung 5: Schematischer Aufbau eines Gerstenkorns [151]

Der Keimling besteht aus kleinen, dünnwandigen, eckigen Zellen, die feinkörniges Plasma und den Zellkern enthalten. Das Embryonalgewebe des Keimes ist wachstumsfähig und reich an Eiweiß, Fett, Vitaminen, Enzymen und Mineralstoffen. Der Mehlkörper des Korns ist aus großen, dünnwandigen Zellen aufgebaut, die Stärkekörner in eine strukturlose Eiweißsubstanz eingebaut enthalten. In den Zellen werden die für das Wachstum der Pflanze notwendigen Nährstoffe gespeichert. Die äußere Schicht des Mehlkörpers besteht aus einer ein- oder mehrfach mineralstoffreichen Schicht großer wabenförmiger Zellen, der sogenannten Aleuronschicht. Das gesamte Korn wird von einer inneren Samenschale (Farbstoffschicht und hyaline Membran), der Testa-Layer, und einer äußeren Fruchtschale (Oberhaut mit Längszellen, Querzellen und Schlauchzellen) umschlossen. Die Fruchtschale ist bei der Gerste sehr eng mit einer dem Schutz während des Wachstums dienenden Spelze umhüllt, die nicht beim Dreschen abfällt, sondern durch einen besonderen Schälvorgang abgetrennt werden muss [150-153].

Gerste enthält ein komplexes Gemisch an phenolischen Substanzen, hierzu zählen insbesondere Flavonoide sowie phenolische Säuren und Cumarine. Die Phenolcarbonsäuren liegen in Gerste gewöhnlich gebunden an Zellwandbestandteilen der Schale vor. Die höchste Konzentration weisen Vanillinsäure (50 mg/kg Gerste), *cis/trans*-p-Cumarsäure (350 mg/kg Gerste) und Ferulasäure (1500 mg/kg Gerste) auf [154]. Weiterhin konnten Gallussäure, Protocatechusäure, Gentsinsäure, p-Hydroxybenzoesäure, Diferulasäure, Kaffeesäure, Syringasäure, Sinapinsäure, Zimtsäure und Chlorogensäure identifiziert werden [155-157].

Während der allgemeine Biosyntheseweg der Flavonoide im Sekundärstoffwechsel von Pflanzen als weitgehend aufgeklärt gilt [158-162], ist bei der Biosynthese der in Gerste vorkommenden Flavonoide der detaillierte Ablauf einiger Schlüsselreaktionen sowie die Beteiligung verschiedener Enzyme bisher noch nicht vollständig bekannt [163, 164]. Mögliche Mechanismen sind bei STAFFORD [69, 165] und KRISTIANSEN [166, 167] postuliert.

Verschiedene Untersuchungen haben ergeben, dass die Flavonoide in den Gerstenkörnern in erster Linie in der Samenschale (Testa-Layer) konzentriert sind, aber auch in den Spelzen und in der Aleuronschicht vorliegen. Allerdings werden diese Ergebnisse von einigen Autoren dahingehend kritisiert, dass die Flavonoide ausschließlich in der Testa-Layer lokalisiert sind und ein Vorkommen in den drei Kompartimenten des Korns einzig auf ein mangelhaftes Untersuchungsverfahren mit unzureichender Trennung der einzelnen Teile des Gerstenkorns zurückzuführen sei [168-172]. In welcher Bindungsform die Flavonoide in den Zellen vorliegen, ist bisher ungeklärt. Möglicherweise sind sie, ähnlich wie die Phenolcarbonsäuren, an Zellwandbestandteilen der Schale gebunden. Denkbar ist aber auch, dass ein kleiner Prozentsatz in Form von Metall-Chelat-Komplexen vorliegt, da Gerste eine Vielzahl von Mineralien und Spurenelementen wie z. B. Eisen, Kobalt, Kupfer enthält [173].

In Gerste sind neben den Monomeren Catechin und Gallo catechin bisher 6 Proanthocyanidine identifiziert und charakterisiert worden. Dabei handelt es sich um zwei Dimere und vier Trimere, die aus Catechin- und Gallo catechin-Einheiten aufgebaut sind. In Tabelle 3 sind die bisher in Gerste identifizierten Flavonoide und ihre durchschnittlich gefundenen Gehalte aufgeführt.

In nahezu allen Untersuchungen wurde (+)-Catechin als Monomer in Gerste nachgewiesen, während JENDE-STRID [174], WHITTLE et al. [181] und BRANDON et al. [175] Hinweise auf das Vorkommen von Gallo catechin und Epigallo catechin fanden. Die beiden Letztgenannten konnten zudem ein nur aus Gallo catechin-Einheiten aufgebautes Trimer isolieren. Eine bisher ausschließlich in Buchweizen und Rhabarber-Arten detektierte Verbindung, ein Catechin-Glucopyranosid, konnte ebenfalls in Gerste und Malz im Jahr 2000 erstmalig von FRIEDRICH [183] isoliert und identifiziert werden. Es fehlen hier jedoch aber Bestätigungen weiterer Arbeitsgruppen. Auch hinsichtlich der in Gerste enthaltenen Proanthocyanidine besteht Uneinigkeit in der Literatur. Eine ausführliche Strukturaufklärung bezüglich der Sequenzordnung der enthaltenen Monomeren der bisher sechs beschriebenen Hauptproanthocyanidine ist bisher nicht bekannt geworden. Darüber hinaus finden sich in der Literatur auch Hinweise auf die Existenz weiterer oligomere Flavonoide in Gerste. So stellten

WHITTLE et al. [181] 1999 nach ihren Untersuchungen mittels Electrospray-LC-MS die Vermutung auf, dass neben den sechs Hauptproanthocyanidinen in Gerste weitere 50 oligomere Flavanole bis hin zu Pentameren vorliegen.

Tabelle 3: In Gerste identifizierte Flavonoide mit Konzentrationsbereichen

Trivialname bzw. Nomenklatur nach PORTER [65] in Klammern	Literatur	Konzentration (mg/kg Trockensubstanz Gerste)
Monomere		
(+)-Catechin (C)	[174-180, 181-183*, 184]	[178]: 26-33; [179]: 10-14; [180]: 30-95; [183*]: 25-50; [184]: 15-64
Catechin-Glucopyranosid (CGp)	[183*]	[183*]: 6-38
(-)-Epicatechin (EpiC)	[181, 184, 185]	[184]: < 3
(-)-Gallocatechin (GC)	[174, 175, 181*]	k. A.
(-)-Epigallocatechin (EpiGC)	[174, 181]	k. A.
Dimere		
Procyanidin B3 (C(4 α →8)C)	[174, 175 [#] , 176-180, 181-183*, 186 [#] , 187 [#]]	[178]: 136-270; [179]: 97-142; [180]: 65-350
Prodelphinidin B3 (GC(4 α →8)C)	[174, 175 [#] , 176-180, 181-183*, 186 [#] , 187 [#]]	[178]: 272-362; [179]: 229-234; [180]: 108-450
Trimere		
Procyanidin C2 (C(4 α →8)C(4 α →8)C)	[174-178, 181*, 183*, 186 [#] , 187 [#]]	[178]: 27-110
Prodelphinidin C2 (GC(4 α →8)GC(4 α →8)C)	[174-178, 181*, 183*, 186, 187 [#]]	[178]: 135-243
(GC(4 α →8)C(4 α →8)C)	[174-178, 181*, 183*, 186, 187 [#]]	[178]: 114-245
(C(4 α →8)GC(4 α →8)C)	[174-178, 181*, 183*, 186, 187 [#]]	[178]: 59-138
(GC-GC-GC)	[175, 181]	k. A.
Propelargonidine	[176, 186]	k. A.
Tetramere/Pentamere	[181*]	k. A.

[#] Absicherung über NMR-Untersuchungen

* Absicherung über MS-Untersuchungen

4.2 Die Rolle der Flavonoide im Brauprozess

Bier wird heutzutage in Deutschland zumeist nach dem bayerischen Reinheitsgebot aus dem Jahr 1516 gebraut, welches als einzige Grundzutaten Gerste, Hopfen, Wasser und Hefe vorsieht. Als Braugerste wird vor allem die zweizeilig nickende Sommergerste (*Hordeum distichum nutans*) verwendet, aber auch die sechszeilige Wintergerste gewinnt an Bedeutung. Relevante Kriterien für die Qualität von Braugerste sind u. a. die Beschaffenheit des Mehlkörpers, der Vollgerstenanteil, die Keimenergie und -fähigkeit, der Wassergehalt (Soll < 14 %) sowie der Eiweißgehalt (Soll < 11,5 %). Eiweißarme Gersten sind nötig für die Herstellung heller Malze und Biere, ein hoher Proteingehalt dagegen ergibt Biere mit dunkler Farbe [152, 188].

Die Bierherstellung gliedert sich in die drei Bereiche **Mälzen**, **Würzbereitung** und **Gärung** (s. Abbildung 6). Beim **Mälzen** wird die Gerste unter künstlichen oder gesteuerten Umweltbedingungen zum Keimen gebracht. Durch vorheriges Einweichen der Gerste mit Wasser werden während des Keimvorgangs Enzyme aktiviert und gebildet, die später im eigentlichen Brauprozess am Abbau hochmolekularer Stoffe wie z. B. Stärke und Eiweiß beteiligt sind. Um optimale Keimbedingungen (hoher Sauerstoffgehalt, 15 - 20 °C) zu erzielen, erfolgt während des Mälzens das Einblasen von feuchter Luft. Im weiteren Verlauf der Keimung wird der Mehlkörper, der vor allem aus Stärke besteht, allmählich abgebaut. Die Zellwände werden aufgelöst und die Eiweiße und Fette partiell abgebaut, es bildet sich das sogenannte Grünmalz. Durch schonendes Trocknen wird es zum Darrmalz. Die Keimung wird an dieser Stelle unterbrochen und die typischen Aroma- und Farbstoffe werden gebildet.

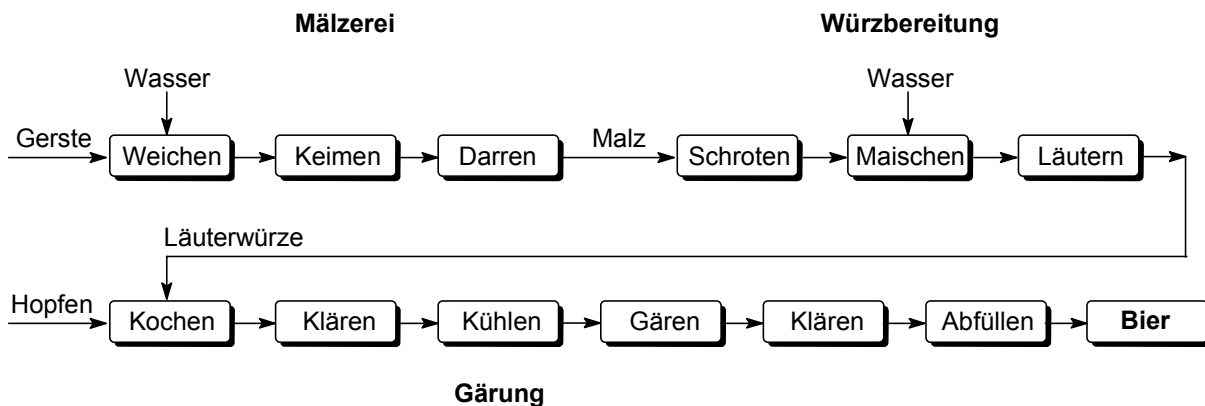


Abbildung 6: Der Prozess des Bierbrauens [189]

Bevor das Malz nun weiterverarbeitet wird, erfolgt zunächst seine Schrotung, wobei die Spelzen nach Möglichkeit intakt bleiben sollten, um beim Läutern als Filterschicht eingesetzt werden zu können. Der Mehlkörper wird fein zermahlen und mit Wasser gemischt (Maischen). Das Maischen bildet zusammen mit den Prozessen des Abläuterns und des Kochens den Prozess der **Würzbereitung**. Ziel des Maischens ist, die Inhaltsstoffe des Malzes in Lösung zu bringen. Dabei ist es erforderlich, diese mit Hilfe der malzeigenen Enzyme so

weit abzubauen, dass sie in Wasser löslich sind. Da die enzymatischen Vorgänge temperaturabhängig sind, wird die Maische auf verschiedene Temperaturen erwärmt. Durch den Abbau der Stärke durch Amylasen werden der Hefe vergärbare Zucker zur Verfügung gestellt. Im Anschluss an das Maischen erfolgt das sogenannte Läutern, die Abtrennung der Würze von den als Trebern bezeichneten unlöslichen Rückständen durch Filtration.

Die erhaltene Läuterwürze wird mit dem Hopfen oder Hopfenprodukten (Extrakt/Pellets) in der sogenannten Würzpfanne gekocht, um die Würze auf die gewünschte Konzentration einzudampfen, Enzyme zu inaktivieren und um das Eiweiß zu koagulieren. Die im Hopfen enthaltenen Inhaltsstoffe (z. B. Humulone) werden herausgelöst und durch das Kochen chemisch verändert. Sie sind verantwortlich für den späteren, typisch bitteren Geschmack des Bieres. Die nach der Würzbereitung erhaltene geklärte Würze wird dann durch Zugabe von Hefe der **Gärung** unterworfen. Im Anschluss an die Gärung wird die Hefe abgetrennt, das Bier filtriert und anschließend abgefüllt [152, 190, 191].

Unter quantitativen Aspekten sind Flavonoide beim Brauprozess nicht von besonderer Bedeutung. Qualitativ gesehen wird ihnen hingegen eine wichtige Rolle zugemessen, da sie durch ihre chemischen Eigenschaften direkt oder indirekt Einfluss auf die Herstellung und die Qualität des Bieres ausüben können (s. Abbildung 7) [192].

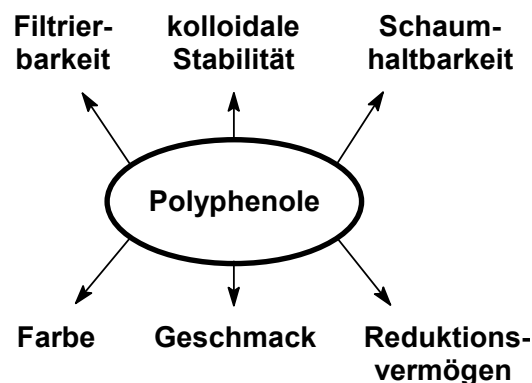


Abbildung 7: Die Bedeutung der Polyphenole für die Bierqualität [192]

Die im Bier nachweisbaren Polyphenole stammen zu etwa 70 bis 90 % aus dem Malz, also der Gerste, und zu 10 bis 30 % aus dem Hopfen. Die Flavonoide, insbesondere die Proanthocyanidine, werden von einigen Autoren [193, 194] als unverzichtbarer Bestandteil des **Biergeschmackes** angesehen. Wegen ihrer relativ geringen Flüchtigkeit treten sie jedoch nicht mit einer deutlichen Flavournote hervor, sondern stellen einen gewissen Hintergrundgeschmack dar [195, 196]. Bei Proanthocyanidinen mit bis zu vier Catechin-Einheiten entsteht ein bitterer, bei Oligomeren mit etwa 6 bis 10 Catechin-Einheiten ein adstringierender Geschmack. Bei mehr als 10 verknüpften Einheiten nimmt der adstringierende Geschmack wieder ab [197]. Bei Verwendung gentechnisch veränderter, proanthocyanidinfreier Gersten wurden hingegen von vielen Autoren [198-200] keine Beeinträchtigung des Geschmackes beschrieben, was aber nicht immer bestätigt wird [201].

Neben der Beeinflussung des Biergeschmackes steht auch zur Diskussion, ob Flavonoide die Geschmacksstabilität des Bieres beeinträchtigen. Für den abgestandenen Geschmack gealterten Bieres sind vor allem gesättigte und ungesättigte Carbonylverbindungen (Alterungscarbonyle) wie *trans*-2-Nonenal oder Undecanal verantwortlich. Ihre Entstehung wird vermutlich durch Oxidation verschiedener Bierinhaltsstoffe durch reaktiven Sauerstoff (Hydroxylradikale, Hydroperoxidradikale) sowohl während der unterschiedlichen Produktionsschritte, als auch im fertigen Bier hervorgerufen [202]. WALTERS et al. [203, 204] konnten in Modellversuchen mit gealtertem Bier zeigen, dass bei geringen Sauerstoffkonzentrationen bevorzugt *trans*-2-Nonenal und bei einem hohen Sauerstoffgehalt eher langkettige Carbonylverbindungen gebildet werden. Durch Zugabe von Antioxidantien wie z. B. Ascorbinsäure kann der Alterungsprozess des Bieres verlangsamt werden. Aufgrund ihres **Reduktionsvermögens** wird den Flavonoiden eine ähnliche Wirkungsweise zugeschrieben, wobei der exakte Mechanismus ungeklärt ist. In Modellversuchen wurde gezeigt, dass durch Zugabe von (+)-Catechin die Bildung längererkettiger Carbonylverbindungen unterdrückt wird [193, 195]. Ähnliche Ergebnisse erzielten KANEDA et al. [205], die durch eine Steigerung des Polyphenols-Gehaltes im Bier eine Erhöhung der Reduktionswirkung feststellen konnten. Bisher sind die Zusammenhänge zwischen der Geschmacksstabilität von Bier und der Reduktionskraft im Detail aber weiterhin ungeklärt [206-208].

Bei hellen Bieren sind, neben den Produkten der Maillard-Reaktion, Polyphenole die wesentlichen Farbbildner. Polyphenolarme Biere haben daher eine besonders helle **Farbe**. Weisen die Polyphenole einen hohen Polymerisationsgrad auf, erhält das Bier einen eher rötlichen Farbton [184]. Bezüglich des Einflusses der Polyphenole auf die **Schaumhaltbarkeit** des Bieres konnten WILSON et al. [209] aufzeigen, dass verschiedene Hopfenflavonoide (u. a. Xanthohumol) die Schaumhaltbarkeit des Bieres nachhaltig verbessern. Dagegen sprechen Untersuchungen von SCHUR [192], der keinen Einfluss zwischen Polyphenolgehalt und Schaumhaltbarkeit feststellen konnte. Durch Entfernung der Polyphenole durch Filtration können auch sogenannte Schaumträger eliminiert werden, der sich auswirkende Effekt auf die Schaumhaltbarkeit ist aber nur sehr gering [195].

Beim Bierbrauen gilt als besonderes Problem die **Trübung** („Haze-Formation“) des Bieres. Bis heute ist noch nicht vollständig geklärt, wodurch diese **kolloidale Instabilität** des Bieres hervorgerufen wird. In der Literatur existieren eine beachtliche Anzahl an Veröffentlichungen zu diesem Thema mit verschiedenen Erklärungsansätzen. Es werden zwei Arten der Trübung unterschieden: die biologische Trübung, welche auf der Verunreinigung des Bieres durch Mikroorganismen beruht und bei der heutigen Art des Bierbrauens nur noch eine untergeordnete Rolle spielt, sowie die nicht-biologische Trübung. Die nicht-biologische Trübung entsteht durch die Bildung von wasserunlöslichen Komplexen aus Proteinen der Gerste und Polyphenolen. Hier wird wiederum zwischen der sogenannten „Kältetrübung“ und der „Dauertrübung“ unterschieden. Die Kältetrübung tritt auf, wenn das Bier auf Temperaturen unter 0 °C abgekühlt wird. Beim Erwärmen löst sie sich häufig wieder auf. Unterliegen die an der Kältetrübung beteiligten Komponenten aber nach dem Abfüllen des Bieres in solcher Weise einer Veränderung, dass sie sich bei Raumtemperatur zu unlöslichen Komplexen zusam-

menlagern, so bildet sich die sogenannte Dauertrübung aus. Die Kältetrübung kann also als Vorläufer der Dauertrübung angesehen werden [195, 210-212].

Die monomeren Flavonoide sind zwar in der Lage, sich über Wasserstoffbrückenbindungen an Proteine anzulagern. Dies führt aber nicht zu einer Trübungserscheinung, da sie nicht in der Lage sind, einzelne Proteinmoleküle zu verbinden. Der Trübung geht eine Polymerisierung der Flavonoid-Monomere voraus, um ein aktives Polymer zu bilden, welches sich dann entweder über Wasserstoffbrückenbindungen, über schwache hydrophobe Bindungen mit den Prolin-Abschnitten der Polypeptidketten oder über ionische Bindungen mit ϵ -Aminogruppen der Lysinsequenz mit den Proteinen zusammenlagert [192]. Des Weiteren wird diskutiert, ob sich auch Komplexe mit α - und β -Glucanen, mit Melanoiden oder mit Hopfenharzen bilden. Die Identifizierung der an der Komplexbildung beteiligten Polypeptide ist schwierig, da eine hydrolytische Behandlung der Komplexe mit einer Spaltung der Peptid-Bindung einhergeht. Eine Aussage bezüglich der Beteiligung polymerer Flavonoide an der Komplexbildung ist nur durch eine vorherige komplette Entfernung der Flavonoide aus dem Bier, gefolgt von einer gezielten Zugabe der jeweiligen Substanzen möglich [192, 213, 214].

Es existieren verschiedene Methoden zur präventiven Unterdrückung von Trübungserscheinungen in Bier. Die erste besteht darin, das gebraute Bier zu kühlen. Dabei entwickelt sich zunächst die oben beschriebene Kältetrübung. Wenn die Temperatur über einen längeren Zeitraum gering gehalten wird, bilden sich größere Aggregate der permanenten Trübung aus, welche durch Filtration entfernt werden können. Weitere Möglichkeiten zur Herabsetzung der Trübung sind das Brauen unter Stickstoff- oder Kohlendioxid-Atmosphäre, um so die Oxidation bzw. Polymerisation der Flavonoide zu verhindern und der Zusatz proteolytischer Enzyme, die die Größe der Polypeptid-Ketten verringern [195].

Ein wirkungsvolles in der Praxis zumeist angewandtes Stabilisierungsverfahren beruht auf der Entfernung der an der Trübung beteiligten Stoffe, den Proteinen oder den Polyphenolen. Um die Proteine zu isolieren, können Bentonite [215] oder Kieselgelpräparate [216, 217] eingesetzt werden. Bentonite haben gegenüber Kieselgelen den Nachteil, dass sie unspezifisch auch schaumstabilisierende Polypeptide entfernen. Dagegen hat der Einsatz von Kieselgelen eine Beeinflussung des Polyphenol-Gehaltes zur Folge, da die Polyphenole über Wasserstoffbrücken an die gefällten Proteine gebunden vorliegen und so einer Mitfällung unterliegen können [195].

Zur Entfernung der Polyphenole wurde in der Literatur bereits 1954 der Einsatz des wasserlöslichen Polyvinylpyrrolidon (PVP) beschrieben, 1960 wurde darauf basierend das wasserunlösliche Polymer Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) entwickelt [192, 195]. Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass PVPP die Proanthocyanidine und Catechine nahezu quantitativ aus dem Bier entfernt, ohne dass dabei andere Eigenschaften, wie Farbe, Schaum oder Geschmack eine Veränderung erfahren [218-223].

Neueste Entwicklungen auf Basis von Ionenaustauscherharzen [224] oder dem gekoppelten Einsatz von mehreren Adsorbentien [225, 226] eröffnen die Möglichkeit, durch gleichzeitige Eliminierung von Teilen der Protein- als auch der Polyphenol-Fraktion sehr gute Stabilisie-

rungsergebnisse des Bieres zu erzielen. Ein weiterer vielfach beschriebener Ansatz ist der Einsatz gentechnisch veränderter, polyphenolfreier Hopfenextrakte oder Malze [227-231]. Brauversuche führten zu stabilen Bieren, deren Geschmack nur unwesentlich von denen mit polyphenolhaltigen Malzen gebrauten Bieren abwich.

Eine Ursache für die in diesem Kapitel geschilderten, häufig widersprüchlichen Aussagen bezüglich der in Abbildung 7 dargestellten Bedeutung der Polyphenole für die Bierqualität liegt darin begründet, dass bisher wenige Untersuchungen über den ausschließlichen Einfluss der Stoffgruppe der Proanthocyanidine oder einzelner Substanzen erfolgt sind. In den Brauereien wird heutzutage standardmäßig der Gesamtpolyphenol-Gehalt mittels UV-photometrischer Methoden bestimmt [232]. Differenzierte Aussagen über den Einfluss der Proanthocyanidine auf beispielsweise die Bieralterung oder die Trübungsbildung sind nur durch gezielte Einzelstoffanalytik sowohl in den Braugrundstoffen als auch in Proben des Brauprozesses möglich. Es herrscht aber bis heute noch ein Mangel an analytischen Methoden zur quantitativen und qualitativen Bestimmung der Einzelsubstanzen. Im folgenden Kapitel 4.3 wird ein Überblick über die bisher in der Literatur beschriebenen Methoden zur Bestimmung von Flavonoiden in Brauprozessproben gegeben.

4.3 Bestimmung von Flavonoiden in Brauprozessproben

Aufgrund der großen Bedeutung der Flavonoide sowohl im Hinblick auf die pharmakologische Wirkung beim Menschen (s. Kapitel 3.2.1) als auch auf die technologische Beeinflussung des Brauprozesses und die damit verbundenen Auswirkungen auf das Endprodukt Bier (s. Kapitel 4.2) ist ihre analytische Bestimmung von großem Interesse. Die bisher in der Literatur beschriebenen Methoden zur Bestimmung des Flavonoid-Gehaltes in Gerste (s. Tabelle 3), Malz und in verschiedenen Proben des Brauprozesses sind vielfach mit chemisch-analytischen Defiziten behaftet. Aus diesem Grund existieren sehr widersprüchliche Aussagen hinsichtlich des enthaltenen Flavonoid-Spektrums und den Mengenangaben der einzelnen Verbindungen.

Während in der Literatur verschiedene Methoden zur Bestimmung der Flavonoide in Gerste und Malz sowie auch in Bier beschrieben sind [53-57, 179], finden sich nur sehr wenige Untersuchungen über die Verfolgung des Flavonoid-Gehaltes in Proben des Brauprozesses [233]. In den folgenden Kapiteln 4.3.1 und 4.3.2 soll ein Überblick über die bisher in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Flavonoid-Bestimmung in Gerste und Malz sowie in verschiedenen Proben des Brauprozesses gegeben werden.

4.3.1 Stand der Flavonoid-Analytik in Gerste und Malz

Die analytischen Methoden zur Bestimmung der Flavonoide in Gerste und Malz können wie allgemein üblich in die Bereiche Probenahme, Probenvorbereitung und die eigentliche analytische Bestimmung unterteilt werden.

Probenahme:

Die Probenahme umfasst den gesamten Vorgang von der Entnahme der Proben und gegebenenfalls dem Zerkleinern, dem Mischen und Teilen des Probengutes bis zum Vorliegen der Analysenprobe [234]. In den in der Literatur beschriebenen Verfahren liegen keine Angaben über die Durchführung der Probenahme und der damit gewährleisteten statistischen Absicherung vor. Es wird lediglich eine Beschreibung der untersuchten Gersten- bzw. Malzsorten angeführt [168, 185, 235, 236]. Im ersten Verfahrensschritt werden die jeweiligen Proben zu einem feinen Pulver vermahlen und im Anschluss der Probenvorbereitung unterworfen. Einzig bei den von OUTTRUP et al. [187] durchgeführten Untersuchungen schließt sich an das Zerkleinern eine Siebung des Probengutes an, um die Homogenität der Probe abzusichern.

Probenvorbereitung:

Ziel der Probenvorbereitung ist es, die Flavonoide (Monomere und Oligomere) quantitativ, schnell, schonend und selektiv aus der Probenmatrix zu extrahieren. In der Literatur wird der Einsatz unterschiedlicher Extraktionsmethoden beschrieben. Die am häufigsten eingesetzte Methode ist die klassische Fest-Flüssig-Solvent-Extraktion mit Hilfe eines Mixers [178, 182] oder eines Hochtouren-Zerkleinerers (Ultra-Turrax) [185], um eine vollständige Homogenisierung des Probenmaterials und damit eine möglichst quantitative Extraktion der Flavonoide zu erzielen. Dagegen setzte FRIEDRICH [183] nach einer Zerkleinerung der Gerste mittels einer Kugelmühle die Soxhlet-Extraktion zur Probenvorbereitung ein, während ZIMMERMANN et al. [237] gute Ausbeuten mit der ASE (Accelerated Solvent Extraction) erzielen konnten. Als Extraktionsmittel wird in den meisten Fällen Aceton/Wasser (75:25, v/v) eingesetzt [174, 176, 178-180, 238]. Die Extraktion mit Methanol oder Methanol-Wasser-Gemischen dagegen führt zu wesentlich geringeren Ausbeuten [235, 239]. Andere Mischungsverhältnisse von Aceton mit Wasser, reines Aceton sowie Gemische von Wasser mit Dioxan oder Essigsäureethylester sind ebenfalls weniger gut geeignet [176, 177]. KALUZA et al. [239] erzielten für die Extraktion aus Hirse mit wässrigem N,N-Dimethylformamid (DMF) gute Ergebnisse, allerdings ist eine nachfolgende Aufkonzentrierung der Analyten durch Eindampfen der Lösung hier schwierig.

Die Probenaufbereitung zur quantitativen Bestimmung der Flavonoide ist unter schonenden Bedingungen durchzuführen, da insbesondere die Proanthocyanidine bei erhöhten Temperaturen (> 50 °C) unter Luft- und Lichteinfluss oxidationslabil sind [240]. Um die Oxidation zu verhindern bzw. zu unterdrücken, geben einige Autoren Antioxidantien wie z. B. Ascorbinsäure zu den Extraktions-Gemischen oder arbeiten unter Schutzgasatmosphäre [177, 185]. Die so gewonnenen Rohextrakte werden vor ihrer chromatographischen Untersuchung noch

einer weiteren Aufreinigung unterworfen. Diese dient sowohl zur Abtrennung von störenden gelösten Matrixbestandteilen sowie zur Aufkonzentrierung der Analyten. Zur Abtrennung lipophiler Substanzen (z. B. Carotinoiden), die sich störend auf die chromatographische Trennung auswirken können, wird der Einsatz einer Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Chloroform, Hexan oder Petrolether empfohlen [185, 236]. Häufig wird auch die Überführung der Flavonoide aus den Rohextrakten in Ethylacetat beschrieben [174]. Dieses Verfahren hat aber den Nachteil, dass die polaren Proanthocyanidine nicht quantitativ übergehen [236].

Andere Möglichkeiten zur Aufreinigung und Aufkonzentrierung der Rohextrakte eröffnet die Extraktion an Festphasenmaterialien (SPE; Solid Phase Extraction), wie z. B. an Polyamid, an Ionenaustauschermaterialien oder an Umkehrphasen. Die SPE bietet eine schnelle und selektive Methode der Probenvorbereitung. Neben der Aufreinigung und Aufkonzentrierung ist sie auch zur Überführung eines Analyten in ein anderes Lösemittel oder zur Derivatisierung einsetzbar. Weiterhin eignet sie sich zur Vorfraktionierung einer Probe z. B. in unterschiedliche Verbindungsklassen [241].

Analytische Bestimmung:

Zur Quantifizierung der Proanthocyanidine werden z. B. zur Prozesskontrolle häufig photometrische Methoden eingesetzt. In der Regel beruhen diese Verfahren auf der Wechselwirkung von Polyphenolen mit Eiweißen und anschließender nasschemischer Reaktion [63]. Da so der Gesamt-Polyphenol-Gehalt als Summenparameter in der Probe erfasst wird, sind diese Methoden sehr unspezifisch. Bei einem anderen beschriebenen Verfahren werden ausschließlich die Proanthocyanidine als Summenparameter gemessen. Es wird ihre Umsetzung zu Anthocyanidinen mit butanolischer Salzsäurelösung [242] und die Reaktion mit aromatischen Aldehyden (z. B. Vanillin) [243] zu rotgefärbten Produkten genutzt. Eine ähnliche Reaktion wie das Vanillin, allerdings zu blauen Kondensationsprodukten, geht DMACA (4-Dimethylaminozimtaldehyd) ein, welches mit der terminalen Einheit der Proanthocyanidine reagiert [244]. Um Aussagen über detaillierte Struktur-Wirkungsbeziehungen sowohl hinsichtlich der pharmakologischen Wirkung als auch bei der Beeinflussung der technologischen Prozesse zu treffen, ist die Ermittlung des Flavonoid-Gehaltes in Form eines Summenparameters aber nicht ausreichend.

Zur Identifizierung und Strukturaufklärung der Proanthocyanidine bezüglich Anzahl und Art der Monomeren-Einheiten, sequenzieller Aufbau und Stereochemie der Verknüpfungsstelle der Monomeren werden in der Literatur verschiedene chemisch- und strukturanalytische Methoden beschrieben [63]. Eine Möglichkeit besteht in der säurekatalysierten Hydrolyse mit z. B. Schwefelsäure. Hierbei erfolgt eine Spaltung der Interflavan-Bindung, bei der das entstehende Carbokation in alkoholischer Lösung zum Anthocyanidin reagiert. Das Chinonmethid als zweites Hydrolyseprodukt kann durch nucleophile Reagenzien abgefangen werden. Dadurch sind die enthaltenen Bausteine identifizierbar, und die Position der Interflavan-Bindung kann bestimmt werden. Diese Methode ist aber sehr aufwendig, fehlerbehaftet, und es können keine Aussagen über die Stereochemie der Interflavan-Bindung getroffen werden [175, 245, 248].

In den achtziger Jahren eröffnete der Einsatz der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie eine neue Möglichkeit der Strukturaufklärung. OUTTRUP et al. [187] und MULKAY et al. [186] konnten in Gerste zwei dimere und vier trimere Proanthocyanidine mittels NMR identifizieren und charakterisieren. Mittels ^{13}C -NMR lässt sich hierbei die absolute und die relative Stereochemie des heterocyclischen Ringes der einzelnen Monomeren-Einheit, das Verhältnis von Catechin/Epicatechin- zu Gallocatechin-Einheiten, sowie indirekt das Molekulargewicht der untersuchten Verbindung bestimmen. Eine Aussage über die Monomeren-Sequenz, abgesehen von der *top* und der *base*-Einheit, ist mit dieser Methode aber nur schwer möglich [67, 246].

Heutzutage werden für die quantitative Bestimmung von Flavonoiden in Gerste und Malz hauptsächlich flüssig-chromatographische Verfahren beschrieben, wobei die Dünnschichtchromatographie (DC) [247] weitestgehend von der HPLC abgelöst wurde. Häufig werden C18-Umkehrphasen (Reversed Phase, RP-C18-HPLC) mit binären wässrigen Gradientensystemen (Methanol oder Acetonitril) [174, 176, 180, 183-186, 235, 236, 248] und UV-Detektion bei 280 nm eingesetzt. Durch Zugabe von Essig- oder Ameisensäure wird die Trennleistung verbessert und Peaktailing unterdrückt; seltener wird auch der Zusatz von organischen Modifiern wie 2-Propanol, Tetrahydrofuran oder Isooctan zur mobilen Phase empfohlen [174, 181, 184, 185, 249].

Die Detektion der Flavonoide mit Dioden-Array-Detektoren (DAD) bietet gegenüber den herkömmlichen Festwellenlängen-UV-Detektoren die Möglichkeit, die chromatographischen Peaks anhand ihrer UV-Spektren zu charakterisieren [185, 235]. Des Weiteren wird die aufwendige Nachsäulenderivatisierung mit DMACA beschrieben, wobei die gebildeten blauen Kondensationsprodukte mit großer Empfindlichkeit bei einer Wellenlänge von 640 nm detektiert werden [72]. Der Einsatz eines coulometrischen Detektors führt gegenüber der UV-Detektion zu niedrigeren Nachweisgrenzen [183].

Ein großes Problem bei der Bestimmung von Flavonoiden in Gerste und Malz besteht aber darin, dass für die bisher beschriebenen Proanthocyanidine keine Standardsubstanzen kommerziell erhältlich sind. Da sich die Proanthocyanidine nur durch Anzahl und Sequenz der monomeren Bausteine (+)-Catechin und (-)-Gallocatechin unterscheiden und damit sowohl in ihren UV-Spektren als auch in ihrem elektrochemischen Verhalten sehr ähnlich sind [183], kann eine sichere Unterscheidung der einzelnen Substanzen nicht über DAD- oder elektrochemische Detektion erfolgen. Bei der UV-Detektion wird durch die Spektrenähnlichkeit allerdings die Möglichkeit der sogenannten indirekten Quantifizierung über (+)-Catechin genutzt [183].

In den späten neunziger Jahren eröffnete die Entwicklung neuer Kopplungsmethoden mit der HPLC Möglichkeiten zur Identifizierung der Proanthocyanidine. Die Technik der HPLC-NMR [250], der Einsatz der NMR-Spektroskopie als Online-Detektor, wurde dabei z. B. für die Bestimmung von Flavonoidglykosiden [251, 252] oder zur Bestimmung der Phenolsäuren in Hopfen und Bier beschrieben [253].

Eine weitere, relativ neue Analysetechnik, stellt die Verwendung eines Massenspektrometers als Detektor in der HPLC, die sogenannte LC-MS/MS-Kopplung, dar. Sie bietet einer-

seits die Möglichkeit zur Online-Identifizierung der Proanthocyanidine über ihre Molmassen. Durch gezielte Fragmentierungsuntersuchungen (MS/MS) können Hinweise über die sequenzielle Verknüpfung der Monomeren in den oligomeren Verbindungen getroffen werden. Bisher existieren aber nur sehr wenige Veröffentlichungen auf dem Gebiet der Gersten-, Malz- sowie der Bieranalytik [181-183, 249]. WHITTLE et al. [181] führten 1999 Untersuchungen mit LC-MS-Kopplung an Gerste und Bierproben durch, allerdings erfolgte keine Verifizierung der getroffenen Zuordnungen über Fragmentierungsuntersuchungen. Erste Ansätze hinsichtlich einer Strukturaufklärung bzw. Identifizierung der in Gerste und Gerstenmalz enthaltenen Proanthocyanidine lieferte FRIEDRICH [183]. Im Rahmen dieser Arbeit soll daher die LC-DAD-MS/MS-Kopplung eingesetzt werden, um zum einen neue Erkenntnisse über das in Gerste enthaltene Flavonoid-Profil zu erlangen und zum anderen eine bisher nicht oder nur ansatzweise durchgeführte Sequenzermittlung der Proanthocyanidine durchzuführen.

4.3.2 Stand der Flavonoid-Analytik in Proben des Brauprozesses

Die Einteilung der Arbeitsschritte zur Analyse der Flavonoide in Proben des Brauprozesses und des Bieres erfolgt analog der Bestimmung in Gerste und Malz (s. Kapitel 4.3.1).

Probenahme:

Bei den Untersuchungen von Bier [53, 55, 57, 179] erfolgt zumeist keine Beschreibung einer statistisch abgesicherten Probenahme. Einzig werden die Sorte bzw. Marke des Bieres und/oder die Bedingungen des Brauens und die damit verbundenen Proben des Brauprozesses näher definiert.

Probenvorbereitung:

Bei den beschriebenen Probenvorbereitungsmethoden wird zwischen flüssigen Proben (z. B. Bier und Würze) und Proben mit Feststoffanteil (z. B. Maische) unterschieden [178].

Die flüssigen Proben werden, wenn sie eine Trübung aufweisen, im ersten Schritt gefiltert [54, 56]. Handelt es sich um Proben nach dem Gärungsprozess, so wird im nächsten Schritt die Kohlensäure durch Entgasen entfernt [55, 57]. Die analytische Bestimmung erfolgt direkt oder erst nach weiteren Aufkonzentrierungs- und Aufreinigungsschritten. So extrahierten beispielsweise WICHERN und DILLY [254] bei der Flavonoid-Bestimmung zum Nachweis von Rohfruchtbieren das Bier mit Hexan, um lipophile Substanzen abzutrennen. ROEDER et al. [249] lyophilisierten das Bier, um es anschließend über Festphasenextraktionen (SPE) an einem Polyamid-Material aufzureinigen und vor der analytischen Bestimmung in zwei Fraktionen, eine Monomer- und eine Oligomer-Fraktion, aufzutrennen. KIRBY und WHEELER [55] setzten als SPE-Material Sephadex LH 20 ein. Zur Entfernung lipophiler Substanzen wurde im Anschluss an die SPE mit Petrolether extrahiert und vor der analytischen Bestimmung eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat durchgeführt.

Für die Bestimmung der Flavonoide in Proben des Brauprozesses mit Feststoffanteil (z. B. Maische) wird eine klassische Flüssig-Flüssig-Extraktion wie für die Gersten- und Malzproben beschrieben (s. Kapitel 4.3.1) durchgeführt [154].

Analytische Bestimmung:

Für die analytische Bestimmung der Flavonoide in Proben des Brauprozesses und in Bier werden prinzipiell die schon unter Kapitel 4.3.1 beschriebenen Methoden angewendet. Die Ermittlung eines Summenparameters, dem Gesamtpolyphenolgehalt, findet für einfache Fragestellungen z. B. hinsichtlich der Trübungsbildung in Bier über UV-photometrische Methoden Anwendung [255, 256]. Bei der quantitativen Bestimmung mittels HPLC werden als stationäre Phasen RP-C18-Materialien, als mobile Phasen binäre wässrige Gradientensysteme unter Zusatz von Methanol, Acetonitril oder von Modifiern wie Essig- bzw. Ameisensäure und zur Detektion häufig UV- bzw. DAD-Detektoren [53, 55, 56, 178, 233, 254] verwendet. Zusätzlich erfolgt auch die elektrochemische Detektion aufgrund ihrer vergleichsweise niedrigeren Nachweisgrenze [54, 57, 179].

Der Mangel an kommerziell erhältlichen Standardsubstanzen der Proanthocyanidine führt auch hier zu den bereits beschriebenen Problemen (s. Kapitel 4.3.1). Die Möglichkeit einer Identifizierung der Verbindungen in Bier oder in Brauprozessproben mittels LC-DAD-MS/MS-Kopplung wurde bisher nur wenig eingesetzt [181, 249].

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Versuche zur Darstellung von Procyanidin B3 als Referenzsubstanz

Zur Gewinnung von Pflanzeninhaltsstoffen als Referenzsubstanzen gibt es prinzipiell zwei unterschiedliche aufwendige Methoden:

1. Isolierung im präparativen Maßstab aus Pflanzenmaterial
2. Organische Synthese

Bei der nach Literaturangaben [42-45, 178, 183, 185, 257] präparativen Isolierung von Proanthocyanidinen erfolgt im ersten Schritt eine Fest-Flüssig-Extraktion aus Gerste. Der so gewonnene Gerstenrohextrakt wird dann über geeignete Säulenmaterialien mehrstufig in seine Einzelkomponenten aufgetrennt. Hierzu wird der Einsatz unterschiedlicher Säulenmaterialien beschrieben. Neben Polyamid-Materialien, wie z. B. Nylon-66 [178, 183, 257], findet das poröse Vinyl-Copolymer Toyopearl HW 40 [42, 185] und sehr häufig auch das Dextranmaterial Sephadex LH 20 [43-45] Anwendung.

Die organische Synthese zur Darstellung der dimeren und höher molekularer Flavonoide erfolgt entweder ausgehend von den Monomeren (+)-Catechin und (-)-Epicatechin [46] oder von dem Edukt (+)-Dihydroquercetin [47, 48].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte Procyanidin B3 (Catechin-(4 α →8)-catechin) analog zu einem in der Literatur [46] beschriebenen Syntheseweg zum Procyanidin B2 (Epicatechin-(4 β →8)-epicatechin) dargestellt werden. Die geplante Synthesestrategie wird in Abbildung 8 schematisch gezeigt. Ausgehend vom (+)-Catechin (**1**) erfolgte im ersten Schritt der Schutz der phenolischen Hydroxylgruppe durch Umsetzung mit Benzylbromid zum Benzylether. Der Einsatz anderer Schutzgruppen wie z. B. Methoxy- oder Benzyloxymethylgruppen war nicht möglich, da das Zielmolekül für die erforderlichen Bedingungen zur nachfolgenden Abspaltung („Entschützung“) wahrscheinlich zu instabil wäre. Die durchgeführte Umsetzung mit Benzylbromid zeigte, dass neben dem gewünschten 5,7,3',4'-Tetra-O-benzylcatechin (**2**) auch das fünffach benzylierte 3,5,7,3',4'-Penta-O-benzylcatechin entsteht. Die Trennung dieser Reaktionsprodukte erfolgte säulenchromatographisch auf Kieselgel mit Dichlormethan als Eluent. Dabei lagen die erreichten Ausbeuten für das vierfach benzylierte Produkt (**2**) bei über 50 % und die des fünffach benzylierten bei 10 % der Theorie.

Die Bildung der Produkte wurde mittels ¹H- und ¹³C-NMR- (s. Kapitel 7.4) sowie LC-MS/MS-Messungen bestätigt. Der Precursor-Ion-Scan (s. Abbildung 9) ergab Signale von (**2**) bei m/z 651 ([M+H]⁺), m/z 673 (Natrium-Addukt [M+Na]⁺) und m/z 689 (Kalium-Addukt [M+K]⁺). Die Fragmentmuster des Product-Ion-Scans konnten dann sowohl dem vierfach als auch dem fünffach benzylierten Produkt zugeordnet werden.

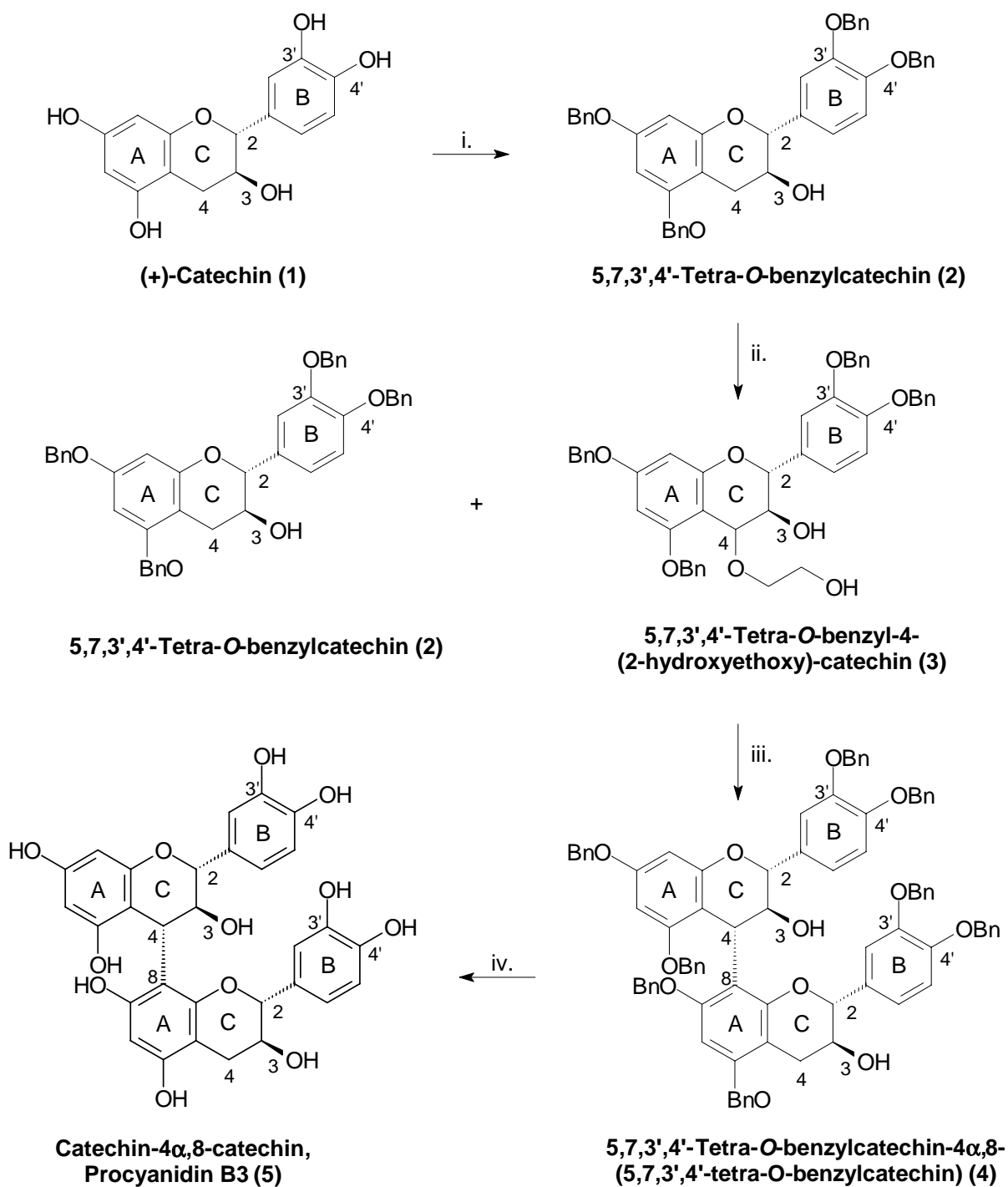


Abbildung 8: Reaktionsweg zur Synthese von Procyanidin B3

- i. Benzylierung der phenolischen Hydroxylgruppen
- ii. Oxidation mit Ethylenglycol an C4
- iii. Knüpfung der Interflavan-Bindung (4 α →8)
- iv. Abspaltung der benzylichen Schutzgruppe

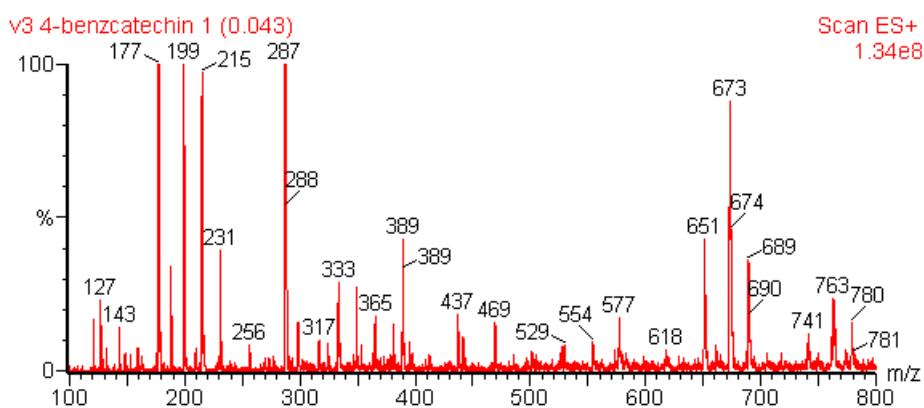


Abbildung 9: Full-Scan Massenspektrum von 5,7,3',4'-Tetra-O-benzylcatechin (**2**) (ESI, positive-Mode)

Im nächsten Schritt erfolgte die Oxidation des geschützten, vierfach benzylierten Catechins (**2**) an dem C4-Atom mit Ethylenglykol, DDQ (2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzochinon) und DMAP (4-Dimethylaminopyridin) zum 5,7,3',4'-Tetra-O-benzyl-4-(2-hydroxyethoxy)-catechin (**3**). Dadurch wird die C4-Position für die anschließende C-C-Knüpfung der Interflavan-Bindung mit 5,7,3',4'-Tetra-O-benzylcatechin (**2**) zusätzlich aktiviert. Das oxidierte Produkt (**3**) konnte nach zweifacher säulenchromatographischer Aufreinigung in Ausbeuten von ca. 40 % erhalten werden (spektroskopische Daten s. Kapitel 7.4).

Im nachfolgenden Reaktionsschritt sollte das 5,7,3',4'-Tetra-O-benzyl-4-(2-hydroxyethoxy)-catechin (**3**) dann mit dem Produkt (**2**) C-C-verknüpft werden und abschließend die Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppen mit Pd/C/H₂ zum Zielmolekül Procyanidin B3 (**5**) erfolgen.

Um die Ausbeute des gewünschten Dimeren (**4**) im dritten Reaktionsschritt der Synthese, der Kupplung, zu erhöhen und die intermolekulare Reaktion des oxidierten Catechins (**3**) zu unterdrücken, wurde ein vierfacher Überschuss an geschütztem Catechin (**2**) eingesetzt. Bei der Durchführung dieses Reaktionsschrittes kam es aber nicht zu der erwarteten Umsetzung zu dem Produkt (**4**). Die Versuchsansätze zur Kondensation der beiden Moleküle unter Zusatz von Titantetrachlorid in Dichlormethan und Tetrahydrofuran als Lösungsmittel zeigten keine einheitliche Produktbildung. Es gelang also nicht, die in der Literatur [46] beschriebene Knüpfung der Interflavan-Bindung des Epimeren 5,7,3',4'-Tetra-O-benzylepicatechin mit Epicatechin auf die geplante Synthese des Procyanidin B3 zu übertragen. Versuche, durch Variation der Reaktionsbedingungen das Dimer zu erhalten, zeigten nach der säulenchromatographischen Aufarbeitung ein breites Produktspektrum.

Möglicherweise könnte der Einsatz anderer Kopplungsbedingungen zu dem gewünschten Produkt führen. Alternativ könnten auch andere in der Literatur [258] beschriebene Synthesestrategien auf ihre Übertragbarkeit hin untersucht werden. Im zeitlich begrenzten Rahmen dieser Arbeit wurde aber auf weitere Versuche verzichtet, die Synthese noch erfolgreich zu beenden, um schließlich die Untersuchungen auf die Entwicklung der HPLC-Methoden zu konzentrieren.

5.2 Bestimmung von (+)-Catechin in Gerste mittels HPLC-DAD

Zur Entwicklung und Optimierung des HPLC-DAD-Verfahrens zur Bestimmung von (+)-Catechin in Gerste wurden die im folgenden aufgeführten Untersuchungen durchgeführt:

- Aufnahme des UV-Spektrums von (+)-Catechin (Lösemittel: Essigsäure (2,5 %; v/v), Phosphatpuffer pH 2 und ein DMF/H₂O-Gemisch (2:1; v/v)): Die UV-Absorptionsmaxima lagen bei 235 nm und 280 nm. Um möglichst selektiv zu arbeiten, da bei Wellenlängen um 230 nm u. a. viele phenolische Säuren absorbieren, wurde als Detektionswellenlänge 280 nm gewählt.
- Ermittlung einer geeigneten mobilen Phase: Bestimmung des pK_s-Wertes von (+)-Catechin sowie Einfluss verschiedener mobiler Phasen auf die Retentionszeit, Peakbreite und -symmetrie des (+)-Catechin-Peaks.
- Einfluss des Lösungsmittels der (+)-Catechin-Messprobe auf die Peakbreite und -symmetrie und auf die Analyt-Stabilität
- Vorauswahl einer analytischen Säule

5.2.1 Mobile Phase

In der Literatur (s. Kapitel 4.3.1) wird bei der Bestimmung von Flavonoiden mit RP-Säulenmaterialien hauptsächlich der Einsatz binärer wässriger Gradientensysteme unter Zusatz von Methanol oder Acetonitril als mobile Phasen beschrieben. Darüber hinaus werden häufig noch Essig- oder Ameisensäure, seltener organische Lösemittel wie 2-Propanol, Tetrahydrofuran oder Isooctan als Modifier hinzugefügt.

Eine wichtige Rolle spielt die Einstellung des pH-Wertes der mobilen Phase, da ausschließlich undissoziierte Analyt-Moleküle mit dem unpolaren RP-Material in Wechselwirkung treten können. Im allgemeinen sollte daher der pH-Wert der mobilen Phase etwa in der Größenordnung 2 pH-Einheiten unterhalb des pK_s-Wertes der Analyten liegen [259]. Für die (+)-Catechin-Bestimmung ist daher die Kenntnis des pK_s-Wertes von (+)-Catechin erforderlich, um eine Deprotonierung der im Molekülgerüst vorhandenen Phenolgruppen zu unterdrücken. Der pK_{s1}-Wert von (+)-Catechin sollte aufgrund der vorhandenen phenolischen Gruppen im Bereich von 9,89, entsprechend dem für Phenol tabellierten Wert, liegen [260]. Die Bestimmung des pK_{s1}-Wertes von (+)-Catechin erfolgte photometrisch durch Aufnahme von E-pH-Diagrammen zu 10,9 (siehe Anhang A.1).

Zur Optimierung der mobilen Phase wurden (+)-Catechin-Standard-Lösungen der Massenkonzentration $\beta = 250$ mg/L unter Verwendung eines Phosphatpuffer/Acetonitril-Gradienten **P1** (s. Kapitel 7.5.1.3, Tabelle 27) mit einem pH von 2 als mobile Phase chromatographiert. Die Einstellung des pH-Wertes auf 2 gewährleistet sowohl das Vorliegen von (+)-Catechin in

undissoziierter Form als auch die Stabilität in der mobilen Phase, denn in einem basischen bzw. schwach sauren pH-Bereich kann es zu Ringöffnungsreaktionen des Polyphenolgerüsts kommen [261, 262]. Der erhaltenen (+)-Catechin-Peak (s. Abbildung 10a) wies bei hoher Peaksymmetrie eine durchschnittliche Basislinienbreite von nur 2,5 Minuten auf. Variationen der Pufferkonzentration sowie eine Erhöhung des pH-Wertes auf 3 zeigten weder einen Einfluss auf die Peakfläche, -höhe, Retentionszeit oder Basislinienbreite des (+)-Catechin-Peaks in der Standard-Lösung noch auf das Peakmuster des ebenfalls chromatographierten Gerstenextraktes (s. Kapitel 5.3.2). Im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen mobilen Phasen (z. B. Essigsäure mit Zusatz verschiedener genau dosierter organischer Modifizier [180, 184]) ist der Phosphatpuffer pH 2 einfacher zusammengesetzt und ermöglichte eine gute Basislinientrennung der einzelnen Analyt-Peaks.

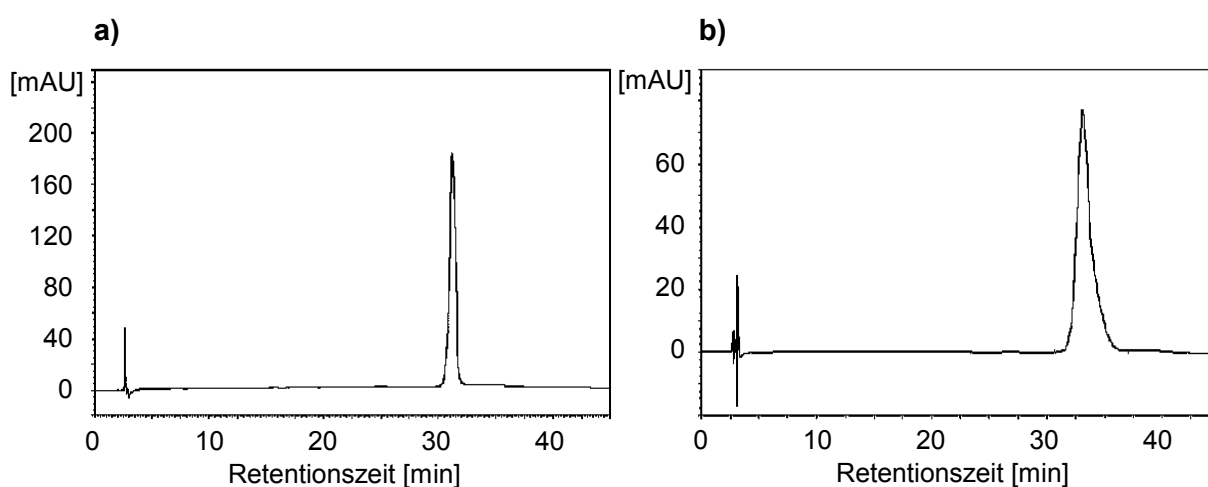


Abbildung 10: Chromatogramme von (+)-Catechin in DMF/H₂O (2:1; v/v), $\beta = 250$ mg/L, Detektionswellenlänge 280 nm, a) Gradient **P1**; b) Gradient **E1**

Zusätzlich wurde ein Essigsäure-Gradient **E1** (2,5 % und 8 %; v/v) auf seine Eignung hin überprüft. Die chromatographische Untersuchung einer (+)-Catechin-Standard-Lösung mit dem in Tabelle 28 (s. Kapitel 7.5.3.1) beschriebenen Gradienten **E1** ergab das in Abbildung 10b) dargestellte Chromatogramm mit einer durchschnittlichen Basislinienbreite des (+)-Catechin-Peaks von 4,3 min. Für die weiteren Untersuchungen wurden sowohl der Phosphatpuffer-Gradient als auch der Essigsäure-Gradient eingesetzt, obgleich Phosphatpuffer aufgrund seiner geringen Verdampfbarkeit und seiner Neigung zu Clusterbildung nicht oder nur sehr schlecht für den späteren Einsatz in der Massenspektrometrie geeignet ist. Er wies aber für die Methode gegenüber des Essigsäure-Gradienten eine geringere Basislinienbreite bei höherer Peaksymmetrie des (+)-Catechin-Peaks auf.

5.2.2 Einfluss des Lösemittels der (+)-Catechin-Messprobe

Das wichtigste Kriterium bei der Auswahl eines geeigneten Lösemittels ist die vollständige Löslichkeit der Analyten. Weiterhin müssen die Analyten in dem gewählten Medium stabil

sein und bei der HPLC-Bestimmung schmale Peaks mit einer hohen Symmetrie ergeben. Es wurden Methanol, Ethanol, Ethylacetat, 2,5 %ige und 8 %ige Essigsäure sowie ein DMF/H₂O-Gemisch (2:1; v/v) eingesetzt. In allen zeigte (+)-Catechin eine hohe Löslichkeit. Bei der nachfolgenden chromatographischen Bestimmung mit der HPLC-DAD ergaben ausschließlich das DMF/H₂O-Gemisch und die 8 %ige Essigsäure (+)-Catechin-Peaks der geforderten Symmetrie, wobei die erhaltene Basislinienbreite des Peaks bei Verwendung des DMF/H₂O-Gemisches deutlich geringer war. Lösungsversuche mit Gerstenextrakt (s. Kapitel 5.3.2) zeigten, dass bei Einsatz von DMF/H₂O eine klare Lösung erhalten wurde. Für die weiteren Untersuchungen wurde daher das DMF/H₂O-Gemisch als Lösungsmittel für die jeweilige Messprobe eingesetzt. Die Untersuchungen bezüglich der Analyt-Stabilität wurden im Rahmen der Methodvalidierung durchgeführt (s. Kapitel 5.5.4).

5.2.3 Vorauswahl der analytischen Säule

In der Literatur [174, 176, 178-181, 184, 249] wird der Einsatz herkömmlicher C18-Materialien zur Bestimmung der Flavonoide in Gerste beschrieben. Häufig wird hier aber keine chromatographische Trennung der einzelnen Analyten erzielt, so dass keine basislinien-getrennten Peaks erhalten werden.

Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit neben der in den Voruntersuchungen eingesetzten Nucleosil RP-18 Säule sieben weitere C18-Phasen mit unterschiedlichen Säulendimensionen, eine C8-Phase sowie sieben neuartige endgruppen-modifizierte RP-Materialien (s. Tabelle 4) erprobt werden. Hierzu wurde mit einer (+)-Catechin-Standard-Lösung ($\beta = 250 \text{ mg/L}$) der Einfluss der Flussrate auf die Retentionszeit, die Peakfläche, die Peakform und die Basislinienbreite des (+)-Catechin-Peaks ermittelt. Um Aussagen bezüglich der Struktur-Wechselbeziehung des Analyten mit den unterschiedlichen eingesetzten stationären Phase treffen zu können, wurden basierend auf den ermittelten chromatographischen Daten die theoretische Bodenzahl N , die reduzierte Trennstufenhöhe h und die reduzierte Fliessgeschwindigkeit v berechnet (s. Anhang A.2, Tabelle A.1 und A.2). Diese erlauben einen absoluten Vergleich der unterschiedlichen Trennsäulen [263].

Eine hohe Affinität zwischen Analyt und der stationären Phase liegt vor, wenn eine hohe Bodenzahl N erzielt wird. Im allgemeinen beruhen die Wechselwirkungen der Analyten mit C18-Materialien fast ausschließlich auf Van-der-Waals-Wechselwirkungen, während bei den Phenyl- oder gemischten Phenyl-Hexyl-Materialien in besonderem Maße π - π -Wechselwirkungen zum Tragen kommen. Ein Vergleich der für die einzelnen Säulen berechneten Kenngrößen zeigte, dass mit den Phenyl- bzw. Phenyl-Hexyl-Phasen gegenüber den Alkyl-Phasen keine wesentlich größeren Bodenzahlen erzielt wurden. Eine besonders geringe Affinität wies (+)-Catechin zu der C8-, der C16-Amid- sowie der Cyano-Trennsäule auf. Dies konnte sowohl bei Einsatz des Gradienten **E1** als auch beim Gradienten **P1** beobachtet werden. Bei allen Säulen wurden mit dem Gradienten **P1** höhere Bodenzahlen und somit geringere reduzierte Trennstufenhöhen erreicht.

Um vergleichende Aussagen über die Leistungsfähigkeit der verschiedenen Trennsäulen bezüglich der Trennleistung und der Packungsqualität treffen zu können, gilt als Richtwert, dass bei einer reduzierten Fließgeschwindigkeit $v = 3$ die reduzierte Trennstufenhöhe h nicht größer als 3 bis 4, und bei $v = 100$ kleiner als 20 sein sollte [263]. Am besten erfüllt bei Einsatz der Gradienten **E1** und **P1** die YMC C18-, die Chromolith C18- und die Discovery Polyethylenglycol-Säule diese Voraussetzung.

Zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit der jeweiligen Trennsäule bezüglich des Einsatzes zur Bestimmung von Flavonoiden in Gerste, wurde für jede Flussrate der Quotient Q_F aus der ermittelten Peakbreite w und der Retentionszeit R_t des (+)-Catechin-Peaks berechnet:

Gleichung 1:

$$Q_F = \frac{W_{(\text{Catechin})}}{R_{t(\text{Catechin})}}$$

In Gerste existieren neben (+)-Catechin, wie in Kapitel 4.1 beschrieben, mindestens zwei dimere-, fünf trimere Flavonoide sowie zusätzlich weitere phenolische Säuren. Da diese Komponenten polarer als (+)-Catechin sind und bei Einsatz eines Reversed-Phase-Materials früher eluieren werden, musste $Q_F \leq 0,10$ sein, um eine Basislinien-Trennung der Komponenten des Gerstenextraktes überhaupt zu ermöglichen, bei gleichzeitiger Minimierung der Gesamtdauer eines Chromatographielaufes.

Tabelle 4: Bezeichnung, Material und Dimensionen der eingesetzten Säulen

Bezeichnung der Säule	Endgruppe	Dimension [mm]
Wakosil II 3C18 RS	C18	100 x 4,0
Nautilus, Nucleosil 100-5C	C18	125 x 2,0
YMC-Pack ODS-AM	C18	150 x 3,0
Synergi 4 μ Hydro RP	C18	250 x 2,0
Omnispher 5 C18	C18	250 x 3,0
Nucleosil 100 C18	C18	250 x 4,0
Chromolith Performance RP-18e	C18	100 x 4,6
Nucleosil 50-5 C8 eC	C8	125 x 2,0
Synergi 4 μ Polar-RP	Phenyl	150 x 2,0
Zorbax	Phenyl	150 x 2,0
Luna 5 μ Phenyl-Hexyl	Phenyl-Hexyl	250 x 2,0
Discovery RP-Amide C16	C16, Amid	150 x 2,1
Discovery Cyano	Cyano	150 x 2,1
Discovery HS PEG	Polyethylenglycol	250 x 4,6
Discovery HS F5	Pentafluorophenyl	250 x 4,6

In Abbildung 11 und Abbildung 12 sind die errechneten Quotienten als Funktion der Flussrate für die Alkyl-modifizierte Säulen bei Verwendung des Essigsäure-Gradienten **E1** und des

Phosphatpuffer/Acetonitril-Gradienten **P1** graphisch dargestellt. Es zeigt sich, dass bei Einsatz des Gradienten **P1** unabhängig vom Säulenmaterial kleinere Quotienten erhalten wurden. Die Retentionszeiten des (+)-Catechin-Peaks waren bei Verwendung des Gradienten **P1** ähnlich oder sogar höher als die bei dem Gradienten **E1**. Daraus folgt, dass die mit dem Gradienten **P1** ermittelten Basislinienbreiten wesentlich geringer, die Peaks also deutlich schmaler waren.

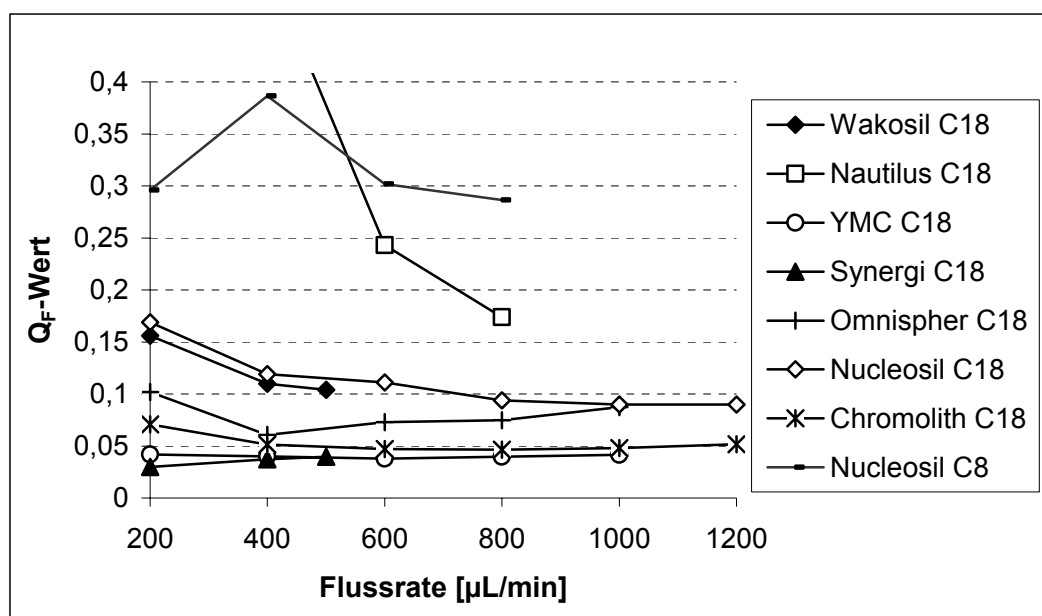


Abbildung 11: Q_F -Werte für den (+)-Catechin-Peak ($\beta = 250 \text{ mg/L}$, DMF/H₂O, 2:1 (v/v)) in Abhängigkeit der Flussrate des Gradienten **E1** für Alkyl-modifizierte RP-Säulen ($n = 4$)

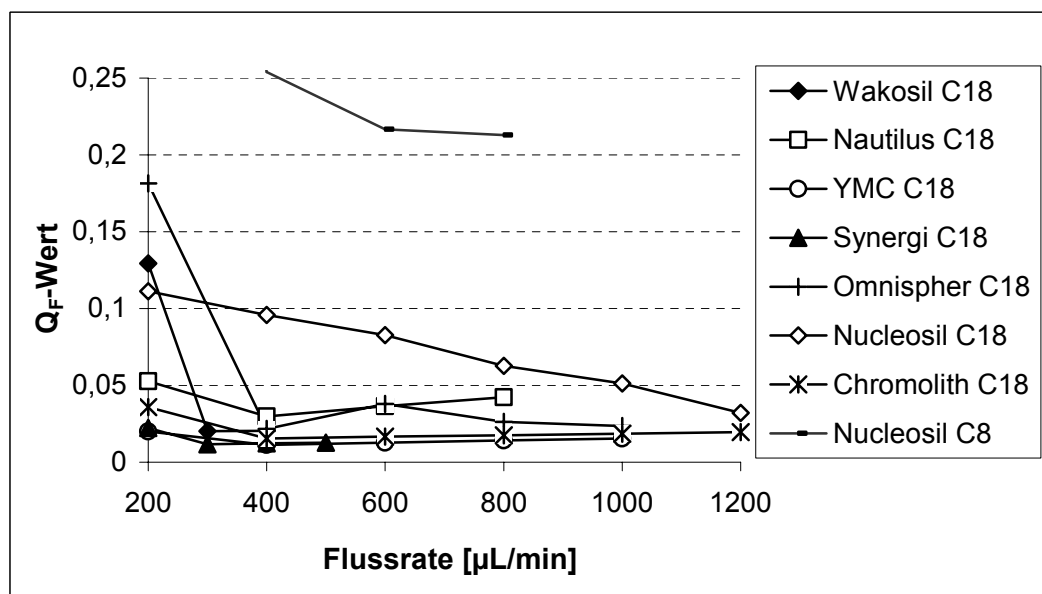


Abbildung 12: Q_F -Werte für den (+)-Catechin-Peak ($\beta = 250 \text{ mg/L}$, DMF/H₂O, 2:1 (v/v)) in Abhängigkeit der Flussrate des Gradienten **P1** für Alkyl-modifizierte RP-Säulen ($n = 4$)

Bei dem Nucleosil C8-Material ergaben sich für beide Gradienten bei allen eingestellten Flussraten Q_F -Werte, die über dem definierten Grenzwert von 0,10 lagen. Der Analyt wurde auf diesem Material im Vergleich zu den anderen C18-Materialien nur unzureichend retardierte, was schon aufgrund der geringen Bodenzahl erwartet wurde. Hinzu kam, dass das gewählte Säulenvolumen von etwa 400 mm³ sehr gering war. Die Nautilus C18-Säule mit den gleichen Dimensionen zeigte für den Gradienten **E1** ebenfalls sehr geringe Retentionszeiten mit großen Peakbreiten und dadurch auch hohe Quotienten. Bei Verwendung des Phosphatpuffers **P1** wurden hingegen Q_F -Werte berechnet, die deutlich < 0,10 lagen. Neben diesen beiden Säulen ergaben sich bei dem Gradienten **E1** im Vergleich zu den anderen Materialien auch für die Wakosil C18 vergleichsweise große Q_F -Werte bis zu 0,12 bei Flussraten bis 500 µL/min. In der gleichen Größenordnung lagen auch die Quotienten der Nucleosil C18-Säule, die bei Verwendung höherer Flussraten aber unter 0,10 sanken. Da der Quotient über dem gesetzten Grenzwert von 0,10 lag und eine weitere Steigerung der Flussrate aufgrund des maximalen Grenzwertes der Druckbelastung der Säulen nicht möglich war, wurde darauf verzichtet die Säulen Nucleosil C8, Nautilus C18 und Wakosil C18 auf die Analyse von Realproben (Gerstenextrakten) anzuwenden.

Die Q_F -Werte der anderen untersuchten C18-Materialien lagen deutlich unter dem Grenzwert. Eine Besonderheit stellte die Chromolith-Säule, ein neuartiges makroporöses Material, das ohne hohe Druckbelastung hohe Flussraten bis zu 2400 µL/min erlaubt, mit Q_F -Werten kleiner 0,1 dar. Die Anwendbarkeit Untersuchung der fünf ausgewählten C18-Säulen auf die Trennung der Bestandteile von Gerstenextrakt wird in Kapitel 5.3.2.2 beschrieben.

In Abbildung 13 und Abbildung 14 sind die Verläufe der Q_F -Werte für die funktionell-modifizierten RP-Säulen bei Verwendung des Essigsäure-Gradienten **E1** und des Phosphatpuffer/Acetonitril-Gradienten **P1** dargestellt. Analog zu den Alkyl-modifizierten Säulen trat auch hier wieder die Besonderheit auf, dass die (+)-Catechin-Peaks bei dem Phosphatpuffer höhere Retentionszeiten, aber wesentlich geringere Peakbreiten aufwiesen.

Das Cyano-modifizierte Material zeigte die geringste Wechselwirkung mit dem Analyten, was zu Retentionszeiten von 5 bis 7 min bei großen Peakbreiten, und damit zu Quotienten bis 0,4 führte. Ein ähnliches Trennverhalten zeigte auch die Amid-modifizierte Säule, welche mit dem Gradienten **E1** bei einer Flussrate von 400 µL/min Peaks mit Basislinienbreiten von bis zu 7 min erreichte und daher nicht für einen Einsatz geeignet war. Während sich die Cyano- und die Amid-modifizierten Säulen somit als ungeeignet erwiesen haben, wurden die drei Phenyl-, die Polyethylenglycol- sowie die Pentafluorophenyl-modifizierten Säulen nach diesen Untersuchungen mit den erreichten Q_F -Werte $\leq 0,1$ als „brauchbar“ zur Untersuchung von Realproben eingestuft (s. Kapitel 5.3.2.2).

Zusammenfassend ergaben sich aus diesen Untersuchungen fünf herkömmliche C18-modifizierte Materialien mit unterschiedlichen Säulendimensionen, zwei Phenyl-modifizierte, eine Phenyl-Hexyl-modifizierte, eine Polyethylenglycol- sowie eine Pentafluorophenyl-Phase, die hinsichtlich ihres chromatographischen Trennvermögens bei Realproben eingesetzt und untersucht werden sollten.

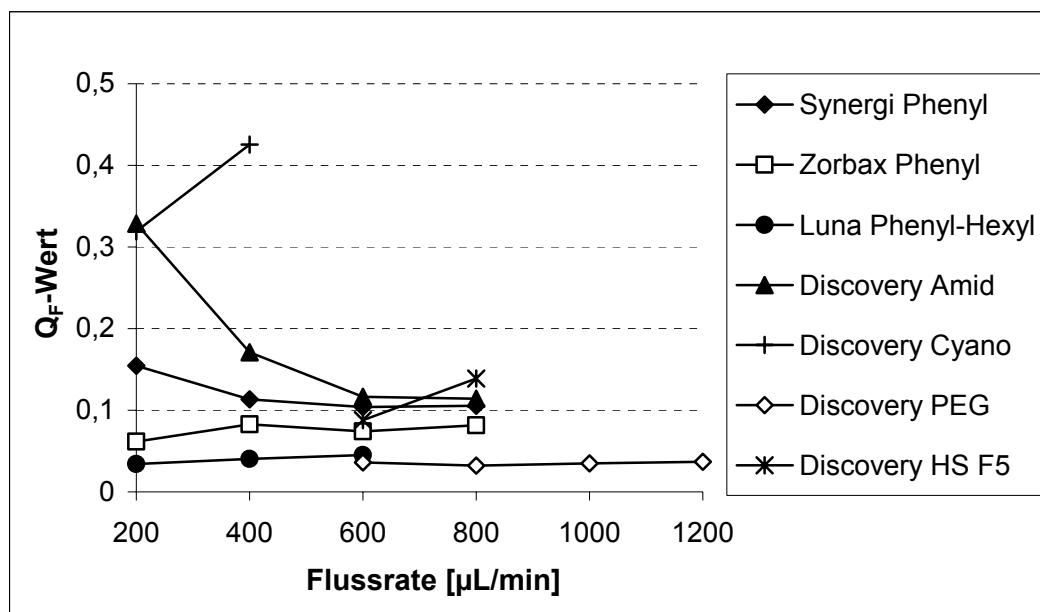


Abbildung 13: Q_F -Werte für den (+)-Catechin-Peak ($\beta = 250$ mg/L, DMF/H₂O, 2:1 (v/v)) in Abhängigkeit der Flussrate des Gradienten **E1** für verschieden funktionell-modifizierte RP-Säulen ($n = 4$)

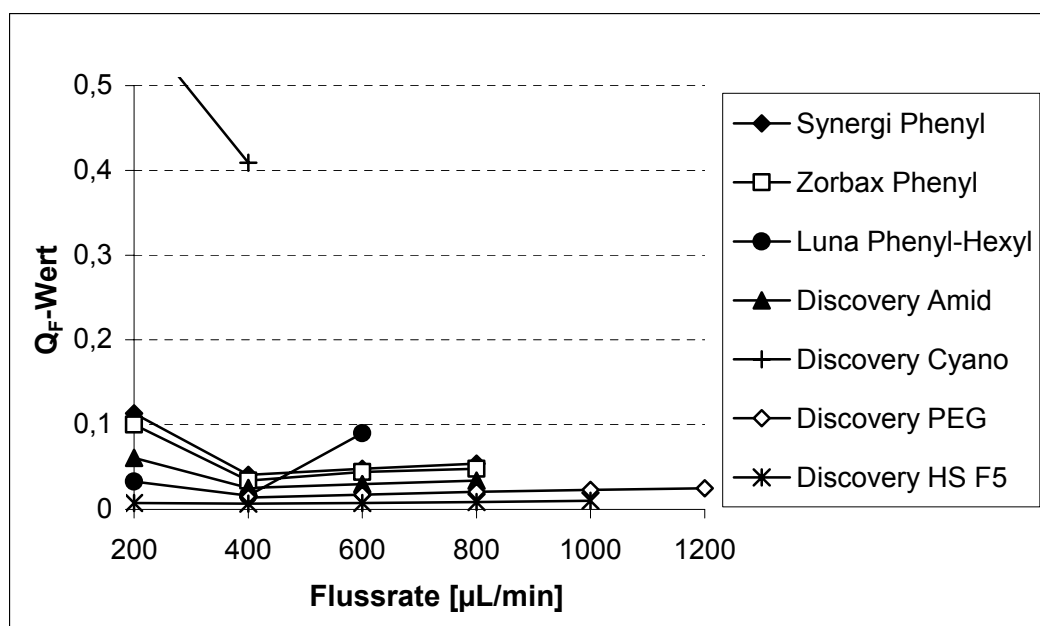


Abbildung 14: Q_F -Werte für den (+)-Catechin-Peak ($\beta = 250$ mg/L, DMF/H₂O, 2:1 (v/v)) in Abhängigkeit der Flussrate des Gradienten **P1** für verschieden funktionell-modifizierte RP-Säulen ($n = 4$)

5.3 Bestimmung von Flavonoiden in Gerste mittels HPLC-DAD

5.3.1 Probenahme und Probenvorbereitung

Ziel der Probenvorbereitung war es, die in Gerste enthaltenen Flavonoide möglichst vollständig, unzersetzt und ohne störende Matrixbestandteile zu extrahieren. Die Flavonoide, insbesondere die Proanthocyanidine, zeigen bei erhöhten Temperaturen und unter Luftfluss oxidative Instabilität, des weiteren kann es bei UV-Licht-Einwirkungen zu Ring-Spaltungsreaktionen kommen [240]. Dies war bei der gesamten Extraktion der Proanthocyanidine zu berücksichtigen, deshalb sollten die Analyten bei der Probenvorbereitung möglichst nicht oder wenig dem UV-Licht ausgesetzt werden, d.h. es sollten Braunglas-Gefäße verwendet werden. Weiterhin sollte die Probenvorbereitung so durchgeführt werden, dass die Temperaturen bei den einzelnen Extraktionsschritten (z. B. Entfernung von Lösungsmittel) < 60 °C gehalten werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Extraktionsmethoden erprobt, zum einen eine Fest-Flüssigextraktion mit einem Ultra-Turrax, zum anderen ein Mikrowellen-gestütztes Extraktionsverfahren (MSS, Mikrowave Supported Solvent Extraction). In Abbildung 15 ist der Ablauf der Probenvorbereitung schematisch dargestellt.

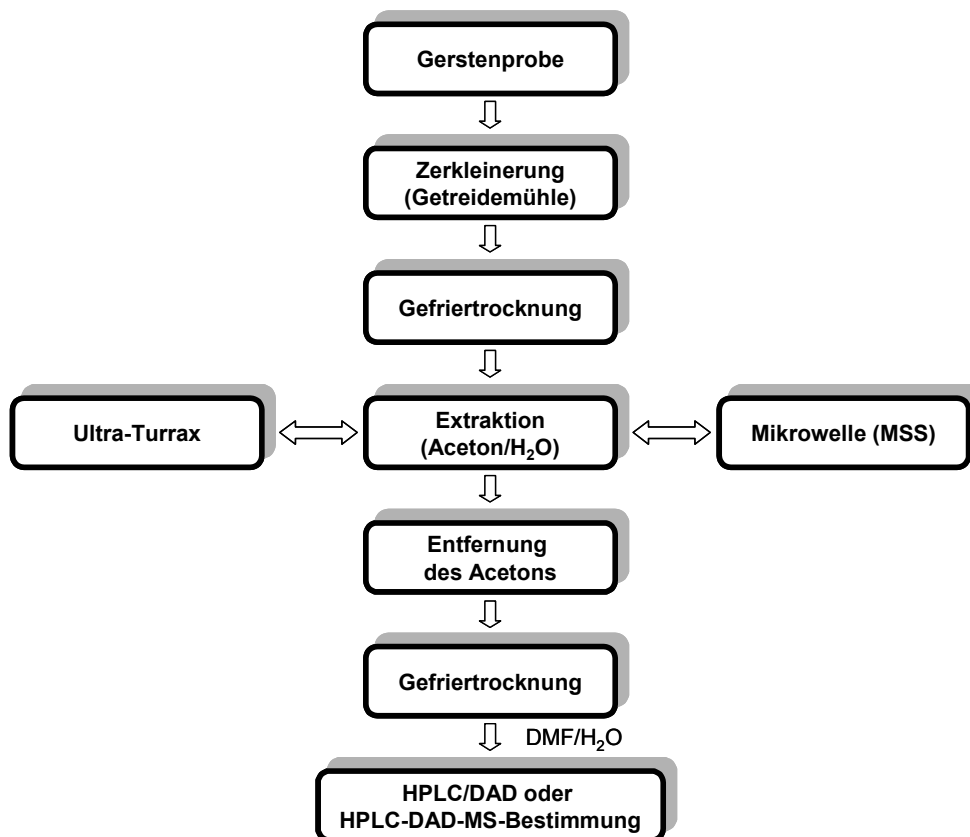


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Probenvorbereitung zur Bestimmung von Flavonoiden in Gerste

5.3.1.1 Extraktion mit dem Ultra-Turrax

Zur Isolierung der Flavonoide wurde in Anlehnung an literaturbekannte Verfahren [185] das im folgenden beschriebene Extraktionsverfahren entwickelt. Im ersten Schritt der Probenvorbereitung erfolgte die Zerkleinerung und Homogenisierung der Gerstenprobe in einer Getreidemühle. Im Anschluss wurde das Probenmaterial gefriergetrocknet und danach mit Hilfe eines Ultra-Turrax unter Eiskühlung mit einem Aceton/Wasser-Gemisch extrahiert. Auf die Erprobung anderer Extraktionsmittel wurde verzichtet, da zahlreiche beschriebene Untersuchungen [176, 183] belegen, dass mit Aceton/Wasser die höchsten Extraktionsausbeuten erzielt werden. Um die Oxidation der Analyten zu verhindern, erwies sich die Zugabe von Natriumdisulfit als Antioxidans gegenüber dem Einsatz von Ascorbinsäure [177] als vorteilhafter, da Ascorbinsäure zu Peaküberlagerungen im Chromatogramm führt.

Um den Einfluss der Anzahl der Extraktionsschritte auf die Extraktionsausbeute zu untersuchen, wurde die Probenvorbereitung zweimal mit jeweils sieben Extraktionsschritten durchgeführt. Die Ausbeute jedes Extraktionsschrittes wurde aus der Summe der ermittelten Peakflächen des (+)-Catechin-, des Procyanidin B3- und des Prodelphinidin C2-Peaks (Identifizierung s. Kapitel 5.6.3.4) berechnet und auf die Gesamtausbeute der ersten Extraktion mit dem Ultra-Turrax bezogen (normiert auf 100 %, s. Abbildung 16, 1a). Wie in Abbildung 16 (1a und b) dargestellt, lag die Extraktionsausbeute nach vier Durchgängen deutlich über 95 %, so dass auf die Durchführung weiterer Extraktionsschritte verzichtet wurde.

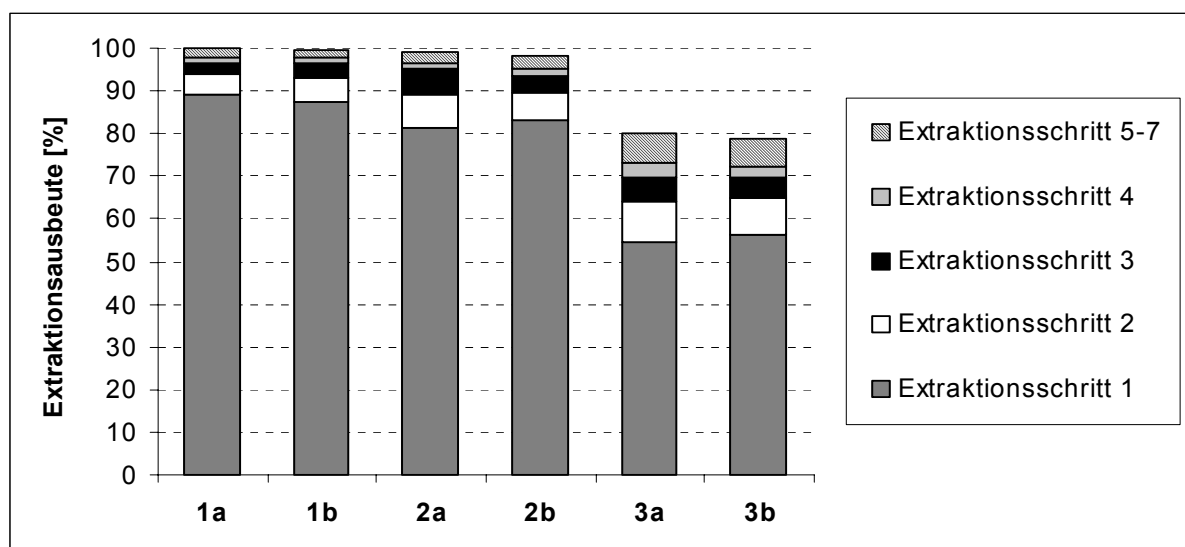


Abbildung 16: Extraktionsausbeuten und prozentuale Verteilung über die einzelnen Extraktionsschritte. **1a,b**: Ultra-Turrax; **2a,b**: Mikrowelle (30 °C); **3a,b**: Mikrowelle (50 °C) ($n = 2$)

Im nächsten Schritt der Probenvorbereitung wurde das Aceton schonend aus den vereinigten Fraktionen am Rotationsverdampfer abgetrennt. Zur Isolierung der Flavonoide aus der verbleibenden Wasserphase ist häufig ihre Überführung in Ethylacetat beschrieben [174,

185, 236]. Eigene Untersuchungen zeigten aber, dass es hierbei etwa zu 20 %igen Verlusten an polaren Proanthocyanidinen kam, da diese nicht quantitativ extrahiert wurden. Versuche, eine Aufkonzentrierung der Analyten mittels SPE zu erreichen, lieferten keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Hierfür wurden verschiedene Festphasenmaterialien (RP-18-Materialien, Anionen- und Kationenaustauscher-Materialien, polymere Mischphasen) auf ihre Eignung hin untersucht. Während mit (+)-Catechin-Standard-Lösungen Wiederfindungsraten um die 90 % erzielt wurden, wurden die Proanthocyanidine bei Aufgabe von Gerstenextrakten im Durchschnitt nur zu 20 % retardiert. Ein Grund hierfür kann sein, dass das große Volumen der Extraktionslösung (ca. 100 mL) zum Durchbruch der Analyten führte. Zur quantitativen Erfassung der Analyten wurden die wässrigen Proben daher in lichtgeschützten Gefäßen gefriergetrocknet und der erhaltene Rückstand zur Analyse in ein DMF/H₂O-Gemisch (s. Kapitel 5.2.2) aufgenommen.

5.3.1.2 Mikrowellengestützte Extraktion (MSS)

Neben der Extraktion mit dem Ultra-Turrax wurde zusätzlich der Einsatz einer für Flavonoide bisher ausschließlich aus Gemüse und Gewürzen [264, 265] beschriebenen mikrowellengestützten Extraktion (MSS; Microwave Supported Solvent Extraction) erprobt. Ziel war es, mit dieser relativ neuen Technik große Probenmengen (> 30 g) effektiver zu extrahieren und gleichzeitig den zeitlichen Aufwand der Probenvorbereitung zu minimieren.

Nach der Zerkleinerung und Gefriertrocknung der Gerste erfolgte die Extraktion wie in Kapitel 5.3.1.1 beschrieben mit dem Aceton/Wasser-Gemisch unter Zugabe von Natriumdisulfid in der Mikrowelle. Hierbei wurden verschiedene Extraktionstemperaturen (30 °C und 50 °C) eingestellt. In Abbildung 16 (2a und b, 3a und b) sind die erhaltenen Ergebnisse der MSS-Technik der „Ultra-Turrax-Methode“ zum Vergleich gegenübergestellt. Bei einer Temperatur von 30 °C entsprachen die erhaltenen Extraktionsausbeuten nach vier Extraktionsschritten mit ca. 95 % etwa denen, die mit dem Ultra-Turrax erzielt wurden. Nach Durchführung der Extraktion bei 50 °C lagen die erzielten Ausbeuten bei nur etwa 80 % bezogen auf die Ausbeuten der Ultra-Turrax-Methode. Die Flavonoide unterlagen wahrscheinlich während der höheren Extraktionstemperatur einer Zersetzung. Die weitere Probenvorbereitung wurde dann entsprechend, wie bereits in Kapitel 5.3.1.1 beschrieben, durchgeführt.

Zusammenfassend kann durch den Einsatz der Mikrowelle zwar nicht, wie erhofft, eine Minimierung des Zeitaufwandes der Probenvorbereitung gegenüber dem Einsatz eines Ultra-Turrax erreicht werden. Eine 95 %ige Extraktionsausbeute wurde mit beiden Extraktionsverfahren nach vier Extraktionsdurchgängen, einer Dauer von 10 min mit der Ultra-Turrax-Methode und 15 min mit der MSS-Technik erhalten. Dennoch bietet die MSS den Vorteil, dass die zu extrahierenden Probenmengen an Gerste bei gleicher Extraktionseffektivität größer sein können. Die eingesetzte Probenmenge von 30 g Gerste ist zwar für eine analytische Bestimmung ausreichend. Da aber mit der MSS-Technik bis zu 500 g Gerste pro Ansatz extrahierbar sind, eröffnet sich hier für zukünftige Arbeiten die Möglichkeit einer Isolierung der Flavonoide aus Gerste im präparativen Maßstab.

5.3.2 Optimierung der HPLC-DAD-Bedingungen

Ausgehend von den chromatographischen Bedingungen für (+)-Catechin als Modellsubstanz (s. Kapitel 5.2) sollten im folgenden die HPLC-DAD-Bedingungen auf Realproben übertragen und optimiert werden. Da die in Gerste enthaltenen höher-molekularen Flavonoide ähnliche Eigenschaften wie (+)-Catechin zeigen und (+)-Catechin als Monomeren-Baustein enthalten ist, wurde sowohl das für (+)-Catechin ermittelte UV-Maximum von 280 nm als Detektionswellenlänge übernommen, als auch DMF/H₂O als Lösungsmittel für die Messprobenlösung, in dem der Gerstenextrakt vollständig löslich ist.

5.3.2.1 Optimierung des Gradientenverlaufes

Ziel der Optimierung war, durch Variation der beiden entwickelten Gradienten (Essigsäure-Gradient **E1** bzw. Phosphatpuffer/Acetonitril-Gradient **P1**) für alle relevanten Peaks eine optimale Basislinientrennung zu erreichen. Hierzu wurde als analytische Säule, wie auch bereits für die (+)-Catechin-Bestimmung, die Nucleosil C18-Säule als sogenannte Basissäule mit einer Flussrate von 1 mL/min verwendet.

Der Gradient **E1** konnte nicht in seinem ursprünglichen Verlauf für die Analyse der Realproben eingesetzt werden, da seine Elutionskraft nicht ausreichte, um die im Gerstenextrakt vorhandenen unpolaren Komponenten vollständig von der analytischen Säule zu eluieren. Es war deshalb die Zugabe von Acetonitril zur mobilen Phase erforderlich. Der Schwerpunkt der Optimierungsuntersuchungen bezüglich der Basislinientrennung der Peaks lag im vorderen Bereich des HPLC-Chromatogrammes, da die Proanthocyanidine aufgrund ihrer im Vergleich zu (+)-Catechin größeren Polarität schneller von der HPLC-Säule eluieren. Der zeitliche Verlauf des durch verschiedene Experimente ermittelten und erfolgreich zur Trennung einsetzbaren Gradienten **E2** ist in Kapitel 7.5.3.1 beschrieben. Ein repräsentatives HPLC-Chromatogramm eines Gerstenextraktes zeigt Abbildung 29 in Kapitel 5.5.5.1.

Bei Einsatz des Phosphatpuffer/Acetonitril-Gradienten **P1** wurden für (+)-Catechin im Vergleich zum Gradienten **E1** wesentlich schmalere und symmetrischere Peaks erhalten. Zur Erzielung einer Basislinientrennung der Analyten und einer Verkürzung der Analysenzeiten wurde auch dieser Gradient in mehreren Versuchen variiert. Erstaunlicherweise führte der Einsatz des resultierenden Gradienten **P2** (s. Kapitel 7.5.3.1) im Vergleich zum Gradienten **E2** zu einem völlig anderen Peakmuster (s. Kapitel 5.5.5.1, Abbildung 28), was auf die unterschiedliche Wechselwirkung Analyt-Fließmittel zurückzuführen ist. Beide Gradienten erwiesen sich als geeignet, Flavonoide in Gerstenextrakten basisliniengetrengt zu chromatographieren, so dass sich die Wahl des Fließmittels nach dem geforderten Anwendungsziel bzw. der Detektionsart (UV, MS) orientieren kann.

5.3.2.2 Leistungsvergleich der analytischen Säulen

Die für die Basissäule Nucleosil C18 entwickelten Gradienten **E2** und **P2** sollten auf die in

den Voruntersuchungen (s. Kapitel 5.2.3) ausgewählten analytischen Säulen übertragen und optimiert werden. Abhängig von der maximalen Druckbelastung der jeweiligen Säule wurden systematische Versuche mit unterschiedlichen Flussraten durchgeführt.

In Abbildung 17 sind die Chromatogramme eines Gerstenextraktes bei Verwendung der Synergi Hydro RP-Phase und der anderen nicht-Alkyl-modifizierten Phasen gegenübergestellt.

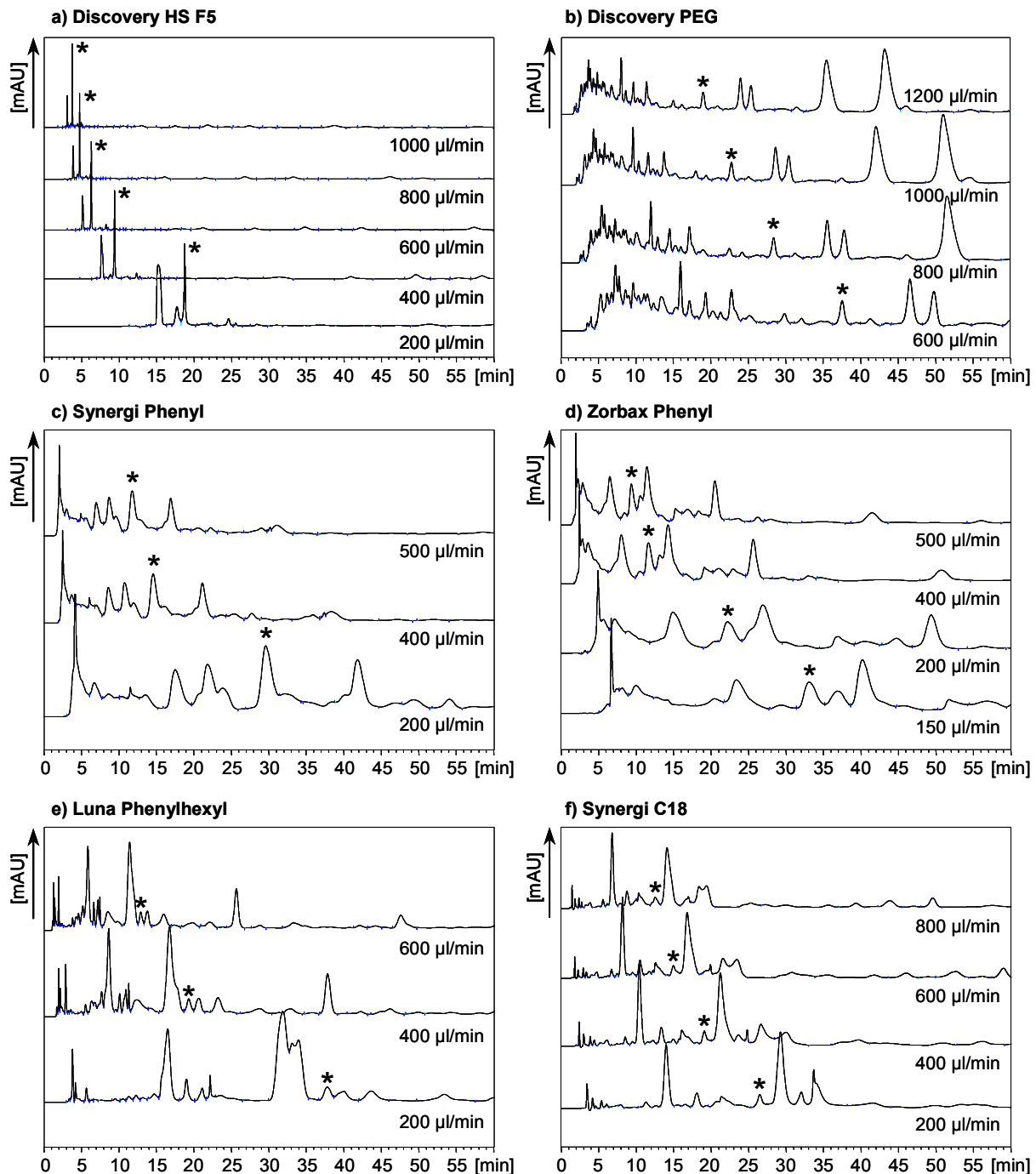


Abbildung 17: Einfluss unterschiedlicher analytischer Säulen und Flussraten auf die HPLC-UV-Chromatogramme ($\lambda = 280 \text{ nm}$) eines Gerstenextraktes (Gradient E2) (* Peak-Markierung zur Verfolgung des Effektes der Flussratenänderung)

Bei den drei Phenyl-modifizierten Säulenmaterialien wurde keine Basislinientrennung erreicht. Zudem waren die Retentionszeiten sehr lang. Eine Erhöhung der Flussrate war, bedingt durch die maximale Druckbelastung der Säule, nicht möglich. Bei der Pentafluorphenylphase wurden, abgesehen von drei polaren Analyten-Peaks, die anderen Analyten nicht bzw. sehr spät eluiert. Ebenso war die Polyethylenglykolphase nicht für die Bestimmung in Gerste geeignet, da im vorderen Bereich des Chromatogramms keine Basislinientrennung der Peaks erreicht wurde. Das beste Trennergebnis wurde mit der Synergi C18-Säule (s. Abbildung 17f) erhalten, doch zeigen sich auch hier Peaküberlappungen in Form von Schultern, sowie deutliches Peaktailing. Versuche, durch Variation des eingesetzten Gradienten die Trennung zu verbessern, führten zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis.

In Abbildung 18 sind die mit den analytischen Säulen erhaltenen Chromatogramme dargestellt, die ein vergleichbares Trennverhalten wie das Nucleosil C18-Material zeigten. Sowohl bei der Omnispher C18-, der YMC C18- als auch bei der Chromolith C18-Säule wurden basisliniengetrennte Analyten-Peaks bei kurzen Analysenzeiten erhalten. Die Peakform war bei Verwendung der Chromolith C18-Säule etwas schlechter als bei der Omnispher C18- und der YMC C18-Säule. Dennoch stellen diese drei C18-Säulen neben der Nucleosil C18 eine Alternative zur Trennung von Flavonoiden in Gerste bei Verwendung des Essigsäure/Acetonitril-Gradienten **E2** dar.

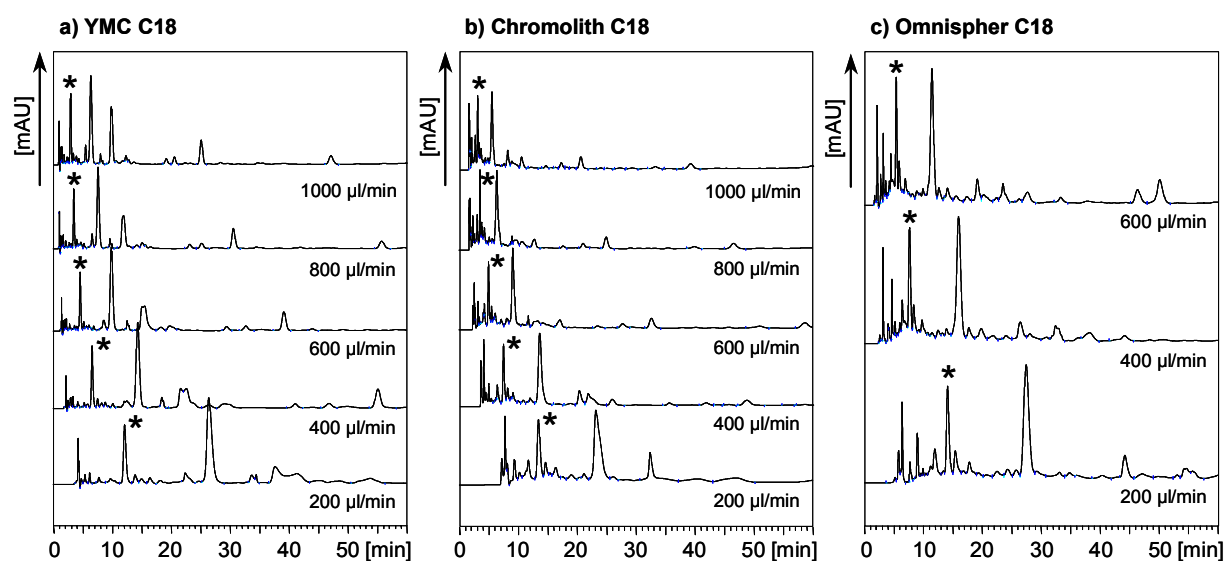


Abbildung 18: Einfluss unterschiedlicher RP-C18-Säulen und Flussraten auf die HPLC-UV-Chromatogramme ($\lambda = 280$ nm) eines Gerstenextraktes (Gradient **E2**)

Die aus den Untersuchungen der Realproben mit dem Phosphatpuffer/Acetonitril-Gradienten **P2** erhaltenen Chromatogramme sind in Abbildung 19 und Abbildung 20 dargestellt. Es zeigte sich, dass hier ebenso wie bei Verwendung des Gradienten **E2** die drei Phenyl-modifizierten Materialien wie auch die Pentafluorphenyl- und die Polyethylenglykol-Säule nicht für die Trennung der Analyten in Realproben geeignet waren (s. auch Abbildung 19).

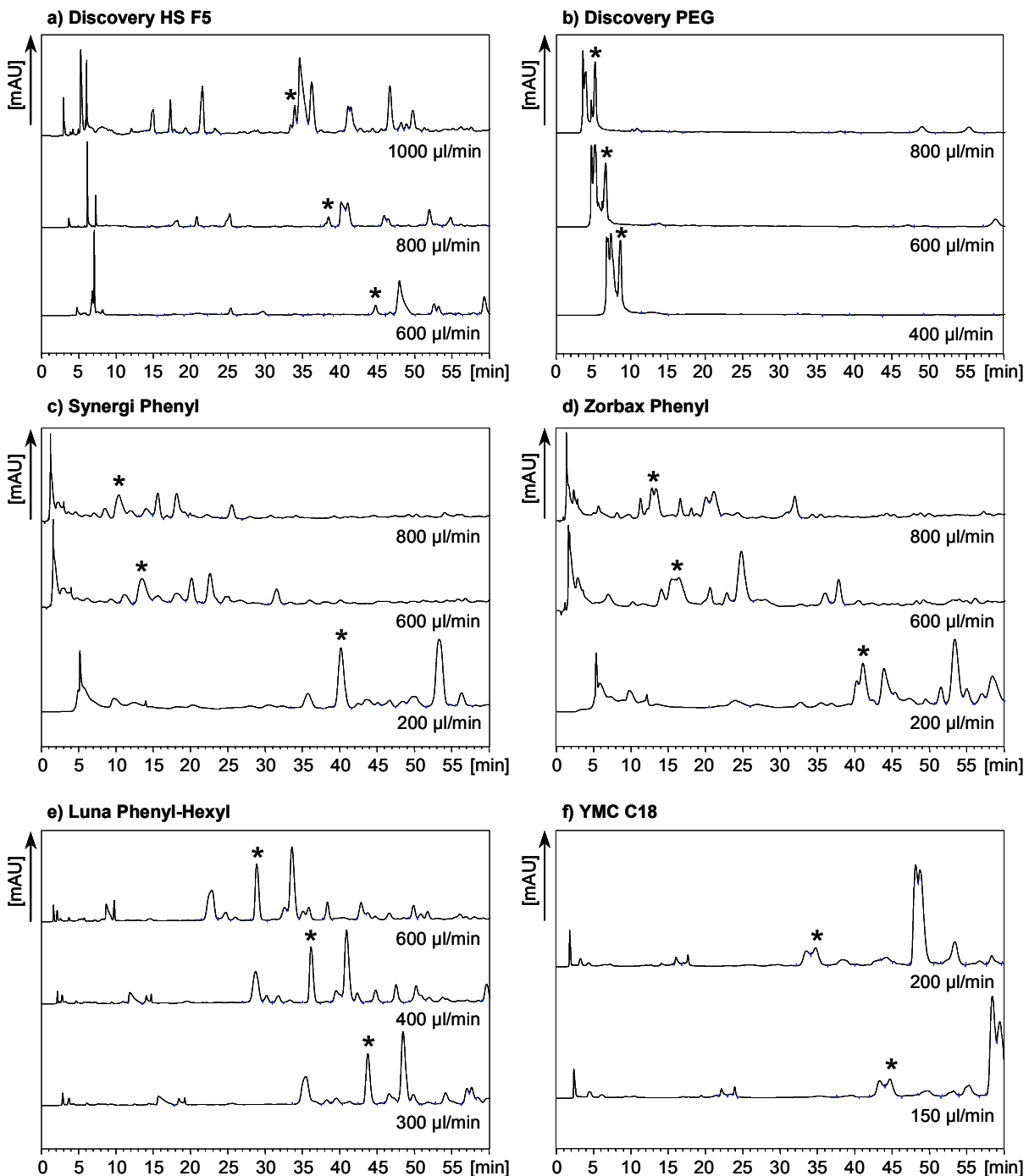


Abbildung 19: Einfluss unterschiedlicher analytischer Säulen und Flussraten auf die HPLC-UV-Chromatogramme ($\lambda = 280 \text{ nm}$) eines Gerstenextraktes (Gradient P2)

Das erhaltene Peakmuster wies bei keiner der Säulen eine Basislinientrennung auf. Besonders das Trennverhalten der Polyethylenglycol-Säule (s. Abbildung 19b) war erstaunlich; bei Verwendung des Gradienten E2 wurden kurze Retentionszeiten beobachtet, bei Verwendung des Gradienten P2 erfolgte bis 55 min keine Elution der relevanten Analyten. Als einziges C18-Material konnte die YMC C18-Säule für die geplante Anwendung ausgeschlossen werden, obwohl bei der analytischen Trennung mit dem Gradienten E2 gute Ergebnisse er-

zielt wurden. Limitierend waren hier die hohen Säulen-Drücke, weshalb nicht versucht wurde, durch Erhöhung der Flussrate bessere Trennungen zu erzielen.

In Abbildung 20 sind Chromatogramme zusammengestellt, die mit den Säulen erhaltenen wurden, welche neben der Nucleosil- C18-Säule bei Verwendung des Gradienten **P2** einsetzbar waren. Besonders hervorzuheben war hier die Säule Chromolith C18. Durch die makroporöse Trägermatrix bietet diese Säule nur einen geringen Gegendruck, es sind deshalb Flussraten bis zu 3 mL/min realisierbar. Als Nachteil ist aber der hohe Lösemittelverbrauch zu sehen. Zudem kann sie in der LC-DAD-MS/MS nur bei gleichzeitiger Verwendung eines Split-Einlasses eingesetzt werden.

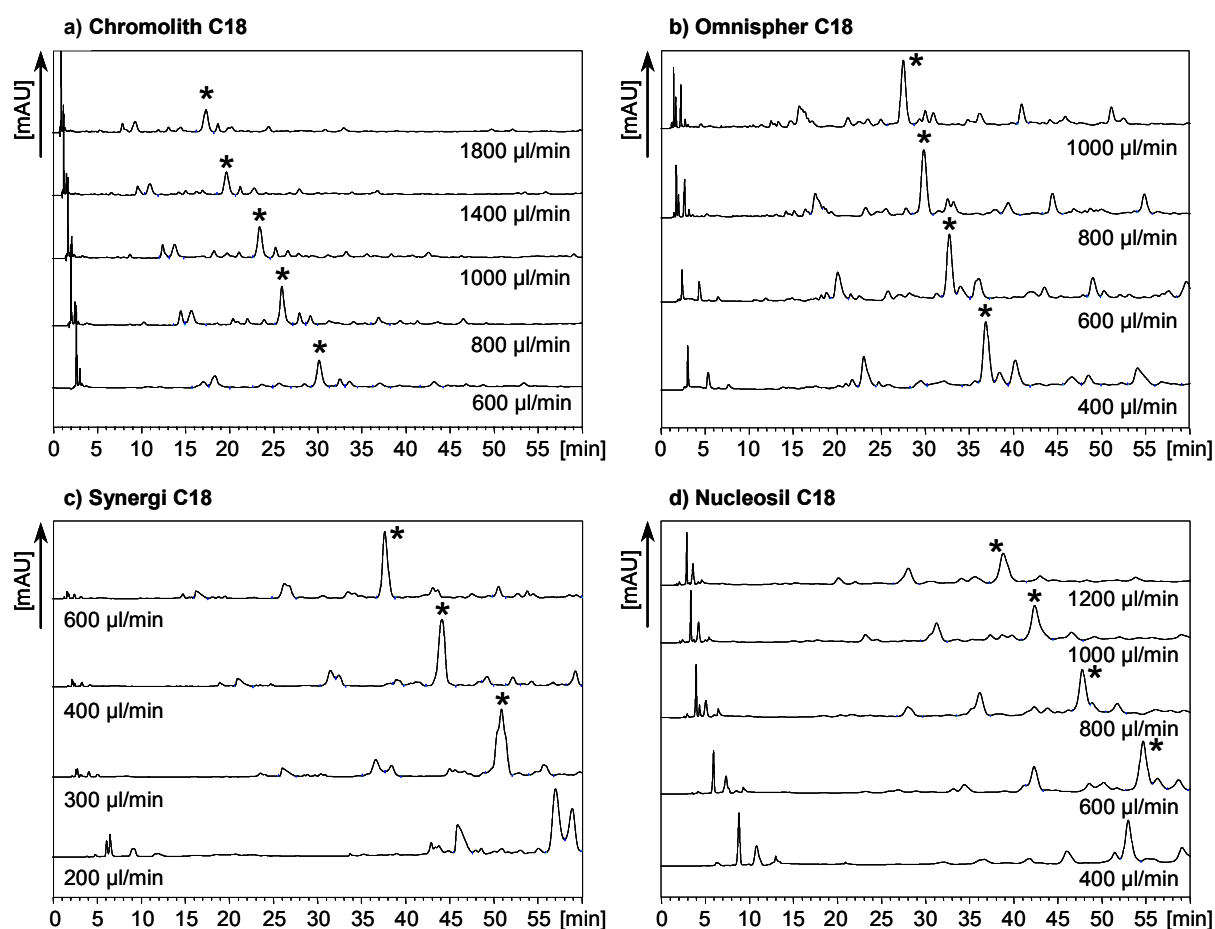


Abbildung 20: Einfluss unterschiedlicher RP-C18-Säulen und Flussraten auf die HPLC-UV-Chromatogramme ($\lambda = 280 \text{ nm}$) eines Gerstenextraktes (Gradient **E2**)

Zusammenfassend zeigten die neuartig modifizierten Säulenmaterialien nicht die für die Flavonoid-Bestimmung erhofften Trenneigenschaften. Besonders erstaunlich war das chromatographische Verhalten der drei Säulen mit Phenyl- bzw. Phenyl-Hexyl-Endgruppen. Die π - π -Wechselwirkungen, auf denen die Retardierung der Analyten auf diesen stationären Phase beruhen, führten im Vergleich zu den bei den herkömmlichen C18-Materialien wirksamen Van-der-Waals-Wechselwirkungen zu keinem selektiveren Trennverhalten. Auch die Pentafluorophenyl- und die Polyethylenglykol-Phase eigneten sich nicht für einen Einsatz in der

Flavonoid-Analytik, wobei einschränkend zu sagen ist, dass ausschließlich Essigsäure/Acetonitril bzw. Phosphatpuffer/Acetonitril als mobile Phasen eingesetzt wurden. Bei Verwendung anderer mobiler Phasen ist ihr Einsatz unter Umständen möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde aber auf die Erprobung anderer Elutionsmittel verzichtet.

Vergleichbar gute Trenneigenschaften mit der Nucleosil C18-Säule wurden mit den anderen C18-modifizierten Säulen YMC, Omnispher und Chromolith erzielt. Die Untersuchung machte aber noch mal deutlich, welchen großen Einfluss die Wahl der mobilen Phase auf die erhaltenen Chromatogramme ausübt. Während beispielsweise die YMC C18-Säule für den Gradienten **E2** gute Trennergebnisse lieferte, ist ihr Einsatz bei dem Phosphatpuffer/Acetonitril-Gradienten **P2** nicht empfehlenswert.

5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Methodenentwicklung

Zur Bestimmung von Flavonoiden in Gerste wurde ein HPLC-Verfahren (Probenvorbereitung und chromatographische Trennung) entwickelt und optimiert, welches sich sowohl für die UV-Detektion als auch für die Online-Detektion mittels MS eignen sollte. Der schematische Ablauf des Verfahrens ist in Abbildung 21 dargestellt.

In einem ersten Schritt wurde mit dem monomeren Flavonoid (+)-Catechin als Modellsubstanz ein chromatographisches System entwickelt. Hierbei wurden mit einer Nucleosil C18-Säule erfolgreich zwei mobile Phasen, ein Essigsäure-Gradient **E1** sowie ein Phosphatpuffer-Gradient **P1** erprobt. Als optimales Lösemittel der Messprobe stellte sich ein DMF/H₂O-Gemisch (2:1; v/v) heraus. In weiteren Voruntersuchungen wurden dann fünfzehn verschiedene analytische Trennsäulen, basierend auf herkömmlichen C18-Phasen sowie neuartig modifizierten Materialien auf ihre Einsetzbarkeit für die Bestimmung von (+)-Catechin und der in Gerste enthaltenen Flavonoide untersucht. Es zeigte sich, dass neben der Säule Nucleosil C18 bei Verwendung des Essigsäure/Acetonitril-Gradienten **E2** sowohl die Säulen YMC C18, Omnispher C18 als auch die aus einem makroporösem Material bestehende Säule Chromolith C18 gute Trenneigenschaften bei Realproben aufzeigten. Bei Einsatz des Phosphatpuffer/Acetonitril-Gradienten **P2** erwiesen sich ebenfalls nur die C18-modifizierten Säulenmaterialien als geeignet. Da die Säule Nucleosil C18 eine gute reproduzierbare Trennung der Analyten-Peaks bei Einsatz des Phosphatpuffer/Acetonitril-Gradienten **P2** und des Essigsäure/Acetonitril-Gradienten **E2** lieferte, sie in der Anschaffung kostengünstig ist und sich durch eine große Robustheit bei hohem Probendurchsatz auszeichnete, wurde sie für die weiteren Untersuchungen eingesetzt.

Zur Isolierung der Flavonoide aus Gerste wurden zwei verschiedene Arten der Probenvorbereitungen entwickelt und optimiert (s. Abbildung 21). Die Extraktion mit einem Ultra-Turrax zeigte hierbei gute Ausbeuten, die mit denen durch die Mikrowellen-gestützte Extraktion (MSS) bei 30 °C erzielten vergleichbar sind [266]. Der Einsatz der MSS bietet den Vorteil, dass auch Probenmengen bis zu 500 g extrahiert werden können.

Das entwickelte Analysenverfahren zur Bestimmung von Flavonoiden in Gerste sollte nun im nächsten Schritt zur Dokumentation der Zuverlässigkeit einer ausführlichen Validierung unterworfen werden.

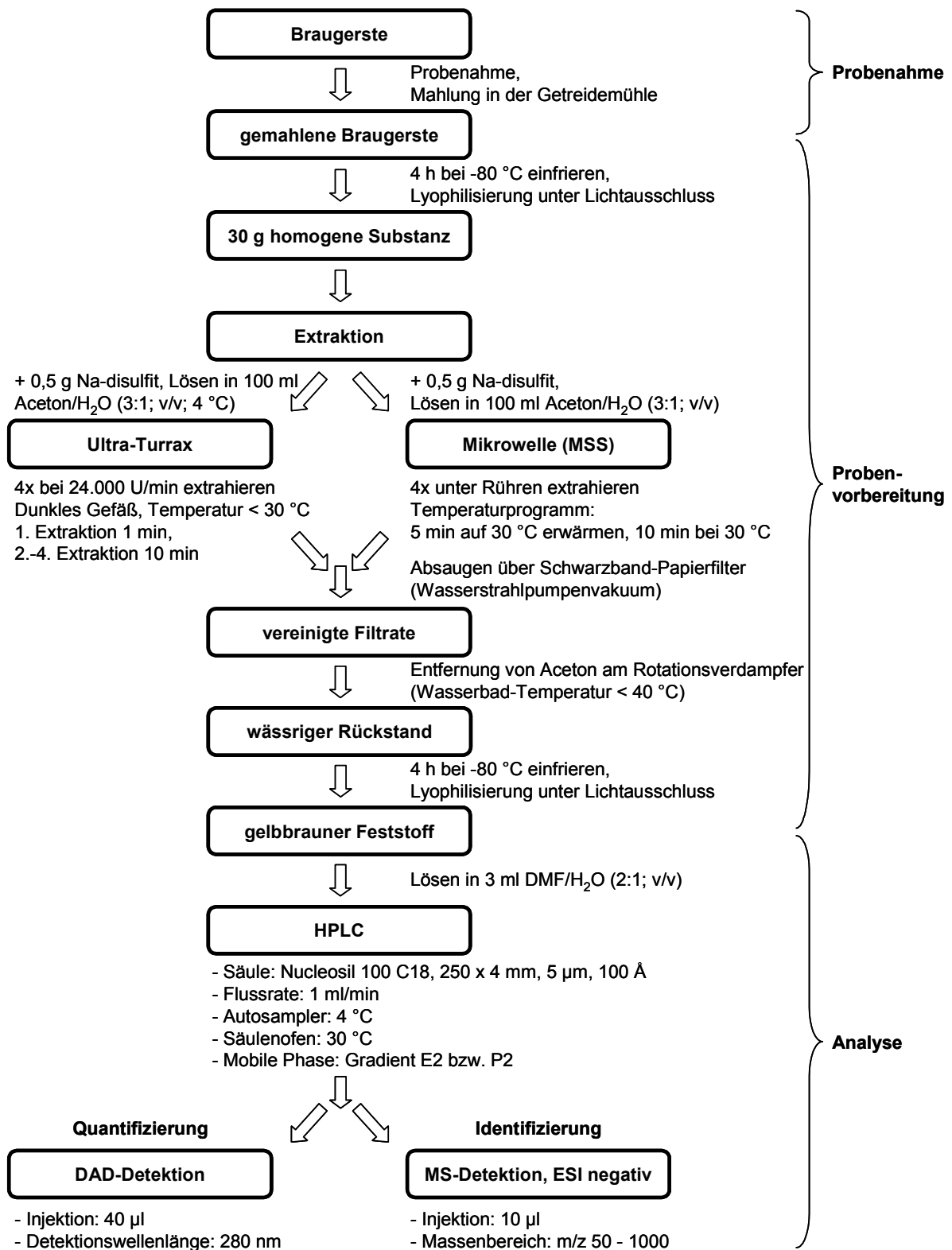


Abbildung 21: Schematischer Arbeitsablauf des optimierten Analyseverfahrens zur Bestimmung von Flavonoiden aus Brauprozessproben

5.5 Validierung des entwickelten HPLC-DAD-Verfahrens

Um das neu entwickelte Analysenverfahren (s. Abbildung 21) in die Routine-Analytik einzuführen, sowie zum Leistungsvergleich mit anderen Verfahren und zur Beurteilung der erhaltenen Analyseergebnisse, muss es einer Validierung unterworfen werden. Unter dem Begriff Validierung versteht man die Prüfung, ob eine analytische Methode für die Erfüllung einer ganz bestimmten Aufgabe geeignet ist, also den Nachweis und die Dokumentation der Zuverlässigkeit einer Methode [267-269]. Eine genauere Definition wurde neben vielen anderen 1992 von EBEL [270] gemacht: „Die Validierung eines Analysenverfahrens ist im Prinzip eine fehlertheoretische Systemanalyse der angewandten chemischen, physikalischen und mathematischen Grundlagen, der verwendeten Messsysteme, der Datengewinnung und Datenverarbeitung einschließlich der notwendigen Kalibrierung.“

Es existiert bislang keine einheitliche, universell anwendbare Validierungsvorschrift für Laboratorien. Im Jahr 1999 wurde ein Entwurf einer internationalen Norm, der DIN EN ISO/IEC 17025 [271] „allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien“ verabschiedet. Mit der Übernahme dieser DIN-Norm als europäische Norm gilt künftig international eine einheitliche Grundlage zum Nachweis der technischen und fachlichen Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien. Hier versteht man unter Validierung „...die Bestätigung durch Untersuchung und Bereitstellung eines Nachweises, dass die besonderen Anforderungen für einen speziellen beabsichtigten Gebrauch erfüllt werden“.

Die Validierung eines Analysenverfahrens umfasst eine Vielzahl von Einzelschritten. Nach Feststellung, in welcher Probenmatrix die gewählte Komponente bestimmt werden soll, erfolgt die Wahl der Bestimmungsmethode und die Erstellung einer Arbeitsvorschrift. Dabei ist die Bestimmung folgender Validierungsparameter relevant [267-269, 272-274]:

- **Wahl des Arbeitsbereiches**
- **Linearität**
- **Nachweis- und Bestimmungsgrenze**
- **Stabilität**
- **Spezifität**
- **Präzision**
- **Richtigkeit**
- **Robustheit**

Laut DIN EN ISO/IEC 17025 [271] muss der Bereich und die Genauigkeit der mit validierten Verfahren erreichbaren Werte hinsichtlich Ergebnisunsicherheit, Nachweisgrenze usw. den Erfordernissen des Anwenders gerecht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Validierung des entwickelten HPLC-DAD-Verfahrens zur quantitativen Bestimmung von (+)-Catechin und ausgewählten Flavonoiden in Gerste (s. Abbildung 21) in Anlehnung an die im folgenden aufgeführten Richtlinien und Normen durchgeführt.

- DIN EN ISO/IEC 17025, Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien (1999) [271]
- Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften, L221 (2002) [275]
- FDA, Reviewer Guidance Validation of Chromatographic Methods (1994) [276]
- ICH, Guidance for Industry, Q2A (1995) und Q2B (1996) [277, 278]

5.5.1 Wahl des Arbeitsbereiches

Die Validierung beginnt mit der Wahl des vorläufigen Arbeitsbereiches, welcher sich wiederum nach dem praxisorientierten Anwendungsziel und den technisch realisierbaren Möglichkeiten richtet. Für den Arbeitsbereich eines Analysenverfahrens müssen folgende Voraussetzungen erfüllt sein [267, 272]:

- Linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration der Lösung (Analyt-Konzentration) und dem Detektorsignal, in diesem Fall der Peakfläche
- Signifikante Unterscheidbarkeit der Messwerte vom Blindwert, d. h. die untere Arbeitsbereichsgrenze muss gleich oder größer der Bestimmungsgrenze sein
- Erreichbarkeit der geforderten Analysenpräzision im gesamten Arbeitsbereich
- Bezugnahme auf das praxisorientierte Anwendungsziel, d. h. die zu erwartende (+)-Catechin-Konzentration in den Realproben

5.5.1.1 Essigsäure/Acetonitril-Gradient E2

Linearer Bereich

Um den linearen Bereich der (+)-Catechin-Bestimmung zu ermitteln, wurden Standard-Lösungen der Konzentrationen β von 0,125 mg/L bis 2500 mg/L in DMF/H₂O (2:1; v/v) hergestellt, jeweils zehnmal chromatographisch vermessen und bei der Detektionswellenlänge von 280 nm die Peakflächen und -höhen bestimmt (s. Anhang A.3, Tabelle A.3). Aus den erhaltenen Datenpaaren (x = Konzentration und y = Detektorsignal bzw. Peakfläche) kann die Funktion, die den linearen Zusammenhang zwischen der Konzentration x als unabhängiger Variablen und dem gemessenen Wert y als abhängiger Variablen beschreibt sowie das Bestimmtheitsmaß berechnet werden. Die durch lineare Regression erhaltene Geradengleichung lautet

$$y = a + bx$$

mit den Konstanten $a = - 0,5376$ mAU·min, $b = 0,4582$ mAU·min/(mg/L) sowie dem Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,9999$. Für den gesamten Konzentrationsbereich von 0,125 mg/L bis 2500 mg/L konnte somit von einem linearen Zusammenhang zwischen der Peakfläche und der (+)-Catechin-Konzentration ausgegangen werden.

Bestimmungsgrenze

Zur Festlegung des Arbeitsbereiches war es außerdem erforderlich, die Bestimmungsgrenze des Verfahrens zu ermitteln, da die untere Grenze des Arbeitsbereiches gleich oder größer der Bestimmungsgrenze zu wählen ist. Die Bestimmung erfolgte als eigener Validierungsparameter (s. Kapitel 5.5.3.1). Als Bestimmungsgrenze des Verfahrens und somit als Mindestkonzentration der unteren Grenze des Arbeitsbereiches ergab sich eine (+)-Catechin-Konzentration von 1,25 mg/L.

Analysenpräzision

Die ermittelte Bestimmungsgrenze konnte aber nicht als untere Arbeitsbereichsgrenze gesetzt werden, da über den gesamten Arbeitsbereich die relativen Standardabweichungen s_{rel} der ermittelten Peakflächen $\leq 3\%$ liegen sollten [272]. Erst ab (+)-Catechin-Konzentrationen von $\beta \geq 2,5$ mg/L war diese Anforderung erfüllt (s. Anhang A.3, Tabelle A.3).

Praxisorientiertes Anwendungsziel

Abschließend sollte bei der Wahl des Arbeitsbereiches aber noch das praxisorientierte Anwendungsziel in Betracht gezogen werden. Die in der Literatur angegebenen (+)-Catechin-Gehalte in Gerste von etwa 30 $\mu\text{g/g}$ Trockenmasse (s. Tabelle 3) entsprechen in etwa einer Analyt-Konzentration von 300 mg/L in der Messprobe.

Aus allen vier aufgeführten Anforderungen an den Arbeitsbereich und um einen möglichst großen Konzentrationsbereich abzudecken, wurde als vorläufige untere Arbeitsbereichsgrenze eine (+)-Catechin-Konzentration von 5 mg/L und als obere Arbeitsbereichsgrenze eine Konzentration von 2500 mg/L gewählt.

5.5.1.2 Phosphatpuffer/Acetonitril-Gradient P2

Zur Ermittlung des **linearen Bereiches** bei Einsatz des Phosphatpuffer/Acetonitril-Gradienten **P2** wurde analog Kapitel 5.5.1.1 vorgegangen. Im Anhang A.3, Tabelle A.4 sind die ermittelten Peakhöhen, Peakflächen sowie die relativen Standardabweichungen der Peakflächen aufgeführt. Die Konstanten der durch lineare Regression erhaltenen Geradengleichung ergaben sich zu $a = 0,1800$ mAU·min, $b = 0,4478$ mAU·min/(mg/L) mit dem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9999$. Als **Bestimmungsgrenze** wurde eine Konzentration von 1,25 mg/L ermittelt (s. Kapitel 5.5.3.2). Aufgrund des **praxisorientierten Anwendungszieles** der Methode und der Anforderung an die **Analysenpräzision** (s_{rel} der ermittelten Peakflächen $\leq 3\%$) wurde bei Einsatz des Gradienten **P2** als vorläufige untere Arbeitsbereichsgrenze ebenso eine Konzentration von 5 mg/L und als obere Arbeitsbereichsgrenze eine Konzentration von 2500 mg/L gewählt.

5.5.2 Linearität

Der Validierungsparameter Linearität beinhaltet im ersten Schritt die Erstellung einer Kalibrierfunktion für den gewählten Arbeitsbereich und die Ermittlung der Verfahrenskenndaten dieses funktionellen Zusammenhanges. Um den gewählten Ansatz zu überprüfen, wurden dann die im folgenden aufgeführten statistischen Berechnungen durchgeführt:

- Prüfung auf Linearität: Anpassungstest nach MANDEL [279]
 - Residualanalyse
 - Prüfung auf Varianzinhomogenität
-

- Absicherung der unteren Grenze des Arbeitsbereiches
- Überprüfung der Empfindlichkeit

5.5.2.1 Essigsäure/Acetonitril-Gradient E2

Zur **Ermittlung der Kalibrierfunktion** bei Einsatz des Essigsäure/Acetonitril-Gradienten **E2** als mobile Phase wurden zehn gleichmäßig über den gewählten Arbeitsbereich verteilte Konzentrationen an (+)-Catechin-Standard-Lösungen in DMF/H₂O angesetzt und jeweils zehnmal mittels HPLC-DAD chromatographisch vermessen [272, 280]. Da die Kalibrierfunktion keine Ausreißer enthalten darf, wurden zunächst die einzelnen Messreihen mittels des GRUBBS-Testes (s. Anhang A.4) untersucht und als frei von Ausreißern bestätigt [267, 272, 281]. Im Anschluss wurden für die erhaltenen Flächen der (+)-Catechin-Peaks die jeweiligen Mittelwerte, Standardabweichungen und relativen Standardabweichungen berechnet (s. Anhang A.3, Tabelle A.5).

Zur rechnerischen Überprüfung, ob es sich um eine lineare Kalibrierfunktion handelt, wurde der **Anpassungstest nach MANDEL** [272, 273, 279] durchgeführt (s. Anhang A.5). Hierzu wurden aus den für die Standardproben ermittelten Messwerten die Reststandardabweichungen s_{y1} und s_{y2} der linearen Kalibrierfunktion 1. Grades und der Kalibrierfunktion 2. Grades herangezogen, die Differenz der Varianzen DS^2 ermittelt und anschließend einem *F*-Test unterworfen (Erläuterungen der statistischen Berechnung s. Anhang A.5). Der hieraus berechnete Prüfwert *PW* lag mit 0,39 weit unterhalb des tabellierten *F*-Wertes von 12,25 ($f_1 = 1$, $f_2 = N - 3$, $P = 99\%$). Durch die Kalibrierfunktion 2. Grades wurde keine signifikant bessere Anpassung erreicht, die Kalibrierfunktion war somit linear (berechneter Korrelationskoeffizient $R^2 = 0,9999$). In Tabelle 5 sind alle ermittelten Kenngrößen der Kalibrierfunktionen 1. und 2. Grades gegenübergestellt.

Tabelle 5: Ergebnisse des Anpassungstests nach MANDEL für die Bestimmung von (+)-Catechin (Kalibrierlösungen $\beta = 5$ bis 2500 mg/L, Gradient **E2**)

	Kalibrierfunktion	
	1. Grades $y = a + bx$	2. Grades $y = a + bx + cx^2$
Konstante a [mAU·min]	3,7450	- 0,2353
Konstante b [mAU·min / (mg/L)]	0,4527	0,4633
Konstante c [mAU·min / (mg/L)²]	-	- 4,21 · 10 ⁻⁶
Reststandardabweichung [mAU·min]	7,03	7,31
Prüfwert <i>PW</i>	0,39	
<i>F</i> ($f_1 = 1$, $f_2 = N - 3$, $P = 99\%$)	12,25	

Neben dem Anpassungstest nach MANDEL ist die **Residualanalyse** eine weitere Möglichkeit zu überprüfen, ob der gewählte funktionale Ansatz des Kalibriermodells, hier die lineare

Funktion, die Messergebnisse hinreichend beschreibt. Die Residuen sind die vertikalen Abstände der Messwerte von der Regressionsgerade. In der graphischen Darstellung (s. Abbildung 22) sind auf der Abzisse der Arbeitsbereich sowie als Ordinaten-Abschnitt die positive bzw. negative Abweichung aufgetragen.

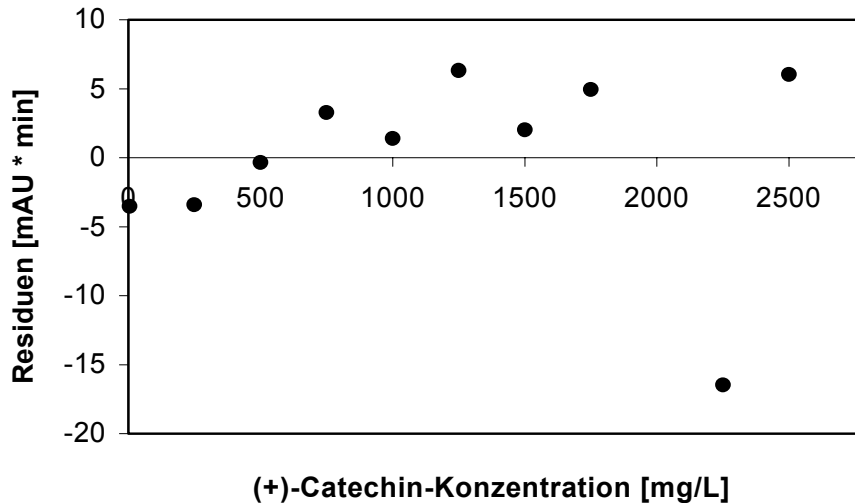


Abbildung 22: Graphische Darstellung der Residuen in Abhängigkeit der Konzentration der (+)-Catechin-Standard-Lösungen (Gradient **E2**)

Bei einem richtig gewählten mathematischen Modell sind die Residuen um das Nullniveau normalverteilt [267, 272]. Mit einer statistischen Verteilung der berechneten Residuen um den Mittelwert Null konnte die angenommene lineare Funktion bestätigt werden.

Die beschriebene lineare Regression geht von einer konstanten (homogenen) Unpräzision (Varianz der Messwerte) über den Arbeitsbereich aus. **Varianzinhomogenität** führt nicht nur zu einer höheren Unpräzision, sondern durch mögliche Veränderungen der Geradensteigung auch zu einer höheren Ungenauigkeit [272]. Zur Überprüfung, ob die Standardabweichungen aus zwei unterschiedlichen Messreihen vergleichbar sind, wurden jeweils zehn (+)-Catechin-Standard-Lösungen der niedrigsten (x_1) sowie der höchsten Konzentration (x_{10}) des vorläufigen Arbeitsbereiches analysiert und für beide Datensätze die Varianzen s_1^2 und s_{10}^2 berechnet. Diese wurden anschließend mittels *F*-Test auf Homogenität überprüft (s. Anhang A.7).

Für die Messwerte ergab sich bei einem Arbeitsbereich von 5 mg/L bis 2500 mg/L (+)-Catechin eine Inhomogenität der Varianzen. Durch Erhöhung der unteren Arbeitsgrenze auf 250 mg/L würde Homogenität erzielt werden, dies erschien aber nicht erstrebenswert, da die (+)-Catechin-Konzentrationen in den Realproben häufig unter diesem Wert liegen (s. Kapitel 4.1, Tabelle 3). In der Routine-Analytik werden oft Verfahren eingesetzt, die eine Inhomogenität der Varianzen aufweisen. Das Problem der Überprüfung der Varianzinhomogenität liegt darin begründet, dass in die Berechnung des Prüfwertes die Absolutwerte der Standardabweichungen und nicht die prozentualen Abweichungen eingehen. Um eine Einschränkung des Arbeitsbereiches zu vermeiden, könnten zur Beschreibung des funktionalen

Zusammenhanges auch gewichtete Regressionsmodelle herangezogen werden. Dies würde aber im Routinebetrieb einen nicht akzeptablen Rechenaufwand bedeuten. Daher wurde der Arbeitsbereich von 5 mg/L bis 2500 mg/L (+)-Catechin trotz der Konzentrationsabhängigkeit der Messpräzision beibehalten.

Als nächster Schritt erfolgte die **Absicherung der unteren Arbeitsgrenze**. Eine Kalibrierfunktion ist nur dann für quantitative Analysen einsetzbar, wenn sich alle später mit ihr berechneten Analyseergebnisse signifikant von Null unterscheiden. Die gewählte untere Grenze des Arbeitsbereiches mit einer Konzentration von 5 mg/L (+)-Catechin lag um den Faktor 4 höher als die aus dem Signal-Rausch-Verhältnis ermittelte Bestimmungsgrenze von 1,25 mg/L (s. Kapitel 5.5.3.1) und konnte aufgrund der Erfüllung der von KROMIDAS [268, 269] gestellten Anforderung für die Bestimmungsgrenze als statistisch abgesichert angenommen werden.

Zusätzlich sollte hier aber noch eine von FUNK et al. [272] empfohlene Überprüfungsmethode zur Absicherung der unteren Arbeitsgrenze angewandt werden. Ist die aus dieser Berechnung ermittelte Größe $x_p \leq x_l$, so ist der gesamte gewählte Arbeitsbereich statistisch abgesichert (Berechnung s. Anhang A.8). Der hier berechnete Wert für x_p lag mit 72,29 mg/L (+)-Catechin oberhalb der gewählten unteren Grenze des Arbeitsbereiches. Der Arbeitsbereich wäre somit erst für diese Konzentration statistisch abgesichert. Bei der Berechnung von x_p hat die ermittelte Verfahrensstandardabweichung s_{x_0} einen sehr großen Einfluss, obwohl es sich hierbei aber um eine nicht normierte Größe handelt. Da die erstellte Kalibriergerade mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9999$ eine hohe Genauigkeit aufwies und weil die erhaltene Peakfläche (2,49 mAU·min) bei einer Konzentration von 5 mg/L deutlich größer als Null war, erfolgte keine Verkleinerung des Arbeitsbereiches.

Das Maß für die **Empfindlichkeit** einer Methode ergibt sich aus der Änderung des Messwertes bei einer Änderung der Konzentration. Vereinfacht gilt, dass eine Methode um so leistungsfähiger ist, je größer die Steigung b der Kalibriergeraden und je kleiner die Reststandardabweichung s_{y_1} ist. Die Reststandardabweichung gibt die Streuung der Messwerte um die Regressionsgerade an. Wird die Reststandardabweichung auf die Mitte des Arbeitsbereiches korreliert, so kann die Verfahrensstandardabweichung s_{x_0} errechnet werden (s. Anhang A.9, Gleichung A.30). Durch Normierung der Verfahrensstandardabweichung s_{x_0} wird die relative Verfahrensstandardabweichung V_{x_0} erhalten, die als Kenngröße zur Qualitätskontrolle bei Routineanalysen Einsatz findet und einen schnellen und einfachen Vergleich verschiedener Verfahren erlaubt [273]. Für die Verfahrensstandardabweichung s_{x_0} ergab sich eine Konzentration von 15,53 mg/L, als relative Verfahrensstandardabweichung V_{x_0} ein Wert von 1,32 %. Damit genügte das Verfahren den in der Literatur [273, 282] beschriebenen Anforderungen an die Kalibrierpräzision für eine 10-Punkt-Kalibrierung mit $V_{x_0} < 3,4$ %.

Daraus ergab sich, dass der vorläufig gewählte Arbeitsbereich von 5 mg/L bis 2500 mg/L (+)-Catechin für das HPLC-DAD-Verfahren beibehalten werden konnte. Die ermittelte lineare Kalibrierfunktion $y = 0,4527x + 3,7450$ wurde durch verschiedene Modellrechnungen überprüft und statistisch abgesichert.

5.5.2.2 Phosphatpuffer/Acetonitril-Gradient P2

Zur **Ermittlung der Kalibrierfunktion** wurden zehn (+)-Catechin-Lösungen in DMF/H₂O mit gleichmäßig über den gewählten Arbeitsbereich verteilten Konzentrationen vermessen (s. Anhang A.3, Tabelle A.6) und anschließend die Linearität der Kalibrierfunktion mittels des **Anpassungstestes nach MANDEL** [279] überprüft (s. Tabelle 6). Die ermittelte Funktion erwies sich als linear, was durch eine **Residualanalyse**, auf deren Darstellung hier verzichtet wird, bestätigt wurden.

Wie auch beim Einsatz des Essigsäure/Acetonitril-Gradienten als mobile Phase zeigten die Messwerte eine **Varianzhomogenität** über den gewählten Arbeitsbereich (berechneter Prüfwert 256,03; statistischer Grenzwert 5,35 [272]). Der gewählte Arbeitsbereich wurde dennoch beibehalten. Der bei der **Absicherung der unteren Arbeitsgrenze** berechnete Wert für x_p lag hier mit 0,14 mg/L (+)-Catechin niedriger als die gewählte untere Grenze des Arbeitsbereiches. Mit einer relativen Verfahrensstandardabweichung V_{x_0} von 0,87 % (s. Tabelle 6) entsprach das Verfahren den in der Literatur [282] beschriebenen Anforderungen und die ermittelte Kalibrierfunktion war statistisch abgesichert.

Tabelle 6: *Ergebnisse des Anpassungstests nach MANDEL für die Bestimmung von (+)-Catechin (Kalibrierlösungen $\beta = 5$ bis 2500 mg/L, Gradient P2)*

	Kalibrierfunktion	
	1. Grades $y = a + bx$	2. Grades $y = a + bx + cx^2$
Konstante a [mAU·min]	5,3661	0,3709
Konstante b [mAU·min / (mg/L)]	0,4345	0,4477
Konstante c [mAU·min / (mg/L) ²]	-	$-5,28 \cdot 10^{-6}$
Reststandardabweichung [mAU·min]	4,45	3,06
Prüfwert PW	9,89	
$F (f_1 = 1, f_2 = N - 3, P = 99 \%)$	12,25	
Verfahrensstandardabweichung s_{x_0} [mg/L]	10,24	
rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x_0} [%]	0,87	

5.5.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

5.5.3.1 Essigsäure/Acetonitril-Gradient E2

Die Nachweisgrenze ist definiert als die kleinste qualitativ noch nachweisbare Analyt-Menge. Unter der Bestimmungsgrenze wird im allgemeinen die kleinste noch quantifizierbare Analyt-Menge verstanden, die mit einer vorgegebenen Richtigkeit und Präzision erfasst werden kann [267]. In der DIN Norm 32645 [283] wurde neben diesen beiden Validierungsparametern zusätzlich der Begriff Erfassungsgrenze eingeführt. Sie ist definiert als der geringste Gehalt, der bei tatsächlicher Anwesenheit des Analyten identifiziert werden kann, bzw. als

Mindestmenge, die mit vorgegebener Wahrscheinlichkeit nachgewiesen werden kann. Laut ISO 11843-1 (DIN 55350) [267] wird der Signalwert, dessen oberer Abstand vom geschätzten Blindwert so groß ist, dass seine rein zufällige Überschreitung durch einen Messwert der Blindprobe unwahrscheinlich ist, als Erkennungsgrenze bezeichnet. Damit entspricht der Begriff Erkennungsgrenze der Definition für die Nachweisgrenze in DIN 32645.

Aufgrund der Vielzahl an Definitionen existieren auch verschiedenste Berechnungsverfahren für die Nachweis- und die Bestimmungsgrenze. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurde in dieser Arbeit die Definition aus den IUPAC-Richtlinien zur Nomenklatur in der Chromatographie [284] herangezogen, welche mit der im Amtsblatt L221 der Europäischen Gemeinschaften [275] und der von KROMIDAS [267] beschriebenen einhergeht. Dabei ist die Nachweisgrenze definiert als der 3-fache Wert des Grundrauschens des Detektorsignals. Das Grundrauschen wird durch das Analysieren von 20 Leerwertproben pro Matrix berechnet. Für die DAD-Detektion erfolgte die Ermittlung des Grundrauschens anhand von 20 willkürlich ausgewählten Chromatogrammen von Gerstenproben sowie Standard-Leerwertproben. Das Grundrauschen des Detektorsignals betrug 0,032 mAU, damit ergab sich als Nachweisgrenze des HPLC-DAD-Verfahrens zur Bestimmung von (+)-Catechin in Gerste eine Konzentration von $\beta = 0,25$ mg/L (s. Anhang A.3, Tabelle A.3). Die Erfassungsgrenze laut DIN 32645 [283] lag dann bei einer Konzentration von 0,5 mg/L (+)-Catechin.

Zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze wurden die selben Richtlinien und Normen wie für die Nachweisgrenze herangezogen [267, 275, 283, 284], als Konzentration an der Bestimmungsgrenze wurde ein Signal/Rausch-Verhältnis von 9:1 festgesetzt. Damit ergab sich als Bestimmungsgrenze des Verfahrens eine (+)-Catechin-Konzentration von 1,25 mg/L.

5.5.3.2 Phosphatpuffer/Acetonitril-Gradient P2

Das Grundrauschen des Detektorsignals bei Einsatz des Gradienten **P2** betrug 0,03 mAU, damit ergab sich als Nachweisgrenze analog zum Essigsäure/Acetonitril-Gradienten eine (+)-Catechin-Konzentration von $\beta = 0,25$ mg/L, als Erfassungsgrenze 0,5 mg/L und als Bestimmungsgrenze 1,25 mg/L.

5.5.4 Stabilität

Dem Validierungsparameter Stabilität kommt eine sehr große Bedeutung zu, denn häufig führt eine unzureichende Stabilität des Analyten in der Probe während der Lagerung oder der Analyse selbst zu erheblichen Fehlern im Analysenergebnis. Weiterhin ist auch die Stabilität der Analyten in Kalibrierlösungen unter verschiedenen Lagerungsbedingungen abzusichern. Eine Stabilitätsprüfung umfasst verschiedene Lagerungsbedingungen und -zeiträume in Bezug auf die Kalibrierlösungen sowie Realproben bei unterschiedlichen Analyt-Konzentrationen [275]. Die Zerfallserscheinungen sind als (%) -Restanalyt (s. Anhang A.10) zu dokumentieren, die schließlich Aussagen über die maximale Lagerungszeit und die optimalen Lagerungsbedingungen erlauben.

Die Stabilität von (+)-Catechin in Kalibrierlösungen und im Gerstenextrakt wurde bei Lagerungstemperaturen von 5 °C, 25 °C und -80 °C geprüft. Dabei wurde ermittelt, über welchen Zeitraum die Proben ohne signifikante Änderung der (+)-Catechin-Konzentration gelagert werden können. Zur Beurteilung der Signifikanz wurde die Definition des „kritischen Wiederholungsbetrages“ bzw. „Ermittlung der Wiederholungsgrenze“ von KROMIDAS [267, 269] herangezogen. Diese gibt den Grenzwert an, unterhalb dessen die Differenz zwischen zwei einzelnen Messergebnissen mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit von 95 % nicht unterschieden werden kann. Eine signifikante Änderung liegt demnach vor, wenn der Konzentrationsunterschied von (+)-Catechin in der jeweiligen Lösung zwischen Beginn und Ende des Untersuchungszeitraumes größer als der 2,8fache Wert der Messpräzision der (+)-Catechin-Bestimmung wird (s. Anhang A.10).

5.5.4.1 Stabilität von (+)-Catechin in Kalibrierlösungen

Um die Stabilität von (+)-Catechin in der Kalibrierlösung zu untersuchen, wurden Lösungen mit drei über den Arbeitsbereich verteilten Konzentrationen ($\beta = 5, 250$ und 500 mg/L) in DMF/H₂O (2:1; v/v) frisch angesetzt und über einen Zeitraum von 72 h unter Lichtausschluss bei 5 °C und 25 °C gelagert. Innerhalb dieses Zeitraumes wurde in Intervallen von 140 min der (+)-Catechin-Gehalt chromatographisch bestimmt. In Abbildung 23 und Abbildung 24 sind die verschiedenen (+)-Catechin-Konzentrationen in den Kalibrierlösungen in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer aufgetragen. Es ergab sich mit der Definition aus der Messpräzision für die (+)-Catechin-Bestimmung ($s_{rel} \leq 3$ %, s. Kapitel 5.5.1) ein maximal zulässiger Grenzwert von 8,4 % als Kriterium für nicht-signifikante Konzentrationsänderungen.

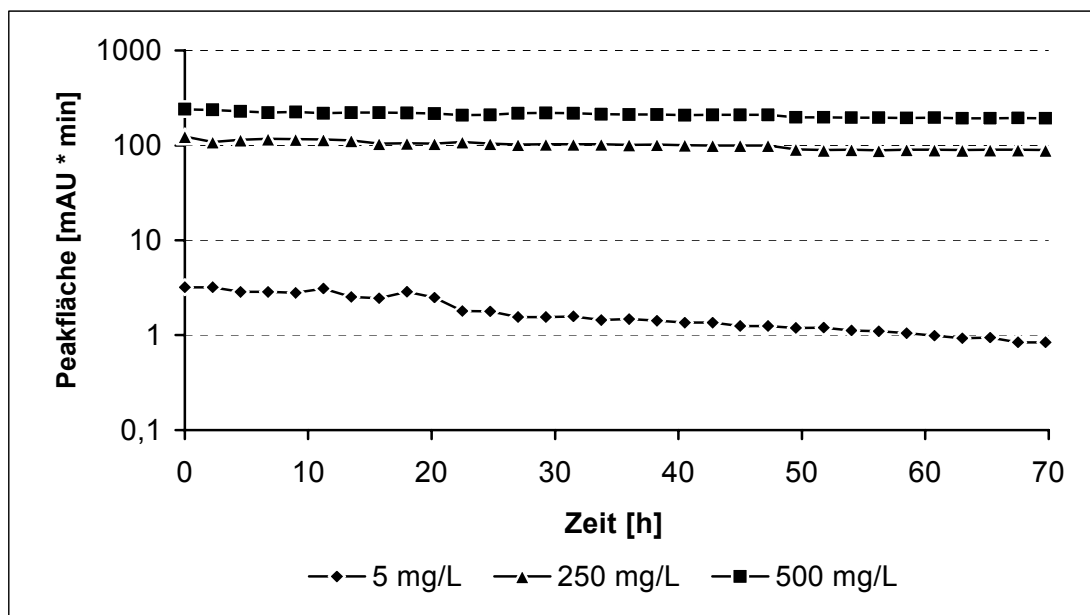


Abbildung 23: Stabilität von (+)-Catechin-Kalibrierlösungen (DMF/H₂O, 2:1; v/v) über einen Zeitraum von 70 h unter Lichtausschluss bei 25 °C

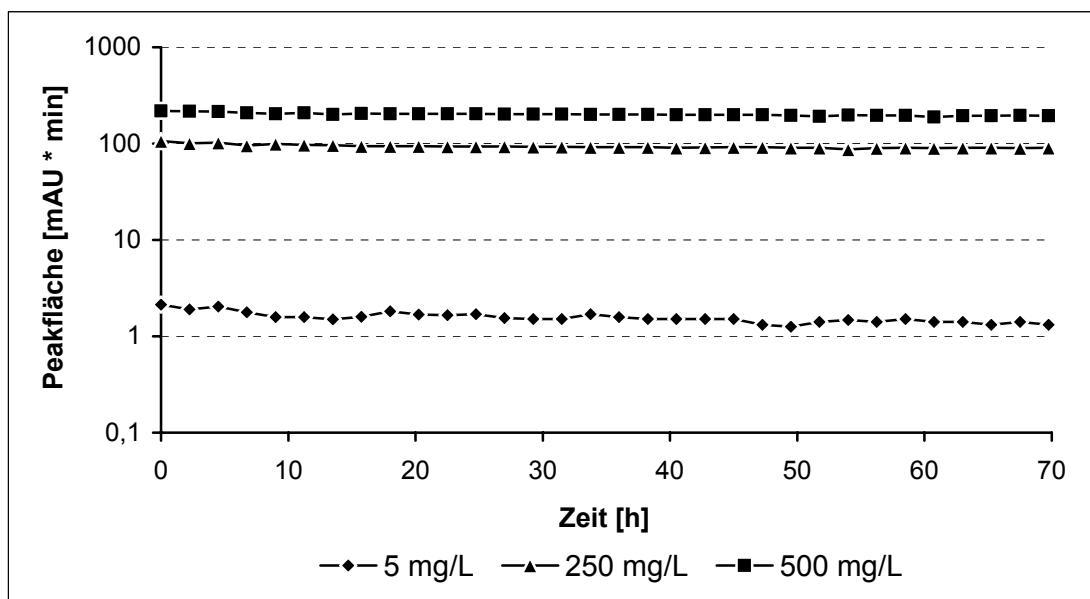


Abbildung 24: Stabilität von (+)-Catechin-Kalibrierlösungen (DMF/H₂O, 2:1; v/v) über einen Zeitraum von 70 h unter Lichtausschluss bei 5 °C

Bei einer Lagerungstemperatur von 25 °C trat bis zu einem Zeitraum von 12 h, bei 5 °C bis zu 18 h keine signifikante Abnahme der (+)-Catechin-Konzentration auf. Erst ab diesen Zeitpunkten konnte von einer Instabilität der Lösung gesprochen werden. Der berechnete Wert für den Restanalyt (s. Anhang A.10) sank ab hier für alle drei Konzentrationen und bei beiden Temperaturen auf < 92 %. Die Konzentrationsabnahme erfolgte, wie in den beiden Abbildungen ersichtlich, erwartungsgemäß bei der höheren Lagerungstemperatur deutlich schneller, denn nach 72 h konnten bei einer Ausgangskonzentration von 5 mg/L (+)-Catechin nur noch 26 % Restanalyt, bei 250 mg/L 70 % und bei 500 mg/L 80 % nachgewiesen werden. Dagegen ergaben sich bei 5 °C jeweils deutlich höhere Restanalyt-Werte von 60 %, 80 % und 87 %.

Da der Analyt üblicherweise bei der Probenvorbereitung selbst dem Tageslicht ausgesetzt ist, war es wichtig, die Stabilität unter Licht-Einwirkung zu untersuchen. Daher wurden zwei (+)-Catechin-Standard-Lösungen der Konzentrationen $\beta = 125$ und 250 mg/L hergestellt, in spezielle UV-Vis-durchlässige Vials gefüllt und bei 5 °C die Konzentration über einen Zeitraum von 9 h bei Tageslichteinwirkung verfolgt. In Abbildung 25 sind die erhaltenen Peakflächen gegen die Lagerungsdauer aufgetragen. Bei beiden Lösungen konnte bis zum Untersuchungsende keine signifikante Änderung der (+)-Catechin-Konzentration festgestellt werden. Die über alle Messwerte einer Konzentration ermittelten relativen Standardabweichungen lagen mit 0,4 % für 125 mg/L und 0,2 % für 250 mg/L sogar weit unter den geforderten 3 % für die Messpräzision.

Zusammenfassend zeigten die erhaltenen Ergebnisse, dass die Stabilität von (+)-Catechin erwartungsgemäß in besonderem Maße von der Lagerungstemperatur abhängig ist. Der Lichteinfluss ist dagegen, zumindest bei Temperaturen unterhalb Raumtemperatur, vernachlässigbar.

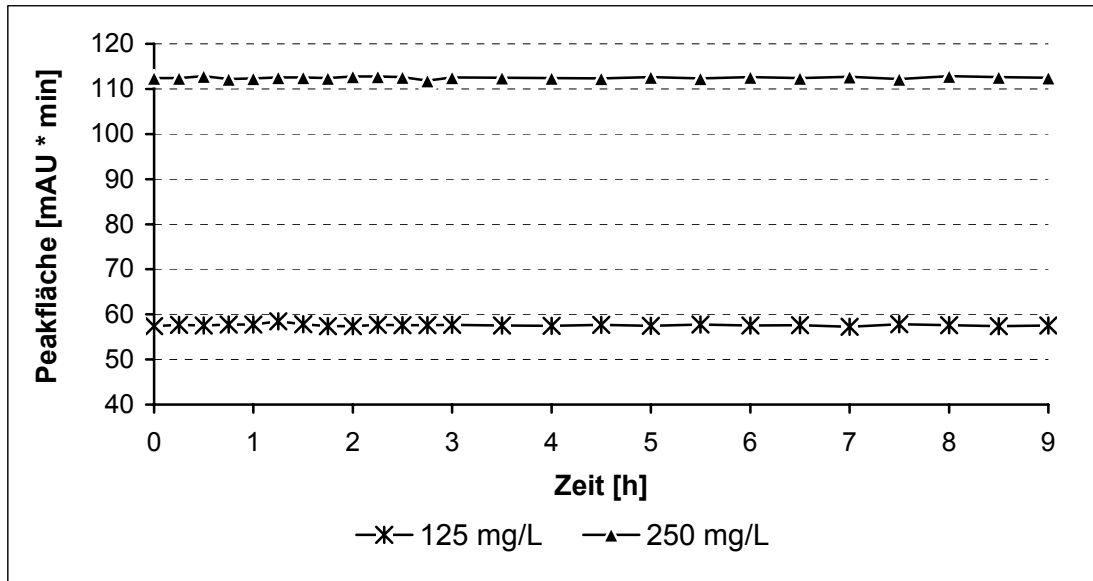


Abbildung 25: Stabilität von (+)-Catechin-Kalibrierlösungen (DMF/H₂O, 2:1; v/v) über einen Zeitraum von 9 h unter Tageslichteinwirkung bei 5 °C (n = 2)

Die **Langzeitstabilität** der (+)-Catechin-Lösungen wurde anhand von (+)-Catechin-Standard-Lösungen der Konzentrationen $\beta = 125$ und 250 mg/L über insgesamt 219 Tage bei -80 °C untersucht. Während der Lagerungszeit wurden in Intervallen (s. Kapitel 7.6.3) Proben entnommen und der (+)-Catechin-Gehalt durch sechsfach-Injektion bestimmt. Während der Messung wurden die Messproben im Autosampler bei 5 °C gehalten. Abbildung 26 zeigt die Mittelwerte der Peakflächen über eine Dauer von 125 Tagen. Es konnte über den gesamten Versuchszeitraum keine signifikante Änderung der Konzentration festgestellt werden, der zulässige Grenzwert von 8,4 % [267] wurde nicht überschritten.

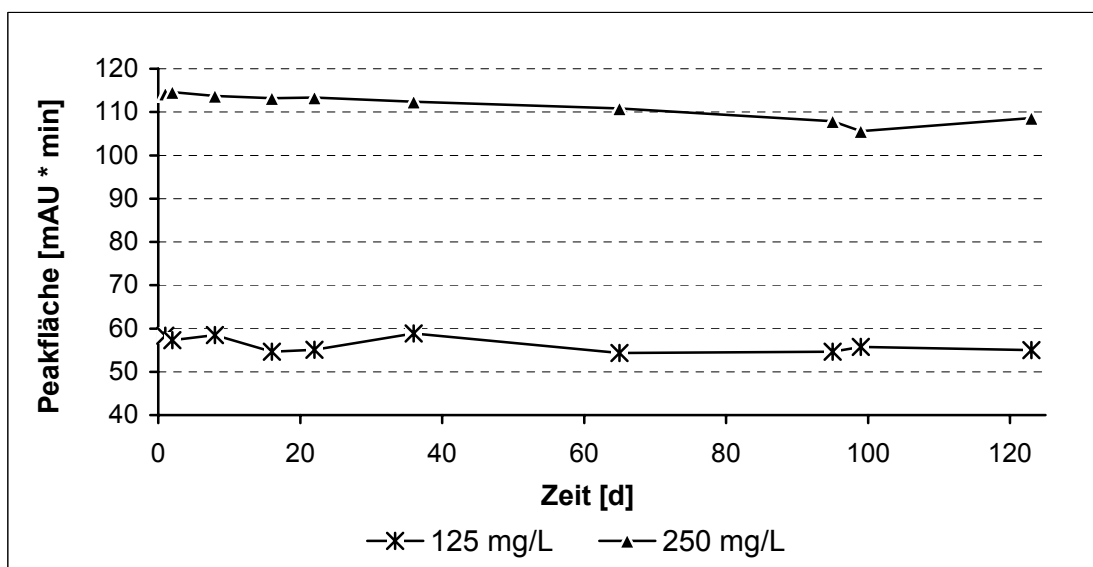


Abbildung 26: Langzeitstabilität von (+)-Catechin-Kalibrierlösungen (DMF/H₂O, 2:1; v/v) über 125 Tage unter Lichtausschluss bei -80 °C (n = 6)

Aufgrund der Ergebnisse der durchgeführten Stabilitätsuntersuchungen wird empfohlen, die Kalibrierlösungen während einer Messreihe gekühlt zu halten (gekühlter Autosampler), um Verfälschungen der Analyseergebnisse zu vermeiden. Darüber hinaus zeigte die Untersuchung der Langzeitstabilität, dass die Kalibrierlösungen entweder täglich frisch anzusetzen oder nach Ansetzen bis zur Verwendung bei -80 °C zu lagern sind.

5.5.4.2 Stabilität von (+)-Catechin in Realproben

Neben der ausreichenden Stabilität von (+)-Catechin in den Kalibrierlösungen musste auch die Stabilität des Analyten in Realproben überprüft werden. Hierzu wurden drei Gerstenextrakte bei -80 °C , 5 °C und 25 °C unter Lichtausschluss gelagert und die (+)-Catechin-Konzentration über einen Zeitraum von 50 h in Abständen von 160 min mittels HPLC-DAD bestimmt (s. Abbildung 27).

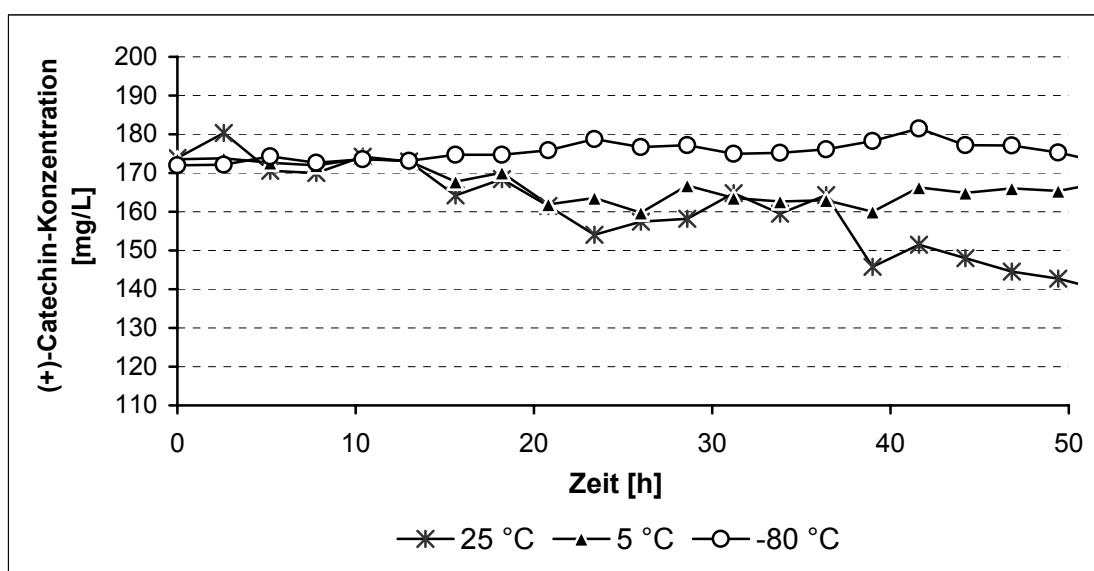


Abbildung 27: Stabilität von (+)-Catechin in Gerstenextrakt über einen Zeitraum von 50 h unter Lichtausschluss bei -80 °C , 5 °C und 25 °C

Bei einer Lagerungstemperatur von -80 °C konnte, wie auch bei den Kalibrierproben, über den gesamten Zeitraum keine signifikante Abnahme der Analyt-Konzentration beobachtet werden. Im Gegensatz hierzu zeigten die Proben bei Lagerungstemperaturen von 5 °C sowie 25 °C ab einer Lagerungsdauer von 16 h einen signifikanten Konzentrationsabfall von ca. 8 %. Der Zerfall von (+)-Catechin verlief, wie sich auch bereits bei den Ergebnissen der Stabilitätsprüfung der Kalibrierproben gezeigt hatte, bei höheren Temperaturen deutlich schneller. So wurde bei 25 °C eine kontinuierliche relative Abnahme der Analyt-Konzentration bis auf etwa 70 % Restanalyt nach 50 h ermittelt, während bei 5 °C der Restgehalt bei etwa 90 % stabil blieb. Die Lagerungsbedingungen der Gerstenproben sind erwartungsgemäß genauso zu wählen wie bei den Kalibrierproben. Die aufgearbeiteten Realpro-

ben sollten daher entweder direkt vermessen und während der Messung auf 5 °C gekühlt werden, oder gegebenenfalls, um eine längerfristige Stabilität zu gewährleisten, bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert werden.

5.5.5 Spezifität

Unter dem Begriff Spezifität wird die Fähigkeit einer Methode verstanden, eine Substanz oder eine Substanzklasse ohne Verfälschung durch andere in der Probe vorhandene Komponenten zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren [267, 268, 275]. Die Überprüfung der Spezifität eines chromatographischen Verfahrens ist besonders wichtig, da die Identifizierung der Analyten in der HPLC-Routineanalytik mit UV-Detektion in erster Linie über deren Retentionszeiten erfolgt. Dabei besteht vor allem bei der Analyse komplexer biologischer Matrices die Gefahr, dass ein Analyt-Peak von Begleitkomponenten mit gleicher Retentionszeit überlagert wird und somit eine Verfälschung der Analysenergebnisse eintritt [122]. Laut dem Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften [275] muss die Spezifität eines HPLC-DAD-Verfahrens zum einen durch einen Retentionszeitvergleich mit geeigneten Standardmaterialien erfolgen. Der Analyt muss bei der Retentionszeit eluieren, die für den entsprechenden Kalibrierstandard unter den gleichen Versuchsbedingungen typisch ist. Zum anderen muss ein UV-Spektren-Vergleich erfolgen, die Absorptionsmaxima im Spektrum des Analyten müssen mit einer Toleranz, die durch das Auflösungsvermögen des Detektionssystems bestimmt wird, bei denselben Wellenlängen wie bei den Kalibrierstandards liegen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Untersuchung der Spezifität des HPLC-DAD-Verfahrens sowohl durch einen Vergleich der Retentionszeiten als auch durch einen Vergleich der UV-Spektren erfolgen. Um die Peak-Reinheit zu bestätigen, sollte zusätzlich noch der Vergleich von MS-Spektren des Analyten mit dem Kalibrierstandard erfolgen.

5.5.5.1 Spezifitätstest durch Vergleich der Retentionszeiten

Die Überprüfung der Spezifität des hier angewendeten Analysenverfahrens erfolgte im ersten Schritt über einen Vergleich der Retentionszeiten [278]. Hierzu wurde ein, wie unter Kapitel 5.3.1.1 beschrieben, aufgearbeiteter Gerstenextrakt direkt und anschließend nach Zudotierung einer reinen (+)-Catechin-Standard-Lösung mittels HPLC-DAD analysiert. Bei der Zudotierung halbierten sich alle Peaks der im Gerstenextrakt-Chromatogramm sichtbaren Inhaltsstoffe im Vergleich zum Chromatogramm des nicht-dotierten Gerstenextraktes bis auf den (+)-Catechin-Peak mit der Retentionszeit von 39,5 min (Gradient **P2**, s. Abbildung 28) bzw. 35 min (Gradient **E2**, s. Abbildung 29). Da aber nicht auszuschließen war, dass sich andere Begleitsubstanzen unter den jeweiligen Peaks befinden, wurden weitere Spezifitäts-Untersuchungen durchgeführt.

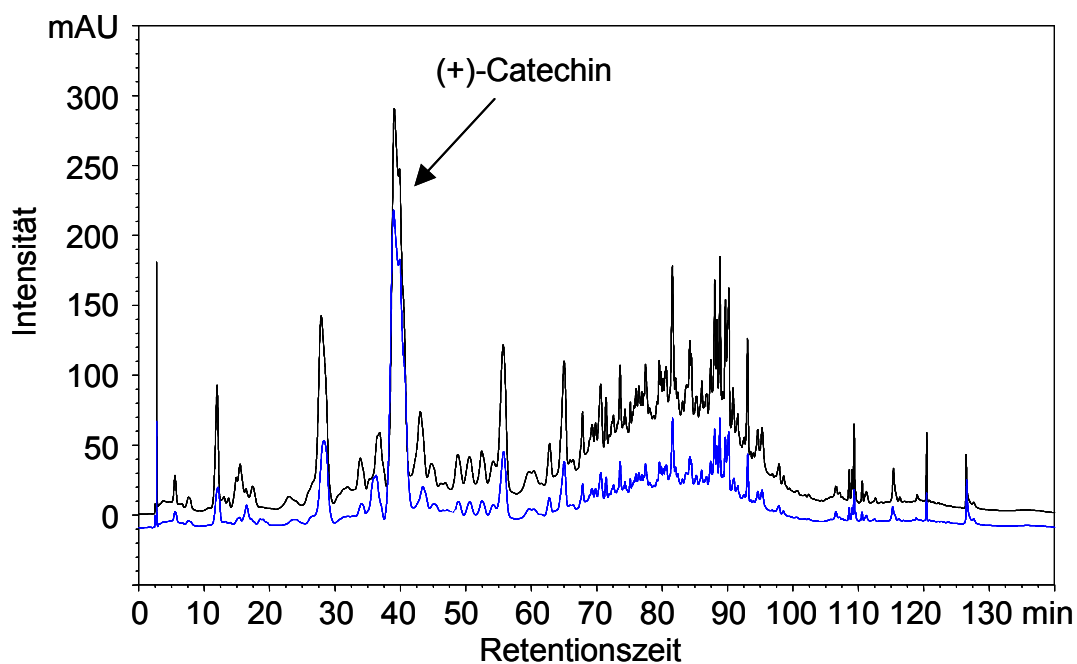


Abbildung 28: Spezifitätstest durch Vergleich der Retentionszeiten; Gerstenextrakt in DMF/H₂O (2:1; v/v) ohne (oben) und mit Zudotierung (unten) einer (+)-Catechin-Standard-Lösung, Gradient **P2**

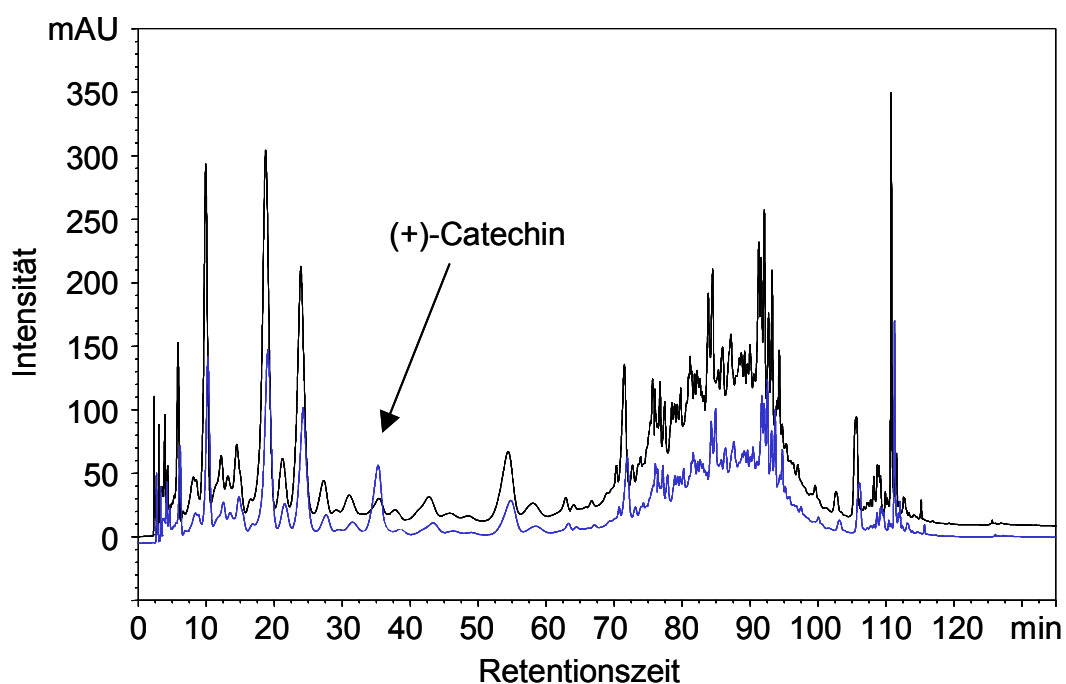


Abbildung 29: Spezifitätstest durch Vergleich der Retentionszeiten; Gerstenextrakt in DMF/H₂O (2:1; v/v) ohne (oben) und mit Zudotierung (unten) einer (+)-Catechin-Standard-Lösung, Gradient **E2**

5.5.5.2 Spezifitätstest durch Vergleich der UV-Spektren

Die Spezifität eines HPLC-Verfahrens mit UV-Detektion kann durch den Vergleich der UV-Spektren des Analyt-Peaks in einer Kalibrierprobe und einer Realprobe erfolgen [268]. Hierzu wurden jeweils Chromatogramme einer (+)-Catechin-Standard-Lösung und einer Gerstenextrakt-Probe sowohl mit dem Gradienten **E2** als auch mit dem Gradienten **P2** als mobile Phase mittels HPLC-DAD aufgenommen. Zur Absicherung der Peak-Reinheit („Peak Purity“) wurden die UV-Spektren der jeweiligen (+)-Catechin-Peaks am Anfang, im Maximum und am Peak-Ende miteinander verglichen. Zur Charakterisierung der Übereinstimmung der drei UV-Spektren wurde der sogenannte Match-Faktor [285] herangezogen. Durch die Berechnung der mittleren quadratischen Abweichungen zwischen den Kurven konnte somit ein Übereinstimmungskriterium gebildet werden. Ein Match-Faktor von 0 bedeutet völlig verschiedene, ein Match Faktor von 1000 identische UV-Spektren. Sowohl bei den Kalibrierproben als auch bei den Realproben wurden bei beiden Gradienten Match-Faktoren zwischen 990 und 999 und somit eine nahezu vollständige Peak-Reinheit ermittelt.

Zum Vergleich der Analyt-Peaks in Kalibrierlösung und in Realproben wurde der Match-Faktor der normierten UV-Spektren am jeweiligen (+)-Catechin Peak-Maximum gebildet. Die normierte Darstellung der UV-Spektren war erforderlich, um die Vergleichbarkeit, z. B. durch unterschiedliche Absorptionswerte am UV-Maximum, die durch unterschiedliche Analyt-Konzentrationen in den Proben bedingt sind, zu gewährleisten. In Abbildung 30 sind die für den Essigsäure/Acetonitril-Gradienten **E2** erhaltenen Chromatogramme sowie die zugehörigen normierten UV-Spektren dargestellt. Der berechnete Match-Faktor betrug 983. Für die hier nicht dargestellten UV-Spektren bei Verwendung des Gradienten **P2** wurde der Match-Faktor zu 976 berechnet. Somit war bei beiden Gradienten eine sehr gute Übereinstimmung der UV-Spektren und damit ein deutlicher Hinweis auf die Spezifität des Analysenverfahrens gegeben.

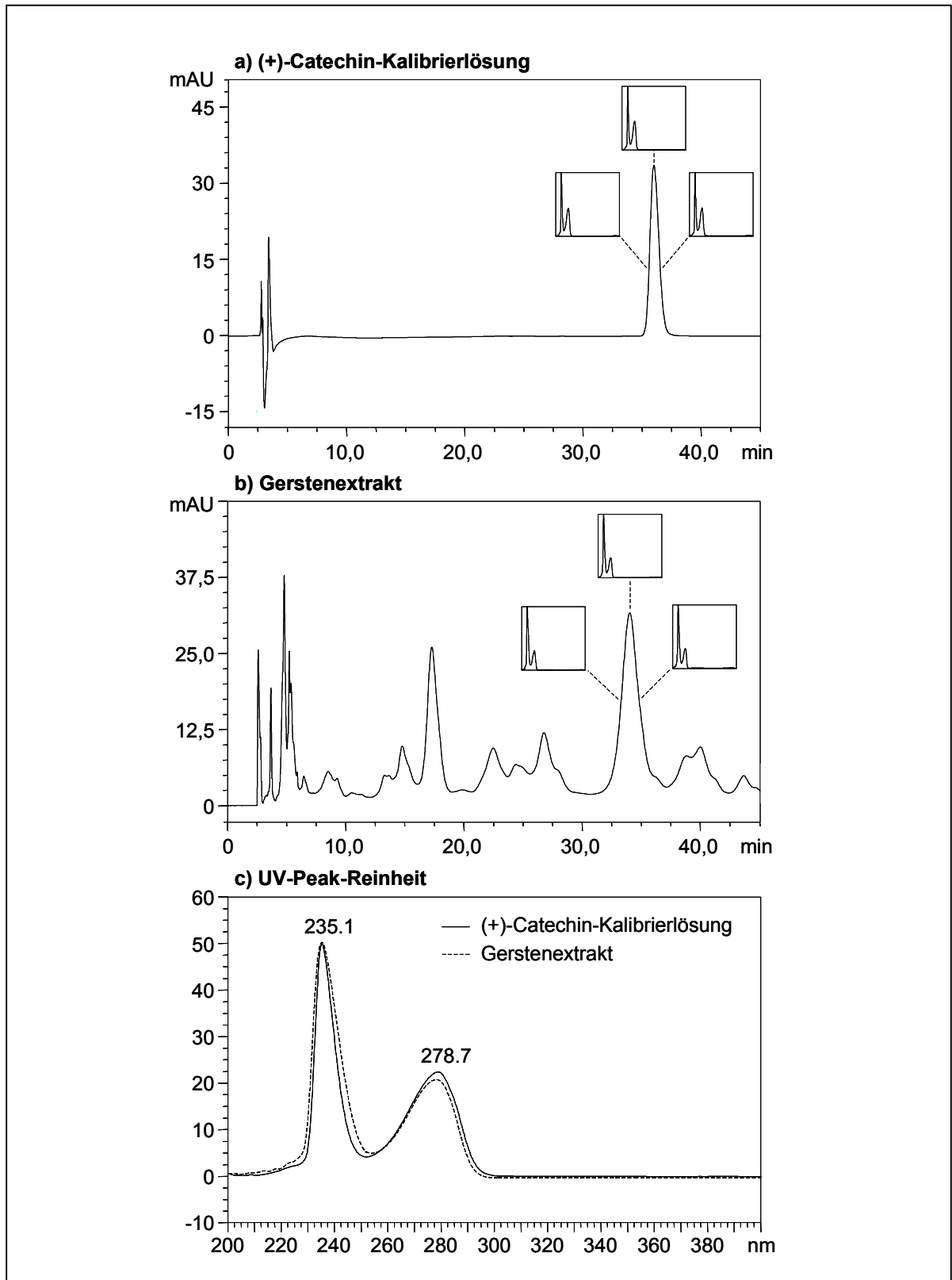


Abbildung 30: Spezifitätstest durch Vergleich der DAD-Spektren des (+)-Catechin-Peaks aus Kalibrierlösung ($\beta = 30 \text{ mg/L}$) und einem Gerstenextrakt (280 nm, Gradient E2)

5.5.5.3 Spezifitätstest durch Vergleich der Massenspektren (LC-ESI-MS)

Eine weitere Möglichkeit, die Peak-Reinheit und damit die Spezifität des Analysenverfahrens zu überprüfen, ist die Aufnahme von MS-Spektren in aufsteigender/abfallender Peak-Flanke sowie im Peak-Maximum [268]. Nähere Angaben zu den Messbedingungen des LC-MS-Systems siehe Kapitel 7.2.2. In Abbildung 31 sind die MS-Spektren (ESI, negative-Mode), summiert über die Basislinienbreite der (+)-Catechin-Peaks, einer (+)-Catechin-Standard-Lösung und eines Gerstenextraktes bei Einsatz des Gradienten **E2** als mobile Phase, sowie eines Gerstenextraktes unter Verwendung des Gradienten **P2** gegenübergestellt.

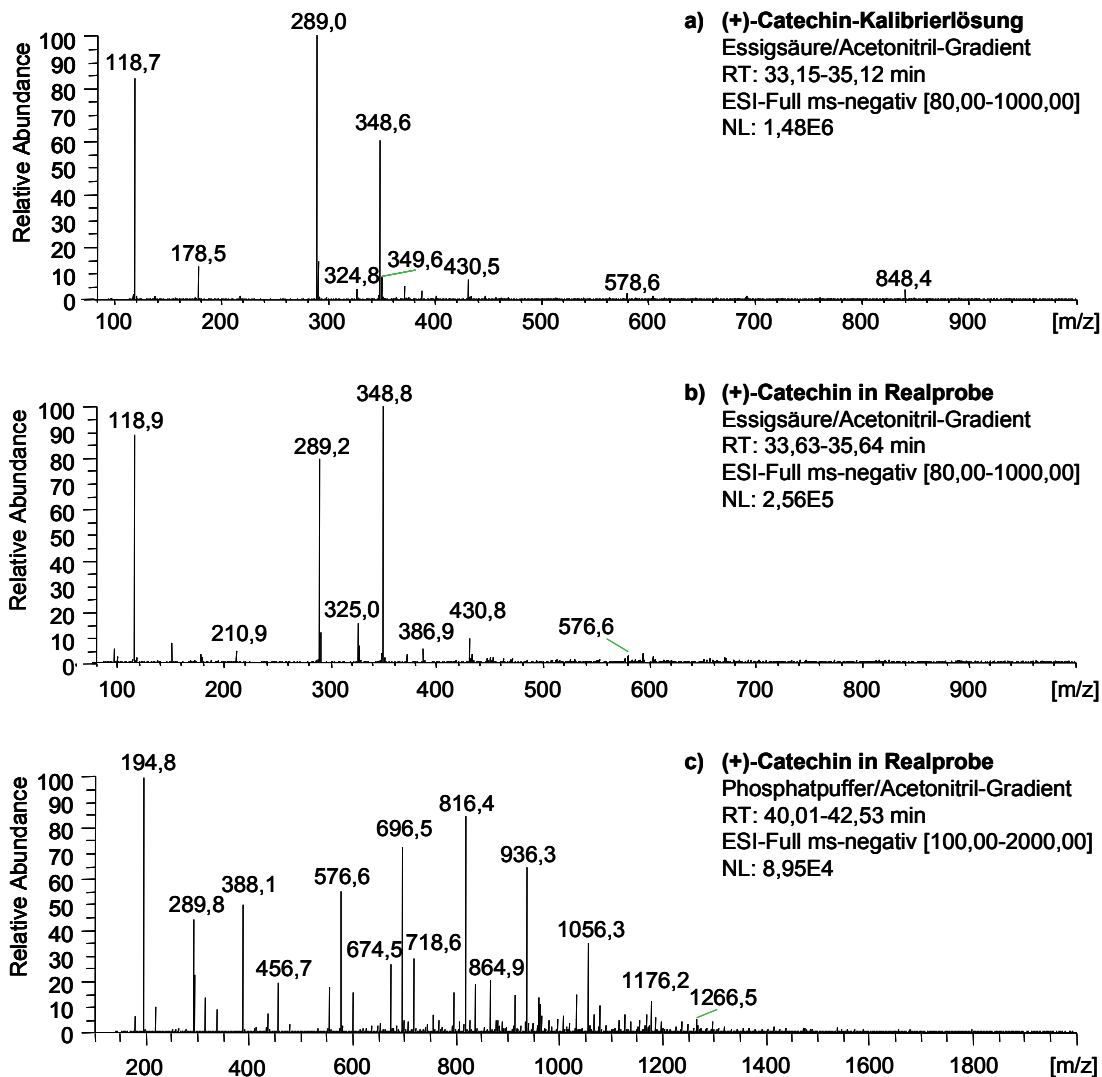


Abbildung 31: Vergleich der LC-ESI-Massenspektren (MS^1 -Scan) von (+)-Catechin:
a) (+)-Catechin-Standard-Lösung ($\beta = 125$ mg/L, Gradient **E2**);
b) Gerstenextrakt (Gradient **E2**); c) Gerstenextrakt (Gradient **P2**)

Das Massenspektrum der Standard-Lösung ergab Signale bei m/z 289,0 (Precursor-Ion $[M-H]^-$), bei m/z 348,6 (Acetat-Addukt $[M+Acetat-H]^-$) und bei m/z 118,7 (Lösungsmittel-

Dimer [Acetat-Dimer-2H⁺]). Die Zuordnung konnte durch die Fragmentmuster der ebenfalls aufgenommenen Product-Ion-Scans (s. Kapitel 5.6.3) der jeweiligen Ionen bestätigt werden. Das MS-Spektrum des (+)-Catechin-Peaks in der Realprobe bei Einsatz des Gradienten **E2** war identisch mit dem der Standard-Lösung mit Ausnahme der Intensitätsverhältnisse der Signale bei m/z 289,2 und m/z 348,8. Durch diese massenspektrometrische Bestätigung der Peak-Reinheit war die Spezifität des Analysenverfahrens bei Einsatz des Essigsäure/Acetonitril-Gradienten **E2** gewährleistet.

Die Aufnahme eines Massenspektrums mit Phosphatpuffer als mobile Phase ist aufgrund seiner schlechten Verdampfbarkeit und seiner Eigenschaft, mit den Analyt-Molekülen Cluster zu bilden, schwierig. Die Signale des erwarteten (+)-Catechin-Precursor-Ions [M-H]⁺ bei m/z 289,8 und des Phosphat-Addukts [M+PO₄³⁻-H]⁺ bei m/z 388,1 wiesen nur eine relative Intensität von 45 % auf. Bei dem intensivsten Massen-Signal mit m/z 194,8 handelte es sich um ein Lösungsmittel-Dimer [Phosphat-Dimer-2H⁺]. Auf eine weitere Zuordnung der detektierten Signale wurde verzichtet. Zusammenfassend mit den unter Kapitel 5.5.5.1 und Kapitel 5.5.5.2 erhaltenen Ergebnissen konnte die Spezifität des Analysenverfahrens bei Verwendung des Gradienten **P2** als gesichert angesehen werden.

5.5.6 Präzision

Die Präzision ist das Maß für die Übereinstimmung unabhängiger Analysenergebnisse untereinander. Sie gibt die Streuung von Analysenergebnissen an und wird durch zufällige Fehler entweder durch das Analysengerät selbst (**Messpräzision** bzw. **Systempräzision**) oder bei der Durchführung des gesamten Analysenverfahrens (**Methodenpräzision**) hervorgerufen [267, 268, 272]. Dabei wird je nach Art und Weise der Wiederholung zwischen verschiedenen Arten der Präzision unterschieden. Die Ermittlung der **Wiederholpräzision** erfolgt in kurzen Zeitabständen mit demselben Verfahren, an identischen Proben, in demselben Labor, durch den gleichen Bearbeiter und mit derselben Geräteausrüstung. Bei der **Vergleichspräzision** werden die Ermittlungsergebnisse mit demselben Verfahren, an identischen Proben, aber in verschiedenen Laboratorien, von verschiedenen Bearbeitern und mit verschiedener Geräteausrüstung bestimmt. Die Angabe der **Tag-zu-Tag-Präzision** beschreibt die Streuung der Analysenergebnisse bei Untersuchung der Proben unter sonst gleichen Bedingungen, aber an verschiedenen Tagen. Als Präzisionsmaß wird im allgemeinen die Standardabweichung s , die relative Standardabweichung s_{rel} , und seltener die Varianz s^2 verwendet.

5.5.6.1 Messpräzision

Die Messpräzision des HPLC-Verfahrens mit UV-Detektion wurde im ersten Schritt durch jeweils zehnfach-Injektion von drei unterschiedlich konzentrierten (+)-Catechin-Standard-Lösungen bestimmt. Die in Tabelle 7 aufgeführten ermittelten relativen Standardabweichungen waren bei Verwendung des Gradienten **E2** geringfügig größer (0,95 bis 1,89 %) als die

mit dem Gradienten **P2** erhaltenen (0,87 bis 1,66 %). Die bereits unter Kapitel 5.5.1 gestellte Anforderung an die Analysenpräzision $\leq 3\%$ [272] wurde für alle Bestimmungen daher noch einmal bestätigt. Um zu überprüfen, ob die Standardabweichungen der unterschiedlichen Messreihen miteinander vergleichbar sind, wurde weiterhin die Varianzhomogenität (s. Anhang A.7) untersucht. Für jede der drei Messreihen lag der ermittelte Prüfwert unterhalb des tabellierten F -Wertes von 3,18 ($f_1 = f_2 = f = N - 1 = 9$, $P = 95\%$).

Tabelle 7: Vergleich der Messpräzisionen bei der Bestimmung der (+)-Catechin-Konzentration in Kalibrierlösungen, Gradienten **E2** und **P2** ($n = 10$)

Probe	Gradient E2			Gradient P2		
	\bar{x} [mg/L]	s [mg/L]	s_{rel} [%]	\bar{x} [mg/L]	s [mg/L]	s_{rel} [%]
1	50,38	0,95	1,89	51,34	0,85	1,66
2	185,26	1,76	0,95	185,25	1,04	0,56
3	1286,36	14,15	1,10	1284,56	11,23	0,87

Zur Ermittlung der Messpräzision von Realproben wurden zwei verschiedene Gerstenextrakte jeweils zehnfach mittels HPLC-DAD unter Verwendung der Gradienten **E2** und **P2** untersucht. Die ermittelten Messpräzisionen waren mit Werten für s_{rel} um 2 % geringfügig größer als bei den Standard-Lösungen, lagen aber allesamt im Bereich der geforderten Analysenpräzision [272]. Die beiden mit unterschiedlichen Gradienten ermittelten Messreihen zeigten Varianzhomogenität, d. h., die mit ihnen detektierten Ergebnisse sind vergleichbar.

Tabelle 8: Vergleich der Messpräzisionen bei der Bestimmung der (+)-Catechin-Konzentration in Gerstenextrakten, Gradienten **E2** und **P2** ($n = 10$)

Probe	Gradient E2			Gradient P2		
	\bar{x} [mg/L] in Messprobe	s [mg/L]	s_{rel} [%]	\bar{x} [mg/L] in Messprobe	s [mg/L]	s_{rel} [%]
1	106,75	2,02	2,35	108,35	2,15	1,98
2	205,38	4,13	2,01	204,74	5,26	2,57

5.5.6.2 Methodenpräzision

Die Bestimmung der Methodenpräzision unter Wiederholbedingungen erfolgte mit zwei unterschiedlichen Gerstenproben. Nach Zerkleinerung und Lyophilisierung wurden die Gerstenproben in zweimal sechs Aliquote aufgeteilt, diese sowohl mittels Ultra-Turrax (s. Kapitel 5.3.1.1) und MSS (s. Kapitel 5.3.1.2) getrennt aufgearbeitet und der (+)-Catechin-Gehalt mittels HPLC-DAD unter Verwendung des Gradienten **E2** bestimmt. Die berechneten Mittelwerte für die Konzentrationen, die Standardabweichungen und die relativen Standardabweichungen sind in Tabelle 9 dargestellt.

Der Ausreißer-Test nach GRUBBS [272, 281] belegte, dass alle Datenreihen frei von Ausreißern waren. Die ermittelten Standardabweichungen lagen zwischen 5 und 9 % und sind auf zufällige Fehler bei der Probenvorbereitung zurückzuführen.

Tabelle 9: *Methodenpräzision unter Wiederholbedingungen für die Bestimmung von (+)-Catechin in Gerstenextrakten nach Aufarbeitung mittels Ultra-Turrax und MSS, Gradient E2 (n = 6)*

Probe	Aufarbeitung mittels Ultra-Turrax			Aufarbeitung mittels MSS		
	\bar{x} [mg/L] in Messprobe	s [mg/L]	s_{rel} [%]	\bar{x} [mg/L] in Messprobe	s [mg/L]	s_{rel} [%]
1	109,38	8,74	7,75	108,35	6,76	6,24
2	208,75	11,75	5,63	204,74	17,91	8,75

5.5.6.3 Tag-zu-Tag-Präzision

Die Beurteilung der Tag-zu-Tag-Präzision kann durch die Angabe des sogenannten Vertrauensbereiches bzw. der Wiederholbarkeit r_{95} (s. Anhang A.11) erfolgen. Dies ist eine im Vergleich zur Standardabweichung aussagekräftigere Größe [269]. Wiederholt ein Labor eine Messung am gleichen Objekt an zwei unterschiedlichen Tagen, so sind die beiden erhaltenen Ergebnisse mit 95 % Sicherheit als gleich zu betrachten, wenn die Differenz kleiner ist als die Wiederholbarkeit des Verfahrens. Um zu überprüfen, ob das entwickelte HPLC-DAD-Verfahren dieser Anforderung genügt, wurden aus den Messwerten zur Auswahl einer analytischen Säule (s. Kapitel 5.2.3) die Standardabweichungen der bei der (+)-Catechin-Bestimmung ermittelten Peakflächen herangezogen, der Wert für die Wiederholbarkeit r_{95} berechnet und mit der größten Differenz verglichen (s. Tabelle 10).

Tabelle 10: *Vergleich der Standardabweichungen s und s_{rel} sowie der Wiederholbarkeit r_{95} mit der größten Differenz der Peakflächen bei Injektion einer (+)-Catechin-Standard-Lösung (Probe 1: $\beta = 125$ mg/L; Probe 2: $\beta = 250$ mg/L)*

Probe	Flussrate [μ L/min]	s [mAU·min]	s_{rel} [%]	r_{95} [mAU·min]	größte Differenz der Peakflächen [mAU·min]
1a	200	2,30	3,41	6,44	6,05
1b	400	1,19	3,64	3,33	3,71
1c	600	0,83	3,79	2,32	2,24
1d	800	0,65	3,98	1,82	1,80
1e	1000	0,44	3,33	1,23	1,07
2a	200	2,11	1,53	5,91	5,56
2b	400	1,89	2,79	5,29	5,01
2c	600	1,37	3,10	3,84	3,07
2d	800	0,73	2,16	2,04	1,79
2e	1000	0,89	3,46	2,49	2,09

Abgesehen von dem ermittelten Wert für die (+)-Catechin-Standard-Lösung ($\beta = 125 \text{ mg/L}$) bei einer Flussrate von $400 \text{ }\mu\text{L/min}$ waren die Differenzen der Peakflächen jeweils kleiner als r_{95} . Die ermittelten Ergebnisse bei den Messungen an verschiedenen Tagen waren also mit 95 % Sicherheit als gleich zu betrachten. Das Verfahren erfüllte damit die Anforderung an die Tag-zu-Tag-Präzision [269].

5.5.7 Richtigkeit

Die Richtigkeit von Analyseergebnissen ist ein Maß für die Abweichung des Messwertes vom Bezugswert (Sollwert) und repräsentiert die systematischen Fehler des Analyseverfahrens. Voraussetzung für die Richtigkeit ist die Selektivität des Verfahrens sowie eine Wiederfindungsrate von 100 % nach jedem Schritt der Probenvorbereitung bzw. eine konstante, rechnerisch korrigierbare Wiederfindungsrate. Die Überprüfung der Richtigkeit kann anhand von Referenzmaterialien durch Vergleich mit einer unabhängigen validierten Methode oder durch die Methode der Standardaddition erfolgen [268, 272, 273]. In der Literatur wird allgemein zwischen **Referenzsubstanzen** und **zertifizierten Referenzmaterialien** unterschieden. Referenzmaterialien müssen sich laut ISO Guide 30 [286, 287] durch eine definierte Reinheit und Homogenität auszeichnen, damit sie für die Überprüfung der Richtigkeit von Methoden einsetzbar sind. Erst durch eine belegte Strukturaufklärung sowie die Absicherung verschiedener Prüfpunkte (Stabilität, etc.) kann das Material durch eine Organisation (z. B. BAM, Bundesamt für Materialforschung, Berlin) zertifiziert werden. Da kein zertifiziertes Referenzmaterial erhältlich ist und bisher keine validierte Methode zur (+)-Catechin-Bestimmung in Gerste existiert, sollte die Richtigkeit im Rahmen dieser Arbeit über die Wiederfindung bestätigt werden.

5.5.7.1 Wiederfindung

Die Wiederfindung ist das Verhältnis des unter Wiederholbedingungen gemessenen Mittelwertes zum richtigen Wert des Analyten in der Probe. Es können so Verluste an den zu analysierenden Substanzen während der Probenvorbereitung aufgedeckt werden. Bei der Bestimmung der Wiederfindung für (+)-Catechin wurden identische Aliquote einer gemahlene Gerstenprobe zweimal mit jeweils 0 (β_0 , „Blindwert“), 10, 20 und 30 mg (+)-Catechin als Trockensubstanz dotiert und anschließend sowohl mittels MSS als auch mit dem Ultra-Turrax, wie unter Kapitel 5.3.1 beschrieben, aufgearbeitet und mit der HPLC-DAD bestimmt. Die in Tabelle 11 dargestellten Ergebnisse der Untersuchungen wiesen für die Aufarbeitung mit dem Ultra-Turrax einen Mittelwert der Wiederfindungen von 90,1 % und für die MSS von 84,1 % auf. Während der Probenvorbereitung traten also geringfügige Verluste an (+)-Catechin auf, bedingt durch die aufwendigen Extraktionsschritte.

Tabelle 11: Wiederfindungen für (+)-Catechin beim Aufstocken von Gerste (Gradient E2)

Probe	β_0 (+)-Catechin) in Trockenmasse Gerste [mg/30 g]	Wiederfindung [%]		
		10 mg (+)-Catechin zudotiert	20 mg (+)-Catechin zudotiert	30 mg (+)-Catechin zudotiert
Aufarbeitung mit Ultra-Turrax				
1	0,321	89,3	88,5	91,2
2	0,316	86,7	91,7	93,1
Aufarbeitung mit MSS				
1	0,301	81,3	82,4	87,9
2	0,308	85,7	86,1	81,3

5.5.8 Robustheit

Die Robustheit ist nach KROMIDAS [267] die Fähigkeit eines Verfahrens, ein Ergebnis zu liefern, das durch variierende Bedingungen nicht oder nur unwesentlich verfälscht wird. Die Robustheit beschreibt somit das Ausmaß der Unabhängigkeit eines Ergebnisses von Änderungen aller relevanter Einflussparameter. Wie auch bei den anderen Validierungsparametern existieren in der Literatur vielfältige Definitionen. Die wohl treffendste gibt die FDA [276]: „Die Robustheit ist die Prüfung der Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis zu liefern, das von kleinen aber realistischen und eindeutig definierbaren Änderungen der Methodenparameter wie pH-Wert, Temperatur, Extraktionszeit, chromatographische Säule (Charge, Hersteller) u.s.w. unbeeinflusst bleibt.“ Um die Robustheit des HPLC-DAD-Verfahrens zu ermitteln, wurde der Einfluss des Packungsmaterials der Trennsäule und des pH-Wertes der mobilen Phase auf die Chromatogramme untersucht.

5.5.8.1 Einfluss des Packungsmaterials der Trennsäule

Um den Einfluss des Packungsmaterials der Trennsäule auf die Peakfläche des (+)-Catechin-Peaks zu testen, wurde die Peakfläche bei Verwendung verschiedener Alkyl-modifizierter Säulenmaterialien (s. Tabelle 4) mittels Vierfach-Bestimmung ermittelt. Als Probelösung wurde eine (+)-Catechin-Standard-Lösung ($\beta = 250$ mg/L) eingesetzt. Für die jeweilige Flussrate wurde die Peakfläche bezüglich der Peakfläche des (+)-Catechin-Peaks der Nucleosil C18-Säule normiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 32 dargestellt. Ein Vergleich des Retentionsverhaltens des Analyten, wie in der Literatur [122] beschrieben, war aufgrund der differierenden Säulendimensionen der untersuchten Säulen sowie der in Kapitel 5.2.3 genannten Gründen nicht sinnvoll. Die mit den verschiedenen Trennsäulen ermittelten (+)-Catechin-Peakflächen zeigten bezogen auf die Nucleosil C18-Säule nur eine geringe Abweichung von weniger als 6,5 %. Dies bedeutet, dass das Packungsmaterial keinen wesentlichen Einfluss auf das Retentionsverhalten bzw. das Detektionsverhalten unter den gewählten chromatographischen Bedingungen ausübt.

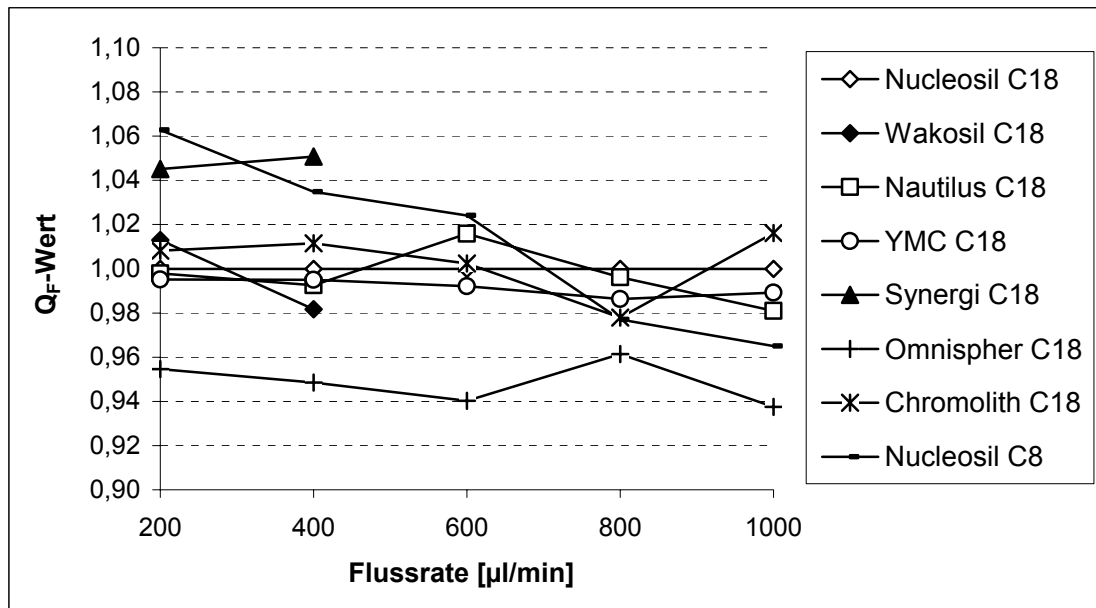


Abbildung 32: Q_F -Werte (auf Säule Nucleosil C18 normiert) für den (+)-Catechin-Peak ($\beta = 250 \text{ mg/L}$, DMF/ H_2O , 2:1; v/v) für RP-C18-Säulen in Abhängigkeit der Flussrate des Gradienten E2 ($n = 4$)

5.5.8.2 Einfluss des pH-Wertes der mobilen Phase

Um den Einfluss des pH-Wertes und der Konzentration der mobilen Phase zu untersuchen, wurde für den Einsatz eines 0,01 mol/L Phosphatpuffers pH 2 (P_a), eines 0,005 mol/L Phosphatpuffers pH 2 (P_b), eines 0,01 mol/L Phosphatpuffers pH 3 (P_c) und eines Phosphatpuffers pH 2 ohne Zugabe von EDTA (P_d) die Retentionszeit sowie die Peakfläche für (+)-Catechin bestimmt. Dazu wurde eine (+)-Catechin-Standard-Lösung ($\beta = 125 \text{ mg/L}$) jeweils zehnmal injiziert und für die genannten Parameter der Mittelwert, die Standardabweichung s sowie die relative Standardabweichung s_{rel} berechnet (s. Tabelle 12).

Tabelle 12: Vergleich verschiedener Kenngrößen des (+)-Catechin-Peaks bei Verwendung unterschiedlicher Phosphatpuffer als mobile Phase. P_a : 0,01 mol/L, pH 2; P_b : 0,005 mol/L, pH 2; P_c : 0,01 mol/L, pH 3; P_d : Phosphatpuffer pH 2 ohne Zugabe von EDTA ($n = 10$)

		P_a	P_b	P_c	P_d
Retentionszeit	\bar{x} [min]	39,45	38,78	39,58	38,76
	s [min]	0,24	0,05	0,16	0,03
	s_{rel} [%]	0,60	0,13	0,40	0,01
Peakfläche	\bar{x} [mAU·min]	55,01	55,21	55,03	54,08
	s [mAU·min]	0,78	0,52	0,68	0,70
	s_{rel} [%]	1,41	0,95	1,24	1,30

Ein Vergleich der Retentionszeiten und der Peakflächen unter Bezug auf die Wiederholbarkeit r_{95} [269] zeigte, dass bei Einsatz der unterschiedlichen Puffer-Konzentration die für den Analyt-Peak erhaltenen Retentionszeiten nicht mit 95 % Sicherheit als gleich zu betrachten sind. Dadurch wird die Quantifizierung von (+)-Catechin aber nicht beeinflusst. Da die erhaltenen Peakflächen keinen signifikanten Unterschied aufwiesen und die Differenz kleiner als die Wiederholbarkeit des Verfahrens ist, hatte sowohl der pH-Wert als auch die Variation der Puffer-Konzentration keinen Einfluss auf die Präzision der Messergebnisse.

5.5.9 Zusammenfassung der Validierungsergebnisse

Das entwickelte HPLC-DAD-Verfahren (s. Kapitel 5.4, Abbildung 21) wurde einer Validierung unterworfen, wodurch die qualitative Bewertung der damit erzielten Analysenergebnisse möglich ist. Eine zusammenfassende Bewertung des neuen HPLC-DAD-Verfahrens im Vergleich zu bereits publizierten Verfahren war nicht möglich, da in der Literatur keine oder nur sehr unvollständige Validierungsdaten angegeben sind.

Im Rahmen der Validierung des HPLC-DAD-Verfahrens ergab sich sowohl für den Essigsäure/Acetonitril-Gradienten **E2** als auch für den Phosphatpuffer/Acetonitril-Gradienten **P2** unter Berücksichtigung des linearen Zusammenhanges der Analyt-Konzentration mit dem Detektorsignal, der geforderten Analysenpräzision und dem praxisorientierten Anwendungsziel ein vorläufiger **Arbeitsbereich** von 5 bis 2500 mg/L. Die untere Grenze des Arbeitsbereiches ist durch die **Bestimmungsgrenze** festgelegt. Diese lag bei beiden Gradienten bei einer (+)-Catechin-Konzentration von 1,25 mg/L (\triangleq 50 ng absolut). Ihre Bestimmung erfolgte, wie auch die der **Nachweis-** (0,25 mg/L \triangleq 10 ng absolut) und **Erfassungsgrenze** (0,5 mg/L \triangleq 20 ng absolut) nach der für die Chromatographie üblichen Ermittlung des Signal/Rausch-Verhältnisses [267, 275, 284]. In der Literatur wird als Nachweisgrenze 5,8 ng (+)-Catechin absolut und als Bestimmungsgrenze 8,6 ng (+)-Catechin absolut angegeben [183]. Es werden aber keine Angaben über die methodische Vorgehensweise angeführt.

Die im nächsten Schritt der Validierung erstellten **Kalibrierfunktionen** wurden mittels statistischer Berechnungen abgesichert, wobei die gewählten Ansätze mit einer **relativen Verfahrensstandardabweichung** V_{x_0} von 1,3 % (**E2**) und 0,9 % (**P2**) weit unterhalb des in der Literatur [273, 282] geforderten Wertes von 3,4 % lagen. Untersuchungen bezüglich der **Stabilität** des Analyten ergaben, dass sowohl die Kalibrierlösungen als auch die Realproben entweder direkt vermessen und während der Messung auf 5 °C gekühlt, oder, um eine längerfristige Stabilität zu gewährleisten, bei einer Temperatur von -80 °C gelagert werden müssen. Obwohl der Validierungsparameter „Stabilität“ von großer Bedeutung ist, da eine mangelnde Stabilität der Proben zu extremen Fehlern im Analysenergebnis führen kann, wird ihm in der Literatur nur wenig Beachtung geschenkt. Systematische Stabilitätsuntersuchungen blieben bisher aus. FRIEDRICH [183] spricht die Empfehlung aus, dass die Bestimmung in Realproben innerhalb von 24 h erfolgen sollte, da er zeigen konnte, dass die Peakfläche von (+)-Catechin bei 10 °C über 24 h in Realproben unverändert blieb.

Zur Überprüfung der **Spezifität** des Verfahrens wurden, wie im Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften [275] gefordert, Dotierungsexperimente an Realproben zum Retentionszeitvergleich durchgeführt und die UV-Spektren des (+)-Catechin-Peaks einer Kalibrierlösung und einer Realprobe (Gerste) miteinander verglichen. Es ergab sich eine sehr gute Übereinstimmung der UV-Spektren (Match-Faktor von 983 (**E2**) bzw. 976 (**P2**)). Zusätzlich erfolgte ein Spezifitätstest zur Bestätigung der Peak-Reinheit durch Aufnahme von MS-Spektren (LC-ESI-MS) über die gesamte Peakbreite. Bei Verwendung des Gradienten **E2** konnte sowohl das Precursor-Ion $[M-H]^-$ bei m/z 289 als auch ein Acetat-Addukt $[M+Acetat-H]^-$ bei m/z 349 nachgewiesen werden. Aufgrund seiner schlechten Eignung für die Massenspektrometrie wurde bei dem Gradienten **P2** das Signal des Precursor-Ions erwartungsgemäß nur schwach detektiert.

Zur Charakterisierung der Präzision der Analysenergebnisse wurden die Messpräzision, die Methodenpräzision unter Wiederholbedingungen sowie die Tag-zu-Tag-Präzision herangezogen. Dabei wurden für die **Messpräzision** bei beiden Gradienten Werte um 2 % sowie für die **Methodenpräzision** unter Wiederholbedingungen Werte zwischen 5,6 % und 8,8 % ermittelt, wobei die Aufarbeitung mittels MSS gegenüber dem Ultra-Turrax geringfügig höhere Abweichungen zeigte. In der Literatur existieren nur sehr wenige Angaben zur Methodenpräzision. Die ermittelten Werte sind aber deutlich geringer als z. B. die von ROEDER et al. [249] publizierten Daten (22 - 40 %) aus Untersuchungen von Malz. WHITTLE et al. [181] geben einen Variationskoeffizienten von 17 % ($n = 6$) nach einmaliger acetonischer Extraktion und Bestimmung des Rohextraktes an. GOUPY et al. [185] erzielten Werte von 8 % ($n = 5$) und JERUMANIS [178] von 5 - 6 %, jedoch bleibt dabei eine möglicherweise schlechte Wiederfindungsrate unberücksichtigt. Dies trifft vor allen Dingen für die von GOUPY et al. durchgeführte Ethylacetat-Extraktion zur Überführung der Flavonoide im letzten Probenvorbereitungsschritt zu (s. Kapitel 4.3).

Im nächsten Schritt der Validierung wurde zur Beurteilung der **Tag-zu-Tag-Präzision** die Wiederholbarkeit r_{95} zur laborinternen Qualitätskontrolle herangezogen. Es wurde bestätigt, dass die an unterschiedlichen Tagen durchgeführten Messungen mit 95 % Sicherheit als gleich zu betrachten sind.

Die Überprüfung der **Richtigkeit** der Analysenergebnisse erfolgte durch die Bestimmung der **Wiederfindung**, da systematische Fehler ausgeschlossen werden können, wenn die Selektivität des Verfahrens sowie eine konstante, rechnerisch korrigierbare Wiederfindungsrate gegeben ist. Die Mittelwerte der gefundenen Wiederfindungsraten lagen für die Aufarbeitung der Realproben mit dem Ultra-Turrax bei 90,1 % und für die MSS bei 84,1 %. In der Literatur existieren sehr unterschiedliche Angaben über die Wiederfindungsraten. Die von FRIEDRICH [183] ermittelten Wiederfindungen von 87 % für (+)-Catechin bei der Aufarbeitung von Malz an Polyamid lagen in der gleichen Größenordnung. Eine wesentlich geringere Wiederfindungsrate erzielte dagegen ROEDER [249] bei der Aufarbeitung von Malz und Bier.

Die **Robustheit** des Analysenverfahrens wurde anhand von Veränderungen verschiedener Parameter bei der chromatographischen Bestimmung untersucht. Der Einsatz verschiedener

Alkyl-modifizierter RP-Säulen beeinflusste die Peakfläche nur unwesentlich. Die hierzu an mehreren Tagen durchgeführten Untersuchungen zeigten bezüglich der Nucleosil C18-Säule Abweichungen < 6,5 %. Die Änderung des pH-Wertes sowie der Konzentration des Gradienten **P2** hatte nur einen geringen Einfluss auf die Retentionszeit des (+)-Catechin-Peaks, die Peakflächen sind mit 95 % Sicherheit als gleich zu betrachten.

Das hier vorgestellte HPLC-DAD-Verfahren zeichnet sich durch eine bisher noch nie in der Literatur beschriebene umfassende Validierung aus. Es wurde damit erstmals die Möglichkeit zur validierten quantitativen Bestimmung von (+)-Catechin in Gerste eröffnet. Das Verfahren kann zum einen als Grundlage für epidemiologische Untersuchungen eingesetzt werden, weiterhin können auch, basierend auf diesem Verfahren, Untersuchungen über das Verhalten von (+)-Catechin im Brauprozess und seinen Einfluss auf die Bierqualität (s. Kapitel 4.2) durchgeführt werden.

5.6 Identifizierung in Gerste enthaltener Flavonoide mittels LC-DAD-MS/MS-Kopplung

Zur Identifizierung von schwerflüchtigen Verbindungen ohne vorherige Derivatisierung kommt der Technik der Kopplung der HPLC mit einem Massenspektrometer, der LC-MS-Kopplung, immer größere Bedeutung zu. Seit den achtziger Jahren wurden als Ionisierungstechniken neben der chemischen Ionisation (CI), der Impact Laser Spectroscopy (LAMMA) [48] und dem Fast Atom Bombardment (FAB) [288, 289] vor allen Dingen das Thermospray-Interface (TSP) [249, 290-293] zur Analytik von Flavonoiden in biologischen Proben eingesetzt. Nachteilig bei Einsatz des TSP ist aber, dass aus einer hohen Fragmentierungsrate oft nur sehr kleine Signale des Precursor-Ions resultieren.

Eine schonendere Ionisierung der Analyten mit höheren Signalintensitäten der Precursor-Ionen eröffnet die Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI) [182, 294, 295] sowie die Electrospray Ionisation (ESI) [296-299], die in den letzten Jahren immer häufiger Anwendung finden. Die APCI-Technik ist dabei tendenziell eher für unpolare Moleküle geeignet, während sich mit der ESI bevorzugt Ionen von thermolabilen, nicht-flüchtigen, polaren Verbindungen erzeugen und detektieren lassen [259]. Hierbei können entweder positiv geladene ($[M+H]^+$) oder negativ geladene Ionen ($[M-H]^-$) entstehen. In der Literatur [181, 300] wird die Identifizierung der Proanthocyanidine meist ausschließlich über die Precursor-Ionen beschrieben. Bei höhermolekularen Verbindungen konnte auch die Existenz mehrfach geladener Precursor-Ionen ($[M-2H]^{2-}$, $[M-3H]^{3-}$) durch die Isotopenverteilung der einzelnen Signale nachgewiesen werden [294, 301]. Als schwach saure Verbindungen (s. pKs-Wert-Bestimmung, Anhang A.1) lassen sich Polyphenole im negativen Mode besser erfassen, da die Deprotonierung der Verbindungen leichter stattfindet als ihre Protonierung. Es wird eine hohe Ionenausbeute erzielt, wobei die Verwendung einiger Säurezusätze zur mobilen Phase allerdings zur Addukt-Bildung mit den Precursor- oder Product-Ionen führen kann. Da dadurch die Anzahl an Precursor- und Product-Ionen zunimmt, können komplizierte Spek-

tren entstehen. Deshalb arbeiten viele Arbeitsgruppen [181, 302] im positiven Mode, obwohl die Detektion negativ geladener Ionen empfindlicher ist.

Zur Identifizierung von Molekülen bietet eine Ionenfalle (Ion-Trap) gegenüber einem Quadrupol oder Triple-Quadrupol als Massenanalysator wesentliche prinzipielle Vorteile. Denn durch gezielte Isolierung von Precursor-Ionen in der Ionenfalle können durch Kollision mit einem Inertgas Product-Ionen erzeugt werden, welche erneut isoliert und fragmentiert werden können. Diese MS^n -Experimente ermöglichen die Bestimmung von Folgefragmentierungen und damit Ansätze zur Strukturaufklärung der Moleküle. Die Fragmentierung kann aber auch bereits zwischen der Ionenquelle und der Ionenfalle durch Anlegen einer Beschleunigungsspannung nach Stoß mit neutralen Molekülen (stoßinduzierte Fragmentierung, CID, Collision Induced Dissociation) hervorgerufen werden. Die Product-Ionen können dann weiter in der Ionenfalle analysiert werden [259]. Bisher sind in der Literatur nur wenige massenspektrometrische Untersuchungen von Flavanolen und Proanthocyanidinen mit einem ESI-Interface in Kombination mit der Ionenfalle beschrieben worden [183, 298, 303]. Eine umfassende Identifizierung der in Gerste enthaltenen Flavonoide durch MS^3 -Experimente ist bisher nicht bekannt geworden.

Ziel der massenspektrometrischen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit war die Identifizierung von Flavonoiden in Gerste. Folgende Vorgehensweise wurde angestrebt:

- *MS^n -Kollisionsexperimente mit den Monomeren (+)-Catechin und (-)-Gallocatechin.* Hierdurch sollten Hinweise auf das Fragmentierungsverhalten der höhermolekularen Verbindungen, die nicht kommerziell erhältlich sind, erlangt werden.
- *MS^1 -Scan-Experimente mit Gerstenextrakt.* Die durch die MS-Chromatogramme erhaltenen Massenspektren im Bereich von m/z 50 - 2000 sollten zu einer vorläufigen Identifizierung der Inhaltsstoffe dienen.
- *MS^3 -Kollisionsexperimente mit Gerstenextrakt* zur Identifizierung der detektierten Flavonoide und zur Absicherung der getroffenen Zuordnung.

5.6.1 Kollisionsexperimente mit monomeren Flavonoiden

Es wurden Standard-Lösungen der monomeren Flavanole (+)-Catechin, (-)-Epicatechin, (-)-Gallocatechin und (-)-Epigallocatechin ($\beta = 125$ mg/L) in DMF/H₂O hergestellt und das Fragmentierungsverhalten durch MS^n -Experimente während verschiedener Chromatographieläufe unter Verwendung des Gradienten **E2** untersucht. Bei dem Monomeren (+)-Catechin ($R_t = 34,0$ min) und seinem Epimeren (-)-Epicatechin ($R_t = 62,1$ min) wurde das Precursor-Ion $[M-H]^-$ m/z 289,2 sowie das Acetat-Addukt $[M+Acetat-H]^-$ m/z 348,6 detektiert (s. Kapitel 5.5.5.3, Abbildung 31a). Bei (-)-Gallocatechin ($R_t = 12,5$ min) und (-)-Epigallocatechin ($R_t = 64,3$ min) hingegen konnte keine Addukt-Bildung mit dem Fließmittel beobachtet werden. Diese beiden Moleküle neigten jedoch zur Dimeren-Bildung ($[2M-H]^-$ m/z 610,9).

Zur Untersuchung des Fragmentierungsverhaltens wurden die jeweiligen Precursor-Ionen in der Ionenfalle isoliert und schrittweise die Kollisionsenergie erhöht, bis nur noch ein Signal geringer Intensität detektiert werden konnte. Die entstandenen Product-Ionen (in Tabelle 13 fett markiert) wurden erneut isoliert und als Precursor-Ionen nochmals durch kontinuierliche Erhöhung der Energie fragmentiert. In Tabelle 13 (ausführlichere Darstellung s. Anhang A.12, Tabelle A.7 und A.8) sind die entstandenen Product-Ionen der vier Monomeren in abnehmender Intensitätsreihenfolge aufgeführt. In Abbildung 33 sind die aus dem Fragmentierungsmuster abgeleiteten und basierend auf bereits veröffentlichten Untersuchungsergebnissen [48, 298] möglichen Zerfallswege am Beispiel des (+)-Catechins dargestellt.

Tabelle 13: Fragmentierungsprodukte der Monomeren (+)-Catechin, (-)-Epicatechin, (-)-Gallocatechin und (-)-Epigallocatechin mittels LC-MSⁿ-Experimenten (Gradient E2)

Experiment	(+)-Catechin / (-)-Epicatechin		(-)-Gallocatechin / (-)-Epigallocatechin	
	Precursor-Ion [M-H] ⁻ mit m/z	Product-Ion [M-H] ⁻ mit m/z	Precursor-Ion [M-H] ⁻ mit m/z	Product-Ion [M-H] ⁻ mit m/z
MS ²	289,2	245,3/ 205,3/ 179,2/ 271,1/ 231,3/ 165,2/ 125,1	304,9	179,0/ 261,1/ 220,9/ 287,0/ 219,1/ 165,0/ 124,9/ 137,1
MS ³	-	-	287,0	242,9/ 269,3/ 244,9/ 218,9/ 203,0
	245,3	203,3/ 227,1/ 187,2/ 161,2/ 175,1	261,1	218,9/ 243,1/ 202,9/ 177,1/ 192,1
	205,3	161,2/ 187,3/ 177,2	220,9	202,9/ 176,9/ 192,9
	179,2	163,9/ 135,1/ 151,1	179,0	163,9/ 150,8/ 134,8
MS ⁴	203,3	175,1/ 185,2/ 161,2/ 109,1	218,9	176,9 /125,1/ 192,1
	161,2	109,1	176,9	125,1

fett: Product-Ionen MS²-Experiment, eingesetzt als Precursor-Ionen MS³-Experimente bzw. Product-Ionen MS³-Experiment, eingesetzt als Precursor-Ionen MS⁴-Experimente

Das Fragmentierungsmuster der vier Verbindungen ist nahezu identisch. Die Precursor-Ionen fragmentieren hauptsächlich in drei Product-Ionen, abhängig von der Position der im Molekül erzeugten negativen Ladung. Das Product-Ion m/z 245,3 entsteht vermutlich durch das Aufbrechen des heterocyclischen C-Ringes, gefolgt von einer Abspaltung eines Acetaldehyds und wies für das Precursor-Ion mit m/z 289,2 die höchste Intensität auf. Im Gegensatz dazu war die Intensität der auf dem äquivalenten Weg entstandenen Product-Ionen m/z 261,1 für die Gallocatechine kleiner, als Product-Ion mit der höchsten Intensität wurde hier das Ion mit m/z 179,0 (Abspaltung des Phenylringes B) detektiert. Die Abspaltung des A-Ringes aus dem Chroman-Gerüst führte für das Precursor-Ion mit m/z 289,2 zu einem Product-Ion mit m/z 205,3, für das Precursor-Ion m/z 304,9 zu dem Product-Ion m/z 220,9.

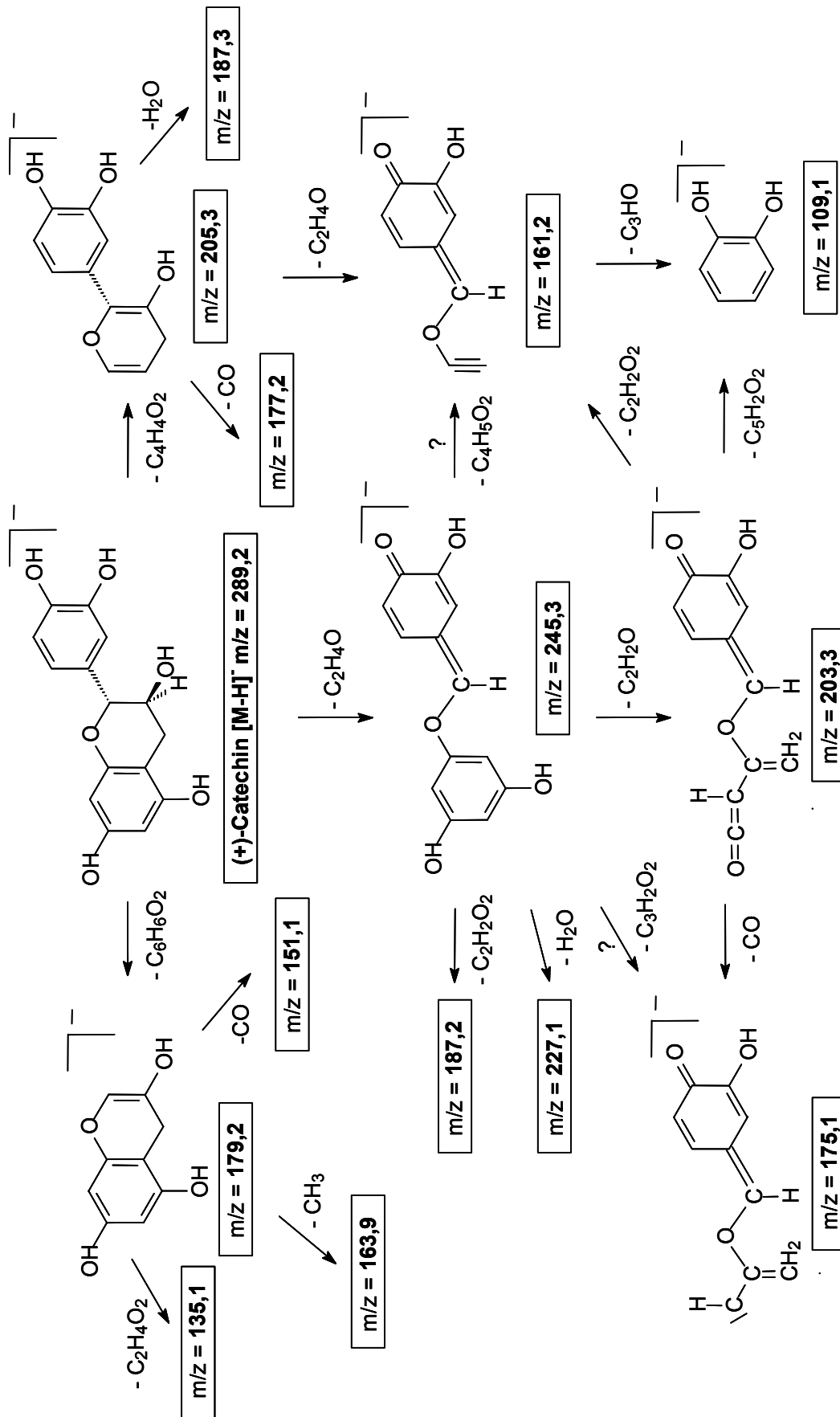


Abbildung 33: Mögliche Fragmentierungen der Flavanole am Beispiel (+)-Catechin, Stoßfragmentierung in der Ionenfalle (ESI, negative-Mode)

Mit den intensivsten Product-Ionen der MS²-Experimente (in Tabelle 13 fett markiert) wurden MS³-Fragmentierungsexperimente durchgeführt. Bei dem Product-Ion mit m/z 179 konnte keine strukturelle Zuordnung der erhaltenen Ionen getroffen werden. Bei beiden durch Abspaltung des A-Ringes resultierenden Product-Ionen (m/z 205,3 bzw. 220,9) kam es zu einem Aufbrechen des C-Ringes (resultierende Product-Ionen m/z 161,2 bzw. 176,9), und schließlich entstand als Product-Ion ein di- oder trisubstituierter Phenylring mit m/z 109,1 bzw. 125,1. Die Fragmentierungsuntersuchungen der Product-Ionen mit m/z 245,3 bzw. 261,1 führten zu keinem einheitlichen Ergebnis. So konnte nicht unterschieden werden, ob die Product-Ionen ausschließlich über die Zwischenstufe des Fragmentes m/z 203,3 bzw. 218,9 oder direkt in die Product-Ionen mit m/z 161,2 bzw. 176,9 und m/z 175,1 bzw. 192,1 zerfielen. Sowohl bei dem Stoßexperiment mit dem ersten als auch dem zweiten Product-Ion wurden die entsprechenden Fragmente detektiert. Für die weiteren in Tabelle 13 aufgeführten Product-Ionen konnte bisher keine Zuordnung getroffen werden.

5.6.2 Precursor-Ion-Scan-Experimente mit Gerstenextrakten

Es wurden MS¹-Scan-Untersuchungen (ESI, negative-Mode) eines Gerstenextraktes, gelöst in DMF/H₂O, in einem Massenbereich von m/z 50 - 2000 durchgeführt. Zur Zuordnung der einzelnen Gersteninhaltsstoffe wurden die entsprechenden Signale in den MS-Chromatogrammen herangezogen. In Tabelle 14 sind jeweils die Bruttoformel, die mit dem Programm ChemSketch [304] berechnete Molmasse, die Masse des erwarteten Precursor-Ions [M-H]⁻ sowie die Sequenz der Monomeren der in Gerste (s. Kapitel 4.1, Tabelle 3) identifizierten Flavonoide zusammengestellt.

Tabelle 14: Zusammenstellung der Bruttoformel, der Molmasse, sowie der erwarteten Masse der Precursor-Ionen [M-H]⁻ der in Gerste identifizierten Flavonoide

Trivialname	Bruttoformel	Monomeren-Sequenz	Molmasse [g/mol]	Precursor-Ion [M-H] ⁻ [m/z]
(+)-Catechin/ (-)-Epicatechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	C/ EpiC	290,268	289,07
(-)-Gallocatechin/ (-)-Epigallocatechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	GC/ EpiGC	306,267	305,07
(+)-Catechin-Glucopyranosid	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	CGp	452,537	451,12
Procyanidin B3	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	C-C	578,520	577,13
Prodelphinidin B3	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	GC-C	594,520	593,14
Prodelphinidin Dimer	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₄	GC-GC	610,530	609,12
Procyanidin C2	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	C-C-C	866,772	865,21
Prodelphinidin Trimer 1a	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₉	GC-C-C	882,772	881,19
Prodelphinidin Trimer 1b	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₉	C-GC-C	882,772	881,19
Prodelphinidin C2	C ₄₅ H ₃₈ O ₂₀	GC-GC-C	898,771	897,19
Prodelphinidin Trimer 2a	C ₄₅ H ₃₈ O ₂₁	GC-GC-GC	914,772	913,18

Im ersten Schritt erfolgte die Zuordnung der Monomeren, hierzu sind in Abbildung 34 ein UV-Chromatogramm ($\lambda_{\max} = 280 \text{ nm}$), die MS-Chromatogramme (m/z 288,5 - 289,5 und m/z 304,5 - 305,5) der monomeren Flavonoide sowie das MS-Chromatogramm des Acetat-Addukts von Catechin/Epicatechin [$M+\text{Acetat}-H$] (m/z 348,5 - 349,5) dargestellt.

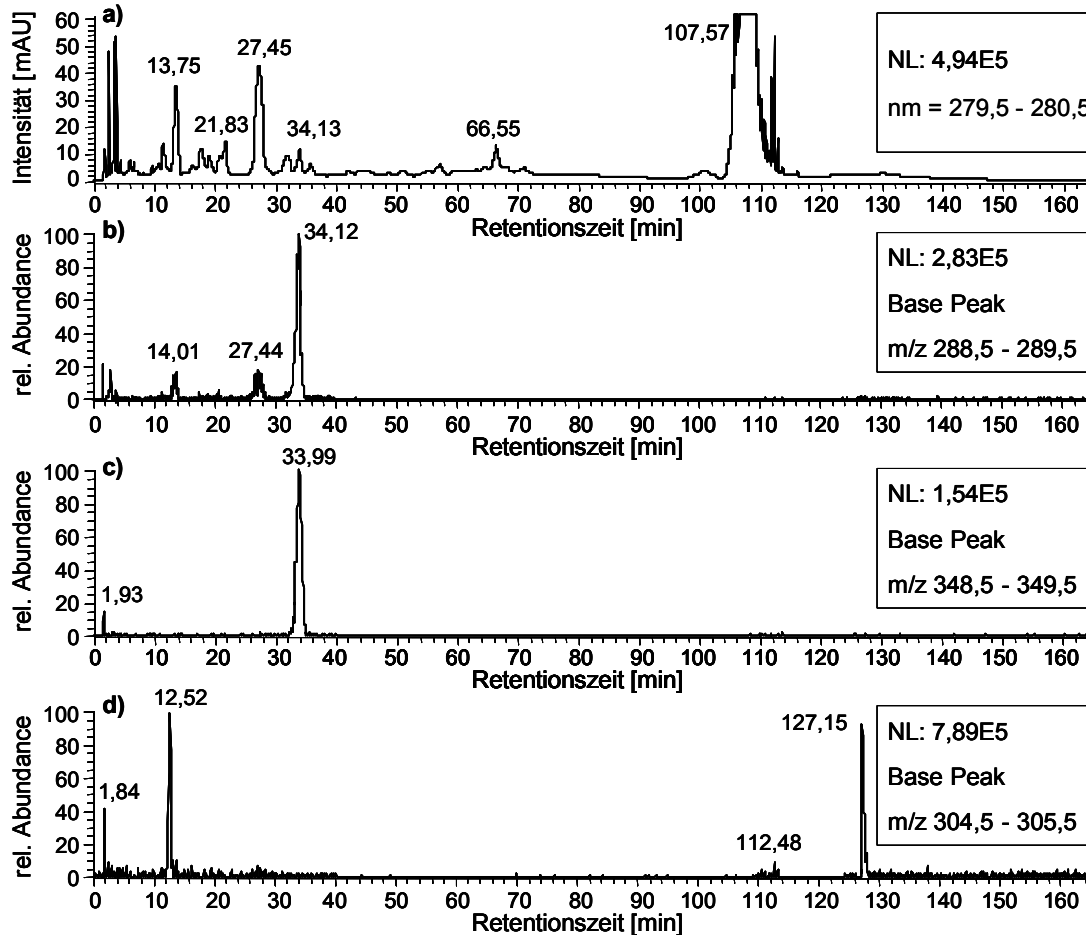


Abbildung 34: UV- und MS-Chromatogramme (Precursor-Ion-Scan-Experimente, ESI, negative-Mode) eines Gerstenextraktes: a) UV-Chromatogramm (280 nm); b)-d) MS-Chromatogramme **monomere** Flavonoide (m/z 289, 349 und 305)

Bei einer Retentionszeit von 34 min wurde ein Peak mit m/z 289,2 und m/z 348,5 detektiert, bei dem es sich um (+)-Catechin bzw. das Acetat-Addukt handelt. Entgegen den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen [181, 185] konnte in dem Gerstenextrakt kein (-)-Epicatechin nachgewiesen werden, da bei einer, aus Versuchen mit Standard-Lösungen ermittelten Retentionszeit für (-)-Epicatechin von etwa 60 min, kein Peak im MS-Chromatogramm (m/z 289 oder m/z 348) detektiert wurde. Die Signale bei $R_t = 14,01$ und 27,44 min sind Catechin/Epicatechin-Einheiten aus Flavonoid-Dimeren bzw. -Trimeren zuzuordnen (s. Kapitel 5.6.3). Unter Umständen resultieren sie aus dem Bruch einer Interflavonoid-Bindung bei der Ionisierung oder im Massenanalysator.

Im MS-Chromatogramm m/z 304,5 - 305,5 konnte der Peak mit $R_t = 12,52$ min als (-)-Gallocatechin identifiziert werden. Erstaunlicherweise konnte bei einer Retentionszeit von

127,15 min ein Signal mit einer für Gallocatechin/Epigallocatechin typischen Masse m/z 305 festgestellt werden. Aufgrund der hohen Retentionszeitverschiebung gegenüber der untersuchten Standard-Lösung (s. Kapitel 5.6.1) handelt es sich hierbei aber nicht um das Monomer (-)-Epigallocatechin. Zudem konnte auch die für Epigallocatechine charakteristische Dimerenbildung ($[2M-H]^-$ m/z 610,9) nicht beobachtet werden.

Entsprechend den Untersuchungen von FRIEDRICH [183], der erstmals (+)-Catechin-Glucopyranosid (2R:3S-Catechin-7O- β -D-glucopyranosid) in Gerste gefunden hat, konnte ebenfalls ein Ion mit derselben Masse m/z 451 im MS-Chromatogramm (nicht abgebildet) bei einer Retentionszeit von 20,53 min ermittelt werden. Die Bestätigung der Existenz dieser Verbindung in Gerste erfolgt später durch MS/MS-Kollisionsexperimente (s. Kapitel 5.6.3.1).

Neben den Monomeren (+)-Catechin, (-)-Gallicocatechin und dem (+)-Catechin-Glucopyranosid konnte in Gerste das dimere Flavonoid Procyanidin B3 (m/z 576,5 - 577,5) sowie das entsprechende Acetat-Addukt bei einer Retentionszeit $R_t = 27,47$ min detektiert werden (s. Abbildung 35). Weiterhin wurden drei Peaks bei den Retentionszeiten $R_t = 13,77$, $R_t = 14,98$ und $R_t = 21,08$ min mit einer Masse von m/z 592,9 gefunden, die Prodelphinidin B3 entsprechen könnten.

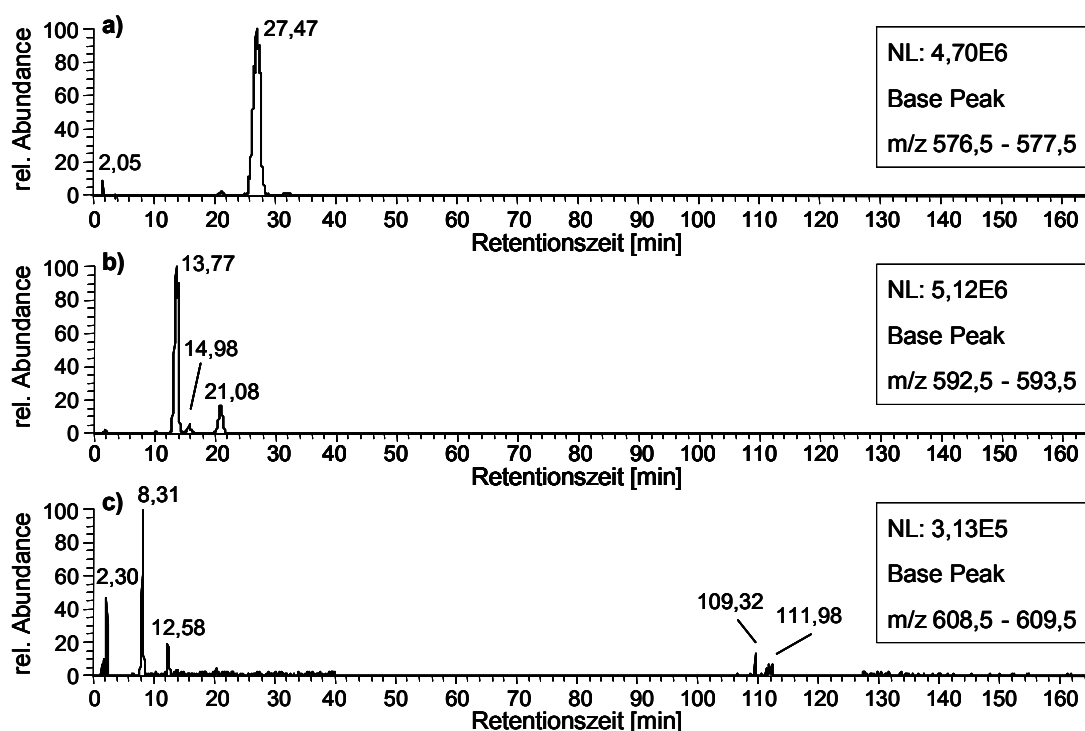


Abbildung 35: Precursor-Ion-Scan-Experimente eines Gerstenextraktes:

a)-c) MS-Chromatogramme **dimerer Flavonoide** (m/z 577, 593 und 609) (ESI, negative-Mode)

Anhand der hier durchgeführten Precursor-Ion-Scan-Untersuchungen konnte jedoch nicht festgestellt werden, bei welchem Peak es sich um das bereits in der Literatur [185] beschriebene Prodelphinidin B3 mit der Monomeren-Sequenz GC-C handelt, ob zusätzlich das Dimer mit der umgekehrten Monomeren-Sequenz vorliegt, oder ob hierbei Bruchstücke einer

höhermolekularen Verbindung detektiert wurden. Um Aussagen darüber treffen zu können, waren weitere MS/MS-Untersuchungen erforderlich (s. Kapitel 5.6.3.2). Ein Signal bei einer Retentionszeit von 8,31 min mit einer Masse m/z 609,1 deutete auf ein ausschließlich aus Gallocatechin-Einheiten aufgebautes Dimer hin, was allerdings ebenfalls durch weitere Untersuchungen bestätigt werden musste.

In Abbildung 36 sind die vier MS-Chromatogramme der trimeren Flavonoide Procyanidin C2 (m/z 864,5 - 865,5), der beiden Prodelphinidin Trimere 1a und 1b (m/z 880,5 - 881,5), die jeweils aus einer Gallocatechin- und zwei Catechin-Einheiten aufgebaut sind, sowie Prodelphinidin C2 (m/z 896,5 - 897,5) dargestellt. Zudem konnten, wie auch bei den aus den Monomeren Gallocatechin und Catechin aufgebauten Dimeren, weitere bisher nicht in der Literatur beschriebene Precursor-Ionen $[M-H]^-$ mit der Masse m/z 881,0 ($R_t = 29,05$ min) und m/z 897,0 ($R_t = 20,89$ min) detektiert werden. Die Frage, ob es sich hierbei um Prodelphinidine, die eine bisher noch nicht beschriebene Verknüpfung der Monomeren aufweisen, oder um Fragmente höhermolekularer Verbindungen handeln könnte, war mit Precursor-Ion-Scan-Experimenten nicht zu lösen. Eine eindeutige Zuordnung der erhaltenen Signale zu den jeweiligen Verbindungen war erst durch weitere Kollisionsexperimente möglich (s. Kapitel 5.6.3.3).

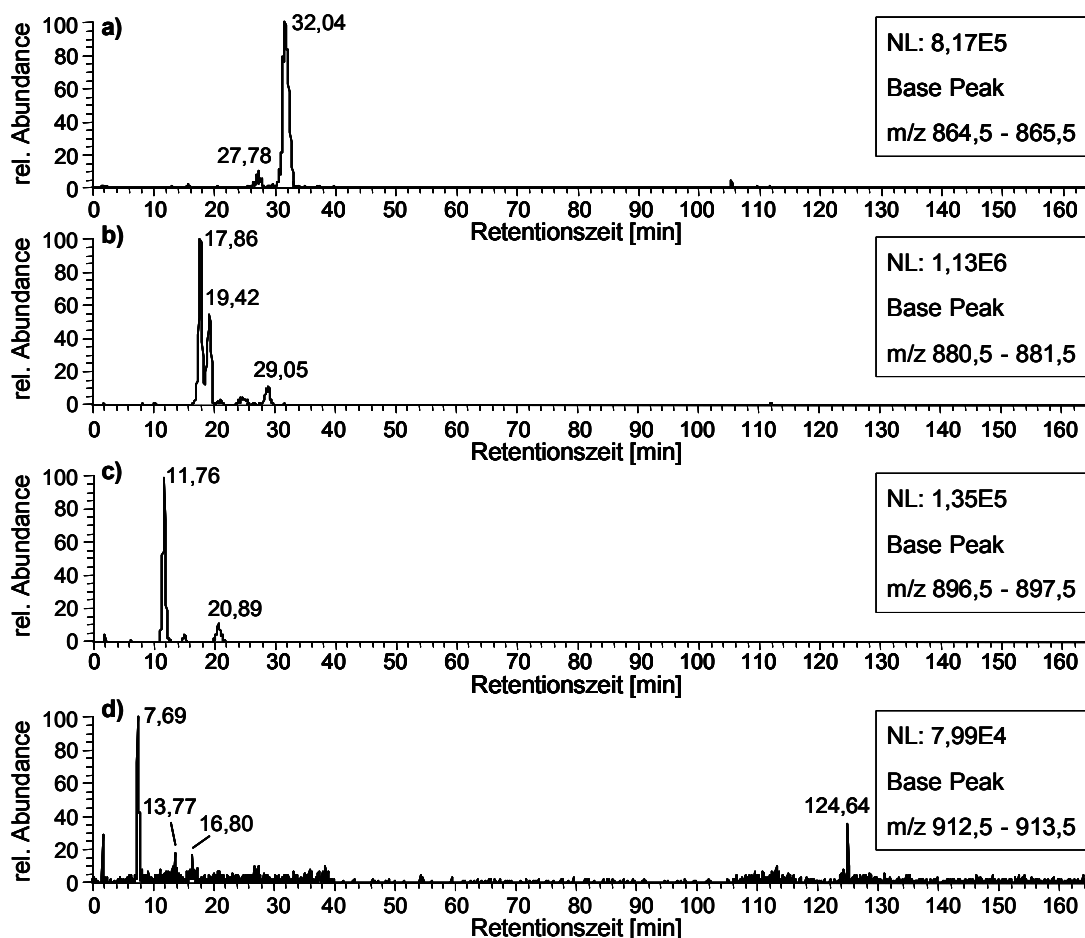


Abbildung 36: Precursor-Ion-Scan-Experimente eines Gerstenextraktes:
a-d) MS-Chromatogramme **trimerer Flavonoide** (m/z 865, 881, 897 und 913) (ESI, negative-Mode)

Neben diesen trimeren Verbindungen wurde bei einer Retentionszeit von 7,69 min ein Signal mit m/z 912,9 detektiert. Vermutlich handelt es sich hierbei um ein bisher nur von BRANDON et al. [175] isoliertes Trimer, welches ausschließlich aus Gallo catechin-Einheiten aufgebaut ist. Obwohl die Existenz dieser Verbindung noch nicht durch andere Arbeitsgruppen bestätigt wurde, steht die vergleichsweise niedrige Retentionszeit von 7,69 min mit der im Vergleich zu den anderen trimeren Flavonoiden höheren Polarität in Einklang. Zur Bestätigung der Existenz dieser Verbindung im Gerstenextrakt wurden aber noch weiterführende Kollisionsexperimente durchgeführt (s. Kapitel 5.6.3.3).

Darüber hinaus detektierten WHITTLE et al. [181] mittels Electrospray-LC-MS (positive-Mode) in Gerste neben den dimeren und trimeren Proanthocyanidinen Precursor-Ionen $[M+H]^+$, die tetrameren und pentameren Verbindungen entsprechen, jedoch nur in sehr untergeordneter Menge vorkommen. Eine Identifizierung anhand von Fragmentierungsexperimenten führte die Arbeitsgruppe allerdings nicht durch. GUYOT et al. [301] zeigten bei ihren Untersuchungen über Proanthocyanidine aus Äpfeln mit ESI-LC-MS, dass die höhermolekularen Proanthocyanidine sowohl als einfach, aber auch als doppelt oder dreifach geladene Spezies vorliegen können. HAMMERSTONE et al. [294] konnten 1999 diese Beobachtung mittels APCI-LC-MS anhand von Schokoladenproben bestätigen. In Tabelle 15 sind die Molmassen der einfach, doppelt und dreifach geladenen Precursor-Ionen der möglicherweise in Gerstenextrakt vorliegenden tetra- bis hexameren Proanthocyanidine aufgelistet.

Tabelle 15: *Bruttoformel, Molmasse und erwartete Massen der Precursor-Ionen $[M-H]^-$, $[M-2H]^{2-}$ und $[M-3H]^{3-}$ der tetrameren bis hexameren Proanthocyanidine*

Verbindung (Monomeren-Sequenz)	Bruttoformel	Molmasse [g/mol]	Precursor-Ion $[M-H]^-$ [m/z]	Precursor-Ion $[M-2H]^{2-}$ [m/z]	Precursor-Ion $[M-3H]^{3-}$ [m/z]
C-C-C-C	$C_{60}H_{50}O_{24}$	1154,27	1153,26	576,13	383,75
GC-C-C-C	$C_{60}H_{50}O_{25}$	1170,26	1169,26	584,12	389,08
GC-GC-C-C	$C_{60}H_{50}O_{26}$	1186,26	1185,25	592,12	394,41
GC-GC-GC-C	$C_{60}H_{50}O_{27}$	1202,25	1201,25	600,12	399,74
GC-GC-GC-GC	$C_{60}H_{50}O_{28}$	1218,25	1217,24	609,12	405,08
C-C-C-C-C	$C_{75}H_{62}O_{30}$	1442,33	1441,32	720,16	479,77
GC-C-C-C-C	$C_{75}H_{62}O_{31}$	1458,33	1457,32	728,16	485,10
GC-GC-C-C-C	$C_{75}H_{62}O_{32}$	1474,32	1473,31	736,15	490,43
GC-GC-GC-C-C	$C_{75}H_{62}O_{33}$	1490,32	1489,31	744,15	495,77
GC-GC-GC-GC-C	$C_{75}H_{62}O_{34}$	1506,31	1505,30	752,15	501,10
GC-GC-GC-GC-GC	$C_{75}H_{62}O_{35}$	1522,31	1521,30	760,15	506,43
C-C-C-C-C-C	$C_{90}H_{74}O_{36}$	1730,40	1729,39	864,19	575,79
GC-C-C-C-C-C	$C_{90}H_{74}O_{37}$	1746,39	1745,38	872,19	581,12
GC-GC-C-C-C-C	$C_{90}H_{74}O_{38}$	1762,39	1761,38	880,19	586,45
GC-GC-GC-C-C-C	$C_{90}H_{74}O_{39}$	1778,38	1777,37	888,18	591,79
GC-GC-GC-GC-C-C	$C_{90}H_{74}O_{40}$	1794,38	1793,37	896,18	597,12
GC-GC-GC-GC-GC-C	$C_{90}H_{74}O_{41}$	1810,37	1809,36	904,18	602,45
GC-GC-GC-GC-GC-GC	$C_{90}H_{74}O_{42}$	1826,37	1825,36	912,18	607,79

Bei den durchgeführten Untersuchungen konnten in Gerste die Precursor-Ionen $[M-H]^-$ aller fünf möglichen tetrameren Verbindungen nachgewiesen werden. In Abbildung 37 sind die erhaltenen MS-Chromatogramme dargestellt. Abweichend von den in der Literatur beschriebenen MS-Untersuchungen mit Proanthocyanidinen aus Äpfeln oder Schokolade [294, 301] konnten die doppelt geladenen Spezies ($[M-2H]^{2-}$) dieser Verbindungen nur schwach und die dreifach geladenen Precursor-Ionen ($[M-3H]^{3-}$) gar nicht gefunden werden. Für die weiteren höhermolekularen Proanthocyanidine wurden, aufgrund der kleinen Konzentration in Gerste, nur Signale sehr geringer Intensität bei Retentionszeiten um 90 - 100 min erhalten. Es ergaben sich auch hier keine Hinweise auf doppelt oder dreifach geladene Spezies.

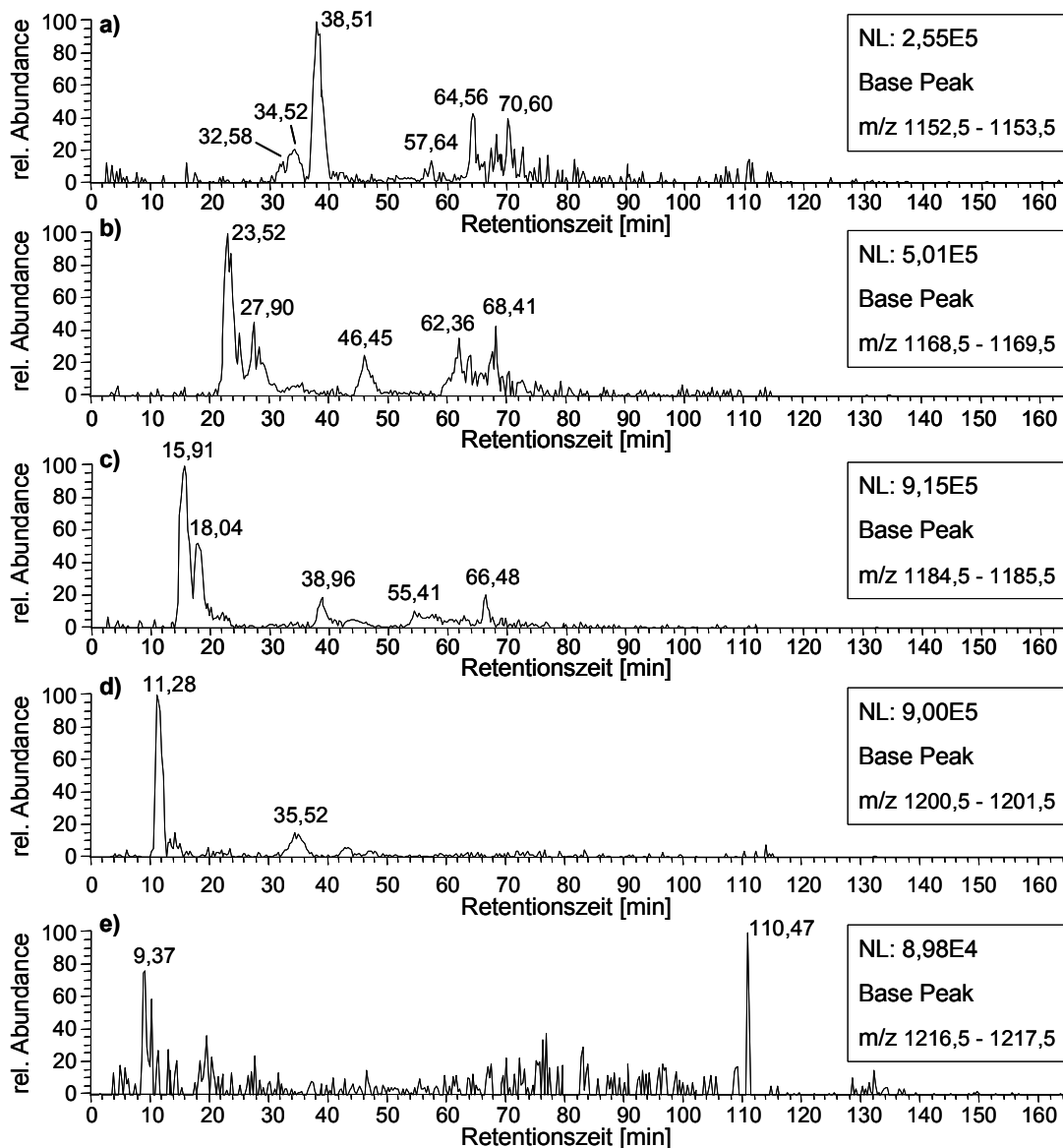


Abbildung 37: Precursor-Ion-Scan-Experimente eines Gerstenextraktes:
a-e) MS-Chromatogramme tetramerer Flavonoide (m/z 1153, 1169, 1185, 1201 und 1217) (ESI, negative-Mode)

Bei dem Retentionsverhalten der di-, tri- und tetrameren Flavonoide ließen sich zwei Trends beobachten. Innerhalb einer Gruppe mit gleicher Anzahl an Monomeren-Bausteinen verringerte sich die Retentionszeit mit steigender Zahl an Gallocatechin-Einheiten aufgrund zunehmender Polarität der Verbindungen. So ist das aus drei Catechin-Einheiten aufgebaute Procyanidin C2 ($R_t = 32,04$ min) durch die geringere Anzahl an Hydroxylgruppen unpolarer gegenüber den Trimeren mit einer (z. B. GC-C-C, $R_t = 17,86$ min), zwei (z. B. GC-GC-C, $R_t = 11,76$ min) bzw. drei Gallocatechin-Einheiten (GC-GC-GC, $R_t = 7,69$ min), und eluierte deshalb später als diese von der Säule (s. Abbildung 36).

Neben der Polarität hat aber auch scheinbar die Molekülgeometrie der Flavonoide einen Einfluss auf das Retentionsverhalten. Das Monomer (+)-Catechin wies eine Retentionszeit von 34 min, das aus zwei Catechin-Einheiten aufgebaute Procyanidin B3 eine Retentionszeit von 27 min auf, wohingegen bei dem Trimer Procyanidin C2 wieder ein Anstieg der Retentionszeit auf 32 min beobachtet und das aus vier Catechin-Einheiten aufgebaute Tetramer schließlich bei einer Retentionszeit von 38 min detektiert wurde. Der Trend, dass es bei zunehmender Anzahl von Monomeren zuerst zu einer Verringerung und dann zu einem Anstieg der Retentionszeit kam, konnte auch für die ausschließlich aus Gallocatechin-Einheiten aufgebauten Flavonoide beobachtet werden. Fundierte Aussagen bezüglich der strukturellen Wechselwirkung zwischen den Flavonoid-Molekülen und stationärer sowie mobiler Phase sind aber nur in Verbindung mit rechnerischen Methoden (Molecular Modeling) oder experimentellen Methoden wie Röntgenstrukturanalyse oder HR-MAS-Suspensions-NMR-Spektroskopie [305] möglich.

Im MS-Chromatogramm m/z 1152,5 - 1153,5 konnten neben dem Signal bei der Retentionszeit von 38 min noch weitere beobachtet werden, welche u. a. mit der Retentionszeit des Trimeren C-C-C ($R_t = 32$ min) übereinstimmen. Die Detektion von Ionen, deren Masse Tetrameren entsprechen, aber eine für Trimere typische Retentionszeit zeigten, war ein möglicher weiterer Hinweis darauf, dass es bei Ionisierung oder im Massenanalysator unter Umständen zu Spaltungen der Interflavonoid-Bindung aber auch zu Rekombination einzelner Fragmente kommen kann.

In Abbildung 37 wurden für die aus unterschiedlichen Monomeren aufgebauten Tetrameren, wie auch bei den Trimeren, erneut mehrere Signale bei den einzelnen MS-Chromatogrammen beobachtet. Beispielsweise fanden sich im MS-Chromatogramm m/z 1168,5 - 1169,5 neben einem Signal hoher Intensität bei der Retentionszeiten $R_t = 23,52$ min auch Signale geringerer Intensität bei 27,90 min, 46,45 min, 62,36 min und 68,41 min. Dabei könnte es sich unter Umständen um Artefakte handeln, die bei der Probenvorbereitung entstehen. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass es sich hierbei um Precursor-Ionen von Verbindungen handelt, die zwar die gleiche Masse (m/z) des Precursor-Ions aufweisen, sich aber in der Sequenz der Monomeren-Bausteine unterscheiden.

5.6.3 Identifizierung einzelner Gersteninhaltsstoffe mittels MSⁿ-Untersuchungen

5.6.3.1 Monomere Flavonoide

Zur Identifizierung der monomeren Flavonoide im Gerstenextrakt wurden Kollisionsexperimente durchgeführt. Bei der stoßinduzierten Fragmentierung des Precursor-Ions mit m/z 289,2 ($[M-H]^+$, (+)-Catechin) mit einer Kollisionsenergie von 40 % konnten hauptsächlich die schon aus den Voruntersuchungen bekannten Product-Ionen m/z 245,3 und m/z 205,3, sowie die aus erneuter Fragmentierung resultierenden Product-Ionen (s. Kapitel 5.6.1, Tabelle 13) detektiert und der gefundene Peak bei $R_t = 34,12$ min somit als (+)-Catechin identifiziert werden.

Die Kollisionsexperimente des Precursor-Ions bei $R_t = 12,52$ min im MS-Chromatogramm m/z 304,5 - 305,5 (s. Abbildung 34d) führten zu identischen Product-Ionen wie bei den Voruntersuchungen mit der (-)-Gallocatechin-Standard-Lösung (s. Tabelle 13). Somit konnte die Existenz beider Monomere durch die Kollisionsexperimente abgesichert werden.

Bei der Untersuchung des Signals bei einer Retentionszeit von 20,53 min, das vermutlich von dem aus (+)-Catechin und Glucose aufgebauten (+)-Catechin-Glucopyranosid ($[M-H]^+$, m/z 451,0) resultiert, wurden bei einer Stoßenergie von 30 % als Product-Ionen Signale mit m/z 289,0 ($[Catechin-H]^+$) sowie m/z 160,9 ($[Glucose-H]^+$) erhalten (s. Abbildung 38). Die Identifizierung des Product-Ions m/z 289,0 als Catechin konnte durch MS³-Experimente bestätigt werden. Die weitere Fragmentierung des Ions mit m/z 160,9 führte zu nicht charakteristischen Product-Ionen. Basierend auf den von FRIEDRICH [183] durchgeführten FAB-MS-Untersuchungen kann es demnach als sicher angesehen werden, dass das (+)-Catechin-Glucopyranosid, welches ursprünglich ausschließlich in Buchweizen [306] und in Rhabarber-Arten [307] gefunden wurde, ebenfalls in Gerste vorkommt.

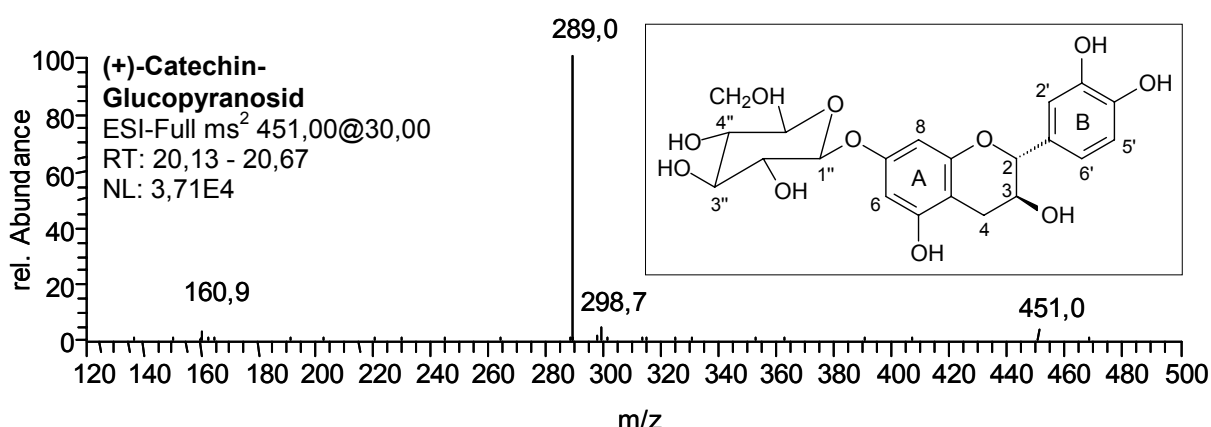


Abbildung 38: LC-ESI-Massenspektrum (Product-Ion-Scan) eines Gerstenextraktes nach stoßinduzierter Fragmentierung in der Ionenfalle: Identifizierung des (+)-Catechin-Glucopyranosids (m/z 451,0; Kollisionsenergie: 30 %)

5.6.3.2 Dimere Flavonoide

Analog der Untersuchungen für die monomeren Flavonoide wurden zur Identifizierung der dimeren Flavonoide ebenfalls Fragmentierungsexperimente durchgeführt. Bei der nachfolgenden Interpretation der massenspektrometrischen Daten ist aber zu berücksichtigen, dass Diastereomere massenspektrometrisch nicht unterschieden werden können, was auch schon die unter Kapitel 5.6.1 durchgeführten Untersuchungen mit Standard-Substanzen gezeigt haben.

In Tabelle 16 sind die jeweils sechs intensivsten Product-Ionen des MS²-Experimentes (fett markiert) der Precursor-Ionen Procyanidin B3 ([M-H]⁻ mit m/z 576,9) und Prodelphinidin Dimer mit m/z 609,1, sowie die daraus resultierenden im MS³-Experiment ermittelten Fragmente aufgeführt. Eine detaillierte Übersicht über die Fragmentierung mit den jeweils abgespaltenen Massen findet sich im Anhang A.12, Tabelle A.9 und A.13.

Tabelle 16: Ergebnisse der MS³-Experimente von Procyanidin B3 und dem Prodelphinidin Dimer GC-GC (Auflistung der Product-Ionen in absteigender Intensitätsreihenfolge)

Precursor-Ion [m/z]	Product-Ion [M-H] ⁻ [m/z]
Procyanidin B3; Sequenz (M_T→M_B): C-C; R_t: 27,47 min (s. Abbildung 35 a)	
MS²-Experiment:	
[M-H] ⁻ 576,9	424,9/ 407,1/ 451,0/ 559,0/ 286,9/ 289,0/ 532,9
MS³-Experimente:	
[M-H ₂ O-H] ⁻ 559,0	541,0/ 289,0/ 406,9/ 286,9
[M-C ₆ H ₆ O ₃ -H] ⁻ 451,0	433,0/ 409,0/ 286,9
[(B _T /C _T -Produkt)-H] ⁻ 424,9	299,0/ 283,0/ 285,0/ 255,0/ 407,0/ 243,0/ 333,0/ 269,9
[(B _T /C _T -Produkt)-H ₂ O-H] ⁻ 407,0	285,0/ 281,1/ 297,0/ 389,1/ 339,0/ 255,1/ 243,0/ 363,0/ 321,1/ 176,0
[M _B -H] ⁻ 289,0	245,1
[M _T -3H] ⁻ 286,9	243,1/ 269,2/ 259,0
Prodelphinidin Dimer; Sequenz (M_T→M_B): GC-GC; R_t: 8,31 min (s. Abbildung 35 c)	
MS²-Experiment:	
[M-H] ⁻ 609,1	423,0/ 440,9/ 483,0/ 305,0/ 591,0/ 303,0/ 272,9/ 521,8
MS³-Experimente:	
[M-H ₂ O-H] ⁻ 591,0	464,9/ 453,1/ 376,9/ 422,9/ 425,1/ 572,5/ 282,9/ 285,1
[M-C ₆ H ₆ O ₃ -H] ⁻ 483,0	464,9/ 422,9/ 399,1/ 349,0/ 301,0/ 251,0/ 440,9
[(B _T /C _T -Produkt)-H] ⁻ 440,9	423,0/ 397,0/ 273,0
[(B _T /C _T -Produkt)-H ₂ O-H] ⁻ 423,0	297,0/ 282,9/ 285,1/ 243,0/ 255,1/ 405,1/ 387,1/ 361,0
[M _B -H] ⁻ 305,0	179,0/ 221,0/ 261,0/ 247,0/ 287,0/ 218,9/ 176,9/ 125,1
[M _T -3H] ⁻ 303,0	259,1/ 244,9/ 177,1/ 284,9/ 218,9/ 217,1

fett: Product-Ionen MS²-Experiment, eingesetzt als Precursor-Ionen MS³-Experimente

Die wichtigste Fragmentierungsreaktion für die Identifizierung der dimeren Proanthocyanidine ist die Abspaltung des B-Ringes zusammen mit Teilen des C-Ringes der oberen Monomeren-Einheit M_T (s. Abbildung 39), die zum Product-Ion m/z 424,9 (M_T = Catechin) oder m/z 440,9 (M_T = Gallocatechin) führt. Die daraus nach Wasserabspaltung resultierenden Product-Ionen weisen häufig hohe Intensitäten auf [183].

In Abbildung 39 sind zwei mögliche Fragmentierungswege A und B gegenübergestellt. FRIEDRICH [303] schlägt eine Retro-Diels-Alder-Reaktion (RDA-Reaktion) als Mechanismus vor (Weg **A**). Hierbei definiert er die Position der im Precursor-Ion durch Abspaltung eines Protons erzeugten negativen Ladung nicht (A1). Eine Alternative zu diesem Ansatz stellt der Fragmentierungsmechanismus **B** dar. Ausgehend von einer Deprotonierung der Hydroxylgruppe an C-5 der unteren Monomeren-Einheit M_B (B1) kommt es zu einem Bruch des C-Ringes, gefolgt von der Abspaltung des Fragmentes mit m/z 152. Das Produkt B2 ist mesomeriestabilisiert, so dass die Struktur dieser Verbindung so dargestellt werden kann, dass die negative Ladung in der ursprünglichen Position lokalisiert bleibt.

In der Literatur besteht Uneinigkeit darüber, ob die beschriebene Abspaltung in der oberen oder in der unteren Monomeren-Einheit M_B stattfindet. STEVENS et al. [308] postulierten 1997 basierend auf LC-MS/MS von Proanthocyanidinen mit APCI (positive-Mode), dass die Abspaltung bevorzugt in der unteren M_B -Einheit stattfindet. Dieses hatten 1987 schon MELLON et al. [291] aufgrund ihrer mit TSP-MS-Spektrometrie im negativen Mode erhaltenen Fragmenten behauptet. Die Daten beider Autoren basieren jedoch auf der Spaltung des Dimers Procyanidin B3. Bei diesem aus identischen Monomeren-Bausteinen aufgebauten Dimeren kann aufgrund der erhaltenen Product-Ionen aber keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Abspaltung des B-Ringes zusammen mit Teilen des C-Ringes in der oberen oder unteren Einheit eintritt, da sich unabhängig vom Ort der Spaltung keine unterschiedlichen Massen der Fragment-Ionen ergeben. Eine Bestätigung der Lokalisierung der negativen Ladung an der Hydroxylgruppe C-5 der unteren Einheit M_B , gefolgt von der Abspaltung in der oberen Monomeren-Einheit M_T sollten die im folgenden beschriebenen Fragmentierungsuntersuchungen an Dimeren mit den Precursor-Ionen $[M-H]^-$ m/z 592,9 geben.

In dem MS-Chromatogramm m/z 592,5 - 593,5 konnten drei Signale bei den Retentionszeiten 13,77, 14,98 und 21,08 min erfasst werden (s. Kapitel 5.6.2, Abbildung 35b). In Tabelle 17 sind die Ergebnisse aus den MS^3 -Experimenten mit den Precursor-Ionen m/z 592,9 bei $R_t = 13,77$ und 14,98 min dargestellt (ausführliche MS-Daten s. Anhang A.12, Tabelle A.10 und A.11). Mit den intensivsten Product-Ionen der MS^2 -Experimente (in Tabelle 17 fett markiert) wurden MS^3 -Fragmentierungsexperimente durchgeführt. Der Peak mit $R_t = 13,77$ min wurde durch den Vergleich mit publizierten Daten [303] als Dimer Prodelphinidin B3, aufgebaut aus den Monomeren-Bausteinen mit der Sequenz GC-C, identifiziert. Die charakteristische Abspaltung des B-Ringes zusammen mit Teilen des C-Ringes erfolgt ausschließlich in der oberen M_T -Einheit. Ein identisches Fragmentierungsverhalten, Deprotonierung in der Basiseinheit mit nachfolgender Abspaltung aus der oberen Einheit, zeigte die bei einer Retentionszeit von 14,98 min detektierte Verbindung; diese konnte somit als Dimer mit der Sequenz C-GC identifiziert werden.

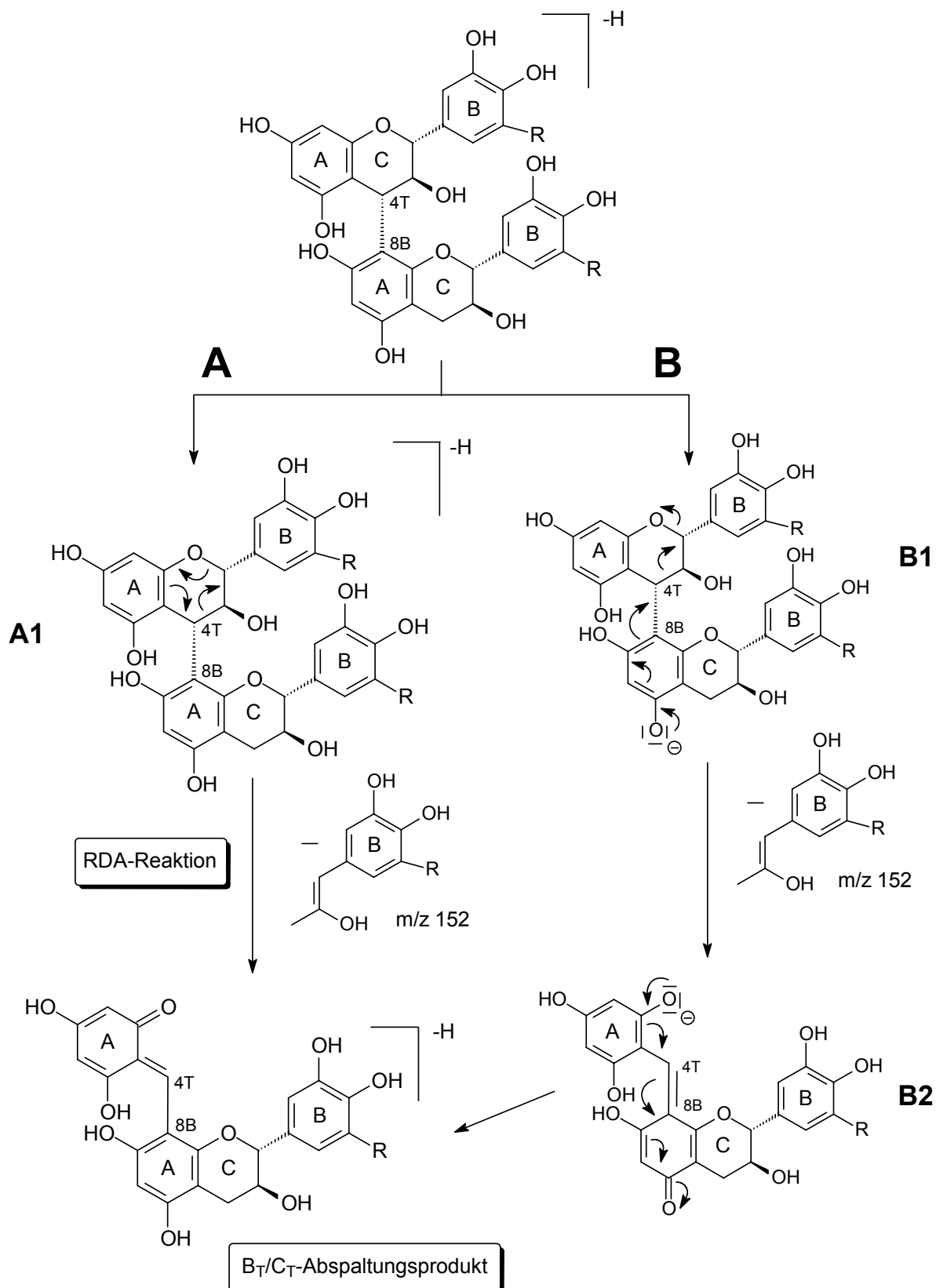


Abbildung 39: Mögliche Fragmentierungsreaktionen dimerer Proanthocyanidine zur Abspaltung des B-Ringes und Teilen des C-Ringes der oberen Monomeren-Einheit M_T (ESI, negative-Mode) ($R = H$ oder OH)

Das im MS-Chromatogramm gefundene Signal bei $R_t = 21,08$ min war einem Molekölion mit der Sequenz GC-C zuzuordnen. Dieses Dimer könnte aus einem Interflavonoid-Bindungsbruch eines höhermolekularen Proanthocyanidins (Tri- oder Tetramer) resultieren oder das Dimer ist aus den Diastereomeren (-)-Epicatechin und (-)-Epigallocatechin aufgebaut. Für die Existenz einer solchen Verbindung fanden sich in der Literatur aber keine Hinweise.

Tabelle 17: Ergebnisse der MS³-Experimente von Prodelphinidin B3 und dem Prodelphinidin Dimer C-GC (Auflistung der Product-Ionen in absteigender Intensitätsreihenfolge)

Precursor-Ion [m/z]	Product-Ion [M-H] ⁻ [m/z]
Prodelphinidin B3; Sequenz (M_T→M_B): GC-C; R_t: 13,77 min (s. Abbildung 35 b)	
MS²-Experiment:	
[M-H] ⁻ 592,9	424,9/ 467,0/ 407,0/ 289,0/ 302,9/ 575,0/ 440,9
MS³-Experimente:	
[M-H ₂ O-H] ⁻ 575,0	437,1/ 449,0/ 407,3/ 424,9/ 476,0/ 287,0/ 394,9
[M-C ₆ H ₆ O ₃ -H] ⁻ 467,0	289,0/ 314,8/ 287,1/ 449,3/ 245,2/ 205,0/ 177,0/ 423,2
[(B _T /C _T -Produkt)-H] ⁻ 424,9	299,0/ 283,0/ 285,0/ 255,0/ 407,0/ 243,0/ 333,0/ 269,9
[(B _T /C _T -Produkt)-H ₂ O-H] ⁻ 407,0	285,0/ 281,1/ 297,0/ 389,1/ 339,0/ 255,1/ 243,0/ 363,0/ 321,1/ 176,0
[M _T -3H] ⁻ 302,9	177,0/ 259,0/ 125,0/ 285,3/ 219,1/ 191,0
[M _B -H] ⁻ 289,0	245,1/ 205,0/ 178,9/ 203,2
Prodelphinidin Dimer; Sequenz (M_T→M_B): C-GC; R_t: 14,98 min (s. Abbildung 35 b)	
MS²-Experiment:	
[M-H] ⁻ 592,9	423,0/ 440,9/ 467,0/ 305,0/ 575,0/ 424,9/ 407,1/ 287,0
MS³-Experimente:	
[M-H ₂ O-H] ⁻ 575,0	453,0/ 305,0/ 449,1/ 437,1/ 423,0/ 465,1/ 327,2/ 475,9/ 283,0/ 177,0
[M-C ₆ H ₆ O ₃ -H] ⁻ 467,0	304,9/ 289,0/ 448,8/ 423,1/ 260,8/ 245,2/ 179,0/ 205,0
[(B _T /C _T -Produkt)-H] ⁻ 440,9	423,0/ 397,0/ 273,0
[(B _T /C _T -Produkt)-H ₂ O-H] ⁻ 423,0	297,0/ 282,9/ 285,1/ 243,0/ 255,1/ 405,1/ 387,1/ 361,0
[M _B -H] ⁻ 305,0	179,0/ 261,1/ 220,9/ 287,0
[M _T -3H] ⁻ 287,0	243,1

fett: Product-Ionen MS²-Experiment, eingesetzt als Precursor-Ionen MS³-Experimente

Die begründete Annahme, dass die Fragmentierungsreaktion nicht in der unteren Einheit M_B der Dimeren stattfindet und dass sie bei den monomeren Flavonoiden gar nicht zu beobachten war, deutet auf eine Beteiligung der unteren Einheit und somit auf den in Abbildung 39 postulierten Reaktionsweg **B** hin. Eine weitere Bestätigung dieses Fragmentierungsmechanismus wurde durch die Kollisionsexperimente der trimeren Verbindungen (s. Kapitel 5.6.3.3) erhalten.

Neben dieser für die Identifizierung der Monomeren-Sequenz wichtigen Fragmentierungsreaktion wurde bei allen vier detektierten Dimeren Fragmente auch beobachtet, die aus einem möglichen Bruch der Interflavonoid-Bindung stammen könnten. In der Literatur besteht aber keine einheitliche Meinung über die Struktur dieser Fragmente. Während KARCHESY et al. [288] im FAB-MS-System keine Zuordnung der gefundenen Product-Ionen treffen, zeigen KIEHNE et al. [292] mit TSP (positive-Mode), dass bei der Spaltung der Interflavonoid-Bindung einfach positiv geladene Product-Ionen $[M_{T/B}+H]^+$ sowohl der oberen als auch der unteren Monomeren-Einheit entstehen.

Die hier durchgeführten Untersuchungen der dimeren Flavonoide führten zu den Product-Ionen $[M_T-3H]^-$ und $[M_B-H]^-$, wahrscheinlich aus einer direkten Spaltung des jeweiligen Precursor-Ions in 4→8-Richtung. Ein möglicher Mechanismus, ausgehend von einer Deprotonierung der Hydroxylgruppe an C-5 der oberen Monomeren-Einheit M_T , ist in Abbildung 40 als **C'** gekennzeichnet. Die resultierenden Product-Ionen wiesen allerdings nur eine geringe Intensität auf, können aber als Hinweis auf die angenommene Monomeren-Abfolge gewertet werden.

Neben der direkten Spaltung des Precursor-Ions kann die Bildung der Fragmente $[M_T-3H]^-$ - abgesehen von dem Dimer GC-GC - alternativ auch als Folgefragment des unspezifischen Product-Ions $[M-C_6H_6O_3-H]^-$ gedeutet werden. Das Product-Ion $[M-C_6H_6O_3-H]^-$ entsteht durch die Abspaltung eines Phloroglucin-Fragmentes der Masse 126, welche nur aus der oberen Monomeren-Einheit M_T ohne Interflavonoid-Bindungsbruch erfolgen kann. In Abbildung 40 (Weg **A'**) ist der hierfür von FRIEDRICH [183] postulierte Mechanismus dargestellt.

FRIEDRICH [183] postuliert keine definierte Position der Ladung im Molekül, sondern geht von einer Übertragung eines Protons und somit einer - im negativen Mode eher unwahrscheinlichen - Ladungstrennung aus (**A1'**). Daraus werden nach der Phloroglucin-Abspaltung zwei im Gleichgewicht stehende Product-Ionen (**A2'** und das Abspaltungs-Produkt) erhalten. Eine andere mögliche mechanistische Erklärung ist in Abbildung 40 (Weg **B'**) aufgezeigt. Die Deprotonierung findet hier wieder an der Hydroxylgruppe an C-5 der unteren Monomeren-Einheit M_B statt (**B1'**). Über eine instabile chinoide Zwischenstufe (**B2'**) erfolgt im nächsten Schritt die Abspaltung des Phloroglucins und das Product-Ion, welches allerdings ein freies nicht-bindendes Elektronenpaar aufweist, wird erhalten. Durch die Übertragung eines Protons innerhalb des Moleküls entstehen die Abspaltungs-Produkte analog zu FRIEDRICHS [183] Mechanismus. Da die Untersuchung aber im negativen Mode durchgeführt wurde, ist eine solche Reaktion eher unwahrscheinlich.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Sequenzermittlung der Dimeren primär über die charakteristische ermittelte Masse (m/z) des Product-Ions $[(B_T/C_T\text{-Abspaltungs-Produkt})-H]^-$, über die m/z -Daten der Fragmente der direkten Interflavonoid-Bindungsspaltung ($[M_T-3H]^-$ und $[M_B-H]^-$), sowie über die auf die Phloroglucin-Abspaltung folgenden Product-Ionen $[M-C_6H_6O_3-H]^-$ ermöglicht wird.

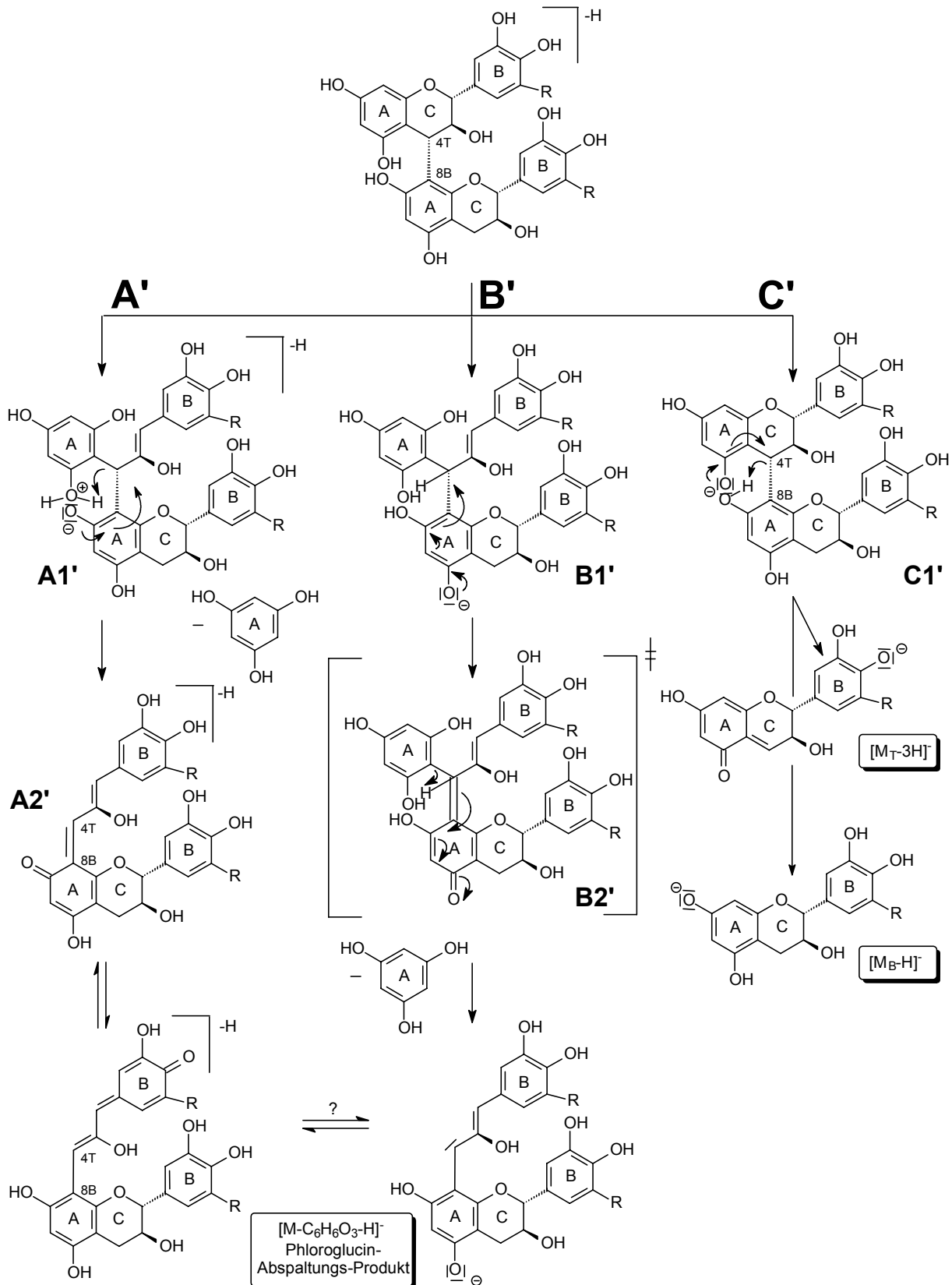


Abbildung 40: Phloroglucin-Abspaltung (A-Ring) der oberen Monomeren-Einheit M_T (Weg **A'** und **B'**) [183] und Interflavonoid-Spaltung dimerer Proanthocyanidine (Weg **C'**) (ESI, negative-Mode; R = H oder OH)

5.6.3.3 Trimere Flavonoide

Eine ausführliche Übersicht über die zur Sequenzermittlung der trimeren Verbindungen durchgeführten Kollisionsexperimente und die hierbei ermittelten Product-Ionen ist im Anhang A.12, Tabelle A. 14 bis A.18 dargestellt. In Tabelle 18 sind die aus den MS²- und MS³-Experimenten erhaltenen Product-Ionen der beiden Precursor-Ionen mit m/z 864,5 und m/z 912,9, den ausschließlich aus identischen Monomeren aufgebauten Trimeren, aufgelistet. In Tabelle 19 sind die Fragmente der im MS-Chromatogramm m/z 880,5 - 881,5 erhaltenen beiden größten Peaks (R_t = 17,86 und 19,42 min), und in Tabelle 20 die Fragmente des Signals bei R_t = 11,76 min des Precursor-Ions mit m/z 897,0 zusammengestellt. Mit den fett markierten Product-Ionen der MS²-Experimente wurden MS³-Fragmentierungsexperimente durchgeführt.

Tabelle 18: Ergebnisse der MS³-Experimente von Procyanidin C2 und dem Prodelphinidin Trimer GC-GC-GC (Auflistung der Product-Ionen in absteigender Intensitätsreihenfolge)

Precursor-Ion [m/z]	Product-Ion [M-H] ⁻ [m/z]
Procyanidin C2; Sequenz (M_T→M_M→M_B): C-C-C; R_t: 32,04 min (s. Abbildung 36 a)	
MS²-Experiment:	
[M-H] ⁻ 864,9	694,9/ 738,9/ 576,9/ 712,8/ 846,9/ 574,8/ 586,9/ 424,9/ 407,0/ 298,8/ 286,9/ 781,0/ 677,0/ 618,9/ 542,9/ 532,8/ 767,1
MS³-Experimente:	
[M-H ₂ O-H] ⁻ 846,9	695,0/ 677,3/ 559,1/ 557,0/ 598,6/ 407,0/ 787,1/ 764,6/ 726,9/ 289,2
[M-C ₆ H ₆ O ₃ -H] ⁻ 738,9	451,1/ 568,9/ 587,0/ 289,2/ 628,4/ 657,0
[(B _T /C _T -Produkt)-H] ⁻ 712,8	694,9/ 614,7/ 561,0/ 406,9/ 289,0/ 653,0/ 424,9/ 668,9
[(B _T /C _T -Produkt)-H ₂ O-H] ⁻ 694,9	542,9/ 451,0/ 677,0/ 404,8/ 289,2/ 525,0/ 499,1/ 461,3/ 613,0/ 363,0/ 391,1
[(B _M /C _M -Produkt)-C ₆ H ₆ O ₃ -H] ⁻ 586,9	n. b.
[M _M -M _B -H] ⁻ 576,9	424,9/ 407,1/ 451,0/ 289,0/ 559,1
[M _T -M _M -3H] ⁻ 574,8	448,9/ 422,9/ 287,0/ 405,1/ 556,9/ 514,8/ 269,1/ 243,1/ 389,1/ 289,1/ 430,8
[(B _T /C _T und B _M /C _M -Produkt)-H ₂ O-H] ⁻ 542,9	525,0/ 391,1/ 285,2
[(B _M /C _M -Produkt)-C ₆ H ₆ O ₃ -3H ₂ O-H] ⁻ 532,8	407,0/ 245,1/ 375,1
[(B _M /C _M -Produkt)-(M _T -H)-H] ⁻ 424,9	407,0
[(B _M /C _M -Produkt)-(M _T -H)-H ₂ O-H] ⁻ 407,0	siehe Dimer C-C (s. Tabelle 16)
[M _T -3H] ⁻ ; [M _M -3H] ⁻ 286,9	siehe Dimer C-C (s. Tabelle 16)

Fortsetzung von Tabelle 18:

Prodelphinidin Trimer; Sequenz ($M_T \rightarrow M_M \rightarrow M_B$): GC-GC-GC; R_t: 7,69 min (s. Abbildung 36 d)		
MS²-Experiment:		
[M-H]⁻	912,9	726,9/ 786,9/ 895,0/ 744,9/ 608,9/ 558,9/ 482,9/ 440,9/ 423,0/ 618,9/ 606,9/ 540,9/ 302,9/ 814,9/ 391,0
MS³-Experimente:		
[M-H₂O-H]⁻	895,0	726,9/ 877,1/ 835,1/ 465,0/ 314,9/ 410,3/ 423,1/ 663,1
[M-C₆H₆O₃-H]⁻	786,9	646,8/ 625,0/ 383,0/ 442,8/ 704,8/ 727,1/ 741,7/ 748,7/ 305,0
[(B_T/C_T-Produkt)-H]⁻	744,9	727,0/ 662,3/ 685,1/ 644,0/ 477,0/ 465,2
[(B_T/C_T-Produkt)-H₂O-H]⁻	726,9	558,9/ 483,1/ 645,1/ 708,9/ 543,1/ 666,7
[(B_M/C_M-Produkt)-C₆H₆O₃-H]⁻	618,9	n. b.
[M_M-M_B-H]⁻	608,9	siehe Dimer GC-GC (s. Tabelle 16)
[M_T-M_M-3H]⁻	606,9	546,9/ 524,7/ 571,1/ 357,6/ 303,0/ 589,1/ 509,1/ 466,4/ 427,4/ 197,2/ 217,1
[(B_T/C_T und B_M/C_M-Produkt)-H₂O-H]⁻	558,9	459,1/ 527,0/ 374,8/ 497,6/ 477,6/ 305,0/ 386,8/ 525,1/ 516,6/ 415,1/ 392,8
[(B_T/C_T und B_M/C_M-Produkt)-2H₂O-H]⁻	540,9	496,8/ 458,9/ 523,1/ 414,9/ 504,9
[M-C₆H₆O₃-(M_T-H)-H]⁻	482,9	465,0/ 305,1/ 357,1/ 422,9
[(B_M/C_M-Produkt)-(M_T-H)-H]⁻	440,9	423,0/ 405,1/ 297,2/ 243,0/ 283,1
[(B_M/C_M-Produkt)-(M_T-H)-H₂O-H]⁻	423,0	405,1/ 283,1/ 243,0/ 297,2
[M_T-3H]⁻; [M_M-3H]⁻	302,9	siehe Dimer GC-GC (s. Tabelle 16)

fett: Product-Ionen MS²-Experiment, eingesetzt als Precursor-Ionen MS³-Experimente

Bei allen nachgewiesenen Precursor-Ionen wurde sowohl eine Wasserabspaltung als auch die unspezifische Abspaltung von Phloroglucin (s. Abbildung 40) beobachtet. Das erste für die Sequenzermittlung relevante Product-Ion, analog der dimeren Verbindungen, ist die in Abbildung 39 beschriebene Abspaltung des B-Ringes zusammen mit Teilen des C-Ringes der oberen Monomeren-Einheit M_T zu den Product-Ionen [(B_T/C_T-Produkt)-H]⁻ bzw. nach Wassereliminierung zu [(B_T/C_T-Produkt)-H₂O-H]⁻. Bei den Trimeren mit m/z 864,5 (C-C-C) und m/z 912,9 (GC-GC-GC) konnte bei den erhaltenen Fragmenten allerdings nicht unterschieden werden, ob die Abspaltung auch aus der mittleren Monomeren-Einheit M_M erfolgt ist. Die Masse der erhaltenen Fragmente wäre dann identisch. Unter der Annahme, dass die Abspaltung in der oberen Einheit erfolgt, konnte bei den Signalen mit m/z 881,0 und m/z 897,0 schon eine erste Zuordnung erfolgen. So deutet das [(B_T/C_T-Produkt)-H]⁻ mit m/z 712,8 des Precursor-Ions m/z 881,0 bei $R_t = 17,86$ min auf ein Gallocatechin als obere Monomeren-Einheit hin. Damit wäre die Sequenz ($M_T \rightarrow M_M \rightarrow M_B$) für dieses Precursor-Ion auf GC-C-C festgelegt. Bei dem zweiten Peak mit $R_t = 19,42$ min liegt dann ein Catechin in der M_T -Einheit vor, als Sequenz wäre noch C-GC-C oder C-C-GC möglich. Mit der gleichen Be-

gründung wird dem Trimer mit m/z 897,0 als oberes Monomer ein Gallo catechin zugeordnet, es wäre dann noch über die Abfolge GC-GC-C oder GC-C-GC zu entscheiden.

Ein bei den Dimeren nicht zu beobachtendes Product-Ion $[(B_M/C_M\text{-Produkt})\text{-}C_6H_6O_3\text{-}H]^-$ entsteht durch die Abspaltung des B-Ringes und Teilen des C-Ringes der mittleren Monomeren-Einheit M_M zusammen mit Phloroglucin der oberen Einheit M_T . Diese Product-Ionen belegen die oben gemachte Annahme der Zuordnung GC-C-C für m/z 881,0 bei $R_t = 17,86$ min. Des weiteren handelt es sich bei dem zweiten Peak mit m/z 881,0 bei $R_t = 19,42$ min um ein Ion der Sequenz C-GC-C, sowie bei dem Peak mit m/z 897,0 bei $R_t = 11,76$ min um GC-GC-C.

Tabelle 19: Ergebnisse der MS^3 -Experimente von Prodelphinidin Trimer 1a und 1b (Auflistung der Product-Ionen in absteigender Intensitätsreihenfolge)

Precursor-Ion [m/z]	Product-Ion [M-H] ⁻ [m/z]
Prodelphinidin Trimer 1a; Sequenz ($M_T \rightarrow M_M \rightarrow M_B$): GC-C-C; R_t: 17,86 min (s. Abbildung 36 b)	
MS^2-Experiment:	
[M-H] ⁻ 881,0	694,9/ 576,9/ 754,9/ 542,9/ 590,9/ 407,0/ 862,8/ 424,9/ 405,9/ 602,9/ 712,8/ 728,8/ 465,8/ 363,0/ 289,0/ 303,0/ 286,9
MS^3-Experimente:	
[M-H ₂ O-H] ⁻ 862,8	783,3/ 773,1/ 753,2/ 710,7/ 558,8/ 516,6/ 694,7/ 273,1
[M-C ₆ H ₆ O ₃ -H] ⁻ 754,9	576,9/ 736,9/ 464,9/ 602,8/ 423,0/ 286,8/ 284,5/ 711,4
[(B _M /C _M -Produkt)-H] ⁻ , gering 728,8	711,0
[(B _T /C _T -Produkt)-H] ⁻ 712,8	694,9/ 651,1/ 652,7/ 561,0/ 318,7/ 380,9/ 408,9/ 517,2
[(B _T /C _T -Produkt)-H ₂ O-H] ⁻ 694,9	542,9/ 451,1/ 677,0/ 390,9/ 289,1/ 243,0/ 525,0/ 363,1/ 404,8/ 659,0
[(B _M /C _M -Produkt)-C ₆ H ₆ O ₃ -H] ⁻ 602,9	n. b.
[M _T -M _M -3H] ⁻ 590,9	529,0/ 464,9/ 422,9/ 412,9/ 547,8/ 302,9/ 325,0
[M _M -M _B -H] ⁻ 576,9	siehe Dimer C-C (s. Tabelle 16)
[(B _T /C _T und B _M /C _M -Produkt)-H ₂ O-H] ⁻ 542,9	siehe Trimer C-C-C (s. Tabelle 18)
[M-(M _B -H)-C ₆ H ₆ O ₃ -H] ⁻ 465,8	siehe Dimer GC-C (s. Tabelle 17)
[(B _M /C _M -Produkt)-(M _T -H)-H] ⁻ 424,9	407,0
[(B _M /C _M -Produkt)-(M _T -H)-H ₂ O-H] ⁻ 407,0	siehe Dimer C-C (s. Tabelle 16)
[(B _T /C _T -Produkt)-(M _B -H)-H ₂ O-H] ⁻ 405,9	n. b.
[M _T -3H] ⁻ 303,0	siehe Dimer GC-GC (s. Tabelle 16)
[M _B -H] ⁻ 289,0	siehe Monomer C (s. Tabelle 13)
[M _M -3H] ⁻ 286,9	siehe Dimer C-C (s. Tabelle 16)

Fortsetzung von Tabelle 19:

Prodelphinidin Trimer 1b; Sequenz ($M_T \rightarrow M_M \rightarrow M_B$): C-GC-C; R_t: 19,42 min (s. Abbildung 36 b)		
MS²-Experiment:		
[M-H]⁻	881,0	710,9/ 754,9/ 592,9/ 591,5/ 542,9/ 586,9/ 694,9/ 424,9/ 407,0/ 728,8/ 525,0/ 561,1/ 466,9/ 862,9/ 289,0/ 286,9/ 302,8/ 394,9
MS³-Experimente:		
[M-H₂O-H]⁻	862,9	694,7/ 407,2/ 395,1/ 725,0/ 574,8/ 542,8/ 524,9/ 535,2/ 814,7/ 764,7/ 676,7
[M-C₆H₆O₃-H]⁻	754,9	586,8/ 593,3/ 736,9/ 569,0/ 289,0/ 407,1/ 425,0/ 302,9/ 694,3/ 477,1/ 466,9/ 464,8
[(B_T/C_T-Produkt)-H]⁻	728,8	710,9/ 668,7/ 542,9/ 646,9/ 585,5/ 289,0/ 560,8/ 464,4
[(B_T/C_T-Produkt)-H₂O-H]⁻	710,9	692,7/ 542,8/ 525,0/ 467,2/ 289,0/ 667,1/ 585,0
[(B_M/C_M-Produkt)-H₂O-H]⁻, gering	694,9	543,0/ 568,9/ 677,1
[M_M-M_B-H]⁻	592,9	siehe Dimer GC-C (s. Tabelle 17)
[M_T-M_M-3H]⁻	591,5	529,0/ 464,9/ 422,9/ 412,9/ 548,2/ 394,9
[(B_M/C_M-Produkt)-C₆H₆O₃-H]⁻	586,9	n. b.
[(B_T/C_T und B_M/C_M-Produkt)-H]⁻	561,1	542,6/ 517,9/ 246,4/ 271,0/ 525,0/ 408,9/ 457,1/ 390,9/ 506,9/ 402,7/ 405,1/ 280,7/ 481,9
[(B_T/C_T und B_M/C_M-Produkt)-H₂O-H]⁻	542,9	siehe Trimer C-C-C (s. Tabelle 18)
[(B_T/C_T und B_M/C_M-Produkt)-2H₂O-H]⁻	525,0	siehe Trimer C-C-C (s. Tabelle 18)
[M-(M_B-H)-C₆H₆O₃-H]⁻	466,9	siehe Dimer C-GC (s. Tabelle 17)
[(B_M/C_M-Produkt)-(M_T-H)-H]⁻	424,9	407,0
[(B_M/C_M-Produkt)-(M_T-H)-H₂O-H]⁻	407,0	siehe Dimer C-C (s. Tabelle 16)
[M_M-3H]⁻	302,8	siehe Dimer GC-GC (s. Tabelle 16)
[M_B-H]⁻	289,0	siehe Monomer C (s. Tabelle 13)
[M_T-3H]⁻	286,9	siehe Dimer C-C (s. Tabelle 16)

fett: Product-Ionen MS²-Experiment, eingesetzt als Precursor-Ionen MS³-Experimente

Um die getroffene Zuordnung zu verifizieren, wurden im folgenden die allerdings nur in geringer Intensität detektierten Fragmente des Bruches der verschiedenen Interflavonoid-Bindungen herangezogen. Abgesehen von den Fragmenten [M_B-H]⁻, die bei den Kollisionsexperimenten mit den Precursor-Ionen mit m/z 864,9 und m/z 912,9 erst nach Phloroglucin-Abspaltung erhalten wurden, erfolgten alle Spaltungen wie bei den Dimeren direkt aus den unfragmentierten Ionen und, wie in Abbildung 40 dargestellt, in 4→8-Richtung. Damit konnte die getroffene Zuordnung bestätigt werden.

Tabelle 20: Ergebnisse der MS³-Experimente von Prodelphinidin C2 (Auflistung der Product-Ionen in absteigender Intensitätsreihenfolge)

Precursor-Ion [m/z]	Product-Ion [M-H] ⁻ [m/z]
Prodelphinidin C2; Sequenz (M_T→M_M→M_B): GC-GC-C; R_t: 11,76 min (s. Abbildung 36 c)	
MS²-Experiment:	
[M-H] ⁻ 897,0	710,9/ 543,0/ 592,9/ 770,9/ 728,9/ 407,1/ 424,9/ 467,0/ 878,9/ 835,1/ 391,0/ 289,0/ 302,9/ 602,9/ 853,1/ 633,0/ 606,9
MS³-Experimente:	
[M-H ₂ O-H] ⁻ 878,9	861,1/ 541,0/ 410,7/ 407,3/ 693,2/ 711,1/ 288,8/ 589,1/ 718,4/ 284,8
[M-C ₆ H ₆ O ₃ -H] ⁻ 770,9	n. b.
[(B _T /C _T -Produkt)-H] ⁻ 728,9	710,9/ 542,9/ 407,0/ 646,8/ 561,8/ 424,8/ 390,9/ 288,9/ 315,0/ 524,9/ 585,1/ 602,4/ 281,1/ 667,4/ 466,8
[(B _T /C _T -Produkt)-H ₂ O-H] ⁻ 710,9	542,9/ 525,0/ 288,8/ 407,2/ 420,8/ 693,1/ 667,1/ 558,7/ 467,1/ 243,0/ 484,6/ 315,0/ 302,5
[M _T -M _M -3H] ⁻ 606,9	481,1/ 428,9/ 420,5/ 302,8/ 297,1/ 362,8/ 378,9/ 578,1
[(B _M /C _M -Produkt)-C ₆ H ₆ O ₃ -H] ⁻ 602,9	n. b.
[M _M -M _B -H] ⁻ 592,9	siehe Dimer GC-C (s. Tabelle 17)
[(B _T /C _T und B _M /C _M -Produkt)-H ₂ O-H] ⁻ 543,0	525,0/ 391,2/ 461,0/ 305,1/ 289,1/ 456,8/ 315,0
[M-C ₆ H ₆ O ₃ -(M _T -H)-H] ⁻ 467,0	siehe Dimer GC-C (s. Tabelle 17)
[(B _M /C _M -Produkt)-(M _T -H)-H] ⁻ 424,9	siehe Dimer GC-C (s. Tabelle 17)
[(B _M /C _M -Produkt)-(M _T -H)-H ₂ O-H] ⁻ 407,1	siehe Dimer GC-C (s. Tabelle 17)
[M _T -3H] ⁻ ; [M _M -3H] ⁻ 302,9	siehe Dimer GC-GC (s. Tabelle 16)
[M _B -H] ⁻ 289,0	siehe Monomer C (s. Tabelle 13)

fett: Product-Ionen MS²-Experiment, eingesetzt als Precursor-Ionen MS³-Experimente

Neben diesen Product-Ionen konnten für alle Precursor-Ionen auch weitere relevante Fragmente detektiert und strukturell zugeordnet werden, die aus einer Abspaltung des B-Ringes und Teilen des C-Ringes der mittleren Monomeren-Einheit oder der mittleren und oberen Einheiten zusammen mit anderen Molekülresten wie z. B. [(B_M/C_M-Produkt)-(M_T-H)-H]⁻ resultieren. Eine B_B/C_B-Abspaltung in der unteren Einheit konnte nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden. Die bei den MS³-Experimenten erhaltenen Fragment-Massen stimmen aber mit denen der Dimeren überein und das Product-Ionen-Muster der Precursor-Ionen untereinander ist ähnlich, so dass diese Fragmentierung nicht wahrscheinlich ist. Dies belegt noch einmal den unter Kapitel 5.6.3.2 beschriebenen und in Abbildung 39 dargestellten Fragmentierungsweg **B**, der eine Interflavonoid-Bindung (4→8) für die Spaltung voraussetzt.

Im MS-Chromatogramm mit m/z 880,5 - 881,5 (s. Kapitel 5.6.2, Abbildung 36b) wurden, abgesehen von den bereits diskutierten Signalen, zusätzliche Peaks geringer Intensität bei $R_t = 24,13$ min und 29,05 min beobachtet. Basierend auf der oben beschriebenen Vorgehensweise der Identifizierung relevanter Product-Ionen zur Sequenzermittlung des Moleküls wiesen die bei Kollisionsexperimenten mit diesen Verbindungen erhaltenen Fragmente auf die Monomeren-Abfolge GC-C-C hin. Ob es sich hierbei um Bruchstücke höhermolekularer Verbindungen handelte oder um ein aus den Monomeren (-)-Epicatechin bzw. (-)-Epigallocatechin aufgebautes Trimer, konnte nicht entschieden werden. Das gleiche trifft auf den Peak im MS-Chromatogramm mit m/z 896,5 - 897,5 (s. Kapitel 5.6.2, Abbildung 36c) bei einer Retentionszeit von 20,89 min zu. Das Precursor-Ion zerfiel nach dem für eine Monomeren-Abfolge GC-GC-C typischen Fragmentierungsmuster (s. Tabelle 20).

5.6.3.4 Tetramere Flavonoide

Zur Identifizierung der tetrameren Proanthocyanidine waren im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nur MS^2 -Experimente der Signale mit der größten Intensität (s. Kapitel 5.6.2, Abbildung 37) möglich. Es konnten daher für die aus unterschiedlichen Monomeren-Einheiten aufgebauten Verbindungen (m/z 1169,3, m/z 1185,4 und m/z 1201,1) nur erste vorläufige Struktur-Zuordnungen getroffen werden. In Tabelle 21 wird eine Übersicht über einige ausgewählte Product-Ionen der tetrameren Proanthocyanidine gegeben.

Die Tetrameren C-C-C-C (m/z 1153,1) und GC-GC-GC-GC (m/z 1217,0) zeigten das schon für die entsprechenden Trimere beschriebene, typische Fragmentierungsverhalten. Die ausschließlich aus Gallocatechin-Einheiten aufgebaute Verbindung liegt, wie auch schon die entsprechende trimere Verbindung, nur in sehr geringer Konzentration in Gerste vor.

Tabelle 21: Ergebnisse der MS^2 -Experimente ausgewählter tetramerer Proanthocyanidine

Product-Ionen [m/z]	Precursor-Ion [M-H] ⁻ [m/z] (s. Abbildung 37)						
	1153,1 R _t : 38,51 min	1169,3 R _t : 23,52 min	1169,3 R _t : 27,90 min	1184,5 R _t : 15,91 min	1184,5 R _t : 18,04 min	1201,3 R _t : 11,28 min	1217,0 R _t : 9,37 min
[M-H ₂ O-H] ⁺	1135,1	1151,2	1151,2	1167,1	1167,1	1183,2	1199,0
[M-C ₆ H ₆ O ₃ -H] ⁻	1027,1	1043,3	1043,2	1059,3	1059,2	1075,1	1091,3
[(B _T /C _T - Produkte)-H] ⁻	1001,1	1001,1/ 1017,3	1001,1/ 1017,2	1017,2	1017,2	1033,2	1049,1
[(B _T /C _T -Pro- dukte)-H ₂ O-H] ⁻	983,3	983,2/ 999,3	983,2/ 999,2	999,3	999,2	1015,3	1031,0
[M _{M1} -M _{M2} -M _B -H] ⁻	865,2	865,2/ 881,3	865,2/ 881,3	881,2	881,2	897,2	913,2
[M _T -M _M -3H] ⁻	573,5	n. d.	n. d.	606,1	606,1	606,3	606,1
[M _T -3H] ⁻	287,3	n. d.	n. d.	303,3	303,3	303,1	303,0
[M _B -H] ⁻	289,1	n. d.	n. d.	305,3	305,0	289,1	305,3

Das für das tetramere Prodelphinidin mit m/z 1201,3 detektierte Product-Ion $[(B_T/C_T\text{-Produkt})\text{-H}_2\text{O}\text{-H}]^+$ deutet auf ein Gallo catechin als obere Monomeren-Einheit M_T hin. Die Fragmente aus dem Interflavonoid-Bindungsbruch zeigten ein Catechin als Basis-Einheit. Da die Intensität der Ionen aus der Spaltung der C-C-Bindungen im Molekül, wie bei den Dimeren bereits beobachtet, sehr gering war und die Gesamtzahl der bei den Kollisionsexperimenten erhaltenen Fragmente sehr groß war, kann die Struktur GC-GC-GC-C nur vermutet werden. Das gleiche gilt für die vier weiteren tetrameren Verbindungen. Die unter Kapitel 5.6.3.3 beschriebenen, für die Sequenzermittlung relevanten Product-Ionen konnten ebenfalls nur in einer sehr geringen Intensität erhalten werden. So kann bei beiden Precursor-Ionen mit m/z 1184,5 eine Abspaltung des B-Ringes und Teilen des C-Ringes der oberen Monomeren-Einheit angenommen werden, die auf Gallo catechin als M_T -Einheit hinweist. Zusätzlich zu den in Tabelle 21 aufgeführten Product-Ionen $[M_B\text{-H}]^+$ mit m/z 305,0 wurden auch Signale mit m/z 289,0 gefunden. Abgesehen von Gallo catechin als oberer Monomeren-Einheit war also keine weitere Strukturzuordnung möglich. Ähnliches galt auch für die Precursor-Ionen mit m/z 1169,3. Neben der Abspaltung des Fragmentes 168 g/mol, welches dem Product-Ion $[(B_T/C_T\text{-Produkt})\text{-H}]^+$, resultierend aus einem Tetramer mit einer Gallo catechin-Einheit als oberes Monomer, entspricht, wurden auch Signale gefunden, die für ein Catechin sprechen. Signale der Product-Ionen der Interflavonoid-Bindungsspaltung konnten in den erhaltenen MS-Spektren nicht detektiert werden.

Zusammenfassend zeigten die Untersuchungen, dass in Gerste neben den beschriebenen monomeren, dimeren und trimeren auch tetramere Verbindungen vorliegen. Eine weitere Bestätigung der Struktur durch MS^3 -Kollisionsexperimente steht noch aus.

5.6.4 Zusammenfassung der LC-MS-Identifizierungsergebnisse: Essigsäure/Acetonitril-Gradienten E2

Ziel der massenspektrometrischen Untersuchungen war die Identifizierung einiger in Gerste enthaltener Flavonoide. In Tabelle 22 ist eine Zusammenstellung der ermittelten UV- und MS-Daten aufgeführt, in Abbildung 41 ist ein Ausschnitt des UV-Chromatogrammes mit einer Zuordnung der identifizierten Verbindungen dargestellt.

Zur Identifizierung wurden Fragmentierungsuntersuchungen mit den vier Monomeren (+)-Catechin, (-)-Epicatechin, (-)-Gallo catechin sowie (-)-Epigallo catechin in Standard-Lösungen durchgeführt. Anhand des hieraus ermittelten Fragmentierungsverhaltens konnten dann ausschließlich (+)-Catechin und (-)-Gallo catechin in Gerste nachgewiesen werden. Weiterhin konnte auch die Existenz eines bisher nur von FRIEDRICH [183] beschriebenen (+)-Catechin-Glucopyranosids bestätigt werden. Die Identifizierung höhermolekularer Flavonoide erfolgte im ersten Schritt über Precursor-Ion-Scan-Experimente (MS-Chromatogramme). Zur Aufklärung der Monomeren-Sequenz der einzelnen Verbindungen wurden nachfolgend MS^3 -Untersuchungen durchgeführt. Die schematische Vorgehensweise zur Identifizierung der di-, tri- und tetrameren Verbindungen ist in Abbildung 42 dargestellt.

Tabelle 22: Zusammenstellung der mit LC-DAD-MS/MS ermittelten Daten

Retentionszeit DAD-Detektion [min]	UV- Maximum [nm]	Precursor- Ion [M-H] ⁻ [m/z]	zugeordnete Verbindung
2,41	228; 285	401,3 / 563,1	n. b.
2,67	223; 272	236,9 / 266,8	n. b.
3,47	237; 267	188,9 / 221,0	n. b.
4,00	232	175,1 / 230,9	n. b.
4,67	220; 275	202,8 / 221,0	n. b.
6,13	223; 283	221,0 / 241,0	n. b.
6,72	224; 307	156,9 / 195,0	n. b.
7,69 (R _t in MS)	223; 285	912,9	Prodelphinidin Trimer 2a (GC-GC-GC)
8,31 (R _t in MS)	223; 270	609,1	Prodelphinidin Dimer (GC-GC)
9,37 (R _t in MS)	230; 285	1217,0	Prodelphinidin Tetramer (GC-GC-GC-GC)
10,92	223; 284	216,9 / 684,7	n. b.
11,28 (R _t in MS)	223; 278	1201,3	Prodelphinidin Tetramer (GC-GG-GC-C) [#]
11,76	223; 276	897,0	Prodelphinidin C2 (GC-GC-C)
12,52	220; 272	304,9 / 610,9	(-)-Gallocatechin
13,77	223; 276	592,9	Prodelphinidin B3 (GC-C)
14,98	219; 276	592,9	Prodelphinidin Dimer (C-GC)
15,91 (R _t in MS)	223; 276	1184,5	Prodelphinidin Tetramer (GC-GC-C-C) [#]
16,57	220; 284	97,3	n. b.
17,86 (R _t in MS)	223; 278	881,0	Prodelphinidin Trimer 1a (GC-C-C)
18,04 (R _t in MS)	220; 276	1184,5	Prodelphinidin Tetramer (GC-GC-C-C) [#]
19,42 (R _t in MS)	223; 278	881,0	Prodelphinidin Trimer 1b (C-GC-C)
20,13 (R _t in MS)	220; 276	451,0	(+)-Catechin-Glucopyranosid
20,89 (R _t in MS)	223; 276	897,0	Bruchstück (GC-GC-C)
21,08 (R _t in MS)	223; 276	592,9	Bruchstück (GC-C)
23,52 (R _t in MS)	224; 277	1169,3	Prodelphinidin Tetramer (GC-C-C-C) [#]
27,45	223; 278	567,9	Procyanidin B3 (C-C)
27,90 (R _t in MS)	223; 278	1169,3	Prodelphinidin Tetramer (GC-C-C-C) [#]
29,05 (R _t in MS)	224; 279	881,0	Bruchstück (GC-C-C)
32,04	219; 279	864,9	Procyanidin C2 (C-C-C)
34,12	219; 278	289,2 / 348,5	(+)-Catechin
35,52 (R _t in MS)	223; 285	1201,3	Prodelphinidin Tetramer (GC-GG-GC-C) [#]
38,51 (R _t in MS)	219; 275	1153,1	Procyanidin Tetramer (C-C-C-C)
38,96 (R _t in MS)	220; 276	1184,5	Prodelphinidin Tetramer (GC-GC-C-C) [#]
46,45 (R _t in MS)	219; 275	1169,3	Prodelphinidin Tetramer (GC-C-C-C) [#]
62,36 (R _t in MS)	219; 275	1169,3	Prodelphinidin Tetramer (GC-C-C-C) [#]
66,48 (R _t in MS)	223; 285	1184,5	Prodelphinidin Tetramer (GC-GC-C-C) [#]

[#] Monomeren-Sequenz nicht geklärt

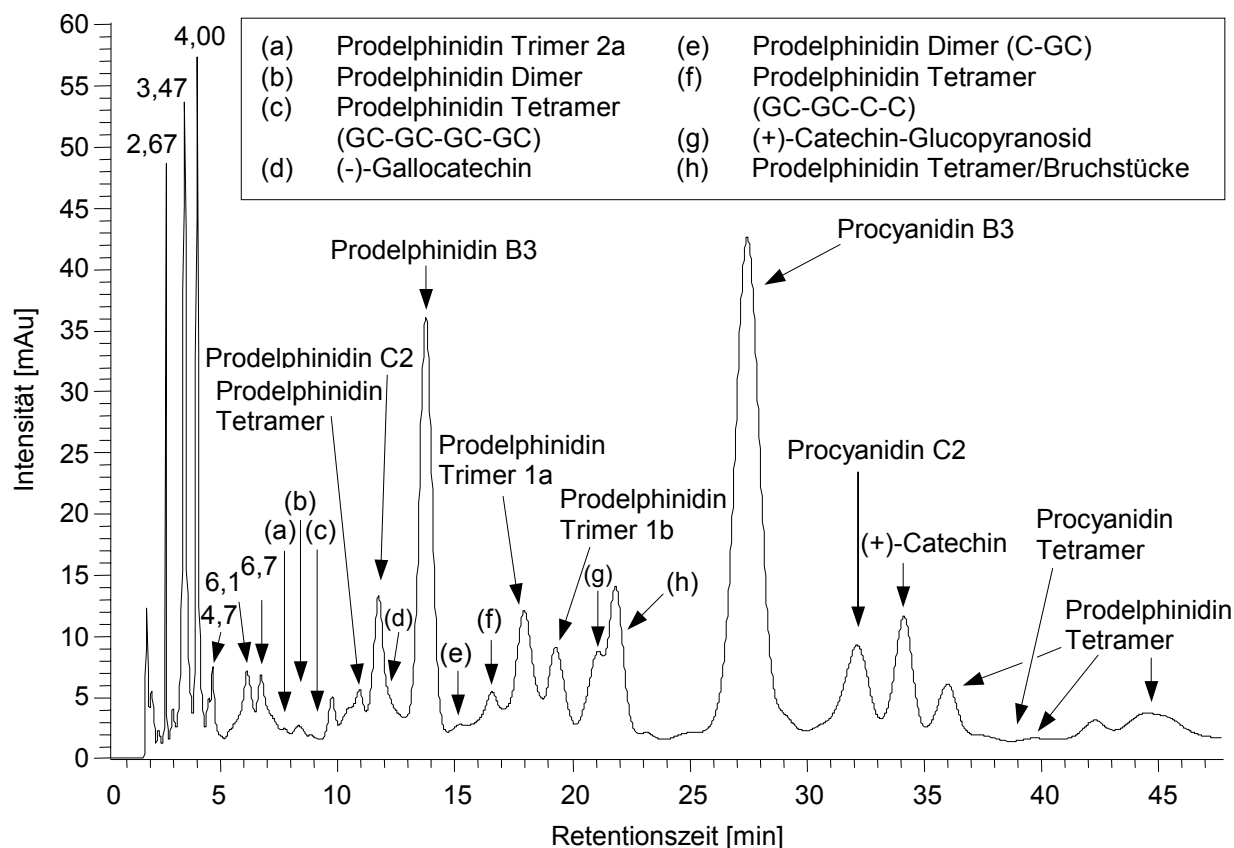


Abbildung 41: Ausschnitt eines DAD-Chromatogrammes ($\lambda = 280 \text{ nm}$) mit Zuordnung der identifizierten Flavonoide, Gradient E2

Neben den bereits literaturbekannten Dimeren Procyanidin B3 (C-C) und Prodelphinidin B3 (GC-C) konnte ein bisher nur von FRIEDRICH [183] in Malz detektiertes, aus zwei Gallocatechin-Einheiten aufgebautes Dimer auch in Gerste nachgewiesen werden. Durch die hierzu erforderliche Aufklärung des für alle Dimeren typischen Fragmentierungsmusters bzw. die Identifizierung relevanter Product-Ionen gelang auch der Nachweis des dimeren Prodelphinidins mit der Sequenz C-GC sowie einer weiteren Spezies $[M-H]^-$ mit der Masse m/z 592,9 noch ungeklärter Struktur.

Im Anschluss erfolgte die Sequenzermittlung der in den MS-Chromatogrammen der trimeren Verbindungen detektierten Peaks. Die ausführlichen MS^3 -Untersuchungen bestätigten die für die Dimeren postulierten Fragmentierungsreaktionen. Durch die Zuordnung weiterer für die Trimeren typischen Product-Ionen konnte erstmals eine systematische Vorgehensweise zur Identifizierung der Monomeren-Abfolge erarbeitet werden. Es zeigte sich, dass zusätzlich zu den bisher in Gerste vermuteten Trimeren Procyanidin C2 (C-C-C), den Prodelphinidin-Trimeren GC-C-C und C-GC-C, sowie dem Prodelphinidin C2 (GC-GC-C) weitere Signale mit derselben Sequenz identifiziert wurden. Hierbei könnte es sich sowohl um Teilfragmente aus höhermolekularen Verbindungen handeln, die aus einem möglichen Bruch der Interflavonoid-Bindungen resultieren, als auch unter Umständen um Spezies, die aus einer Rekombination einzelner Fragmente resultieren.

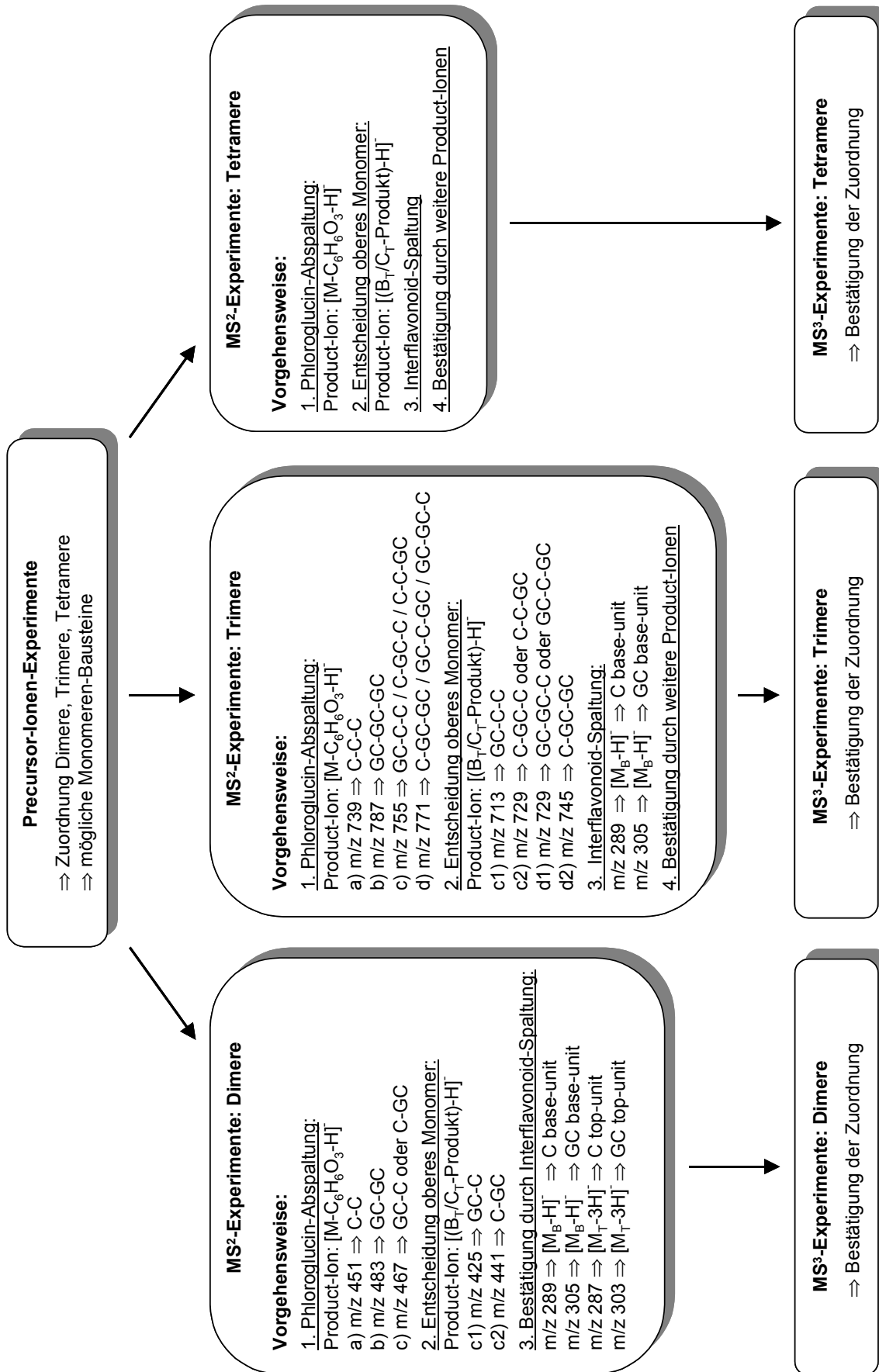


Abbildung 42: Systematische Vorgehensweise zur Identifizierung der di-, tri- und tetrameren Flavonoide in Gerste mit LC-MSⁿ

Die Möglichkeit der Existenz bisher nicht in der Literatur beschriebener Proanthocyanidine, welche aus den Monomeren (-)-Epicatechin bzw. (-)-Epigallocatechin aufgebaut sind, kann aber auch nicht ausgeschlossen werden. Weiterhin wurde ein bisher nur von BRANDON et al. [175] als Gersteninhaltsstoff erwähntes Trimer der Monomerenfolge GC-GC-GC identifiziert, obwohl es nur in sehr geringer Konzentration in Gerste vorliegt.

Eine ebenfalls, unter quantitativen Aspekten gesehen, untergeordnete Rolle stellen die höhermolekularen Flavonoide in Gerste dar. Hier gelang der Nachweis von tetrameren Verbindungen. Die Zuordnung der bei den Kollisionsexperimenten erhaltenen Product-Ionen führten zu ersten Ansätzen der Sequenzermittlung der Tetrameren. Hiermit konnte gezeigt werden, dass das entwickelte Vorgehensschema (s. Abbildung 42) auch für höhermolekulare Verbindungen anwendbar ist.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass das Spektrum der in Gerste enthaltenen Flavonoide sehr vielfältig ist. Die Problematik in der Identifizierung liegt zum einen darin begründet, dass die Verbindungen in Gerste in den nur sehr geringen Konzentrationen vorliegen, zum anderen in der strukturellen Ähnlichkeit der Flavonoide, da sie ausschließlich aus den Monomeren (+)-Catechin und (-)-Gallocatechin aufgebaut sind. Mit den hier durchgeführten Untersuchungen mit einer Ionenfalle als Massendetektor im negativen ESI-Mode gelang erstmals eine umfassende und grundlegende Identifizierung der di- und trimeren wie auch zum Teil höhermolekularen Flavonoide in Gerste basierend auf einer systematischen Vorgehensweise der Zuordnung relevanter Product-Ionen.

5.6.5 Zusammenfassung der LC-MS-Identifizierungsergebnisse: Phosphatpuffer/Acetonitril-Gradienten P2

Eine Identifizierung der einzelnen Flavonoide in Gerste, wie unter Kapitel 5.6.2 bei Einsatz des Gradienten **E2** beschrieben, war bei Verwendung von Phosphatpuffer als mobile Phase nur eingeschränkt durchführbar. Die bei der massenspektrometrischen Detektion erhaltenen Signale der relevanten Precursor-Ionen wiesen nur eine geringe Intensität auf. In Abbildung 43 sind beispielhaft die MS-Chromatogramme m/z 576,5 - 577,5 ($[M-H]^-$, Procyanidin B3) und m/z 880,5 - 881,5 ($[M-H]^-$, Prodelphinidin Trimer 1a und 1b) sowie die entsprechenden Massenspektren der HPLC-Trennung eines Gerstenextraktes mit dem Gradienten **P2** (UV-Chromatogramm s. Abbildung 44) abgebildet.

Die Chromatogramme zeigen im Vergleich zum Einsatz des Essigsäure/Acetonitril-Gradienten **E2** ein wesentlich höheres Grundrauschen. Während mit dem Gradienten **E2** die Bildung von Acetat-Addukten ($[M+Acetat]^-$) zu beobachten war, kam es bei Verwendung des Gradienten **P2** zur Anlagerung von Phosphat. Neben dem einfachen Phosphat-Addukt $[M+Phosphat]^-$ mit m/z 674,6 konnten im MS-Spektrum des Procyanidin B3 (Abbildung 43 1b) auch Phosphat-Cluster der Form $[M+Natriumphosphat]^-$ mit m/z 696,5 $[M+2Natriumphosphat]^-$ mit m/z 816,4, $[M+3Natriumphosphat]^-$ mit m/z 936,3, sowie $[M+4Natriumphosphat]^-$ mit m/z 1056,3 detektiert werden.

Im Gegensatz zum Procyanidin B3 beschränkte sich die Addukt-Bildung bei dem Prodelphinidin Trimer 1a (Abbildung 43 2b) auf das einfache Phosphat-Addukt mit m/z 978,6. Im MS-Spektrum wurde zusätzlich ein Ion mit m/z 576,6 detektiert, welches aus dem schon bei den unter Kapitel 5.6.3 durchgeführten Kollisionsexperimenten beobachteten Bruch der Interflavonoid-Bindung der oberen Monomeren-Einheit M_T resultiert. Bei diesem Product-Ion handelt es sich um das Bruchstück C-C, welches dann erneut der oben beschriebenen Cluster-Bildung mit Phosphat unterlag.

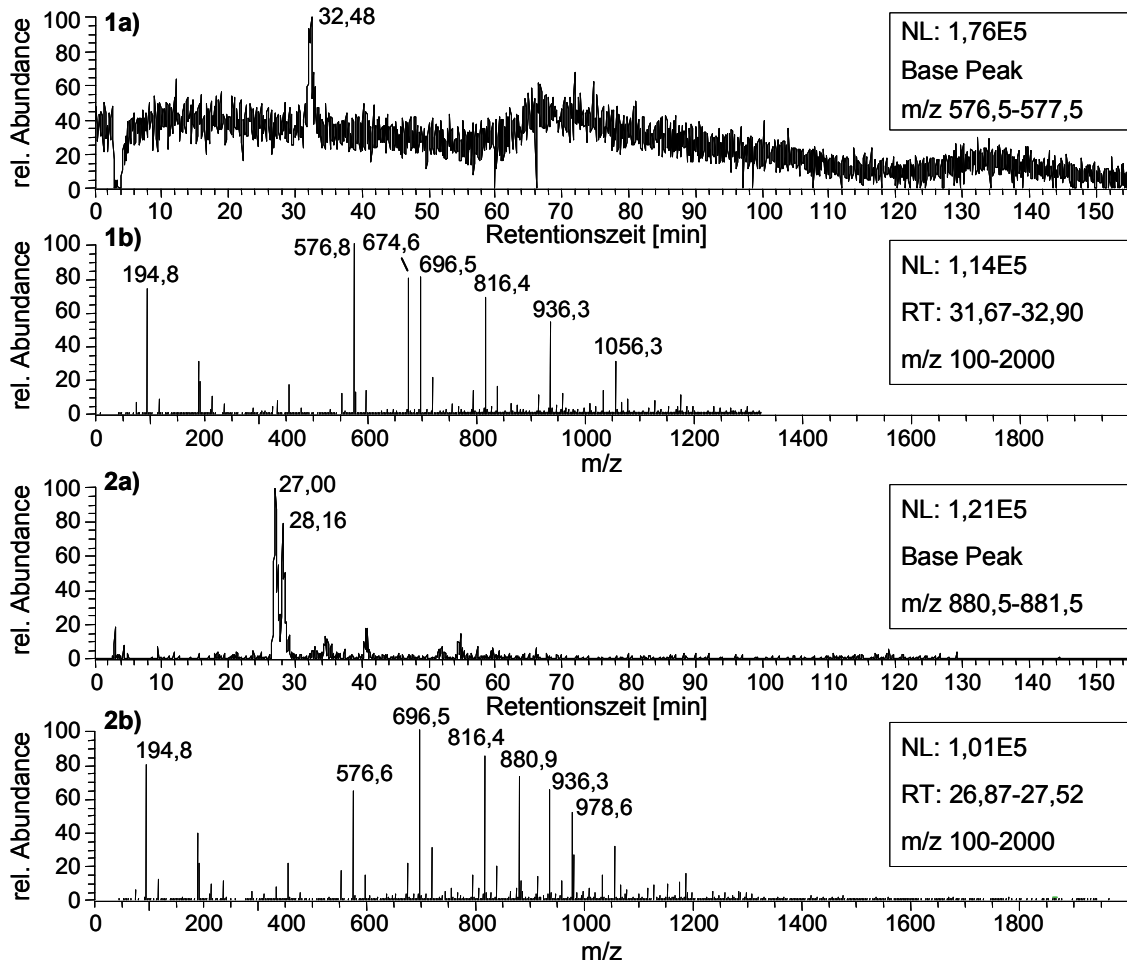


Abbildung 43: Precursor-Ion-Scan-Experimente eines Gerstenextraktes:

1a), 2a) MS-Chromatogramme (m/z 577 und 881)

1b), 2b) zugehörige LC-ESI-Massenspektren (ESI, negative-Mode)

Zur Identifizierung der einzelnen Analyten wurden MS^2 -Experimente durchgeführt. Aufgrund der geringen Signalintensität wurde auf MS^3 -Untersuchungen verzichtet. Das Fragmentierungsverhalten der Precursor-Ionen ist identisch mit dem bereits bei Verwendung des Gradienten **E2** beschriebenen. Aufgrund der geringen Empfindlichkeit unter Einsatz des Phosphatpuffers sowie ihrer geringen Konzentration in Gerste, konnten nur zwei tetramere Flavonoide detektiert werden. In Abbildung 44 ist ein Ausschnitt des DAD-Chromatogrammes mit den identifizierten Analyten dargestellt.

Zusammenfassend beurteilt ist ein Phosphatpuffer-Gradient für den Routine-Einsatz in der Massenspektrometrie nicht geeignet. Aufgrund seiner schlechten Verdampfbarkeit kam es zu Ablagerungen in der Ionenquelle und auch in der Detektionseinheit. Neben einem erhöhten Reinigungsaufwand zog dies ein hohes Grundrauschen nach sich, welches in einer geringen Signalintensität der Precursor-Ionen resultierte. Zusätzlich erschwerte das hohe Maß an Cluster-Bildung die Identifizierung der Analyten, da ein hoch komplexes Spektrum an Product-Ionen im MS-Spektrum entstand. Trotz dieser Schwierigkeiten gelang die Identifizierung der di- und trimeren Flavonoide in Gerste. Damit wurde erstmals die Möglichkeit eröffnet, die Detektion und Quantifizierung der in Gerste enthaltenen Flavonoide mittels DAD und dem aufgrund seiner wie unter Kapitel 5.3.2.1 beschriebenen für die Chromatographie gut geeigneten Phosphatpuffer als mobile Phase durchzuführen.

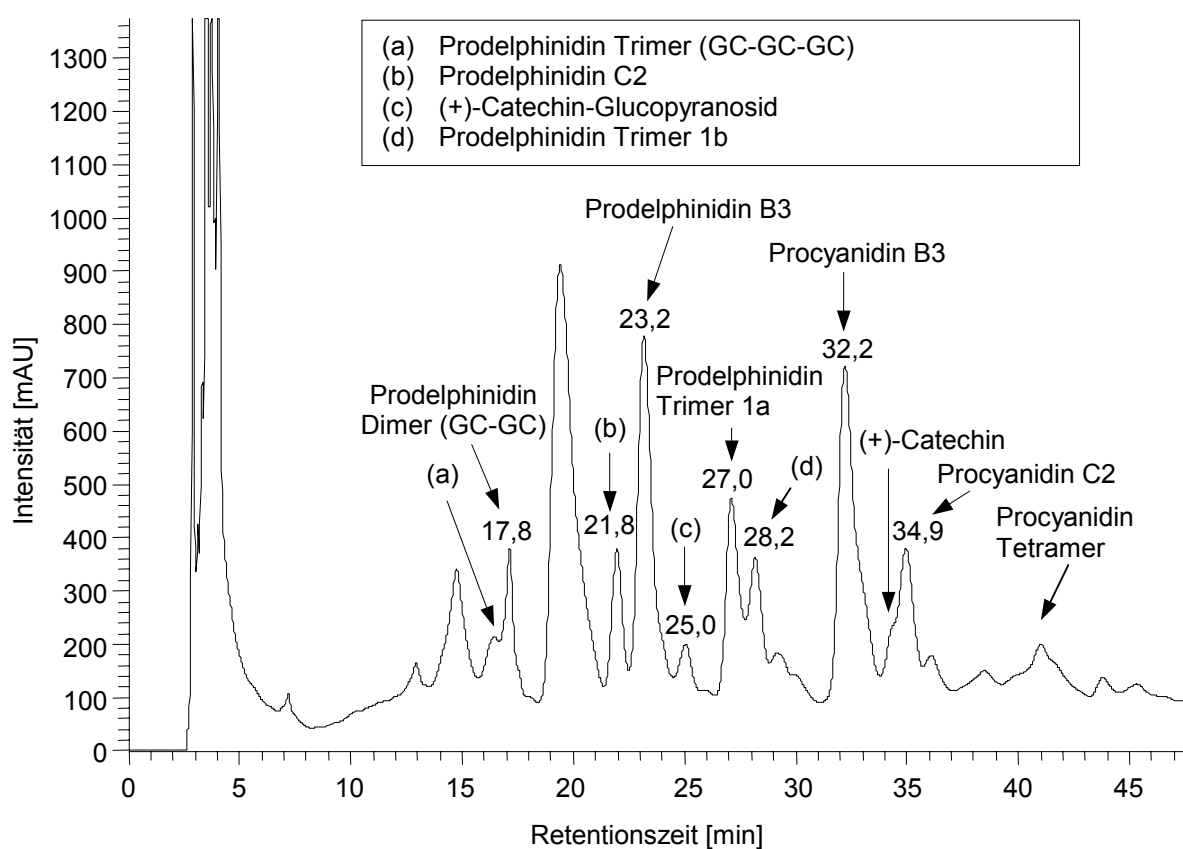


Abbildung 44: Ausschnitt eines DAD-Chromatogrammes ($\lambda = 280 \text{ nm}$) mit Zuordnung der identifizierten Flavonoide, Gradient **P2**

5.7 Bestimmung von Flavonoiden in Realproben

Im ersten Teil der Arbeit wurde ein HPLC-DAD-Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Flavonoiden in Gerste entwickelt und validiert, sowie eine Identifizierung von Proanthocyanidinen mittels LC-DAD-MS/MS erreicht. Dieses DAD-Verfahren sollte dann zur Untersuchung des Flavonoid-Gehaltes in verschiedenen Braugerstensorten eingesetzt werden.

Die in der Braugerste enthaltenen Flavonoide spielen beim Bierbrauprozess eine wichtige Rolle (s. Kapitel 4.2), für den Bierbrauer, aber auch für den Verbraucher ist die Verfolgung des Flavonoid-Gehaltes während des Brauprozesses und die Bestimmung im Endprodukt Bier von großem Interesse. Daher sollte, über die Analyse von Braugersten hinaus, an einer exemplarisch durchgeführten Untersuchung der Flavonoid-Fluss in verschiedenen Brauprozessstufen verfolgt werden.

Hierzu war in einem ersten Schritt die Übertragung der für Gerste entwickelte Methode der Probenvorbereitung (s. Kapitel 5.4, Abbildung 21) auf die verschiedenen Zwischenprodukte des Brauprozesses und des Endproduktes Bier erforderlich. Die analytische Bestimmung sollte mit der LC-DAD-MS/MS-Gerätekombination durchgeführt werden. Dies eröffnete die Möglichkeit einer Online-Identifizierung der einzelnen Substanzen, da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass es bei der analytischen Bestimmung der Brauprozessproben durch Matrixeinflüsse zu Retentionszeit-Verschiebungen der Analyten-Peaks im Vergleich zu den Gerstenextrakt-Chromatogrammen kommt.

5.7.1 Bestimmung von Flavonoiden in Sommergersten mittels HPLC-DAD

Es wurden die Flavonoid-Gehalte in den drei Braugerstensorten „Annabell“, „Henni“ und „Viskosa“ bestimmt. Hierzu wurden die Proben, wie in Kapitel 5.4, Abbildung 21 schematisch dargestellt, aufgearbeitet und mit dem HPLC-DAD-System analysiert. Da abgesehen von den monomeren Flavonoiden keine Referenzsubstanzen kommerziell erhältlich waren, erfolgte die Quantifizierung der Proanthocyanidine indirekt über die für (+)-Catechin ermittelte Kalibriergerade (s. Kapitel 5.5.2.1), wie auch bereits in der Literatur [183] beschrieben. Diese Bestimmung basiert auf der Tatsache, dass sich die Proanthocyanidine nur durch Anzahl und Sequenz der Monomeren-Bausteine (+)-Catechin und (-)-Gallocatechin (s. Kapitel 3.1.2, Abbildung 3) unterscheiden, und somit ihre UV-Spektren sehr ähnlich der Monomeren sind. In Tabelle 23 sind die in den Braugersten bestimmten Flavonoid-Gehalte der jeweiligen Doppelbestimmung aufgeführt.

Die Summe der bestimmten Flavonoid-Gehalte betrug für die Gerstensorte „Annabell“ 441 mg/kg. Die für die beiden weiteren Sorten „Henni“ und „Viskosa“ ermittelten Gehalte lagen mit 607 mg/kg und 729 mg/kg etwas höher. In der Literatur [183, 185, 235] variieren die Angaben der ermittelten Summenwerte sehr stark, was darin begründet liegt, dass von den verschiedenen Autoren jeweils eine unterschiedliche Anzahl Analyten in die Berechnung miteinbezogen wurden. Ein Vergleich der hier für die drei Braugerstensorten gemessenen Werte mit bereits publizierten Daten ist daher nur bezogen auf den jeweiligen Einzel-Analyten sinnvoll (s. Kapitel 4.1, Tabelle 3). So lag die für die Gerste „Annabell“ erhaltene Catechin-Konzentration mit 22,2 mg/kg, für die Gerste „Henni“ mit 42,6 mg/kg und für die Gerste „Viskosa“ mit 16,0 mg/kg in der Größenordnung der in anderen Gerstensorten beschriebenen. Beispielsweise bestimmte BELLMER et al. [184] Catechin-Konzentrationen von

14-64 mg/kg, FRIEDRICH [183] wie auch GOUPY [185] von 25 - 50 mg/kg. Geringere Konzentrationen mit 10-14 mg/kg detektierte MADIGAN et al. [179] 1994 mittels elektrochemischer Detektion.

Neben (+)-Catechin als Monomer, welches nahezu in allen bisher durchgeführten Untersuchungen in Gerste detektiert wurde, wiesen einige Autoren [181, 184, 185] auch (-)-Epicatechin, wenn auch nur in einer sehr geringen Konzentration von < 3 mg/kg [184] nach. In den drei Braugersten konnte die Existenz dieses Monomers allerdings nicht bestätigt werden (s. Kapitel 5.6.2). Darüber hinaus fanden JENDE-STRID [174], WHITTLE et al. [181] und BRANDON et al. [175] Hinweise auf das Vorkommen von (-)-Epigallocatechin und (-)-Gallocatechin. Letztgenanntes konnte ebenfalls in den untersuchten Sorten „Annabell“, „Henni“ und „Viskosa“ gefunden und quantifiziert werden, die Gehalte von 1 - 2 mg/kg waren aber deutlich geringer als die für (+)-Catechin. Ebenfalls konnte die von FRIEDRICH [183] publizierte Untersuchung bestätigt werden, der erstmals ein Catechin-Glucopyranosid in Gerste und Malz isolierte, identifizierte und Gehalte von 6 - 38 mg/kg ermittelte.

Tabelle 23: Flavonoid-Gehalte in verschiedenen Braugerstensorten; HPLC-DAD-Verfahren (n = 2)

Analyt	mg/kg Trockenmasse Gerste		
	„Annabell“	„Henni“	„Viskosa“
(+)-Catechin	22,20	42,67	16,08
(+)-Catechin-Glucopyranosid	21,26	25,72	38,55
(-)-Gallocatechin	1,11	1,54	1,69
Procyanidin B3 (C-C)	66,47	135,25	189,81
Prodelphinidin B3 (GC-C)	116,14	129,26	150,64
Prodelphinidin Dimer (C-GC)	13,43	8,92	18,79
Prodelphinidin Dimer (GC-GC)	3,22	5,70	2,88
Procyanidin C2 (C-C-C)	52,28	89,64	107,23
Prodelphinidin Trimer 1a (GC-C-C)	39,79	43,44	61,73
Prodelphinidin Trimer 1b (C-GC-C)	24,56	37,00	48,68
Prodelphinidin C2 (GC-GC-C)	77,67	81,32	89,46
Prodelphinidin Trimer 2a (GC-GC-GC)	3,05	7,10	4,27
Summe der Analyt-Gehalte	441,27	607,55	729,82

Als dimere Flavonoide wurden in Gerste bisher hauptsächlich Procyanidin B3 (C-C) und Prodelphinidin B3 (GC-C) beschrieben [178-180, 183, 185], wobei mit wenigen Ausnahmen in den meisten Gerstensorten das Prodelphinidin B3 höhere Gehalte aufweist. MADIGAN et al. [179] ermittelte beispielsweise in verschiedenen Gersten Gehalte an Prodelphinidin B3 von 229 - 234 mg/kg und an Procyanidin B3 von 88 - 142 mg/kg. Dieses Verhältnis konnte ausschließlich für die Sorte „Annabell“ mit einem im Vergleich zum Procyanidin B3 40 mg/kg größeren Wert für den Prodelphinidin-Gehalt bestätigt werden.

Neben dem Prodelphinidin B3 wurde im Rahmen dieser Arbeit auch ein Prodelphinidin Dimer mit der Sequenz C-GC bei einer Retentionszeit von 15 min identifiziert (s. Kapitel 5.6.3.2), welches ebenfalls von FRIEDRICH [183] gefunden, aber nicht quantifiziert wurde. Die Gehalte für dieses Dimer lagen in den Gersten mit 8,9 - 18,8 mg/L aber wesentlich niedriger als die des in umgekehrter Sequenz aufgebauten Prodelphinidin B3. Mit Gehalten zwischen 2,8 - 5,7 mg/kg fanden sich in den untersuchten Sorten das Prodelphinidin Dimer GC-GC. Vergleichswerte in der Literatur existieren für diese Verbindung aber ebenfalls nicht. Die nachgewiesenen trimeren Verbindungen liegen tendenziell in geringerer Menge als die dimeren Verbindungen vor. Bei allen drei Gerstensorten stellten die Verbindungen Procyandin C2 (C-C-C) und Prodelphinidin C2 (GC-GC-C) die Hauptvertreter mit Gehalten von 52,2 - 107,2 mg/kg und 77,6 - 89,4 mg/kg dar, was mit Daten aus literaturbekannten Untersuchungen [178, 183, 185] korreliert. Die in Kapitel 5 5.6.2 zusätzlich detektierten Signale in den MS-Chromatogrammen für die trimeren Verbindungen, welche bei Kollisionsexperimenten Molekülonen der Sequenz GC-GC-C (Abbildung 36 c) und GC-C-C (Abbildung 36b) zugeordnet werden konnten (s. Kapitel 5.6.3.3), wurden in allen Gerstensorten in geringen Konzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenze aber oberhalb der Nachweisgrenze des Verfahrens detektiert. Das ausschließlich aus Gallocatechin-Einheiten aufgebaute Prodelphinidin Trimer 2a wurde, entsprechend der Untersuchung von WHITTLE et al. [181], nur in einer sehr geringen Konzentration zwischen 3,0 und 7,1 mg/L detektiert.

Die Einsetzbarkeit des entwickelten und validierten HPLC-DAD-Verfahrens konnte somit gezeigt werden. Bereits in der Literatur veröffentlichte Gehalte einzelner Flavonoide stimmten mit den hier erhaltenen Ergebnissen überein. Darüber hinaus gelang erstmalig die Quantifizierung bisher nicht quantifizierte oder noch nicht beschriebener Verbindungen.

5.7.2 Bestimmung von Flavonoiden in Brauprozessproben mittels LC-DAD-MS/MS

5.7.2.1 Kalibrierung des LC-DAD-MS/MS-Verfahrens

Zur Bestimmung der Flavonoide in Brauprozessproben mit der LC-DAD-MS/MS-Gerätekombination war eine vorherige Kalibrierung erforderlich. Neben der Kalibrierung für die Detektion mit DAD wurde hier auch eine Kalibrierung der MS-Detektion angestrebt, wobei analog zu Kapitel 5.5 vorgegangen wurde.

Wahl des Arbeitsbereiches

Zur Ermittlung des linearen Bereiches für die DAD- sowie die MS-Detektion wurden (+)-Catechin-Standard-Lösungen ($\beta = 0,0625$ mg/L bis 2500 mg/L) in DMF/H₂O (2:1; v/v) hergestellt und jeweils zehnmal chromatographisch vermessen. In Anhang A.13, Tabelle A.19 sind die erhaltenen Mittelwerte sowie die relative Standardabweichung der Peakflächen der DAD- und der MS-Detektion bei den verschiedenen Konzentrationen gegenübergestellt.

Die durch lineare Regression erhaltene Geradengleichung für die **Detektion mittels DAD** lautet: $y = 236550,8 + 26906,5x$ mit dem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9997$. Somit konnte für den untersuchten Konzentrationsbereich von einem linearen Zusammenhang zwischen Detektorsignal und Konzentration ausgegangen werden. Die Nachweisgrenze ergab sich zu 0,125 mg/L, die Bestimmungsgrenze für die DAD-Detektion zu 0,25 mg/L (s. Kapitel 5.5.3.1) [267, 275, 284]. Die geforderte Analysenpräzision von $s_{rel} \leq 3\%$ [272] ist ab einer (+)-Catechin-Konzentration von 0,625 mg/L gegeben. Um eine Vergleichbarkeit der beiden HPLC-DAD-Verfahren (s. Kapitel 5.5.9) bezüglich ihrer Leistungsfähigkeit zu ermöglichen und gleichzeitig den Anforderungen des praxisorientierten Anwendungszieles, d. h. der Quantifizierung der Flavonoide in den Brauprozessproben und in Bier zu genügen, wurde als vorläufige untere Arbeitsbereichsgrenze eine (+)-Catechin-Konzentration von 1,875 mg/L und als obere Arbeitsbereichsgrenze eine Konzentration von 2500 mg/L gewählt.

Für die Quantifizierung **mittels MS-Detektion** wurden die Mittelwerte und rel. Standardabweichungen der Summe der Peakflächen des (+)-Catechin-Precursor-Ions $[M-H]^+$ mit m/z 289,2 und des ebenfalls entstehenden Precursor-Acetat-Addukts $[M+Acetat-H]^+$ mit m/z 348,6 herangezogen (s. Anhang A.13, Tabelle A.19). Bei der Ermittlung des linearen Zusammenhangs zwischen Detektorsignal und (+)-Catechin-Konzentration konnte keine Festlegung auf eine der beiden Precursor-Ionen erfolgen, da die Bildung des Acetat-Adduktes nicht ausreichend reproduzierbar war: So lag das Verhältnis der Peakflächen in den MS-Chromatogrammen m/z 349 und m/z 289 zwischen 0,65 und 0,77. Daher wurde auf eine Quantifizierung über die Summe der Product-Ionen der beiden Precursor-Ionen verzichtet.

Die Überprüfung des linearen Bereiches über die Summe der Precursor-Ionen ergab eine Funktion 2. Grades (polynomisch): $y = 9809561,7 + 1712779,8x - 297,4x^2$ mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9998$. Für die lineare Regression gilt dagegen $R^2 = 0,9871$. Im Vergleich zur DAD-Detektion lag die Nachweisgrenze des MS-Verfahrens deutlich niedriger bei 0,0625 mg/L (+)-Catechin und die Bestimmungsgrenze bei 0,1875 mg/L (+)-Catechin (s. Kapitel 5.5.3.1). Die berechneten relativen Standardabweichungen der Peakflächen entsprachen erst ab $\beta \geq 2,5$ mg/L der geforderten Analysenpräzision von $s_{rel} \leq 3\%$ [272]. Aufgrund dieser im Vergleich zur DAD-Detektion höheren Grenze des unteren Arbeitsbereiches wurde auf eine weitere Kalibrierung der MS-Detektion verzichtet. Der Einsatz der MS-Detektion für die Identifizierung der verschiedenen Flavonoide in den Realproben blieb aber unerlässlich.

Linearität

Zur **Ermittlung der Kalibrierfunktion** für die **Detektion mittels DAD** wurden zehn gleichmäßig über den gewählten Arbeitsbereich verteilte Konzentrationen an (+)-Catechin-Standard-Lösungen in DMF/H₂O jeweils zehnmal mit der LC-DAD-MS/MS-Gerätekombination chromatographisch vermessen (s. Kapitel 5.5.2). Für die in den DAD-Chromatogrammen erhaltenen Flächen der (+)-Catechin-Peaks wurden die jeweiligen Mittelwerte, Standardabweichungen und relativen Standardabweichungen berechnet (s. Anhang A.13, Tabelle A.20) und die einzelnen Messreihen durch Überprüfung mittels des GRUBBS-Testes (s. Anhang A.2) als frei von Ausreißern bestätigt [267, 272].

Zur rechnerischen Prüfung der Linearität wurde der **Anpassungstest nach MANDEL** [273, 279] (s. Anhang A.5) durchgeführt. Anschließend wurde die Homogenität der Varianzen, die Empfindlichkeit und anschließend die Absicherung der unteren Grenze des Arbeitsbereiches überprüft. In Tabelle 24 sind alle ermittelten Kenngrößen dargestellt. Die berechnete Kalibrierfunktion ist linear, der Prüfwert *PW* liegt mit einem Wert von 0,016 weit unterhalb des tabellierten F-Wertes von 12,25 [272]. Eine Homogenität der Varianzen wurde nicht erreicht, ebenso war, wie auch bei dem unter Kapitel 5.5 beschriebenen HPLC-DAD-Verfahren, keine statistische Absicherung der unteren Grenze des Arbeitsbereiches gegeben. Die relative Verfahrensstandardabweichung ist mit 1,09 % aber sehr gering und entspricht den in der Literatur beschriebenen Anforderungen für validierte Analysenverfahren [273]. Das LC-DAD-MS/MS-Verfahren konnte deshalb zur Identifizierung und Quantifizierung der Flavonoide in den Realproben eingesetzt werden.

Tabelle 24: Ergebnisse des Anpassungstests nach MANDEL für die Bestimmung von (+)-Catechin (Kalibrierlösungen $\beta = 1,875$ bis 2500 mg/L) LC-DAD-MS/MS-Gerätekombination, Gradient E2

	Kalibrierfunktion	
	1. Grades $y = a + bx$	2. Grades $y = a + bx + cx^2$
Konstante <i>a</i> [μ AU·min]	341016,14	322566,95
Konstante <i>b</i> [μ AU·min/(mg/L)]	36900,50	26956,37
Konstante <i>c</i> [μ AU·min/(mg/L) ²]	-	- 0,023
Reststandardabweichung [μ AU·min]	338167,75	361117,75
Prüfwert (<i>PW</i>)		0,016
$F(f_1 = 1, f_2 = N - 3, P = 99 \%)$		12,25
Homogenität der Varianzen (<i>PW</i>)		nicht gegeben
Verfahrensstandardabweichung s_{x_0} [mg/L]		12,57
rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x_0} [%]		1,09
untere Arbeitsgrenze x_p [mg/L]		65,01

5.7.2.2 Bestimmung der Flavonoide in Brauprozessproben

Zur Untersuchung des Flavonoid-Flusses von Malz über verschiedene Brauprozessproben bis hin zum fertigen Bier wurden Proben aus dem Brauprozess zur Herstellung eines Pilsener Bieres (Warsteiner-Brauerei) entnommen. Die Probenahme erfolgte in verschiedenen Stufen des Prozesses (dem **Maischen**, dem **Läutern**, dem **Würzekochen**, dem Prozess im **Whirlpool**, der **Kühlung**, der **Gärung**) und schließlich im **Bier** selber. Eine Übersicht über alle entnommenen Brauprozessproben wird in Abbildung 47 gegeben.

Die Untersuchung des Flavonoid-Gehaltes beginnt mit dem zum Brauen eingesetzten Malz. Eine Bestimmung der für den Brauprozess relevanten Gerstensorten war nicht möglich, da

die Brauerei bereits gemälzte Gerste als Braurohstoff bezog und zudem eine Mischung aus verschiedenen Malzen zum Brauen einsetzte. Im ersten Schritt des Brauens erfolgt das **Maischen**. Der im Maischbottich gefahrene Temperaturverlauf sowie die Zeitpunkte der Probenahmen sind in Abbildung 45 dargestellt. Im Anschluss wurde die Maische zum **Läutern**, dem Filtern der Maische, in den sogenannten Läuterbottich gepumpt und drei Proben, eine der Vorderwürze und zwei der Nachgüsse, gezogen. Die Vorderwürze und die Nachgüsse wurden dann in der Würzpfanne gesammelt und gekocht. Der Temperaturverlauf des **Würzekochens** sowie die Zeitpunkte der Probenahmen sind in Abbildung 46 abgebildet.

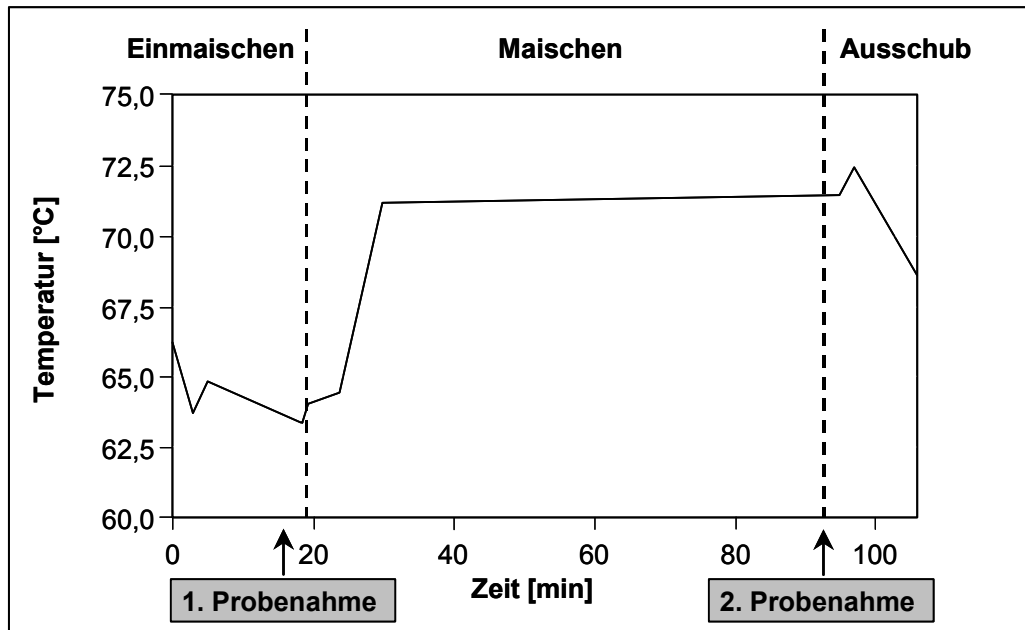


Abbildung 45: Temperaturverlauf des Maischens

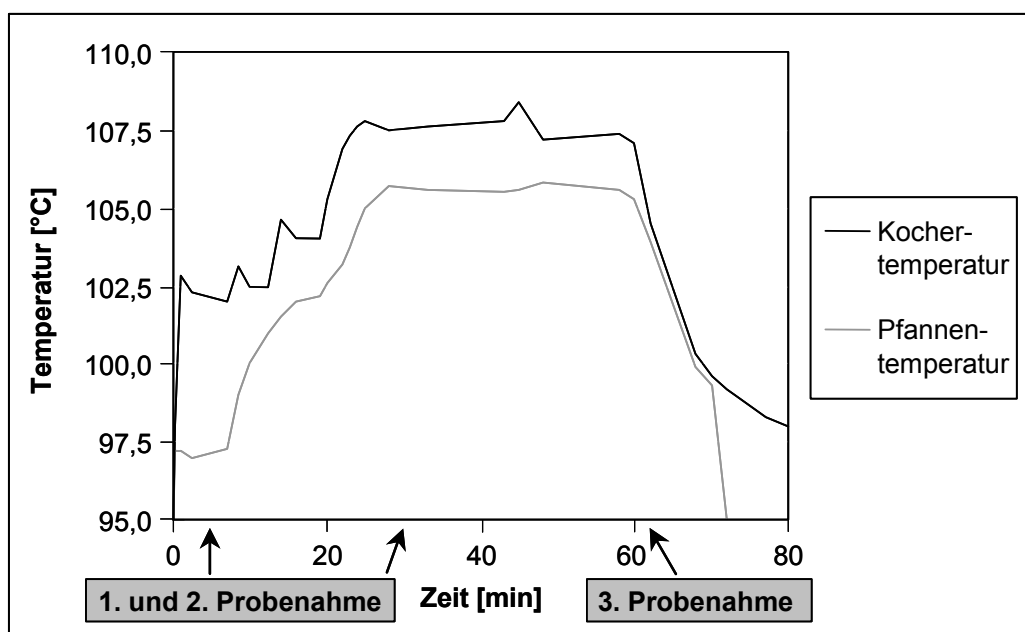


Abbildung 46: Temperaturverlauf des Würzekochens

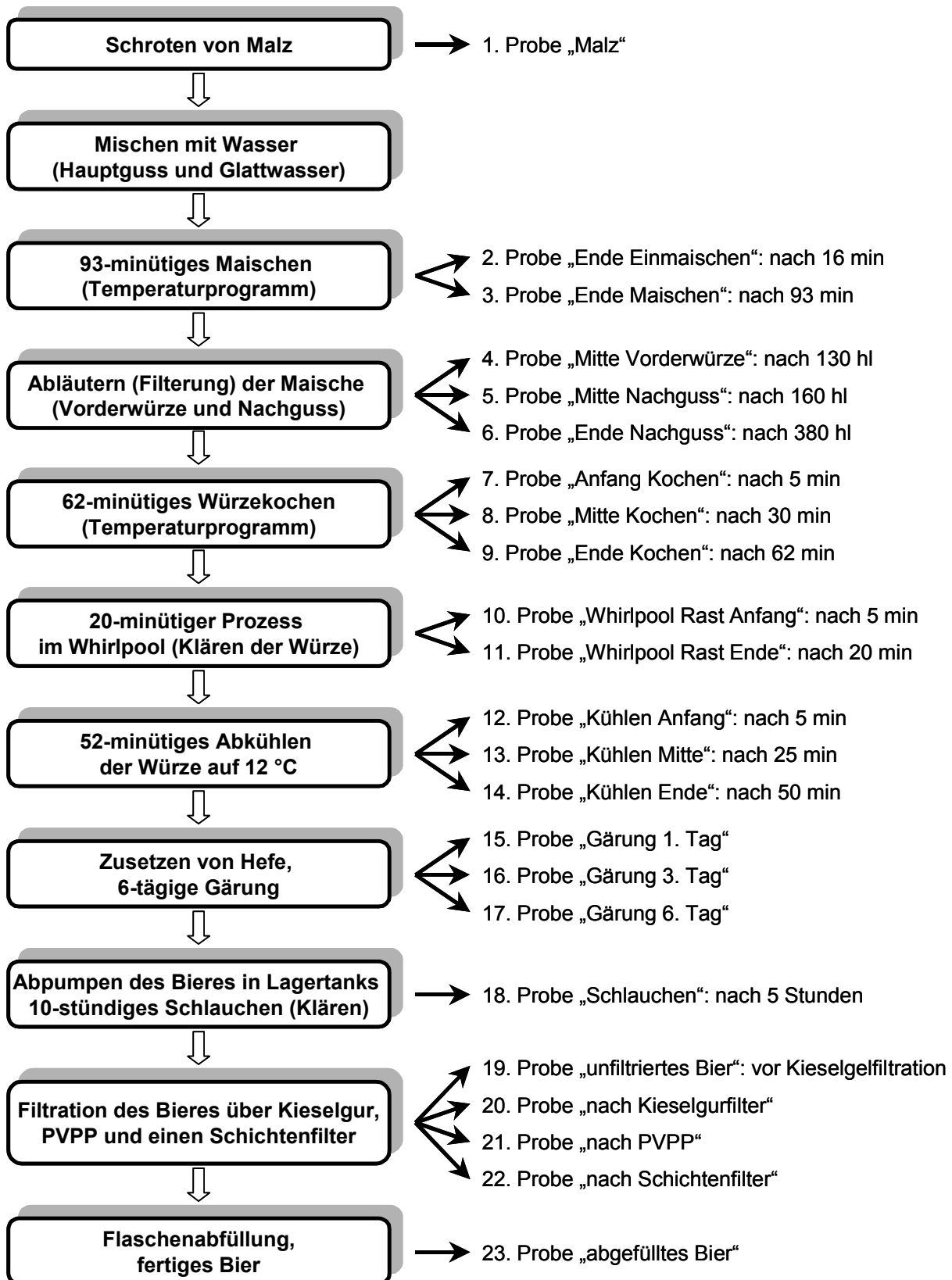


Abbildung 47: Schematischer Überblick über die Probenahme während des Brauprozesses

Nach dem Ausschlagen der Würze erfolgte die Abtrennung der Eiweiß- und Hopfenbestandteile im sogenannten **Whirlpool**. Es wurden während dieses Prozesses zwei Proben ent-

nommen. Vor der anschließenden Gärung wurde das Bier dann einer **Kühlung** unterworfen und durch Zugabe von Hefe der Gärprozess gestartet. Während der **Hauptgärung** erfolgten drei Probenahmen über sechs Tage hinweg, bis das Bier dann zur weiteren Reifung in Lagertanks gepumpt wurde, das sogenannte „Schlauchchen“. Diese Reifung im Lagertank wurde nicht mit in die Untersuchung einbezogen. Eine weitere Probe wurde dann von dem gereiften Bier genommen. Um dieses trübe Bier zu Klären, wurden dann verschiedene Filtrations-schritte durchgeführt. Der Flavonoid-Gehalt wurde im Anschluss an die Kieselgur-Filtration, die Filtration über PVPP und nach Einsatz eines Schichtenfilters untersucht. Abschließend erfolgte noch eine Gehaltsbestimmung in dem fertig abgefüllten Bier.

Alle Proben, abgesehen von dem Malz selber und den Proben der Maische, wurden lyophilisiert und direkt mit der LC-DAD-MS/MS-Gerätekombination analysiert. Da Maische einen sehr hohen Feststoffanteil aufwies, wurden diese Proben vor der Flavonoid-Bestimmung, wie unter Kapitel 5.3.1.1 für Gerste beschrieben, aufgearbeitet. In der Tabelle 25 und Tabelle 26 sind die für die Proben erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst. Die Quantifizierung erfolgte indirekt über die für (+)-Catechin bestimmte Kalibriergerade (s. Kapitel 5.7.2.1), die Identifizierung der Verbindungen mittels MSⁿ-Detektion. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu ermöglichen, wurden die Gehalte der Proben der **Maische**, um die Verdünnung durch die Wasserzugabe zu berücksichtigen, auf Malz bezogen. Weiterhin wurden die Proben des **Würzekochens**, um die Aufkonzentrierung durch Wasserverluste während des Kochens zu berücksichtigen, auf eine Stammwürze von 11,6 % bezogen. In Abbildung 48 ist der Verlauf der Gehalte (Summe der mono-, di- und trimeren Flavonoide) während des Brauprozesses dargestellt.

Bei der nachfolgenden Interpretation der Flavonoid-Konzentrationen in den Brauprozessproben ist zu berücksichtigen, dass nur eine einfache Probenahme mit anschließender Doppelbestimmung erfolgte. Es können also lediglich Trends aufgezeigt werden.

Flavonoid-Gehalt in Malz:

Die in Malz bestimmten Gehalte der Monomeren (+)-Catechin mit 1,60 mg/kg und (-)-Gallocatechin mit 2,12 mg/kg lagen in der Größenordnung der bereits in der Literatur beschriebenen Werte [183, 185]. McMURROUGH [309] dagegen erhielt bei seinen Untersuchungen 1979 in Malz eine (+)-Catechin-Konzentration von 30 mg/kg, konnte aber kein (-)-Gallocatechin detektieren. Nur BELLMER et al. [184] konnten in verschiedenen Malzsorten bis zu 36 mg/kg (+)-Catechin nachweisen. Darüber hinaus fanden sie auch das Monomer (-)-Epicatechin, welches nicht in dem untersuchten Malz nachzuweisen war. Die von mehreren Autoren [154, 184, 233] beschriebene Beobachtung, dass sich beim Mälzen der Gerste der (+)-Catechin-Gehalt im Durchschnitt um die Hälfte reduziere, während der Gehalt der Di- und Trimeren konstant bliebe, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden, da die Rohgersten der zum Brauen eingesetzten Malzmischung nicht zur Verfügung standen.

Tabelle 25: Flavonoid-Gehalte in den Proben des Maischens, des Läuterns, des Würzekochens und im Whirlpool (LC-DAD-MS/MS, Gradient E2) (n = 2)

Analyt	Maischen [mg/kg]			Läutern [mg/L]			Würzekochen [mg/L]			Whirlpool [mg/L]	
	1. Probe Malz	2. Probe Ende Einmischen	3. Probe Ende Maischen	4. Probe Mitte Vorderwürze	5. Probe Mitte Nachguss	6. Probe Ende Nachguss	7. Probe Anfang Kochen	8. Probe Mitte Kochen	9. Probe Ende Kochen	10. Probe Rast Anfang	11. Probe Rast Ende
(+)-Catechin (C)	1,60	3,23	7,02	1,26	0,56	0,59	1,21	1,22	1,92	1,80	2,93
(+)-Catechin-Glucopyranosid	13,64	17,27	14,53	1,72	0,41	0,41	1,29	0,93	1,25	0,71	1,04
(-)-Gallocatechin (GC)	2,12	5,65	11,02	1,82	0,85	0,29	1,10	1,11	2,25	u. B.	u. B.
Procyanidin B3 (C-C)	107,55	117,66	201,42	14,56	5,08	2,38	30,55	24,38	38,82	24,04	34,03
Prodelfphinidin B3 (GC-C)	74,96	78,05	70,61	9,46	3,44	1,99	6,99	5,77	8,02	4,99	4,64
Prodelfphinidin Dimer (GC-GC)	5,66	18,81	15,68	1,99	0,93	0,92	1,64	1,48	1,73	1,34	1,34
Procyanidin C2 (C-C-C)	134,20	170,53	168,12	34,28	12,53	4,58	48,36	20,90	40,43	30,02	30,61
Prodelfphinidin Trimer 1a (GC-C-C)	17,55	14,55	14,48	0,80	0,40	0,49	0,82	0,21	0,48	0,51	0,59
Prodelfphinidin Trimer 1b (C-GC-C)	9,09	9,16	10,03	0,62	0,26	0,35	0,68	0,28	0,44	0,43	0,62
Prodelfphinidin C2 (GC-GC-C)	47,44	81,73	85,33	22,11	4,45	1,28	28,14	16,90	21,93	20,09	13,80
Prodelfphinidin Trimer 2a (GC-GC-GC)	1,02	2,13	2,46	0,43	0,21	0,13	u. B.	u. B.	n. d.	n. d.	n. d.
Summe	414,83	518,77	600,70	89,05	29,12	13,41	120,78	73,18	117,27	83,93	89,60

n. d.: nicht detektiert; u. B.: unterhalb der Bestimmungsgrenze

Tabelle 26: Flavonoid-Gehalte in den Proben der Kühlung, der Gärung und des Bieres (LC-DAD-MS/MS, Gradient E2) (n = 2)

Analyt	Kühlung [mg/L]				Gärung [mg/L]				Bier [mg/L]			
	12. Probe Anfang	13. Probe Mitte	14. Probe Ende	15. Probe 1. Tag	16. Probe 3. Tag	17. Probe 6. Tag	18. Probe Schläuchen	19. Probe unfiltriertes Bier	20. Probe nach Kieselgurfilter	21. Probe nach PVPP-Filter	22. Probe nach Schichtenfilter	23. Probe abgefülltes Bier
(+)-Catechin (C)	1,62	1,81	2,48	1,40	1,13	1,15	3,56	1,65	1,43	0,34	0,40	0,53
(+)-Catechin-Glucopyranosid	1,17	1,23	1,65	0,33	0,81	0,88	0,40	1,06	0,95	0,98	1,05	0,66
(-)-Galocatechin (GC)	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Procyanidin B3 (C-C)	16,67	30,21	51,41	11,23	16,32	15,13	15,07	25,76	28,49	18,37	19,71	17,16
Prodelphephidin (GC-C)	2,23	2,51	3,51	1,48	1,23	1,64	1,47	2,84	1,80	0,72	2,89	1,63
Prodelphephidin Dimer (GC-GC)	1,56	1,61	1,61	0,95	0,81	0,71	0,75	0,43	u. B.	n. d.	n. d.	n. d.
Procyanidin C2 (C-C-C)	30,99	27,35	28,82	6,59	5,10	3,16	5,71	12,83	11,42	n. d.	n. d.	n. d.
Prodelphephidin Trimer 1a (GC-C-C)	0,36	0,73	1,15	0,56	0,54	0,67	1,00	0,50	0,43	n. d.	n. d.	n. d.
Prodelphephidin Trimer 1b (C-GC-C)	0,36	0,51	0,80	0,51	0,42	0,67	0,81	0,67	0,53	n. d.	n. d.	n. d.
Prodelphephidin C2 (GC-GC-C)	12,37	12,87	13,99	9,57	6,93	4,93	3,38	4,56	4,51	n. d.	n. d.	n. d.
Prodelphephidin Trimer 2a (GC-GC-GC)	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Summe	67,33	78,83	105,41	32,62	33,29	28,94	32,15	50,30	49,56	20,41	24,05	19,98

n. d.: nicht detektiert; u. B.: unter der Bestimmungsgrenze

Neben den Monomeren (+)-Catechin und (-)-Gallocatechin wurden auch die Dimere Procyanidin B3 und Prodelphinidin B3, wie in bereits in der Literatur [183, 185, 247, 249] beschrieben, in Malz detektiert. Die Konzentration von Procyanidin B3 lag mit 107,55 mg/kg deutlich über der für Prodelphinidin B3 (74,96 mg/kg). Wie auch für die Monomeren variieren die in anderen Untersuchungen bestimmten Konzentrationen stark. Zusätzlich zu dem Signal für Prodelphinidin B3 konnten, wie schon bei der Untersuchung des Gerstenextraktes (s. Kapitel 5.6.2, Abbildung 35b), im MS-Chromatogramm m/z 592,5 - 593,5 zwei weitere Signale bei $R_t = 15$ und 21 min erfasst werden. Durch MS^n -Experimente wurde das erste Signal auch hier dem Dimer mit der Sequenz C-GC und das zweite Signal einem Molekülion mit der Sequenz GC-C zugeordnet. Darüber hinaus wurde das von FRIEDRICH [183] erstmalig in Malz identifizierte, dort aber nicht quantifizierte, aus zwei (-)-Gallocatechin-Einheiten aufgebaute Dimer (m/z 609) mit einer Konzentration von 5,66 mg/kg in Malz detektiert. Anders verhält es sich mit dem aus (+)-Catechin und Glucose aufgebauten (+)-Catechin-Glucopyranosid ($[M-H]^+$, m/z 451,0). Dieses von ihm erstmalig in Malz identifizierte Flavonoid konnte in verschiedenen Malzsorten in der Größenordnung von 25 - 45 mg/kg detektiert werden. Die eigenen Untersuchungsergebnisse mit 13,64 mg/kg liegen also darunter.

Bezüglich des Gehaltes der Flavonoid-Trimere in Malz gibt es bisher nur sehr wenige Arbeiten. GOUPY et al. [185] bestimmten 1999 die Konzentration des Trimers Procyanidin C2 mit der Sequenz C-C-C in einer Größenordnung von 5 mg/kg. FRIEDRICH [183] ermittelte für das Trimer Procyanidin C2 Werte von 31 - 78 mg/kg, für die Prodelphinidin Trimere (m/z 881) mit der Sequenz GC-C-C und C-GC-C 39 - 103 mg/kg und für Prodelphinidin C2 (m/z 897) 50 - 80 mg/kg. In dem hier untersuchten Malz konnte Procyanidin C2 in einer Konzentration von 134,20 mg/kg bestimmt werden. Die Werte für die Trimere GC-C-C und C-GC-C lagen dagegen mit 17,55 mg/kg und 9,09 mg/kg deutlich darunter (s. Tabelle 25).

Im MS-Chromatogramm m/z 880,5 - 881,5 wurden wie beim Gerstenextrakt (s. Kapitel 5.6.2, Abbildung 36b) zusätzliche Peaks geringer Intensität bei $R_t = 24$ und 29 min beobachtet. Basierend auf der in Kapitel 5.6.3.3 beschriebenen Vorgehensweise der Identifizierung relevanter Product-Ionen zur Sequenzermittlung des Moleküls, weisen die bei Kollisionsexperimenten mit diesen Verbindungen erhaltenen Fragmente auch hier auf die Monomeren-Abfolge GC-C-C hin. Eine Quantifizierung dieser Verbindungen konnte aber nicht erfolgen, da die Signale unterhalb der Bestimmungsgrenze des Verfahrens lagen. Im MS-Chromatogramm m/z 896,6 - 897,5 wurde neben dem Signal für Prodelphinidin C2 (GC-GC-C) bei $R_t = 12$ min, welches in einer Konzentration von 47,44 mg/kg in dem untersuchten Malz vorliegt, wie auch in Gerste (s. Kapitel 5.6.2, Abbildung 36c) ein weiterer Peak bei einer Retentionszeit von 21 min mit der gleichen Monomeren-Sequenz GC-GC-C detektiert. Dieses Signal, vermutlich aus einer höhermolekularen Verbindung durch Bruch der Flavonoid-Bindung resultierend, konnte aufgrund der geringen Konzentration aber auch keiner Quantifizierung unterworfen werden. Als weiteres trimeres Flavonoid wurde abschließend die bisher erstmals von BRANDON [175] in Gerste beschriebene Verbindung mit der Abfolge GC-GC-GC gefunden und durch MS^n -Experimente bestätigt. Ihre Konzentration von 1,02 mg/kg ist mit der des Monomeren (+)-Catechin vergleichbar.

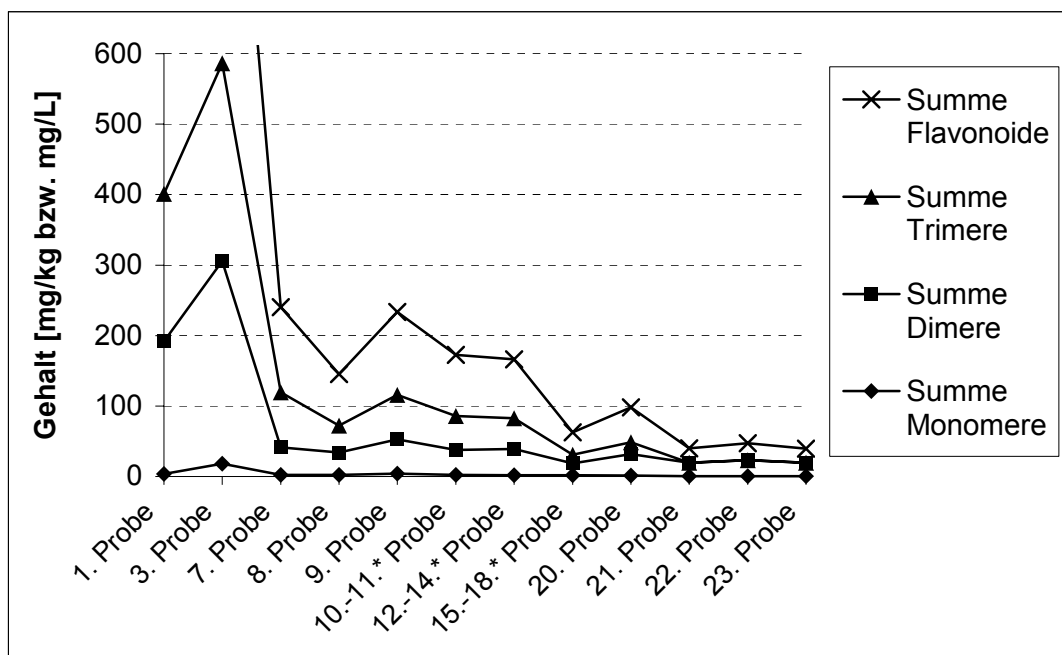


Abbildung 48: Verlauf der Gehalte der monomeren, dimeren und trimeren Flavonoide während des Brauprozesses (* Mittelwerte der jeweiligen Proben)

Verlauf der Flavonoid-Gehalte während des Brauprozesses:

Ausgehend von den in Malz ermittelten Werten für die einzelnen Flavonoide sollte nun das Flavonoid-Muster in den verschiedenen Brauprozessproben verfolgt werden. In der Literatur werden zumeist nur Untersuchungen in Proben des Maischens, des Würzekochens und des Bieres direkt durchgeführt, wobei dann häufig auch keine Differenzierung der einzelnen Substanzen erfolgt. So gaben McMURROUGH et al. [154] in Bier die Summe der Monomere mit 9 mg/L, die der Dimere mit 2,6 mg/L und die der Trimere mit 3,2 mg/L an. MOLL et al. [233] postulierten basierend auf ihren Untersuchungen einen Gesamt-Flavonoid-Gehalt von 10 mg/g und PAPP et al. [218] von 8,5 mg/L.

Aufgrund der vom Verbraucher nicht erwünschten Trübung des Bieres (Haze-Formation), verursacht durch die Bildung von Komplexen aus Proteinen und Polyphenolen (s. Kapitel 4.2), haben sich in der Vergangenheit viele Arbeitsgruppen [56, 57, 221] mit dem Einfluss der Filtration des Bieres über PVPP und auf den daraus resultierenden Flavonoid-Gehalt im Bier beschäftigt. Beispielweise stellten McMURROUGH et al. [57] im Mittel eine Halbierung der Konzentration der Monomere (+)-Catechin und (-)-Epicatechin sowie der Dimere Procyanidin B3 und Prodelphinidin B3 fest. Neben der Reduktion des Flavonoid-Gehaltes durch Filtration des Bieres über PVPP wurde in mehreren unabhängigen Studien [154, 212, 233, 247] postuliert, dass beim Kochen der Würze der Gehalt der höhermolekularen Flavonoide sinkt, während gleichzeitig die Konzentration der Monomeren steigt. Grund hierfür sei, dass es bei den Temperaturen des Kochens zu einem Bruch der Interflavonoid-Bindung käme. In der Literatur wurden bisher keine Hinweise über eine Gesamt-Bilanzierung des Flavonoid-Flusses während eines Brauprozesses gefunden.

Die eigenen Untersuchungsergebnisse (s. Tabelle 25 und 26) zeigen, dass es im ersten Schritt, dem **Maischen** zu einer 400 bis 500 %igen Zunahme des Gehaltes der Monomeren (+)-Catechin und (-)-Galocatechin kam. Bei den höhermolekularen Flavonoiden konnte nur bei dem Dimeren Procyanidin B3 (C-C), dem Prodelphinidin Dimer (GC-GC) und dem Trimeren Prodelphinidin C2 (GC-GC-C) eine Erhöhung festgestellt werden. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass es beim **Maischen** unter Umständen zu einem Bruch der Interflavonoidbindung höhermolekularer Flavonoide gefolgt von einer Erhöhung der Monomeren-Gehalte kommt. Im nächsten Schritt, dem **Läutern** der Maische, waren in der 4. Probe *Mitte Vorderwürze* erwartungsgemäß die höchsten Konzentrationen zu finden, in der 5. Probe *Mitte Nachguss* und der 6. Probe *Ende Nachguss* wurden durch das Nachspülen der Maische nur noch geringe Konzentrationen detektiert. Entgegen den Angaben in der Literatur [154, 212, 233, 247] kann aber beim anschließenden **Würzekochen** eine signifikante Abnahme der Konzentration der höhermolekularen Flavonoide, verbunden mit einer Zunahme der Monomeren, nicht bestätigt werden. Die Untersuchung der 9. Probe *Ende Kochen* zeigte im Gegensatz zur 7. Probe *Anfang Kochen* vergleichsweise hohe Gehalte. Bei den nachfolgenden Brauprozessstufen, d. h. in der 10. Probe *Whirlpool Rast Anfang* und der 11. Probe *Whirlpool Rast Ende* sowie der 12. Probe *Kühlung Anfang* und der 13. Probe *Kühlung Mitte* waren keine signifikanten Unterschiede des Gesamtgehaltes feststellbar. Die erhaltenen Werte liegen zwischen 67 und 89 mg/L. In der 14. Probe *Kühlung Ende* wurde ein Anstieg auf 105,31 mg/L verzeichnet. Ein Vergleich der Gehalte der Einzelverbindungen zeigt, dass dieser Anstieg in erster Linie auf einer Zunahme der Konzentration des Dimers Procyanidin B3 beruht. Dieses Ergebnis sollte daher in einer weiteren Untersuchung noch einmal überprüft werden, zumal der für die 15. Probe *Gärung 1. Tag* erhaltene Wert mit 11,23 mg/L deutlich geringer ist. In den drei Proben der **Gärung** ist eine deutliche Abnahme des Flavonoid-Gehaltes auf etwa 30 mg/L festzustellen. Diese könnte einerseits auf eine Verdünnung durch die Hefe-Zugabe andererseits auch auf Zerfallsprozesse während der sechs-tägigen Gärungsphase zurückgeführt werden.

Das fertige Bier wurde in einem ersten Filtrationsschritt dann über einen **Kieselgurfilter** gegeben, hierbei zeigte sich keine auffällige Änderung des Flavonoid-Gehaltes. Im nächsten **Filtrationsschritt über PVPP** halbierte sich der Gehalt, wie auch bereits in der Literatur [56, 57, 221] beschrieben. Die letzte Brauprozessprobe, das abgefüllte **Bier**, wies einen Gesamt-Flavonoid-Gehalt von 20 mg/L auf, der geringfügig über den in der Literatur angegebenen Ergebnissen von 13 mg/L [55], 12 mg/L [57], 8,5 mg/L [218] und 5,4 mg/L [221] vornehmlich für Lager Bier lag. Die Tatsache, dass die ermittelten Gesamt-Gehalte in den untersuchten Proben der Würze- und der Bierproben im Durchschnitt höher als die in der Literatur bisher angegebenen Gehalte waren, könnte unter Umständen daraus resultieren, dass hier keine Probenvorbereitung erfolgte. Die flüssigen Proben wurden gefriergetrocknet, die jeweiligen erhaltenen Feststoffe ohne weitere Aufarbeitung in DMF/H₂O (2:1; v/v) gelöst und anschließend direkt mit der LC-DAD-MS/MS analysiert. McMURROUGH et al. [57] beispielsweise führten zur Aufreinigung bzw. Abtrennung von Zuckern einen Extraktionsschritt durch, bei dem aber nicht überprüft wurde, ob es zu Verlusten der Analyten kam. Ein weiterer Grund

könnte sein, dass die Proben der Warsteiner-Brauerei im Vergleich mit anderen Brauereien während des gesamten Brauprozesses nur sehr wenig mit Luftsauerstoff in Verbindung kommen [310], eine Oxidation zu höhermolekularen Substanzen somit unterbunden wird.

Die in der 23. Probe *Bier* für (+)-Catechin ermittelte Konzentration mit 0,53 mg/L (Tabelle 26) liegt innerhalb der in der Literatur [53, 57, 218] beschriebenen Größenordnung. Der Gehalt während des Brauens reduzierte sich etwa auf ein Drittel. Im Vergleich dazu konnte das Monomer (+)-Gallocatechin nur bis zur 9. Probe *Ende Kochen* quantifiziert werden, da die Konzentration ab der 10. Probe *Rast Anfang* unterhalb der Bestimmungsgrenze lag. Qualitativ war (-)-Gallocatechin noch bis zur Kieselgur-Filtration des Bieres nachweisbar. Als weiteres Monomer wurde erstmalig in Bier das (+)-Catechin-Glucopyranosid mit 0,66 mg/L detektiert.

Von den dimeren Flavonoiden lagen im Bier nur noch Procyanidin B3 und Prodelphinidin B3 vor. Die Konzentration des Prodelphinidin B3 nahm während des Brauprozesses auf ca. 2 % der Ausgangskonzentration in Malz, die des Procyanidin B3 auf ca. 15 % ab. Durch die PVPP-Filtration wurden sowohl Dimere GC-GC (m/z 609) als auch die Dimeren mit der Sequenz C-GC ($R_t = 15$ min, m/z 593) und GC-C ($R_t = 21$ min, m/z 593) aus dem Bier abgetrennt. Ein Zerfall der Dimeren in die Monomere während des Kochprozesses durch einen Bruch der Interflavonoid-Bindung konnte nicht bestätigt werden.

Im Gegensatz zu den Dimeren konnte in der Probe nach Filtration mit PVPP im Bier kein Trimer detektiert werden. Procyanidin C2 (C-C-C) wies in Malz mit 134,20 mg/kg zwar die höchste Konzentration der Flavonoide auf, der Gehalt reduzierte sich aber bei der **Gärung** auf eine Konzentration von 6,59 mg/L. Die weiteren trimeren Verbindungen mit der Sequenz GC-C-C ($R_t = 24$ und 29 min, m/z 881) und auch die Verbindung GC-GC-C ($R_t = 21$ min, m/z 897) konnten bereits in den Proben der **Gärung** nicht mehr nachgewiesen werden. Der Gehalt an dem ausschließlich aus Gallocatechin-Einheiten aufgebautem Prodelphinidin-Trimer lag schon am Ende des **Läuterns** unterhalb der Bestimmungsgrenze. Die für die Trimeren erhaltenen Ergebnisse entsprachen damit nicht den von McMURROUGH et al. [154, 221], die Summengehalte von 3,2 - 5,4 mg/L angeben. Andere Autoren [55, 233] konnten mittels HPLC-DAD ebenfalls keine Trimere nachweisen. Der Befund, dass nach PVPP-Filtration in der Bierprobe keine Trimere mehr nachzuweisen sind, bestätigt nochmals die bereits in mehreren Untersuchungen [154, 212, 233, 247] herausgestellte Sorptions-Effektivität des Polymers, die schließlich zur vergleichsweisen „Flavonoid-Armut“ des Endproduktes Bier führt.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Flavonoide zählen zur Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe, und sie stellen eine umfangreiche Stoffklasse polyphenolischer Verbindungen dar, die in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft ubiquitär vorkommen. In zahlreichen epidemiologischen Studien konnten im menschlichen Organismus viele unterschiedliche protektive Wirkungsweisen (antioxidativ, antiatherosklerotisch usw.) dieser Substanzen nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang ist die Identifizierung und Quantifizierung von Flavonoiden in Gerste von besonderer Bedeutung, da dieses heimische Getreide als Ausgangsstoff bei der Herstellung verschiedenster Produkte (Brot, Müsli) so z. B. auch von Bier dient. Hier führen die oligomeren Flavonoide durch Komplexbildung mit Proteinen während des Brauprozesses zu einer vom Verbraucher unerwünschten Trübung des Bieres.

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist kein vollständig validiertes HPLC-Verfahren zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Flavonoiden in Gerste bekannt. Als Ursache hierfür ist zum einen ein Mangel an kommerziellen Referenzsubstanzen der in Gerste bisher detektierten höhermolekularen Verbindungen, der Proanthocyanidine, zu sehen. Weiterhin ist das in Gerste enthaltene, vielfältige Stoffspektrum an Flavonoiden bisher nur teilweise aufgeklärt. Da Gerste neben Hopfen, Malz und Wasser als eine der vier Grundzutaten zur Bierherstellung fungiert, hat dies zur Folge, dass bislang keine systematischen Untersuchungen über den Flavonoid-Fluss während des Bierbrauprozesses möglich sind.

Die bisher beschriebenen Verfahren zur Bestimmung von Flavonoiden in Gerste, Malz und verschiedenen Proben des Brauprozesses beschränken sich entweder auf die Ermittlung eines Polyphenol-Summenparameters z. B. zur Prozesskontrolle oder auf die Analyse der monomeren Flavonoide. Diese Arbeit verfolgte daher folgende Ziele:

- Synthese des dimeren Flavonoids Procyanidin B3 als Referenzsubstanz
- Entwicklung und Optimierung eines HPLC-DAD-Verfahrens (Probenahme, Probenvorbereitung und chromatographische Trennung) zur Quantifizierung ausgewählter Flavonoide in Gerste
- Umfassende Validierung des Analyseverfahrens
- Identifizierung weiterer Verbindungen in Gerste mittels LC-DAD-MS/MS
- Anwendung des validierten HPLC-DAD-Verfahrens zur Bestimmung von Flavonoiden in Gerste und zur Verfolgung des Flavonoid-Flusses während eines Bierbrauprozesses

Die **Darstellung des Procyanidin B3** sollte in Anlehnung an bereits in der Literatur beschriebene Synthesewege für andere dimere Flavonoide erfolgen. Die Synthese konnte erfolgreich bis zur zweiten Stufe durchgeführt werden. Die Realisierung des letzten Reaktions-schrittes gelang nicht und konnte aus Zeitgründen nicht weiter verfolgt werden. Die gelungenen Umsetzungen der neuen Synthesestrategie sollten aber im Rahmen weiterer Untersuchungen prinzipiell zur Darstellung von Referenzsubstanzen der Proanthocyanidine führen.

Die **Entwicklung eines HPLC-DAD-Verfahrens** zur Bestimmung von Flavonoiden erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen **Monomeren (+)-Catechin als Modellsubstanz**. Hierbei zeigten sich sowohl ein Phosphatpuffer/Acetonitril-Gradient **P1** als auch ein Essigsäure-Gradient **E1** als mobile Phasen geeignet, wobei der Einsatz des Gradienten **E1** die Übertragbarkeit des Verfahrens auf die zur späteren Identifizierung eingesetzte Detektion mittels Massenspektrometer sicherstellte. Als optimales Lösemittel der Messprobe stellte sich ein DMF/H₂O-Gemisch (2:1; v/v) heraus.

Ein besonderer Schwerpunkt bei der Methodenentwicklung lag auch auf der systematischen Erprobung verschiedenartiger stationärer Phasen bzw. analytischer Trennsäulen. Es wurden sowohl acht herkömmliche C18-Materialien mit unterschiedlichen Säulendimensionen, ein C8-Material sowie sieben verschieden neuartig endgruppen-modifizierte Reversed-Phase-Materialien hinsichtlich Trennleistung und Packungsqualität untersucht. Darüber hinaus erfolgte zur Beurteilung der jeweiligen Säule bezüglich ihres späteren Einsatzes bei Realproben die Einführung eines Quotienten Q_F aus der ermittelten Peakbreite und der Retentionszeit des (+)-Catechin-Peaks. Es erwiesen sich fünf herkömmliche C18-Materialien, zwei Phenyl-, eine Phenyl-Hexyl-, eine Polyethylenglycol- sowie eine Pentafluorophenyl-Phase als geeignet, deren chromatographisches Trennvermögen dann bei Realproben untersucht wurde.

Zur Entwicklung des **HPLC-DAD-Verfahrens zur Bestimmung der Flavonoide in Gerste** erfolgte eine systematische Optimierung aller Probenvorbereitungsschritte zur Isolierung der Flavonoide (s. Abbildung 15). Es wurden zwei verschiedene Methoden der Probenvorbereitung, eine klassische Fest-Flüssig-Extraktion mit Ultra-Turrax-Unterstützung und eine Mikrowellen-gestützte Extraktion (MSS, Microwave Supported Solvent Extraction) eingesetzt. Mit beiden Extraktionsverfahren wurde eine 95 %ige Extraktionsausbeute nach vier Extraktionsdurchgängen bei einer Dauer von 10 min mit der Ultra-Turrax-Methode und 15 min mit der MSS-Technik (Extraktionstemperatur: 30 °C) erhalten. Die MSS bietet gegenüber der Extraktion mit dem Ultra-Turrax den Vorteil, in einem Extraktionsdurchgang bis zu 500 g Gerste aufarbeiten zu können. Damit eröffnet sie die Möglichkeit für weiterführende Arbeiten, um die in Gerste enthaltenen höhermolekularen, nicht kommerziell erhältlichen Proanthocyanidine im präparativen Maßstab isolieren zu können.

Die durchgeführten Untersuchungen zur Einsetzbarkeit der zuvor ausgewählten analytischen Trennsäulen für den Gerstenextrakt sowie Variationen der eingesetzten Gradienten führten dann zu dem in Abbildung 21 schematisch dargestellten Analysenablauf. Zusammenfassend hat sich zur quantitativen Bestimmung von Flavonoiden in Gerste die Reversed-Phase Chromatographie mit einem chromatographischen System bestehend aus einer RP-18 Trennsäule und einem Phosphatpuffer/Acetonitril-Gradient **P2** oder einem Essigsäure/Acetonitril-Gradient **E2** als optimal erwiesen. Die Detektion erfolgte mit einem DAD-Detektor bei einer Wellenlänge von 280 nm.

Bei der **umfassenden Validierung des optimierten HPLC-DAD-Verfahrens** nach den gültigen Richtlinien der DIN EN ISO/IEC 17025, der FDA, der ICH sowie nach dem Amtsblatt

der Europäischen Gemeinschaften wurden die Validierungsparameter Linearität, Spezifität, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Präzision, Richtigkeit, Robustheit und Stabilität bestimmt. Die Validierung wurde sowohl für den Einsatz des Gradienten **E2** als auch für den Gradienten **P2** durchgeführt.

Die Bestimmungsgrenze des Verfahrens lag mit beiden Gradienten bei einer (+)-Catechin-Konzentration von 1,25 mg/L (\pm 50 ng absolut), die Nachweisgrenze bei einer Konzentration von 0,25 mg/L (\pm 10 ng absolut). Die relative Verfahrensstandardabweichung V_{x_0} der erstellten und statistisch abgesicherten Kalibrierfunktionen wurde zu 1,3 % (**E2**) und 0,9 % (**P2**) bestimmt und war damit geringer als die geforderten 3 %. Im weiteren wurde der Validierungsparameter Stabilität untersucht. Es zeigte sich, dass die Realproben entweder direkt vermessen und während der Messung auf 5 °C gekühlt, oder, um eine längerfristige Stabilität zu gewährleisten, bei einer Temperatur von -80 °C gelagert werden sollten. Für die Messpräzision wurden mit beiden Gradienten Werte um 2 % ermittelt. Die Methodenpräzision unter Wiederholbedingungen zeigte für die Aufarbeitung mittels MSS und mittels Ultra-Turrax Werte zwischen 5,6 % und 8,8 %.

Zur laborinternen Qualitätskontrolle konnte bestätigt werden, dass die an unterschiedlichen Tagen durchgeführten Messungen mit 95 % Sicherheit als gleich zu betrachten sind (Tag-zu-Tag-Präzision). Die Bestimmung der Richtigkeit erfolgte hier indirekt über die Ermittlung der Wiederfindung, wobei diese in erster Linie reproduzierbar sein muss. Die Mittelwerte der gefundenen Wiederfindungsraten lagen für die Aufarbeitung der Realproben mit dem Ultra-Turrax bei 90,1 % und für die MSS bei 84,1 %. Somit konnte die Richtigkeit des Verfahrens bestätigt werden. Abschließend wurde noch die Robustheit des Analysenverfahrens anhand von Veränderungen verschiedener Parameter bei der chromatographischen Bestimmung bestätigt.

Ein weitere Zielsetzung dieser Arbeit lag auf der **Identifizierung in Gerste enthaltener Flavonoide mittels LC-DAD-MSⁿ**. In Gerste sind neben den Monomeren (+)-Catechin und (-)-Gallocatechin bisher 6 Proanthocyanidine beschrieben worden (s. Tabelle 3). Dabei handelt es sich um zwei Dimere und vier Trimere, die aus Catechin- und Gallocatechin-Einheiten aufgebaut sind. Zur Identifizierung wurden im ersten Schritt MSⁿ-Untersuchungen mit den Monomeren (+)-Catechin (C), (-)-Epicatechin, (-)-Gallocatechin (GC) und (-)-Epigallocatechin durchgeführt. Es zeigte sich, dass die jeweiligen Epimeren das gleiche Fragmentierungsmuster aufweisen. Durch MS¹-Untersuchungen (Precursor-Ionen-Experimente) erfolgte eine erste Zuordnung der erhaltenen Massensignale bezüglich der möglichen Monomeren-Sequenz der höhermolekularen Flavonoide (Di-, Tri- und Tetramere). Gezielte MSⁿ-Untersuchungen führten dann, unter Berücksichtigung typischer Fragmentierungsreaktionen bzw. charakteristischer Product-Ionen zur erstmaligen Erarbeitung einer systematischen Vorgehensweise zur Identifizierung der verschiedenen Proanthocyanidine.

Auf diese Weise konnten neben den bisher beschriebenen Dimeren Procyanidin B3 (Sequenz C-C) und Prodelphinidin B3 (GC-C) auch dimere Verbindungen der Sequenz C-GC und GC-GC nachgewiesen werden. Hinweise in der Literatur über die Existenz der Trimeren

mit der Monomeren-Abfolge C-C-C (Procyanidin C2), GC-GC-C (Prodelphinidin C2) sowie GC-C-C und C-GC-C wurden ebenfalls bestätigt. Darüber hinaus wurde auch eine ausschließlich aus Gallocatechin-Einheiten aufgebaut trimere Verbindung GC-GC-GC identifiziert. Zur Identifizierung der erstmals in Gerste gefundenen tetrameren Proanthocyanidine waren im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nur MS²-Experimente der Signale mit der größten Intensität möglich. Es konnte daher nur eine erste vorläufige Struktur-Zuordnung getroffen werden (s. Tabelle 21). Zu einer umfassenden Strukturaufklärung dieser tetrameren Flavonoide sowie zur Untersuchung der möglichen Existenz weiterer höhermolekularer Verbindungen (Pentamere, Hexamere usw.) in Gerste besteht weiterer Untersuchungsbedarf. Dabei sollten neben der Massenspektrometrie auch andere Methoden wie z. B. die on-line-LC-NMR-Spektroskopie eingesetzt werden, die eine Unterscheidung von Diastereoisomeren der Monomeren-Bausteine ermöglicht.

Die **Anwendung des HPLC-DAD-Verfahrens** wurde anhand der quantitativen Bestimmung der Flavonoid-Gehalte in den drei **Braugerstensorten „Annabell“, „Henni“ und „Viskosa“** demonstriert. Die Quantifizierung der Proanthocyanidine erfolgte hierbei indirekt über (+)-Catechin. Die ermittelten Flavonoid-Gehalte für die monomeren, dimeren und trimeren Flavonoide zeigen eine gute Übereinstimmung mit Literaturdaten. Des Weiteren gelang auch die Quantifizierung der erstmals in Gerste durch MSⁿ-Untersuchungen identifizierten di- und trimeren Verbindungen. Somit konnte die Einsatzfähigkeit des entwickelten und validierten HPLC-DAD-Verfahrens gezeigt werden.

Darüber hinaus wurden dann, zur **Verfolgung des Flavonoid-Flusses** während eines Brauprozesses, verschiedene **Prozessproben eines Braudurchganges mittels LC-DAD-MS/MS untersucht**. Ausgehend von Malz als Braugrundstoff wurden bei den jeweiligen Braustufen, dem Maischen, dem Läutern, dem Würzekochen, der Kühlung, der Gärung, der Filtration sowie dem Bier verschiedene Proben genommen. Die Identifizierung der einzelnen Substanzen erfolgte durch MSⁿ-Untersuchungen unter Anwendung der zuvor erarbeiteten systematischen Vorgehensweise, die Quantifizierung mittels DAD-Detektion indirekt über (+)-Catechin. Durch die Untersuchung konnte sowohl die Abnahme der Flavonoid-Konzentration ausgehend vom Malz als Braugrundstoff bis zum fertigen Bier, als auch die Veränderung des Flavonoid-Musters in den jeweiligen Stufen des Brauprozesses nachgewiesen werden.

Zu einer deutlichen Reduzierung des Flavonoid-Gehaltes führten neben der Gärung des Bieres, besonders die am Ende stattfindenden Filtrationsschritte des gebrauten Bieres über einen Kieselgur- einen PVPP- und einen Schichtenfilter. Besonders effektiv wirkt die PVPP-Filtration. Dies soll selektiv Polyphenole aus dem Bier absorbieren, um die für den Verbraucher unerwünschte Trübung, hervorgerufen durch Komplexbildung der Polyphenole mit Proteinen, zu vermindern. Die Effektivität dieses Filtrationsschrittes konnte also bestätigt werden, da im fertigen Bier nur noch monomere und dimere, aber keine höhermolekularen Flavonoide mehr nachweisbar waren. Bei zukünftigen Arbeiten sollten dann, um noch detailliertere Informationen zu erhalten, auch die Flavonoide aus dem Hopfen mit einbezogen werden, die in dieser Untersuchung nicht mit berücksichtigt werden konnten.

Mit dem in dieser Arbeit entwickelten, optimierten und validierten HPLC-DAD-Verfahren ist eine zuverlässige quantitative Bestimmung von Flavonoiden in Gerste möglich. Die chromatographischen Bedingungen zeichnen sich dadurch aus, dass auch die massenspektrometrische Detektion einsetzbar ist. Durch die massenspektrometrischen MS^n -Stoßexperimente wurde erstmals ein systematisches Vorgehensschema zur Identifizierung höhermolekularer Flavonoide entwickelt, welches auch für andere Probenarten eingesetzt werden kann. Darüber hinaus konnte der Flavonoid-Fluss in Proben eines Bierbrauprozesses verfolgt werden. Das Ziel weiterführender Arbeiten sollte primär, basierend auf der Gewinnung von Referenzsubstanzen der oligomeren Proanthocyanidine, eine direkte Quantifizierung mittels MS-Detektion durch das hier entwickelte HPLC-Verfahren sein.

7 Experimenteller Teil

7.1 Chemikalien

Die im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen eingesetzten Chemikalien sind im folgenden alphabetisch geordnet aufgeführt.

Aceton (p. a.; Merck/Darmstadt)
Acetonitril (HPLC-Grade; Merck/Darmstadt)
Benzylbromid, $\geq 98,0$ % (purum; Fluka/Taufkirchen)
(+)-Catechin Hemihydrat, ≥ 98 % (Sigma/Deisenhofen)
2,3-Dichlor-5,6-dicyan-p-benzochinon, DDQ, 97 % (purum; Fluka/Taufkirchen)
Dichlormethan, $\geq 99,8$ % (p. a.; Fluka/Taufkirchen)
4-Dimethylaminopyridin, $\geq 99,0$ % (puriss.; Fluka/Taufkirchen)
Eisessig (HPLC-Grade; Merck/Darmstadt)
(-)-Epicatechin (Sigma/Deisenhofen)
(-)-Epigallocatechin, min. 98 % (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Ethanol (HPLC-Grade; Merck/Darmstadt)
Ethylacetat (p. a.; Merck/Darmstadt)
Ethylenglycol, 99,8 % (wasserfrei; Sigma-Aldrich/Steinheim)
(-)-Galocatechin Hydrat, H₂O-Gehalt 1,3 mol/mol (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Methanol (HPLC-Grade; Merck/Darmstadt)
Natriumchlorid, (reinst; Fluka/Taufkirchen)
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat (p. a.; Merck/Darmstadt)
Natriumdisulfit, trocken (p. a.; Merck/Darmstadt)
Natriumhydrid, 60 % (Suspension in Öl; Fluka/Taufkirchen)
Natriumhydroxid, Plätzchen, ≥ 99 % (p. a.; Merck/Darmstadt)
N,N-Dimethylformamid (p. a.; bzw. puriss., absolut wasserfrei; Fluka/Taufkirchen)
ortho-Phosphorsäure, 85 % (p. a.; Merck/Darmstadt)
Pufferlösungen, pH 1 und pH 7 (gebrauchsfertig; Merck/Darmstadt)
Titriplex III, Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA (p. a.; Merck/Darmstadt)
Trifluoressigsäure, 99 % (p. a.; Sigma-Aldrich/Steinheim)
Wasser (bidestilliert mit Destamat; Heraeus/Hanau)

7.2 Geräte

7.2.1 HPLC-DAD-System

Pumpe: P 580 A mit integriertem Degasser; Gynkotek HPLC (Dionex/Idstein)
Injektionsautomat: Autosampler GINA 50 T (gekühlt, 5 °C); Gynkotek HPLC (Dionex/Idstein)
Injektionsvolumen: 40 μ L
Trennsäule: Nucleosil[®] 100, 250 x 4 mm, RP-C18, 5 μ m (Macherey-Nagel)

Säulenofen:	Säulentemperatur: 30 °C
Detektor:	UVD 340 S, Gynkotek HPLC (Dionex/Idstein)
Messbereich:	220 - 400 nm, ausgewählte Messwellenlängen: 220, 250, 280 und 320 nm
Auswertung:	Gynkosoft Chromeleon-Chromatographie-Datensystem, PCD Version 5.50, Gynkotek HPLC, Peakflächenmethode (Dionex/Idstein)
Flussrate:	1 mL/min
Mobile Phase:	s. Kapitel 7.5.1.3 bzw. 7.5.3.1

7.2.2 LC-DAD-MS/MS Ion-Trap-System

Die Untersuchungen wurden mit einem LCQ-Advantage Ion-Trap Komplettsystem der Firma Thermo Finnigan/Egelsbach durchgeführt.

HPLC-System:

Degasser:	SCM 1000 Vakuum Membrane Degasser
Pumpe:	P 4000 Gradient Pumpe
Injektionsautomat:	AS 3000, Autosampler (gekühlt, 4 °C) mit integriertem Säulenofen (temperiert: 30 °C)
Injektionsvolumen:	10 µL und 40 µL
Trennsäule:	Nucleosil® 100, 250 x 4 mm, RP-C18, 5 µm (Macherey-Nagel)
Detektor:	UV 6000 LP, DHA
Messbereich:	190 - 800 nm
Auswertung:	Xcalibur™, Version 1.3, Thermo Finnigan/Egelsbach 1998-2001
Flussrate:	1 mL/min
Mobile Phase:	s. Kapitel 7.5.1.3 bzw. 7.5.3.1

LCQ-Advantage Ion-Trap:

Ionisierungsmethode: Electrospray ionisation (ESI, negative-Mode)

Tune-Page-Parameter:

Mass Range:	50 - 1000 [m/z]	Capillary Voltage:	-11 [V]
Sheat Gas Flow Rate:	60 [arb]	Tube Lens Offset:	-5 [V]
Auxillary Gas Flow Rate:	5 [arb]	Multipole 1 Offset:	1,75 [V]
Ion Spray Voltage:	4,5 [kV]	Lens Voltage:	14 [V]
Capillary Temperature:	280 [°C]	Multipole 2 Offset:	6,5 [V]

7.2.3 LC-MS/MS Triple-Quadrupol-System

Die Massenspektren zur Charakterisierung der in Kapitel 5.1 beschriebenen Syntheseprodukte wurden im Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt SVUA Detmold an einem Massenspektrometer Quattro Ultima mit Ion-Spray Interface und MassLynx-Auswertesoftware der Firma Micromass/Eschborn aufgenommen.

Quattro Ultima Triple Quadrupol:

Ionisierungsmethode: Electrospray ionisation (ESI, positive-Mode)

Tune-Page-Parameter:

Mass Range:	100 - 1000 [m/z]	Capillary Voltage:	3,5 [kV]
Cone Gas Flow:	100 [L/h]	Cone Voltage:	50 [V]
Desolvation Gas Flow:	500 [L/h]	Entrance:	50
Source Temperature:	125 [°C]	Exit:	50
Desolvation Temperature:	250 [°C]	Multiplier Voltage:	650 [V]

7.2.4 NMR-Spektrometer

Die ^1H -, ^{13}C - und DEPT135-NMR-Spektren wurden an einem AMX 300 Spektrometer der Firma Bruker/Rheinstetten (Magnetfeldstärke 7,05 T, ^1H -Resonanzfrequenz 300,13 MHz, ^{13}C -Resonanzfrequenz 75,43 MHz) mit einem 5mm inversen Dual-Probenkopf aufgenommen. Die Spektren wurden auf die jeweiligen Restlösemittelsignale von Aceton-d₆ (^1H : 2,04 ppm, ^{13}C : 29,8 und 206,2 ppm) bzw. CD_2Cl_2 (^1H : 5,35 ppm, ^{13}C : 53,8 ppm) referenziert.

7.2.5 Spektrophotometer

V-550 UV-VIS Spektrophotometer (Jasco/Groß-Umstadt):

Parameter:	Photometric Mode: Abs
Response:	Medium
Band Width:	1,0 nm
Scanning Speed:	100 nm/min
Bereich:	200 - 400 nm
Data Pitch:	0,5 nm
Küvetten:	Helma (optisches Glas); Nr. 6030, Durchmesser 10 mm

7.2.6 Mikrowellen-System

Die Microwave Solvent Supported Extraction (MSS) aus Gerste (s. Kapitel 7.5.2.2) wurde mit einer Mikrowelle ETHOS 1600 (MLS Mikrowellenlaborsysteme GmbH/Leutkirch) unter Verwendung der Software EASYWAVE[®] (Version 3.1.3.0, MLS GmbH/Leutkirch) durchgeführt.

7.2.7 pH-Meter

Es wurde ein Digital-pH-Meter 646 der Firma Knick/Berlin unter Verwendung einer Ingold Elektrode 402-M6-S7, nach vorheriger Kalibrierung mit 2 Pufferlösungen (pH-Werte 1 und 7), eingesetzt. Während der Messung wurde die jeweilige Lösung gerührt.

7.3 Lösungen

7.3.1 Mobile Phasen

Phosphatpuffer: In einem Becherglas wurden 1,38 g (10 mmol) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in 1000 mL bidest. Wasser gelöst und der Lösung 0,0744 g (0,3 mmol) EDTA (Titriplex III) zugefügt. Anschließend wurde die Lösung mit 14 %iger Phosphorsäure (w/w) auf pH 2 eingestellt. Dazu wurden 164,6 g (1,68 mol) 85 %ige Phosphorsäure (w/w) mit bidest. Wasser auf 1000 mL aufgefüllt. Der Phosphatpuffer wurde durch einen 0,2 μm Filter (Phenomenex/Aschaffenburg) filtriert und täglich frisch angesetzt.

Essigsäure (2,5 %; v/v und 8 %; v/v): Zur Herstellung der 2,5 %igen und 8 %igen Essigsäure wurden Eisessig und bidest. Wasser im Verhältnis 2,5:97,5 (v/v) bzw. 8:92 (v/v) gemischt und mit einem Magnetrührer gerührt. Im Anschluss wurden die beiden Lösungen durch einen 0,2 μm Filter (Phenomenex/Aschaffenburg) filtriert.

7.3.2 (+)-Catechin-Stammlösung

Es wurden 125 mg (+)-Catechin in 50 mL DMF/ H_2O (2:1; v/v) gelöst. Die Lösung wurde direkt nach ihrer Herstellung verwendet oder, falls erforderlich, bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ bis zur Messung gelagert. Alle weiteren im Rahmen dieser Arbeit verwendeten (+)-Catechin-Standard-Lösungen wurden durch Verdünnen dieser Stammlösung hergestellt.

7.4 Versuche zur Darstellung von Procyanidin B3

Darstellung von 5,7,3',4'-Tetra-O-benzylcatechin (2)

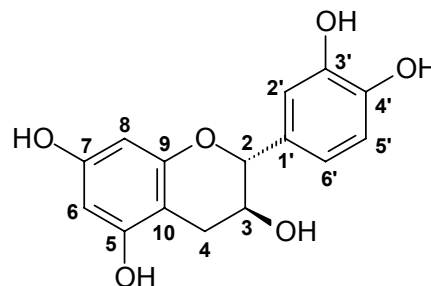
In einem Dreihalskolben, versehen mit Tropftrichter, Blasenzähler und Stickstoffballon, wurden 1,186 g (29,24 mmol) NaH unter Rühren in 30 mL wasserfreiem DMF gelöst. Hierzu wurde eine Lösung von 2 g (6,80 mmol) (+)-Catechin (20 h getrocknet im Ölpumpenvakuum bei $80\text{ }^\circ\text{C}$, 0,2 mbar) in 30 mL DMF tropfenweise innerhalb von 30 min zugegeben. Die braune Reaktionslösung wurde weitere 30 min gerührt und anschließend mit einem NaCl/Eiskältebad abgekühlt. Zu der abgekühlten Lösung wurden 30,60 mmol (4,5 eq.) Benzylbromid tropfenweise über eine Dauer von 20 min zugegeben, und die dunkelbraune Reaktionslösung im auftauenden Kältebad über 12 h gerührt. Anschließend wurde das DMF bei $38\text{ }^\circ\text{C}$ und 4 mbar unter Vakuum abdestilliert und der erhaltene bräunliche Rückstand (4,6 g) 20 h im Ölpumpenvakuum getrocknet. Zur Isolierung des Produktes wurde eine Kieselgel-Säule (40 x 5 cm) mit Ethylacetat/Dichlormethan (1:5; v/v) als Laufmittel eingesetzt. Die Ausbeute an dem weißen Feststoff 5,7,3',4'-Tetra-O-benzylcatechin betrug 2,27 g \triangleq 51,35 % der Theorie.

Charakterisierung:

1. (+)-Catechin

NMR-Spektroskopie:¹H-NMR (Aceton-d₆); chemische Verschiebungen δ in ppm:

6,91 (d, 2 Hz, 1H, H₂), 6,81 (d, 8 Hz, 1H, H₅), 6,77 (dd, 2 und 8 Hz, 1H, H₆), 6,03 (d, 2 Hz, 1H, H₈), 5,89 (d, 2 Hz, 1H, H₆), 4,57 (d, 7 Hz, 1H, H₂), 4,01 (ddd, 4 - 7 Hz, 1H, H₃), 2,92 (dd, 4 und 9 Hz, 1H, H_{4 α}), 2,54 (dd, 4 und 9 Hz, 1H, H_{4 β}).

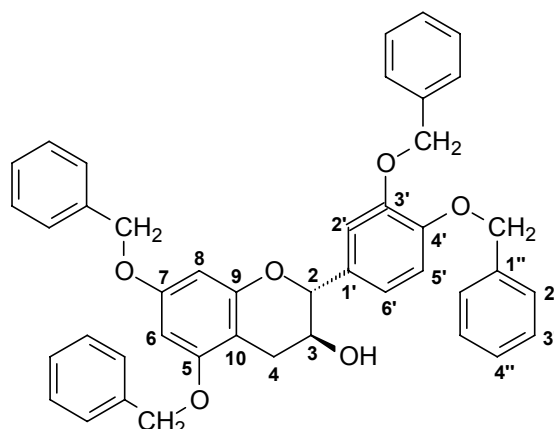
¹³C-NMR (Aceton-d₆); δ in ppm:

156,9 (C₇), 156,7 (C₅), 156,6 (C₉), 145,2 (C_{3'}, C_{4'}), 131,8 (C_{1'}), 119,7 (C_{6'}), 115,3 (C_{5'}), 114,9 (C_{2'}), 100,2 (C₁₀), 95,7 (C₆), 95,0 (C₈), 82,4 (C₂), 67,9 (C₃), 28,7 (C₄).

2. 5,7,3',4'-Tetra-O-benzylcatechin

NMR-Spektroskopie:¹H-NMR (CD₂Cl₂); chemische Verschiebungen δ in ppm:

7,47 - 7,34 (m, 20H, H_{2''} - H_{4''}), 7,07 (d, 2 Hz, 1H, H₂), 6,98 (m, 2H, H_{5'} und H_{6'}), 6,29 (d, 2 Hz, 1H, H₈), 6,21 (d, 2 Hz, 1H, H₆), 5,14 - 5,02 (4s, 8H, O-CH₂), 4,66 (d, 8 Hz, 1H, H₂), 4,04 (ddd, 5 - 14 Hz, 1H, H₃), 3,07 (dd, 5 und 14 Hz, 1H, H_{4 α}), 2,63 (dd, 8 und 14 Hz, 1H, H_{4 β}).

¹³C-NMR (CD₂Cl₂); δ in ppm:

158,9 (C₇), 157,9 (C₅), 155,5 (C₉), 149,3 (C_{3'}), 149,1 (C_{4'}), 137,5 - 137,2 (4C, C_{1''}), 131,3 (C_{1'}), 128,7 - 127,3 (20C, C_{2''} - C_{4''}), 120,6 (C_{6'}), 114,7 (C_{5'}), 113,8 (C_{2'}), 102,5 (C₁₀), 94,5 (C₆), 93,8 (C₈), 81,6 (C₂), 71,2 - 70,0 (4C, O-CH₂), 68,0 (C₃), 27,8 (C₄).

Massenspektrometrie (ESI, positive-Mode):

5,7,3',4'-Tetra-O-benzylcatechin wurde in Ethylacetat/Methanol/Ameisensäure im Verhältnis 3:1:0,5 (v/v/v) gelöst ($\beta = 0,1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) und mittels Direktinjektion vermessen (s. Kapitel 7.2.3).

Full-Scan 5,7,3',4'-Tetra-O-benzylcatechin: m/z 651: Precursor-Ion [M+H]⁺
 m/z 673: Natrium-Addukt [M+Na]⁺
 m/z 689: Kalium-Addukt [M+K]⁺

Product-Scan von m/z 651: m/z 291: (+)-Catechin [M+H]⁺
 m/z 319: Spaltung C-Ring

3,5,7,3',4'-Penta-O-benzylcatechin: m/z 741: Precursor-Ion [M+H]⁺
 m/z 763: Natrium-Addukt [M+Na]⁺
 m/z 779: Kalium-Addukt [M+K]⁺

Darstellung von 5,7,3',4'-Tetra-O-benzyl-4-(2-Hydroxyethoxy)-catechin (3)

In einem Dreihalskolben mit Tropftrichter, Blasenähler und Stickstoffballon wurden 3 g (4,62 mmol) 5,7,3',4'-Tetra-O-benzylcatechin in 30 mL wasserfreiem Dichlormethan gelöst. Bei Raumtemperatur wurden unter Rühren nacheinander zuerst 1,5 mL (24,70 mmol) Ethylenglycol gefolgt von 2,1 g (9,24 mmol) DDQ zugegeben. Hierbei fand ein Farbumschlag der Reaktionslösung von schwarz-grün nach dunkelbraun statt, während schrittweise der Ausfall eines hellgrauen Niederschlages in der Ethylenglycol-Phase zu beobachten war.

Nachfolgend wurde das Reaktionsgemisch 110 min bei RT stark durchmischt, mit 1,1 mL (9,21 mmol) 4-Dimethylaminopyridin versetzt und erneut 5 min gerührt. Die nun intensiv dunkelgrün gefärbte Reaktionslösung wurde mit 25 g Kieselgel versetzt und am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 35 °C bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde auf eine Kieselgelsäule (40 x 5 cm) aufgetragen und alle mobilen Produkte mit dem Laufmittel Ethylacetat/Hexan (1:1; v/v) eluiert. Um das Produkt zu erhalten, wurde mit Kieselgel und dem Laufmittel Ethylacetat/Hexan (2:3; v/v) rechromatographiert. Das Eluat wurde am Rotationsverdampfer eingengt und der erhaltene kristalline weiße Feststoff in Petrolether unter Zugabe von Dichlormethan umkristallisiert. Die erhaltene Ausbeute betrug 1,4 g \triangleq 42,68 % der Theorie.

Charakterisierung:

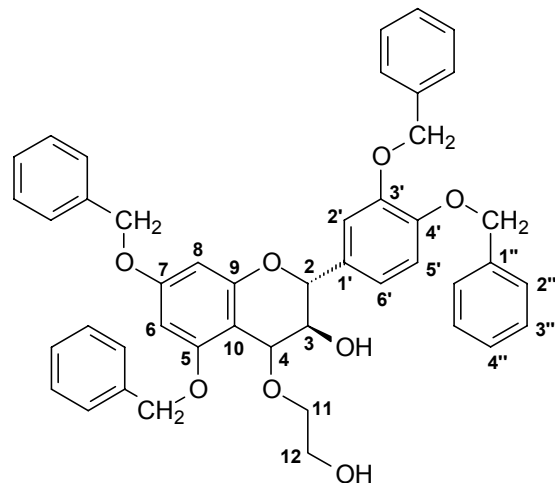
NMR-Spektroskopie:

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2); chemische Verschiebungen δ in ppm:

7,48 - 7,33 (m, 20H, $\text{H}_{2''}$ - $\text{H}_{4''}$), 7,15 (d, 2 Hz, 1H, $\text{H}_{2'}$), 7,00 (dd, 2 und 8 Hz, 1H, H_6), 6,97 (d, 8Hz, 1H, H_5), 6,29 (d, 2 Hz, 1H, H_8), 6,16 (d, 2 Hz, 1H, H_6), 5,28 (d, 8 Hz, 1H, H_2), 5,14 - 5,01 (4s, 8H, O- CH_2), 4,81 (d, 5 Hz, 1H, H_4), 4,10 (dd, 5 und 12 Hz, 1H, H_3), 3,83 (m, 1H, H_{11}), 3,62 (t, 5 Hz, 1H, H_{12}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2); δ in ppm:

160,8 (C_7), 158,6 (C_5), 155,9 (C_9), 149,0 ($\text{C}_{3'}$), 148,8 ($\text{C}_{4'}$), 137,3 - 136,8 (4C, $\text{C}_{1''}$), 131,5 ($\text{C}_{1'}$), 128,7 - 127,5 (20C, $\text{C}_{2''}$ - $\text{C}_{4''}$), 122,0 (C_6), 114,8 (C_5), 114,1 (C_2), 104,2 (C_{10}), 94,9 (C_6), 94,0 (C_8), 77,5 (C_2), 73,5 (C_{11}), 71,7 - 70,6 (4C, O- CH_2), 71,6 (C_3), 71,2 (C_4), 62,7 (C_{12}).



Massenspektrometrie (ESI, positive-Mode):

5,7,3',4'-Tetra-O-benzyl-4-(2-Hydroxyethoxy)-catechin wurde in Acetonitril/Ameisensäure 5:0,1 (v/v) gelöst ($\beta = 100 \text{ ng}/\mu\text{L}$) und mittels Direktinjektion vermessen (s. Kapitel 7.2.3).

Full-Scan: m/z 733: Natrium-Addukt $[\text{M}+\text{Na}]^+$
 Product-Scan von m/z 733: m/z 671: Abspaltung $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_2$

7.5 Methodenentwicklung

7.5.1 Entwicklung der HPLC-DAD-Bedingungen für (+)-Catechin

7.5.1.1 UV-Absorptionsmaximum

Es wurde eine (+)-Catechin-Standard-Lösung der Massenkonzentration $\beta = 250$ mg/L sowohl in Phosphatpuffer (pH 2) als auch in Essigsäure (2,5 %; v/v) und in DMF/H₂O (2:1; v/v) hergestellt (s. Kapitel 7.3.2) und diese mit dem in Kapitel 7.2.5 beschriebenen Spektrophotometer gegen die jeweilige Blindlösung vermessen.

7.5.1.2 pKs-Wert

In Vorversuchen wurde der Zusammenhang zwischen UV-Absorption und Konzentration der (+)-Catechin-Lösung ermittelt. Die Endkonzentration der Messlösung wurde auf 200 mg/L und somit auf eine Absorption von 1 eingestellt. Zur Herstellung der Messlösungen wurden 70 mL bidest. Wasser in einem Becherglas vorgelegt und mit 1 mL (+)-Catechin-Standard-Lösung in DMF/H₂O (2:1; v/v) der Konzentration 15 g/L versetzt. Unter Rühren erfolgte durch tropfenweise Zugabe von Natronlauge (0,025; 0,05; 0,1 und 1 mol/L) die Einstellung der pH-Werte von 9 bis 13 in 0,125er-Schritten (pH-Meter s. Kapitel 7.2.7). Die Herstellung der Referenzlösung erfolgte äquivalent zur Messlösung, ohne Zusatz der (+)-Catechin-Lösung. Die UV-Messung der jeweiligen Lösung gegen die Referenz erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm und wurde dreimal durchgeführt (Spektrophotometer s. Kapitel 7.2.5).

7.5.1.3 Mobile Phase

Zur Ermittlung einer geeigneten mobilen Phase wurde eine (+)-Catechin-Lösung der Massenkonzentration $\beta = 250$ mg/L in DMF/H₂O (2:1; v/v) gelöst und mit der unter Kapitel 7.2.1 beschriebenen Gerätekombination zehnmal chromatographisch vermessen. In einer ersten Versuchsreihe wurde als mobile Phase ein wie in Kapitel 7.3.1 beschriebener 0,01 molarer Phosphatpuffer, weiterhin ein halb konzentrierter 0,005 molarer Phosphatpuffer sowie ein 0,01 molarer Phosphatpuffer ohne Zugabe von EDTA hergestellt und nacheinander vermessen. Für den jeweiligen Phosphatpuffer (pH 2) und Acetonitril wurde der in Tabelle 27 beschriebene Gradientenverlauf eingesetzt (Gradient **P1**).

Tabelle 27: Zeitlicher Verlauf des Gradienten **P1**

Zeit [min]	Mobile Phase A [%] (Phosphatpuffer)	Mobile Phase B [%] (Acetonitril)
0	100	0
30	90	10
40	100	0
45	100	0

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die (+)-Catechin-Lösung der Massenkonzentration $\beta = 250$ mg/L mittels HPLC-DAD unter Verwendung von Essigsäure der Konzentrationen 2,5 % (v/v) und 8 % (v/v) als mobile Phase chromatographisch vermessen. Hierzu wurden die beiden Essigsäure-Lösungen wie in Kapitel 7.3.1 beschrieben hergestellt (Gradient **E1**).

Tabelle 28: Zeitlicher Verlauf des Gradienten **E1**

Zeit [min]	Mobile Phase A [%] (Essigsäure, 2,5 %; v/v)	Mobile Phase B [%] (Essigsäure, 8 %; v/v)
0	95	5
5	90	10
30	70	30
35	50	50
40	95	5
45	95	5

7.5.1.4 Lösemittel der Messprobe

Es wurden (+)-Catechin Standard-Lösungen der Massenkonzentrationen $\beta = 250$ mg/L und 125 mg/L in DMF/H₂O (2:1; v/v), Methanol, Ethanol, Ethylacetat und Essigsäure (2,5 % und 8 %; v/v) hergestellt und jeweils fünfmal mittels HPLC-DAD bei einer Wellenlänge von 280 nm untersucht. Für die Messungen wurden die in Tabelle 27 und 28 beschriebenen Gradienten **P1** und **E1** eingesetzt.

7.5.1.5 Vorauswahl der analytischen Trennsäule

Um den Einfluss der Flussrate auf die Retentionszeit und die Basislinienbreite von (+)-Catechin zu untersuchen, wurde eine (+)-Catechin-Standard-Lösung der Konzentration $\beta = 250$ mg/L in DMF/H₂O (2:1; v/v) mit den in Tabelle 29 aufgeführten Reversed-Phase-Säulenmaterialien bei Flussraten von 150 μ L/min bis maximal 2400 μ L/min der Gradienten **P1** (s. Tabelle 27) und **E1** (s. Tabelle 28) jeweils viermal chromatographisch untersucht.

Tabelle 29: Bezeichnung, Material, Dimension und Hersteller der eingesetzten Reversed-Phase-Säulen

Bezeichnung	Phase	Particle Size/ Pore Size	Dimension [mm]	Hersteller
Wakosil II 3C18 RS	C18	3 μ m, 120 Å, unpolar endcapped	100 x 4,0	SGE Chromatographie- Produkte/Darmstadt
Nautilus, Nucleosil, 100-5 C18	C18	5 μ m, 100 Å, polar endcapped	125 x 2,0	Macherey-Nagel/ Düren
YMC-Pack ODS-AM	C18	5 μ m, 120 Å, unpolar endcapped	150 x 3,0	YMC Europe/ Schermbek
Synergi 4 μ Hydro RP	C18	4 μ m, 80 Å, polar endcapped	250 x 2,0	Phenomenex/ Aschaffenburg

Fortsetzung von Tabelle 29:

Omnispher 5 C18	C18	5 µm, 110 Å, nicht endcapped	250 x 3,0	Varian/ Darmstadt
Nucleosil 100 C18	C18	5 µm, 100 Å, unpolar endcapped	250 x 4,0	Macherey-Nagel/ Düren
Chromolith Performance RP-18e	C18	2 µm Macroporen, Mesoporen, unpolar endcapped	100 x 4,6	Merck/ Darmstadt
Nucleosil 50-5 C8 eC	C8	5 µm, 50 Å, unpolar endcapped	125 x 2,0	Macherey-Nagel/ Düren
Synergi 4µ Polar-RP	Phenyl	4 µm, 80 Å, polar endcapped	150 x 2,0	Phenomenex/ Aschaffenburg
Zorbax	Phenyl	5 µm, 100 Å, nicht endcapped	150 x 2,0	Phenomenex/ Aschaffenburg
Luna 5µ Phenyl-Hexyl	Phenyl- Hexyl	5 µm, 100 Å, encapped	250 x 2,0	Phenomenex/ Aschaffenburg
Discovery RP-Amide C16	C16, Amid	5 µm, 180 Å, encapped	150 x 2,1	Supelco/ Taufkirchen
Discovery Cyano	CN	5 µm, 180 Å, encapped	150 x 2,1	Supelco/ Taufkirchen
Discovery HS PEG	Poly ethylen glycol	5 µm, 120 Å, nicht endcapped	250 x 4,6	Supelco/ Taufkirchen
Discovery HS F5	Penta fluoro phenyl	5 µm, 120 Å, encapped	250 x 4,6	Supelco/ Taufkirchen

7.5.2 Optimierung der Probenvorbereitung

7.5.2.1 Extraktion mit dem Ultra-Turrax

Für einen Extraktionsansatz zur Analyse wurde eine repräsentative 30 g Probe Braugerste eingewogen, mit einer Getreidemühle (Modell 862; Jupiter/Schorndorf) fein gemahlen und unter Lichtausschluss mit Hilfe der Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-4 (Anlagensteuerung LCD 1M; Christ/Osterode am Harz) lyophilisiert. Anschließend wurde die gemahlene Gerste einmal unter Zusatz von 0,5 g (2,6 mmol) Natriumdisulfit mit 100 mL eines auf 4 °C gekühlten Aceton/Wasser-Gemisches (3:1; v/v) versetzt und unter Kühlung (NaCl/Eiskältebad) mit einem Ultra-Turrax (T25, mit Aufsatz SN 25, IKA-Labortechnik/Staufen) 1 min bei 24.000 U/min in einem Braunglas-Gefäß extrahiert. Der Extrakt wurde dann unter Wasserstrahl-pumpenvakuum über eine Nutsche mit einem Schwarzband-Papierfilter (Schleicher & Schüll/Dassel) abgesaugt. Die Extraktion wurde noch dreimal mit jeweils 100 mL des auf 4 °C temperierten Aceton/Wasser-Gemisches für jeweils 10 min wiederholt. Während der Extraktion wurde die Temperatur des Extraktes mittels des NaCl/Eiskältebad auf maximal 30 °C gehalten. Die erhaltenen Filtrate wurden vereinigt und das Aceton am Rotationsverdampfer (Wasserbadtemperatur bis maximal 40 °C) entfernt. Die wässrige Phase wurde 4 h

bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und anschließend unter Lichtausschluss lyophilisiert. Der erhaltene gelb-bräunliche Feststoff wurde entweder für eine längere Lagerungsdauer bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren oder für die chromatographische Bestimmung in DMF/H₂O (2:1; v/v) gelöst. Bei Extraktionen mit größeren Ausgangsvolumina muss die Anzahl der Extraktionsschritte sowie die Extraktionsmittelmenge äquivalent erhöht werden.

7.5.2.2 Mikrowellengestützte Extraktion (MSS)

Wie unter Kapitel 7.5.2.1, wurden für einen Extraktionsansatz 30 g einer repräsentativen Gerstenprobe mit der Getreidemühle fein gemahlen. Anschließend wurde die gemahlene Gerste in einem Rundkolben mit Flachboden mit 100 mL eines Aceton/Wasser-Gemisches (3:1; v/v) unter Zusatz von 0,5 g (2,6 mmol) Natriumdisulfit in der Mikrowelle (s. Kapitel 7.2.6) unter Rühren extrahiert. Die Gesamtdauer des Extraktionsprogrammes betrug 15 min, wobei nach einer fünf-minütigen Aufwärmphase der Mikrowelle auf $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ eine zehn-minütige Extraktion bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ folgte. Der erhaltene Extrakt wurde abgesaugt und danach erneut noch dreimal mit jeweils 100 mL Aceton/Wasser (3:1; v/v) aufgeschlämmt, erneut in der Mikrowelle extrahiert und abgesaugt. Die anschließenden Schritte der Extraktion wurden wie unter Kapitel 7.5.2.1 beschrieben durchgeführt.

7.5.3 Optimierung der HPLC-DAD-Bedingungen

7.5.3.1 Gradientenverlauf

Zur Optimierung des Gradientenverlaufes wurden sowohl der mit dem Ultra-Turrax (s. Kapitel 7.5.2.1) als auch der mittels MSS (s. Kapitel 7.5.2.2) gewonnene Gerstenextrakt mit der unter Kapitel 7.2.1 beschriebenen Gerätekombination chromatographisch untersucht. Die ausgehend von den Gradienten **E1** und **P1** (s. Kapitel 7.5.1.3) entwickelten und optimierten Gradienten **E2** und **P2** sind in Tabelle 30 und Tabelle 31 aufgeführt.

Tabelle 30: Zeitlicher Verlauf des Essigsäure/Acetonitril-Gradienten **E2**

Zeit [min]	Mobile Phase A [%] (Essigsäure, 2,5 %; v/v)	Mobile Phase B [%] (Essigsäure, 8 %; v/v)	Mobile Phase C [%] (Acetonitril)
0	95	5	0
20	90	10	0
50	70	30	0
55	50	50	0
60	0	100	0
100	0	50	50
110	0	0	100
120	0	0	100
135	95	5	0
140	95	5	0

Tabelle 31 Zeitlicher Verlauf des Phosphatpuffer (pH 2)/Acetonitril-Gradienten P2

Zeit [min]	Mobile Phase A [%] (Phosphatpuffer)	Mobile Phase B [%] (Acetonitril)
0	100	0
55	90	10
100	50	50
110	0	100
120	0	100
135	100	0
140	100	0

7.5.3.2 Analytische Trennsäulen

Zur Auswahl einer analytische Trennsäule wurden die in Tabelle 29 aufgeführten RP-Säulen (mit Ausnahme der Säulen Wakosil II 3C18 RS; Nautilus, 100-5C; Nucleosil 50-5 C8 eC; Discovery RP-Amide C16 und Discovery Cyano) auf ihre Eignung zur Trennung der Flavonoide in Gerstenextrakt untersucht. Hierzu wurden aufgearbeitete Gerstenproben bei Flussraten von 150 $\mu\text{L}/\text{min}$ bis maximal 2400 $\mu\text{L}/\text{min}$ der Gradienten **E2** (s. Tabelle 30) und **P2** (s. Tabelle 31) jeweils viermal chromatographisch mit der unter Kapitel 7.2.1 beschriebenen Gerätekombination untersucht.

7.5.3.3 Zusammenfassung der Methodenentwicklung: Allgemeingültige Vorgehensweise zur Bestimmung von Flavonoiden in Gerste

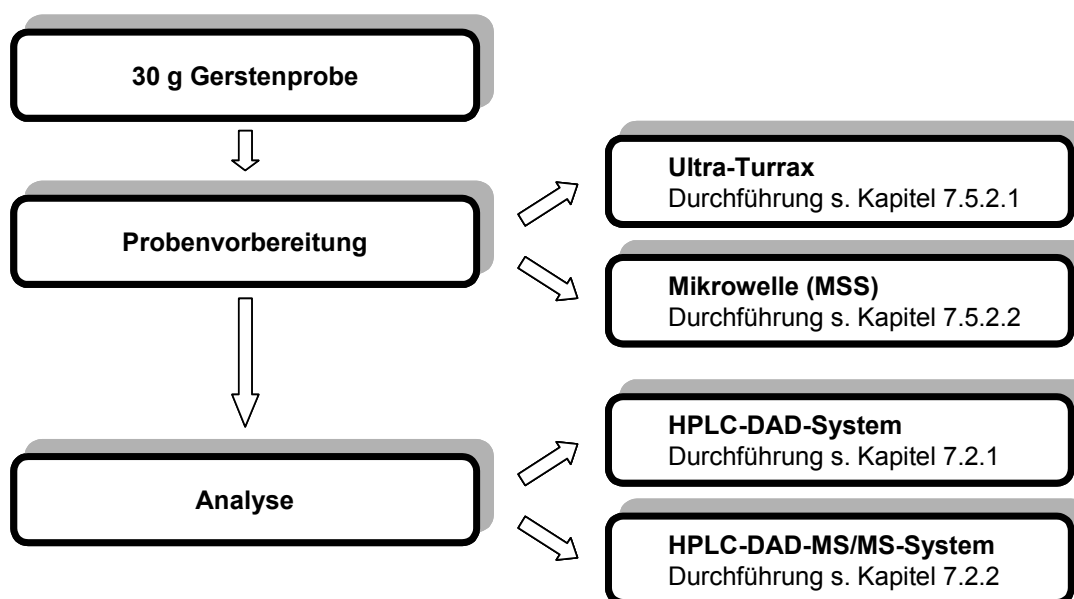


Abbildung 49: Vorgehensweise zur Bestimmung von Flavonoiden in Gerste

7.6 Validierung des HPLC-DAD-Verfahrens

Die im folgenden beschriebenen Validierungsschritte des HPLC-DAD-Verfahrens zur Bestimmung von (+)-Catechin wurden mit der unter Kapitel 7.2.1 beschriebenen HPLC-Anlage mit DAD-Detektor durchgeführt. Als mobile Phasen wurde sowohl der Essigsäure-Gradient **E2** als auch der Phosphatpuffer-Gradient **P2** eingesetzt (s. Tabelle 30 und Tabelle 31). Die Herstellung der mobilen Phasen erfolgte wie unter Kapitel 7.3.1 beschrieben. Eine zusammenfassender Überblick über die schematische Vorgehensweise ist in Abbildung 15 (s. Kapitel 5.4.) dargestellt.

7.6.1 Linearer Bereich

Zur Bestimmung des linearen Bereiches wurden (+)-Catechin-Standard-Lösungen der Konzentrationen 0,125 mg/L; 0,1875 mg/L; 0,25 mg/L; 0,625 mg/L; 1,25 mg/L; 1,875 mg/L; 2,5 mg/L; 6,25 mg/L; 12,5 mg/L; 18,75 mg/L; 25 mg/L; 62,5 mg/L; 125 mg/L; 187,5 mg/L; 250 mg/L; 625 mg/L; 1250 mg/L; 1875 mg/L und 2500 mg/L in DMF/H₂O (2:1; v/v) hergestellt und eine Zehnfach-Bestimmung durchgeführt.

7.6.2 Kalibriergerade

Der Arbeitsbereich wurde mit einer Massenkonzentration von 5 mg/L bis 2500 mg/L (+)-Catechin in DMF/H₂O (2:1; v/v) für die (+)-Catechin-Standard-Lösungen festgelegt. Mit zehn gleichmäßig über diesen Bereich verteilten Konzentrationen (5 mg/L; 250 mg/L; 500 mg/L; 750 mg/L; 1000 mg/L; 1250 mg/L; 1500 mg/L; 1750 mg/L; 2250 mg/L und 2500 mg/L) wurden zur Ermittlung der Kalibriergeraden jeweils zehn Bestimmungen durchgeführt.

7.6.3 Stabilität von (+)-Catechin in Kalibrierlösungen

Zur Untersuchung der Stabilität von (+)-Catechin wurden Standard-Lösungen mit den Massenkonzentrationen 5 mg/L, 250 mg/L und 500 mg/L in DMF/H₂O (2:1; v/v) hergestellt und bei Temperaturen von 5 °C und 25 °C über 72 h unter Lichtausschluss gelagert. Die Konzentrationen wurden in Intervallen von 140 min bestimmt.

Um die Stabilität unter Licht-Einwirkung zu untersuchen, wurden zwei Standard-Lösungen ($\beta = 125$ und 250 mg/L) (+)-Catechin in UV-durchlässige Vials gefüllt, in einem NaCl/Eiskältebad auf 5 °C temperiert, dem Sonnenlicht ausgesetzt und die Konzentrationen mittels HPLC-DAD über 9 h verfolgt.

Die Untersuchung der Langzeitstabilität wurde wie im folgenden beschrieben durchgeführt: es wurden zwei (+)-Catechin-Lösungen der Konzentrationen 125 mg/L und 250 mg/L in DMF/H₂O (2:1; v/v) angesetzt, bei -80 °C gelagert und in Zeitabständen von 1, 2, 8, 16, 22, 36, 65, 95, 99, 123, 165, 179, 190 und 219 Tagen bei einer Wellenlänge von 280 nm chromatographisch vermessen.

7.6.4 Stabilität von (+)-Catechin in Realproben

Zur Untersuchung der Stabilität von (+)-Catechin im Gerstenextrakt wurden drei Gerstenproben wie unter Kapitel 7.5.2.1 beschrieben aufgearbeitet. Zwei Analysenproben wurden bei 5 °C und 25 °C unter Lichtausschluss gelagert und in Zeitabständen von 160 min die (+)-Catechin-Konzentration mittels HPLC-DAD bestimmt. Die dritte Analysenprobe wurde in Aliquote aufgeteilt und diese bei einer Temperatur von -80 °C gelagert. Jedes zur Analyse entnommene Aliquot wurde vor der HPLC-DAD-Bestimmung 2 h auf 5 °C temperiert.

7.6.5 Spezifität

7.6.5.1 Spezifitätstest durch Vergleich der Retentionszeiten

Zum Vergleich der Retentionszeiten des (+)-Catechin-Peaks wurde Gerste wie unter Kapitel 7.5.2.1 beschrieben aufgearbeitet, in zwei Aliquote zu 500 µL geteilt, und sowohl unter Verwendung des Gradienten **E2** (s. Tabelle 30) als auch des Gradienten **P2** (s. Tabelle 31) mittels HPLC-DAD vermessen. Zu 500 µL des zweiten Aliquotes Gerstenextrakt wurden 500 µL einer (+)-Catechin-Standard-Lösung der Massenkonzentrationen $\beta = 250$ mg/L in DMF/H₂O (2:1; v/v) zudosiert und erneut injiziert.

7.6.5.2 Spezifitätstest durch Vergleich der Massenspektren

Es wurde eine Gerstenprobe wie unter Kapitel 7.5.2.2 beschrieben aufgearbeitet, in 3 mL DMF/H₂O (2:1; v/v) gelöst und mit dem Gradienten **E2** (s. Tabelle 30) sowie mit dem Gradienten **P2** (s. Tabelle 31) mit der unter Kapitel 7.2.2 beschriebenen LC-DAD-MS/MS-Gerätekombination chromatographiert. Zusätzlich wurde eine (+)-Catechin-Standard-Lösung ($\beta = 125$ mg/L) mit dem Gradienten **E2** analysiert.

7.6.6 Präzision

7.6.6.1 Messpräzision

Zur Ermittlung der Messpräzision wurden drei (+)-Catechin-Standard-Lösungen sowie zwei Gerstenproben (s. Kapitel 7.5.2.1) jeweils unter Verwendung des Gradienten **E2** (s. Tabelle 30) sowie des Gradienten **P2** (s. Tabelle 31) zehnmal injiziert und mittels HPLC-DAD (s. Kapitel 7.2.1) vermessen.

7.6.6.2 Methodenpräzision

Zur Ermittlung der Methodenpräzision unter Wiederholbedingungen wurden 360 g Gerste der Sorte „Annabell“ sowie „Viskosa“ fein gemahlen und in Aliquote zu 30 g aufgeteilt. Sechs Aliquote wurden dann wie unter Kapitel 7.5.2.1 und die weiteren sechs wie unter Kapitel 7.5.2.2 beschrieben aufgearbeitet. Der jeweils erhaltene Rückstand wurde für die chroma-

tographische Bestimmung in DMF/H₂O (2:1; v/v) gelöst und mit der unter Kapitel 7.2.1 beschriebenen Gerätekombination mit dem Gradienten **E2** (s. Tabelle 30) vermessen.

7.6.6.3 Tag-zu-Tag-Präzision

Zur Ermittlung der Tag-zu-Tag-Präzision wurden zwei (+)-Catechin-Standard-Lösungen der Konzentration $\beta = 125$ mg/L und 250 mg/L in DMF/H₂O (2:1; v/v) mit den in Tabelle 29 aufgeführten Alkyl-modifizierten RP-Säulenmaterialien bei Flussraten von 200 μ L/min bis 1000 μ L/min des Gradienten **E1** (s. Tabelle 28) jeweils viermal chromatographisch untersucht.

7.6.7 Wiederfindung

Zur Ermittlung der Wiederfindungsrate wurden 480 g Gerste „Annabell“ mit der Getreidemühle fein gemahlen und in 16 Aliquote aufgeteilt. Zu je vier Aliquoten wurden 10 mg, 20 mg und 30 mg (+)-Catechin-Trockensubstanz zudotiert. Jeweils zwei dieser Aliquote sowie je zwei undotierte Proben wurden mit dem Ultra-Turrax (s. Kapitel 7.5.2.1) und parallel dazu die anderen Proben mit der MSS (s. Kapitel 7.5.2.2) aufgearbeitet und anschließend unter Einsatz des Gradienten **E2** (s. Tabelle 30) mit der HPLC-DAD chromatographiert.

7.6.8 Robustheit

7.6.8.1 Einfluss des Packungsmaterials der Trennsäule

Es wurden die erhaltenen Messwerte aus Kapitel 7.5.1.5 herangezogen.

7.6.8.2 Einfluss des pH-Wertes der mobilen Phase

Es wurde eine (+)-Catechin-Standard-Lösung ($\beta = 125$ mg/L) mit der unter Kapitel 7.2.1 beschriebenen Gerätekombination jeweils zehnmal chromatographisch untersucht. Dazu wurde der Gradient **P2** (s. Tabelle 31) mit der unter Kapitel 7.3.1 beschriebenen Phosphatpuffer-Zusammensetzung eingesetzt. Zusätzlich wurden ein 0,005 mol/L Phosphatpuffer pH 2 (0,69 g NaH₂PO₄*H₂O in 1000 mL bidest. Wasser), ein 0,01 mol/L Phosphatpuffer pH 3 und ein 0,01 mol/L Phosphatpuffer pH 2 ohne Zusatz von EDTA verwendet.

7.7 Identifizierung in Gerste enthaltener Flavonoide mittels LC-DAD-MS/MS-Kopplung

7.7.1 Kollisionsexperimente mit monomeren Flavonoiden

Es wurden Lösungen mit (+)-Catechin, (-)-Epicatechin, (-)-Gallocatechin und (-)-Epigallocatechin ($\beta = 125$ mg/L) in DMF/H₂O (2:1; v/v) hergestellt und diese durch Direktinjektion

sowie durch chromatographische Bestimmungen mit dem Gradienten **E2** (s. Tabelle 30) mit der unter Kapitel 7.2.2 beschriebenen Gerätekombination untersucht. Für die MSⁿ-Untersuchungen wurde die Kollisionsenergie in 10er-Schritten von 10 % auf 60 % erhöht, die MS³-Experimente wurden mit einer CID-Energie von 30 % sowie 50 % durchgeführt.

7.7.2 Precursor-Ion-Scan-Experimente mit Gerstenextrakten

Zur Identifizierung der einzelnen Gersteninhaltsstoffe wurde Gerste, wie unter Kapitel 7.5.2.1 beschrieben, aufgearbeitet und die Messproben mit den Gradienten **E2** und **P2** mittels LC-DAD-MS/MS (s. Kapitel 7.2.2) über einen Massenbereich von m/z 50 - 2000 gescannt.

7.7.3 Identifizierung einzelner Gersteninhaltsstoffe durch MSⁿ-Untersuchungen

Die Kollisionsexperimente wurden an wie unter Kapitel 7.5.2.1 beschrieben aufgearbeiteten Gerstenextrakten durchgeführt. Als mobile Phase wurden die Gradienten **E2** und **P2** eingesetzt. Für die MSⁿ-Untersuchungen wurde die Energie in 10er-Schritten von 10 % auf 60 % erhöht, die MS³-Experimente wurden mit CID-Energien von 30 % und 50 % durchgeführt.

7.8 Bestimmung von Flavonoiden in Realproben

7.8.1 Bestimmung von Flavonoiden in Sommergersten mittels HPLC-DAD

Es wurden jeweils repräsentative 30 g Proben Braugerste der Sorten „Annabell“ (Tausend-Korn-Gewicht: 54,5 g; Keimfähigkeit: 96), „Henni“ (Tausend-Korn-Gewicht: 42,8 g; Keimfähigkeit: 98) und „Viskosa“ (Tausend-Korn-Gewicht: 51,2 g; Keimfähigkeit: 97) des Erntejahres 2000, bezogen von der Hordsaat Saatzucht GmbH/Böhnshagen, fein gemahlen, lyophilisiert und anschließend wie unter Kapitel 7.5.2.1 beschrieben aufgearbeitet. Der erhaltene Rückstand wurde in 3 mL DMF/H₂O (2:1; v/v) aufgenommen und mit der unter Kapitel 7.2.1 beschriebenen Gerätekombination jeweils fünfmal (Gradient **E2**, s. Tabelle 30) chromatographisch vermessen.

7.8.2 Bestimmung von Flavonoiden in Brauprozessproben mittels LC-DAD-MS/MS

7.8.2.1 Kalibrierung des LC-DAD-MS/MS-Verfahrens

Die Kalibrierungsuntersuchungen des LC-DAD-MS/MS-Verfahrens zur Bestimmung von (+)-Catechin wurden mit der unter Kapitel 7.2.2 beschriebenen HPLC-Anlage mit DAD- und MS-Detektor mit dem Gradienten **E2** als mobile Phase durchgeführt (s. Tabelle 30).

Zur Bestimmung des **linearen Bereiches** wurden (+)-Catechin-Standard-Lösungen der Konzentrationen 0,0625 mg/L; 0,125 mg/L; 0,1875 mg/L; 0,25 mg/L; 0,625 mg/L; 1,25 mg/L; 1,875 mg/L; 2,5 mg/L; 6,25 mg/L; 12,5 mg/L; 18,75 mg/L; 25 mg/L; 62,5 mg/L; 125 mg/L; 187,5 mg/L; 250 mg/L; 1250 mg/L; 1875 mg/L und 2500 mg/L in DMF/H₂O (2:1; v/v) hergestellt und jeweils eine Zehnfach-Bestimmung durchgeführt. Nach Festlegung des Arbeitsbereiches von 1,875 mg/L bis 2500 mg/L (+)-Catechin wurden zur Ermittlung der **Kalibrierfunktion** mit zehn gleichmäßig über diesen Bereich verteilten Konzentrationen jeweils zehn Analysen durchgeführt: 1,875 mg/L; 50 mg/L; 500 mg/L; 750 mg/L; 1000 mg/L; 1250 mg/L; 1500 mg/L; 1750 mg/L; 2250 mg/L und 2500 mg/L.

7.8.2.2 Bestimmung der Flavonoide in Brauprozessproben

Zur Flavonoid-Bestimmung in verschiedenen Brauprozessproben wurde von der Warsteiner-Brauerei (Warstein) ein Bierbrauprozess exemplarisch nachgestellt. Die während des Brauprozesses gezogenen Proben sind in Tabelle 32 zusammengestellt.

Tabelle 32: Brauprozessproben: Bezeichnung, entnommenes Probevolumen, Gewicht sowie erhaltene Menge an Trockensubstanz nach Lyophilisierung

Probenbezeichnung	Volumen [mL]	Gewicht [g]	Trockensubstanz nach Lyophilisierung [g]
Maischen			
1. Malz	-	30	-
2. Ende Einmaischen	480	518,8	114,9
3. Ende Maischen	480	506,0	109,1
Läutern			
4. Mitte Vorderwürze	475	506,7	68,6
5. Mitte Nachguss	480	481,6	10,6
6. Ende Nachguss	480	472,8	3,0
Würzekochen			
7. Anfang Kochen	460	472,8	51,6
8. Mitte Kochen	411	430,2	28,2
9. Ende Kochen	420	420,0	46,9
Whirlpool			
10. Whirlpool Rast Anfang	420	443,0	50,8
11. Whirlpool Rast Ende	430	442,2	50,4
Kühlung			
12. Köhlen Anfang	440	457,8	39,5
13. Köhlen Mitte	400	400,9	21,1
14. Köhlen Ende	440	457,8	60,2
Gärung			
15. Gärung 1. Tag	510	563,8	22,6
16. Gärung 3. Tag	585	589,9	22,4
17. Gärung 6. Tag	560	563,8	22,0
18. Schlauchen	510	501,7	16,0

Fortsetzung von Tabelle 32:

Bier			
19. unfiltriertes Bier	438	440,3	16,5
20. nach Kieselgurfilter	465	467,2	15,9
21. nach PVPP	500	501,1	18,3
22. nach Schichtenfilter	449	449,3	16,7
23. abgefülltes Bier	500	501,3	19,2

Prozessführung und Probenahme:

Das für einen Braudurchgang eingesetzte Malz (9450 kg) setzte sich, wie in Tabelle 33 aufgeführt, aus 10 verschiedenen Malzsorten zusammen.

Tabelle 33: Zusammensetzung des zum Brauen eingesetzten Malzes

Sorte	Menge [kg]	Sorte	Menge [kg]
Soufflet	1150	Durst	1300
Mainmalz	550	Malteurop	2000
Schweinfurt	600	Palatia a	500
Bamberger	850	Palatia b	950
Weissheimer	550	Thywissen	1000

Maischen: Zum Maischen wurde eine Gesamtschüttung von 9450 kg Malz mit 358 hL Wasser, dem sogenannten Hauptguss, und 65 hL Glattwasser eingesetzt. Die Maischzeit betrug insgesamt 93 min. Der hierbei eingesetzte Temperaturverlauf ist in Abbildung 45 (s. Kapitel 5.7.2.2) dargestellt. Die erste Probenahme erfolgte am Ende des Einmaischens (2. Probe **Ende Einmaischen**) und die zweite Probenahme am Ende des Maischens jeweils mit einer Schöpfkelle direkt aus dem Maischbottich (3. Probe **Ende Maischen**).

Läutern: Zum sogenannten Abläutern, dem Filtern der Maische, um Treber (feste Bestandteile) und Würze (Flüssigkeit) vollständig voneinander abzutrennen, wurde die Maische in den sogenannten Läuterbottich gepumpt. Die Vorderwürze bestand hierbei aus 260 hL Wasser. Nach 130 hL wurde die 4. Probe **Mitte Vorderwürze** direkt mit einer Schöpfkelle entnommen. Der Nachguss bestand aus 380 hL Wasser. Die Probenahme erfolgte hier einmal nach 160 hL (5. Probe **Mitte Nachguss**) sowie nach 380 hL am Ende des Nachgusses (6. Probe **Ende Nachguss**). Die letzten Nachgüsse (32 hL) heißen Glattwasser, sind kaum noch würzehaltig, und wurden deshalb zum Einmaischen des nächsten Sudes verwendet.

Würzekochen: Die Vorderwürze und die Nachgüsse wurden in der Würzpfanne (Würzkesel) gesammelt, und am Ende des Läutervorganges, dem sogenannten Zeitpunkt „Panne voll“, wurde damit begonnen, die Würze zu kochen. Die Hopfengabe (CO₂- und Ethanol-Extrakt) erfolgte in mehreren Schritten. Der Temperaturverlauf des insgesamt 62-minütigen Würzekochens ist in Abbildung 46 (s. Kapitel 5.7.2.2) dargestellt. Die Probenahmen über einen Auslasshahn erfolgten nach fünf-minütigem (7. Probe **Anfang Kochen**), nach 30-minütigem (8. Probe **Mitte Kochen**) sowie nach 62-minütigem (9. Probe **Ende Kochen**) Kochen der Würze.

Whirlpool: Nach dem Hopfensud wurde die Würze ausgeschlagen. Dann wurde die heiße Würze (bei etwa 98 °C) in den sogenannten Whirlpool transferiert, und es wurden die Eiweiß- und Hopfenbestandteile (Heißstrub) abgetrennt. Der Vorgang dauerte 20 min und es wurde zu Beginn (10. Probe **Whirlpool Rast Anfang**) und am Ende (11. Probe **Whirlpool Rast Ende**) eine Probe entnommen.

Kühlung: Nachfolgend wurde die Würze über einen Zeitraum von 52 min auf eine Temperatur von etwa 12 °C abgekühlt. Die Probenahme erfolgte nach 5 Minuten (12. Probe **Kühlen Anfang**), nach 25 Minuten (13. Probe **Kühlen Mitte**) und nach 50 min (14. Probe **Kühlen Ende**).

Gärung: Nach Beendigung des Kühlvorganges wurde die Würze in die sogenannten Gärbottiche bzw. Gärtanks gepumpt und Hefe zugesetzt, um die Gärung, die Umwandlung des Malzzuckers in Alkohol und Kohlensäure, zu starten. Während der Gärung wurden Proben am ersten Tag (15. Probe **Gärung 1. Tag**), am dritten Tag (16. Probe **Gärung 3. Tag**) und am sechsten Tag (17. Probe **Gärung 6. Tag**), dem Ende der Hauptgärung, gezogen. Zur Reifung wurde das Bier dann in Lagertanks abgefüllt. Bei diesem sogenannten zehnstündigen „Schlauchen“ wird die Hefe abgetrennt. Hierbei erfolgte erneut eine Probenahme (18. Probe **Schlauchen**).

Bier: Im Anschluss an die Reifung des Jungbieres wurden drei Filtrationsschritte des gereiften Bieres durchgeführt. Um den Einfluss dieser Schritte auf die Flavonoid-Abtrennung zu untersuchen, wurden Proben des unfiltrierten Bieres (19. Probe **unfiltriertes Bier**), im Anschluss an die Kieselgurfiltration (20. Probe **nach Kieselgurfilter**), im Anschluss an die Filtration über PVPP (21. Probe **nach PVPP**) und im Anschluss an die abschließende Filtration über einen Schichtenfilter (22. Probe **nach Schichtenfilter**) entnommen. Das nun fertige Bier wurde in Flaschen abgefüllt und abschließend der Flavonoid-Gehalt bestimmt (23. Probe **abgefülltes Bier**).

Probenvorbereitung: Nach der Probenahme wurden die Proben des **Maischens** und des **Läuterns** 10 min in einem Wasserbad (15 °C) auf RT abgekühlt, bei -80 °C eingefroren und anschließend lyophilisiert. Bei den Proben des **Würzekochens**, aus dem Prozess im **Whirlpool**, sowie beim **Kühlen** wurde vor dem Abkühlen auf RT ein Zentrifugationsschritt zur Abtrennung der festen Bestandteile vorgeschaltet. Die Proben der **Gärung** und des gebrauten **Bieres** wurden ohne Vorbehandlung direkt bei -80 °C eingefroren und lyophilisiert.

Zur **chromatographischen Bestimmung** wurden die jeweiligen Proben in DMF/H₂O (2:1; v/v) gelöst, und unter Verwendung der in Kapitel 7.2.2 beschriebenen LC-DAD-MS/MS Gerätekombination mit dem Gradienten **E2** (s. Tabelle 30) analysiert, mit Ausnahme der **Malzprobe** und der Proben der **Maische**. Hier wurden für jede Doppelbestimmung 30 g Trockensubstanz eingewogen und mit der Getreidemühle Jupiter fein gemahlen. Anschließend wurden die gemahlene Proben wie unter Kapitel 7.5.2.1 beschrieben aufgearbeitet, die erhaltenen Feststoffe in DMF/H₂O (2:1; v/v) aufgenommen und mittels HPLC-DAD-MS/MS untersucht.

8 Literatur

- [1] K. Forkel; *Das akute Koronarsystem*. Visite **17** (2002) 4-7.
- [2] G. D. Leonard, J. A. McCaffrey, M. Maher; *Optimal therapy for oesophageal cancer*. Cancer Treat. Rev. **29(4)** (2003) 275-282.
- [3] A. Lopez-Candales; *Cardiovascular diseases: a review of the hispanic perspective. Awareness is the first step to action*. J. Med. **33(1-4)** (2002) 227-245.
- [4] H. Hauner, A. Hamann, B. Husemann, H. Liebermeister, M. Wabitsch, J. Westenhöfer, W. Wiegand-Glebinski, A. Wirth, G. Wolfram; *Evidenzbasierte Leitlinie – Adipositas. Prävention und Therapie der Adipositas*. Deutsche Adipositas Gesellschaft, Deutsche Diabetes Gesellschaft, DGE (Hrsg.) (2003).
- [5] J. Fang, J. Wylie-Rosett, H. W. Cohen, R. C. Kaplan, M. H. Alderman; *Exercise, body mass index, caloric intake, and cardiovascular mortality*. Am. J. Prev. Med. **25(4)** (2003) 283-289.
- [6] A. Lucia, C. Earnest, M. Perez; *Cancer-related fatigue: can exercise physiology assist oncologists?* Lancet Oncol. **4(10)** (2003) 616-625.
- [7] H. Gin, V. Rigalleau, L. Baille; *Diet and physical activity in type 2 diabetes prevention*. Rev. Prat. **53(10)** (2003) 1074-1077.
- [8] M. Yao, A. H. Lichtenstein, S. B. Roberts, G. Ma, S. Gao, K. L. Tucker, M. A. McCrory; *Relative influence of diet and physical activity on cardiovascular risk factors in urban chinese adults*. Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. **27(8)** (2003) 920-932.
- [9] C. W. Kuzawa, L. S. Adair, J. L. Avila, J. H. Cadungog, N. A. Le; *Atherogenic lipid profiles in filipino adolescents with low body mass index and low dietary fat intake*. Am. J. Human Biol. **15(5)** (2003) 688-696.
- [10] M. G. L. Hertog, H. B. Bueno-de Mesquita, A. M. Fehily, P. M. Sweetnam, P. C. Elwood, D. Kromhout; *Fruit and vegetable consumption and cancer mortality in the caerphilly study*. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. **5(9)** (1996) 673-677.
- [11] G. Block, B. Patterson, A. Subar; *Fruits, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence*. Nutr. Cancer **18** (1992) 1-29.
- [12] C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, G. Paganga; *Antioxidant properties of phenolic compounds*. Trends Plant Sci. **2(4)** (1997) 152-159.
- [13] B. N. Ames, M. K. Shigenaga, T. M. Hagen; *Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging*. Proc. Natl. Acad. Sci. **90** (1993) 7915-7922.
- [14] B. Halliwell; *Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans*. Free Rad. Res. **25(1)** (1996) 57-74.
- [15] B. Watzl, C. Leitzmann (Hrsg.); *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*, 2. überarbeitete und erweiterte Auflage. Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart (1999).
- [16] S. Reuber, J. F. Bornman, G. Weissenböck; *A flavonoid mutant of barley (hordeum vulgare L.) exhibits increased sensitivity to UV-B radiation in the primary leaf*. Plant, Cell Environ. **19** (1996) 593-601.
- [17] G. U. Schönberger; *Gesundheitliche Wirkung von Anthocyanen*. In: *Gesunde Ernährung zwischen Natur- und Kulturwissenschaft*, 1. Auflage. Dr. Rainer Wild-Stiftung (Hrsg.), Heidelberg (1999) 229-234.
- [18] E. Teuscher; *Sekundärstoffe – Favoriten bei der Suche nach neuen Arzneistoffen?* Dtsch. Apoth. Ztg. **130** (1990) 1627-1633.
- [19] H. Oberitter; *Bericht zur DGE-Arbeitstagung 1998, Sekundäre Pflanzenstoffe*. DGE-Info (1998).
- [20] H. M. Meltzer, K. E. Malterud; *Can dietary flavonoids influence the development of coronary heart disease?* Scand. J. Nutr. **41(2)** (1997) 50-57.
- [21] Deutsche Gesellschaft für Ernährung; *Sekundäre Pflanzenstoffe - Ergebnisse der DGE-Arbeitstagung 1998*. Ernährungsumschau **46(1)** (1999) 22-23.
- [22] E. U. Graefe; H. Derendorf, M. Veit; *Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol quercetin in humans*. Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. **37(5)** (1999) 219-233.
- [23] P. C. H. Hollman; *Bioavailability of flavonoids*. Eur. J. Clin. Nutr. **51(1)** (1997) S66-S69.
- [24] V. Brucknek, A. Szent-Györgyi; *Chemical nature of Citrin*. Nature **138** (1936) 1057.
- [25] H.-K. Biesalski, P. Fürst, H. Kasper (Hrsg.); *Ernährungsmedizin*, 2. überarbeitete und erweiterte Auflage. Thieme-Verlag, Stuttgart, New York (1998).
- [26] S. Ruzsnyák, A. Szent-Györgyi; *Vitamin P: flavonols as vitamins*. Nature **138** (1936) 27.
- [27] C. R. Roger; *The nutritional incidence of flavonoids: some physiological and metabolic considerations*. Experientia **44(9)** (1988) 725-804.

- [28] P. C. H. Hollman, M. G. L. Hertog, M. B. Katan; *Analysis and health effects of flavonoids*. Food Chem. **57(1)** (1996), 43-46.
- [29] M. G. L. Hertog, P. C. H. Hollman; *Potential health effects of the dietary flavonol quercetin*. Eur. J. Clin. Nutr. **50** (1996), 63-71.
- [30] K. Robards, M. Antolovich; *Analytical chemistry of fruit bioflavonoids - a review*. Analyst **122** (1997) 11-34R.
- [31] J. Peterson, J. Dwyer; *Taxonomic classification helps identify flavonoid-containing foods on a semiquantitative food frequency questionnaire*. J. Am. Diet. Assoc. **98(6)** (1998) 677-682.
- [32] H. Böhm, H. Boeing, J. Hempel, B. Raab, A. Kroke; *Flavonole, Flavone und Anthocyane als natürliche Antioxidantien der Nahrung und ihre mögliche Rolle bei der Prävention chronischer Erkrankungen*. Z. Ernährungswiss. **37** (1998) 147-163.
- [33] DGE-Info, *Natürliche Antioxidantien und mögliche Prävention chronischer Erkrankungen*. Ernährungsumschau **9** (1998) 131-133.
- [34] K. Herrmann; *In pflanzlichen Lebensmitteln vorkommende Flavonoide als Antioxidantien*. Gordian **93(7/8)** (1993) 108-111.
- [35] J. Pérez-Illarbe; T. Hernández, I. Estrella; *Phenolic compounds in apples: varietal differences*. Z. Lebensm. Unters. Forsch. **192** (1991) 551-554.
- [36] K. Herrmann; *Flavonols and flavones in food plants: a review*. J. Food Technol. **11** (1976) 433-448.
- [37] S. Burda, W. Oleszek, C. Y. Lee; *Phenolic compounds and their changes in apples during maturation and cold storage*. J. Agric. Food Chem. **38** (1990) 945-948.
- [38] A. Crozier, M. E. J. Lean, M. S. McDonald, C. Black; *Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery*. J. Agric. Food Chem. **45** (1997) 590-595.
- [39] H. Kim, P. G. Keeney; *(-)-Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans*. J. Food Sci. **49(4)** (1984) 1090-1092.
- [40] R. Schildbach; *Brauerste weltweit*. Brauwelt **45** (1994) 2436-2456.
- [41] M. Böhm, S. Rosenkranz, U. Laufs; *Das „French Paradox“. Wirkungen von Alkohol, Wein und Weinhaltstoffen auf das Herz*. Dtsch. Med. Wochenschr. **127** (2002) 2748-2756.
- [42] G. Derdelinckx, J. Jerumanis; *Separation of malt and hop proanthocyanidins on Fractogel TSK HW-40 (S)*. J. Chromatogr. **285** (1984) 231-234.
- [43] I. McMurrugh, G. P. Hennigan; *Tanning properties of flavanols in barley and hops measured by reaction with cichonine sulphate in relation to haze formation in beer*. J. Inst. Brew. **90** (1984) 24-32.
- [44] J. A. Delcour, L. L. Verhulst, R. Geys, H. Deliever, P. Dondeyne; *Trimeric and oligomeric flavanoids in beer: a joint application of Sephadex LH-20 and reversed-phase gradient elution high-performance liquid chromatography*. J. Inst. Brew. **87** (1981) 391-393.
- [45] H. Henke (Ed.); *Preparative gel chromatography on sephadex LH-20*. Hüthig Verlag GmbH, Heidelberg (1995) 195-197.
- [46] W. Tückmantel, A. P. Kozikowski, L. J. Romanczyk, Jr.; *Studies in polyphenol chemistry and bioactivity. 1. Preparation of building blocks from (+)-catechin. Procyanidin formation. Synthesis of the cancer cell growth inhibitor, 3-O-galloyl-(2R,3R)-epicatechin-4 β ,8-[3-O-galloyl-(2R,3R)-epicatechin]*. J. Am. Chem. Soc. **121** (1999) 12073-12081.
- [47] J. A. Delcour, S. A. R. Verduyck; *Direct synthesis of the barley proanthocyanidins prodelfinidin B3, prodelfinidin C2 and two trimeric proanthocyanidins with a mixed prodelfinidin-procyanidin stereochemistry*. J. Inst. Brew. **92** (1986) 244-249.
- [48] G. Fonknechten, M. Moll, D. Cagniant, G. Kirsch, J. F. Muller; *Synthesis and characterisation of dimers of catechin and epicatechin*. J. Inst. Brew. **89** (1983) 424-431.
- [49] J. B. Harborne, T. J. Mabry, H. Mabry (Eds.); *The flavonoids*. Chapman and Hall, London (1975).
- [50] J. B. Harborne, T. J. Mabry (Ed.); *The flavonoids. Advances in research*. Chapman & Hall, London (1982).
- [51] J. B. Harborne (Ed.); *The flavonoids. Advances in research since 1980*. Chapman & Hall, London (1988).
- [52] J. B. Harborne (Ed.); *The flavonoids. Advances in research since 1986*. Chapman & Hall, London (1994).
- [53] P. J. Hayes, M. R. Smyth, I. McMurrugh; *Comparison of electrochemical and ultraviolet detection methods in high-performance liquid chromatography for the determination of phenolic compounds commonly found in beers*. Analyst **112** (1987) 1197-1207.
- [54] I. McMurrugh, D. Madigan, D. Bogan; *Measurement of proanthocyanidins and catechins in beer by high-performance liquid chromatography using electrochemical detection*. Bull. Liaison Groupe Polyphenols **16** (1992) 104-107.

- [55] W. Kirby, R. E. Wheeler; *The extraction of beer polyphenols and their assay by H.P.L.C.* J. Inst. Brew. **86** (1980) 15-17.
- [56] A. A. Qureshi, W. C. Burger, N. Prentice; *Quantitation of potential flavoring compounds in worts and beers by HPLC.* J. Amer. Soc. Brew. Chem. **37(4)** (1978) 153-160.
- [57] I. McMurrrough, T. Baert; *Identification of proanthocyanidins in beer and their direct measurement with a dual electrochemical detector.* J. Inst. Brew. **100** (1994) 409-416.
- [58] J. Kühnau; *The Flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition.* In: G. H. Bourne (Ed.); *World Review of Nutrition and Dietetics, Volume 24.* S. Karger Verlag, Basel (1976) 117-191.
- [59] B. Watzl, G. Rechkemmer; *Flavonoide.* Ernährungsumschau **48(12)** (2001) 499-503.
- [60] J. Peterson, J. Dwyer; *Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity.* Nutr. Res. **18(12)** (1998) 1995-2018.
- [61] J. Heilmann, I. Merfort; *Aktueller Kenntnisstand zum Metabolismus von Flavonoiden II. Resorption und Metabolismus von Flavonen, Flavanonen, Flavanen, Proanthocyanidinen und Isoflavonoiden.* Pharm. unserer Zeit **27(4)** (1998) 173-183.
- [62] D. Strack, V. Wray; *Anthocyanins.* In: P. M. Dey, J. B. Harborne (Eds.); *Methods in plant biochemistry – Volume 1. Plant phenolics.* Academic Press, London (1989) 325-356.
- [63] C. Santos-Buelga, A. Scalbert; *Review: proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health.* J. Sci. Food Agric. **80** (2000) 1094-1117.
- [64] L. J. Porter; *Flavans and proanthocyanidins.* In: J. B. Harborne (Ed.); *The flavonoids. Advances in research since 1980.* Chapman and Hall, London (1988) 21-62.
- [65] L. J. Porter; *Flavans and proanthocyanidins.* In: J. B. Harborne (Ed.); *The flavonoids. Advances in research since 1986.* Chapman and Hall, London (1994) 23-55.
- [66] T. de Bruyne, L. Pieters, R. Dommisse, H. Kolodziej, V. Wray, D. Vanden Berghe, A. Vlietinck; *NMR characterization and biological evaluation of proanthocyanidins: a systematic approach.* In: S. Gross (Ed.); *Plant polyphenols: chemistry, biology, pharmacology, ecology.* Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York (1999) 193-209.
- [67] E. Haslam (Ed.); *Plant Polyphenols, Vegetable tannins revisited.* Cambridge University Press, Cambridge (1989) 14-89.
- [68] L. J. Porter; *Tannins.* In: P. M. Dey, J. B. Harborne (Eds.); *Methods in plant biochemistry – Volume 1. Plant phenolics.* Academic Press, London (1989) 389-419.
- [69] H. A. Stafford; *Proanthocyanidin and flavan-3-ol biosynthesis: comparison with the anthocyanidin pathway and future needs.* In: A. Scalbert (Ed.); *Polyphenolic Phenomena,* INRA editions, Paris (1993) 73-80.
- [70] R. Kaul; *Pflanzliche Procyanidine – Vorkommen, Klassifikation und pharmakologische Wirkungen.* Pharm. unserer Zeit **25(4)** (1996) 175-185.
- [71] E. C. Bate-Smith; *Phytochemistry of proanthocyanidins.* Phytochemistry **14** (1975), 1107-1113.
- [72] G. E. Rohr; *Analytical investigation on and isolation of procyanidins from Crataegus leaves and flowers.* Dissertation, Universität Zürich (1999), ETH No. 13020.
- [73] R. W. Hemingway, L. Y. Foo, L. J. Porter; *Linkage isomerism in trimeric and polymeric 2,3-cis-procyanidins.* J. Chem. Soc. Perkin Trans. **1** (1982) 1209-1216.
- [74] E. Haslam; *Proanthocyanidins.* In: J. B. Harborne, T. J. Mabry (Eds.), *The flavonoids. Advances in research.* Chapman and Hall, London (1982) 417-447.
- [75] P. M. Giles, Jr.; *International Union of Pure and Applied Chemistry, commission on nomenclature of organic chemistry. Revised Section F: natural products and related compounds (IUPAC recommendations 1999).* Pure Appl. Chem. **71** (1999) 587-643.
- [76] M. Böhm, S. Rosenkranz, U. Laufs; *Das „French Paradox“. Wirkungen von Alkohol, Wein und Weinhaltstoffen auf das Herz.* Dtsch. Med. Wochenschr. (Weihnachtsausgabe) (2002) 2748-2756.
- [77] T. M. Goldfinger; *Beyond the french paradox: the impact of moderate beverage alcohol and wine consumption in the prevention of cardiovascular disease.* Cardiol. Clin. **21(3)** (2003) 449-457.
- [78] L. A. Moreno, A. Sarria, B. M. Popkin; *The nutrition transition in spain: a european mediterranean country.* Eur. J. Clin. Nutr. **56(10)** (2002) 992-1003.
- [79] L. L. Stanley, M. J. P. Mazier; *Potential explanations for the french paradox.* Nutr. Res. **19(1)** (1999) 3-15.
- [80] S. Gorinstein; *Comments on “Potential explanations for the french paradox”.* Nutr. Res. **19(11)** (1999) 1599-1602.
- [81] J. Constant; *Alcohol, ischemic heart disease, and the french paradox.* Clin. Cardiol. **20** (1997) 420-424.

- [82] M. G. L. Hertog, D. Kromhout, C. Aravanis, H. Blackburn, R. Buzina, F. Fidanza, S. Giampaoli, A. Jansen, A. Menotti, S. Nedeljkovic, M. Pekkarinen, B. S. Simic, H. Toshima, E. J. M. Feskens, P. C. H. Hollman, M. B. Katan; *Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Study*. Arch. Intern. Med. **155** (1995) 381-386.
- [83] M. G. L. Hertog, P. C. H. Hollman, M. B. Katan, D. Kromhout; *Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands*. Nutr. Cancer **20** (1993) 21-29.
- [84] P. C. H. Hollman, I. C. Arts; *Flavonols, Flavones and Flavanols – nature, occurrence dietary burden*. J. Sci. Food Agric. **80(7)** (2000) 1081-1093.
- [85] J. Heilmann, I. Merfort; *Aktueller Kenntnisstand zum Metabolismus von Flavonoiden I. Resorption und Metabolismus von Flavonolen*. Pharm. unserer Zeit **27(2)** (1996) 58-64.
- [86] A. J. Parr, G. P. Bolwell; *Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile*. J. Sci. Food Agric. **80(7)** (2000) 985-1012.
- [87] J. Spilková, J. Hubík; *Biologische Wirkungen von Flavonoiden*. Pharm. unserer Zeit **17(1)** (1988) 1-9.
- [88] J. Spilková, J. Hubík; *Biologische Wirkungen von Flavonoiden, II. Teil*. Pharm. unserer Zeit **21(4)** (1992) 174-182.
- [89] M. T. Huang, C. T. Ho, C. Y. Lee; *Phenolic compounds in food and their effects on health I*. ACS Symposium Series 507. American Chemistry Society, Washington DC (1992).
- [90] M. T. Huang, C. T. Ho, C. Y. Lee; *Phenolic compounds in food and their effects on health II*. ACS Symposium Series 507. American Chemistry Society, Washington DC (1992).
- [91] B. Bertram; *Flavonoide. Eine Klasse von Pflanzeninhaltsstoffen mit vielfältigen biologischen Wirkungen, auch mit karzinogener Wirkung?* Dtsch. Apoth. Ztg. **129(47)** (1989) 2561-2571.
- [92] B. Stavric, T. I. Matula; *Flavonoids in foods: Their significance for nutrition and health*. In: A. S. H. Ong, L. Packer (Eds.); *Lipid-soluble antioxidants: biochemistry and clinical applications*. Birkhäuser Verlag, Basel (1992) 275-295.
- [93] A. Ogawa, H. Arai, H. Tanizawa, T. Miyahara, T. Toyo'oka; *On-line screening method for antioxidants by liquid chromatography with chemiluminescence detection*. Anal. Chim. Acta **383** (1999) 221-230.
- [94] G. W. Plumb, S. de Pasqual-Teresa, C. Santos-Buelga, V. Cheyner, G. Williamson; *Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: effect of polymerisation, galloylation and glycosylation*. Free Rad. Res. **29** (1998) 351-358.
- [95] A. E. Hagerman, K. M. Riedl, G. A. Jones, K. N. Sovik, N. T. Ritchard, P. W. Hartzfeld, T. L. Riechel; *High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants*. J. Agric. Food Chem. **46** (1998) 1887-1892.
- [96] D. Bagchi, A. Garg, R. L. Krohn, M. Bagchi, M. X. Tran, S. J. Stohs; *Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro*. Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol. **95(2)** (1997) 179-189.
- [97] C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, G. Paganga; *Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids*. Free Radic. Biol. Med. **20(7)** (1996) 933-956.
- [98] T. Ariga, I. Koshiyama, D. Fukushima; *Antioxidative properties of procyanidins B-1 and B-3 from Azuki Beans in aqueous systems*. Agric. Biol. Chem. **52(11)** (1988) 2717-2722.
- [99] A. Ghiselli, M. Serafini; *Diet and total plasma antioxidant capacity in humans*. Méd. Biol. Environn. **26(2)** (1998) 171-175.
- [100] R. G. Cutler, J. Bertram, L. Packer, A. Mori. *Oxidative stress and aging*, 1. Auflage. Birkhäuser Verlag, Basel (1995) 35-39.
- [101] J. Falbe, M. Regnitz (Hrsg.); *Römpp Lexikon Chemie*, 10. überarbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1996).
- [102] A. L. Catapano; *Antioxidant effect of flavonoids*. Angiology **48(1)** (1997) 39-44.
- [103] H. Sies (Ed.); *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. Academic Press, London (1991).
- [104] B. Halliwell; *Antioxidants in human health and disease*. Annu. Rev. Nutr. **16** (1996) 33-50.
- [105] A. S. Meyer, M. Heinonen, E. N. Frankel; *Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidations*. Food Chem. **61** (1998) 71-75.
- [106] D. D. Schramm, J. B. German; *Potential effects of flavonoids on the etiology of vascular disease*. J. Nutr. Biochem. **9** (1998) 560-566.
- [107] T. Ishikawa, M. Suzukawa, T. Ito, H. Yoshida, M. Ayaori, M. Nishiwaki, A. Yonemura, Y. Hara, H. Nakamura; *Effect of tea flavonoid supplementation on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification*. Am. J. Clin. Nutr. **66** (1997) 261-266.

- [108] L. B. M. Tijburg, T. Mattern, J. D. Folts, U. M. Weisgerber, M. B. Katan; *Tea flavonoids and cardiovascular diseases: a review*. *Critical Rev. Food Sci. Nutr.* **37(8)** (1997) 771-785.
- [109] J. A. Vinson, J. Jang, J. Yang, Y. Dabbagh, X. Liang, M. Serry, J. Proch, S. Cai; *Vitamins and especially flavonoids in common beverages are powerful in vitro antioxidants which enrich lower density lipoproteins and increase their oxidative resistance after ex vivo spiking in human plasma*. *J. Agric. Food Chem.* **47** (1999) 2502-2504.
- [110] S. Maxwell, G. Thorpe; *Tea flavonoids have little short term impact on serum antioxidant activity*. *Br. Med. J.* **313** (1996) 229.
- [111] S. Maxwell, A. Cruickshank, G. Thorpe; *Red wine and antioxidative activity in serum*. *Lancet* **344** (1994) 193-194.
- [112] J. A. Vinson, B. A. Hontz; *Phenol antioxidant index: comparative antioxidant effectiveness of red and white wine*. *J. Agric. Food Chem.* **43** (1995) 401-403.
- [113] G. Cao, E. Sofic, R. L. Prior; *Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships*. *Free Radic. Biol. Med.* **22(5)** (1997) 749-760.
- [114] M. C. Nicoli, S. Calligaris, L. Manzocco; *Effect of enzymatic and chemical oxidation on the antioxidant capacity of catechin model systems and apple derivatives*. *J. Agric. Food Chem.* **48** (2000) 4576-4580.
- [115] J. E. Brown, H. Khodr, R. C. Hider, C. A. Rice-Evans; *Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties*. *Biochem. J.* **330** (1998) 1173-1178.
- [116] G. Paganga, H. Al-Hashim, H. Khodr, B. C. Scott, O. I. Aruoma, R. C. Hider, B. Halliwell, C. A. Rice-Evans; *Mechanisms of antioxidant activities of quercetin and catechin*. *Redox Report* **2(6)** (1996) 359-364.
- [117] O. Kozluca, E. Olcay, S. Sueruecue, Z. Gueran, T. Kulaksiz, N. Ueskent; *Prevention of doxorubicin induced cardiotoxicity by catechin*. *Cancer Letters* **99(1)** (1996) 1-6.
- [118] M. L. Mira, M. T. Fernandez, M. Santos, R. Rocha, M. H. Florencio, K. R. Jennings; *Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity*. *Free Rad. Res.* **36(11)** (2002) 1199-1208.
- [119] S. N. Mhatre, R. K. Iyer, P. N. Moorthy; *Characterization of aluminium complexes in tea extract. Part I. Aluminum-27 NMR studies*. *Magn. Reson. Chem.* **31(2)** (1993) 169-175.
- [120] M. T. Fernandez, M. L. Mira, M. H. Florencio, K. R. Jennings; *Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study*. *J. Inorg. Biochem.* **92(2)** (2002) 105-111.
- [121] K. Wedepohl; *Zur Analytik von Metall-Flavonoid-Komplexen als Elementspezies in pflanzlichen Lebensmitteln*. Dissertation. Universität Stuttgart (1986).
- [122] J. Steffan; *Bestimmung von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma und Leukozyten mit HPLC/UV und HPLC/EC: Methodenentwicklung, Validierung und Anwendung*. Dissertation, Universität Paderborn (1999).
- [123] H. Wollersen; *Bestimmung von Antioxidantien in biologischen Proben mit HPLC und elektrochemischer Detektion*. Diplomarbeit, Universität Paderborn (1998).
- [124] K. Takamura, M. Ito; *Effects of metal ions and flavonoids on the oxidation of ascorbic acid*. *Chem. Pharm. Bull.* **25(12)** (1977) 3218-3225.
- [125] W. Bors, C. Michel, S. Schikora; *Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials: a pulse radiolysis study*. *Free Radic. Biol. Med.* **19(1)** (1995) 45-52.
- [126] T. Hirano, M. Gotoh, K. Oka; *Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL-60 cells*. *Life Science* **55** (1994) 1061-1069.
- [127] G. Jacobasch, S. Florian, H. Pforte, J. Hempel, K. Schmehl, D. Schmiedl; *Inhibition of hereditary intestinal carcinoma development by flavonoids*. In: I. T. Johnson, G. R. Fenwick (Eds.); *Dietary Anticarcinogens and Antimutagens. Chemical and biological aspects*. Royal Soc. Chem., Cambridge (2000) 321-323.
- [128] H. Fujiki; T. Horiuchi, K. Yamashita, H. Hakii, M. Suganuma, H. Nishino, A. Iwashima, Y. Hirata, T. Sugimura; *Inhibition of tumor promotion by flavonoids*. In: V. Cody, E. Middleton, Jr., J. B. Harborne (Eds.); *Plant flavonoids in biology and medicine; biochemical, pharmacological, and structure-activity relationships*. Alan R. Liss Inc., New York (1986) 429-440.
- [129] H. R. Grimmer, V. Parbhoo, M. McGrath; *Antimutagenicity of polyphenol-rich fractions from sorghum bicolor grain*. *J. Sci. Food Agric.* **59** (1992) 251-256.
- [130] L. Le Marchand, S. P. Murphy, J. H. Hankin, L. R. Wilkens, L. N. Kolonel; *Intake of flavonoids and lung cancer*. *J. Natl. Cancer Inst.* **92** (2000) 154-160.
- [131] P. Knekt, R. Järvinen, R. Seppänen, M. Heliövaara, L. Teppo, E. Pukkala, A. Aromaa; *Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms*. *Am. J. Epidemiol.* **146(3)** (1997) 223-230.

- [132] S. Lautreite, A. C. Musonda, J. Doehmer, G. O. Edwards, J. K. Chipman; *Flavonoids inhibit genetic toxicity produced by carcinogens in cells expressing CYP1A2 and CYP1A1*. *Mutagenesis* **17** (2002) 45-53.
- [133] N. M. O'Brien, J. A. Woods, S. A. Aherne, Y. C. O'Callaghan; *Cytotoxicity, genotoxicity and oxidative reactions in cell-culture models: modulatory effects of phytochemicals*. *Biochem. Soc. Trans.* **28** (2000) 22-26.
- [134] S. J. Duthie, V. L. Dobson; *Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack in vitro*. *Eur. J. Nutr.* **38** (1999) 28-34.
- [135] J. A. Choi, J. Y. Kim, J. Y. Lee, C. M. Kang, H. J. Kwon, Y. D. Yoo, T. W. Kim, Y. S. Lee, S. J. Lee; *Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin*. *Int. J. Oncol.* **19** (2001) 837-844.
- [136] E. Middleton, Jr., C. Kandaswami; *Commentary: effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions*. *Biochem. Pharmacol.* **43(6)** (1992) 1167-1179.
- [137] E. Middleton, Jr.; *Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function*. In: M. Manthey, A. Buslig (Eds.); *Flavonoids in the living system*. Plenum Press, New York (1998) 175-182.
- [138] R. Maffei Facino, M. Carini, G. Aldini, E. Bombardelli, P. Morazzoni, R. Morelli; *Free radicals scavenging action and anti-enzyme activities of procyanidines from vitis vinifera*. *Arzneim.-Forsch.* **44(5)** (1994) 592-601.
- [139] E. Middleton, Jr., C. Kandaswami, T. C. Theoharides; *The effect of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer*. *Pharmacol. Rev.* **52** (2000) 673-751.
- [140] M. R. Fesen, K. W. Kohn, F. Letreurtre, Y. Pommier; *Inhibitors of human immunodeficiency virus integrase*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** (1993) 2399-2403.
- [141] R. I. Brinkworth, M. J. Stoermer, D. P. Fairlie; *Flavones are inhibitors of HIV-1 proteinase*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188(2)** (1992) 631-637.
- [142] M. M. Cowan; *Plant products as antimicrobial agents*. *Clin. Microbiol. Rev.* **12(4)** (1999) 564-582.
- [143] J. R. C. Bell, J. L. Donovan, R. Wong, A. L. Waterhouse, J. B. German, R. L. Walzem, S. E. Kasim-Karakas; *(+)-Catechin in human plasma after ingestion of a single serving reconstituted red wine*. *Am. J. Clin. Nutr.* **71** (2000) 103-108.
- [144] J. L. Donovan, J. R. Bell, S. Kasim-Karakas, J. B. German, R. L. Walzem, R. J. Hansen, A. L. Waterhouse; *Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine*. *J. Nutr.* **129(9)** (1999) 1662-1668.
- [145] K. H. van Het Hof, S. A. Wiseman, C. S. Yang, L. B. M. Tuburg; *Plasma and lipoprotein levels of tea catechins following repeated tea consumptions*. *Proc. Soc. Experim.* **220(4)** (1999) 203-209.
- [146] M. Harada, Y. Kan, H. Naoki, Y. Fukui, N. Kageyama, M. Nakai, W. Miki, Y. Kiso; *Identification of the major antioxidative metabolites in biological fluids of the rat with ingested (+)-catechin and (-)-epicatechin*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63(6)** (1988) 973-977.
- [147] M. J. Lee, Z. Y. Wang, H. Li, L. Chen, Y. Sun, S. Gobbo, D. A. Balentine, C. S. Yang; *Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects*. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **4** (1995) 393-399.
- [148] G. Groenewoud, H. K. L. Hundt; *The microbial metabolism of condensed (+)-catechins by rat faecal microflora*. *Xenobiotica* **16** (1986) 99-107.
- [149] R. A. Perez-Maldonado, B. W. Norton; *Digestion of ¹⁴C-labelled condensed tannins from desmodium intortum in sheep and goats*. *Br. J. Nutr.* **76** (1996) 501-513.
- [150] J. Schormüller (Hrsg.); *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 2. vollständig neubearbeitete Auflage. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1974) 456-469.
- [151] W. Schäfer, W. Flechsig (Hrsg.); *Das Getreide. Eine Waren- und Sortenkunde*, 4. verbesserte und ergänzte Auflage. Alfred Strothe Verlag, Hannover (1973) 32-38.
- [152] L. Narziss (Hrsg.); *Abriß der Bierbrauerei*, 3. neu bearbeitete Auflage. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart (1972).
- [153] U. Renzenbrink (Hrsg.); *Die sieben Getreide. Nahrung für den Menschen*. Rudolf Geering-Verlag, Dornach (1981) 76-91.
- [154] I. McMurrugh, J. R. Byrne; *HPLC analysis of bittering substances, phenolic compounds, and various compounds of alcoholic beverages*. In: L. M. L. Nollet (Ed.); *Food Analysis by HPLC*. Marcel Dekker, Inc., New York (1992) 579-641.
- [155] B. Jende-Strid; *Phenolic acids in grains of wild-type barley and proanthocyanidin-free mutants*. *Carlsberg Res. Commun.* **50** (1985) 1-14.
- [156] E. Nordkvist, A.-C. Salomonsson, P. Åman; *Distribution of insoluble bound phenolic acids in barley grain*. *J. Sci. Food Agric.* **35** (1984) 657-661.

- [157] D. von Wettstein, R. A. Nilan, B. Ahrenst-Larsen, K. Erdal, J. Ingversen, B. Jende-Strid, K. N. Kristiansen, J. Larsen, H. Outtrup, S. E. Ullrich; *Proanthocyanidin-free barley for brewing: progress in breeding for high yield and research tool in polyphenol chemistry*. Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am. **22** (1985) 41-52.
- [158] D. Strack; *Phenolic metabolism*. In: P. M. Dey, J. B. Harborne (Eds.); *Plant biochemistry*. Academic Press, London (1997) 387-416.
- [159] W. Heller, G. Forkmann; *Biosynthesis*. In: J. B. Harborne (Ed.); *The flavonoids. Advances in research since 1986*. Chapman and Hall, London (1988) 399-425.
- [160] W. Heller, G. Forkmann; *Biosynthesis of flavonoids*. In: J. B. Harborne (Ed.); *The flavonoids. Advances in research since 1986*. Chapman and Hall, London (1994) 499-535.
- [161] W. Heller; *Flavonoid biosynthesis, an overview*. In: V. Cody, E. Middleton, Jr., J. B. Harborne (Eds.); *Plant flavonoids in biology and medicine; biochemical, pharmacological, and structure-activity relationships*. Alan R. Liss Inc., New York (1986) 25-42.
- [162] G. Forkmann; *Biosynthesis of flavonoids*. In: A. Scalbert (Ed.); *Polyphenolic Phenomena*, INRA editions, Paris (1993) 65-71.
- [163] G. Stotz; *Enzymologie und Genetik der Oxidationsreaktionen in der Flavonoid-Biosynthese höherer Pflanzen*. Dissertation, Universität Tübingen (1983) 1-8.
- [164] D. Jaques, C. T. Opie, L. J. Porter, E. Haslam; *Plant proanthocyanidins. Part 4. Biosynthesis of procyanidins and observations on the metabolism of cyanidin in plants*. J. Chem. Soc. Perkin Trans. **17** (1977) 1637-1643.
- [165] H. A. Stafford (Ed.); *Flavonoid metabolism*. CRC Press, Boca Raton (1990).
- [166] K. N. Kristiansen; *Conversion of (+)-dihydroquercetin to (+)-2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidin and (+)-catechin with an enzyme extract from maturing grains of barley*. Carlsberg Res. Commun. **51** (1986) 51-60.
- [167] K. N. Kristiansen; *Biosynthesis of proanthocyanidins in barley: genetic control of the conversion of dihydroquercetin to catechin and procyanidins*. Carlsberg Res. Commun. **49** (1984) 503-524.
- [168] S. Aastrup, H. Outtrup; *Location and characterization of barley flavonoids during grain filling*. Proc. 20th Congr. Eur. Brew. Conv. **20** (1985) 667-674.
- [169] S. Aastrup, H. Outtrup, K. Erdal; *Location of the proanthocyanidins in the barley grain*. Carlsberg Res. Commun. **49** (1984) 105-109.
- [170] B. Skadhauge, K. K. Thomsen, D. von Wettstein; *The role of barley testa layer and its flavonoid content in resistance to Fusarium infections*. Hereditas **126** (1997) 147-160.
- [171] S. Aastrup; *A test for presence or absence of proanthocyanidins in barley and malt*. Carlsberg Res. Commun. **50** (1985) 37-42.
- [172] B. Jende-Strid; *Genetic control of flavonoid biosynthesis in barley*. Hereditas **119** (1993) 187-204.
- [173] S. W. Souci, W. Fachmann, H. Kraut; *Die Zusammensetzung der Lebensmittel, Nährwert-Tabellen*, 6. revidierte und erweiterte Auflage. Medpharm Scientific Publ., Stuttgart (2000) 532-533.
- [174] B. Jende-Strid; *Analysis of proanthocyanidins and phenolic acids in barley, malt, hops and beer*. In: H. F. Linskens, J. F. Jackson (Eds.); *Beer analysis*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1988) 109-127.
- [175] M. J. Brandon, L. Y. Foo, L. J. Porter, P. Meredith; *Proanthocyanidins of barley and sorghum; composition as a function of maturity of barley ears*. Phytochemistry **21(12)** (1982) 2953-2957.
- [176] I. McMurrough, M. J. Loughrey, G. P. Hennigan; *Content of (+)-catechin and proanthocyanidins in barley and malt grain*. J. Sci. Food Agric. **34** (1983) 62-72.
- [177] I. McMurrough, D. Madigan; *Semipreparative chromatographic procedure for the isolation of dimeric and trimeric proanthocyanidins from barley*. J. Agric. Food Chem. **44** (1996) 1731-1735.
- [178] J. Jerumanis; *Quantitative analysis of flavonoids in barley, hops and beer by high-performance liquid chromatography (HPLC)*. J. Inst. Brew. **91** (1985) 250-252.
- [179] D. Madigan, I. McMurrough, M. R. Smyth; *Determination of proanthocyanidins and catechins in beer and barley by high-performance liquid chromatography with dual-electrode electrochemical detection*. Analyst **119** (1994) 863-868.
- [180] I. McMurrough; *High-performance liquid chromatography of flavonoids in barley and hops*. J. Chromatogr. **218** (1981) 683-693.
- [181] N. Whittle, H. Eldrige, J. Bartley; *Identification of the polyphenols in barley and beer by HPLC/MS and HPLC/electrochemical detection*. J. Inst. Brew. **105(2)** (1999) 89-99.
- [182] M.-N. Maillard, P. Giampaoli, M.-E. Cuvelier; *Atmospheric pressure chemical ionization (APCI) liquid chromatography-mass spectrometry: characterization of natural antioxidants*. Talanta **43** (1996) 339-347.

- [183] W. Friedrich; *Proanthocyanidine in den Braurohstoffen Gerste (Hordeum vulgare L.) und Gerstenmalz: HPLC-Bestimmung mit UV- und Elektrodenarray-Detektion*. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (2000).
- [184] H.-G. Bellmer, R. Galensa, J. Gromus; *Bedeutung der Polyphenole für die Bierherstellung: Analytik, Ergebnisse und Diskussion (Teil 1)*. Brauwelt **28/29** (1995) 1372-1379.
- [185] P. Goupy, M. Hugues, P. Boivin, M. J. Amiot; *Antioxidant composition and activity of barley (hordeum vulgare) and malt extracts and of isolated phenolic compounds*. J. Sci. Food Agric. **79(12)** (1999) 1625-1634.
- [186] P. Mulkay, R. Touillaux, J. Jerumanis; *Proanthocyanidins of barley: separation and identification*. J. Chromatogr. **208** (1981) 419-423.
- [187] H. Outtrup, K. Schaumburg; *Structure elucidation of some proanthocyanidins in barley by ¹H 270 MHz NMR spectroscopy*. Carlsberg Res. Commun. **46** (1981) 43-52.
- [188] H. Rudolph; *Selber Bier brauen*. Midena Verlag, Augsburg (1999) 6-27.
- [189] H.-D. Belitz, W. Grosch; *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 4. Auflage. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1992) 805-818.
- [190] G. Baron; *Bier*. In: D. Osteroth (Hrsg.); *Taschenbuch für Lebensmittelchemiker und -technologien 2*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1991) 297-313.
- [191] C. Markus; *Entwicklung einer HPLC-DAD/MS-Methode zur Bestimmung von Flavonoiden in Gerste*. 1. Staatsexamensarbeit, Universität Paderborn (2002), 4-19.
- [192] F. Schur; *Rolle der Polyphenole beim Brauen*. Brauerei-Rdsch. **98(3)** (1987) 37-60.
- [193] W. Back, C. Forster, M. Krottenthaler, J. Lehmann, B. Sacher, B. Thum; *Neue Forschungserkenntnisse zur Verbesserung der Geschmacksstabilität*. Brauwelt **38** (1997) 1677-1692.
- [194] A. Piendl, M. Biendl; *Über die physiologische Bedeutung der Polyphenole und Hopfenbitterstoffe des Bieres*. Brauwelt **140(13/14)** (2000) 526-544.
- [195] K. Wackerbauer, H.-M. Anger; *Bierstabilisierung unter besonderer Berücksichtigung der Polyphenole*. Monatsschr. Brauwiss. **37(4)** (1984) 153-161.
- [196] M. Dadic; *Phenolics and beer staling*. Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am. **11(2)** (1974) 140-145.
- [197] K. Herrmann; *Bemerkungen zum „Gerbstoff“-Gehalt in Lebensmitteln*. Gordian **94** (1994) 12-14.
- [198] K. Fukuda, W. Saito, S. Arai, Y. Aida; *Production of a novel proanthocyanidin-free barley line with high quality*. J. Inst. Brew. **105** (1999) 179-183.
- [199] D. von Wettstein; *Breeding of value added barley by mutation and protein engineering*. In: Int. Atomic Energy Agency (Ed.); *Induced mutations and molecular techniques for crop improvement*. Proc. Int. Symp. (1995) 67-76.
- [200] K. Erdal; *Proanthocyanidin-free barley - malting and brewing*. J. Inst. Brew. **92** (1986) 220-224.
- [201] Anonymus; *Proanthocyanodinfreie Gerste „Galant“: Erfahrungen im Anbau, in der Mälzerei und in der Brauerei*. Brauwelt **16** (1986) 618-622.
- [202] S. Araki, T. Kimura, C. Shimizu, S. Furusho, M. Takashio, K. Shinotsuka; *Estimation of antioxidative activity and its relationship to beer flavor stability*. J. Am. Soc. Brew. Chem. **57(1)** (1999) 34-37.
- [203] M. T. Walters, A. P. Heasman, P. S. Hughes; *Comparison of (+)-catechin and ferulic acid as natural antioxidants and their impact on beer flavor stability. Part 1: forced-aging*. J. Am. Soc. Brew. Chem. **55(2)** (1997) 83-89.
- [204] M. T. Walters, A. P. Heasman, P. S. Hughes; *Comparison of (+)-catechin and ferulic acid as natural antioxidants and their impact on beer flavor stability. Part 2: extended storage trials*. J. Am. Soc. Brew. Chem. **55(3)** (1997) 91-98.
- [205] H. Kaneda, N. Kobayashi, S. Furusho, H. Sahara, S. Koshino; *Reducing activity and flavor stability of beer*. Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am. **32** (1995) 90-94.
- [206] M. L. Andersen, H. Outtrup, P. Riis, L. H. Skibsted; *Do polyphenols influence the flavour stability of beer?* Proc. 27th Congr. Eur. Brew. Conv. **27** (1999) 133-140.
- [207] M. L. Andersen, H. Outtrup, L. H. Skibsted; *Potential antioxidants in beer assessed by ESR spin trapping*. J. Agric. Food Chem. **48** (2000) 3106-3111.
- [208] C. Forster, J. Schwieger, L. Narziß, W. Back, M. Uchida, M. Ono, K. Yanagi; *Untersuchungen zur Geschmacksstabilität von Bier mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie freier Radikale*. Monatsschr. Brauwiss. **52** (1999) 86-93.
- [209] R. J. H. Wilson, T. R. Roberts, R. J. Smith, L. L. Bradley, M. Moir; *The inherent foam stabilising and lacing properties of some minor, hop-derived constituents of beer*. Proc. 27th Congr. Eur. Brew. Conv. **27** (1999) 188-207.

- [210] T. O'Rourke, R. Ianniello, I. McMurrough, A. Springle; *The role of tannoids in the colloidal stabilisation of beer*. Proc. 25th Conv. Inst. Brew. (Asia Pacif. Sect.) **25** (1998) 143-146.
- [211] M. Rehmanji, A. Mola, K. S. Narayanan, R. M. Ianniello; *Polyclar® (PVPP) for improving shelf life in laboratory treated lagers*. Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am. **35(2)** (1998) 95-100.
- [212] C. W. Bamforth; *Beer haze*. J. Am. Soc. Brew. Chem. **57(3)** (1999) 81-90.
- [213] L. Chapon; *Der Begriff Tannoide. Prinzip der Bestimmung und Auswertung der Ergebnisse*. Monatsschr. Brauwiss. **46(7/8)** (1993) 263-279.
- [214] H. Pfenninger, P. Anderegg, H. Hug, F. Ullmann; *Halbtechnische Brauversuche mit Malz aus der anthocyanogenfreien Gerste der Sorte Galant*. Brauerei-Rdsch. **97(7/8)** (1986) 141-172.
- [215] D. Hoover; *Some aspects of the colloidal system of beer*. Proc. Am. Soc. Brew. Chem. **27** (1969) 181-189.
- [216] K. Raible; *Bierstabilisierung mit Kieselgel*. Brauerei-Rdsch. **90(1/2)** (1979) 26-30.
- [217] J. E. Guzman, I. P. McKeown, M. Gleaves, G. G. Stewart, A. Doyle; *Selective protein adsorption with silica gel*. Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am. **36(2)** (1999) 227-230.
- [218] A. Papp, W. Winnewisser, E. Geiger; *Influence of (+)-catechin und ferulic acid on formation of beer haze and their removal through different polyvinylpyrrolidone-types*. J. Inst. Brew. **107(1)** (2001) 55-60.
- [219] I. McMurrough; *The colloidal stabilisation of beer by treatment with polyvinylpyrrolidone (PVPP)*. Cerevisia **23(3)** (1998) 27-34.
- [220] I. McMurrough, D. Madigan, R. J. Kelly; *Evaluation of rapid colloidal stabilization with polyvinylpyrrolidone (PVPP)*. J. Am. Soc. Brew. Chem. **55(2)** (1997) 38-43.
- [221] I. McMurrough, T. O'Rourke; *New insight into the mechanism of achieving colloidal stability*. Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am. **34(1)** (1997) 271-277.
- [222] I. McMurrough, D. Madigan, R. J. Kelly; *The role of flavonoid polyphenols in beer stability*. J. Am. Soc. Brew. Chem. **54(3)** (1996) 141-148.
- [223] K. J. Siebert, P. Y. Lynn; *Mechanisms of adsorbent action in beverage stabilization*. J. Agric. Food Chem. **45** (1997) 4275-4280.
- [224] M. Katzke, R. Nendza, D. Oechsle; *Die Bierstabilisierung mit Ionenaustauschern. Teil 2 - Verfahrenstechnik und Ergebnisse aus Praxisversuchen*. Brauwelt **36** (1998) 1628-1632.
- [225] R. A. Mussche, C. de Pauw; *Total stabilisation of beer in a single operation*. J. Inst. Brew. **105(6)** (1999) 386-391.
- [226] R. A. Mussche, C. de Pauw; *Total stabilisation of beer in a single operation*. Proc. 25th Conv. Inst. Brew. (Asia Pacif. Sect.) **25** (1998) 125-130.
- [227] D. von Wettstein; J. Larsen, B. Jende-Strid, B. Ahrenst-Larsen, J. A. Sørensen, K. Erdal; *Proanthocyanidinfreie Braugersten: Fortschritte in der Züchtung*. Brauwelt **121(11)** (1981) 760-767.
- [228] K. Erdal, H. Outtrup, B. Ahrenst-Larsen; *Barley and hop proanthocyanidins and the colloidal stability of beer*. Proc. 20th Congr. Eur. Brew. Conv. **20** (1985) 459-466.
- [229] J. A. Delcour, S. Vanhamel, E. Moerman, R. Vancaenenbroeck; *Use of proanthocyanidin-free malt galant and/or physico-chemical stabilisation treatments for the production of chill-proof beers*. Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am. **24** (1987) 21-27.
- [230] J. A. Delcour, S. Vanhamel, E. Moerman, R. Vancaenenbroeck; *Protein precipitation during wort boiling: quality aspects of diminished wort boiling times of brews prepared from proanthocyanidin-free or regular raw materials*. J. Inst. Brew. **96** (1988) 371-374.
- [231] B. Jende-Strid; *Proanthocyanidin-free malting barley - a solution of the beer haze problem*. Proc. 26th Congr. Eur. Brew. Conv. **26** (1997) 101-108.
- [232] J. Tuellmann, mündliche Mitteilung, Warsteiner-Brauerei, Warstein (2003).
- [233] M. Moll, G. Fonknechten, M. Carnielo, R. Flayeux; *Changes in polyphenols from raw materials to finished beer*. Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am. **21(2)** (1984) 79-87.
- [234] K. H. Koch; *Die Probenahme - Stiefkind der Analytik*. CLB **53(8)** (2002) 294-298.
- [235] P. Goupy, M. Hugues, P. Boivin, M. J. Amiot; *Antioxidant compounds of barley (Hordeum vulgare) and malt extracts*. Proc. 27th Congr. Eur. Brew. Conv. **27** (1999) 445-451.
- [236] B. Jende-Strid, B. Lindberg Møller; *Analysis of proanthocyanidins in wild-type and mutant barley (Hordeum vulgare L.)*. Carlsberg Res. Commun. **46** (1981) 53-64.
- [237] B. Zimmermann, M. Papagiannopoulos, A. Mellenthin, R. Galensa; *Online-Kopplung von ASE, SPE und HPLC am Beispiel der Polyphenolanalytik in Malz*. Lebensmittelchemie **55** (2001) 66-67.

- [238] I. McMurrough, J. McDowell; *Chromatographic separation and automated analysis of flavanols*. Anal. Biochem. **91** (1978) 92-100.
- [239] W. Z. Kaluza, R. M. McGrath, T. C. Roberts, H. H. Schröder; *Separation of phenolics of sorghum bicolor (L.) moench grain*. J. Agric. Food Chem. **28** (1980) 1191-1196.
- [240] R. L. Jackman, J. L. Smith. *Anthocyanidins and betalains*. In: G. A. F. Hendry, J. D. Houghton (Eds.); *Natural Food Colorants*, 2nd edition. Kluwer Academic Publishers, London, Glasgow (1996) 244-309.
- [241] M. Papagiannopoulos, B. Zimmermann, A. Mellenthin, M. Krappe, G. Maio, R. Galensa; *ASE-ASPEC-HPLC Kopplung - Automatisierte Bestimmung von Proanthocyanidinen in Malz*. GIT Labor-Fachz. **45(9)** (2001) 950-952.
- [242] L. J. Porter, L. N. Hrstich, B. G. Chan; *The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin*. Phytochemistry **25(1)** (1986) 223-230.
- [243] S. K. Sarkar, R. E. Howarth; *Specificity of the vanillin test for flavanols*. J. Agric. Food Chem. **24(2)** (1976) 317-320.
- [244] Y.-G. Li, G. Tanner, P. Larkin; *The DMACA-HCl protocol and the threshold proanthocyanidin content for bloat safety in forage legumes*. J. Sci. Food Agric. **70** (1996) 89-101.
- [245] M. Gutmann; *Localization of proanthocyanidins using in situ-hydrolysis with sulfuric acid*. Biotech. Histochem. **68(3)** (1993) 161-165.
- [246] P. K. Agrawal, M. C. Bansal, L. J. Porter, L. Y. Foo; *Flavonoids*. In: P. K. Agrawal (Ed.); *Carbon-13 NMR of flavonoids*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam (1989) Chapter 8, 432-496.
- [247] I. McMurrough, J. A. Delcour; *Wort Polyphenols*. Ferment **7** (1994) 175-182.
- [248] J. Rigaud, J. Perez-Illarbe, J. M. Ricardo da Silva, V. Cheynier; *Micro method for the identification of proanthocyanidin using thiolysis monitored by high-performance liquid chromatography*. J. Chromatogr. **540** (1991) 401-405.
- [249] A. Roeder, T. M. L. Lam, R. Galensa; *Thermospray-LCMS-Untersuchungen über Proanthocyanidine und andere Polyphenole im Malz, Bier und Hopfen*. Monatsschr. Brauwiss. **48(11/12)** (1995) 390-396.
- [250] K. Albert (Ed.); *On-line LC-NMR and related techniques*. J. Wiley & Sons, Ltd., West Sussex (2002).
- [251] W. Vilegas, J. H. Y. Vilegas, M. Dachtler, T. Glaser, K. Albert; *Application of on-line C₃₀ RP-HPLC-NMR for the analysis of flavonoids from leaf extract of Maytenus aquifolium*. Phytochem. Anal.; **11** (2000) 317-321.
- [252] L. C. Santos, M. Dachtler, F. D. P. Andrade, K. Albert, W. Vilegas; *Application of HPLC-NMR coupling using C₃₀ phase in the separation and identification of flavonoids of taxonomic relevance*. Fresenius J. Anal. Chem.; **368** (2000) 540-542.
- [253] K. Pusecker, K. Albert, E. Bayer; *Investigation of hop and beer bitter acids by coupling of high-performance liquid chromatography to nuclear magnetic resonance spectroscopy*. J. Chromatogr. A **836** (1999) 245-252.
- [254] H. Wichern, P. Dilly; *Nachweis von Rohfruchtbiere. Maisgrieß als Malzersatz*. Monatsschr. Brauwiss. **40(5)** (1987) 196-198.
- [255] V. M. Bendelow; *Automated procedure for the estimation of total polyphenol content in beer, wort, malt, and barley*. J. Amer. Soc. Brew. Chem. **35(4)** (1977) 150 - 152.
- [256] A. Lugasi, J. Hovari; *Antioxidant properties of commercial alcoholic and nonalcoholic beverages*. Nahrung **47(2)** (2003) 79-86.
- [257] J. A. Delcour; *Malt and hop flavanoids in pilsner beer*. In: H. F. Linskens, J. F. Jackson (Eds.); *Beer analysis*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1988) 225-240.
- [258] J. A. Delcour, D. Ferreira, D. G. Roux; *Synthesis of condensed tannins. Part 9. The condensation sequence of leucocyanidin with (+)-catechin and with the resultant procyanidins*. J. Chem. Soc. Perkin Trans. **1** (1983) 1711-1717.
- [259] R. Willoughby (Ed.), E. Sheehan, S. Mitrovich; *A global view of LC/MS*, 2nd edition. Global View Publishing, Pittsburgh (2002).
- [260] R. C. Weast (Ed.); *Handbook of Chemistry and Physics*, 55th edition. CRC Press, Cleveland (1974) Tabelle D-129.
- [261] L. Y. Rios, R. N. Bennett, S. A. Lazarus, C. Remesy, A. Scalbert, G. Williamson; *Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans*. Am. J. Clin. Nutr. **76(5)** (2002) 1106-1110.
- [262] Q. Y. Zhu, R. R. Holt, S. A. Lazarus, J. L. Ensunsa, J. F. Hammerstone, H. H. Schmitz, C. L. Keen; *Stability of the flavan-3-ols epicatechin and catechin and related dimeric procyanidins derived from cocoa*. J. Agric. Food Chem. **50(6)** (2002) 1700-1705.

- [263] V. Meyer (Hrsg.); *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*, 7. Auflage. Salle und Sauerländer, Frankfurt am Main (1992).
- [264] L. Ding, Y. Li, M.-J. Li, Z.-Y. Liu, H.-Q. Zhang; *Novel microwave-assisted extraction method of extracting flavonoids from Radix and Caulis acanthopanax Senticosi*. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao* **24(8)** (2003) 1403-1405.
- [265] L. Wang, Z. Liu, J. Lu, C. Gu, H. Chen; *Microwave-aided analysis of total flavonoid and polysaccharide in purslane herb*. *Shipin Gongye Keji* **23(5)** (2002) 70-73.
- [266] H. Wollersen, M. Grote, H. Hesecker; *Methodenentwicklung zur Quantifizierung ausgewählter Flavonoide in Gerste mit HPLC und UV/EC-Detektion*. *Lebensmittelchemie* **55** (2001) 65-66.
- [267] S. Kromidas (Hrsg.); *Validierung in der Analytik*, 1. Auflage. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim (1999).
- [268] S. Kromidas, R. Klinkner, R. Mertens; *Methodenvalidierung im analytischen Labor*. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **43** (1995) 669-676.
- [269] S. Kromidas (Hrsg.); *Qualität im analytischen Labor*, 1. Auflage. VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim (1995).
- [270] S. Ebel, *Validation of analysis methods*. *Fresenius J. Anal. Chem.* **342** (1992) 769-778.
- [271] DIN EN ISO/IEC 17025; *Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien*, Ausgabe: 2000-04. Beuth-Verlag GmbH, Berlin (2000).
- [272] W. Funk, V. Dammann, G. Donnevert (Hrsg.); *Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie*, 1. Auflage. VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim (1992).
- [273] S. Kromidas (Hrsg.); *Handbuch Validierung in der Analytik*, 1. Auflage. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim (2000).
- [274] Deutsches Institut für Normung e. V., DIN 38402, Teil A 51; *Kalibrierung von Analyseverfahren, Auswertung von Analyseergebnissen und lineare Kalibrierfunktionen für die Bestimmung von Verfahrenskenngrößen*, 16. Auflage. Beuth-Verlag GmbH, Berlin (1986).
- [275] Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften, L221, (nicht veröffentlichungsbedürftige Rechtsakte); *Entscheidung der Kommission vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen*. Aktenzeichen K(2002) 3044.
- [276] FDA Reviewer Guidance; *Validation of chromatographic methods*. Center for Drug Evaluation and Research (CDER) at the Food and Drug Administration (FDA), Rockville (1994).
- [277] ICH: Q2A; *Guideline for industry, text on validation of analytical procedures: definitions and terminology*. International Conference on the Harmonisation of technical requirements for the registration of pharmaceuticals for human use (ICH) (1995).
- [278] ICH: Q2B; *Guidance for industry, validation of analytical procedures: methodology*. International Conference on Harmonisation (ICH) (1996).
- [279] J. Mandel (Ed.); *The statistical analysis of experimental data*, 1. Auflage. Wiley Verlag, New York (1964).
- [280] V. Neitzel; *Die Kalibration von Analyseverfahren (Teil 1). Lineare Kalibrationsfunktionen*. *CLB Chemie in Labor und Biotechnik.* **53(1)** (2002) 9-13.
- [281] K. Doerffel (Hrsg.); *Statistik in der analytischen Chemie*, 5. Auflage. Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie GmbH, Leipzig (1990).
- [282] *Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammanalytik: Strategien für die Durchführung von Wasseranalysen*, 21. Lieferung. VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim (1989).
- [283] Deutsches Institut für Normung e. V., DIN 32645: *Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze, Ermittlung unter Wiederholbedingungen, Begriffe, Verfahren, Auswertung*. Beuth-Verlag GmbH, Berlin (1994).
- [284] L. E. Ettre; *International Union of Pure and Applied Chemistry. Nomenclature for chromatography (IUPAC recommendations 1993)*. *Pure Appl. Chem.* **65(4)** (1993) 819-872.
- [285] Gynkotek HPLC; *Handbuch zum Chromeleon-Chromatographie-Datensystem*, PCD-Version 5,50. Dionex, Idstein (1999).
- [286] M. Stoepler, W. R. Wolf, P. J. Jenks (Eds.); *Reference materials for chemical analysis: certification, availability and proper usage*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim (2001).
- [287] A. Zschunke (Ed.); *Reference materials in analytical chemistry. A guide for selection and use*. Springer Series in Materials Science Vol. 40. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (2000).
- [288] J. J. Karchesy, R. W. Hemingway, Y. L. Foo, E. Barofsky, D. F. Barofsky; *Sequencing procyanidin oligomers by fast atom bombardment mass spectrometry*. *Anal. Chem.* **58** (1986) 2563-2567.

- [289] R. Self, J. Eagles, G. C. Galletti, I. Mueller-Harvey, R. D. Hartley, A. G. H. Lea, D. Magnolato, U. Richli, R. Gujer, E. Haslam; *Fast atom bombardment mass spectrometry of polyphenols (syn. vegetable tannins)*. Biomed. Mass Spectrom. **13** (1986) 449-468.
- [290] M. Careri, A. Mangia, M. Musci; *Overview of the applications of liquid chromatography-mass spectrometry interfacing systems in food analysis: naturally occurring substances in food*. J. Chromatogr. A **794** (1998) 263-297.
- [291] F. A. Mellon, J. R. Chapman, J. A. E. Pratt; *Thermospray liquid chromatography-mass spectrometry in food and agricultural research*. J. Chromatogr. **394** (1987) 209-222.
- [292] A. Kiehne, C. Lakenbrink, U. H. Engelhardt; *Analysis of proanthocyanidins in tea samples: I. LC-MS results*. Z. Lebensm. Unters. Forsch. A **205** (1997) 153-157.
- [293] Y. Y. Lin, K. J. Nk, S. Yang; *Characterization of flavonoids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J. Chromatogr. **629** (1993) 389-393.
- [294] J. F. Hammerstone, S. A. Lazarus, A. E. Mitchell, R. Rucker, H. H. Schmitz; *Identification of procyanidins in cocoa (theobroma cacao) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry*. J. Agric. Food Chem. **47** (1999) 490-496.
- [295] M. A. Aramendía, I. García, F. Lafont, J. M. Marinas; *Determination of isoflavones using high-performance liquid chromatography with atmospheric-pressure chemical ionization mass spectrometry*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **9** (1995) 503-508.
- [296] G. K. Poon; *Analysis of catechins in tea extracts by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry*. J. Chromatogr. A **794** (1998) 63-74.
- [297] E. Le Roux, T. Doco, P. Sarni-Manchado, Y. Lozano, V. Cheyner; *A-type proanthocyanidins from pericarp of litchi chinensis*. Phytochemistry **48(7)** (1998) 1251-1258.
- [298] E. Gariboldi, D. Mascetti, G. Galli, P. Caballion, E. Bosisio; *LC-UV-Electrospray-MS-MS mass spectrometry analysis of plant constituents inhibiting xanthine oxidase*. Pharm. Res. **15(6)** (1998) 936-943.
- [299] P. Miketova, K. H. Schram, J. L. Whitney, E. H. Kerns, S. Valcic, B. N. Timmermann, K. J. Volk; *Mass spectrometry of selected components of biological interest in green tea extracts*. J. Nat. Prod. **61** (1998) 461-467.
- [300] J.-M. Souquet, V. Cheyner, F. Brossaud, M. Moutounet; *Polymeric proanthocyanidins from grape skins*. Phytochemistry, **43(2)** (1996) 509-512.
- [301] S. Guyot, T. Doco, J.-M. Souquet, M. Moutounet, J.-F. Drilleau; *Characterization of highly polymerized proanthocyanidins in cider apple (malus sylvestris var. kermerrien) skin and pulp*. Phytochemistry **44(2)** (1997) 351-357.
- [302] M. A. M. Nawwar, M. S. Marzouk, W. Nigge, M. Linscheid; *High-performance liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric screening für polyphenolic compounds of epilobium hirsutum - the structure of the unique ellagitannin epilobamide-A*. J. Mass Spectrom. **32** (1997) 645-654.
- [303] W. Friedrich, A. Eberhardt, R. Galensa; *Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry*. Eur. Food Res. Technol. **211** (2000) 56-64.
- [304] ACD/ChemSketch Software, Version 5.12 (part of ACD/Labs). Advanced Chemistry Development Inc., Toronto (2003).
- [305] C. Hellriegel; *Untersuchung von molekularen Erkennungsprozessen in Interphasen mit modernen Methoden der High-Resolution- (HR) und HR-MAS-Suspensions-NMR-Spektroskopie*. Dissertation, Universität Tübingen (2001).
- [306] M. Watanabe; *Catechins as antioxidants from buckwheat (fagopyrum esculentum moench) groats*. J. Agric. Food Chem. **46** (1998) 839-845.
- [307] Y. Kashiwada, G. I. Nonaka, I. Nishioka; *Tannins and related compounds. XLV. Rhubarb. (5). Isolation and characterization of flavan-3-ol and procyanidin glucosides*. Chem. Pharm. Bull. **34** (1986) 3208-3222.
- [308] J. F. Stevens, M. L. Deinzer; *Application of ESI-MS and HPLC-APCI-MS(-MS) in the structure elucidation of condensed tannins*. Proc. 45th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Palm Springs (1997).
- [309] I. McMorrough; *Chromatographic procedures for measuring polyphenol haze precursors*. Proc. 17th Congr. Eur. Brew. Conv. **17** (1979) 321-334.
- [310] R. Schorn (Braumeister), mündliche Mitteilung, Warsteiner-Brauerei, Warstein (2004).
- [311] Origin User Manual, Version 4.1, OriginLab Corp., Northampton (1995) 301-305.

A Anhang

INHALTSVERZEICHNIS

A	ANHANG	A-1
A.1	Bestimmung des pK_s-Wertes von (+)-Catechin.....	A-2
A.2	Säulentest	A-3
A.3	Kalibrierdaten des HPLC-DAD-Verfahrens	A-6
A.4	Ausreißertest nach GRUBBS	A-8
A.5	Anpassungstest nach MANDEL [279]	A-8
A.6	Residualanalyse	A-11
A.7	Test auf Homogenität der Varianzen	A-11
A.8	Absicherung der unteren Arbeitsgrenze	A-12
A.9	Empfindlichkeit	A-12
A.10	Stabilitätsberechnungen	A-13
A.11	Tag-zu-Tag-Präzision	A-13
A.12	Übersicht der Messdaten der MSⁿ-Untersuchungen	A-14
A.13	Kalibrierdaten des LC-DAD-MS/MS-Verfahrens	A-36

A.1 Bestimmung des pK_s -Wertes von (+)-Catechin

Die Bestimmung der pK_s -Werte von (+)-Catechin erfolgte photometrisch durch Ermittlung von A-pH-Diagrammen. Am Wendepunkt der ermittelten Titrationskurve ist die Konzentration der Säure äquivalent ihrer korrespondierenden Base, daher gilt hier: $pH = pK_s$. In Abbildung A.1 ist die ermittelte Absorption gegen den pH-Wert der jeweiligen Messlösung aufgetragen. In dem pH-Bereich von 10,9 zeigen die Absorptionswerte eine sprunghafte Zunahme. Dieser Kurvenverlauf lässt sich durch die sigmoidale Boltzmann Funktion

$$y = (a_1 - a_2) / 1 + \exp((x - x_0) / dx) + a_2$$

mit den Koeffizienten $a_1 = 0,8924$; $a_2 = 1,2558$ und $dx = 0,0212$ beschreiben [311]. Zur Ermittlung des pK_s -Wertes von (+)-Catechin wurde der Wendepunkt dieser Funktion über die 2. Ableitung berechnet. Der Wendepunkt liegt bei einem pH-Wert von 10,9 und entspricht damit dem pK_{s1} -Wert.

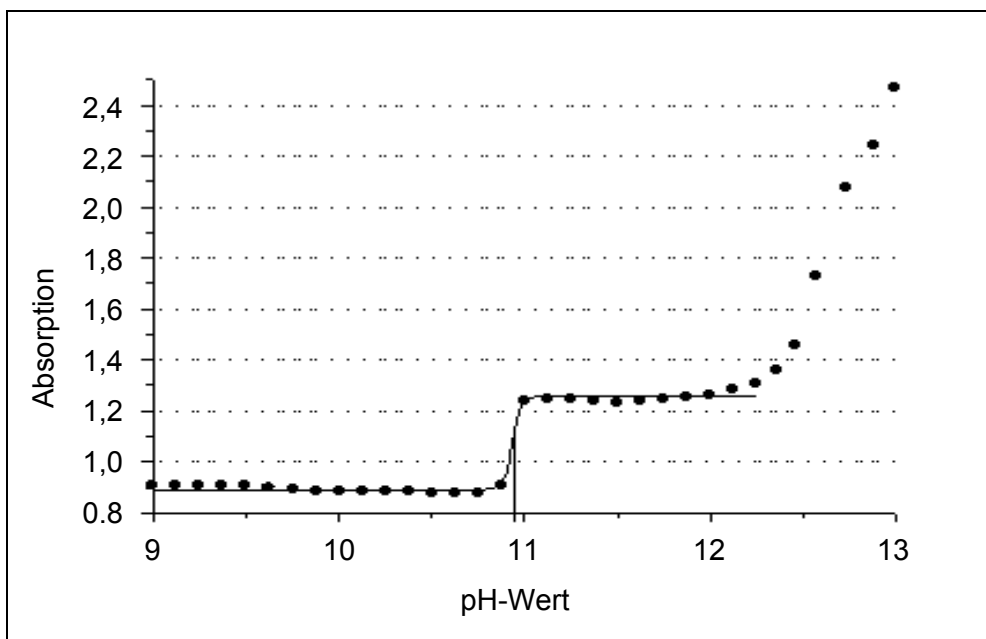


Abbildung A.1: A-pH-Diagramm einer (+)-Catechin-Lösung ($\beta = 200 \text{ mg/L}$) bei 280 nm ($n = 3$)

Da das Gerüst des (+)-Catechin-Moleküls insgesamt fünf Hydroxylgruppen beinhaltet, sollte der Kurvenverlauf, wenn sich die pK_s -Werte signifikant unterscheiden, erwartungsgemäß vier weitere sprunghafte Änderungen des Absorptionsverhalten bei Erhöhung des pH-Wertes und damit vier weitere pK_s -Werte aufzeigen. Bei der Einstellung auf pH-Werte > 12 zeigten die Absorptionswerte der (+)-Catechin-Lösungen einen starken Anstieg ohne sichtbare Wendepunkte, d.h. eine Bestimmung der anderen pK_s -Werte konnte nicht erfolgen.

A.2 Säulentest

Zum absoluten Vergleich von Trennsäulen erweisen sich dimensionslose Größen als am besten geeignet [263]. Hierzu erfolgt im ersten Schritt die Berechnung der Bodenzahl N (s. Gleichung A.1). Mit Gleichung A.2 lässt sich die reduzierte Trennstufenhöhe h ermitteln.

Gleichung A.1:
$$N = 5,54 \left(\frac{R_t}{w} \right)^2$$

mit: R_t = Retentionszeit [min]
 w = Peakbreite [min]

Gleichung A.2:
$$h = \frac{1000 \cdot L_c}{N \cdot d_p}$$

mit: L_c = Säulenlänge [mm]
 d_p = Teilchendurchmesser [μm]

Anstelle der Flussrate F der mobilen Phase wird die reduzierte Fließgeschwindigkeit v berechnet. Hierzu wird die für Umkehrphasen vereinfachte Gleichung A.3 herangezogen.

Gleichung A.3:
$$v \approx 27 \frac{d_p \cdot F}{(d_c)^2}$$

mit: F = Flussrate der mobilen Phase [mL/min]
 d_c = Säulendurchmesser [mm]

In Tabelle A.1 und A.2 sind die berechneten Kenngrößen für die analytischen Trennsäulen bei Verwendung des Gradienten **E1** und **P1** zusammengestellt.

Tabelle A.1: *Ermittelte Kenngrößen der analytischen Trennsäulen (Gradient **E1**)*

Analytische Trennsäule	Flussrate [$\mu\text{L}/\text{min}$]	R_t [min]	w [min]	N	h	v
Wakosil C18	200	15,6	2,1	900	37,0	1,0
	400	11,5	1,0	2027	16,0	2,0
	500	9,8	0,8	2770	12,0	2,5
Nautilus C18	200	17,5	13,4	27	917,0	6,8
	400	13,9	7,1	61	409,0	13,5
	600	11,5	2,8	271	92,0	20,3
	800	8,8	1,5	530	47,0	27,0
YMC C18	200	38,5	1,6	9094	3,3	3,0
	400	23,5	0,9	9933	3,0	6,0
	600	17,2	0,7	11221	2,7	9,0
	800	13,5	0,5	10199	2,9	12,0
	1000	11,1	0,5	9276	3,2	15,0
Synergi C18	200	46,8	1,4	18121	3,5	5,4
	400	26,3	1,0	11519	5,4	10,8
	500	21,8	0,9	10079	6,2	13,5

Fortsetzung von Tabelle A.1:

Omnispher C18	200	55,9	4,7	2226	22,5	3,0
	400	20,5	1,3	4337	11,5	6,0
	600	14,8	1,1	3006	16,6	9,0
	800	12,4	0,8	3812	13,1	12,0
	1000	10,2	0,9	2102	23,8	15,0
Nucleosil C18	200	90,3	15,1	579	86,2	1,7
	400	67,2	8,0	1129	44,2	3,4
	600	45,1	5,2	1302	38,4	5,1
	800	40,9	3,7	1955	25,5	6,8
	1000	33,8	3,0	2034	24,5	8,4
	1200	28,9	2,3	2531	19,7	10,1
Chromolith C18	200	32,2	2,3	3194	15,7	0,5
	400	20,9	1,1	6027	8,3	1,0
	600	14,8	0,7	7187	7,0	1,5
	800	11,3	0,5	7394	6,8	2,0
	1000	9,2	0,4	6974	7,2	2,6
	1200	7,3	0,4	5953	8,4	3,1
	1400	6,7	0,3	6360	7,9	3,6
	1600	5,9	0,3	6109	8,2	4,1
	1800	5,2	0,3	5974	8,4	4,6
	2000	4,7	0,3	5671	8,8	5,1
	2200	4,1	0,2	5664	8,8	5,6
Nucleosil C8	200	6,6	1,9	183	137,0	6,8
	400	3,7	1,4	107	234,0	13,5
	600	2,8	0,8	176	142,0	20,3
	800	2,1	0,6	195	128,0	27,0
Synergi Phenyl	200	21,1	3,3	667	56,3	5,4
	400	12,3	1,4	1171	32,0	10,8
	600	8,3	0,9	1466	25,6	16,2
	800	6,2	0,7	1437	26,1	21,6
Zorbax Phenyl	200	30,1	1,9	4202	7,1	6,8
	400	12,1	1,0	2319	12,9	13,5
	600	8,4	0,6	2911	10,3	20,3
	800	6,3	0,5	2401	12,5	27,0
Luna Phenyl-Hexyl	200	38,2	1,3	13836	3,6	6,8
	400	19,9	0,8	9643	5,2	13,5
	600	13,5	0,6	7612	6,6	20,3
Discovery C16 Amid	200	24,2	7,9	148	202,4	6,1
	400	14,2	2,6	487	61,6	12,2
	600	9,5	1,2	1090	27,5	18,4
	800	7,3	0,8	1227	24,5	24,5
Discovery Cyano	200	7,0	2,2	157	191,0	6,1
	400	3,2	1,3	93	322,4	12,2
Discovery Polyethylenglycol	600	50,5	1,8	12320	4,1	3,8
	800	38,6	1,2	15503	3,2	5,1
	1000	31,6	1,1	13219	3,8	6,4
	1200	26,1	1,0	11596	4,3	7,7
Discovery Pentafluorophenyl	600	27,4	2,7	1669	30,0	3,8
	800	15,9	2,2	813	61,5	5,1

Tabelle A.2: *Ermittelte Kenngrößen der analytischen Trennsäulen (Gradient P1)*

Analytische Trennsäule	Flussrate [µL/min]	R _t [min]	w [min]	N	h	v
Wakosil C18	200	34,6	3,8	1311	25,1	1,0
	300	32,5	0,7	39073	0,9	1,5
	400	28,0	0,6	38230	0,9	2,0
Nautilus C18	200	44,6	2,3	6165	4,0	6,8
	400	31,5	0,9	17956	1,4	13,5
	600	24,7	0,9	12100	2,0	20,3
	800	20,8	0,9	8930	2,8	27,0
YMC C18	200	49,7	1,0	39795	0,8	3,0
	400	35,5	0,4	119836	0,3	6,0
	600	29,3	0,4	97573	0,3	9,0
	800	25,4	0,4	80703	0,4	12,0
	1000	22,5	0,4	66109	0,5	15,0
Synergi C18	200	49,9	1,1	32870	1,9	5,4
	300	42,0	0,5	117366	0,5	8,1
	400	36,0	0,4	106483	0,6	10,8
	500	32,3	0,4	99068	0,6	13,5
Omnispher C18	200	20,2	3,3	598	83,7	3,0
	400	32,9	0,7	32692	1,5	6,0
	600	27,4	0,9	15652	3,2	9,0
	800	25,0	0,7	22246	2,3	12,0
	1000	23,3	0,6	28042	1,8	15,0
Nucleosil C18	200	65,1	8,1	1057	473,0	1,7
	400	49,3	4,5	1897	26,3	3,4
	600	42,5	3,6	2304	21,7	5,1
	800	36,5	2,4	3702	13,5	6,8
	1000	34,2	1,8	5715	8,7	8,4
	1200	31,3	1,2	10850	4,6	10,1
Chromolith C18	200	49,6	1,8	12434	4,0	0,5
	400	34,1	0,5	63962	0,8	1,0
	600	27,6	0,5	57739	0,9	1,5
	800	23,5	0,4	52417	1,0	2,0
	1000	20,8	0,4	46625	1,0	2,6
	1200	18,9	0,4	41507	1,2	3,1
	1400	17,3	0,4	39142	1,3	3,6
	1600	16,3	0,3	36302	1,4	4,1
	1800	15,2	0,3	32843	1,5	4,6
	2000	14,3	0,3	31444	1,6	5,1
	2200	13,7	0,3	30898	1,6	5,6
	2400	12,9	0,3	27388	1,8	6,1
Nucleosil C8	200	6,8	5,4	26	955,5	6,8
	400	10,0	2,6	246	101,6	13,5
	600	6,9	1,5	331	75,5	20,3
	800	5,3	1,1	350	71,4	27,0
Synergi Phenyl	200	35,7	4,0	1251	30,0	5,4
	400	21,5	0,9	8890	4,2	10,8
	600	15,8	0,8	6895	5,4	16,2
	800	12,0	0,7	5341	7,0	21,6
Zorbax Phenyl	200	37,8	3,7	1664	18,0	6,8
	400	23,8	0,8	13112	2,3	13,5
	600	17,9	0,7	9400	3,2	20,3
	800	14,2	0,7	6937	4,3	27,0

Fortsetzung von Tabelle A.2:

Luna Phenyl-Hexyl	200	45,6	1,5	15360	3,3	6,8
	300	37,5	0,6	64485	0,8	10,1
	400	31,8	0,5	62107	0,8	13,5
	500	13,7	4,8	130	384,6	16,9
	600	17,7	1,6	1930	25,9	20,3
Discovery C16 Amid	200	45,9	2,7	4772	6,3	6,1
	400	27,3	0,7	24402	1,2	12,2
	600	21,0	0,6	17561	1,7	18,4
	800	17,2	0,6	13883	2,2	24,5
Discovery Cyano	200	5,4	2,8	59	508,2	6,1
	400	3,4	1,4	95	316,0	12,2
Discovery Polyethylenglycol	400	56,3	0,8	83204	0,6	2,6
	600	43,6	0,8	52706	1,0	3,8
	800	35,8	0,8	36533	1,4	5,1
	1000	30,5	0,7	30324	1,7	6,4
	1200	26,9	0,7	25847	1,9	7,7
Discovery Pentafluorophenyl	200	75,3	0,6	269371	0,2	1,3
	400	56,2	0,4	332000	0,2	2,6
	600	46,8	0,4	269996	0,2	3,8
	800	41,0	0,4	207642	0,2	5,1
	1000	36,8	0,4	158128	0,3	6,4

A.3 Kalibrierdaten des HPLC-DAD-Verfahrens

Tabelle A.3: Mittelwerte und relative Standardabweichungen s_{rel} für Peakflächen sowie Peakhöhen zur Bestimmung des linearen Bereiches (Gradient E2) ($n = 10$)

$\beta(+)$ -Catechin [mg/L]	Peakhöhe [mAU]	Peakfläche \bar{y} [mAU·min]	Peakfläche s_{rel} [%]
0,125	0,03	0,05	29,03
0,1875	0,07	0,09	25,46
0,25	0,11	0,13	199,33
0,625	0,16	0,24	115,45
1,25	0,25	0,38	59,88
1,875	0,40	0,65	5,69
2,5	0,67	0,92	2,49
6,25	1,66	2,49	1,98
12,5	3,41	5,29	0,54
18,75	5,11	7,91	1,90
25	6,92	10,80	1,36
62,5	17,05	27,66	0,26
125	34,51	55,74	0,34
187,5	53,05	85,75	0,14
250	70,04	113,51	0,21
625	170,69	279,78	0,12
1250	367,08	575,94	0,13
1875	521,10	862,79	0,06
2500	645,97	1141,53	0,03

Tabelle A.4: Mittelwerte und relative Standardabweichungen s_{rel} für Peakflächen sowie Peakhöhen zur Bestimmung des linearen Bereiches (Gradient P2) ($n = 10$)

$\beta((+)\text{-Catechin})$ [mg/L]	Peakhöhe [mAU]	Peakfläche \bar{y} [mAU·min]	Peakfläche s_{rel} [%]
0,125	0,09	0,04	125,35
0,1875	0,12	0,05	24,45
0,25	0,13	0,06	18,92
0,625	0,28	0,15	8,08
1,25	0,76	0,55	5,00
1,875	1,04	0,74	3,62
2,5	1,43	1,04	2,93
6,25	3,65	2,61	0,83
12,5	8,49	6,10	1,40
18,75	11,73	8,35	1,16
25	16,28	11,16	0,30
62,5	40,86	28,17	1,44
125	79,95	55,81	1,06
187,5	123,04	84,55	0,56
250	160,97	112,74	0,57
625	384,02	278,98	0,62
1250	704,06	563,51	0,91
1875	949,31	842,07	0,63
2500	1152,46	1116,36	0,31

Tabelle A.5: Mittelwerte, Standardabweichungen und relative Standardabweichungen s_{rel} der Peakflächen zur Bestimmung der Kalibrierfunktion (Gradient E2) ($n = 10$)

$\beta((+)\text{-Catechin})$ [mg/L]	Peakfläche \bar{y} [mAU·min]	Peakfläche s [mAU·min]	Peakfläche s_{rel} [%]
5	2,49	0,04	1,61
250	113,51	0,24	0,21
500	229,75	0,51	0,22
750	346,54	0,59	0,17
1000	457,85	0,27	0,06
1250	575,94	0,75	0,13
1500	684,81	0,34	0,05
1750	800,91	1,84	0,23
2250	1005,85	0,80	0,08
2500	1141,53	0,34	0,03

Tabelle A.6: Mittelwerte, Standardabweichungen und relative Standardabweichungen s_{rel} der Peakflächen zur Bestimmung der Kalibrierfunktion (Gradient **P2**) ($n = 10$)

$\beta((+)\text{-Catechin})$ [mg/L]	Peakfläche \bar{y} [mAU·min]	Peakfläche s [mAU·min]	Peakfläche s_{rel} [%]
5	2,43	0,03	1,23
250	112,51	0,56	0,50
500	223,07	2,10	0,94
750	332,28	1,46	0,44
1000	441,14	3,22	0,73
1250	553,74	8,31	1,50
1500	660,62	3,90	0,59
1750	770,03	10,86	1,41
2250	974,79	5,07	0,52
2500	1090,33	18,72	1,64

A.4 Ausreißertest nach GRUBBS

Der Ausreißertest nach GRUBBS [272, 281] wird zur Aufdeckung einzelner Ausreißerwerte in einer Analysenserie genutzt. Hierzu wird der Mittelwert \bar{y} (s. Gleichung A.4) der Messwerte einer Analysenserie gebildet und die Standardabweichung s der Analysendaten berechnet. Durch Einsetzen in Gleichung A.5 wird für den Analysenwert y^* mit der größten Differenz zum Mittelwert überprüft, ob es sich um einen Ausreißer handelt.

Gleichung A.4:
$$\bar{y} = \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N y_i$$

Gleichung A.5:
$$PW = \frac{|y^* - \bar{y}|}{s}$$

Der ermittelte Prüfwert PW wird mit den statistischen Tabellenwerten rM für den GRUBBS-Test [267, 281] verglichen. Das Test-Ergebnis ist wie folgt zu bewerten [275]:

$$\begin{array}{ll}
 PW \leq rM (f, P = 90 \%): & \text{kein Ausreißer} \\
 rM (f, P = 90 \%) < PW \leq rM (f, P = 95 \%): & \text{wahrscheinlich Ausreißer} \\
 PW > rM (f, P = 95 \%): & \text{Ausreißer}
 \end{array}$$

A.5 Anpassungstest nach MANDEL [279]

Zur Durchführung des Testes werden 10 Proben einer Konzentrationsreihe vermessen, deren Konzentrationen möglichst äquidistant über den gewählten Arbeitsbereich verteilt liegen. Zunächst werden aus den erhaltenen Messwerten die Kalibrierfunktionen 1. und 2. Grades (mit x_i = Konzentration und y_i = Detektorsignal), sowie die jeweiligen Reststandardabweichungen

chungen s_{y1} und s_{y2} berechnet. Durch Vergleichen der Kalibrierfunktionen 1. und 2. Grades wird die Verringerung der Reststandardabweichung, die sich aufgrund der Wahl des Regressionsmodells 2. Ordnung gegenüber dem 1. Ordnung ergibt, auf Signifikanz geprüft [272, 273, 281].

Kalibrierfunktion 1. Grades: $y = a + bx$

Die Steigung b ist ein Maß für die Empfindlichkeit und wird nach Gleichung A.6 ermittelt. Die hierzu benötigten Mittelwerte der Konzentration (\bar{x}) und des Detektorsignals (\bar{y}) werden mit Gleichung A.4 und A.7 berechnet.

$$\text{Gleichung A.6:} \quad b = \frac{\sum_{i=1}^N [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

$$\text{Gleichung A.7:} \quad \bar{x} = \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N x_i$$

Der Schnittpunkt mit der Ordinate a (errechneter Blindwert) ergibt sich dann aus Gleichung A.8:

$$\text{Gleichung A.8:} \quad a = \bar{y} - b\bar{x}$$

Die **Reststandardabweichung** s_{y1} gibt die Streuung der Messwerte um die Regressionsgerade an, sie ist ein Präzisionsmaß für die Kalibrierung:

$$\text{Gleichung A.9:} \quad s_{y1} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - 2}}$$

mit:

$$\text{Gleichung A.10:} \quad \hat{y}_i = a + bx_i$$

Kalibrierfunktion 2. Grades: $y = a + bx + cx^2$

Die Regressionsanalyse liefert die Kalibrierfunktion 2. Grades mit ihren Funktionskoeffizienten a , b und c . Diese können mit Gleichung A.11 bis A.13 berechnet werden:

$$\text{Gleichung A.11:} \quad a = \frac{\left(\sum_{i=1}^N y_i - b \sum_{i=1}^N x_i - c \sum_{i=1}^N x_i^2 \right)}{N}$$

$$\text{Gleichung A.12:} \quad b = \frac{Q_{xy} - c \cdot Q_{x^3}}{Q_{xx}}$$

$$\text{Gleichung A.13:} \quad c = \frac{Q_{xy} \cdot Q_{x^3} - Q_{x^2y} \cdot Q_{xx}}{Q_{x^3}^2 - Q_{xx} \cdot Q_{x^4}}$$

mit:

$$\text{Gleichung A.14: } Q_{xx} = \sum_{i=1}^N x_i^2 - \left(\frac{\left(\sum_{i=1}^N x_i \right)^2}{N} \right)$$

$$\text{Gleichung A.15: } Q_{xy} = \sum_{i=1}^N (x_i \cdot y_i) - \left(\frac{\left(\sum_{i=1}^N x_i \right) \cdot \left(\sum_{i=1}^N y_i \right)}{N} \right)$$

$$\text{Gleichung A.16: } Q_{x^3} = \sum_{i=1}^N x_i^3 - \left(\frac{\left(\sum_{i=1}^N x_i \right) \cdot \left(\sum_{i=1}^N x_i^2 \right)}{N} \right)$$

$$\text{Gleichung A.17: } Q_{x^4} = \sum_{i=1}^N x_i^4 - \left(\frac{\left(\sum_{i=1}^N x_i^2 \right)^2}{N} \right)$$

$$\text{Gleichung A.18: } Q_{x^2y} = \sum_{i=1}^N (x_i^2 \cdot y_i) - \left(\frac{\left(\sum_{i=1}^N y_i \right) \cdot \left(\sum_{i=1}^N x_i^2 \right)}{N} \right)$$

Die **Reststandardabweichung** s_{y_2} berechnet sich nach Gleichung A.19 und A.20:

$$\text{Gleichung A.19: } s_{y_2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - 3}}$$

$$\text{Gleichung A.20: } \hat{y}_i = a + bx_i + cx_i^2$$

Aus den Reststandardabweichungen s_{y_1} und s_{y_2} wird die Differenz der Varianzen DS^2 ermittelt:

$$\text{Gleichung A.21: } DS^2 = (N - 2) s_{y_1}^2 - (N - 3) s_{y_2}^2 \text{ mit dem Freiheitsgrad } f = 1$$

Anschließend wird für den F -Test der Prüfwert PW berechnet und mit dem Tabellenwert $F(f_1 = 1, f_2 = N - 3, P = 99 \%)$ verglichen [272].

$$\text{Gleichung A.22: } PW = \frac{DS^2}{s_{y_2}^2}$$

Es können zwei Fälle auftreten:

$PW \leq F$: Der errechnete Prüfwert ist kleiner oder gleich dem tabellierten F -Wert. Durch die Kalibrierfunktion 2. Grades wird keine signifikant bessere Anpassung erreicht, die Kalibrierfunktion ist linear.

$PW > F$: Der ermittelte Prüfwert ist größer als der F -Wert. Es sollte versucht werden, durch eine Verbesserung der Einzelschritte des Analysenverfahrens eine Verkleinerung zu erzielen. Gelingt dies nicht, so könnte durch Einengung des Arbeitsbereiches eine ausreichende Linearität erhalten werden. Letztendlich bleibt die Möglichkeit einer Auswertung der Messergebnisse über die Kalibrierfunktion 2. Grades.

A.6 Residualanalyse

Die Residualanalyse ist eine Möglichkeit zu überprüfen, ob der gewählte funktionale Ansatz des Kalibriermodells die Messergebnisse hinreichend beschreibt. Dabei ergeben sich die Residuen d_i als vertikale Abstände der Messwerte von der Regressionskurve [272].

Gleichung A.23:
$$d_i = y_i - \hat{y}_i$$

Die Residuen d_i sind bei richtigem Modellansatz normalverteilt. Weisen die Residuen jedoch einen Trend auf, so ist der zugrunde gelegte Regressionsansatz zu überprüfen.

A.7 Test auf Homogenität der Varianzen

Zur Überprüfung der Varianzhomogenität werden jeweils Standard-Lösungen der niedrigsten (x_1) sowie der höchsten Konzentration (x_{10}) des vorläufigen Arbeitsbereiches getrennt analysiert. Man erhält 20 Messwerte ($y_{i,j}$) aus diesen Messwertserien. Für beide Datensätze werden die Varianzen s_1^2 und s_{10}^2 nach folgender Formel berechnet [272, 283]:

Gleichung A.24:
$$s_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1}$$

Gleichung A.25:
$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} y_{i,j}}{n_i} \quad \text{für } i = 1 \text{ bzw. } i = 10$$

Aus den ermittelten Varianzen der beiden Messwertserien wird anschließend der Prüfwert PW berechnet.

Gleichung A.26:
$$PW = \frac{s_{10}^2}{s_1^2} \quad \text{für } s_{10}^2 > s_1^2$$

oder

Gleichung A.27:
$$PW = \frac{s_1^2}{s_{10}^2} \quad \text{für } s_1^2 > s_{10}^2$$

Der ermittelte Prüfwert wird mit dem Wert aus der F -Tabelle für $f_1 = f_2 = f = N - 1 = 9$ bei einem Vertrauensbereich von 99 % verglichen [272]. Dabei können folgende Fälle auftreten:

$PW < F$: kein signifikanter Unterschied zwischen den Varianzen s_1^2 und s_{10}^2 feststellbar (Homogenität der Varianzen).

$PW \geq F$: signifikanter Unterschied zwischen den Varianzen s_1^2 und s_{10}^2 (Inhomogenität der Varianzen). Es sollte ein engerer Arbeitsbereich gewählt und die Varianzinhomogenität erneut überprüft werden, bis $PW < F$ gilt, oder es müssen gewichtete Regressionsmodelle angewendet werden.

A.8 Absicherung der unteren Arbeitsgrenze

Eine Kalibrierfunktion ist nur dann für quantitative Analysen verwendbar, wenn sich alle später mit ihr berechneten Analyseergebnisse signifikant von Null unterscheiden [272, 273]. Daher ist zu prüfen, ob diese Unterscheidung für die gewählte untere Arbeitsgrenze gegeben ist. Die Berechnungsformel für den Prüfwert x_p mit $t(f = N - 2, P = 95 \%)$ ist im folgenden aufgeführt:

Gleichung A.28:

$$x_p = 2 \cdot s_{x_0} \cdot t \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{(y_p - \bar{y})^2}{b^2 \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}}$$

mit:

Gleichung A.29:

$$y_p = a + s_{y_1} \cdot t \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}}$$

Es können zwei Fälle auftreten:

$x_p \leq x_1$: Der gesamte gewählte Arbeitsbereich ist statistisch abgesichert, d. h. die untere Grenze des Arbeitsbereiches x_1 unterscheidet sich signifikant von Null.

$x_p > x_1$: Die untere Grenze des Arbeitsbereiches x_1 unterscheidet sich nicht signifikant von Null. Der Arbeitsbereich muss eingeschränkt und erneut berechnet werden.

A.9 Empfindlichkeit

Das Maß für die Empfindlichkeit ergibt sich aus der Änderung des Messwertes bei einer Änderung des Konzentrationswertes. Liegt für das Analysenverfahren eine lineare Kalibrierfunktion vor, ist die Empfindlichkeit im gesamten Arbeitsbereich konstant und entspricht dem Regressionskoeffizienten b . Mit Hilfe der Empfindlichkeit kann dann die **Verfahrensstandardabweichung** s_{x_0} und die **relative Verfahrensstandardabweichung** V_{x_0} ermittelt werden [267, 272].

Gleichung A.30:
$$s_{x_0} = \frac{s_{y_1}}{b}$$

Gleichung A.31:
$$V_{x_0} = \frac{s_{x_0} \cdot 100\%}{\bar{x}}$$

A.10 Stabilitätsberechnungen

Zur Beurteilung der Stabilität nach [275] erfolgt die Berechnung des Restanalyt nach der im folgenden aufgeführten Formel:

Gleichung A.32:
$$\text{Restanalyt (\%)} = c_i \cdot \frac{100}{c_0}$$

mit: c_i = Analyt-Konzentration zum Zeitpunkt i
 c_0 = Ausgangskonzentration der Lösung

Die Ermittlung der Wiederholgrenze [267, 269] für die Beurteilung, ob es sich bei der Differenz zwischen zwei Einzelmesswerten um eine signifikante Änderung handelt, erfolgt durch die Berechnung der Wiederholdifferenz r .

Gleichung A.33
$$r = f \cdot \sqrt{2} s$$

mit: r = Wiederholdifferenz
 s = Standardabweichung
 f = empirisch ermittelter Zahlenwert

Die Variable f hängt von dem gewählten Signifikanzniveau P und der Verteilung der Messwerte ab. Für $P = 90\%$ gilt $f = 2,3$, für $P = 99\%$ gilt $f = 2,3$ und für ein Signifikanzniveau von $P = 95\%$ ein Faktor von 1,96; damit erhält man für die Wiederholdifferenz:

Gleichung A.34:
$$r = 1,96 \cdot \sqrt{2} \cdot s = 2,77 \cdot s \approx 2,8 \cdot s$$

A.11 Tag-zu-Tag-Präzision

Bei der Beurteilung der Tag-zu-Tag-Präzision erfolgt die Angabe des Vertrauensbereiches. Der Vertrauensbereich beschreibt die Abweichung von einem gegebenen Sollwert, innerhalb derer die zu erwartenden Messergebnisse mit einer bestimmten statistischen Sicherheit (Wahrscheinlichkeit) liegen. In der Regel werden die Vertrauensbereiche für 95 % Sicherheit angegeben. Diese bezeichnet man als Wiederholbarkeit r_{95} :

Gleichung A.35:
$$r_{95} = f \cdot \sqrt{2} \cdot s$$

Wobei der Faktor f gemäß der DIN ISO 5727 [267, 269] für die Beurteilung der Präzisionsergebnisse als 2 gesetzt und das Produkt $2 \cdot \sqrt{2}$ auf 2,8 gerundet. Es ergibt sich also.

Gleichung A.36:
$$r_{95} = 2,8 \cdot s$$

Tabelle A.9: Fragmentierung von Procyanidin B3 ($R_t = 27,47$ min): Dimer Catechin-Catechin (Precursor-Ion $[M-H]^-$ mit m/z 576,9)

Neutralverlust/ Summenformel	Masse [g/mol]	1. Product- Ion [m/z]	Neutralverlust/ Summenformel	Masse [g/mol]	2. Product- Ion [m/z]	Neutralverlust/ Summenformel	Masse [g/mol]	3. Product- Ion [m/z]
H ₂ O	18	559,0	H ₂ O	18	541,0			
			C ₈ H ₈ O ₃	152	406,9			
			C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270	289,0	C ₂ H ₄ O	44	245,1
			C ₁₅ H ₁₂ O ₅	272	286,9	H ₂ O	18	269,2
						CO	28	259,0
C ₂ H ₄ O	44	532,9	C ₈ H ₁₄ O ₃ / C ₇ H ₁₀ O ₄	158	374,6			
C ₆ H ₆ O ₃	126	451,0	H ₂ O	18	433,0			
			C ₂ H ₂ O	42	409,0			
			C ₉ H ₈ O ₃	164	286,9	H ₂ O	18	269,2
						CO	28	259,0
C ₈ H ₈ O ₃	152	424,9	H ₂ O	18	407,0	H ₂ O	18	389,1
						C ₂ H ₄ O	44	363,0
						C ₄ H ₄ O	68	339,0
						C ₄ H ₆ O ₂	86	321,1
						C ₆ H ₆ O ₂	110	297,0
						C ₇ H ₆ O ₂	122	285,0
						C ₆ H ₆ O ₃	126	281,1
						C ₈ H ₈ O ₃	152	255,1
						C ₉ H ₈ O ₃	164	243,0
						C ₁₂ H ₇ O ₅	231	176,0
			C ₃ H ₈ O ₃ / C ₆ H ₄ O	92	333,0			
			C ₆ H ₆ O ₃	126	299,0			
			C ₇ H ₈ O ₃	140	285,0			
			C ₇ H ₁₀ O ₃	142	283,0			
			C ₇ H ₇ O ₄	155	269,9			
			C ₈ H ₁₀ O ₄	170	255,0			
			C ₉ H ₁₀ O ₄	182	243,0			
C ₈ H ₁₀ O ₄	170	407,1						
C ₁₅ H ₁₂ O ₆	288	289,0	C ₂ H ₄ O	44	245,1			
C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290	286,9	C ₂ H ₄ O	44	243,1			

Tabelle A.10: Fragmentierung von Prodelphinidin B3 ($R_t = 14,98$ min): Dimer Catechin-Galocatechin (Precursor-Ion $[M-H]^-$ mit m/z 592,9)

Neutral-verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	1. Product- ion [m/z]	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	2. Product- ion [m/z]	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	3. Product- ion [m/z]
H ₂ O	18	575,0	C ₅ H ₇ O ₂	99	475,9			
			C ₆ H ₆ O ₂	110	465,1			
			C ₇ H ₆ O ₂	122	453,0			
			C ₆ H ₆ O ₃	126	449,1			
			C ₇ H ₆ O ₃	138	437,1			
			C ₈ H ₈ O ₃	152	423,0			
			C ₁₃ H ₁₂ O ₅	248	327,2			
			C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270	305,0			
			C ₁₅ H ₁₆ O ₆	292	283,0			
			C ₂₂ H ₂₂ O ₇	398	177,0			
C ₆ H ₆ O ₃	126	467,0	H ₂ O	18	448,8			
			C ₂ H ₄ O	44	423,1			
			C ₉ H ₆ O ₃	162	304,9			
			C ₉ H ₆ O ₄	178	289,0	C ₂ H ₄ O	44	245,2
						C ₄ H ₄ O ₂	84	205,0
						C ₆ H ₆ O ₂	110	179,0
			C ₁₁ H ₁₀ O ₄	206	260,8			
C ₈ H ₈ O ₃	152	440,9	H ₂ O	18	423,0	H ₂ O	18	405,1
						H ₄ O ₂	36	387,1
						C ₂ H ₆ O ₂	62	361,0
						C ₆ H ₆ O ₃	126	297,0
						C ₇ H ₆ O ₃	138	285,1
						C ₇ H ₈ O ₃	140	282,9
						C ₈ H ₈ O ₄	168	255,1
						C ₉ H ₈ O ₄	180	243,0
			C ₂ H ₄ O	44	397,0			
			C ₈ H ₈ O ₄	168	273,0			
C ₈ H ₈ O ₄	168	424,9	H ₂ O	18	407,1			
C ₈ H ₁₀ O ₄	170	423,0						
C ₁₅ H ₁₂ O ₆	288	305,0	H ₂ O	18	287,0			
			C ₂ H ₄ O	44	261,1			
			C ₄ H ₄ O ₂	84	220,9			
			C ₆ H ₆ O ₃	126	179,0			
C ₁₅ H ₁₄ O ₇	306	287,0	C ₂ H ₄ O	44	243,1			

Tabelle A.11: Fragmentierung von Prodelphinidin B3 ($R_t = 13,77$ min): Dimer Gallo-catechin-Catechin (Precursor-Ion $[M-H]^-$ mit m/z 592,9)

Neutral-verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	1. Product- ion [m/z]	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	2. Product- ion [m/z]	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	3. Product- ion [m/z]
H ₂ O	18	575,0	C ₅ H ₇ O ₂ C ₆ H ₆ O ₃ C ₇ H ₆ O ₃ C ₈ H ₆ O ₃ C ₉ H ₈ O ₄ C ₁₅ H ₁₂ O ₆	99 126 138 150 180 288	476,0 449,0 437,1 424,9 394,9 287,0	H ₂ O	18	407,3
C ₆ H ₆ O ₃	126	467,0	H ₂ O C ₂ H ₄ O C ₈ H ₈ O ₃ C ₉ H ₆ O ₄ C ₉ H ₈ O ₄ C ₁₁ H ₁₀ O ₅ C ₁₃ H ₁₀ O ₆ C ₁₅ H ₁₄ O ₆	18 44 152 178 180 222 262 290	449,3 423,2 314,8 289,0 287,1 245,2 205,0 177,0			
C ₈ H ₈ O ₃	152	440,9						
C ₈ H ₈ O ₄	168	424,9	H ₂ O C ₃ H ₈ O ₃ C ₆ H ₆ O ₃ C ₇ H ₈ O ₃ C ₇ H ₁₀ O ₃ C ₇ H ₇ O ₄ C ₈ H ₁₀ O ₄ C ₉ H ₁₀ O ₄	18 92 126 140 142 155 170 182	407,0 333,0 299,0 285,0 283,0 269,9 255,0 243,0	H ₂ O C ₂ H ₄ O C ₄ H ₄ O C ₄ H ₆ O ₂ C ₆ H ₆ O ₂ C ₇ H ₆ O ₂ C ₆ H ₆ O ₃ C ₈ H ₈ O ₃ C ₉ H ₈ O ₃ C ₁₂ H ₇ O ₅	18 44 68 86 110 122 126 152 164 231	389,1 363,0 339,0 321,1 297,0 285,0 281,1 255,1 243,0 176,0
C ₈ H ₁₀ O ₅	186	407,0						
C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290	302,9	H ₂ O C ₂ H ₄ O C ₄ H ₄ O ₂ C ₅ H ₄ O ₃ C ₆ H ₆ O ₃ C ₉ H ₆ O ₄	18 44 84 112 126 178	285,3 259,0 219,1 191,0 177,0 125,0			
C ₁₅ H ₁₂ O ₇	304	289,0	C ₂ H ₄ O C ₄ H ₄ O ₂ C ₆ H ₆ O ₂	44 84 110	245,1 205,0 178,9	C ₂ H ₂ O	42	203,1

Tabelle A.12: Fragmentierung von Prodelphinidin B3 ($R_t = 21,08$ min): Dimer Gallo-catechin-Catechin (Precursor-Ion $[M-H]^-$ mit m/z 592,9)

Neutral-verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	1. Product- ion [m/z]	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	2. Product- ion [m/z]	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	3. Product- ion [m/z]		
H ₂ O	18	575,0	C ₄ H ₇ O ₂	82	492,9	H ₂ O	18	437,1		
			C ₇ H ₄ O ₂	120	455,0					
			C ₈ H ₆ O ₃	150	424,9					
			C ₈ H ₈ O ₄	168	407,3					
			C ₉ H ₈ O ₄	180	394,9					
			C ₁₀ H ₁₁ O ₅	211	364,2					
			C ₁₅ H ₁₂ O ₆	288	287,0					
C ₆ H ₆ O ₃	126	467,0	H ₂ O	18	448,9					
			C ₂ H ₄ O	44	423,0					
			C ₉ H ₆ O ₄	178	288,9					
			C ₉ H ₈ O ₄	180	287,1					
			C ₁₁ H ₁₀ O ₅	222	245,2					
			C ₁₃ H ₁₀ O ₆	262	205,0					
			C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290	177,1					
C ₈ H ₈ O ₃	152	440,9								
C ₈ H ₈ O ₄	168	424,9	H ₂ O	18	407,0	H ₂ O	18	389,1		
						C ₂ H ₄ O	44	363,0		
						C ₄ H ₄ O	68	339,0		
						C ₄ H ₆ O ₂	86	321,1		
						C ₆ H ₆ O ₂	110	297,0		
						C ₇ H ₆ O ₂	122	285,0		
						C ₆ H ₆ O ₃	126	281,1		
						C ₈ H ₈ O ₃	152	255,1		
						C ₉ H ₈ O ₃	164	243,0		
						C ₁₂ H ₇ O ₅	231	176,0		
						C ₃ H ₈ O ₃	92	333,0		
						C ₆ H ₆ O ₃	126	299,0		
						C ₇ H ₈ O ₃	140	285,0		
						C ₇ H ₁₀ O ₃	142	283,0		
						C ₇ H ₇ O ₄	155	269,9		
			C ₈ H ₁₀ O ₄	170	255,0					
			C ₉ H ₁₀ O ₄	182	243,0					
C ₈ H ₁₀ O ₅	186	407,0								
C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290	302,9	H ₂ O	18	285,3					
			C ₂ H ₄ O	44	259,0					
			C ₃ H ₈ O ₃	92	220,9					
			C ₆ H ₆ O ₃	126	177,0					
			C ₉ H ₆ O ₄	178	125,0					
C ₁₅ H ₁₂ O ₇	304	289,0	C ₂ H ₄ O	44	245,1	H ₂ O	18	227,0		
						C ₂ H ₂ O	42	203,1		
			C ₄ H ₄ O ₂	84	205,1					
			C ₆ H ₆ O ₂	110	178,9					

Tabelle A.13: Fragmentierung von Prodelphinidin Dimer Gallocatechin-Galocatechin ($R_t = 8,31 \text{ min}$) (Precursor-Ion $[M-H]^-$ mit m/z 609,1)

Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	1. Product- ion [m/z]	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	2. Product- ion [m/z]	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	3. Product- ion [m/z]	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	4. Product- ion [m/z]
H ₂ O	18	591,0	H ₂ O	18	572,5						
			C ₆ H ₆ O ₃	126	464,9						
			C ₇ H ₆ O ₃	138	453,1						
			C ₈ H ₆ O ₄	166	425,1						
			C ₈ H ₈ O ₄	168	422,9						
			C ₁₀ H ₁₄ O ₅	214	376,9						
			C ₁₅ H ₁₄ O ₇	306	285,1						
			C ₁₅ H ₁₆ O ₇	308	282,9						
C ₃ H ₃ O ₃ / C ₄ H ₇ O ₂	87	521,8	H ₂ O	18	503,8						
			C ₄ HO ₂	81	441,0						
			C ₄ H ₅ O ₃	101	421,0						
			C ₆ H ₄ O ₃ / C ₇ H ₈ O ₂	124	398,1						
C ₆ H ₆ O ₃	126	483,0	H ₂ O	18	464,9						
			C ₂ H ₂ O	42	440,9			18	H ₂ O		
			C ₄ H ₄ O ₂	84	399,1						422,9
			C ₈ H ₆ O ₂	134	349,0						
			C ₉ H ₁₀ O ₄	182	301,0						
			C ₁₂ H ₈ O ₅	232	251,0						

Tabelle A.14: Fragmentierung von Procyanidin C2 ($R_t = 32,04$ min): Trimer Catechin-Catechin-Catechin (Precursor-Ion $[M-H]^-$ mit m/z 864,9)

Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	1. Product- ion	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	2. Product- ion	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	3. Product- ion	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	4. Product- ion
H ₂ O	18	846,9	C ₂ H ₄ O ₂	60	787,1						
			C ₄ H ₂ O ₂	82	764,6						
			C ₇ H ₄ O ₂	120	726,9						
			C ₈ H ₈ O ₃	152	695,0	H ₂ O	18	677,3			
			C ₁₃ H ₁₂ O ₅	248	598,6						
			C ₁₅ H ₁₂ O ₆	288	559,1						
			C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290	557,0						
			C ₂₂ H ₁₆ O ₁₀	440	407,0						
			C ₃₀ H ₂₂ O ₁₁	558	289,2						
C ₄ H ₄ O ₂	84	781,0	C ₄ H ₂ O ₂	82	699,0						
C ₄ H ₂ O ₃	98	767,1	C ₂₂ H ₁₆ O ₁₀	440	341,0						
C ₆ H ₆ O ₃	126	738,9									
			C ₄ H ₂ O ₂	82	657,0						
			C ₆ H ₆ O ₂	110	628,4						
			C ₈ H ₈ O ₃	152	587,0	H ₂ O	18	568,9			
			C ₁₅ H ₁₂ O ₆	288	451,1						
			C ₂₄ H ₁₈ O ₉	450	289,2						
C ₈ H ₈ O ₃	152	712,8	H ₂ O	18	694,9	H ₂ O	18	677,0			
						C ₄ H ₂ O ₂	82	613,0	H ₂ O	18	525,0
						C ₈ H ₈ O ₃	152	542,9	C ₂ H ₄ O	44	499,1
									C ₄ H ₂ O ₂	82	461,3
									C ₈ H ₈ O ₃	152	391,1

Fortsetzung von Tabelle A.14:

Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	1. Product- ion	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	2. Product- ion	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	3. Product- ion	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	4. Product- ion
			C ₈ H ₈ O ₃	152	424,9	H ₂ O	18	407,0	H ₂ O	18	389,1
			C ₈ H ₁₀ O ₄	170	407,1				C ₆ H ₆ O ₂	110	297,3
			C ₁₅ H ₁₂ O ₆	288	289,0				C ₇ H ₆ O ₂	122	285,1
C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290	574,8	H ₂ O	18	556,9				C ₉ H ₈ O ₃	164	243,1
			C ₂ H ₄ O ₂	60	514,8			18			
			C ₆ H ₆ O ₃	126	448,9			60	H ₂ O		
								160	C ₂ H ₄ O ₂		
			C ₈ H ₈ O ₃	152	422,9			18	C ₉ H ₄ O ₃		
			C ₁₅ H ₁₂ O ₆	288	287,0			18	H ₂ O		
								18	H ₂ O		
								44	C ₂ H ₄ O		
C ₁₆ H ₁₈ O ₇	322	542,9	H ₂ O	18	525,0						
			C ₈ H ₈ O ₃	152	391,1						
			C ₁₅ H ₁₂ O ₆	288	285,2						
			C ₆ H ₆ O ₃	126	407,0						
C ₁₇ H ₁₆ O ₇	332	532,8	C ₇ H ₁₀ O ₄	158	375,1						
			C ₁₅ H ₁₂ O ₆	288	245,1						
			H ₂ O	18	407,0						
C ₂₂ H ₁₆ O ₁₀	440	424,9									
C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	458	407,0									
C ₂₉ H ₂₆ O ₁₂	566	298,8									
C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	578	286,9									

Ausführlicher Zerfall m/z 425 und m/z 407 s. Tabelle A.9.

Fortsetzung von Tabelle A.15:

Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	1. Product- ion	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	2. Product- ion	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	3. Product- ion	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	4. Product- ion			
C ₈ H ₈ O ₃	152	728,8	H ₂ O	18	710,9			692,7						
									667,1					
										585,0				
										542,8				
										525,0	H ₂ O	18	506,9	
										467,2				
										289,0				
C ₈ H ₁₀ O ₄	170	710,9												
C ₈ H ₁₀ O ₅	186	694,9												
			H ₂ O	18	677,1									
			C ₆ H ₆ O ₃	126	568,9									
			C ₈ H ₈ O ₃	152	543,0									
C ₁₅ H ₁₂ O ₆	288	592,9												
C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290	591,5	C ₂ H ₄ O	44	548,2	H ₂ O	18	529,0						
			C ₆ H ₆ O ₃	126	464,9									
			C ₈ H ₈ O ₄	168	422,9									
			C ₉ H ₆ O ₄	178	412,9									

Fortsetzung von Tabelle A.15:

Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	1. Product- ion	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	2. Product- ion	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	3. Product- ion	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	4. Product- ion
$C_{15}H_{18}O_6$	294	586,9									
$C_{16}H_{16}O_7$	320	561,1	H_2O	18	542,6	H_2O	18	525,0	H_2O	18	506,9
											481,9
											405,1
											402,7
											280,7
$C_{16}H_{18}O_8$	338	542,9									
$C_{16}H_{20}O_9$	356	525,0									
$C_{21}H_{18}O_9$	414	466,9									
$C_{22}H_{16}O_{11}$	456	424,9									
$C_{22}H_{18}O_{12}$	474	407,0									
$C_{23}H_{18}O_{12}$	486	394,9									
$C_{30}H_{26}O_{12}$	578	302,8									
$C_{30}H_{24}O_{13}$	592	289,0									
$C_{30}H_{26}O_{13}$	594	286,9									

Ausführlicher Zerfall m/z 593, m/z 425 und m/z 407 s. Tabelle A.11.

Tabelle A.16: Fragmentierung von Prodelphinidin Trimer Gallocatechin-Catechin-Catechin ($R_t = 17,86$ min) (Precursor-Ion $[M-H]^-$ mit m/z 881,0)

Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	1. Product- ion	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	2. Product- ion	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	3. Product- ion	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	4. Product- ion
H ₂ O	18	862,8	C ₅ H ₄ O C ₃ H ₆ O ₃ C ₆ H ₆ O ₂ C ₈ H ₈ O ₃ C ₈ H ₈ O ₄ C ₁₅ H ₁₂ O ₇ C ₁₈ H ₁₈ O ₇ C ₃₀ H ₂₂ O ₁₃	80 90 110 152 168 304 346 590	783,3 773,1 753,2 710,7 694,7 558,8 516,6 273,1						
C ₆ H ₆ O ₃	126	754,9	H ₂ O C ₂ H ₄ O C ₈ H ₈ O ₃ C ₉ H ₆ O ₄ C ₁₅ H ₁₄ O ₆ C ₁₇ H ₁₆ O ₇ C ₂₄ H ₂₀ O ₁₀ C ₂₄ H ₂₂ O ₁₀	18 44 152 178 290 332 468 470	736,9 711,4 602,8 576,9 464,9 423,0 286,8 284,5						
C ₈ H ₈ O ₃	152	728,8	H ₂ O	18	711,0						659,0
C ₈ H ₈ O ₄	168	712,8	H ₂ O	18	694,9	H ₂ O C ₈ H ₈ O ₃ C ₁₃ H ₈ O ₅ C ₁₅ H ₁₄ O ₆ C ₁₇ H ₁₈ O ₇ C ₂₂ H ₁₄ O ₈ C ₂₄ H ₂₀ O ₉	18 152 244 290 334 406 452	677,0 542,9 451,1 404,8 361,1 289,1 243,0	H ₂ O H ₂ O C ₈ H ₈ O ₃	18 18 152	525,0 390,9

Fortsetzung von Tabelle A.16:

Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	1. Product- ion	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	2. Product- ion	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	3. Product- ion	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	4. Product- ion
			C ₂ H ₄ O ₂	60	652,7						
			C ₂ H ₆ O ₂	62	651,1						
			C ₈ H ₈ O ₃	152	561,0						
			C ₉ H ₈ O ₅	196	517,2						
			C ₁₅ H ₁₂ O ₇	304	408,9						
			C ₁₇ H ₁₆ O ₇	332	380,9						
			C ₂₂ H ₁₈ O ₇	394	318,7						
C ₈ H ₁₀ O ₅	186	694,9									
C ₁₄ H ₁₄ O ₆	278	602,9									
C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290	590,9	C ₂ H ₄ O	44	547,8	H ₂ O	18	529,0			
			C ₆ H ₆ O ₃	126	464,9						
			C ₈ H ₈ O ₄	168	422,9						
			C ₉ H ₈ O ₄	178	412,9						
			C ₁₃ H ₁₄ O ₆	266	325,0						
			C ₁₅ H ₁₂ O ₆	288	302,9						
C ₁₅ H ₁₂ O ₇	304	576,9									
C ₁₆ H ₁₈ O ₈	338	542,9									
C ₂₁ H ₁₉ O ₉	415	465,8									
C ₂₂ H ₁₆ O ₁₁	456	424,9	H ₂ O	18	407,0						
C ₂₂ H ₁₈ O ₁₂	474	407,0									
C ₂₂ H ₁₉ O ₁₂	475	405,9									
C ₂₄ H ₂₂ O ₁₃	518	363,0									
C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	578	303,0									
C ₃₀ H ₂₄ O ₁₃	592	289,0									
C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	594	286,9									

Ausführlicher Zerfall m/z 577, m/z 425 und m/z 407 s. Tabelle A.9.

Tabelle A.17: Fragmentierung von Prodelphinidin Trimer Gallocatechin-Galocatechin-Catechin ($R_t = 11,76$ min) (Precursor-Ion $[M-H]^-$ mit m/z 897,0)

Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	1. Product- ion	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	2. Product- ion	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	3. Product- ion	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	4. Product- ion
H ₂ O	18	878,9	H ₂ O	18	861,1						
			C ₇ H ₁₂ O ₄	160	718,4						
			C ₈ H ₈ O ₄	168	711,1	H ₂ O	18	693,2			
			C ₈ H ₁₀ O ₅	186	693,2						
			C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290	589,1						
			C ₁₆ H ₁₈ O ₈	338	541,0						
			C ₂₃ H ₁₆ O ₁₁	468	410,7						
			C ₂₂ H ₁₆ O ₁₂	472	407,3						
			C ₃₀ H ₂₂ O ₁₃	590	288,9						
			C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	594	284,8						
C ₂ H ₄ O	44	853,1	H ₂ O	18	835,1						
C ₂ H ₆ O ₂	62	835,1									
C ₆ H ₆ O ₃	126	770,9									
C ₈ H ₈ O ₄	168	728,9	H ₂ O	18	710,9	H ₂ O	18	693,1			
						C ₂ H ₄ O	44	667,1			
						C ₈ H ₈ O ₃	152	558,7			
						C ₈ H ₈ O ₄	168	543,0			
									H ₂ O	18	525,0
									C ₄ H ₂ O ₂	82	461,0
									C ₄ H ₆ O ₂	86	456,8
									C ₈ H ₈ O ₃	152	391,2
									C ₁₁ H ₁₆ O ₅	228	315,0
									C ₁₂ H ₁₄ O ₅	238	305,1
									C ₁₂ H ₁₄ O ₆	254	289,1

Fortsetzung von Tabelle A.17:

Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	1. Product- ion	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	2. Product- ion	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	3. Product- ion	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	4. Product- ion
C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290	606,9	CHO	29	578,1						
			C ₆ H ₆ O ₃	126	481,1						
			C ₉ H ₆ O ₄	178	428,9						
			C ₈ H ₁₀ O ₅	186	420,5						
			C ₁₀ H ₁₂ O ₆	228	378,9						
			C ₁₀ H ₁₂ O ₇	244	362,8						
			C ₁₅ H ₁₂ O ₇	304	302,8						
			C ₁₅ H ₁₈ O ₇	310	297,1						
C ₁₄ H ₁₄ O ₇	294	602,9									
C ₁₅ H ₁₂ O ₇	304	592,9									
C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354	543,0									
C ₂₂ H ₂₂ O ₉	430	467,0									
C ₂₂ H ₁₆ O ₁₂	472	424,9	H ₂ O	18	407,1						
C ₂₂ H ₁₈ O ₁₃	490	407,1									
C ₂₂ H ₁₈ O ₁₄	506	391,0									
C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	594	302,9									
C ₃₀ H ₂₄ O ₁₄	608	289,0									

Ausführlicher Zerfall m/z 593, m/z 425 und m/z 407 s. Tabelle A.11.

Fortsetzung von Tabelle A.18:

Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	1. Product- ion	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	2. Product- ion	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	3. Product- ion	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	4. Product- ion		
C ₆ H ₆ O ₃	126	786,9	C ₃ H ₂	38	748,7								
			C ₂ H ₅ O	45	741,7								
			C ₂ H ₄ O ₂	60	727,1								
			C ₄ H ₂ O ₂	82	704,8								
			C ₇ H ₈ O ₃	140	646,8								
			C ₉ H ₆ O ₃	162	625,0								
			C ₁₈ H ₁₆ O ₇	344	442,8								
			C ₂₂ H ₁₂ O ₈	404	383,0								
			C ₂₄ H ₁₈ O ₁₁	482	305,0								
			C ₈ H ₈ O ₄	168	744,9	H ₂ O	18	727,0					
C ₈ H ₁₀ O ₅	186	726,9	C ₂ H ₄ O ₂	60	685,1								
			C ₄ H ₂ O ₂	82	662,3								
			C ₄ H ₅ O ₃	101	644,0								
			C ₁₃ H ₁₆ O ₆	268	477,0								
			C ₁₄ H ₁₆ O ₆	280	465,2								
			C ₁₄ H ₁₄ O ₇	294	618,9								
			C ₁₅ H ₁₂ O ₇	304	608,9								
			C ₁₅ H ₁₄ O ₇	306	606,9	H ₂ O	18	589,1	H ₂ O	18	571,1		
						C ₂ H ₄ O ₂	60	546,9					
						C ₄ H ₂ O ₂	82	524,7					
			C ₄ H ₂ O ₃	98	509,1								
			C ₇ H ₈ O ₃	140	466,4								

Fortsetzung von Tabelle A.18:

Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	1. Product- ion	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	2. Product- ion	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	3. Product- ion	Neutral- verlust/ Summen- formel	Masse [g/mol]	4. Product- ion
			$C_9H_8O_4$	180	427,4						
			$C_{13}H_{14}O_5$	250	357,6						
			$C_{15}H_{12}O_7$	304	303,0						
			$C_{19}H_{18}O_9$	390	217,1						
			$C_{22}H_{18}O_8$	410	197,2						
$C_{19}H_{14}O_7$	354	558,9									
$C_{19}H_{16}O_8$	372	540,9	H_2O	18	523,1	H_2O	18	504,9			
			C_2H_4O	44	496,8						
			$C_4H_2O_2$	82	458,9						
			$C_6H_6O_3$	126	414,9						
$C_{21}H_{18}O_{10}$	430	482,9	H_2O	18	465,0						
			$C_2H_4O_2$	60	422,9						
			$C_6H_6O_3$	126	357,1						
			$C_9H_6O_4$	178	305,1						
$C_{23}H_{20}O_{11}$	472	440,9	H_2O	18	423,0						
						H_2O	18	405,1			
						$C_6H_6O_3$	126	297,2			
						$C_7H_8O_3$	140	283,1			
						$C_9H_8O_4$	180	243,0			
$C_{23}H_{22}O_{12}$	490	423,0									
$C_{27}H_{22}O_{11}$	522	391,0									
$C_{30}H_{26}O_{14}$	610	302,9									

Ausführlicher Zerfall m/z 609, m/z 441 und m/z 423 s. Tabelle A.13.

A.13 Kalibrierdaten des LC-DAD-MS/MS-Verfahrens

Tabelle A.19: Mittelwerte und relative Standardabweichungen für die Peakflächen (MS: Summe m/z 289 und m/z 348; DAD: 280 nm) bei der Bestimmung des linearen Bereiches (Gradient E2) (n = 10)

$\beta((+)\text{-Catechin})$ [mg/L]	MS-Peakfläche \bar{y} [$\mu\text{AU}\cdot\text{min}$]	MS-Peakfläche s_{rel} [%]	DAD-Peakfläche \bar{y} [$\mu\text{AU}\cdot\text{min}$]	DAD-Peakfläche s_{rel} [%]
0,0625	218990	20,17	2201	29,24
0,125	231270	21,85	2867	15,87
0,1875	317982	12,39	4345	9,11
0,25	472833	12,58	5766	3,39
0,625	1155686	4,44	17915	2,67
1,25	2331955	5,30	36036	1,07
1,875	4503467	4,13	64821	0,52
2,5	6384149	3,75	81885	1,22
6,25	15253028	1,62	224499	1,86
12,5	29984367	0,98	407233	1,93
18,75	43145821	1,95	688594	1,40
25	53972105	1,99	907591	1,56
62,5	133326585	0,51	2197724	2,73
125	240959783	0,65	4100618	2,55
187,5	342124095	0,80	6208107	1,84
250	434378948	1,66	8432005	1,15
625	995087636	0,39	16525200	1,16
1250	1668976522	0,45	33344130	0,66
1875	2144524084	0,71	50648264	0,81
2500	2452298224	0,23	67679731	1,27

Tabelle A.20: Mittelwerte, Standardabweichungen und relative Standardabweichung s_{rel} der Peakflächen (280 nm) bei der Bestimmung der Kalibrierfunktion mittels LC-DAD-MS/MS-Gerätekombination (Gradient E2) (n = 10)

$\beta((+)\text{-Catechin})$ [mg/L]	Peakfläche \bar{y} [$\mu\text{AU}\cdot\text{min}$]	Peakfläche s [$\mu\text{AU}\cdot\text{min}$]	Peakfläche s_{rel} [%]
1,875	65221	851	1,31
50	1751806	14910	0,85
500	14192275	140928	0,99
750	20921364	323976	1,56
1000	26795668	209166	0,78
1250	33644129	350774	1,04
1500	40774580	325231	0,80
1750	47685107	354979	0,74
2250	60591539	563501	0,93
2500	67739731	239596	0,35
