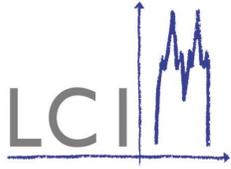


Schnelle Analysenmethode zur Bestimmung ausgewählter Polyphenole in Kakao- und Schokoladenerzeugnissen



Marion Raters¹⁾, Franziska Lotz²⁾, Julia Schnapka¹⁾, Reinhard Matissek¹⁾



¹⁾LCI, Lebensmittelchemisches Institut des Bundesverbandes der Deutschen Süßwarenindustrie (BDSI) e. V., Adamsstraße 52-54, 51063 Köln, www.lci-koeln.de
²⁾Justus-Liebig-Universität Gießen, Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie, Heinrich-Buff-Ring 58, 35392 Gießen

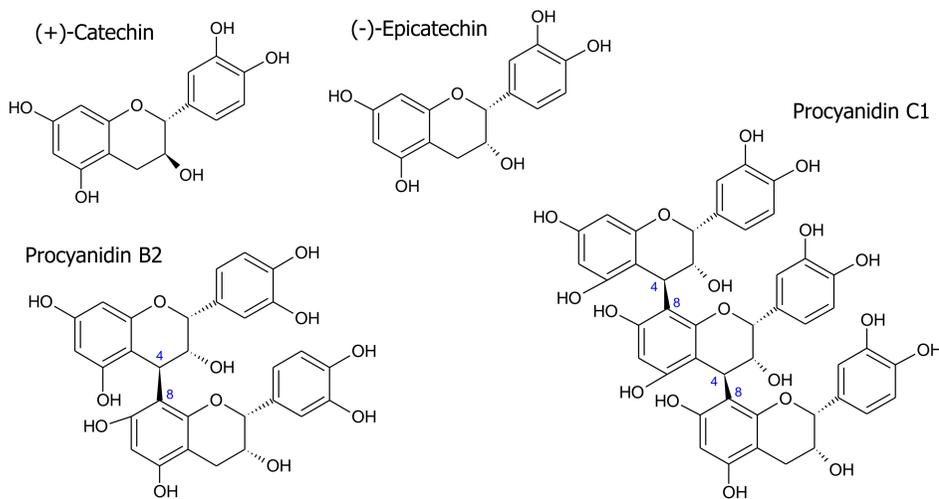
Hintergrund

Bei Polyphenolen handelt es sich mengenmäßig um eine der wichtigsten Verbindungsklassen in der Natur; sie werden von ausnahmslos allen Pflanzen als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe (Sekundärmetabolite) produziert. Obwohl es sich um Verbindungen ohne Nährstoffcharakter handelt, haben Polyphenole, insbesondere aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaft, eine positive Wirkung auf die menschliche Gesundheit. Daher haben sie in den letzten zehn Jahren vermehrt wissenschaftliches, physiologisches, technologisches und wirtschaftliches Interesse erlangt.



Polyphenole lassen sich in drei Klassen gliedern: Die Phenol(carbon)säuren, die Tannine und die Flavonoide. Letztere spielen insbesondere in Kakao eine wichtige Rolle. Mengenmäßig dominieren die monomeren Flavane (-)-Epicatechin, (+)-Catechin sowie verschiedene höherpolymere Procyanidine, die vor allem für die Bitterkeit und Adstringenz, aber auch die typische Farbgebung verantwortlich sind [1-3].

Polyphenole



Validierung

Die vorgestellte Methode wurde in Anlehnung an die Vorgaben von Kromidas validiert [4]. Hierzu wurde eine Schokoladenprobe entsprechend der in dieser Arbeit entwickelten Methode aufgearbeitet und vermessen. In Tabelle 1 sind die wesentlichen Validierungsergebnisse wie z. B. die relative Standardabweichung der Wiederholbarkeit (RSD_R) und Vergleichbarkeit (RSD_R), die Wiederfindung sowie die Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ) für die vier untersuchten Flavonoide zusammengefasst.

Tabelle 1: Ergebnisse der Methodenvalidierung

	Catechin	Epicatechin	Procyanidin B2	Procyanidin C1
Wiederholbarkeit RSD_R , [%]	5,1	4,6	5,5	5,8
Vergleichbarkeit RSD_R , [%]	8,1	5,3	5,9	8,2
Wiederfindung [%]	75,5	81,4	n.b.	n.b.
LOD [$\mu\text{g/g}$]	5	6	3	8
LOQ [$\mu\text{g/g}$]	15	17	9	24

(n.b. = nicht bestimmt)

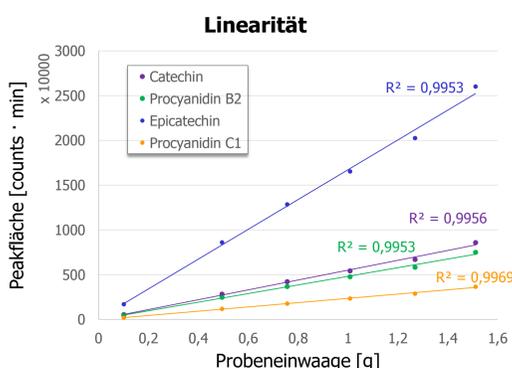


Abb. 1: Linearitätsprüfung für die untersuchten Flavonoide

In Abbildung 1 ist die Linearitätsprüfung für die Flavonoide Catechin, Epicatechin, Procyanidin B2 und Procyanidin C1 dargestellt. Diese ergab für die betrachteten vier Flavonoide ein sehr zufriedenstellendes Bestimmtheitsmaß (R^2) von mindestens 0,9953 im untersuchten Bereich zwischen 0,1 und 1,5 g Probeneinwaage. Die hier vorgestellte Methode ist somit in einem weiten Konzentrationsbereich linear, verfügt über eine gute Reproduzierbarkeit und ist mit einer Nachweisgrenze (LOD) zwischen 3 und 8 $\mu\text{g/g}$ sehr sensitiv.

Ziel

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung und Validierung einer schnellen Analysenmethode zur Bestimmung ausgewählter Polyphenole in Kakao- und Schokoladenerzeugnissen mittels HPLC-FD. Die Quantifizierung der Flavonoide Epicatechin, Catechin, Procyanidin B2 und Procyanidin C1 in den Proben erfolgte über externe Standards.

Aufarbeitung

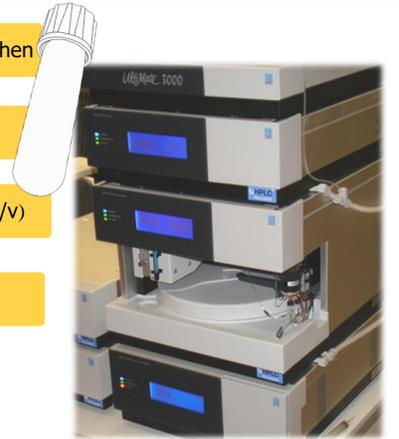
Einwaage von ca. 1 g Probe in Zentrifugenröhrchen

Entfetten mit 3 x 10 mL Hexan

Extraktion mit 2 x 5 mL MeOH/H₂O (80/20, v/v)

SPE-Aufreinigung

HPLC-FD



HPLC-Parameter

- Säule: Ultra PFPP (100 x 2,0 mm; 3 μm)
- Ofentemperatur: 30 °C
- Injektionsvolumen: 1 μL
- Eluent: A: 0,1%ige Ameisensäure
B: 0,1%ige Ameisensäure in Acetonitril
- Fluoreszenzdetektion: Anregung bei 280 nm, Emission bei 318 nm
- Modus: Gradient (siehe Abbildung 2)

Abbildung 3 und 4 zeigen das HPLC-FD Chromatogramm des Misch-Standards mit den Flavonoiden (+)-Catechin, (-)-Epicatechin, Procyanidin B2 und Procyanidin C1 bzw. einer Schokoladenprobe

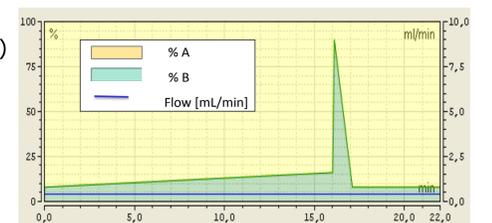


Abb. 2: Gradientenprogramm und Fluss (0,4 mL/min)

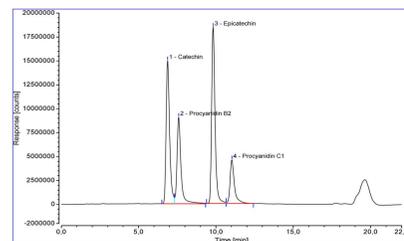


Abb. 3: Misch-Standard (je 20 $\mu\text{g/mL}$ (+)-Catechin, Procyanidin B2 und Procyanidin C1, 30 $\mu\text{g/mL}$ (-)-Epicatechin)

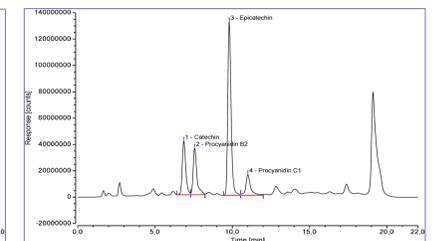


Abb. 4: Chromatogramm einer Schokoladenprobe (Gehalte [mg/g]: Catechin=0,25; Procyanidin B2=0,36; Epicatechin=1,01; Procyanidin C1=0,35)

Schlussfolgerung

Für die Bestimmung ausgewählter Polyphenole (Catechin, Epicatechin, Procyanidin B2 und Procyanidin C1) in Kakao- und Schokoladenerzeugnissen konnte eine schnelle und einfache Analysenmethode erfolgreich etabliert und validiert werden.

Die Methode stellt ein für die Routineanalytik geeignetes Verfahren dar. Nach einer wenig aufwändigen Aufarbeitung kann der Probenextrakt mittels HPLC-FD innerhalb kurzer Analysenzeiten untersucht und über externe Standards die Flavonoide in der Probe qualitativ und quantitativ bestimmt werden.

Literatur

- Matissek R, Baltas W (2011) Lebensmittelchemie. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 509f
- Schek A (2003) Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe. Ernährung/Nutrition 27: 304-316
- Kelm MA, Johnson JC, Robbins RJ, Hammerstone JF, Schmitz HH (2006) High-Performance Liquid Chromatography Separation and Purification of Cacao (*Theobroma cacao* L.) Procyanidins According to Degree of Polymerization Using a Diol Stationary Phase. J Agric Food Chem 54: 1571-1576
- Kromidas S (2000) Handbuch Validierung in der Analytik. WILEY-VCH Verlag, Weinheim