

Polyphenolanalytik in Schokolade

Methode zur Überprüfung eines Health Claims

Dr. Marion Raters | Franziska Lotz | Prof. Dr. Reinhard Matissek

Nicht nur heute wird Kakao und Schokolade gerne verzehrt. Schon bei den Mayas und den Azteken war der Kakao Bestandteil des täglichen Lebens. Es handelte sich bei ihnen quasi um ein „Allround-Heilmittel“, welches bei Magenschmerzen, Darmblutungen, Wunddesinfektionen, aber auch zur Geburtseinleitung und zur Behandlung von äußeren Entzündungen und Wundstellen verwendet wurde.

Dabei wurde nicht nur die Bohne des Kakaobaumes *Theobromacacao* verwendet, sondern auch die Blüten, Blätter und ein aus ihnen gewonnenes Öl. Lange galt Schokolade als eine ernährungsphysiologische Sünde. Doch viele Menschen, die Schokolade gerne essen, dürfen aufatmen. Man erinnert sich wieder daran, dass Kakao als ein „Heilmittel“ eingesetzt werden kann und versucht seine Wirkungen naturwissenschaftlich zu belegen. Hierbei konzentriert sich die Forschung auf eine Stoffgruppe, die auch in Rotwein, Rotkohl, fast allen Obstsorten, Tee und vielen anderen Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft vorkommt. Es handelt sich hierbei um die Polyphenole auch Pflanzenphenole genannt.

Was sind Polyphenole?

Polyphenole stellen nicht nur mengenmäßig eine der wichtigsten Verbindungsklassen in der Natur dar; sie werden von ausnahmslos allen Pflanzen als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe produziert. Der Mensch nimmt etwa 10g an Polyphenolen pro Tag mit der (pflanzlichen) Nahrung auf. Obwohl es sich um Verbindungen ohne Nährstoffcharakter handelt, haben Polyphenole eine positive Wirkung auf die menschliche Gesundheit. Ihnen wird unter anderem die Eigenschaft zugeschrieben, das Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu minimieren, den Blutdruck zu senken und eine gewisse antikanzerogene bzw. antigenotoxische Wirkung zu haben. Entscheidend ist dabei ihr ausgeprägtes antioxidatives Potential, mit dem sie in der Lage sind, als Radikalfänger zu fungieren. Daher haben sie in den letzten zehn Jahren vermehrt wissenschaftliches, physiologisches, technologisches und wirtschaftliches Interesse erlangt [Schek 2003, Kuhnert 2013].

Polyphenole lassen sich in drei Klassen gliedern: die Phenol(carbon)säuren, die Tannine und die Flavonoide [Kuhnert 2013]. Letztere spielen insbesondere in Kakao eine wichtige Rolle. Mengenmäßig dominieren die monomeren Flavaneole, eine Unterklasse der Flavonoide, wie beispielsweise das (-)-Epicatechin. Oligomere und polymere Verbindungen der Flavaneole werden als Proanthocyanidine bezeichnet. Sie sind nach Lignin die am häufigsten vorkommenden natürlichen Polyphenole und tragen insbesondere zur Farbstabilität, Bitterkeit und Adstringenz von pflanzlichen Lebensmitteln bei. Die molekulare Masse der Proanthocyanidine wird entsprechend ihres

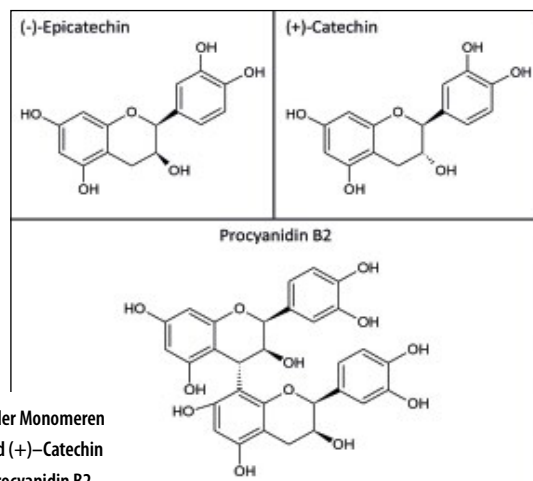


Abb. 1: Strukturen der Monomeren (-)-Epicatechin und (+)-Catechin sowie dem Dimer Procyanidin B2

Polymerisierungsgrads (Dimer, Trimer, usw.) ausgedrückt. Eine große Unterklasse der Proanthocyanidine stellen die Procyanidine dar. Sie setzen sich ausschließlich aus den monomeren Flavanolen Catechin und Epicatechin zusammen [Gu et al. 2003].

Als Strukturbeispiele sind in Abbildung 1 die Flavane (-)-Epicatechin, (+)-Catechin sowie das Dimer Procyanidin B2, das sich aus zwei (C4–C8) verknüpften (-)-Epicatechin-Monomeren zusammensetzt, dargestellt.

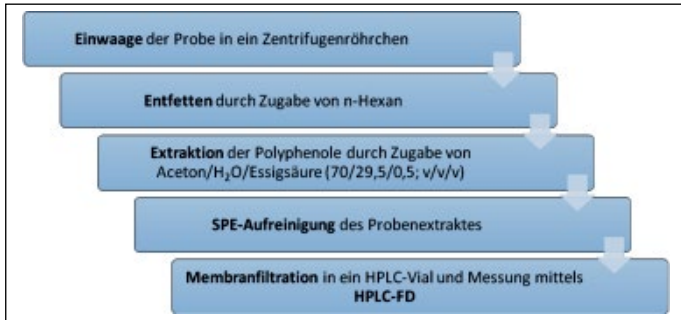


Abb. 2: Probenaufarbeitungsschema zur Bestimmung der Polyphenole DP 1-10 mittels HPLC-FD

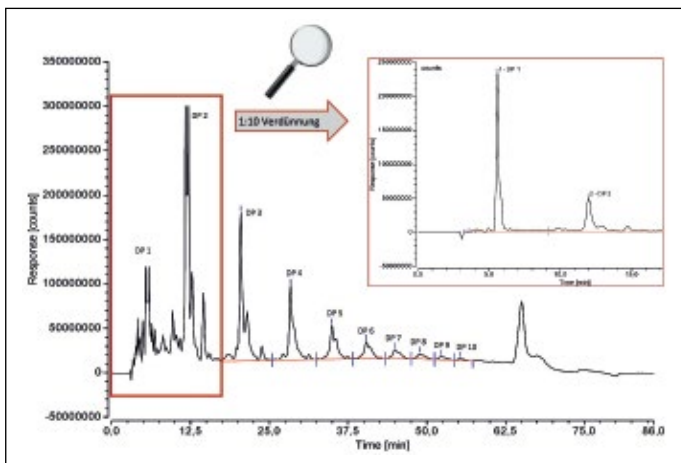


Abb. 3: HPLC-FD-Chromatogramm einer Schokoladenprobe (Kakaogehalt 60%) mit einem Gesamtpoly-phenolgehalt (Summe DP 1-10) von 522,91 mg/100 g. Der vergrößerte Ausschnitt stellt das entsprechende Chromatogramm einer 1:10 verdünnten Lösung dar.

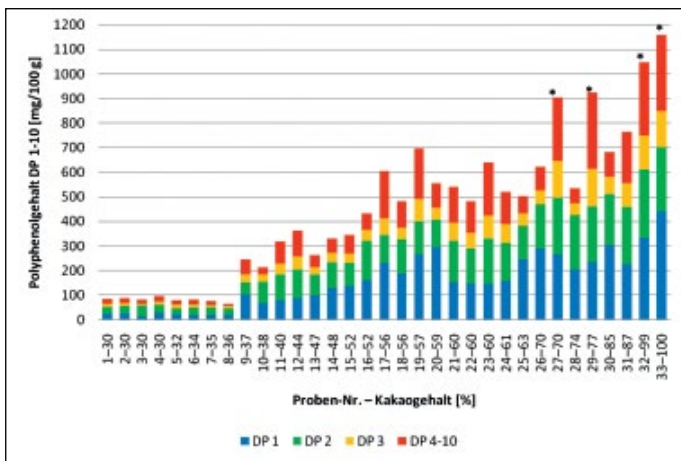


Abb. 4: Gesamtpolyphenolgehalte (DP 1-10) der 33 untersuchten Kaka- und Schokoladenerzeugnisse sortiert nach aufsteigenden Kakaogehalten (Anteile an DP 1, 2, 3 und 4-10 sind farblich gekennzeichnet); * > 200 mg Polyphenole (DP 1-10) in 25 g Schokolade

Health Claim für Kakaoflavane

Bereits 2011 wurde von der Firma Barry Callebaut, einem weltweit führenden Hersteller von qualitativ hochwertigen Kaka- und Schokoladenerzeugnissen mit Hauptsitz in Zürich (Schweiz) der Antrag für einen Health Claim (dt. nährwert- und gesundheitsbezogene Angabe) bei der EFSA (European Food Safety Authority) eingereicht. Mit dem positiven Gutachten der NDA (Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies) der EFSA wurde im Juli 2012 Barry Callebaut als erstem kakaoverarbeitendem Unternehmen in der EU folgendes Gesundheitsversprechen zugestanden: „Cocoa flavanols help maintain endothelium-dependent vasodilation, which contributes to normal bloodflow“ („Kakaoflavane helfen die Endothel-abhängige Elastizität der Blutgefäße aufrechtzuerhalten und tragen damit zu einem normalen Blutfluss bei“). Die entsprechende Zulassung durch die EU-Kommission wurde dem genannten Unternehmen mit Beschränkung auf fünf Jahre im September 2013 erteilt. Um die versprochene Wirkung zu erlangen, wird laut EFSA eine tägliche Aufnahme von 200 mg Kakaoflavanen empfohlen, was mit einem Konsum von 2,5 g flavanolreichen Kakaopulver oder 10 g flavanolreicher dunkler Schokolade erreicht werden könne. Unter dem Begriff „Kakaoflavane“ werden entsprechend den Ausführungen der EFSA insbesondere monomere (vor allem Epicatechin) und oligomere Flavane (verschiedene Procyanidine) mit Polymerisierungsgrad (DP, degree of polymerization) 2–10 verstanden [EFSA Journal 2012].

Methode zur Bestimmung der Polyphenole DP 1-10

Um überprüfen zu können, ob einem Kaka- oder Schokoladenerzeugnis dieser Health Claim zugesprochen werden kann, ist die Quantifizierung der Polyphenole mit Polymerisierungsgrad (DP) 1–10 notwendig. Im LCI konnte im Rahmen einer Masterarbeit eine für die Routineanalytik angepasste Methode erfolgreich etabliert werden. Diese Analysenmethode ist bestens geeignet, die Einhaltung der Anforderungen an die Verwendung des Health Claims bei Kaka- und Schokoladenerzeugnissen zu überprüfen. Die Methode basiert auf den grundlegenden Arbeiten von Robbins et al. (2012). Hierbei werden die Polyphenole – nach Entfetten der eingewogenen Probe mit Hexan – mit einem Lösungsmittelgemisch bestehend aus Aceton, Wasser und Essigsäure extrahiert und anschließend über eine SPE-Säule aufgereinigt. Nach Membranfiltration kann der Probenextrakt dann direkt mittels HPLC-FD analysiert werden (siehe Abb. 2). Die quantitative Auswertung erfolgte nach den Angaben des von Robbins et al. entwickelten Prinzips mittels Reaktiver Response-Faktoren.

Ergebnisse

Im LCI wurde eine Auswahl von 33 Kaka- und Schokoladenerzeugnissen mit Kakaogehalten zwischen 30 und 100% von insgesamt 16 Herstellern auf ihre Gehalte an Polyphenolen mit Polymerisierungsgrad DP 1–10 untersucht. Bei den mittels HPLC-FD untersuchten Proben handelte es sich überwiegend um Schokoladen oder Kuvertüren. Abbildung 3 ist ein Beispiel-Chromatogramm einer Schokoladenprobe (Kakaogehalt 60%) zu entnehmen.

Abbildung 4 zeigt die Gesamtpolyphenolgehalte der untersuchten Proben als Summe der Polyphenole DP 1–10 in der Einheit mg pro 100g sowie deren Verteilung auf die jeweiligen Polyphenole mit DP 1, DP 2, DP 3 und DP 4–10 in Abhängigkeit von den Kakaogehalten der analysierten Proben in %. Erwartungsgemäß ist ein signifikanter Anstieg der Gesamtpolyphenolgehalte mit ansteigenden Kakaogehalten zu beobachten. Ferner ist der farbigen Darstellung der Polyphenolverteilung auf die einzelnen Polymerisierungsgrade DP 1, 2, 3 sowie 4–10 in Abbildung 4 zu entnehmen, dass die monomeren und dimeren Polyphenole (DP 1 und DP 2, blau und grün markiert) in der Summe bei allen 33 untersuchten Proben über 50 % der gesamten Polyphenole DP 1–10 ausmachen. Trimere Polyphenole (DP 3, gelb markiert) haben einen Anteil von 8–16 % und die Summe der DP 4–10 (rot markiert) liegen bei 11–34 % der Gesamtpolyphenole mit DP 1–10.



Beim Verzehr einer Portion Schokolade (das entspricht in der Regel 25 g) würden somit – den Vorgaben der EFSA entsprechend – solche Produkte die Voraussetzungen zur Verwendung des oben beschriebenen Health Claims für Kakaoflavanoole erfüllen, deren Polyphenolgehalte mit DP 1–10 über 200 mg pro 25 g liegen. Dies betrifft von den in dieser Arbeit analysierten Kakao- und Schokoladenerzeugnissen insgesamt vier Produkte (s. *Markierung in Abbildung 4).

Mit Blick auf den Health Claims bleibt damit folgende Abschlussbemerkung: Möchte man auch beim Verzehr einer etwas weniger polyphenolreichen Schokolade in den Genuss der beschriebenen zahlreichen positiven Wirkungen kommen, so muss man eine entsprechend größere Portion Schokolade zu sich nehmen. Guten Appetit!

Dank

Wir danken der Stiftung der Deutschen Kakao- und Schokoladenwirtschaft, Hamburg für die finanzielle Förderung des Projektes.

- [1] Schek A (2003) Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe. Ernährung/Nutrition 27
- [2] Kuhnert N (2013) Polyphenole: vielseitige Pflanzeninhaltsstoffe. Chem. Unserer Zeit 47: 80-91
- [3] Gu L, Kelm MA, Hammerstone JF, Beecher G, Holden J, Haytowitz D, Prior RL (2003) Screening of Foods Containing Proanthocyanidins and Their Structural Characterization Using LC-MS/MS and Thiolytic Degradation. J Agric Food Chem 51: 7513-7521
- [4] EFSA (2012) Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to cocoa flavanols and maintenance of normal endothelium-dependent vasodilation pursuant to Article 13(5) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA Journal 10 (7): 2809
- [5] Robbins RJ, Leonczak J, Li J, Johnson C, Collins T, Kwik-Urbe C, Schmitz HH (2012) Determination of Flavanol and Procyanidin (by Degree of Polymerization 1-10) Content of Chocolate, Cocoa Liquors, Powder(s), and Cocoa Flavanol Extracts by Normal Phase High-Performance Liquid Chromatography: Collaborative Study. J AOAC Int 95: 1153-1159



Autoren | Kontakt

Dr. Marion Raters | Franziska Lotz | Prof. Dr. Reinhard Matissek

Lebensmittelchemisches Institut (LCI) des
Bundesverbandes der Deutschen Süßwarenindustrie e.V.
Adamsstraße 52–54 | 51063 Köln
www.lci-koeln.de