

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