

**Wechselwirkungen von Polyphenolen  
mit  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Al}^{3+}$ .  
Analyse der Reaktionsprodukte mittels HPLC**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

staatl. gepr. Lebensmittelchemiker Gerd Jungbluth  
geboren am 02. Juli 1968 in Bernkastel-Kues

November 2000

---

Referent:	Prof. Dr. W. Ternes
Korreferent:	Dr. habil. A. Seubert
Tag der Promotion:	17. Dez. 1999
Datum der Veröffentlichung:	01. Nov. 2000

---

Im Gedenken an meinen Vater, Dr. jur. Walter Jungbluth

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Wechselwirkungen von verschiedenen pflanzlichen Polyphenolen mit den Kationen  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  und  $\text{Al}^{3+}$  untersucht. Dabei wurden zwei Ziele verfolgt: zum einen Aufschluss über eine mögliche Komplexbildung der Kationen unter analytischen Bedingungen zu gewinnen, zum anderen gebildete Oxidationsprodukte der Polyphenole zu charakterisieren und quantitativ zu bestimmen.

Die schnell durchführbare UV/Vis-photometrische und fluorimetrische Untersuchung von Gemischen aus Referenzsubstanzen einer Vielzahl von Polyphenolen (Flavone, Flavonole, Flavanole, monocyclische Terpene) mit den Kationen diente dabei als Ausgangspunkt. Die Messergebnisse verdeutlichten, dass in unterschiedlichen Lösungsmittelgemischen, wie sie für die RP-HPLC von Polyphenolen üblich sind, Komplexbildung und Redoxreaktion neben- und nacheinander ablaufen können.  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$  wirkten dabei als starke Oxidationsmittel gegenüber Flavonolen, während  $\text{Al}^{3+}$  von Flavonolen stabil komplexiert wurde.

Zur flüssigkeitschromatographischen Analytik der in den Gemischen vorliegenden Edukte und Produkte wurde anschliessend eine neue HPLC Methode an einer Polystyroldivinylbenzol-Phase, die die Kationen nicht adsorbiert, entwickelt. Mit Photodiodenarray- und Flammen-AAS-Detektion wurde gezeigt, daß in den Reaktionslösungen mit  $\text{Cu}^{2+}$  oder  $\text{Fe}^{3+}$  neben den Edukten genau ein Oxidationsprodukt für das jeweilige Flavonol entstanden war, während mit Fluoreszenzdetektion ein stabil eluierender  $\text{Al}^{3+}$ -Komplex nachgewiesen werden konnte. Die Oxidationsprodukte wurden im folgenden in einem einfachen Verfahren im mg-Maßstab dargestellt und mit ein- und zwei-dimensionaler NMR-Spektroskopie näher charakterisiert als 2-(Hydroxybenzoyl)-2-hydroxy-2H-1-benzofuran-3-one.

Mit den nun eindeutig beschriebenen Referenzsubstanzen der Oxidationsprodukte wurden neue chromatographische Verfahren zu deren Trennung und eindeutigen Detektion entwickelt. Durch Gradientenelution konnte eine Trennung von elf verschiedenen Benzofuranonen, Flavonen und Flavonolen erreicht werden. Diese wurden mit Photodiodenarray-, UV/Vis-, voltammetrischer und massenspektrometrischer Detektion nachgewiesen. Aufgrund der Möglichkeit, mit den Chromatogrammen jeweils Spektren der eluierenden Verbindungen aufzeichnen zu können, waren insbesondere die Photodiodenarray- und die ESI-ion trap/MS-Detektion für eine sichere Quantifizierung (im  $\mu\text{g}/\text{mL}$ -Bereich) sowie eine weiterführende Analytik der Benzofuranone geeignet.

Die Eignung der Chromatographie zur Analytik natürlicher Matrices wurde am Beispiel der Untersuchung von Zwiebeln und Lauch gezeigt. Nach der Spuren-Matrix-Trennung mit einer neu entwickelten SPE-Methode konnten die HPLC-Verfahren zum Nachweis und zur Bestimmung der oxidierten Flavonole eingesetzt werden. Die hohen Gehalte an oxidiertem Quercetin in Zwiebeln, die in der Literatur angegeben sind, ließen sich mit den hier vorgestellten analytischen Verfahren jedoch nicht bestätigen. Vielmehr wurde gezeigt, dass eine unvorsichtige Probenaufarbeitung selbst eine Entstehung der Analyten begünstigen kann.

Schlagwörter: Flavonoide, Komplexe, Oxidation

## Abstract

In the present thesis the interactions of several plant polyphenoles with  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  and  $\text{Al}^{3+}$  were studied. On the one hand complexation of the cations under analytical conditions was investigated, on the other hand oxidation products of the polyphenoles were characterized and determined quantitatively.

In a first step, mixtures of reference substances of several polyphenoles (flavones, flavonoles, flavanoles, monocyclic terpenes) and the cations, dissolved in solvent systems typical for RP-HPLC, were investigated with UV/Vis photometry and fluorimetry. The results indicated the coexistence of complexation and redox reaction.  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$  were able to act as strong oxidants versus flavonoles, while  $\text{Al}^{3+}$  was strongly bound by flavonoles.

In the following a HPLC method was developed for separation and detection of educts and products present in the reaction mixtures. Using a polystyroldivinylbenzene stationary phase, which did not adsorb any cations, in conjunction with photodiodearray and online flame AAS detection it was shown that in those mixtures containing  $\text{Cu}^{2+}$  or  $\text{Fe}^{3+}$  exactly one oxidation product for each flavonol was present. Fluorimetric detection on the other hand proved the elution of one stable Al(III) complex. In a simple preparative procedure the oxidation products of flavonoles were achieved in mg amounts and thus characterized as 2-(hydroxybenzoyl)-2-hydroxy-2H-1-benzofuran-3-ones using one and two-dimensional NMR spectroscopy.

The identified and characterized oxidation products were used as reference substances for development of chromatographic separation and determination procedures. Eleven benzofuranones, flavones, and flavonoles were separated using RP-HPLC with gradient elution in combination with photodiodearray, UV/Vis-, voltammetric and mass spectrometric detection. Especially photodiodearray and mass spectrometric detection were taken as a basis for further quantification (in the range of  $\mu\text{g/mL}$ ) of the benzofuranones as well as their analysis in plant material.

For onions and leek a sample preparation procedure was developed using SPE. Following trace matrix separation the HPLC methods proved to be suitable for detection and determination of the oxidized flavonoles. Nonetheless no significant amounts of benzofuranones could be determined in the plant material, a result which is contradictive to literature. It could be shown that the sample preparation procedure itself, if not taken with great care, may favour the formation of the analytes themselves.

Keywords: flavonoids, complexation, oxidation



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>9</b>
1.1	Allgemeine Einführung . . . . .	9
1.2	Spezielle Zielsetzung . . . . .	11
1.3	Untersuchte Verbindungen . . . . .	12
1.3.1	Kationen . . . . .	12
1.3.2	Antioxidantien . . . . .	13
1.3.2.1	Flavonoide . . . . .	14
1.3.2.2	Phenolische Gewürzinhaltsstoffe . . . . .	15
1.3.2.3	Auswahl der untersuchten Verbindungen . . . . .	16
1.4	Reaktionen und Analytik der Polyphenole . . . . .	18
1.4.1	Vorbemerkung . . . . .	18
1.4.2	Polyphenole als Liganden . . . . .	19
1.4.2.1	Messung der Komplexbildung . . . . .	19
1.4.2.2	Mögliche koordinative Bindungen . . . . .	20
1.4.2.3	Stabile Komplexe . . . . .	21
1.4.2.4	Chromatographie von Polyphenol-Metall-Komplexen . . . . .	22
1.4.3	Oxidation von Polyphenolen . . . . .	24
1.4.4	Chromatographische Analytik von Polyphenolen . . . . .	28
1.5	Strategie und verwendete analytische Methoden . . . . .	29
1.5.1	Vorgehensweise . . . . .	29
1.5.2	Wahl der Reaktions- und Chromatographie-Bedingungen . . . . .	30
1.5.3	Geeignete Detektionstechniken . . . . .	31
1.5.3.1	Einleitung . . . . .	31
1.5.3.2	Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) . . . . .	31
1.5.3.3	Massenspektrometrie (MS) . . . . .	32

<b>2</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>35</b>
2.1	Spektroskopische Verfolgung der Reaktionen . . . . .	35
2.1.1	Einleitung . . . . .	35
2.1.2	UV/Vis-Photometrie . . . . .	36
2.1.2.1	Reaktionen mit $\text{Fe}^{3+}$ und $\text{Fe}^{2+}$ . . . . .	36
2.1.2.2	Reaktionen mit $\text{Cu}^{2+}$ . . . . .	42
2.1.2.3	Reaktionen mit $\text{Al}^{3+}$ . . . . .	48
2.1.3	Fluorimetrie . . . . .	49
2.1.4	Zusammenfassung und Diskussion . . . . .	49
2.2	HPLC von kationenhaltigen Reaktionsgemischen . . . . .	52
2.2.1	Einleitung . . . . .	52
2.2.2	Fluoreszenz-Detektion . . . . .	53
2.2.3	Atomabsorptionsspektroskopische Detektion . . . . .	53
2.2.4	Photodiodenarray-Detektion . . . . .	55
2.2.5	Zusammenfassung und Diskussion . . . . .	58
2.3	Darstellung und Charakterisierung oxidierter Flavonole . . . . .	61
2.3.1	Einleitung . . . . .	61
2.3.2	Darstellung . . . . .	61
2.3.3	NMR-Spektroskopie . . . . .	63
2.3.3.1	Einleitung . . . . .	63
2.3.3.2	Eindimensionale NMR-Spektroskopie . . . . .	63
2.3.3.3	Zweidimensionale NMR-Spektroskopie . . . . .	69
2.3.4	Massenspektrometrie . . . . .	78
2.3.4.1	Einleitung . . . . .	78
2.3.4.2	PBI-EI/MS, PBI-NCI/MS . . . . .	78
2.3.4.3	ESI-Ion trap MS . . . . .	83
2.3.5	Antioxidative Eigenschaften . . . . .	89
2.3.6	Zusammenfassung und Diskussion . . . . .	90
2.4	Diskussion des Reaktionsverlaufs . . . . .	91
2.5	HPLC oxidierter Flavonole . . . . .	93
2.5.1	Einleitung . . . . .	93
2.5.2	Trennung an einer 4 mm I.D. RP-18 Phase . . . . .	94
2.5.2.1	Photodiodenarray-Detektion . . . . .	94
2.5.2.2	Elektrochemische Detektion . . . . .	96



2.5.3	Trennung an einer 2 mm I.D. RP-18 Phase . . . . .	100
2.5.3.1	UV-Detektion . . . . .	100
2.5.3.2	Massenspektrometrische Detektion . . . . .	103
2.5.4	Zusammenfassung und Diskussion . . . . .	104
2.6	Analytik oxidierter Flavonole in biologischer Matrix . . . . .	107
2.6.1	Einleitung . . . . .	107
2.6.2	Aufschluß und Extraktion . . . . .	107
2.6.2.1	Heißextraktion und Säureaufschluß von Glykosiden . . . . .	107
2.6.2.2	Kaltextraktion . . . . .	108
2.6.3	Matrixabhängige Kalibrierung . . . . .	109
2.6.4	Aufreinigung und Anreicherung mittels Festphasenextraktion . . . . .	109
2.6.4.1	Einleitung . . . . .	109
2.6.4.2	Festphasenextraktion ohne Zusatz von Antioxidans . . . . .	113
2.6.4.3	Festphasenextraktion mit Zusatz von Antioxidans . . . . .	114
2.6.5	Ergebnisse der Chromatographie . . . . .	117
2.6.5.1	Einleitung . . . . .	117
2.6.5.2	Vergleich der entwickelten chromatographischen Verfahren . . . . .	117
2.6.5.3	Extrakte aus Heißextraktion . . . . .	118
2.6.5.4	Extrakte aus Kaltextraktion . . . . .	123
2.6.6	Zusammenfassung und Diskussion . . . . .	125
<b>3</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>127</b>
3.1	Allgemeines . . . . .	127
3.1.1	Feststoffe . . . . .	127
3.1.2	Flüssigkeiten . . . . .	128
3.1.3	Lösungen . . . . .	129
3.2	Spektrophotometrie . . . . .	130
3.2.1	UV/Vis-Spektroskopie . . . . .	130
3.2.1.1	Lösungen . . . . .	130
3.2.1.2	Spektrenaufnahme . . . . .	130
3.2.1.3	Zeitabhängige Messung . . . . .	130
3.2.1.4	Konzentrationsabhängige Messung . . . . .	131
3.2.2	Fluorimetrie . . . . .	131
3.2.2.1	Lösungen . . . . .	131
3.2.2.2	Spektrenaufnahme . . . . .	132

3.2.2.3	Veränderung der Fluoreszenz durch Zugabe von $\text{Cu}^{2+}$ oder $\text{Fe}^{3+}$ . . . . .	133
3.3	HPLC von Reaktionsmischungen Polyphenol/Kation . . . . .	134
3.3.1	HPLC-Säule . . . . .	134
3.3.2	Fluoreszenz-Detektion . . . . .	134
3.3.2.1	Parameter . . . . .	134
3.3.2.2	Lösungen . . . . .	134
3.3.3	HHPN-AAS-Detektion . . . . .	135
3.3.3.1	Parameter . . . . .	135
3.3.3.2	AAS . . . . .	136
3.3.3.3	Lösungen . . . . .	136
3.3.3.4	Kalibrierung und Wiederfindungsrate . . . . .	137
3.3.4	Photodiodenarray-Detektion . . . . .	138
3.3.4.1	Parameter . . . . .	138
3.3.4.2	Lösungen . . . . .	138
3.4	Darstellung oxidierter Flavonole . . . . .	139
3.4.1	Chemikalien . . . . .	139
3.4.2	Durchführung . . . . .	139
3.4.3	Lösungen der oxidierten Flavonole . . . . .	140
3.4.4	Überprüfung des Ionentauschs mit AAS . . . . .	141
3.4.4.1	Parameter . . . . .	141
3.4.4.2	Lösungen . . . . .	141
3.4.4.3	Kalibrierung . . . . .	141
3.4.4.4	Probe . . . . .	141
3.5	Strukturaufklärung . . . . .	142
3.5.1	Kernresonanzspektroskopie . . . . .	142
3.5.1.1	Eindimensional . . . . .	142
3.5.1.2	Zweidimensional . . . . .	143
3.5.2	Massenspektroskopie . . . . .	144
3.5.2.1	PBI-EI/MS, PBI-NCI/MS . . . . .	144
3.5.2.2	ESI-ion trap/MS . . . . .	144
3.5.2.3	Lösungen . . . . .	145
3.6	Antioxidative Eigenschaften . . . . .	145
3.6.1	Halbstufenpotentiale . . . . .	145

3.6.2	Rancimat-Tests . . . . .	145
3.6.3	Lösungen . . . . .	145
3.6.4	Auswertung . . . . .	146
3.7	HPLC von Flavonolen, Flavonen und oxidierten Flavonolen . . . . .	147
3.7.1	HPLC-Säulen . . . . .	147
3.7.2	Photodiodenarray-Detektion . . . . .	147
3.7.2.1	Parameter . . . . .	147
3.7.2.2	Lösungen . . . . .	148
3.7.2.3	Kalibrierung . . . . .	148
3.7.2.4	Peakspektren . . . . .	153
3.7.3	Elektrochemische Detektion . . . . .	156
3.7.3.1	Parameter . . . . .	156
3.7.3.2	Lösungen . . . . .	156
3.7.3.3	Hydrodynamische Voltammetrie . . . . .	156
3.7.3.4	Kalibrierung . . . . .	157
3.7.4	UV-Detektion . . . . .	161
3.7.4.1	Parameter . . . . .	161
3.7.4.2	Lösungen . . . . .	162
3.7.5	ESI-ion trap/MS-Detektion . . . . .	162
3.7.5.1	Parameter . . . . .	162
3.7.5.2	Lösungen . . . . .	163
3.8	Analytik oxidierter Flavonole in biologischer Matrix . . . . .	163
3.8.1	Probenvorbereitung . . . . .	163
3.8.1.1	Gefriertrocknung und Säurehydrolyse . . . . .	163
3.8.1.2	Kaltextraktion von frischem Gemüse . . . . .	164
3.8.2	Festphasenextraktion . . . . .	165
3.8.2.1	Parameter . . . . .	165
3.8.2.2	Wiederfindungsraten . . . . .	165
3.8.3	Chromatographie . . . . .	167
3.8.3.1	Parameter . . . . .	167
3.8.3.2	Kalibrierung . . . . .	167
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>173</b>
<b>5</b>	<b>Anhang</b>	<b>177</b>



# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Allgemeine Einführung

Die genauere Erforschung oxidativer Prozesse in biologischen Systemen spielt eine wachsende Rolle im Hinblick auf medizinische und lebensmitteltechnologische Zusammenhänge [1, 2, 3, 4]. Mehr und mehr rücken dabei die vielfältigen Wechselwirkungen zwischen anti- und prooxidativen Verbindungen ins Blickfeld [1, 4].

Oxidative Veränderungen z.B. von Lipiden, Proteinen und DNA können durch reaktive Sauerstoff-Spezies in Form freier Radikale hervorgerufen werden. Treten diese Radikale in so hohen Konzentrationen auf, daß eine natürliche Entgiftung nicht mehr möglich ist, so können die Entstehung von Krebs, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und neurodegenerativen Erscheinungen wie der Alzheimerschen Krankheit stark begünstigt werden. Gleichartige Reaktionen fördern den Verderb, den Abbau von Vitaminen und die Ausbleichung von Pigmenten in Lebensmitteln, was eine deutliche Wertminderung oder deren Unbrauchbarkeit zur Folge haben kann [4, 5].

Diese Autoxidation von Biomolekülen verläuft in einer Vielzahl ineinander greifender Reaktionen. Schematisch gliedert sie sich in drei Schritte:

1. Entstehung hochreaktiver Radikale,
2. primäre Oxidation des Zielmoleküls,
3. Zerfall und Weiterreaktion der Primärprodukte.

Der exakte Verlauf der einzelnen Reaktionen wird dabei durch eine Reihe verschiedener Faktoren beeinflusst [1, 4].

Insbesondere der erste und dritte Schritt dieser Kaskade wird durch die Anwesenheit von Schwermetall-Kationen stark begünstigt. Eine wesentliche Rolle spielen hierbei das ubiquitär vorkommende Eisen, sowie Kupfer-, Mangan-, Kobalt- und Nickelionen [4, 5, 6]. Die Unterdrückung des ersten Schritts dieser Kaskade würde zur Verhinderung möglicher Schäden von Biomolekülen führen [4]. Die Anwesenheit ionischer Prooxidantien in biologischen Systemen ist aber nicht zu verhindern, und eine vollständige Entfernung im Rahmen lebensmitteltechnologischer Prozesse ist nicht wirtschaftlich durchführbar. Dementsprechend ist eine exogene Beeinflussung der unerwünschten Oxidationsprozesse notwendig. Als Verbindungen, die sich hemmend auf die Entstehung von Oxidationsprodukten auswirken, kommen vor allem Enzyme (nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit), Antioxidantien und Chelat-Bildner in Betracht [6].

Eine Vielzahl natürlich vorkommender Verbindungen haben als Antioxidantien die Fähigkeit, mit freien Radikalen zu reagieren, ohne dabei weitere Radikale zu bilden. Andere Verbindungen wiederum reduzieren direkt die reaktiven Sauerstoff-Spezies [1]. Eine dritte Möglichkeit zur Verminderung der Konzentration freier Radikale ist die Verhinderung ihres Entstehens durch stabile Bindung der oben erwähnten Schwermetall-Kationen in Form von Chelat-Komplexen [5, 6, 7, 8, 9].

Der Einfluß von Komplexbildnern auf den Ablauf von kationen-induzierten Oxidationen läßt sich in Modellsystemen untersuchen [9, 10, 11, 12]. Daraus kann aber nicht unmittelbar geschlossen werden, ob in biologischen Matrices ebenfalls derartige Reaktionen stattfinden. Um dies nachweisen zu können, müssen die gesuchten Komplexe selektiv detektiert werden. Die gewählte Analysenmethodik muß dabei sicherstellen, daß der Zustand der Komplexe durch die Untersuchung nicht substantiell verändert wird und eine gemeinsame Detektion von Zentralion und Ligand möglich ist. Zwar wurden in den vergangenen Jahren für etliche Matrices und Elemente entsprechende Verfahren entwickelt, doch konnte der eindeutige Nachweis des Vorliegens von Komplexen aus Antioxidantien und prooxidativen Kationen in natürlichen Matrices noch nicht erbracht werden [13, 14, 15, 16].

Jene Verbindungen, die sowohl radikalfangend als auch komplexierend wirken können, verdienen besondere Aufmerksamkeit. Die Kombination dieser beiden Eigenschaften könnte eine grundsätzlich bessere antioxidative Wirkung zur Folge haben, da mehrere unterschiedliche Ursachen unerwünschter Oxidationsprozesse gleichzeitig bekämpft werden. Ein gezielter Einsatz derartiger Verbindungen wäre demnach in lebensmitteltechnologischer wie medizinischer Hinsicht denkbar. Welche der möglichen Reaktionen dabei dann tatsächlich eine Rolle spielen, ist aber schwer auszumachen.

In diesem Zusammenhang ist zu berücksichtigen, daß die leichte Oxidierbarkeit von Antioxidantien gerade bei Wechselwirkungen mit prooxidativen Kationen eine Redoxreaktion im Anschluß an eine Komplexbildung zur Folge haben kann. Inwieweit Reaktionen dieser Art in der biologischen Matrix ablaufen, ist wenig untersucht. Das Wissen über die Eigenschaften oxidierten Antioxidantien ist aber notwendig, um deren weitere Wirksamkeit hinsichtlich medizinischer wie lebensmitteltechnologischer Zusammenhänge abschätzen zu können [1].

Es müssen folglich analytische Methoden vorhanden sein, um die möglichen Reaktionsprodukte (seien es Komplexe oder Produkte aus Redox-Reaktionen) nachweisen zu können. Nur so kann näher beleuchtet werden, welche Veränderungen Antioxidantien und Prooxidantien während ihrer Wirksamkeit in komplexen Systemen erfahren.

## 1.2 Spezielle Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen analytische Methoden entwickelt werden, die die chromatographische Untersuchung von Produkten erlauben, die bei Reaktionen von Antioxidantien pflanzlichen Ursprungs mit verschiedenen Kationen entstehen. Dabei kann es sich sowohl um stabile Komplexe, als auch um oxidierte Antioxidantien handeln.

Unter Verwendung von Referenzsubstanzen sollen die Parameter eingegrenzt werden, die unter analytischen Bedingungen für den jeweiligen Verlauf der Reaktionen von Bedeutung sind. Die Vorgehensweise ist dabei stets darauf abzustimmen, die Produkte mit HPLC trennen zu können. Es sollen mehrere Detektionsmethoden parallel angewendet werden, so daß eine eindeutige Charakterisierung der chromatographierten Verbindungen möglich ist.

Die so geschaffenen analytischen Voraussetzungen sollen anschließend genutzt werden, um die Reaktionsprodukte in biologischen Matrices nachweisen zu können.

## 1.3 Untersuchte Verbindungen

### 1.3.1 Kationen

Die folgenden Kationen wurden für die Untersuchungen ausgewählt:

- $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$
- $\text{Cu}^{2+}$
- $\text{Al}^{3+}$ .

Wie bereits einleitend erwähnt, sind Eisen- und Kupfer-Kationen die wichtigsten Promotoren von Oxidationsreaktionen in biologischen Systemen [4, 6]. Ihre Untersuchung ist daher im Hinblick auf ihre Wechselwirkungen mit Antioxidantien und Chelatliganden vordringlich interessant.

Das Eisen ist das zweithäufigste Metall und am Aufbau der Erdrinde als vierthäufigstes Element überhaupt mit 4,7 % beteiligt. Anorganisch gebunden liegt es überwiegend in Form oxidischer und sulfidischer Erze vor. In biologischen Systemen spielen Eisenionen eine hervorragende Rolle als Bestandteil des Hämoglobins und treten weiterhin in vielen Proteinen auf, die zum Teil den Ablauf von Redoxreaktionen in lebenden Organismen steuern [17, 18]. Die Oxidationsstufe der Eisenionen spielt dabei für ihre jeweilige Wirksamkeit eine entscheidende Rolle. Der Übergang zwischen zwei- und dreiwertigem Eisen ist leicht möglich, und in biologischen Systemen können Übergangsmetalle leicht reduziert oder oxidiert werden [4, 17, 19]. Spuren von Eisenionen können in der Oxidationsstufe +II die Entstehung freier Hydroxylradikale aus Wasserstoffperoxid stark begünstigen. In dieser sogenannten Fenton-Reaktion wird dabei das Kation oxidiert ( $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ ). Ein entscheidender Schritt für die katalytische Wirkung der Eisenionen für die weitere Bildung hochreaktiver Radikale ist die anschließende Reduktion ( $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ ), die durch Superoxid-anionen, aber auch Ascorbat oder NADH bewirkt wird [4]. Durch diesen Kreislauf können Eisenionen in biologischen Systemen Lipide katalytisch oxidieren und so den Verderb und die Zerstörung von Membranen und DNA mit der Folge verschiedener Krankheiten stark begünstigen [4, 5].

Kupfer liegt anorganisch gebunden hauptsächlich in Form von Oxiden und Sulfiden vor. In biologischen Systemen spielt es nicht die überragende Rolle wie Eisen, findet sich aber auch in einer Reihe von Enzymen. In wässriger Lösung ist  $\text{Cu}^{2+}$  wegen seiner hohen Hydratationsenthalpie die stabilste Wertigkeitsstufe des Kupfers [17]. Ebenso wie Eisenionen sind



auch Kupferionen in der Lage, die Bildung von Radikalen und damit die Oxidation von Biomolekülen wie oben beschrieben zu katalysieren. Dabei wird der Redoxzyklus zwischen  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Cu}^+$  durchlaufen, wobei die Kupferionen in Form von Komplexen gebunden vorliegen [4]. Gleichmaßen spielt auch bei den Eisenionen ihr Bindungszustand für ihre katalytische Wirkung eine wichtige Rolle. Sie sind nur dann wirksam, wenn sie nicht an Proteine gebunden sind, sondern in Form niedermolekularer Komplexe verfügbar sind. Die Identität dieser physiologisch vorliegenden Eisen- und Kupferspezies ist noch unbekannt, es wurden aber Liganden wie Citrat, Aminosäuren, Nucleotide oder Glutathion vorgeschlagen [4, 19].

Für die Ionen der Elemente Eisen und Kupfer wurden also Funktionen als Oxidationsmittel oder Katalysator beschrieben, die von ihrer Bindung als Zentralion in Komplexen abhängig sind. Bei den Untersuchungen zu den Wechselwirkungen dieser Kationen mit Polyphenolen muß also immer berücksichtigt werden, daß Komplexbildung und Redoxreaktion miteinander verbunden sein können.

Aluminium ist das weitestverbreitete unter den Metallen der Erdkruste. Es besitzt eine hohe Sauerstoffaffinität und kommt anorganisch gebunden nur in Form von Oxiden vor. Die Aluminium-Verbindungen leiten sich fast ausnahmslos vom dreiwertigen Aluminium ab, ein Redoxzyklus wie bei Eisen- und Kupferionen findet nicht statt [17]. Dementsprechend können  $\text{Al}^{3+}$ -Ionen nicht direkt zu Redoxreaktionen und zur Bildung von Radikalen beitragen. Trotz der fehlenden Redoxkapazität kann Aluminium aber die eiseninduzierte Lipidperoxidation fördern. Für diese Wirkung wurden etliche verschiedene Mechanismen vorgeschlagen [4]. In den letzten Jahren wurde Aluminium daher verstärkt als Kontaminant von Lebensmitteln betrachtet, da es wie die Prooxidantien Eisen und Kupfer eine Rolle bei der Entstehung neurodegenerativer Krankheiten spielt [20, 21]. Die Toxizität des  $\text{Al}^{3+}$  hängt dabei stark von seinem Bindungszustand ab [21, 22]. Für die vorliegende Arbeit war  $\text{Al}^{3+}$  besonders interessant, da es als Zentralion mit einigen der weiter unten beschriebenen Polyphenole stabile Komplexe bilden kann. An diesen Komplexen sollte so der Einfluß der anderen Kationen durch Verdrängung des Zentralteilchens oder Oxidation des Liganden untersucht werden.

### 1.3.2 Antioxidantien

In der menschlichen Nahrung findet sich eine breite Palette verschiedener Verbindungen, die antioxidativ wirksam sind oder aufgrund ihrer Struktur als Radikalfänger vorgeschlagen wurden. Die wichtigsten Antioxidantien stellen dabei mehrere Gruppen phenolischer

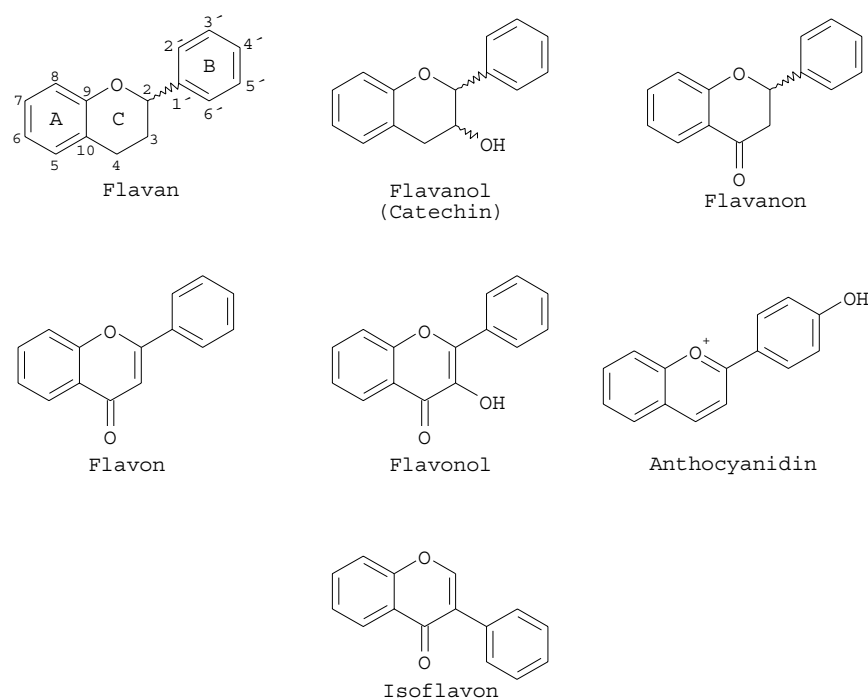
Verbindungen dar [1, 2, 3, 6]. Ihre bedeutendsten Vertreter sind Ascorbinsäure (Vitamin C), Tocopherole und Tocotrienole (Vitamin E), Carotinoide und Flavonoide. Abgesehen vom Vitamin C besteht jede dieser Gruppen aus einer Vielzahl strukturell unterschiedlicher Einzelverbindungen [1], die aufgrund ihres Gehalts an Hydroxygruppen - je nach Molekülstruktur - auch als Liganden für die oben ausgewählten Kationen grundsätzlich geeignet sind [23].

In den vergangenen Jahren sind die nicht vitaminwirksamen wasserlöslichen Polyphenole aus pflanzlichen Quellen verstärkt als Antioxidantien ins Blickfeld gerückt [6]. Ihre Verwendung und Erforschung hat beständig zugenommen, zumal vermehrt über ihre positiven physiologischen Wirkungen berichtet wird [24, 25, 26, 27]. Auch spielt der gezielte Einsatz von hocheffektiven Antioxidantien aus natürlichen Quellen wie Kräutern und Gewürzen eine zunehmende Rolle bei der Haltbarmachung von Lebensmitteln [1, 28]. Die vorliegende Arbeit konzentrierte sich daher auf Flavonoide und ausgewählte phenolische Gewürzinhaltsstoffe.

### 1.3.2.1 Flavonoide

Die Flavonoide stellen eine Klasse von Naturstoffen dar, die als Sekundärmetaboliten im gesamten Pflanzenreich vertreten sind. Sie bestehen in ihrer Grundstruktur aus dem C<sub>15</sub>-Gerüst des Flavans (3,4-Dihydro-2-phenyl-2H-1-benzopyran). Bisher sind etwa 4000 Einzelverbindungen beschrieben, die sich in die Gruppen der Flavane, Flavanole (Catechine), Flavanone, Flavone, Flavonole, Anthocyanidine und Isoflavonoide gliedern (Abb. 1.1). Innerhalb der einzelnen Gruppen werden die Verbindungen durch ihre Substitutionsmuster an den aromatischen Ringen unterschieden. Als Substituenten finden sich vorwiegend Hydroxy- und Methoxygruppen, ebenso sind etliche Glykoside, weitere Derivate und auch Konjugate mehrerer Flavonoide untereinander beschrieben [29].

Den Flavonoiden werden eine Vielzahl biologischer Wirkungen zugeschrieben. Sie haben verschiedene Aufgaben im pflanzlichen Metabolismus, durch ihre Aufnahme über die Nahrung können sie aber auch unterschiedliche Wirkungen auf den tierischen und menschlichen Organismus ausüben. Wichtigste Quellen stellen dabei verschiedene Gemüse- und Obstsorten dar, wobei das qualitative und quantitative Muster der gefundenen Flavonoide von Sorte zu Sorte stark variieren kann. Von besonderem Interesse sind hier die Flavonole und Flavone, die die Hauptgruppe der verzehrten Flavonoide darstellen. Epidemiologische Studien haben gezeigt, daß ihr Verzehr mit einem verminderten Risiko der Entstehung von Krebs und Erkrankungen der Herzkranzgefäße in Zusammenhang steht [29, 25, 26, 3, 30, 24, 27].

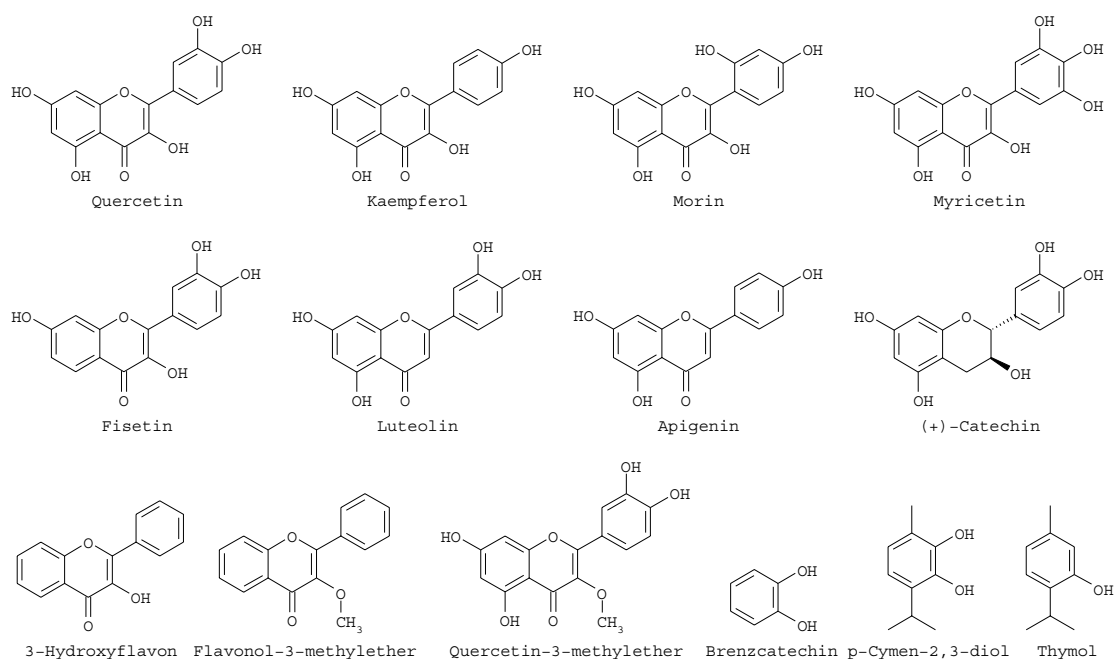


**Abbildung 1.1:** Grundgerüste der einzelnen Klassen von Flavonoiden.

Diese günstigen gesundheitlichen Wirkungen werden zurückgeführt auf die Möglichkeit der Verbindungen, als Antioxidantien, Radikalfänger und Chelat-Bildner zu agieren. Sie können effektiv die Oxidation von Fetten und insbesondere der LDL Lipoproteine einschränken, auch unter Einfluß des Prooxidans  $\text{Cu}^{2+}$  [31, 22, 32, 33, 11]. Quercetin ist in der Lage, die Zytotoxizität von Hydroperoxiden zu verringern und den durch sie hervorgerufenen Strangbruch der DNA zu verhindern [34]. Dafür wird die Eigenschaft des Flavonols als Radikalfänger, insbesondere aber als Chelatligand für Eisenionen verantwortlich gemacht [34].

### 1.3.2.2 Phenolische Gewürzinhaltsstoffe

Eine Reihe von Pflanzen verfügen über eine antioxidative Wirksamkeit. Insbesondere Gewürze wie Rosmarin, Salbei, Thymian oder Oregano enthalten phenolische Terpene, die als Radikalfänger wirken können. Aus diesem Grund werden Extrakte dieser Pflanzen zur Stabilisierung von Lebensmitteln technologisch genutzt [1, 6, 28]. Für die vorliegende Arbeit war der wichtigste antioxidativ wirksame Inhaltsstoff des Thymians, das *p*-Cymen-2,3-diol (Abb. 1.2, S. 16) wegen seiner *o*-diphenolischen Struktur von großem Interesse. Diese Verbindung ermöglichte zusammen die Untersuchung des Einflusses, den weitere Substituenten auf das Komplexbildungsverhalten von *o*-Diphenolen haben. Im Vergleich dazu wurde das



**Abbildung 1.2:** Strukturen und Trivialnamen der in dieser Arbeit untersuchten Phenole.

ebenfalls in Thymian vorhandene monophenolische Thymol untersucht.

### 1.3.2.3 Auswahl der untersuchten Verbindungen

Für die vorliegende Arbeit war es notwendig, aus der großen Vielzahl natürlich vorkommender Polyphenole gezielt einige wenige zur Untersuchung auszuwählen. Dabei standen drei Überlegungen im Vordergrund:

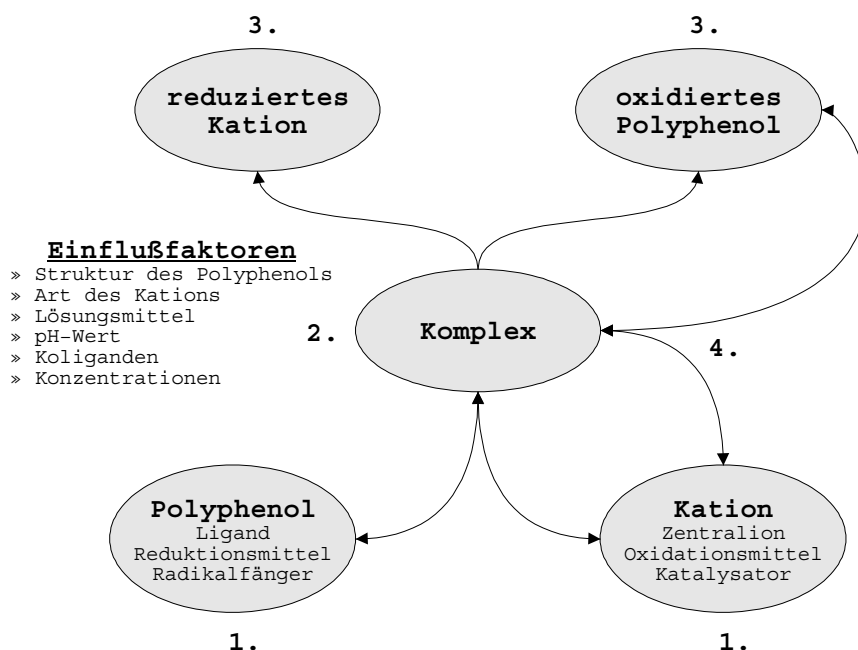
1. Biologische Bedeutung der Verbindung,
2. Eignung des Moleküls als möglicher Ligand und
3. Unterschiede in der Molekülstruktur, die bei den Untersuchungen eindeutige Schlüsse auf den Ablauf von Komplexbildung und Redoxreaktionen zulassen.

Daraus resultierte die Entscheidung für insgesamt 14 Verbindungen. Ihre Strukturformeln, Trivialnamen und systematischen Namen (entsprechend der Chemical Abstracts Nomenklatur [35]) sind in Abb. 1.2 und Tab. 1.1 aufgezeigt.

Die Flavonole Quercetin, Kaempferol und Myricetin, sowie die Flavone Luteolin und Apigenin sind die wichtigsten in der Nahrung vorkommenden Flavonoide [36, 37]. Ausgehend von diesen Verbindungen wurden noch weitere nach den oben angegebenen Punkten

**Tabelle 1.1:** Systematische Namen der in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen entsprechend Chemical Abstracts [35]

Trivialname	systematischer Name
Quercetin	2-(3,4-Dihydroxyphenyl)- 3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-on
Kaempferol	2-(4-Hydroxyphenyl)- 3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-on
Morin	2-(2,4-Dihydroxyphenyl)- 3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-on
Myricetin	2-(3,4,5-Trihydroxyphenyl)- 3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-on
Fisetin	2-(3,4-Dihydroxyphenyl)- 3,7-dihydroxy-4H-1-benzopyran-4-on
Luteolin	2-(3,4-Dihydroxyphenyl)- 5,7-dihydroxy-4H-1-benzopyran-4-on
Apigenin	2-(4-Hydroxyphenyl)- 5,7-dihydroxy-4H-1-benzopyran-4-on
(+)-Catechin	[2R, 3S]-2-(3,4-Dihydroxyphenyl)- 3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-3,5,7-triol
Flavonol	3-Hydroxy-2-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on
Flavonol-3-methylether	3-Methoxy-2-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on
Quercetin-3-methylether	2-(3,4-Dihydroxyphenyl)- 3-methoxy-5,7-dihydroxy-4H-1-benzopyran-4-on
Brenzcatechin	1,2-Dihydroxybenzol
<i>p</i> -Cymen-2,3-diol	1-Isopropyl-2,3-dihydroxy-4-methylbenzol
Thymol	5-Methyl-2-(1-methylethyl)-phenol



**Abbildung 1.3:** Schematische Beschreibung von möglichen Vorgängen und Einflußfaktoren bei der Reaktion von Polyphenolen mit Kationen.

(2) und (3) ausgewählt. Anhand des folgenden Überblicks über bisher in der Literatur beschriebene Untersuchungen wird diese Entscheidung näher erläutert.

## 1.4 Reaktionen und Analytik der Polyphenole

### 1.4.1 Vorbemerkung

Aus der Literatur geht hervor, daß die gewählten Verbindungen grundsätzlich mehrere unterschiedliche Typen von Reaktionen miteinander eingehen können [11]. Wie in Abbildung 1.3 schematisiert dargestellt, sind Komplexbildung und Redoxreaktion wechselseitig voneinander abhängig. Etliche Faktoren beeinflussen dabei einen evtl. aus dem Kation und dem Polyphenol entstandenen Komplex, dessen Verhalten je nachdem sehr unterschiedlich charakterisiert sein kann. Möglich sind:

1. Zerfall des Komplexes in seine Einzelbestandteile (Gleichgewicht auf der Seite der Edukte),
2. stabiler Komplex, der die chemischen Eigenschaften von Zentralion und Ligand maßgeblich verändert,

3. irreversible Redoxreaktion zwischen Zentralion und Ligand,
4. evtl. erneute Komplexbildung von Ionen durch das oxidierte Polyphenol.

Die gewählten Untersuchungsbedingungen haben dabei einen entscheidenden Einfluß auf die Lage der jeweiligen Gleichgewichte. Schon im Jahr 1958 berichteten Lewis und Watts [38] über die Fähigkeit von Zwiebelsaft und wäßrigem Zwiebelextrakt, die Oxidation von Fetten in Gegenwart von  $\text{Cu}^{2+}$  und Ascorbinsäure deutlich zu vermindern. Sie führen diese Eigenschaft zurück auf die mögliche Komplexbildung des  $\text{Cu}^{2+}$  durch Quercetin, werfen aber bereits die Frage auf, ob die Chelat-Liganden selbst durch Oxidation während der Messungen verändert werden können. Diese zentrale Fragestellung wurde bei später beschriebenen Untersuchungen jedoch teilweise außer acht gelassen. Bei der Wiedergabe der in der Literatur beschriebenen Methoden sind folglich neben den Wechselwirkungen von Polyphenolen mit Kationen auch Redoxreaktionen unter Verwendung anderer Oxidationsmittel berücksichtigt.

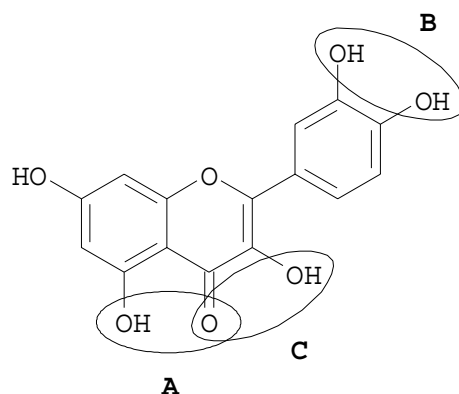
## 1.4.2 Polyphenole als Liganden

### 1.4.2.1 Messung der Komplexbildung

Die Untersuchung von Polyphenol-Metall-Komplexen setzt voraus, daß es Parameter gibt, die durch eine Komplexbildung meßbar verändert werden. Die aus einer Komplexbildung resultierende Ligandenfeldaufspaltung der d-Orbitale des Zentralions führt zu einer Veränderung von dessen Elektronenspektrum. In den meisten Fällen liegt die Ligandenfeldaufspaltung in einem solchen Bereich, daß die Komplexe im Sichtbaren absorbieren und damit als farbig erscheinen. Dagegen absorbieren die meisten der nicht-komplexen Molekülverbindungen im UV-Bereich und erscheinen deshalb als farblos [23]. Als besonders wichtiges Hilfsmittel zur Untersuchung von Komplexen hat sich daher die Vermessung des UV/Vis-Spektrums erwiesen [39].

In Bezug auf die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Polyphenole ist es allerdings wichtig zu beachten, daß durch eine Komplexbildung oder Redoxreaktion auch das elektronische System des Liganden deutlich verändert werden kann. Das Auftreten einer Absorption im sichtbaren Bereich des UV/Vis-Spektrums muß also nicht notwendigerweise eine Komplexbildung anzeigen, sondern kann auch aus der Bildung chinoider Strukturen im Liganden herrühren [40, 41, 42].

Neben der Messung UV/Vis-spektroskopischer Veränderungen durch eine Komplexbildung ist es auch grundsätzlich möglich, die zu untersuchenden Komplexe in synthetischem



**Abbildung 1.4:** Beschriebene Bindungsstellen für Kationen an Polyphenolen am Beispiel des Quercetin (Benennung in Anlehnung an [51]).

Maßstab darzustellen und ihre Eigenschaften in kristallinem Zustand zu untersuchen. Diese Vorgehensweise, die z.B. zur Untersuchung des aktiven Zentrums des Enzyms Quercetinase mit Flavonolen und  $\text{Cu}^{2+}$  durchgeführt wurde [43, 44, 45, 46], war jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

#### 1.4.2.2 Mögliche koordinative Bindungen

Am Beispiel des am intensivsten erforschten Flavonols Quercetin wird deutlich, daß in Polyphenolen mehrere funktionelle Gruppen zur Komplexbildung beitragen können. Die vorgeschlagenen Bindungsstellen zu Zentralionen sind in Abbildung 1.4 dargestellt [38, 47, 48, 49, 50, 51, 43, 44, 52, 53, 25, 54, 45, 41, 55, 11, 56, 57, 12]. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Verbindungen verfügen demnach über die in Tabelle 1.2 aufgelisteten möglichen Bindungsstellen. Die Tabelle verdeutlicht die Systematik der Auswahl der Verbindungen. Sie besitzen jeweils Kombinationen aus den möglichen Bindungsstellen, so daß deren Einfluß auf die ablaufenden Reaktionen systematisch untersucht werden kann.

Neben den in Pflanzen am häufigsten vorkommenden Flavonolen Quercetin, Kaempferol und Myricetin, sowie den Flavonen Luteolin und Apigenin wurden noch weitere Verbindungen herangezogen. Das Flavonol Fisetin bietet durch das Fehlen der Bindungsstelle A die Möglichkeit, den Einfluß der 5-OH-Gruppe auf die ablaufenden Reaktionen zu untersuchen. Morin wurde ausgewählt, weil es als komplexometrisches Nachweisreagenz für  $\text{Al}^{3+}$  bekannt ist. Die Veretherung der 3-OH-Gruppe von Flavonol und Quercetin erlaubte durch die Blockierung der Bindungsstelle C eine genauere Untersuchung der Bedeutung der Azidität dieser funktionellen Gruppe für Komplexbildung und Redoxreaktion. Zusätzlich sollte der Einfluß weiterer funktioneller Gruppen auf die Fähigkeit von *o*-Diphenolen (Bindungs-



**Tabelle 1.2:** Mögliche koordinative Bindungsstellen (Abb. 1.4) in den untersuchten Phenolen (Abb. 1.2)

Verbindung	Bindungsstelle		
	A	B	C
Quercetin	+	+	+
Myricetin	+	+	+
Kaempferol	+		+
Morin	+		+
Fisetin		+	+
3-Hydroxyflavon			+
Luteolin	+	+	
Quercetin-3-methylether	+	+	
Apigenin	+		
Flavonol-3-methylether			
(+)-Catechin		+	
Brenzcatechin		+	
p-Cymen-2,3-diol		+	
Thymol			

stelle B) zur Komplexbildung anhand der Verbindungen (+)-Catechin, Brenzcatechin und *p*-Cymen-2,3-diol, auch im Vergleich zu dem Monophenol Thymol untersucht werden.

#### 1.4.2.3 Stabile Komplexe

In der Literatur ist die Darstellung und Isolierung von Komplexen von Polyphenolen mit verschiedenen Kationen nur spärlich beschrieben. Röntgenkristallographische Daten, die einen eindeutigen Nachweis und eine strukturelle Information über den Komplex zulassen, finden sich für Komplexe von Flavonol und Quercetin mit  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Cu}^+$  [43, 44, 45, 46]. Aus den Untersuchungen geht deutlich hervor, daß die Ausbeuten bei der Darstellung sehr stark von den gewählten Lösungsmitteln und den bei der Darstellung eingesetzten Koliganden abhängig sind. Die Koordination erfolgte in diesen Fällen ausschließlich über die Bindungsstelle C [43, 44, 45, 46]. Ebenso können Brenzcatechin, verschiedene seiner Derivate und andere *o*-Dihydroxyphenole (Bindungsstelle B) an eine Reihe von ein- und zweikernigen Kupfer(II)-Komplexen binden. Auch hier besteht eine starke Abhängigkeit der Produkte von Reaktionsmedium und verwendeten Koliganden [52, 53].

Der analytische Nachweis von  $\text{Al}^{3+}$  mit dem Flavonol Morin wird schon seit langem praktiziert. Er beruht auf der Bildung eines stark fluoreszierenden Komplexes in essigsau-

rer Lösung. In Lehrbüchern ist als Bindungsstelle für das  $\text{Al}^{3+}$  die Position A (Abb. 1.4) angegeben [58]. Porter und Markham [47] zeigten aber bereits 1970, daß das Vorhandensein der Position C für die Reaktion entscheidend ist. Diese Beobachtung wurde von Hollman et al. [59] bestätigt, die eine Nachsäulenderivatisierung mit einem großen Überschuß an  $\text{Al}^{3+}$  für die empfindliche fluorimetrische Detektion ausschließlich von Flavonolen vorschlugen. Die von ihnen untersuchten Flavone (Luteolin und Apigenin) und Catechine ((+)-Catechin und (-)-Epicatechin) bildeten keine fluoreszierenden  $\text{Al}^{3+}$ -Komplexe.

Die Stöchiometrie der  $\text{Al}^{3+}$ -Flavonol-Komplexe in verschiedenen Lösungsmitteln wurde kürzlich von Deng und Van Berkel [60] mit Elektrospray-Massenspektrometrie untersucht. Sie beobachteten die bevorzugte Bildung von einfach positiv geladenen 1:2-Komplexen (Zentralion:Flavonol). In wäßriger Lösung lagen zusätzlich einfach positiv geladene 1:1-Komplexe (Zentralion:Flavonol) mit einer Hydroxygruppe als Koligand vor. Methanol begünstigte die Komplexbildung, und die Methoxygruppe konnte als Koligand zu dem Flavonol nachgewiesen werden. Eine Entscheidung über die genaue Koordination des Komplexes konnte anhand der Daten nicht gegeben werden, die Autoren schlugen aber die Bindung über die 3-Hydroxy-4-keto-Funktion (Bindungsstelle C) als wahrscheinlicher vor [60].

Eine Bindung von  $\text{Al}^{3+}$  an den *o*-diphenolischen B-Ring von Anthocyaninen ist ebenfalls beschrieben [40, 41, 42]. Diese setzt jedoch eine genügend hohe Säurestärke des phenolischen Protons an Position 3' voraus, was bei den Anthocyaninen durch Mesomerie zwischen dem Flavyliumion und einer chinoiden Form gegeben ist. In dieser Form ist ähnlich wie bei den Flavonolen eine 3'-Hydroxy-4'-keto-Funktion (im B-Ring) für die Bindung des Kations verantwortlich [40, 41, 42].

#### 1.4.2.4 Chromatographie von Polyphenol-Metall-Komplexen

Eine Möglichkeit zum Nachweis von Polyphenol-Metall-Komplexen in biologischen Proben stellt deren Abtrennung von anderen Matrixbestandteilen durch Extraktion mit anschließender Chromatographie dar [14]. Bisher ist eine derartige Vorgehensweise nur in einigen wenigen Arbeiten beschrieben, in denen aber die grundsätzliche Problematik, daß die Analysenbedingungen die Komplexe stark beeinflussen können, nicht ausreichend diskutiert wurde.

Weber und Schwedt [61] zeigten bei ihren Untersuchungen zur Bindung von Kupfer-, Zink- und Eisen-Kationen in Kaffee und Tee, daß mit Essigsäureethylester extrahierbare Kationen in Form ihrer Komplexe mit HPLC ansatzweise getrennt werden können. Die organischen Liganden in den eluierenden Peaks wurden durch Anwendung verschiedener

Derivatisierungstechniken näher charakterisiert. In Tee konnte die Zugehörigkeit der Liganden auf die Gruppe der Flavonoide eingegrenzt werden, eine exakte Aufklärung der Struktur einzelner Verbindungen war jedoch mit den gewählten Methoden nicht möglich.

Wedepohl und Schwedt [50, 62] untersuchten 1986 die Bindung von Kupfer an Flavonoide in Zwiebeln und Tomatenschalen. Zur Anreicherung der Komplexe wurden die Abtrennung freier Flavonoide durch deren Adsorption an Cellulose sowie die Extraktion der Komplexe mit Chloroform vorgeschlagen. Gelchromatographie an Sephadex LH-20 wurde zur Fraktionierung der methanolisch/wäßrigen Pflanzenextrakte verwendet und die Kupfer- und Flavonidgehalte der einzelnen Fraktionen getrennt bestimmt. Als Fazit wurde gezogen, daß die höchsten Kupfer-Gehalte des Zwiebel-Extraktes in der gelchromatographischen Fraktion konzentriert waren, die keine Flavonoide enthielten. In den Fraktionen, die Flavonoide enthielten, konnten aber ebenfalls relativ hohe Kupfer-Konzentrationen ermittelt werden. Es könne also gefolgert werden, daß Flavonoide in der Komplexbildung von Kupfer in Pflanzen eine Rolle spielen. Eine Abtrennung der mutmaßlichen Komplexe von den freien Flavonoiden war mit dieser Chromatographie nicht möglich. Ebenso scheiterte der Versuch, eine entsprechende Separierung mit Dünnschicht-Chromatographie an Cellulose bzw. Kieselgel zu erreichen. Letzteres wurde auf die Aufspaltung der Komplexe während der vielstufigen Gleichgewichtseinstellung zwischen stationärer Phase und Probe bei der DC zurückgeführt.

Im Gegensatz dazu berichtete Weber 1988 [51] über die Trennung von Kupfer-, Eisen- und Aluminium-Komplexen verschiedener Flavonoide mittels HPLC. Es wurden Referenzlösungen von Verbindungen eingesetzt, die ausschließlich über die Bindungsstellen A oder B verfügten. Daneben wurden auch Zwiebelextrakt, Grüner und Schwarzer Tee sowie ein nicht genauer charakterisierter Eisen-Flavonoid-Komplex, der als Dünger in der Landwirtschaft verwendet wird, untersucht. Zur Detektion wurden elektrochemische Methoden, sowie UV/Vis und AAS eingesetzt. Auffällig ist dabei, daß die mutmaßlichen Komplexe größtenteils sehr früh eluieren. Die Retentionszeiten der nicht komplexierten Kationen sind für die Referenzmischungen aus Polyphenolen und Metallen aber nicht angegeben, so daß nicht ausgeschlossen werden kann, daß nicht ein Komplex sondern das freie Kation detektiert wurde. Zwar wurden Messungen bei zwei verschiedenen pH-Werten durchgeführt, doch wurde der generelle Einfluß von Extraktion und Chromatographie auf eventuell vorhandene Komplexe nicht untersucht.

Cairns et al. [63] gingen hingegen auf die Problematik ein, die bei der Spezies-Analytik durch die Verwendung von Kieselgel-basierten stationären HPLC-Phasen auftritt. Bei ih-

ren Untersuchungen zur Bestimmung organometallischer Spezies in Tee wiesen sie darauf hin, daß nur durch den Einsatz Polymer-basierter Säulenmaterialien eine Wechselwirkung der Kationen mit der stationären Phase und damit ein Zerfall von Komplexen verhindert werden kann. Durch Kopplung der HPLC mit ICP-MS gelang es so, eine Vielzahl von Elementen nach der Chromatographie des filtrierten Tees zu detektieren. Die chromatographischen Bedingungen wurden dabei auf eine Trennung der organometallischen Komplexe hin optimiert. Aussagen über Verbindungsklassen der Liganden ließen sich aber nicht machen, da die gewählten chromatographischen Bedingungen für deren Trennung nicht optimal waren.

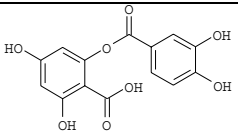
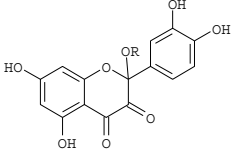
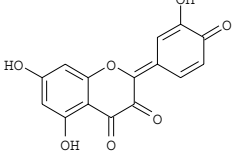
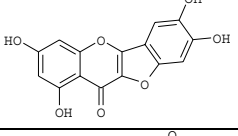
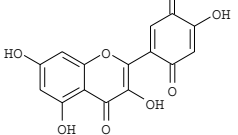
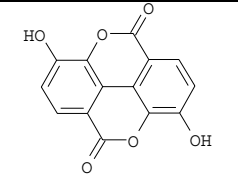
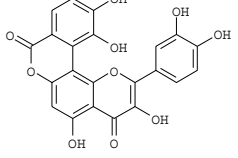
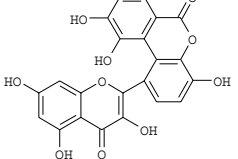
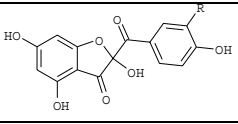
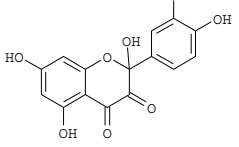
Der Überblick über die wichtigsten Literaturstellen zeigt, daß bisher in den Arbeiten zur Chromatographie von Polyphenol-Metall-Komplexen noch viel zu wenig beachtet wurde, wie sich der letzte Schritt der Analytik, nämlich die chromatographische Trennung selbst, auf die zu untersuchenden Komplexe auswirkt. In allen diesen Arbeiten fehlt zudem der eindeutige Nachweis des Vorliegens entsprechender Komplexe. Darüberhinaus wurde in keiner Weise diskutiert, inwieweit eine Redoxreaktion zwischen Ligand und Zentralion unter den gewählten analytischen Bedingungen abzulaufen vermag. Ohne die Kenntnis dieser Einflußfaktoren erscheint eine derartige Spezies-Analytik aber zweifelhaft, da ein Rückschluß auf die Verhältnisse in der Matrix schwerlich möglich ist.

### 1.4.3 Oxidation von Polyphenolen

Polyphenole mit antioxidativen Eigenschaften können während ihrer Wirkung als Antioxidantien selbst oxidiert werden [6]. Flavone und Flavonole sind auch in diesem Hinblick untersucht worden, es fehlt aber bis heute eine eindeutige Charakterisierung der Redoxreaktionen und den tatsächlich in biologischen Systemen entstehenden Produkten. Ebenso mangelt es an analytischen Methoden zum Nachweis und zur Bestimmung oxidiertes Polyphenole in natürlichen Matrices. Einige Oxidationsreaktionen und die daraus hervorgehenden Verbindungen sind allerdings für Flavonol, Quercetin und Kaempferol beschrieben (Tab. 1.3).

Komplexe von Flavonolen mit  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Cu}^+$  unter Anwesenheit unterschiedlicher stickstoff- und phosphorhaltiger Koliganden (s. 1.4.2.3, S.21) wurden in verschiedenen Lösungsmitteln zur Modellierung des aktiven Zentrums des Enzyms Quercetinase dargestellt [48, 43, 44, 45, 46, 64, 71]. Dieses Enzym katalysiert die Oxidation von Quercetin unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff und Abspaltung von CO aus dem C-Ring des Flavonols. Dabei entsteht ein Depsid (I) (Ester zweier phenolischer Carbonsäuren). Die

**Tabelle 1.3:** In der Literatur beschriebene Produkte für die Oxidation von Flavonolen. (\*: keine spektroskopischen Daten angegeben; \*\*: Vorschläge ohne spektroskopische Absicherung)

Nr.	Verbindung	Oxidationsmittel / Matrix
I		Quercetinase, Cu <sup>2+</sup> -haltige Enzymmodelle [64]
II		Cu <sup>2+</sup> in MeOH, EtOH (R=Me, R=Et) [49]*
III		Cu <sup>2+</sup> in wässrigem PBS-Puffer pH 7,4 [11]**
IV		elektrochemisch in 50 % wäbr. MeOH, pH 4,0[65]**
V		elektrochemisch in 50 % wäbr. MeOH, pH 4,0[65]**
VI		Fe <sup>3+</sup> in alkalisch, wässriger Lösung [66]
VII		Fe <sup>3+</sup> in alkalisch, wässriger Lösung [66]
VIII		Fe <sup>3+</sup> in alkalisch, wässriger Lösung [66]
IX		elektrochemisch (R=OH, R=H) in Acetonitril [67]
X		Enzym aus Rotklee [68], Zwiebeln [69], Tabak** [70]

Koordination des Flavonols sowie die Koliganden der Komplexe sind entscheidend für den Verlauf der Reaktion, in der das Zentralion selbst in seiner Oxidationsstufe nicht verändert wird.

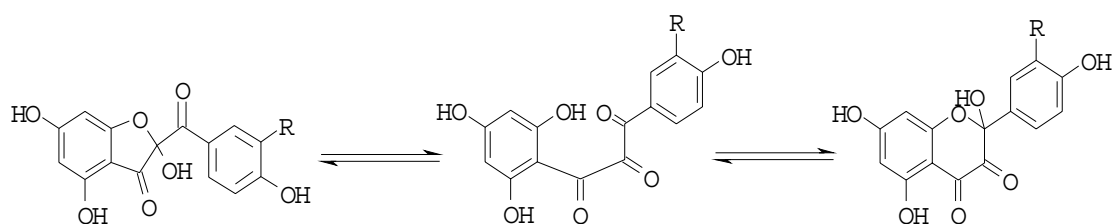
Für die direkte Umsetzung von 3-Hydroxyflavon und Quercetin mit  $\text{CuCl}_2$  in wasserfreien Alkoholen ist eine davon abweichende Reaktion beschrieben. Sie führt unter Beteiligung von Lösungsmittelmolekülen zur Bildung eines 2-Alkoxy-2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-4H-1-benzopyran-3,4-dions (II), während  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  reduziert und dieses durch molekularen Sauerstoff wieder zu  $\text{Cu}^{2+}$  oxidiert wird. Bei wäßriger Aufarbeitung der Reaktionsmischung entsteht das 3-Hydrat des Diketons. Spektroskopische Daten als Beleg für die postulierten Verbindungen sind jedoch nicht angegeben [49].

In wäßrigem Medium bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 sind die Reaktionen von Flavonolen und Flavonen mit  $\text{Cu}^{2+}$  beschrieben. Durch Komplexierung des  $\text{Cu}^{2+}$  mit EDTA konnte gezeigt werden, daß die Reaktion im Falle des Flavons Luteolin reversibel, im Falle der Flavonole Quercetin und Kaempferol jedoch irreversibel verläuft. Die Reaktionsprodukte wurden dabei zwar UV/Vis-spektrophotometrisch charakterisiert, ein Anhaltspunkt für die tatsächliche Existenz der Verbindung (III) nach einem zwei-Elektronen-Übergang fehlt aber [11].

Die Einwirkung von  $\text{Fe}^{3+}$  auf Quercetin in alkalischer wäßriger Lösung wurde von Murari et al. [66] untersucht. Unter diesen Bedingungen werden drei Verbindungen gebildet, die sich von der in einem ersten Oxidationsschritt entstehenden Protocatechusäure (3,4-Dihydroxybenzoesäure) herleiten. Diese kann zum einen zu Catellagsäure (VI) dimerisieren, zum anderen durch oxidative Kopplung mit Quercetin über OH-7 und C-8 bzw. OH-3' und C-2' des Flavonols zwei weitere Verbindungen bilden (VII, VIII). Im Vergleich zu allen anderen hier geschilderten Reaktionen sind die hier gewählten Reaktionsbedingungen recht drastisch, da Flavonole bei hohen pH-Werten nicht stabil sind. So läßt sich die Spaltung des C-Ringes des Quercetin durch die gleichzeitige Einwirkung von  $\text{Fe}^{3+}$  und Alkali erklären. Weitere Oxidationsreaktionen zwischen Flavonoiden und Eisenionen sind nicht beschrieben.

Neben den kationen-induzierten Reaktionen verdienen elektrochemische Oxidationen besondere Aufmerksamkeit. Sie bieten den Vorteil, daß die Reaktion jederzeit beendet und die Zahl der übergegangenen Elektronen gut kontrolliert werden kann [67]. Drei unterschiedliche Produkte wurden auf diese Weise bisher für die Oxidation von Quercetin und Kaempferol beschrieben.

Hendrickson et al. [65] untersuchten das elektrochemische Verhalten mehrerer Flavo-



**Abbildung 1.5:** Gleichgewichts-Reaktion zwischen beschriebenen Oxidationsprodukten von Flavonolen ( $R=H$ ,  $R=OH$ ) [67].

noide und beobachteten das Entstehen zweier Produkte bei der anodischen Oxidation von Quercetin. Die Verbindungen konnten mit HPLC getrennt und ihre UV/Vis-Spektren mit einem Photodioden-Array-Detektor aufgenommen werden. Eine weitere spektroskopische Absicherung der vorgeschlagenen Strukturen (IV, V) erfolgte allerdings nicht.

Im Gegensatz dazu gelang es Viborg Jørgensen et al. kürzlich [67], das jeweilige elektrochemische Oxidationsprodukt von Quercetin und Kaempferol zu isolieren. Die Strukturaufklärung erfolgte mittels MS (Bestimmung der Molekularmasse ohne Fragmentierung) und eindimensionaler NMR-Spektroskopie. Die HPLC-Trennung der Reaktionslösungen nach Übergang von zwei Elektronen zeigte, daß jeweils nur eine Verbindung entstanden war. Das gebildete Produkt (IX) steht als Halbketal in einem Gleichgewicht (Abb. 1.5) mit Verbindung (X).

Verbindung (X) wurde als Oxidationsprodukt des Quercetin in pflanzlichem Material beschrieben. Igarashi et al. [68] isolierten die Verbindung nach Umsetzung von Quercetin mit einer aus Rotklee gewonnenen Enzymsuspension. Die Aufreinigung erfolgte durch 20-fache Extraktion und Fraktionierung durch drei sequentielle Säulenchromatographien in einer Ausbeute von 1 % bezogen auf die eingesetzte Menge an Quercetin. In einer Ausbeute von 0,5 % wurde die gleiche Verbindung durch Einwirkung von Cysteinethylester auf Quercetin unter gleichzeitigem Erhitzen auf 80 °C, Bestrahlung mit 300 W und Begasen mit Luft dargestellt. Auch hier waren eine zehnfache Extraktion und vier Fraktionierungsschritte zur Aufreinigung notwendig. Die isolierten Produkte wurden in beiden Fällen mit MS (Bestimmung der Molekularmasse ohne Fragmentierung) und NMR charakterisiert. Es bleibt allerdings unklar, ob im ersten Fall die Oxidation tatsächlich durch Einwirkung der Enzymsuspension erfolgte bzw. welcher der bei der chemischen Oxidation angelegten Faktoren letztlich für die Reaktion verantwortlich war.

Verbindung (X) wurde ebenfalls nach der methanolischen Extraktion zerkleinerter Zwiebeln mit anschließender Säulenchromatographie und RP-HPLC (stationäre Phase: ODS; mobile Phase: Wasser, Acetonitril, Essigsäure ohne nähere Angaben) erhalten (Strukturauf-

klärung mittels NMR) [69]. Hirose et al. [69] vermuten eine radikalische Oxidation von Quercetin in den äußeren Zellen der Zwiebel als Schutzmechanismus gegen andere oxidative Schäden. Für (X) wird ein Gehalt von 383 mg/100 g in Zwiebeln angegeben [69], wobei allerdings die Konzentration des Edukts Quercetin in Zwiebeln durchschnittlich bei nur etwa 35 mg/100 g liegt [72]. Als ein Metabolit von Quercetin in Zellsuspensionen von Tabakpflanzen wurde auch Verbindung (X) vorgeschlagen, allerdings ohne jeden durch Messungen gestützten Hinweis darauf [70]. In keiner der Arbeiten, die sich mit dem Auftreten von oxidierten Flavonolen in Pflanzen beschäftigen, wurde die Rolle prooxidativer Kationen diskutiert. Ebenso fehlt die Auseinandersetzung damit, ob während der Aufarbeitung des Analysenmaterials Oxidationsreaktionen ablaufen können, die das Ergebnis zu verfälschen vermögen.

Eine weitere enzymatische Oxidation von Quercetin und Fisetin wurde vor kurzem von Jiménez et al. [73, 74] beschrieben. Bei der Umsetzung der Flavonole mit Polyphenoloxidase ist eine Veränderung ihrer UV/Vis-Spektren zu beobachten. Dieses Meßergebnis wurde als Anhaltspunkt dafür gesehen, daß das Polyphenol durch die Einwirkung des Enzyms oxidiert wurde. Eine weitergehende Charakterisierung der Oxidationsprodukte erfolgte allerdings nicht.

Der Überblick zeigt, daß bisher verschiedene Untersuchungen zur Oxidation von Flavonoiden durchgeführt wurden. Eine klare Aussage darüber, welche Reaktionen tatsächlich in biologischen Systemen zu welchen Produkten führen, kann daraus aber nicht abgeleitet werden. Zudem wurde in keinem der beschriebenen Fälle eine analytische Methode vorgestellt, die eine Untersuchung von verschiedenen Matrices auf das Vorkommen und den Gehalt an diesen oxidierten Flavonolen zulassen würde. Dies steht im deutlichen Gegensatz zu der Tatsache, daß die Analytik der Edukte der Oxidation, also der Flavonoide selbst, intensiv bearbeitet wurde.

#### 1.4.4 Chromatographische Analytik von Polyphenolen

Aufgrund des reichhaltigen Vorkommens von Polyphenolen in der Natur wurden zahlreiche Methoden zu ihrem Nachweis und ihrer Bestimmung entwickelt [24]. Bedingt durch die sehr unterschiedlichen Strukturen und Polaritäten der einzelnen Gruppen von Polyphenolen sind auch unterschiedliche Aufbereitungsverfahren und Chromatographiebedingungen beschrieben. Die wichtigste analytische Methode stellt heute die RP-HPLC mit UV- und Dioden-Array-Detektion dar. Zur strukturellen Absicherung werden mehr und mehr auch massenspektrometrische Detektoren eingesetzt [24, 75, 76].



Für die vorliegende Arbeit sind die Methoden zur Analytik der Flavonole und Flavone in Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs von besonderem Interesse. Von den hauptsächlich in Pflanzen vorkommenden Flavonolen und Flavonen sind über 50 verschiedene Glykoside beschrieben. Da aber nur wenige Referenzsubstanzen dieser Verbindungen kommerziell erhältlich sind, wird die direkte quantitative Analyse dieser Glykoside praktisch kaum durchgeführt<sup>1</sup>. Als eine Folge daraus ist es anerkannte Praxis, die Glykoside durch Säurehydrolyse zu spalten und die resultierenden Aglyka zu identifizieren und zu quantifizieren [30]. In einer ausführlichen Studie von Hertog et al. [72] zu dieser Thematik wurden systematisch unterschiedliche Hydrolysebedingungen für verschiedene Glykoside der wichtigsten Flavonole und Flavone untersucht. Die optimalen Bedingungen hingen dabei von der Art des untersuchten Pflanzenmaterials und den analysierten Flavonoiden ab. Bei längerer Extraktionszeit wurde beobachtet, daß aus den Glykosiden freigesetzte Flavonole, nicht aber Flavone, zum Teil wieder abgebaut werden. Es wurde daher vermutet, daß die Gegenwart unbekannter Verbindungen in der Probenmatrix den Abbau von Flavonoiden beschleunigt [72]. Angaben über die Art dieser Metaboliten wurden jedoch nicht gemacht.

Die beschriebenen chromatographischen Methoden beziehen sich aus den erwähnten Gründen auf die Trennung und Detektion der freien Flavonole und Flavone [72, 36, 37, 30]. Die verwendeten Eluenten enthielten als organischen Modifier entweder Methanol oder Acetonitril. Als wäßriger Bestandteil wurden Wasser, wäßrige Lösungen von Essigsäure, Ameisensäure, Trifluoressigsäure, Phosphorsäure sowie Phosphat-, Citrat- oder Acetatpuffer vorgeschlagen. Die pH-Werte der Eluenten lagen zwischen 2,4 und 4,0 [24, 72, 36, 37, 30, 76].

## 1.5 Strategie und verwendete analytische Methoden

### 1.5.1 Vorgehensweise

Die Reaktionen der Polyphenole mit den Kationen sollten in der vorliegenden Arbeit unter HPLC-Bedingungen untersucht werden. Dadurch sollte es möglich sein, erstens den Einfluß der Analysenmethode auf die ablaufenden Reaktionen genauer zu studieren und zweitens leistungsfähige chromatographische Verfahren zur Analytik der Reaktionsprodukte zu entwickeln. An dieser Stelle soll ein Überblick darüber gegeben werden, mit welchen Methoden die gestellten Ziele erreicht wurden, um so den Weg der im Ergebnisteil präsentierten Untersuchungen vorzuzeichnen.

---

<sup>1</sup>Kürzlich wurde allerdings von Häkkinen und Auriola [76] eine HPLC-Methode mit massenspektroskopischer Detektion und Identifizierung von Flavonoid-Glykosiden in Beerenfrüchten beschrieben.

Zunächst wurde mit photometrischen Methoden systematisch untersucht, unter welchen Bedingungen eine Komplexbildung oder Redoxreaktion zwischen mutmaßlichen Liganden und Zentralionen zu beobachten ist. Dabei wurde aufgeklärt, welchen Einfluß der verwendete organische Modifier auf den Ablauf der Reaktionen hat. Unter bestimmten Bedingungen war erkennbar, daß dabei einer Komplexbildung eine Oxidation des Polyphenols folgt. Darauf aufbauend wurde eine HPLC-Methode entwickelt, die es möglich machte, die Reaktionsgemische, die hohe Konzentrationen der eingesetzten Kationen enthielten, zu chromatographieren und die Oxidationsprodukte näher zu charakterisieren. So wurde die Basis gelegt für die leistungsfähige Analytik der oxidierten Polyphenole.

Zur Strukturaufklärung wurden diese Oxidationsprodukte im mg-Maßstab synthetisiert. Mit diesen Referenzsubstanzen konnte anschließend durch Anwendung ein- und zweidimensionaler NMR-Techniken die Struktur der entstandenen Verbindungen uneindeutig bestimmt werden. Darauf aufbauend wurden verschiedene massenspektrometrische Verfahren entwickelt, die einen selektiven Nachweis der Verbindungen erstmals ermöglichten.

Da zu erwarten ist, daß die oxidierten Polyphenole auch in natürlichen Matrices vorkommen, war es notwendig chromatographische Verfahren für deren Trennung zu entwickeln. Dazu wurden mehrere HPLC-Säulen getestet und zwei Chromatographien entwickelt, die das Arbeiten bei verschiedenen Flußraten erlauben. Zur Detektion wurde neben Wellenlängendetektoren auch ein elektrochemischer Detektor sowie ein Massenspektrometer eingesetzt.

Die HPLC-Methoden wurden in Verbindung mit einer ebenfalls neu entwickelten Festphasenextraktion am Beispiel der Zwiebel eingesetzt, um erste Aussagen über das Vorkommen der oxidierten Polyphenole in natürlichen Matrices treffen zu können.

### 1.5.2 Wahl der Reaktions- und Chromatographie-Bedingungen

Da die Chromatographie der Reaktionsprodukte im Mittelpunkt stand, wurden die Reaktionen der Referenzsubstanzen in gängigen HPLC-Eluenten durchgeführt. Als organische Modifier wurden Acetonitril und Methanol eingesetzt. Da sowohl für eine Komplexbildung, als auch für eine Redoxreaktion die Abspaltung von Protonen aus den Phenolen entscheidend sein kann, wurden die Messungen bei zwei verschiedenen pH-Werten durchgeführt, wie sie für die HPLC üblich sind. Die Einstellung der pH-Werte erfolgte durch Zusatz von Essigsäure auf pH 2,5 bzw. von Ammoniumacetat/Essigsäure auf pH 4,0. Die Zusätze wurden ausgewählt, da sie erstens aufgrund ihrer Flüchtigkeit auch für den Einsatz bei massenspektrometrischen Messungen geeignet sind [77, 78] und zweitens im Gegensatz

zu anderen gängigen Puffersubstanzen wie Phosphat und Citrat mit den Kationen keine Komplexe oder schwerlösliche Salze bilden [58, 79].

### 1.5.3 Geeignete Detektionstechniken

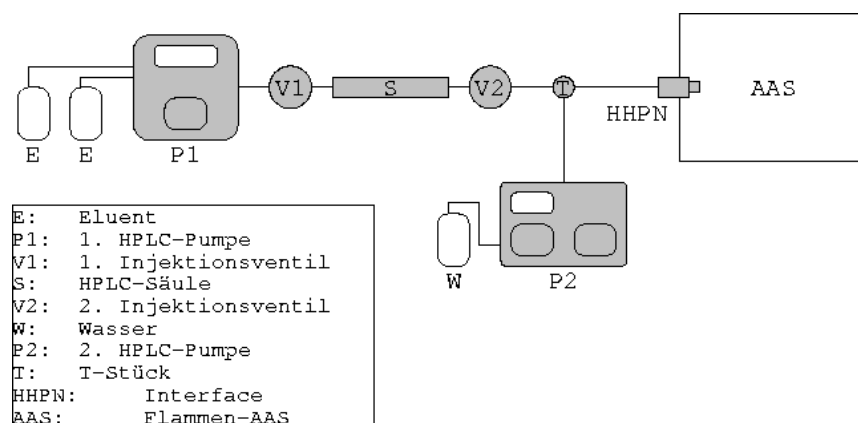
#### 1.5.3.1 Einleitung

Die chromatographische Untersuchung von Produkten der Reaktion von Polyphenolen mit verschiedenen Kationen stand im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit. Zur Absicherung der erzielten Ergebnisse ist es im Rahmen der Spezies-Analytik zwingend notwendig, sich ergänzende Detektionsverfahren einzusetzen, die sowohl eine Erfassung der Zentralionen, als auch der Liganden zulassen [14, 15, 80, 81]. Darüberhinaus erfordert auch die Untersuchung von Oxidationprodukten der Polyphenole in natürlichen Matrices die Anwendung unterschiedlicher selektiver Detektoren. Neben den üblicherweise verwendeten Wellenlängendetektoren kamen daher zusätzlich die Fluoreszenz-, elektrochemische, atomabsorptionsspektrometrische und massenspektrometrische Detektion zum Einsatz. Die Funktionsweise der beiden letztgenannten Verfahren soll an dieser Stelle genauer erläutert werden.

#### 1.5.3.2 Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)

Zur metallspezifischen Detektion nach der HPLC wurden verschiedene atomspektroskopische Verfahren beschrieben. Dazu zählen zum einen atomabsorptionsspektroskopische (Flammen-AAS, elektrothermale AAS, Kaltdampf-AAS), zum anderen Atomemissions- (ICP-AES) und massenspektrometrische (ICP-MS) Techniken [14, 15, 80]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kam eine Kopplung zwischen HPLC und Flammen-AAS zu Einsatz. Dazu wurde ein Hydraulic High Pressure Nebulization (HHPN) Interface verwendet, das im Vergleich zu konventionellen Verneblern eine deutlich höhere Aerosolausbeute und damit eine um etwa den Faktor zehn höhere Nachweisempfindlichkeit ermöglicht [82, 79].

In dem aus Titan gefertigten Interface wird der HPLC-Eluent durch ein Düsenplättchen mit einer Lochgröße von 10-30  $\mu\text{m}$  gedrückt. Der daraus resultierende feine Strahl trifft auf den in der Mischkammer des AAS vorhandenen Prallkopf, so daß ein feiner Nebel entsteht, der mit den Brenngasen in die Flamme gelangt. Die gemessene Signalintensität des untersuchten Metalls hängt dabei stark von der Flußgeschwindigkeit des Eluenten ab, da bei höherem Volumenfluß eine höhere Ausbeute an feinen Tröpfchen resultiert [82]. Diese hohen Flußraten sind aber nicht notwendigerweise kompatibel zu der erwünschten Trennleistung



**Abbildung 1.6:** Schematischer Aufbau des verwendeten HPLC-AAS-Systems.

und dem verwendeten Säulenmaterial. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher zwischen der HPLC-Säule und dem HHPN-Interface mit einer zweiten HPLC-Pumpe über ein T-Stück zusätzlich Wasser zum Eluenten zugepumpt und so die Flußrate in das Interface gesteigert (Abb. 1.6). Die Kalibrierung des AAS erfolgte über ein zweites Injektionsventil hinter der HPLC-Säule. So konnte das Ausmaß der Absorption von Kationen auf der Säule quantitativ untersucht werden.

### 1.5.3.3 Massenspektrometrie (MS)

Zur massenspektrometrischen Strukturaufklärung werden klassischerweise die Elektronenstoß-Ionisation (electron impact ionization: EI) und Chemische Ionisation (chemical ionization: CI) in Kombination mit Quadrupol-MS verwendet. Erstere führt in der Regel zu einer starken Fragmentierung der Analyten und liefert charakteristische Spektren, die mit denen aus Referenzbibliotheken verglichen werden können. Im Gegensatz dazu ermöglicht die sanftere CI (z.B. mit Methan als Reaktandgas) oft eine Bestimmung von Molekularmassen bei nur schwacher Fragmentierung. Die Zufuhr der Analyten in die jeweilige Ionenquelle erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit über ein Particle Beam Interface (PBI). Darin wird der HPLC-Eluent mit Helium fein vernebelt, die flüchtigen Bestandteile bei erhöhter Temperatur und reduziertem Druck in die Gasphase überführt und abgepumpt. Nicht-flüchtige Komponenten werden in einem feinen Strahl als ungeladene Teilchen (particle beam) in Richtung der Ionenquelle beschleunigt, wo sie gleichzeitig ionisiert und fragmentiert werden. Die Anwendbarkeit dieses Systems ist durch die Flüchtigkeit der Eluenten (je niedriger der Siedepunkt desto besser), die Polarität der Analyten (je unpolarer desto besser) und die Flußrate (je niedriger desto besser) begrenzt [77, 78].

Seit etwa zwei Jahren steht mit dem "LCQ" der Firma Finnigan ein neuartiges Ionenfallen (ion trap)-MS zur Verfügung. Die im Interface entstehenden Analyt-Ionen werden eingefangen und durch elektromagnetische Felder auf kleinem Raum gesammelt. Nach dieser Anreicherung, die eine hohe Empfindlichkeit gewährleistet, können sie massenselektiv detektiert und so die Molekularmasse bestimmt werden. Zusätzlich kann eine Strukturinformation gewonnen werden durch mehrfaches sequentielles Auswählen von Ionen, deren Massenspektrum durch anschließende Fragmentierung in der Ionenfalle erzeugt wird ( $MS^n$ ). Diese sanfte Erzeugung von Bruchstücken kann dann auch zur selektiven Detektion nach HPLC-Trennung herangezogen werden. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Techniken werden hier die Ionen bereits im Interface erzeugt. In der verwendeten ESI-Quelle (electrospray ionization) wird der Eluent unter Anlegung eines Potentials von etwa 3 kV bei Atmosphärendruck aus einer Kapillare fein vernebelt. Analytmoleküle können dabei je nach Polung des Potentials in einer Gasphasenreaktion Protonen aufnehmen ( $[M+H]^+$ ) oder abgeben ( $[M-H]^-$ ). Die so entstandenen Ionen werden in Richtung der Ionenfalle beschleunigt, während der Eluent abgepumpt wird. Niedrige Flußraten sind für die wandfreie Funktion des Interface zwingend erforderlich [78].

Die Analyten können entweder über eine vorgeschaltete HPLC-Pumpe oder die im Gerät eingebaute Spritzenpumpe zugeführt werden. Letztere erlaubt das kontinuierliche Einbringen von Referenzlösungen zur Optimierung der Meßparameter und zur Erzeugung von Referenzspektren.

Aufgrund der wesentlich verschiedenen Ionisierungs- und Fragmentierungstechniken können Ergebnisse, die mit EI/CI-Quellen erzielt werden, nicht auf die mit ESI-ion trap-Quellen übertragen werden. Für die Anwendung der jeweiligen Geräte zur massenspektrometrischen Detektion nach der HPLC muß also in jedem Falle zunächst das charakteristische Fragmentierungsverhalten der zu untersuchenden Verbindungen einzeln untersucht werden [78].



# Kapitel 2

## Ergebnisse und Diskussion

### 2.1 Spektroskopische Verfolgung der Reaktionen

#### 2.1.1 Einleitung

Als Basis für die chromatographischen Untersuchungen von Produkten aus Polyphenolen und Kationen mußte zunächst aufgeklärt werden, welche strukturellen Voraussetzungen für eine Komplexbildung oder eine Redoxreaktion notwendig sind und welchen Einfluß die zur Analytik verwendeten Lösungsmittel auf die Reaktionen haben. Photometrische Methoden erlauben dabei schnelle Messungen, die aussagekräftige Ergebnisse liefern.

Die Veränderungen, die die UV/Vis-Spektren der Polyphenole durch den Zusatz von  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  und  $\text{Fe}^{2+}$  erfahren, wurden in wäßrigen HPLC-Eluenten untersucht. Als organische Modifier wurden Acetonitril und Methanol verwendet, weil sie die wichtigsten organischen Bestandteile der bisher beschriebenen Eluenten für die HPLC von Polyphenolen und Polyphenol-Metall-Komplexen sind. Um eine genauere Aussage über den Einfluß des Alkohols auf die Reaktionen machen zu können, wurde zusätzlich Ethanol eingesetzt. Die Anteile der Lösungsmittel in den Reaktionslösungen wurden dabei zwischen 3 % und 100 % variiert.<sup>1</sup>

Um quantitative Zusammenhänge abschätzen zu können, wurden die molaren Verhältnisse zwischen Kationen und Polyphenolen über einen Bereich von 1:16 bis 5:1 variiert. Dies sind im Vergleich zu Konzentrationsverhältnissen in natürlichen Matrices deutlich überhöhte Metallanteile. So konnte aber festgestellt werden, welche relativen Mengen der

---

<sup>1</sup>Da später mit Eluenten aus Acetonitril und wäßriger Essigsäure gearbeitet wurde, beziehen sich die Aussagen über strukturelle Einflüsse der jeweiligen Polyphenole zunächst auf dementsprechende Lösungen.

jeweiligen Kationen erforderlich sind, um die Polyphenole vollständig als Liganden im Komplex zu binden oder vollständig zu oxidieren.

Anschließend wurden  $\text{Al}^{3+}$ -Komplexe von Flavonolen unter exakt den Bedingungen untersucht, unter denen deutliche Reaktionen der Polyphenole mit Eisen- und Kupfer-ionen zu erkennen waren. Dies diente der Verfolgung zweier Ziele. Erstens galt es zu klären, ob sich unter diesen Analysenbedingungen die für Flavonole beschriebenen fluoreszierenden  $\text{Al}^{3+}$ -Komplexe ebenfalls bilden. Darauf aufbauend war es später möglich, diese Komplexe chromatographisch zu untersuchen, um Säulenmaterial auf seine Eignung für die Spezies-Analytik hin zu testen. Zweitens sollten die Versuche mit  $\text{Al}^{3+}$  erste Hinweise darauf geben, welche strukturellen Veränderungen die Polyphenole durch die Reaktion mit  $\text{Fe}^{3+/2+}$  oder  $\text{Cu}^{2+}$  erfahren hatten. Auswirkungen auf die Fluoreszenz-Aktivität der  $\text{Al}^{3+}$ -Komplexe durch  $\text{Fe}^{3+/2+}$  oder  $\text{Cu}^{2+}$  sind dabei zum einen durch Konkurrenz um die koordinativen Bindungsstellen des Liganden, zum anderen durch dessen Oxidation denkbar.

## 2.1.2 UV/Vis-Photometrie

### 2.1.2.1 Reaktionen mit $\text{Fe}^{3+}$ und $\text{Fe}^{2+}$

**Einfluß der Struktur des Polyphenols** Das UV/Vis-Spektrum von 3-Hydroxyflavon erfährt bei Zugabe von  $\text{Fe}^{3+}$  einen bathochromen Shift des Maximums um 55 nm von 350 nm nach 405 nm (Abb. 2.1). Die gelbe Farbe der Lösung veränderte sich auch während mehrtägigem Stehenlassen nicht. Unter gleichen Bedingungen führte die Reaktion zwischen  $\text{Fe}^{3+}$  und 1,2-Dimethyl-3-hydroxy-4-pyridon (Abb. 2.2), das als Chelatbildner für  $\text{Fe}^{3+}$  *in vivo* eingesetzt wird [19, 83, 84, 85], ebenfalls zu einer stabil hellrosa gefärbten Lösung. Durch die Analogie zwischen den chemischen Strukturen der Liganden läßt sich schließen, daß auch 3-Hydroxyflavon durch die 3-Hydroxy-4-keto-Funktion des Aromaten dreiwertiges Eisen in einem stabilen Komplex binden kann. Diese Vermutung wurde dadurch bestätigt, daß sich das Spektrum von Flavonol-3-methylether durch Zugabe von  $\text{Fe}^{3+}$  nicht veränderte. Die Abspaltung des alkoholischen Protons der 3-OH-Gruppe ist dementsprechend für die Komplexbildung zwingend notwendig. Da die Veretherung dies verhindert, kann geschlossen werden, daß 3-Glykoside von Flavonolen ebenfalls kein  $\text{Fe}^{3+}$  an Bindungsstelle C binden.

Bei den Flavonen Apigenin und Luteolin, die über die Bindungsstelle A, nicht aber C verfügen (Abb. 1.4, S. 20), konnte keine deutliche Veränderung der Spektren beobachtet werden (Abb. 2.3). Eine stabile Koordination von  $\text{Fe}^{3+}$  über die 4-Keto und 5-Hydroxy-



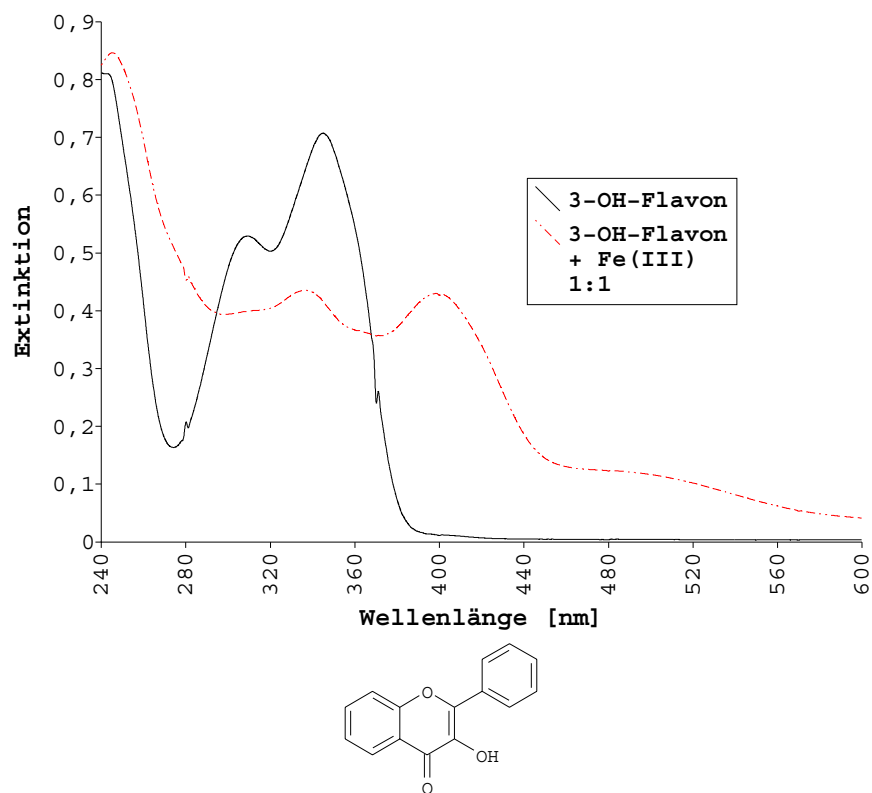


Abbildung 2.1: Veränderung des UV/Vis-Spektrums von 3-Hydroxyflavon durch Zugabe von  $\text{Fe}^{3+}$  (molares Verhältnis 1:1, Reaktionszeit 15 min.).

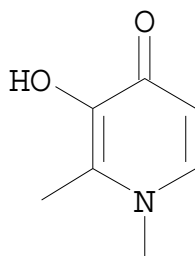
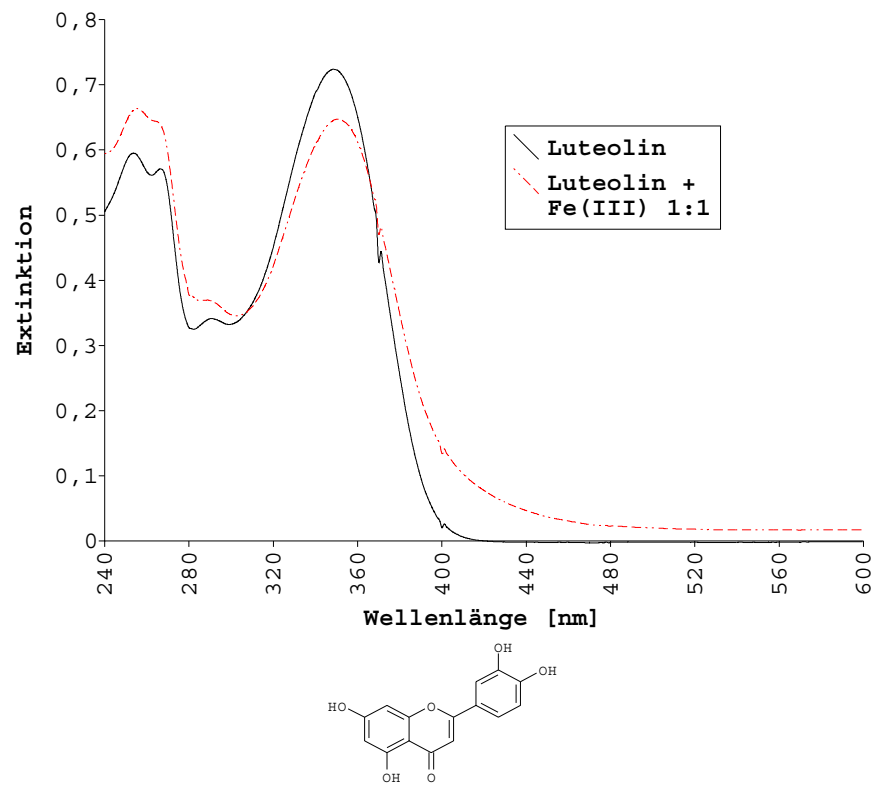
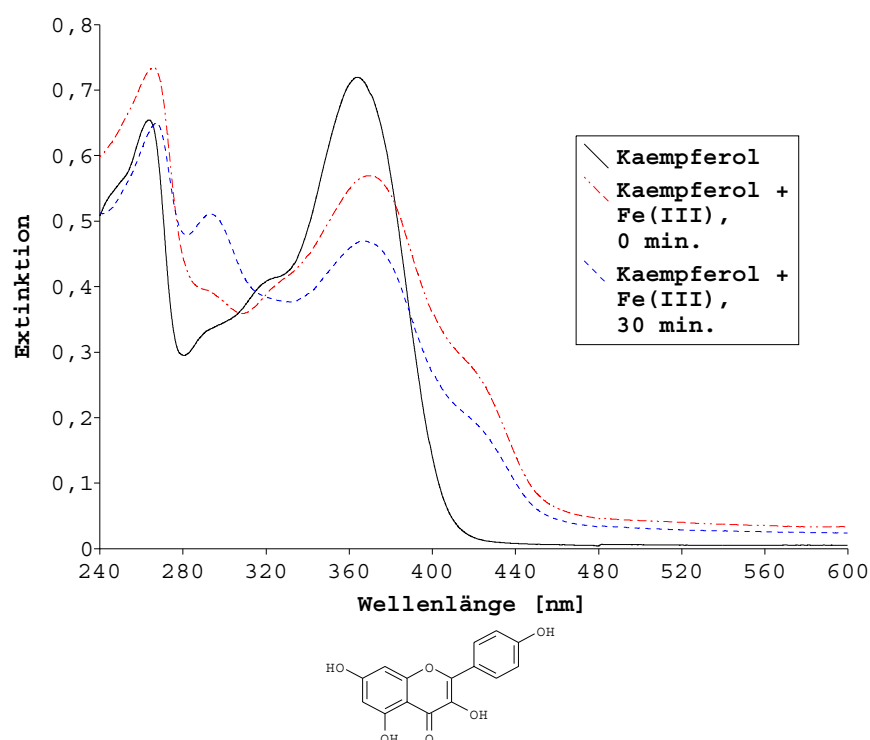


Abbildung 2.2: Struktur von 1,2-Dimethyl-3-hydroxy-4-pyridon, das zu therapeutischen Zwecken als Chelatligand für  $\text{Fe}^{3+}$  *in vivo* eingesetzt wird.



**Abbildung 2.3:** Veränderung des UV/Vis-Spektrums von Luteolin durch Zugabe von  $\text{Fe}^{3+}$  (molares Verhältnis 1:1, Reaktionszeit 15 min).

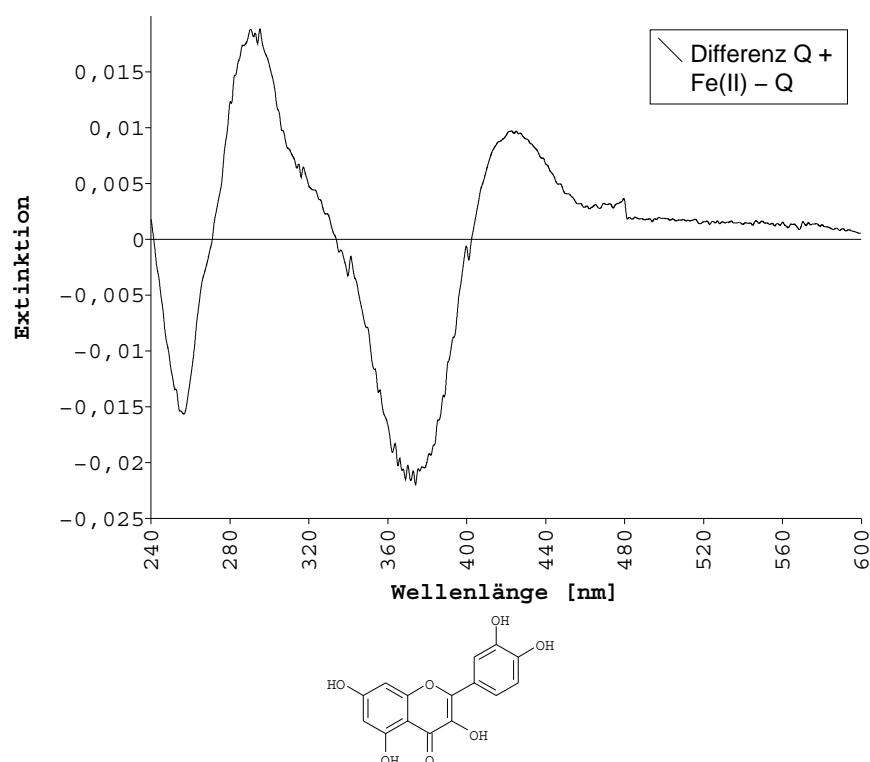


**Abbildung 2.4:** Veränderung des UV/Vis-Spektrums von Kaempferol durch Zugabe von  $\text{Fe}^{3+}$  (molares Verhältnis 1:1): Einfluß der Reaktionszeit.

Gruppe ist also unter den gewählten Bedingungen ausgeschlossen. Die leichte Zunahme der Absorption oberhalb 400 nm bei der Zugabe von  $\text{Fe}^{3+}$  zu Luteolin rührte wahrscheinlich daher, daß an der Bindungsstelle B (*o*-Diphenol) eine Komplexierung oder Oxidation ablaufen konnte.

Eine im Vergleich dazu deutlich stärkere Veränderung der Spektren war bei den untersuchten Flavonolen (Quercetin, Kaempferol, Morin, Fisetin, Myricetin) zu erkennen. Im Gegensatz zum 3-Hydroxyflavon selbst, das wegen des Fehlens zusätzlicher Substituenten nach der Komplexierung keine weiteren Reaktionen eingehen kann, waren bei den Hydroxy-substituierten Flavonolen zwei Veränderungen in den Spektren erkennbar. Die Zugabe von  $\text{Fe}^{3+}$  führte zunächst ebenfalls zu einer Vertiefung der Farbe, die aber nicht stabil bestehen blieb. Die Absorption in den Maxima des freien Flavonols (um 370 nm) und des Komplexes (um 420 nm) fiel innerhalb von etwa 15 min auf null ab. Gleichzeitig war ein Anstieg der Absorption bei einer Wellenlänge um 290 nm zu beobachten (Abb. 2.4). Dieses Verhalten war bei Quercetin-3-methylether nicht zu beobachten, da wiederum kein Proton von der 3-OH-Gruppe zur Verfügung stand.

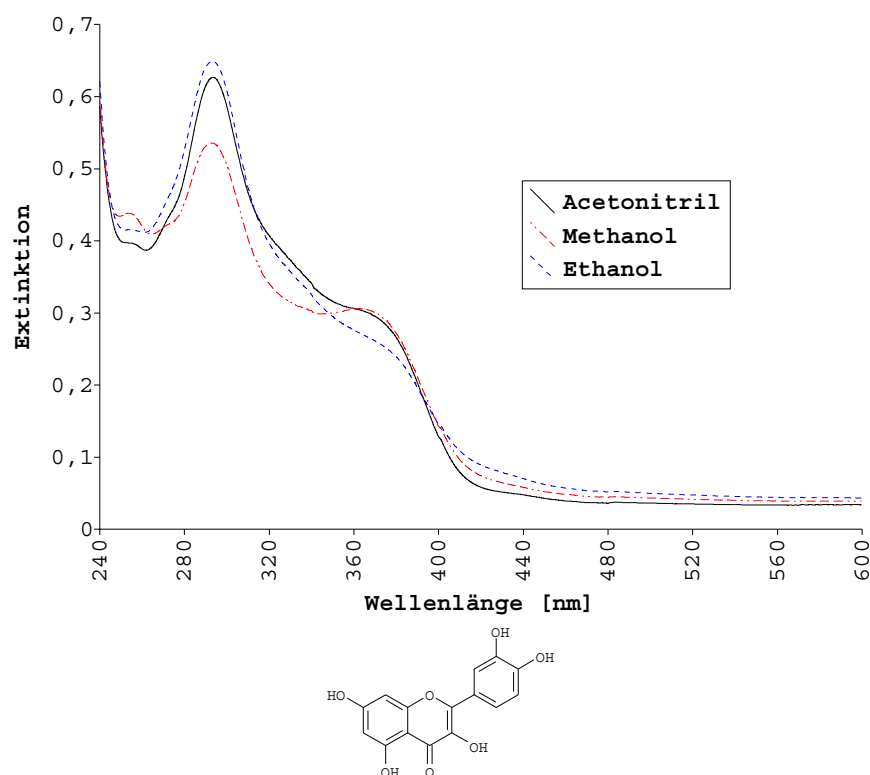
Die Zugabe von  $\text{Fe}^{2+}$  bewirkte bei keiner der untersuchten Verbindungen eine unmittel-



**Abbildung 2.5:** Differenz der UV/Vis-Spektren von Quercetin mit und ohne Zugabe von  $\text{Fe}^{2+}$  (molares Verhältnis 1:5, Reaktionszeit 36 h).

telbare Veränderung der UV/Vis-Spektren. Erst nach mehrstündiger Verzögerung war bei den Flavonolen eine schwach ausgeprägte Farbvertiefung analog der oben für  $\text{Fe}^{3+}$  beschriebenen zu beobachten. In den Spektren schlug sich dies nur marginal wieder: durch die Berechnung von Differenzspektren zwischen den Lösungen ohne und mit  $\text{Fe}^{2+}$ -Addition ließ sich allerdings erkennen, daß auch hier die Absorption im Bereich von 420 nm und 290 nm zunahm, während sie im Bereich von 370 nm sank (Abb. 2.5). Wie an den Absorptionswerten zu erkennen, waren diese Änderungen aber nur schwach ausgeprägt. Dieses Verhalten kann damit erklärt werden, daß  $\text{Fe}^{2+}$  durch in den Lösungen vorhandenen Luftsauerstoff zu einem geringen Anteil zunächst zu  $\text{Fe}^{3+}$  oxidiert wird, welches dann entsprechend weiter reagieren kann. Konsequenterweise muß angenommen werden, daß generell auch  $\text{Fe}^{2+}$  Einfluß auf die Flavonole nehmen kann, sofern es in dem jeweiligen Medium oxidierbar ist.

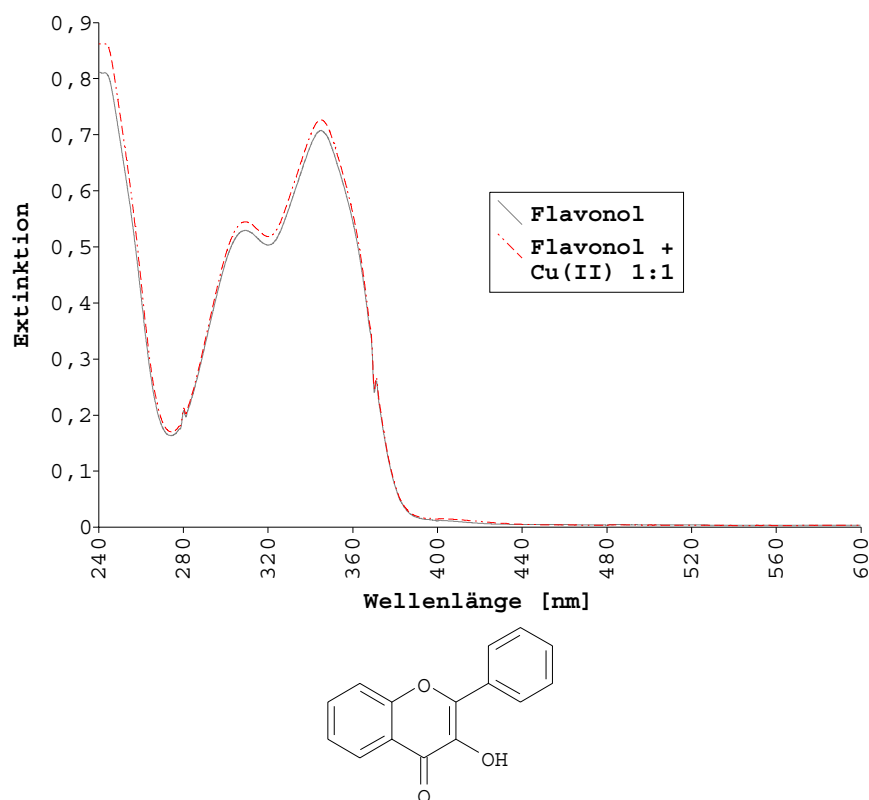
**Einfluß des organischen Modifiers** Die Reaktionen von  $\text{Fe}^{3+}$  mit Flavonolen wurden zusätzlich in alkoholisch/wäßriger Lösung untersucht. Hierbei war zu erkennen, daß unabhängig vom organischen Modifier ebenfalls ein neues Maximum im Bereich von 290 nm



**Abbildung 2.6:** Veränderung des UV/Vis-Spektrums von Quercetin durch Zugabe von  $\text{Fe}^{3+}$  (molares Verhältnis 1:1, Reaktionszeit: 15 min): Einfluß des organischen Lösungsmittels.

auftrat. Gleichzeitig nahm die Absorption im Maximums des jeweiligen Flavonols ab, wie am Beispiel des Quercetin in Abbildung 2.6 dargestellt ist. Unterschiede in den Geschwindigkeiten der Umsetzung waren nicht zu beobachten, allerdings waren die Lösungen vorübergehend gelb gefärbt. Diese im Vergleich zu den acetonitrilhaltigen Lösungen andere Farbe kann nur auf eine Beteiligung von Lösungsmittelmolekülen an den Komplexen zurückgeführt werden.

**Konzentrationsabhängigkeit** Eine vollständige Abnahme der Absorption bei 370 nm auf null war bei einem Konzentrationsverhältnis Flavonol/ $\text{Fe}^{3+}$  von 1:1,2 zu beobachten. Die Bedeutung dieser vollständigen Umsetzung des Flavonols bei einem leichten molaren Überschuß von  $\text{Fe}^{3+}$  wird weiter unten (s. 2.4, S. 91) zusammenfassend diskutiert.



**Abbildung 2.7:** Veränderung des UV/Vis-Spektrums von 3-Hydroxyflavon durch Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  (molares Verhältnis 1:1, Reaktionszeit 15 min).

### 2.1.2.2 Reaktionen mit $\text{Cu}^{2+}$

**Einfluß der Struktur des Polyphenols** Die koordinative Bindung von  $\text{Cu}^{2+}$  an 3-Hydroxyflavon wurde als stark abhängig vom Lösungsmittel und vorhandenen Kolliganden beschrieben [86]. Unter den hier untersuchten Bedingungen wurde eine spektrale Veränderung weder von 3-Hydroxyflavon, noch von 1,2-Dimethyl-3-hydroxy-4-pyridon (Abb. 2.2, S. 37) durch Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  beobachtet. Eine stabile Komplexbildung über OH-3 und CO-4 bei Fehlen weiterer Substituenten kann also ausgeschlossen werden (Abb. 2.7).

Im Gegensatz dazu war bei allen Hydroxyflavonolen eine deutliche Zunahme der Extinktion im Bereich von 290 nm zu beobachten, die nach Zugabe der  $\text{Cu}^{2+}$ -Lösung im Laufe der Reaktionszeit in etwa logarithmisch anstieg (Abb. 2.8). Bei den Flavonolen, die im B-Ring an 3' und 4' mit OH-Gruppen substituiert sind (Quercetin, Fisetin, Myricetin), trat unmittelbar nach dem Vermischen der Lösungen eine intensive violette Färbung auf. Diese Farbe nahm im Laufe der Zeit kontinuierlich wieder ab, während die Extinktion bei etwa 290 nm dementsprechend stieg (Abb. 2.9). Eine derartige Färbung wurde vor kur-

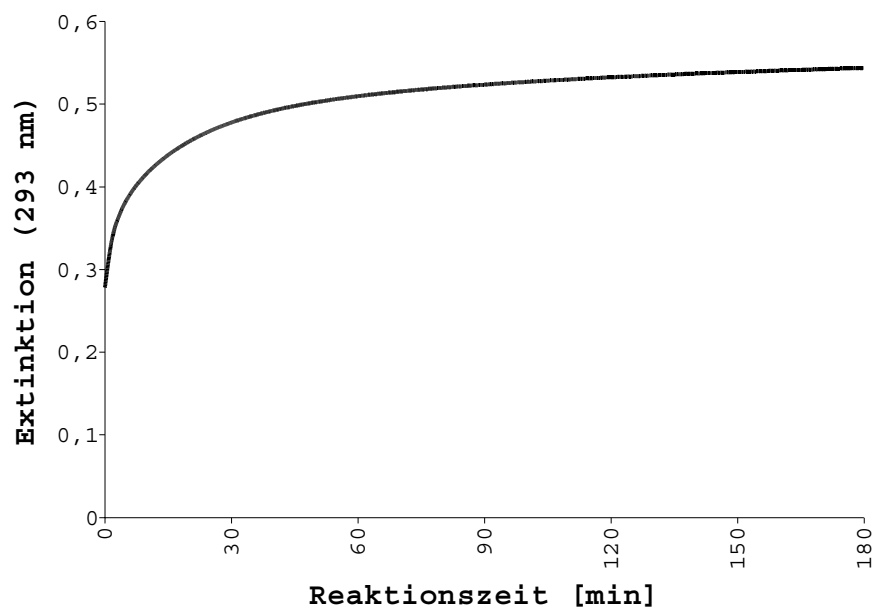


Abbildung 2.8: Zunahme der Extinktion bei 293 nm nach Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  zu einer Lösung von Quercetin ( $c(\text{Q})=10 \mu\text{g}/\text{mL}$ , molares Verhältnis 1:1).

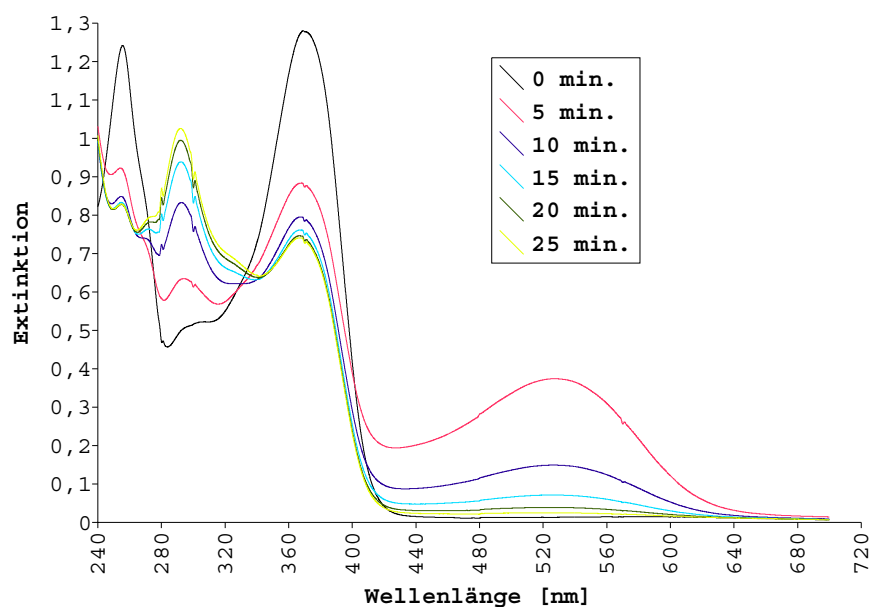


Abbildung 2.9: Zeitabhängige Veränderung des UV/Vis-Spektrums von Quercetin durch Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  (molares Verhältnis 1:1, Acetonitril-haltige Lösung).

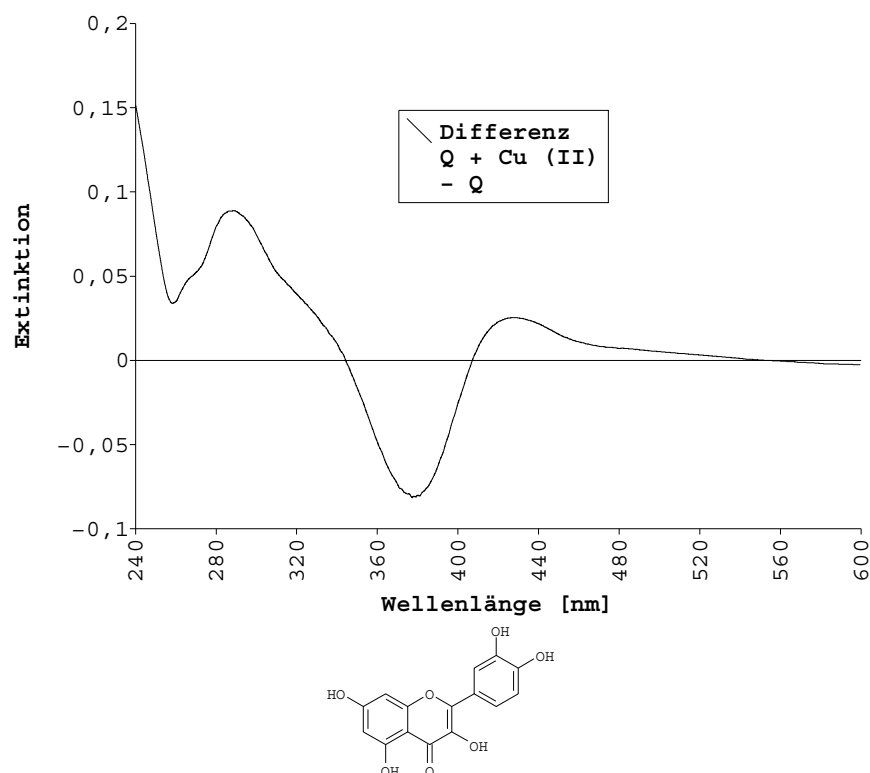
zem auch für die elektrochemische Oxidation von Quercetin, nicht aber von Kaempferol, in Acetonitril beschrieben [67]. Der mögliche Reaktionsverlauf, der diese Farbveränderung erklären kann, wird im Anschluß an die Strukturaufklärung der hier entstandenen Oxidationsprodukte weiter unten (s. 2.4, S. 91) diskutiert. Um aber zunächst die Bedeutung der *o*-diphenolischen Gruppe für Komplexbildung und Redoxreaktion genauer eingrenzen zu können, wurden zusätzlich Versuche mit vier weiteren Phenolen durchgeführt.

Dies war zum einen das Flavanol Catechin (Bindungsstelle B), zum anderen die monozyklischen Phenole Brenzcatechin, Thymol und *p*-Cymen-2,3-diol. Das Spektrum des Monophenols Thymol wurde erwartungsgemäß durch  $\text{Cu}^{2+}$  nicht verändert. Die Messungen der anderen Phenole aber zeigten, daß allein das Vorhandensein der *o*-diphenolischen Gruppe nicht ausreichte für eine meßbare Reaktion mit  $\text{Cu}^{2+}$ . Das UV/Vis-Spektrum von Brenzcatechin änderte sich nach Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  nicht, während beim Spektrum von *p*-Cymen-2,3-diol eine Abnahme der Extinktion im Maximum des freien Phenols bei 273 nm bei gleichzeitiger Zunahme der Extinktion bei etwa 440 nm beobachtet wurde. Im Gegensatz dazu war bei Catechin durch Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  ein Anstieg der Absorption bei 252 nm zu erkennen, während im Maximum des freien Catechins bei 280 nm die Extinktion unverändert blieb. Ein durchgängiges Muster ließ sich in diesen Veränderungen demnach nicht erkennen.

Diese Ergebnisse zeigten sehr deutlich, daß die Substituenten des *o*-Diphenols einen großen Einfluß auf dessen Fähigkeit zur Komplexbildung bzw. auf möglicherweise ablaufende Redoxreaktionen haben. Damit wurde bestätigt, daß für die Untersuchung von Komplexierungen die isolierte Betrachtung einzelner Bindungsstellen nicht sinnvoll ist. In Bezug auf die untersuchten 3',4'-Dihydroxyflavonole (Quercetin, Fisetin, Myricetin) konnte daraus der Schluß gezogen werden, daß die 3-Hydroxy-4-keto-Funktion und der *o*-diphenolische B-Ring sich wechselseitig beeinflussen können. Eine verlässliche Aussage darüber, ob die vorgeschlagene Bindungsstelle B unter den gewählten Bedingungen tatsächlich  $\text{Cu}^{2+}$  binden kann, kann aber nicht abgeleitet werden.

**Einfluß des organischen Modifiers** Bei der Reaktion der Flavonole mit  $\text{Cu}^{2+}$  spielte im Gegensatz zu den erwähnten Reaktionen mit  $\text{Fe}^{3+}$  das verwendete Lösungsmittel eine deutlich stärkere Rolle. Die Zunahme der Absorption bei 293 nm ließ sich in der oben beschriebenen Geschwindigkeit nur in acetonitrilhaltiger Lösung beobachten. Bei der Verwendung von Ethanol oder Methanol führte die Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  zu den Flavonolen zunächst zu einer Gelbfärbung der Lösung. Mit dem Abklingen dieser Farbe war dann aber



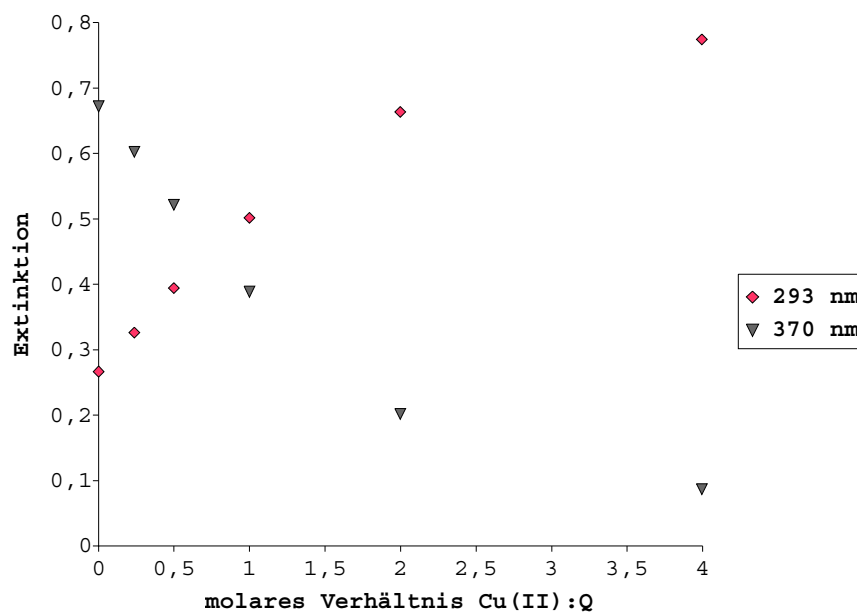


**Abbildung 2.10:** Differenz der UV/Vis-Spektren von Quercetin mit und ohne Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  in ethanolisch wässriger Lösung (molares Verhältnis 1:5, Reaktionszeit 24 h).

ebenfalls eine Veränderung des UV/Vis-Spektrums analog der oben beschriebenen verbunden, die allerdings wesentlich schwächer ausgeprägt war (Abb. 2.10). Die Reaktion verlief in ethanolischer Lösung schneller als in methanolischer, wie auch Utaka und Takeda für die Umsetzung von Quercetin mit  $\text{Cu}^{2+}$  in wasserfreien Alkoholen angegeben haben [48]. Wie schon bei  $\text{Fe}^{3+}$  erläutert, scheint es eine Beteiligung von Lösungsmittelmolekülen an der Komplexbildung zu geben, die durch die Affinität der Zentralionen zu einem freien Elektronenpaar des Sauerstoffatoms der Alkohole zu erklären ist.

Eine Senkung des Anteils an Acetonitril in den Lösungen bei gleichzeitiger Erhöhung des Wasseranteils beeinflusste deutlich die Reaktionsgeschwindigkeit. Nach einer Reaktionszeit von 15 min war noch keine spektrale Veränderung festzustellen. Nach 24-stündigem Stehenlassen der Lösung bei Raumtemperatur war jedoch wie bei einer höheren Acetonitril-Konzentration eine vollständige Umsetzung zu dem Produkt zu beobachten.

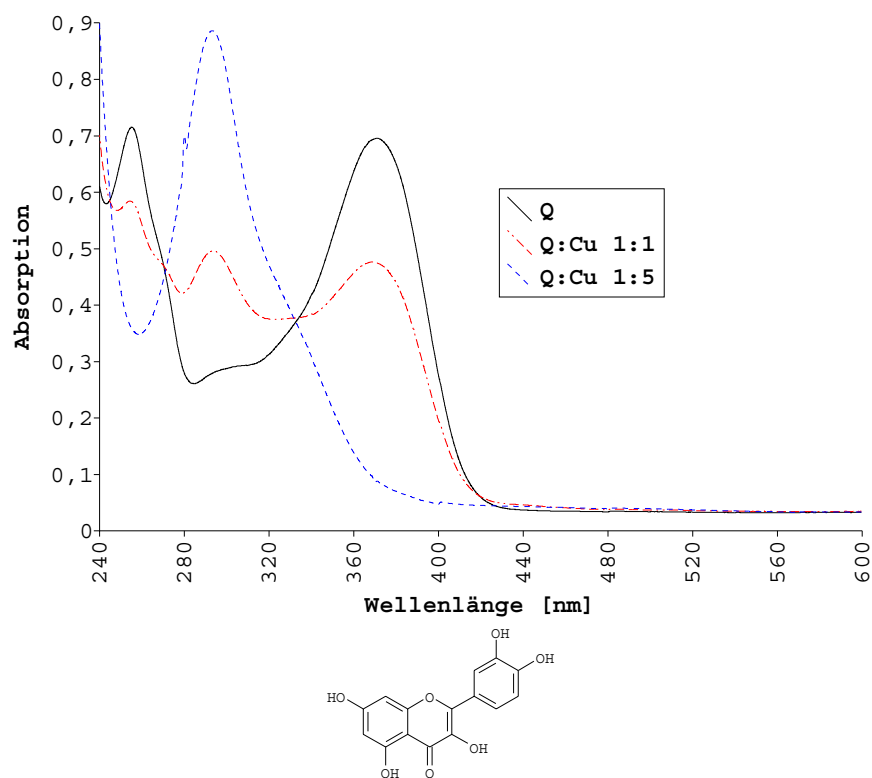
Bei den 3',4'-Dihydroxyflavonolen Quercetin, Fisetin und Myricetin konnte im Verlauf der Reaktion eine rotviolett gefärbte Zwischenstufe beobachtet werden (s. 2.1.2.2, S. 42). Diese trat nur dann auf, wenn sowohl Acetonitril, als auch Wasser in den Lösungen vorhan-



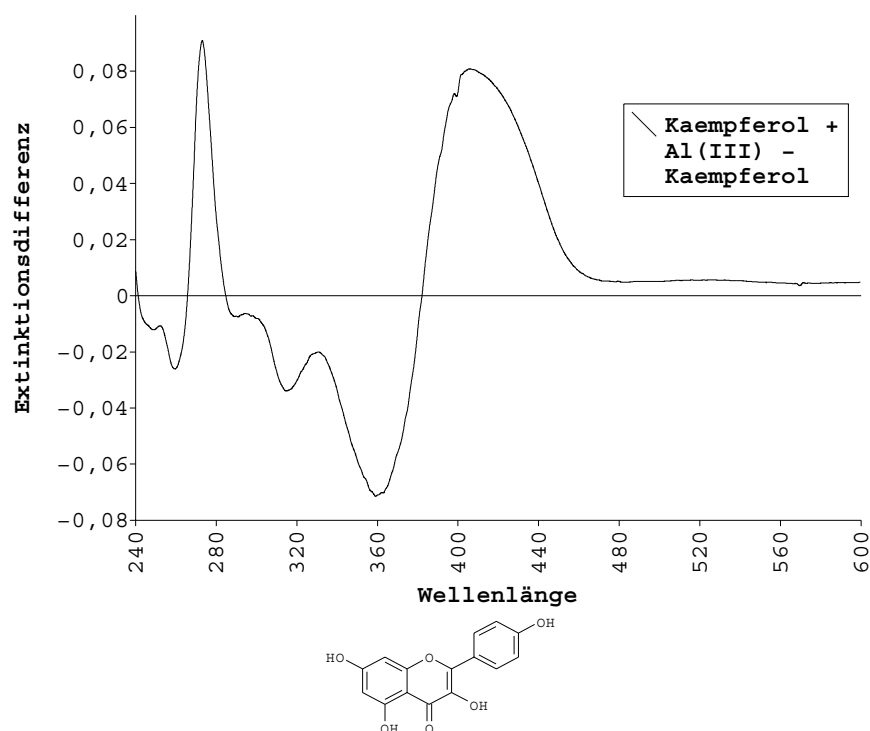
**Abbildung 2.11:** Änderung der Absorptionswerte in den Maxima bei 293 und 370 nm in Abhängigkeit vom molaren Verhältnis zwischen Quercetin (Q) und  $\text{Cu}^{2+}$ .

den waren. Die gleiche Beobachtung wurde, wie erwähnt, kürzlich für die elektrochemische Oxidation von Quercetin in 100 % Acetonitril beschrieben [67]. Eine Diskussion über den Verlauf der hier beschriebenen Reaktionen zwischen Flavonolen und prooxidativen Kationen, sowie die Bedeutung von Wasser und Acetonitril für diese Reaktionen findet sich aus diesem Grund weiter unten im Anschluß an die Strukturaufklärung der entstandenen Verbindungen (s. 2.4, S. 91).

**Konzentrationsabhängigkeit** Um eine Aussage darüber treffen zu können, inwieweit die beobachteten Reaktionen quantitativ verlaufen, wurde die Umsetzung der Flavonole mit  $\text{Cu}^{2+}$  in acetonitrilhaltiger Lösung bei verschiedenen molaren Konzentrationsverhältnissen durchgeführt (Abb. 2.11). Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit  $\text{Fe}^{3+}$  war hier ein deutlich höherer molarer Überschuß des Kations notwendig, um eine vollständige Umsetzung zu erreichen. Erst oberhalb eines Molverhältnisses von 5:1 ( $\text{Cu}^{2+}$  : Hydroxyflavonol) in acetonitrilhaltiger Lösung war keine weitere Abnahme der Absorption bei 370 nm mehr zu beobachten. Es lag also kein unverändertes Flavonol mehr vor. Die Mischspektren der Lösungen bei unterschiedlichen  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentrationen verfügten über drei isobestische Punkte (für Quercetin bei 245, 271 und 332 nm) (Abb. 2.12). Dies konnte als erster Hinweis dafür gesehen werden, daß im Laufe der Reaktion ein Gemisch aus genau zwei Verbindungen entstanden ist [87].



**Abbildung 2.12:** UV/Vis-Spektren der Reaktionsprodukte von Quercetin mit  $\text{Cu}^{2+}$ : Einfluß der Konzentrationsverhältnisse (Reaktionszeit 15 min).



**Abbildung 2.13:** Differenz der UV/Vis-Spektren von Kaempferol mit und ohne Zugabe von  $\text{Al}^{3+}$  (molares Verhältnis 1:1, Reaktionszeit 15 min).

### 2.1.2.3 Reaktionen mit $\text{Al}^{3+}$

Da die Komplexbildung von  $\text{Al}^{3+}$  mit Flavonolen bereits beschrieben ist [47, 59, 60], dienten die folgenden Versuche lediglich zur Überprüfung, ob auch unter den gewählten Bedingungen die entsprechenden Komplexe entstehen können. Eine Reaktion in Form einer Gelbfärbung der Lösung durch einen leichten Anstieg der Absorption bei 410 nm konnte nur bei den Flavonolen beobachtet werden (Abb. 2.13). Die Komplexbildung lief demnach nur bei Vorhandensein von Bindungsstelle C ab. Bei beiden untersuchten Flavonolen, die nur über Bindungsstelle A verfügen, waren keine Anzeichen für eine Komplexbildung zu erkennen. Diese Beobachtungen standen im Einklang mit den von Porter und Markham sowie Hollman et al. publizierten Ergebnissen [47, 59] und stützten die Annahme von Deng und Van Berkel [60], daß die 3-Hydroxy-4-keto-Funktion für die Bindung von  $\text{Al}^{3+}$  ausschlaggebend ist. Eine Komplexbildung über die 4-Keto-5-hydroxyfunktion, wie sie in Lehrbüchern angegeben ist [58], spielte unter den hier angewendeten Bedingungen keine Rolle.

### 2.1.3 Fluorimetrie

$\text{Al}^{3+}$  kann mit Flavonolen über die 3-Hydroxy-4-keto-Funktion Komplexe bilden [60], die (ebenfalls in acetonitrilhaltiger, essigsaurer Lösung) als fluoreszierend beschrieben wurden [59]. So wird Morin als analytisches Nachweisreagenz für  $\text{Al}^{3+}$  in essigsaurer Lösung benutzt, wobei eine grüne Fluoreszenz sichtbar wird [58]. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Lösungen von Quercetin, Kaempferol und Morin mit  $\text{Al}^{3+}$  fluoreszierten erwartungsgemäß ebenfalls. Die Anregungs- und Emissionsmaxima entsprachen dabei den in der Literatur [59] angegebenen. Weder die Flavonole selbst, noch Mischungen aus Flavonolen und  $\text{Cu}^{2+}$  oder  $\text{Fe}^{3+}$ , noch Lösungen der Flavone mit  $\text{Al}^{3+}$  wiesen eine Fluoreszenz auf.

Die Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  oder  $\text{Fe}^{3+}$  zu den fluoreszierenden Lösungen der  $\text{Al}^{3+}$ -Komplexe von Quercetin, Kaempferol und Morin (molare Verhältnisse Flavonol :  $\text{Al}^{3+}$  :  $\text{Cu}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  = 1:1:1) führte zu einer Abnahme der Fluoreszenz-Intensität, nicht aber zu deren völligem Erlöschen. Die Lage der Anregungs- und Emissionsmaxima wurde nicht verändert. Diese Beobachtungen ließen sich auf zwei Arten interpretieren. Es konnte entweder eine Komplexbildung zwischen  $\text{Fe}^{3+}$  oder  $\text{Cu}^{2+}$  und überschüssigem, nicht an  $\text{Al}^{3+}$  gebundenem Flavonol, oder eine Oxidation der nicht im  $\text{Al}^{3+}$ -Komplex gebundenen Liganden abgelaufen sein. Beides würde zu einer Abnahme der Konzentration an ungebundenem Flavonol führen. Damit würde das Gleichgewicht des  $\text{Al}^{3+}$ -Komplexes zu den Edukten hin verschoben und entsprechend die Intensität der Fluoreszenz abnehmen. Basierend auf den vorliegenden Daten ließ sich nicht entscheiden, ob nur eine oder beide der Möglichkeiten in Betracht kommen.

Für die im folgenden durchgeführten HPLC-Trennungen der Reaktionsgemische war aber wichtig zu wissen, daß sich Lösungen herstellen ließen, die sowohl Flavonole, als auch  $\text{Al}^{3+}$ -Komplexe bekannter Struktur, als auch mögliche Oxidationsprodukte der Flavonole enthielten. Die Fluoreszenz der  $\text{Al}^{3+}$ -Komplexe der Flavonole sollte dabei zur empfindlichen und hochselektiven Detektion dieser Komplexe genutzt werden (s. 2.2.2, S. 53).

### 2.1.4 Zusammenfassung und Diskussion

Es konnte gezeigt werden, daß unter den gewählten analytischen Bedingungen die UV/Vis-Spektren von Flavonolen sowie von Polyphenolen mit einer *o*-diphenolischen Gruppe durch Zugabe von Lösungen von  $\text{Cu}^{2+}$  oder  $\text{Fe}^{3+}$  deutlich verändert werden. Das Vorhandensein der Bindungsstelle A im Molekül war für keine der beobachteten Reaktionen notwendig.

Bei den *o*-Diphenolen bestand eine starke Abhängigkeit der Reaktion von den weiteren

Substituenten des Phenytringes. Daraus muß zwingend abgeleitet werden, daß die isolierte Betrachtung dieser funktionellen Gruppe als mögliche Bindungsstelle für Kationen nicht sinnvoll ist. Vielmehr ist es bei diesen Verbindungen notwendig, jeweils das gesamte Molekül als möglichen Liganden aufzufassen und detailliertere Untersuchungen zu dem jeweiligen Einfluß der Substituenten zu machen. Dies war jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Bei allen fünf untersuchten Hydroxyflavonolen (Quercetin, Kaempferol, Myricetin, Morin, Fisetin) war durch Zugabe von  $\text{Fe}^{3+}$  oder  $\text{Cu}^{2+}$  gleichermaßen eine Abnahme der Absorption in den Maxima bei Wellenlängen um 370 nm, sowie eine gleichzeitige Zunahme der Absorption bei Wellenlängen um 290 nm zu beobachten. Ein bathochromer Shift, wie er für  $\text{Fe}^{3+}$ -Komplexe mit den Liganden 3-Hydroxyflavon und 1,2-Dimethyl-3-hydroxy-4-pyridon (Abb. 2.2, S. 37) gemessen wurde, wurde bei den Hydroxyflavonolen nur intermediär beobachtet.  $\text{Fe}^{2+}$  konnte die gleichen Effekte nur dann hervorrufen, wenn es zunächst durch Luftsauerstoff zu  $\text{Fe}^{3+}$  oxidiert wurde.  $\text{Al}^{3+}$  war auch unter den hier gewählten Bedingungen in der Lage, mit den Flavonolen über die 3-Hydroxy-4-Keto-Funktion gelb gefärbte Komplexe zu bilden, die anhand ihrer Fluoreszenz-Aktivität erkannt wurden. Diese Verbindungen wurden später genutzt, um die Eignung von HPLC-Säulen für die Chromatographie von Komplexen zu prüfen.

Unterschiedliche pH-Werte hatten keinen wesentlichen Einfluß auf die beobachteten Reaktionen. Hingegen konnte deren Abhängigkeit vom jeweiligen organischen Modifier deutlich gezeigt werden.  $\text{Cu}^{2+}$  reagierte in Lösungen, die Acetonitril enthalten, schnell mit den Hydroxyflavonolen, während bei Anwesenheit von Methanol oder Ethanol die gleichen Veränderungen langsamer und in schwächerem Ausmaß auftraten. Das Auftreten einer violetten Färbung bei der Reaktion von 3',4'-Dihydroxyflavonolen in acetonitrilhaltiger Lösung wird weiter unten im Anschluß an die Strukturaufklärung anhand aktueller Literaturdaten diskutiert (s. 2.4, S.91)

Im Gegensatz zu  $\text{Cu}^{2+}$  waren die Reaktionsgeschwindigkeiten nach Zugabe von  $\text{Fe}^{3+}$  weitestgehend unabhängig vom Lösungsmittel, die Farben der vorübergehend gebildeten Komplexe aber voneinander verschieden. Es muß also davon ausgegangen werden, daß Lösungsmittelmoleküle an der Komplexbildung maßgeblich beteiligt sind. Die offensichtliche Bindung von Methanol oder Ethanol an die  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen bedeutet aber, daß in natürlichen Matrices eventuell vorliegende Komplexe mit Flavonoid-Liganden durch die Behandlung mit alkoholischen Lösungen in ihrer Zusammensetzung oder Stabilität beeinflußt werden können. Eine wesentliche Voraussetzung für eine aussagekräftige Spezies-

Analytik kann demnach unter diesen Bedingungen nicht erfüllt werden. Die hier erzielten Ergebnisse müssen folglich Zweifel daran wecken, ob die in der Literatur zur Analytik von Metall-Flavonoid-Komplexen beschriebenen chromatographischen Methoden grundsätzlich zu diesem Zweck geeignet sind.

Der starke hypsochrome Shift von 360 nm  $\rightarrow$  286 nm, den die Spektren der Flavonole bei der Reaktion mit  $\text{Cu}^{2+}$  in methanolischer Lösung erfuhren, wurde von Wedepohl und Schwedt [50, 62] auf die Bildung eines Komplexes zurückgeführt. Die hier erzielten Ergebnisse legen aber nahe, daß die gleiche Verbindung auch bei der Reaktion mit  $\text{Fe}^{3+}$  entsteht, und zwar nachdem die für einen Komplex typische Farbe abgeklungen ist. Da die Absorption der Flavonole bei Wellenlängen um 370 nm durch ihr System konjugierter Doppelbindungen bedingt ist, kann geschlossen werden, daß im Laufe der Reaktion dieses aromatische System wesentlich verändert wird. Eine Redoxreaktion zwischen dem jeweiligen Kation und dem Flavonol im Anschluß an eine vorübergehende Komplexbildung ist also wahrscheinlich, wurde aber von Wedepohl und Schwedt [50, 62] nicht in Betracht gezogen. Ein Vergleich mit den UV/Vis-Spektren der Produkte, die für eine elektrochemische Oxidation von Quercetin [65, 67] und jüngst auch für Kaempferol [67] angegeben wurden (Verbindungen IV, V, IX, S. 25), zeigt, daß bei diesen Reaktionen ebenfalls ein Anstieg der Absorption bei einer Wellenlänge um 290 nm beobachtet wurde. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang zudem, daß kürzlich die enzymatische Oxidation von Quercetin mit Polyphenoloxidase beschrieben wurde, die auch einen Anstieg der Absorption bei 291 nm zur Folge hatte. Die isosbestischen Punkte der Mischspektren aus Quercetin und dem nicht näher charakterisierten Oxidationsprodukt wurden mit 332 nm und 271 nm angegeben [73] und entsprechen damit den in der vorliegenden Arbeit gefundenen. Möglicherweise resultieren also die kationen-induzierte, die enzymatische und die elektrochemische Oxidation von Flavonolen in den gleichen Verbindungen.

UV/Vis-Spektren für Produkte der kationen-induzierten Oxidation von Flavonolen wurden bisher in der Literatur nicht angegeben. Die von Brown et al. [11] für die Umsetzung von Quercetin und Kaempferol mit  $\text{Cu}^{2+}$  in wäßrigem PBS-Puffer (pH 7,4) veröffentlichten Spektren sind jeweils Mischspektren mit denen der Ausgangsverbindungen, weisen allerdings neue Maxima bei etwa 330 nm auf (Verbindung III, S. 25) und unterscheiden sich deutlich von den hier beschriebenen.

Durch den starken Einfluß des für die HPLC zwingend notwendigen organischen Modifiers auf die ablaufenden Reaktionen ist eine Untersuchung von Polyphenol-Metall-Komplexen in natürlichen Matrices nicht ohne deutliche Beeinflussung der Komplexe möglich. Inter-

essanter war vielmehr die Frage, inwieweit die in den Modellsystemen entstehenden Oxidationsprodukte der Flavonole auch in biologischen Proben gebildet werden können. Im folgenden wurde daher der Schwerpunkt auf die Aufklärung der Struktur dieser oxidierten Flavonole sowie die Entwicklung einer leistungsfähigen Analytik zu ihrer Untersuchung gelegt.

Zur genaueren Charakterisierung der Oxidationsprodukte sollten NMR- und massenspektrometrische Verfahren eingesetzt werden. Dazu war es zunächst notwendig zu wissen, ob während der Reaktion zwischen den Flavonolen und den jeweiligen Kationen eine oder mehrere neue Verbindungen entstehen. Zu diesem Zweck wurde vor der Strukturaufklärung eine HPLC-Methode zur Untersuchung der kationenhaltigen Reaktionsgemische entwickelt.

## 2.2 HPLC von kationenhaltigen Reaktionsgemischen

### 2.2.1 Einleitung

Anknüpfend an die Ergebnisse der photometrischen und fluorimetrischen Messungen wurde eine HPLC-Methode entwickelt, die es ermöglichte, die in den Reaktionsgemischen vorhandenen Verbindungen chromatographisch zu trennen. Im Falle des Aluminiums handelte es sich dabei zweifelsfrei um Komplexe, während bei Kupfer und Eisen das Vorliegen oxidierter Flavonole wahrscheinlicher war. Um in der Lage zu sein, die Lösungen bei hohen Gehalten an den jeweiligen Kationen chromatographieren zu können, war es zunächst erforderlich, ein für die Aufgabenstellung geeignetes Säulenmaterial zu finden.

Reversed-phase Materialien verfügen stets noch über einen Rest an nicht derivatisierten Silanol-Gruppen. Die hohe Affinität der untersuchten Kationen zu OH-Gruppen kann zur Folge haben, daß sie an der stationären Phase adsorbiert werden [88, 63, 89]. Dies würde dazu führen, daß

1. Komplexe auf der Säule zerfallen, dadurch daß die Zentralionen dem Gleichgewicht durch Bindung an freie Silanol-Gruppen entzogen werden, oder
2. Kationen an der stationären Phase angereichert werden und durch eine Redoxreaktion oder Komplexbildung mit den auf die Säule injizierten Polyphenolen eine reproduzierbare Analytik verhindern.

Aus diesen Gründen wurde ein Kunststoff-Material aus Polystyroldivinylbenzol als stationäre Phase eingesetzt. Auf dieser Säule konnte der  $\text{Al}^{3+}$ -Komplex von Quercetin chromatographiert und selektiv mit Fluoreszenz-Detektion nachgewiesen werden. Die Eignung



der stationären Phase für die Untersuchung stark kationenhaltiger Lösungen wurde zusätzlich mit atomabsorptionsspektroskopischer Detektion untersucht. Darauf aufbauend war es möglich, die Mischungen der Flavonole mit  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$  chromatographisch zu trennen, ohne die Kationen vorher abzutrennen.

### 2.2.2 Fluoreszenz-Detektion

Die charakteristische Fluoreszenz der  $\text{Al}^{3+}$ -Komplexe der Flavonole ermöglichte deren selektive und empfindliche Detektion nach der HPLC. Der in der Spezies-Analytik übliche Einsatz von zwei Detektoren zur sequentiellen oder parallelen Detektion des organischen Liganden (z.B. mit Wellenlängendetektoren) und des Zentralions (z.B. mit AAS) [90, 61, 22, 21, 79, 14, 15] konnte so umgangen werden.

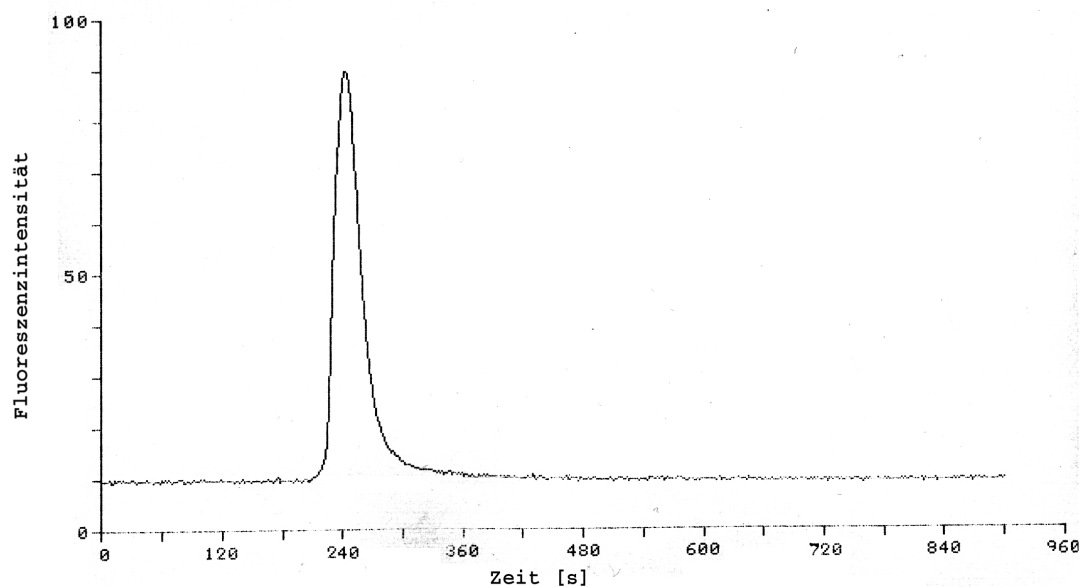
Die Messungen wurden nur mit Quercetin durchgeführt, um ein möglichst einfaches Testsystem zu haben. Vorab wurde unter Einsatz der Photodiodenarray-Detektion die Eluentenzusammensetzung so eingestellt, daß eine kurze Analysenzeit erreicht, dabei aber das freie Flavonol genügend weit vom Totvolumen abgetrennt wird (s. 2.2.4, S. 55).

Mit diesem System wurde mit Fluoreszenz-Detektion genau ein Peak detektiert (Abb. 2.2.2). Mit zunehmender Konzentration an  $\text{Al}^{3+}$  in den injizierten Lösungen (bei gleichbleibender Quercetin-Konzentration) nahm die Höhe des Peaks entsprechend zu. Die Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  oder  $\text{Fe}^{3+}$  zu den fluoreszierenden Lösungen vor der Injektion resultierte wie erwartet in einer Verminderung der Peakhöhe. Im stopped-flow wurde je ein Anregungs- und ein Emissionsspektrum in diesem Peak aufgezeichnet. Die Spektren wiesen die gleichen Maxima auf wie die im Fluorimeter bestimmten. Die nach etwa vier Minuten eluierende Verbindung war folglich der Komplex aus  $\text{Al}^{3+}$  und Quercetin.

Eine abwechselnde Injektion von  $\text{Al}^{3+}$ - und Quercetinlösungen führte nicht zu detektierbaren Peaks. Ebenso wenig war ein Ansteigen der Basislinie zu beobachten. Es konnte also geschlossen werden, daß auf der Säule kein  $\text{Al}^{3+}$  adsorbiert wurde, daß nachfolgende Messungen hätte stören können. Das ausgesuchte Säulenmaterial erwies sich folglich als grundsätzlich für die Aufgabenstellung der Chromatographie stark kationenhaltiger Lösungen geeignet.

### 2.2.3 Atomabsorptionsspektroskopische Detektion

Zusätzlich zu den Messungen mit fluorimetrischer Detektion wurde die mögliche Adsorption von Kationen am Säulenmaterial mit HPLC-AAS untersucht. Dazu wurde der Ausgang der

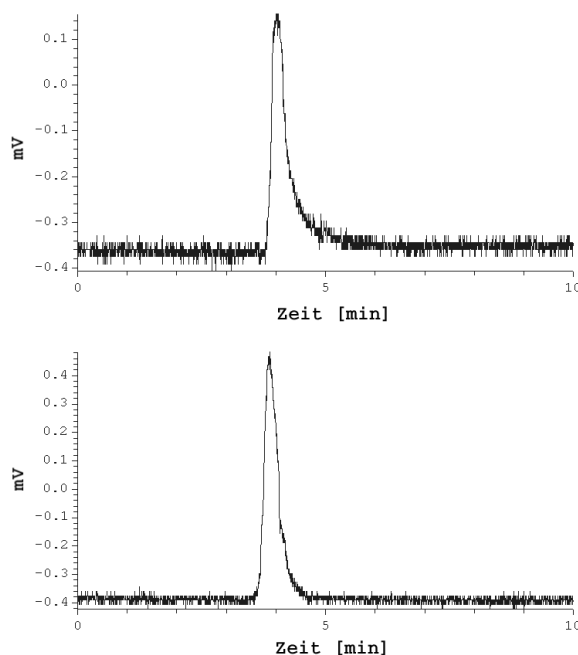


**Abbildung 2.14:** Chromatographie des  $\text{Al}^{3+}$ -Komplexes von Quercetin (molares Verhältnis 1:1); isokratische Elution auf Polystyroldivinylbenzol-Phase, Fluoreszenz-Detektion.

HPLC-Säule über ein HHPN-Interface mit dem Brenner eines Flammen-AAS verbunden. Zur Kalibrierung des Detektors wurde zwischen der Säule und dem Interface ein zweites Injektionsventil eingebaut, das die Injektion von Referenzlösungen ohne Chromatographie direkt in das AAS erlaubte. Die chromatographischen Bedingungen entsprachen den bei der fluorimetrischen Detektion verwendeten.

Die Injektion von  $\text{Cu}^{2+}$ -Lösungen *vor* der Säule führte zu Chromatogrammen mit jeweils genau einem Peak mit einer Retentionszeit von etwa vier Minuten. Die Peakflächen entsprachen denen, die bei der Kalibrierung durch Injektion der Referenzlösungen *nach* der Säule erhalten wurden. Die gesamte auf die Säule gegebene Menge an  $\text{Cu}^{2+}$  eluierte folglich in einem Peak, die Kationen wurden nicht an der stationären Phase adsorbiert.

Um, wie bei der fluorimetrischen Detektion, ein möglichst einfaches Testsystem zu haben, wurde zusätzlich mit Gemischen aus Quercetin und  $\text{Cu}^{2+}$  gearbeitet. Die  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration wurde bei gleichbleibender Konzentration des Flavonols variiert und mit diesen Lösungen eine Kalibrierung durchgeführt. Die anschließende Injektion der Lösungen *vor* der Säule resultierte ebenfalls in genau einem Peak mit einer Retentionszeit von etwa vier Minuten. Auch hier entsprachen die Peakflächen denen der Kalibrierung. Der Zusatz von Quercetin zu den  $\text{Cu}^{2+}$ -Lösungen führte folglich nicht zum Auftauchen neuer Peaks in



**Abbildung 2.15:** Chromatographie von  $\text{Cu}^{2+}$ : Vergleich der Referenzlösung von  $\text{Cu}^{2+}$  (oben) mit der Reaktionsmischung von Quercetin und  $\text{Cu}^{2+}$  (molares Verhältnis 2:1) (unten); isokratische Elution auf Polystyroldivinylbenzol-Phase, Detektion mit Flammen-AAS.

den Chromatogrammen. Die gesamte Menge der Kationen eluierte im Totvolumen, es gab keine Anzeichen für die Elution von Komplexen mit höherer Retentionszeit (Abb. 2.15).

Eine sequentielle Detektion des Polyphenols (mit einem Wellenlängendetektor) und der Kationen (mit AAS), die eine weitergehende Interpretation der Ergebnisse erlaubt hätte, ließ sich nicht durchführen. Der hohe Systemdruck auch nach der HPLC-Säule, der durch das HHPN-Interface verursacht wurde, führte zu einer Undichtigkeit der nicht genügend druckstabilen Detektormesszelle. Aus diesem Grund wurde parallel zu den Messungen mit HPLC-AAS die Photodiodenarray-Detektion zur Detektion der eluierenden Polyphenole eingesetzt.

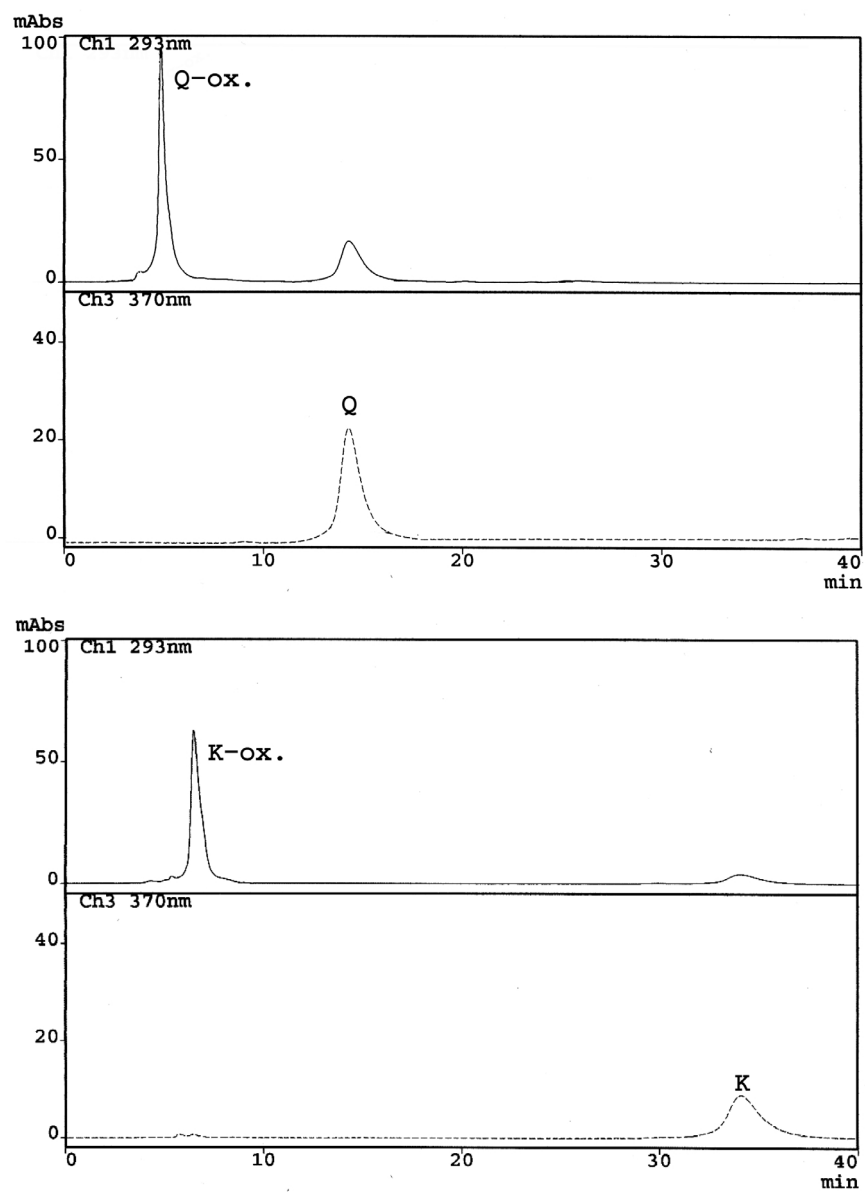
## 2.2.4 Photodiodenarray-Detektion

Zunächst wurden die beiden am häufigsten in Lebensmitteln vorkommenden Flavonole Quercetin und Kaempferol untersucht. Der Photodiodenarray-Detektor erlaubte dabei den Vergleich der UV/Vis-Spektren in den Peaks mit den Ergebnissen der Photometrie (s. 2.1.2, S. 36).

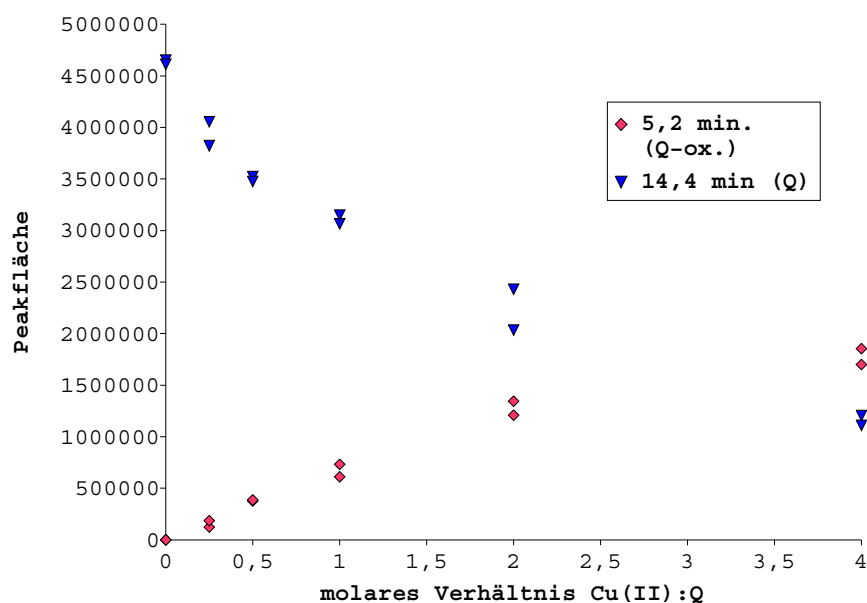
Die chromatographische Trennung der beiden Flavonole ließ sich mit isokratischer Elution mit Acetonitril / wäßriger Essigsäure leicht durchführen. Nach Injektion von Gemischen der Polyphenole mit  $\text{Fe}^{3+}$  oder  $\text{Cu}^{2+}$  war jeweils noch genau ein zusätzlicher Peak in den Chromatogrammen zu erkennen (Abb. 2.16). Die Peakflächen der Flavonole nahmen dabei mit steigender Konzentration des zugesetzten Kations ab, während die der zusätzlich eluierenden Verbindungen in gleichem Maße zunahm (Abb. 2.17). Letztere hatten die gleichen UV/Vis-Spektren wie die Gemische des jeweiligen Flavonols mit einem Überschuß an  $\text{Fe}^{3+}$  oder  $\text{Cu}^{2+}$  (Abb. 2.18). Da die Kationen, wie die Untersuchungen mit HPLC-AAS gezeigt haben, im Totvolumen eluieren, konnte es sich bei diesen Verbindungen wie erwartet nicht um Komplexe handeln. Dies wurde dadurch bestätigt, daß unabhängig vom eingesetzten Kation keine Unterschiede in der Retentionszeit und den Spektren der neu entstandenen Verbindungen zu erkennen war. Es muß dementsprechend eine Redoxreaktion zwischen den Flavonolen und den prooxidativen Kationen abgelaufen sein.

Daß dabei aus jedem Flavonol genau eine Verbindung resultierte, war den dreidimensionalen Chromatogrammen am DAD zu entnehmen. Daraus ließ sich zusätzlich erkennen daß die Oxidationsprodukte nach den  $\text{Al}^{3+}$ -Komplexen der Flavonole (Absorptionsmaximum bei 420 nm) eluierten, also in ihrer Polarität zwischen den Komplexen und den Edukten lagen (Abb. 2.19).

Der Versuch, zusätzlich zu Quercetin und Kaempferol die drei weiteren Flavonole und deren Oxidationsprodukte in einem Lauf mit der Nucleogel-Säule zu trennen, mißlang. Die stationäre Phase war zwar zur Untersuchung der Reaktionsgemische geeignet, eine Gradientenelution scheiterte aber an der zu geringen Trennleistung des Polystyroldivinylbenzol-Materials.



**Abbildung 2.16:** Trennung von Quercetin (Q), Kaempferol (K) und deren Reaktionsprodukten mit  $\text{Cu}^{2+}$  (Q-ox., K-ox.) ( $c(\text{Q},\text{K})=20 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $20 \mu\text{L}$  injiziert, molare Verhältnisse Q:Cu 1:1, K:Cu 1:1); isokratische Elution auf Nucleogel-Säule; Photodiodenarray-Detektion, Chromatogramme bei 293 und 370 nm.



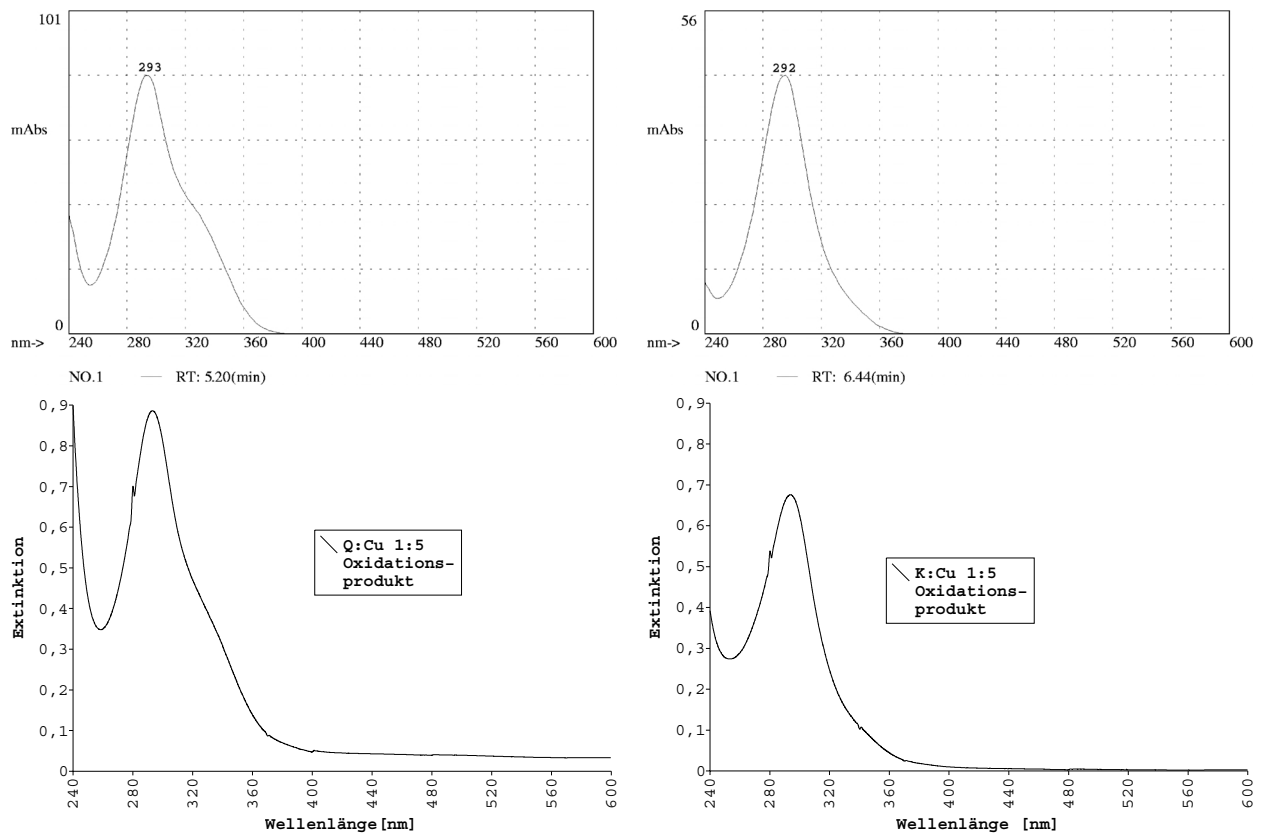
**Abbildung 2.17:** Peakflächen der Flavonole und der zusätzlich eluierenden Verbindungen (Abb. 2.16) am Beispiel der Gemische von Quercetin mit  $\text{Cu}^{2+}$  (Q: Quercetin, Q-ox.: oxidiertes Quercetin).

## 2.2.5 Zusammenfassung und Diskussion

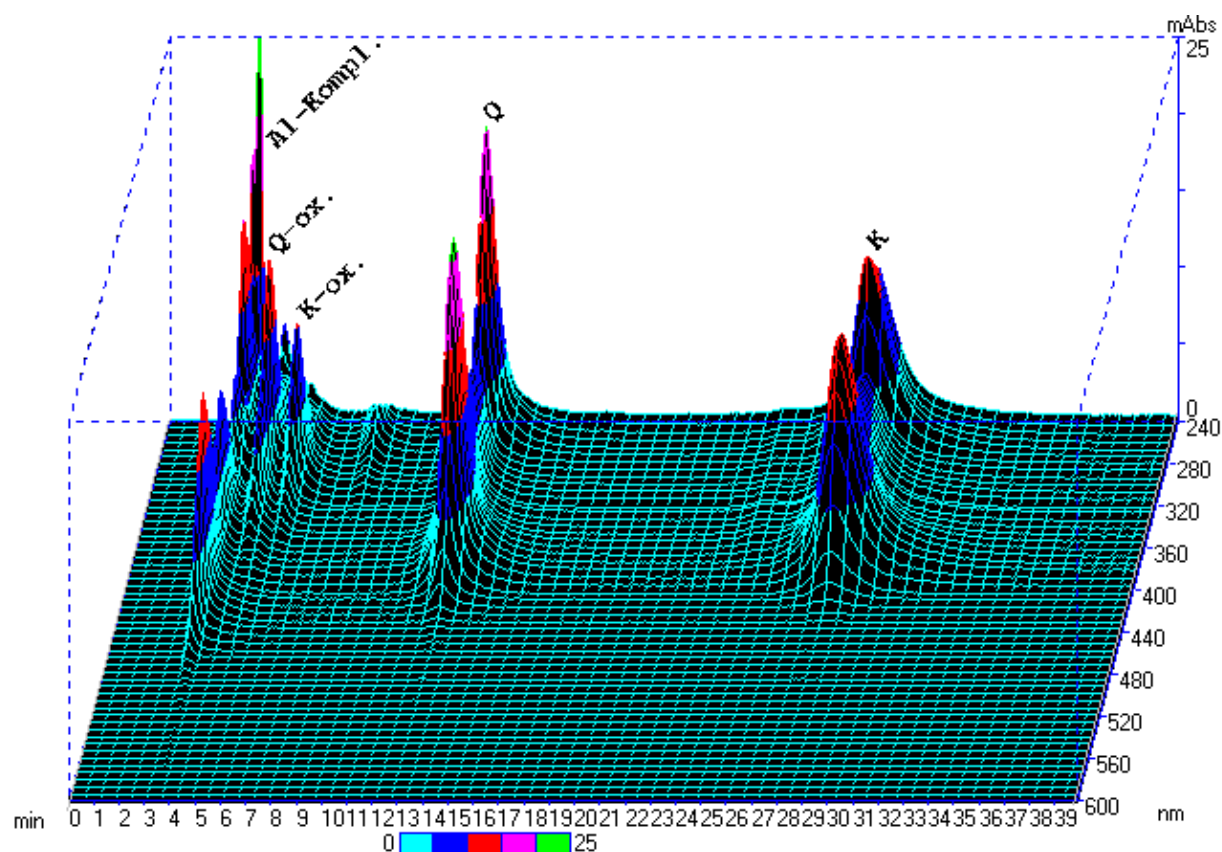
Die entwickelte HPLC-Methode war dazu geeignet Lösungen zu untersuchen, die neben den Flavonolen auch noch hohe Konzentrationen an den eingesetzten Kationen enthielt. Die verwendete stationäre Phase aus einem Kunststoff-Material adsorbierte, wie am Beispiel des  $\text{Cu}^{2+}$  gezeigt, die injizierten Kationen nicht nachhaltig. Im Laufe der Analytik war keine negative Beeinflussung des Säulenmaterials durch die Kationen zu beobachten. Mit diesem Säulenmaterial war die Chromatographie eines  $\text{Al}^{3+}$ -Komplexes von Quercetin möglich. Dieser Komplex konnte fluorimetrisch detektiert und durch sein Fluoreszenzspektrum eindeutig nachgewiesen werden.

Das verwendete Säulenmaterial ist folglich grundsätzlich für die Metall-Spezies-Analytik geeignet. Im Falle der Untersuchungen der Reaktionsmischungen von Flavonolen mit  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$  wurden jedoch keine Komplexe, sondern oxidierte Flavonole chromatographiert. Auch bei einem Gemisch von Quercetin und  $\text{Cu}^{2+}$  wurde mit AAS nur ein Peak für das Kation registriert. Da dessen Peakfläche der des Peaks ohne Zugabe von Quercetin entsprach, kann geschlossen werden, daß keine Komplexbildung stattgefunden hat.

Die Photodiodenarray-Detektion bestätigte, daß in den Reaktionsmischungen eines Flavonols mit  $\text{Cu}^{2+}$  oder  $\text{Fe}^{3+}$  genau zwei Verbindungen vorliegen. Die Redoxreaktion verlief eindeutig zu einem Produkt, dessen UV/Vis-Spektrum dem im Spektrophotometer gemess-



**Abbildung 2.18:** UV/Vis-Spektren in den Peaks der beiden zusätzlich eluierenden Verbindungen bei der Chromatographie der Gemische von Quercetin und Kaempferol mit  $\text{Fe}^{3+}$  oder  $\text{Cu}^{2+}$  (Abb. 2.16) (oben); Vergleich mit den UV/Vis-Spektren der Reaktionsgemische von Quercetin und Kaempferol mit einem Überschuß an  $\text{Cu}^{2+}$  (Abschnitt 2.1.2.2, S. 42) (unten).



**Abbildung 2.19:** Trennung von Quercetin (Q), Kaempferol (K) und deren Reaktionsprodukten mit  $\text{Cu}^{2+}$  (Q-ox., K-ox.) und  $\text{Al}^{3+}$  (Al-Kompl.) ( $c(\text{Q},\text{K})=20 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $20 \mu\text{L}$  injiziert, molares Verhältnis Q:K:Cu:Al 1:1:0,5:1); isokratische Elution auf Nucleogel-Säule; Photodiodenarray-Detektion.



senen entsprach. Somit waren erstens die Voraussetzungen für eine Synthese und Strukturaufklärung dieser Oxidationsprodukte gegeben. Zweitens konnte die HPLC-Methode als Ausgangspunkt für die später zu entwickelnden Methoden der Trennung und selektiven Detektion der oxidierten Flavonole dienen.

## 2.3 Darstellung und Charakterisierung oxidiertes Flavonole

### 2.3.1 Einleitung

Da in der Literatur mehrere Strukturvorschläge für oxidierte Flavonole gemacht wurden (s. Tab. 1.3, S. 25), war zur eindeutigen Beschreibung der hier untersuchten Reaktionen die Aufklärung der exakten Struktur der entstandenen Verbindungen mittels NMR und MS erforderlich. Dazu war es notwendig, die Substanzen in einer Menge von mehreren mg und in reiner Form zur Verfügung zu stellen. Die so erhaltenen Referenzsubstanzen sollten dann anschließend auch für die Entwicklung von HPLC-Methoden zum Nachweis der oxidierten Flavonole in biologischen Matrices genutzt werden. Zusätzlich zur Strukturaufklärung wurde zur weitergehenden Charakterisierung der neu entstandenen Verbindungen noch abgeschätzt, inwieweit sie sich in ihrer antioxidativen Aktivität von den Flavonolen unterscheiden.

### 2.3.2 Darstellung

Die Darstellung der Oxidationsprodukte als Feststoffe sollte verschiedenen Anforderungen gerecht werden:

- eindeutiger, schneller Reaktionsverlauf,
- hohe Reinheit der Produkte,
- einfach durchzuführen.

Die von Utaka und Takeda [49] beschriebene Aufarbeitung des in absolutem Methanol bzw. Ethanol oxidierten Quercetin sieht ein vollständiges Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum vor, wobei das Oxidationsmittel  $\text{Cu}^{2+}$  vorher nicht entfernt wird. Diese Methode war

jedoch auf die vorliegende Aufgabenstellung nicht zu übertragen. Da die Gegenwart größerer Mengen von Wasser im Reaktionsmedium hier ausdrückliche Voraussetzung war, wäre ein Einengen bei erhöhter Temperatur notwendig. Bei der Aufkonzentrierung bestünde daher die Gefahr möglicher Nebenreaktionen.

Daneben gab es noch weitere Gründe, die bei der Darstellung der oxidierten Flavonole eingesetzten Kationen nach Ablauf der Reaktion wieder zu entfernen. Sie würden stören

1. als paramagnetische Ionen bei den NMR-Messungen,
2. durch Verschmutzung des particle-beam-interface,
3. durch mögliche weitere Reaktionen mit den Polyphenolen bei der Ionisierung im Electrospray-Interface,
4. durch Adsorption an freien Silanol-Gruppen handelsüblicher RP-HPLC-Materialien.

Wie den Ergebnissen der photometrischen Messungen zu entnehmen war, mußten die Kationen in einem molaren Überschuß zugegeben werden, um eine schnelle quantitative Umsetzung zu dem jeweiligen Produkt zu erreichen. Vorversuche wurden zunächst mit dem in großer Menge verfügbaren Quercetin und  $\text{Cu}^{2+}$  durchgeführt. Die dabei in den Lösungen vorhandenen mg-Mengen von Kupferionen konnten durch Chromatographie an einer starken Ionentauschersäule nach Ablauf der Reaktion, die photometrisch verfolgt wurde, wieder gebunden werden. Dies wurde durch eine charakteristische hellblaue Verfärbung des Harzes im oberen Bereich der Austauschersäule angezeigt. Eine Überprüfung der Kupferkonzentration in den ablaufenden Lösungen mittels Flammen-AAS bestätigte diese Beobachtung.

Die nach Ionentausch eluierenden Lösungen wurden wegen ihres hohen Wassergehaltes nicht bei erhöhter Temperatur eingengt, sondern testweise mit verschiedenen Lösungsmitteln extrahiert. Diethylether erwies sich dabei am geeignetesten, während Essigsäureethylester starke Emulsionen mit der Reaktionslösung bildete und n-Hexan zu unpolar für das Lösen der Reaktionsprodukte war. Durch die Extraktion mit Diethylether war es notwendig, die Essigsäure im Reaktionsmedium gegen wäßrige Salzsäure zu ersetzen, da erstere mit in die organische Phase extrahiert wird und beim Einengen eine starke Absenkung des pH-Wertes und damit Nebenreaktionen bewirkte. Acetonitril wurde als organischer Bestandteil der Reaktionslösung beibehalten, weil es erstens eine schnelle Reaktion begünstigt und zweitens im Gegensatz zu den Alkoholen nicht selbst als Nucleophil mitreagieren kann. Die Reaktionsbedingungen unterschieden sich dadurch leicht von den oben beschriebenen

(s. 2.1.2.2, S. 42). Die UV/Vis-Spektren der Reaktionsgemische sowie der Produkte waren jedoch mit denen identisch, die in essigsaurer Lösung erhalten wurden.

Die ausgearbeitete Methode konnte anschließend sowohl erfolgreich auf die anderen Hydroxyflavonole, als auch auf die Umsetzung mit  $\text{Fe}^{3+}$  übertragen werden. Die darstellbaren Mengen waren zwar durch die eingeschränkte Löslichkeit der Flavonole in Acetonitril begrenzt, es konnten aber oxidierte Flavonole in Mengen von etwa 90 mg erhalten werden. Diese reichten zur Aufnahme sauberer NMR- und Massenspektren aus und konnten zur Herstellung von Referenzlösungen für die HPLC verwendet werden.

### 2.3.3 NMR-Spektroskopie

#### 2.3.3.1 Einleitung

Zur Aufklärung der Molekülstruktur der mit  $\text{Cu}^{2+}$  bzw.  $\text{Fe}^{3+}$  oxidierten Flavonole wurden zunächst eindimensionale NMR-Techniken herangezogen<sup>2</sup>. Die Literaturangaben zu den chemischen Verschiebungen der Kerne der Flavonoide sind in der Regel auf das Lösungsmittel DMSO bezogen [92]. Da die hier vorliegenden zu untersuchenden Verbindungen wegen der teilweise hohen Preise für die Edukte jedoch nur in kleinen Mengen vorlagen und für weitere Messungen in Reinform zur Verfügung stehen sollten, wurde als Lösungsmittel das leichter flüchtige Acetonitril verwendet. Die Vergleichsspektren der jeweiligen Flavonole mußten jedoch aufgrund ihrer zu geringen Löslichkeit in Acetonitril ebenfalls in DMSO aufgenommen werden.

Um anschließend eine eindeutige Bestimmung der Molekülstruktur der Verbindungen zu ermöglichen, wurden zusätzlich am Beispiel des oxidierten Quercetin zweidimensionale NMR-Techniken angewendet.

#### 2.3.3.2 Eindimensionale NMR-Spektroskopie

Die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren der oxidierten Flavonole zeigten deutlich, daß sowohl die Zahl der Signale (15) als auch die Multiplizitäten im Vergleich zu den Flavonolen unverändert waren (Tab. 2.1). Einige Signale waren allerdings signifikant verschoben (Tab. 2.2). Auffällig war dabei das Auftauchen zweier Signale oberhalb 190 ppm, die auf das Vorliegen zweier Carbonyl-Gruppen hinweisen [91]. Aus den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren wurde weiterhin deutlich, daß die Zahl der aromatischen Protonen durch die Reaktion nicht und die Lage ihrer

---

<sup>2</sup>In den aufgeführten Tabellen basiert die Zuordnung von Signalen zu den jeweiligen Atomen auf dem Inkrement-System [91] und der Summe aller Ergebnisse des Kapitels 2.3.3.

**Tabelle 2.1:**  $^{13}\text{C}$ -NMR: chemische Verschiebungen und Multiplizitäten der C-Atome der oxidierten Flavonole in  $\text{CD}_3\text{CN}$  (s: Singulett, d: Dublett)

C-Atom Nr.	$\delta$ [ppm] des Oxidationsprodukts von			
	Quercetin	Kaempferol	Morin	Fisetin
2	103,8 (s)	104,3 (s)	104,5 (s)	103,7 (s)
3	192,1 (s)	192,5 (s)	194,2 (s)	193,8 (s)
4	190,4 (s)	190,7 (s)	191,5 (s)	190,4 (s)
5	159,3 (s)	163,8 (s)	159,3 (s)	127,9 (d)
6	98,3 (d)	98,6 (d)	98,2 (d)	113,6 (d)
7	170,1 (s)	170,3 (s)	170,1 (s)	168,5 (s)
8	93,0 (d)	93,5 (d)	92,7 (d)	100,1 (d)
9	173,0 (s)	173,2 (s)	172,6 (s)	174,2 (s)
10	101,8 (s)	102,0 (s)	101,5 (s)	112,3 (s)
1'	125,8 (s)	125,9 (s)	110,8 (s)	125,8 (s)
2'	117,3 (d)	133,9 (d)	166,5 (s)	117,3 (d)
3'	145,4 (s)	116,7 (d)	103,9 (d)	145,4 (s)
4'	152,3 (s)	159,4 (s)	167,8 (s)	152,2 (s)
5'	116,1 (d)	116,7 (d)	109,6 (d)	116,1 (d)
6'	125,1 (d)	133,9 (d)	135,5 (d)	125,1 (d)

**Tabelle 2.2:**  $^{13}\text{C}$ -NMR: Differenzen der chemischen Verschiebungen zwischen oxidierten Flavonolen (Fl. ox.) und Flavonolen (Fl.)

C-Atom Nr.	$\delta_{Fl. ox.} - \delta_{Fl.}$ [ppm]			
	Quercetin	Kaempferol	Morin	Fisetin
2	-43,1	-42,6	-42,4	-43,2
3	56,2	56,6	58,3	57,9
4	14,4	14,7	15,5	14,4
5	-1,6	2,9	-1,6	-1,3
6	0,0	0,3	-0,1	0,1
7	6,1	6,3	6,1	6,3
8	-0,5	0,0	-0,8	-0,4
9	16,7	16,9	16,3	16,1
10	-1,3	-1,1	-1,6	-1,3
1'	3,7	3,8	1,3	3,7
2'	2,1	4,4	3,5	2,1
3'	0,2	1,3	0,7	0,2
4'	4,5	0,3	3,8	4,4
5'	0,4	1,3	0,8	0,4
6'	5,0	4,4	3,9	5,0

**Tabelle 2.3:**  $^1\text{H-NMR}$ : chemische Verschiebungen und Multiplizitäten der aromatischen Protonen der oxidierten Flavonole (s: Singulett, d: Dublett, dd:Doppel-Dublett, m: Multiplett)

Proton	$\delta[\text{ppm}]$ des Oxidationsprodukts von			
	Quercetin	Kaempferol	Morin	Fisetin
5				7,40 (d)
6	6,10 (d)	6,11 (d)	6,10 (d)	6,84 (dd)
8	6,07 (d)	6,05 (d)	6,03 (d)	6,58 (d)
2'	7,43 (d)	7,88 (dd)		7,43 (d)
3'		6,86 (dd)	6,35 (d)	
5'	6,84 (d)	6,86 (dd)	6,40 (dd)	6,71 (d)
6'	7,39 (m)	7,88 (dd)	7,95 (d)	7,59 (dd)

Signale gegenüber den Ausgangsverbindungen nur wenig verändert wurde<sup>3</sup> (Tab. 2.3). Da diese Protonen ausschließlich in den Ringen A und B gebunden sind, konnte geschlossen werden, daß diese unverändert erhalten blieben. Die Oxidation mußte also am C-Ring abgelaufen sein.

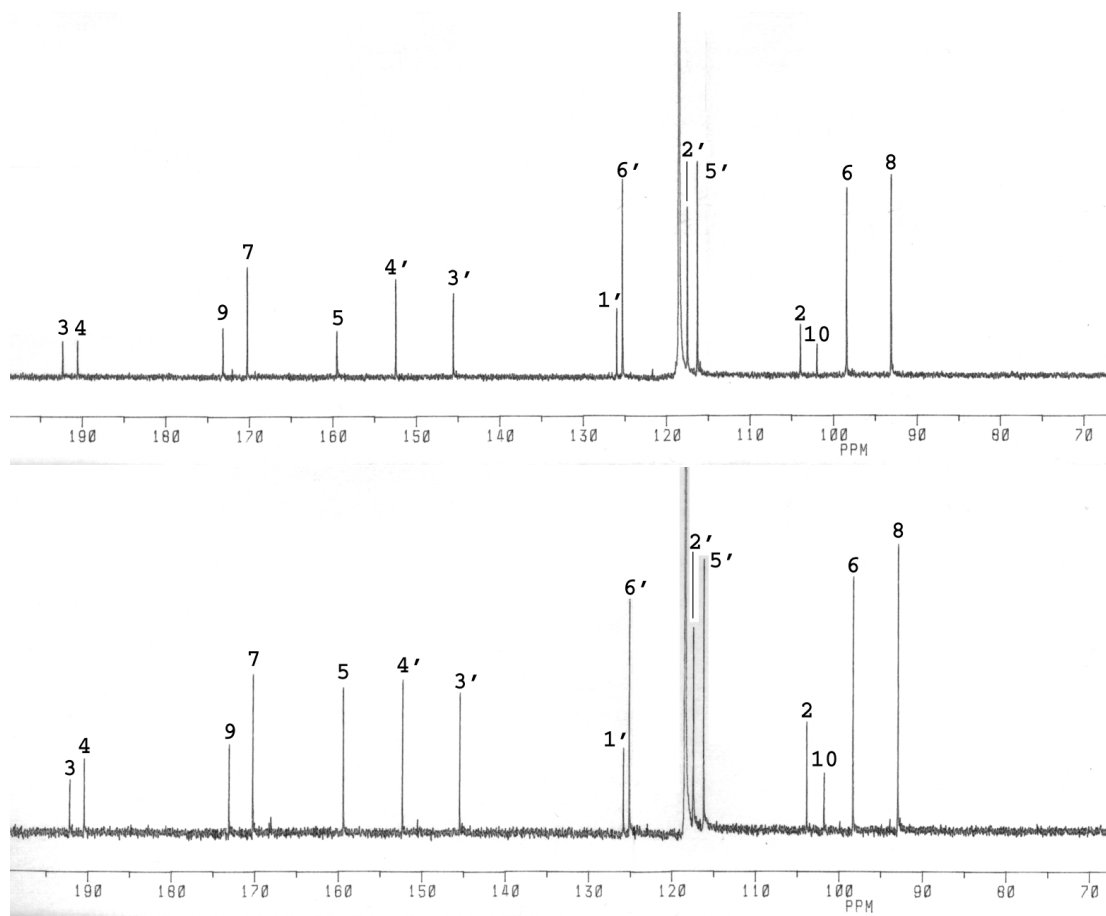
Im Falle des oxidierten Myricetin lag ein Substanzgemisch vor, da deutlich mehr als 15 Signale in vergleichsweise schwacher Intensität im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum zu erkennen waren. Die Oxidation ließ sich für dieses Flavonol nicht so steuern, daß nur eine Verbindung entsteht. Diese Tatsache läßt sich darauf zurückführen, daß die 2,3,4-Trihydroxy-Funktion des B-Rings im Vergleich zu den anderen Verbindungen deutlich stärker oxidationsempfindlich ist. Da die biologische Bedeutung des Myricetins wegen seines im Gegensatz zu Quercetin und Kaempferol vergleichsweise seltenen Vorkommens in pflanzlichen Lebensmitteln relativ gering ist [72, 37], wurde auf eine präparative Trennung und weitere Charakterisierung der zusätzlichen Oxidationsprodukte verzichtet.

Wie die photometrischen und chromatographischen Untersuchungen vermuten ließen, traten die geschilderten Veränderungen in den NMR-Spektren bei allen untersuchten Hydroxyflavonolen gleichermaßen auf. Ebenso waren die Ergebnisse bei Verwendung von  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$  jeweils identisch (Abb. 2.20). Der grundsätzliche Verlauf der Oxidationsreaktion ist demnach unabhängig von der weiteren Substitution des A- und B-Ringes, und die Produkte sind alle in gleicher Weise verändert.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß

1. die oxidierten Flavonole 15 C-Atome mit insgesamt zwei Carbonylgruppen besitzen,

<sup>3</sup>Die Zuordnung der Signale zu H-6 und H-8 war für die Oxidationsprodukte von Quercetin, Kaempferol und Morin nicht eindeutig möglich.



**Abbildung 2.20:**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren des oxidierten Quercetin in  $\text{CD}_3\text{CN}$ : Vergleich der Produkte aus der Reaktion mit  $\text{Cu}^{2+}$  (oben) und  $\text{Fe}^{3+}$  (unten).

### 2.3. DARSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG OXIDIERTER FLAVONOLE 67

2. die Zahl der aromatischen Protonen gegenüber der jeweiligen Ausgangsverbindung unverändert ist und
3. die Aromatizität des A- und B-Rings erhalten bleibt.

Aufgrund dieser Ergebnisse scheidet die in der Literatur für oxidierte Flavonole gemachten Strukturvorschläge I-VIII (Tab. 1.3, S. 25) für die vorliegenden Verbindungen aus. Im einzelnen begründet sich dies wie folgt:<sup>4</sup>

- I: nur 14 C-Atome
- II: 16 bzw. 17 C-Atome, acht bzw. zehn Protonen
- III: drei Carbonyl-Gruppen, chinoider B-Ring
- IV: nur eine Carbonyl-Gruppe, nur vier Protonen
- V: drei Carbonyl-Gruppen, nur vier Protonen, chinoider B-Ring
- VI: nur 14 C-Atome, nur vier Protonen
- VII: 22 C-Atome, sechs Protonen
- VIII: 22 C-Atome, sechs Protonen

Es handelt es sich also bei den in der vorliegenden Arbeit dargestellten Verbindungen um Substanzen, die bisher noch nicht im Zusammenhang mit der kationen-induzierten Oxidation von Flavonolen beschrieben wurden.

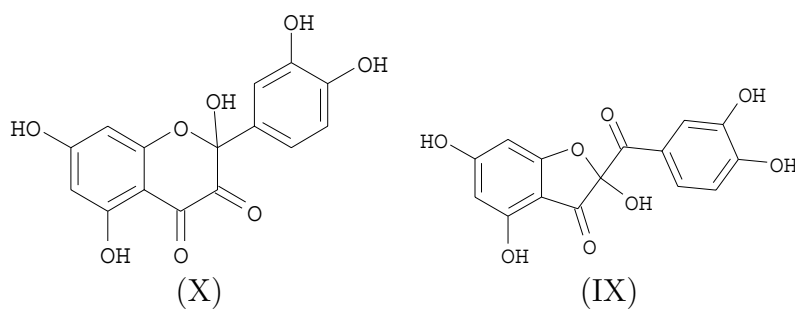
Wie aufgrund der UV/Vis-Spektren zu erwarten war, decken sich die NMR-Ergebnisse im wesentlichen mit den in der Literatur angegebenen Daten für die nur am C-Ring oxidierten Verbindungen (IX) [68] und (X) [67]. In Tabelle 2.4 sind die chemischen Verschiebungen aus dem <sup>13</sup>C-NMR des oxidierten Quercetin im Vergleich zu den Literaturwerten aufgeführt. Darin fallen leichte Unterschiede in der Signal-Zuordnung für die C-Atome 3, 4, 5, 7, 9, 3' und 4' auf, weitestgehend aber herrscht Übereinstimmung. Basierend auf diesen nahezu identischen Daten wurden allerdings zwei verschiedene Strukturen vorgeschlagen [68, 67]. Wie in der Einleitung erläutert, besteht ein Gleichgewicht zwischen zwei möglichen Formen des oxidierten Flavonols (Abb. 1.5, S. 27), einem 2-(Hydroxyphenyl)-2-hydroxy-4H-1-benzopyran-3,4-dion (X) und einem 2-(Hydroxybenzoyl)-2-hydroxy-2H-1-benzofuran-3-on<sup>5</sup> (IX) (Abb. 2.21). Viborg Jørgensen et al. [67] führten als Argument für das Vorliegen

<sup>4</sup>Als Protonen sind die aromatischen und aliphatischen, nicht aber die phenolischen aufgezählt.

<sup>5</sup>Die Nummerierung der C-Atome des Benzofuranons wird für eine bessere Vergleichbarkeit der Daten

**Tabelle 2.4:**  $^{13}\text{C}$ -NMR: chemische Verschiebungen der C-Atome von mit  $\text{Cu}^{2+}$  oder  $\text{Fe}^{3+}$  oxidiertem Quercetin, Vergleich mit Literaturdaten

C-Atom	$\delta$ [ppm]		
	$\text{CD}_3\text{CN}$	Lit. [68] DMSO	Lit. [67] DMSO
2	103,8	101,9	104,5
3	192,1	193,2	189,8
4	190,4	191,5	190,2
5	159,3	160,4	168,4
6	98,3	97,9	96,5
7	170,1	173,9	171,8
8	93,0	92,1	90,3
9	173,0	171,1	158,5
10	101,8	105,8	100,4
1'	125,8	126,4	124,9
2'	117,3	118,1	117,3
3'	145,4	152,7	144,7
4'	152,3	145,9	151,3
5'	116,1	115,5	114,8
6'	125,1	125,4	123,7



**Abbildung 2.21:** Mögliche Strukturen der Produkte der Oxidation von Quercetin mit  $\text{Fe}^{3+}$  oder  $\text{Cu}^{2+}$  (Basis: Daten der eindimensionalen NMR-Messungen).



letzterer Form die Abwesenheit eines Signals um 12 ppm im  $^1\text{H-NMR}$  an. Dieses Signal trete bei allen Flavonoiden auf, die eine Wasserstoff-Brücke zwischen der OH-Gruppe in Position 5 und dem Carbonyl-Sauerstoff an C-4 ausbilden können. Möglicherweise wäre dieses Signal auch bei der pyranoiden Form zu erwarten, durch einen deutlich veränderten Bindungswinkel aber nicht bei der furanoiden. Dem ist entgegenzuhalten, daß bislang keine Erkenntnisse darüber vorliegen, welchen Einfluß die zweite, erst durch die Oxidation entstandene Carbonyl-Funktion auf diese Wasserstoff-Brücke haben könnte. Darüberhinaus kann die Abwesenheit eines Signals für H-Brücken nicht als zwingender Positiv-Nachweis für das Vorliegen der von Viborg et al. [67] postulierten Struktur gelten. Zudem fehlt die Auseinandersetzung mit den von Igarashi et al. [68] publizierten Daten. Eine eindeutige Unterscheidung zwischen der pyranoiden und der furanoiden Form der oxidierten Flavonole ist anhand der eindimensionalen NMR-Ergebnisse nicht möglich.

### 2.3.3.3 Zweidimensionale NMR-Spektroskopie

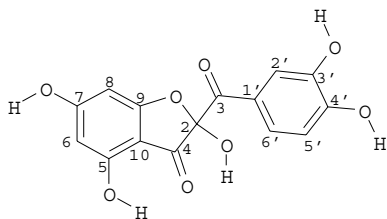
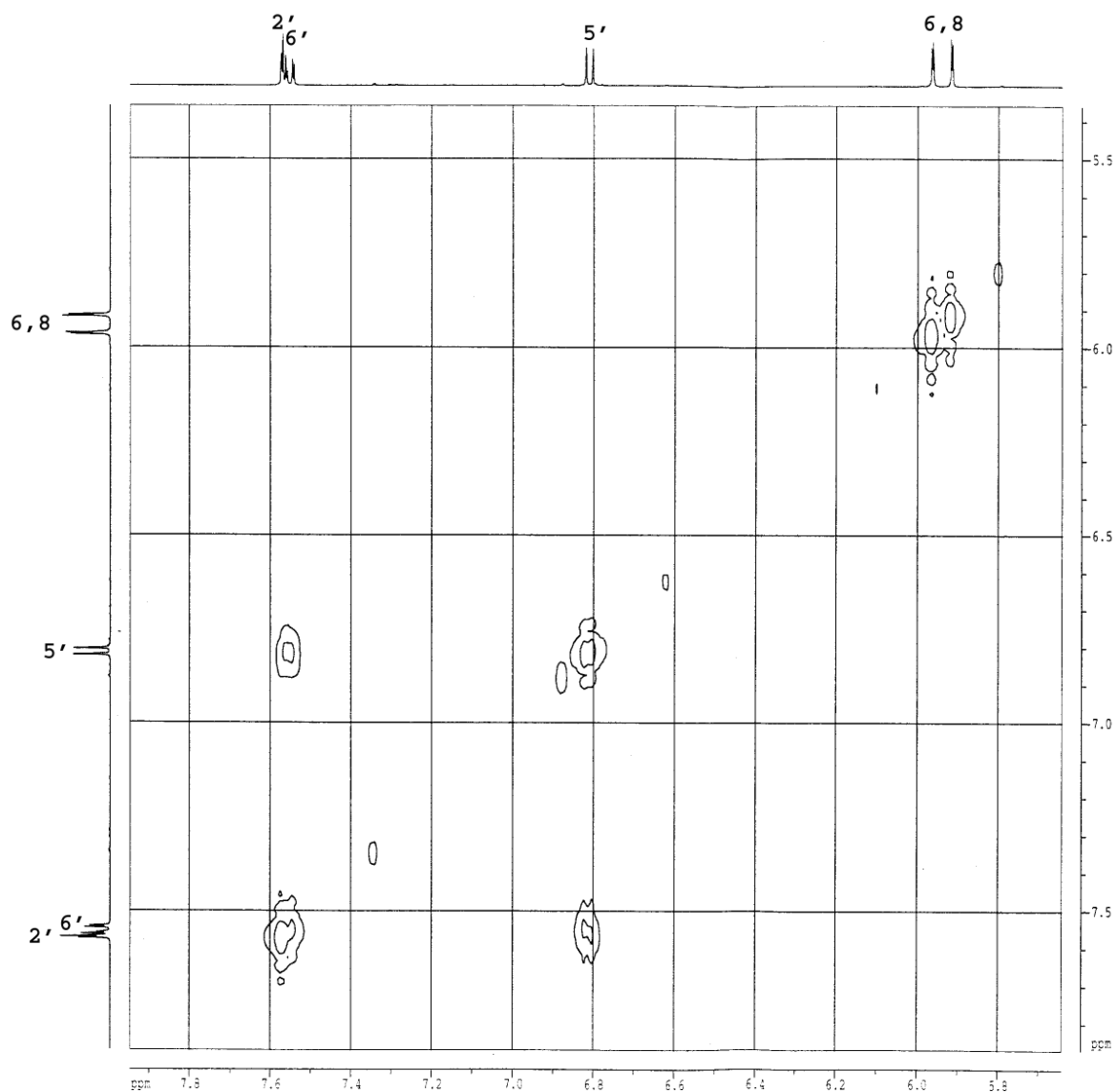
Aufschluß über die tatsächliche Struktur der Verbindungen ließ sich daher nur mit zweidimensionalen NMR-Techniken gewinnen. Es wurde eine Meßtechnik angewendet, die neben Aussagen über die chemische Verschiebung der einzelnen Kerne auch eine eindeutige Beschreibung von Verknüpfungen im Molekül zuließ. Hierzu konnte erfolgreich die HMBC-Technik (*Hetero Nuclear Multiple Bond Correlation*) angewendet werden, die durch die ausgewählte Pulsfolge Kopplungen zwischen Kohlenstoffatomen und Protonen über zwei bis vier Bindungen mit hoher Empfindlichkeit sichtbar macht. Die Kopplung über Heteroatome hinweg ist dabei möglich, im allgemeinen aber schwächer ausgeprägt als die über C-Atome [93], so daß Kopplungen zwischen phenolischen Protonen und C-Kernen nur über zwei oder drei Bindungen hinweg beobachtet wurden.

Die aufwendigen 2D-Messungen wurden auf die oxidierte Form des Quercetin beschränkt. Da ein Einfluß der Substitution der Ringe A und B auf obiges Gleichgewicht sehr unwahrscheinlich ist, konnten die Ergebnisse analog auch auf die anderen Flavonole übertragen werden.

Voraussetzung für eine eindeutige Interpretation der HMQC- und HMBC-Spektren war die genau bekannte Lage der Signale der Protonen. Daher wurden zunächst die oben für die fünf aromatischen Protonen getroffenen Zuordnungen (Tab. 2.3) anhand eines HH-COSY bestätigt (Abb. 2.22). Durch die höhere Auflösung des verwendeten 500 MHz-Gerätes lie-

---

der des Benzopyrandions und der Flavonole angeglichen. IUPAC-konform ist allerdings die Bezeichnung als Benzofuran-**3**-on!



**Abbildung 2.22:** HH-COSY-NMR des oxidierten Quercetin: Kopplung der aromatischen Protonen untereinander (linke und obere Spur: aromatische Protonen).

**Tabelle 2.5:** HH-COSY des oxidierten Quercetin: chemische Verschiebungen und Multiplizitäten der aromatischen Protonen (s: Singulett, d: Dublett, dd:Doppel-Dublett)

Proton	$\delta$ [ppm]
6	5,96 (d)
8	5,92 (d)
2'	7,57 (d)
5'	6,82 (d)
6'	7,55 (dd)

ßen sich darin die Multiplizitäten deutlicher erkennen. Die entsprechenden chemischen Verschiebungen sind in Tabelle 2.5 aufgeführt. Da das Dublett bei 6,82 ppm eine starke Kopplung mit dem Doppel-Dublett bei 7,55 ppm zeigt, konnte ersteres zweifelsfrei H-5', letzteres H-6' zugeschrieben werden. Die meta-Kopplungen H-6  $\leftrightarrow$  H-8 und H-2'  $\leftrightarrow$  H-6' sind dem COSY nicht zu entnehmen. Durch die Ähnlichkeit von H-6 und H-8 konnten diese Protonen aber den beiden Dublett-Signalen größer 5,9 ppm zugeordnet werden, wobei ihre eindeutige Bestimmung anhand dieser Meßdaten nicht möglich war.

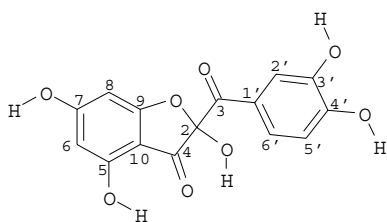
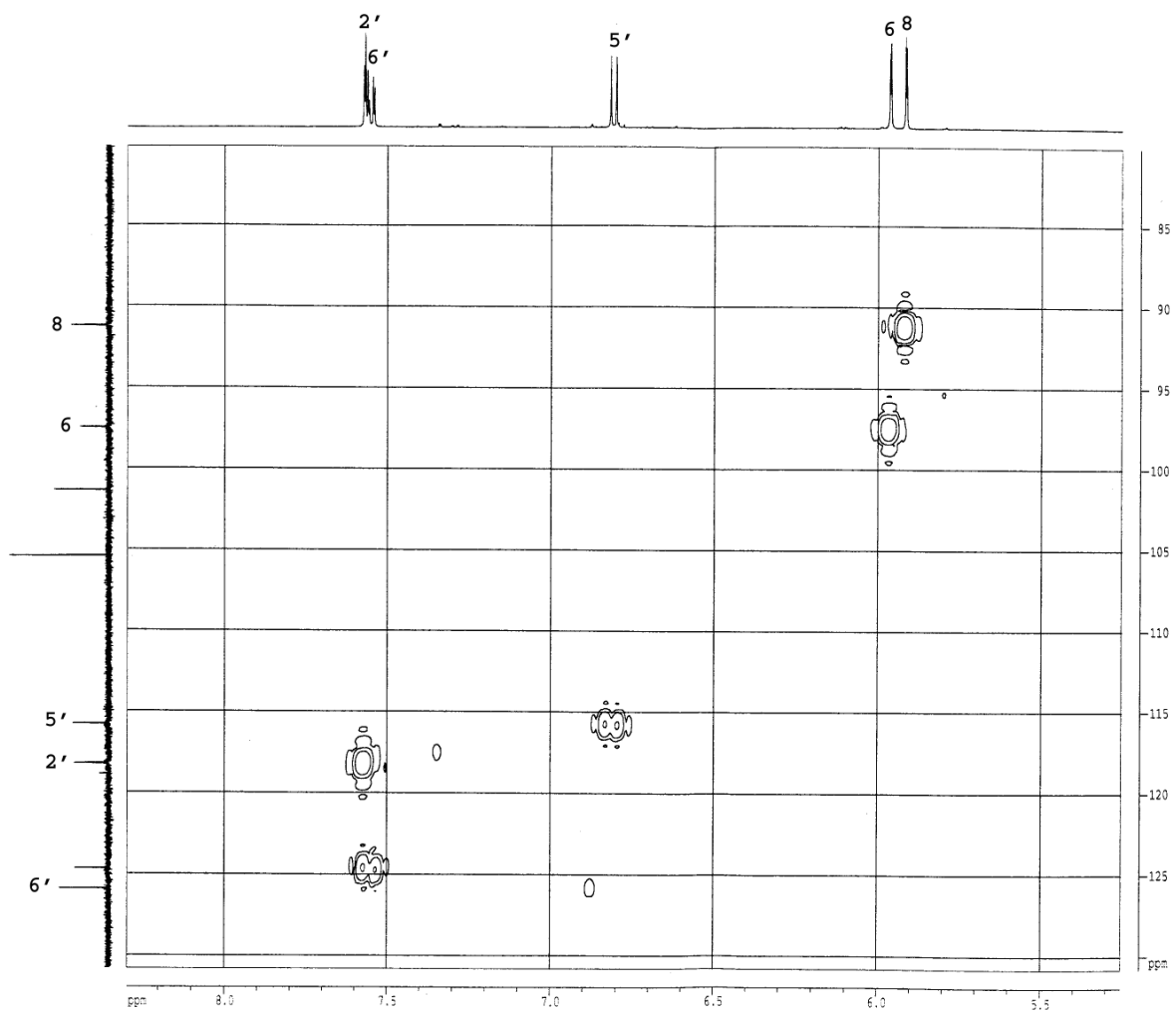
Die Korrelationen der fünf aromatischen Protonen mit den jeweils direkt verknüpften Kohlenstoff-Kernen wurden anschließend mittels HMQC (*Hetero Nuclear Multiple Quantum Correlation*) [93] ermittelt (Abb. 2.23). Die Ergebnisse bestätigten die anhand des Inkrement-Systems getroffenen Zuordnungen (Tab. 2.1) und erlaubten die Bestimmung von H-6 (5,96 ppm) und H-8 (5,92 ppm).

Auf diesen Erkenntnissen basierend wurde das HMBC-Experiment ausgewertet (Abb. 2.24 und 2.25), das eine klare Entscheidung für das Vorliegen des 2-(3,4-Dihydroxybenzoyl)-2,5,7-trihydroxy-2H-benzofuran-3-ons zuließ. Ein Überblick über die Interpretation findet sich in Tabelle 2.6.

Alle fünf phenolischen Protonen erzeugen scharfe, deutlich voneinander getrennte Signale, die eine Zuordnung zulassen. OH-2 wird durch seine intensive Kopplung mit C-2 erkannt, während OH-5 und OH-7 durch die jeweiligen Wechselwirkungen mit C-5, C-6 und C-10 bzw. C-6, C-7 und C-8 charakterisiert sind. Gleichermaßen sind OH-3' und OH-4' durch die Signale mit C-2', C-3' und C-4' bzw. C-3' und C-5' zu erkennen. Damit sind die chemischen Verschiebungen aller zehn Protonen der Verbindung festgelegt.

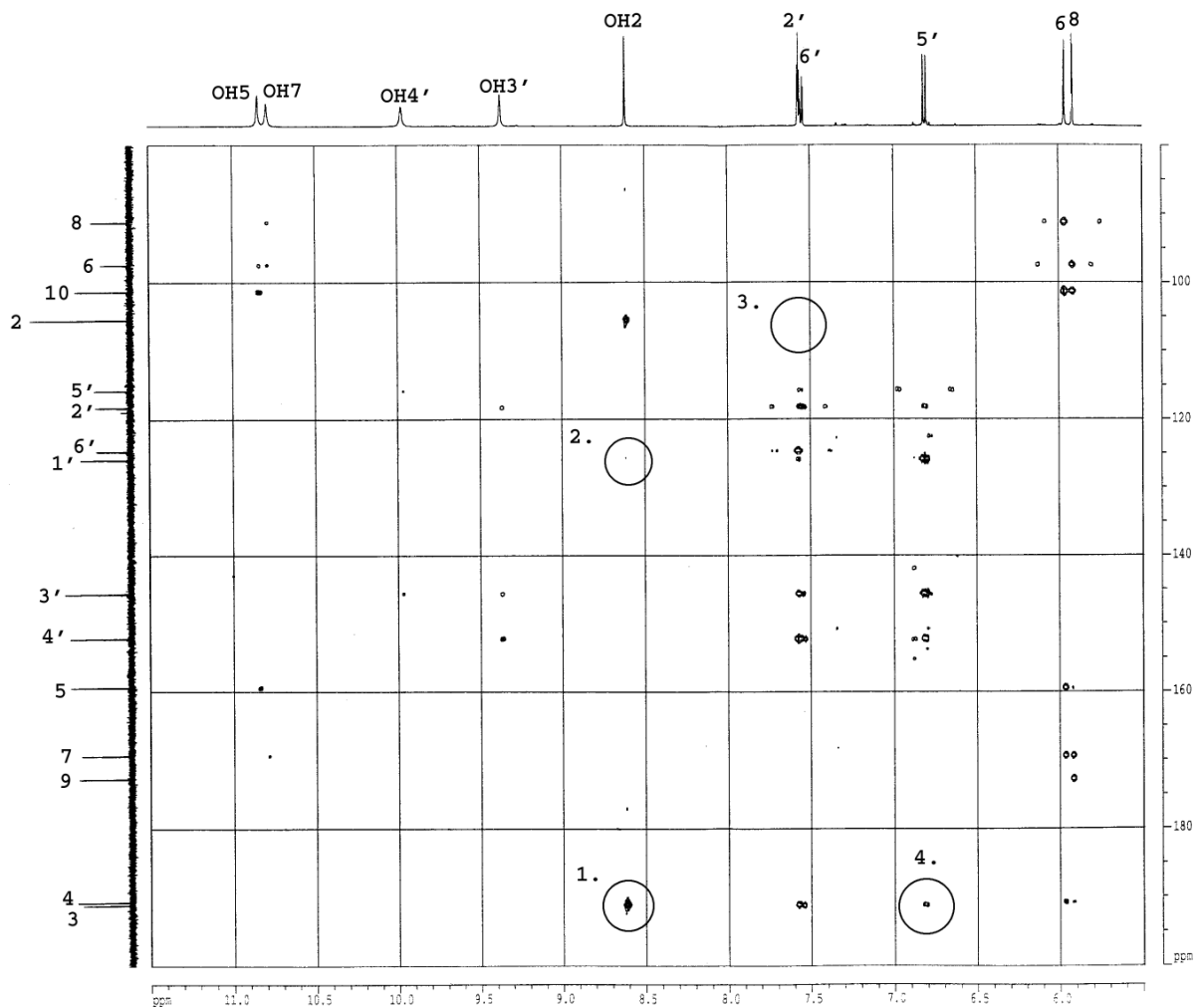
Daraus abgeleitet sind für die Entscheidung für das Benzofuranon und gegen das Benzopyrandion vier Kriterien maßgebend, :

1. OH-2 koppelt in gleicher Intensität mit den Carbonyl-C-Atomen C-3 und C-4: im Benzopyrandion ist eine starke Kopplung OH-2  $\leftrightarrow$  C-3, aber keine Kopplung OH-

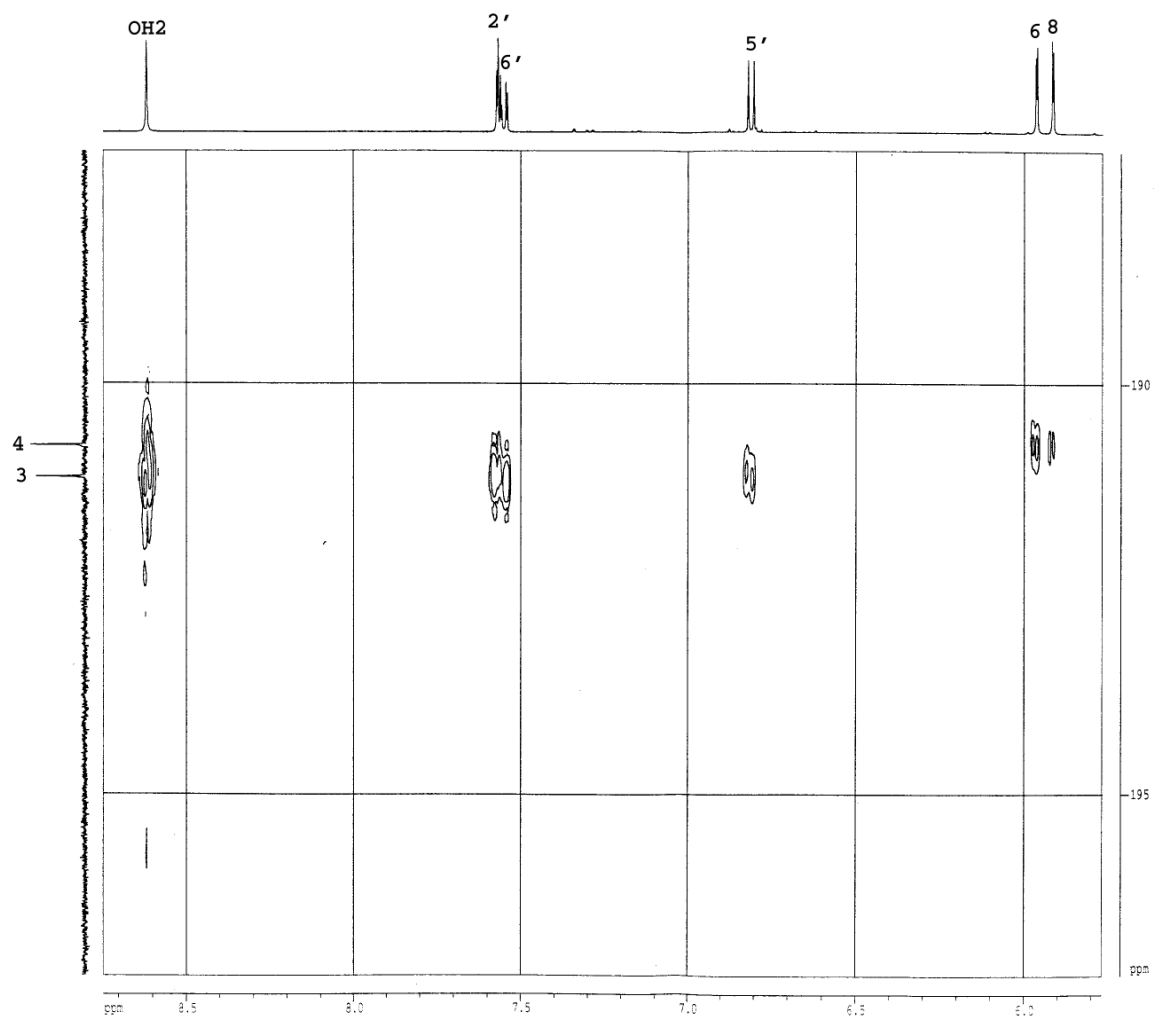


**Abbildung 2.23:** Ausschnitt aus dem HMBC-NMR des oxidierten Quercetin: Kopplung zwischen C-Kernen und ihren fünf direkt gebundenen aromatischen Protonen (obere Spur: aromatische Protonen; linke Spur: C-Kerne).

### 2.3. DARSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG OXIDIERTER FLAVONOLE 73



**Abbildung 2.24:** HMBC-NMR des oxidierten Quercetin: Korrelation zwischen C-Kernen und Protonen über zwei bis vier Bindungen hinweg (obere Spur: aromatische und phenolische Protonen; linke Spur: C-Kerne); Eingekreist sind die Signale, die für die Interpretation die größte Bedeutung haben (siehe Aufzählung im Text).



**Abbildung 2.25:** Ausschnitt aus dem HMBC-NMR des oxidierten Quercetin: die Kopplungen der beiden Carbonyl-C-Atome C-3 und C-4 mit den jeweiligen Protonen sind hier deutlich zu erkennen (Punkte 1. und 4. der Aufzählung im Text).

### 2.3. DARSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG OXIDIERTER FLAVONOLE 75

**Tabelle 2.6:** HMBC-NMR des oxidierten Quercetin: Zuordnung der chemischen Verschiebungen und Kopplungen

C-Atom	$\delta$ [ppm]	H-Atom	$\delta$ [ppm]	Bindungen
2	105,5	OH 2	8,60	2
		<i>nicht</i> 2'	7,59	4
		<i>nicht</i> 6'	7,55	4
3	191,1	2'	7,59	3
		6'	7,55	3
		5'	6,82	4
		OH 2	8,60	3
4	190,6	6	5,95	4
		8	5,92	4
		OH 2	8,60	3
5	159,4	6	5,95	2
		8	5,92	4
		OH 5	10,85	2
6	97,4	8	5,92	3
		OH 7	10,78	3
		OH 5	10,85	3
7	169,3	6	5,95	2
		8	5,92	2
		OH 7	10,78	2
8	91,3	6	5,95	3
		OH 7	10,78	3
9	172,8	8	5,92	2
10	101,4	6	5,95	3
		8	5,92	3
		OH 5	10,85	3
1'	125,9	5'	6,82	3
		2'	7,59	2
		<i>nicht</i> OH 2	8,60	4
2'	118,1	6'	7,55	3
		5'	6,82	4
		OH 3'	9,36	3
3'	145,5	5'	6,82	3
		2'	7,59	2
		OH 4'	9,95	3
		OH 3'	9,36	2
4'	152,2	2'	7,59	3
		6'	7,55	3
		5'	6,82	2
		OH 3'	9,36	2
5'	115,7	2'	7,59	4
		OH 4'	9,95	3
6'	124,6	2'	7,59	3

2 ↔ C-4 über vier Bindungen über das Heteroatom hinweg hinweg zu erwarten, während im Benzofuranon jeweils drei Bindungen zwischen den jeweiligen Kernen liegen.

2. OH-2 koppelt nicht mit C-1': im Benzopyrandion ist diese Kopplung über drei Bindungen zu erwarten, während sie im Benzofuranon ausgeschlossen ist.
3. C-2 koppelt weder mit H-2' noch mit H-6': im Benzopyrandion sind diese Signale wahrscheinlich (je drei Bindungen), während im Benzofuranon vier Bindungen zwischen den Kernen liegen.
4. C-3 koppelt mit H-5': im Benzopyrandion über fünf Bindungen ausgeschlossen, im Benzofuranon dagegen über vier Bindungen möglich.

Die Entscheidung für die furanoide Struktur fußte damit auf der Anwesenheit von drei Signalen und der gleichzeitigen Abwesenheit von zwei Signalen in dem Spektrum. Sie ist somit deutlich stärker untermauert als das oben erwähnte Fehlen des Signals für eine H-Brücke im  $^1\text{H-NMR}$ .

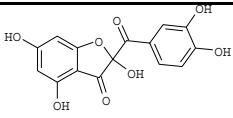
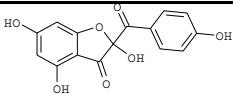
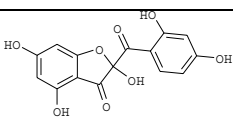
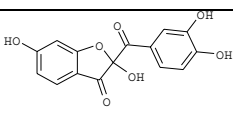
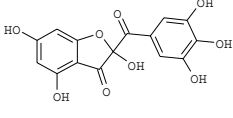
Darüberhinaus erlaubten die HMBC-Ergebnisse weitere Klarstellungen, die aufgrund der in der Literatur angegebenen Werte für die chemischen Verschiebungen der C-Atome 5, 7 und 9 notwendig erscheinen:

- C-5 liegt bei 159,4 ppm, C-9 tieffeldverschoben bei 172,8 ppm, folgend aus:  
Kopplung von C-5 mit OH-5, H-6 und H-8  
Kopplung von C-9 nur mit H-8
- C-7 liegt bei 169,3 ppm, C-9 tieffeldverschoben bei 172,8 ppm, folgend aus:  
Kopplung von C-7 mit OH-7, H-6 und H-8  
Kopplung von C-9 nur mit H-8

Die mit Hilfe von NMR-Spektroskopie gelungene eindeutige Festlegung der Molekülstruktur der untersuchten Verbindungen (Abb. 2.26) ist notwendige Voraussetzung für eine fehlerfreie Interpretation der im folgenden beschriebenen Massenspektrometrie.



### 2.3. DARSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG OXIDIERTER FLAVONOLE 77

Struktur	systematischer Name	Edukt
	2-(3,4-Dihydroxybenzoyl)- 2,4,6-trihydroxy-2H-1-benzofuran-3-on	Quercetin
	2-(4-Hydroxybenzoyl)- 2,4,6-trihydroxy-2H-1-benzofuran-3-on	Kaempferol
	2-(2,4-Dihydroxybenzoyl)- 2,4,6-trihydroxy-2H-1-benzofuran-3-on	Morin
	2-(3,4-Dihydroxybenzoyl)- 2,6-dihydroxy-2H-1-benzofuran-3-on	Fisetin
	2-(3,4,5-Trihydroxybenzoyl)- 2,4,6-trihydroxy-2H-1-benzofuran-3-on	Myricetin

**Abbildung 2.26:** Strukturen und systematische Namen der durch kationen-induzierte Oxidation dargestellten oxidierten Flavonole (ox. Myricetin nicht eindeutig charakterisiert).

## 2.3.4 Massenspektrometrie

### 2.3.4.1 Einleitung

Ziel der massenspektrometrischen Untersuchungen war zum einen die zusätzliche Verifizierung der bisherigen spektroskopischen Daten. Vorrangig aber wurde angestrebt, eine selektive Detektionsmethode für die HPLC der oxidierten Flavonole zu entwickeln. In der Literatur sind zwar massenspektrometrische Verfahren beschrieben, die zur Identifizierung der Benzopyrandione bzw. Benzofuranone herangezogen wurden [68, 67], diese zielten aber lediglich darauf ab, die Molekularmasse der Verbindungen zu bestimmen. Aus diesem Grund sind sie keineswegs genügend selektiv und folglich nicht für eine sichere Detektion der Verbindungen geeignet. Die Molekularmassen der analysierten Flavonole liegen im Bereich von 286 g/mol bis 318 g/mol, mit Differenzen von jeweils 16 g/mol. Mit der Oxidation ist stets eine Steigerung ebenfalls um 16 g/mol verbunden. Das heißt aber, daß Molekularmassen von Edukten und Produkten der Reaktionen exakt übereinstimmen können (z.B.: Quercetin: 302 g/mol, oxidiertes Kaempferol: 302 g/mol). Sollte es also bei der Chromatographie zu einer Koelution von Benzofuranonen mit in der Matrix vorhandenen Flavonolen oder anderen Verbindungen entsprechender Masse kommen, ließe sich über die Masse alleine nicht entscheiden, um welchen Verbindungstyp es sich handelt. Dementsprechend wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit mehrere massenspektrometrische Techniken angewendet, die anhand der Fragmentierung der Verbindungen eindeutig Auskunft über ihre Identität geben.

Durch die unterschiedlichen Substitutionsmuster der untersuchten Verbindungen war es dabei möglich, durch vergleichende Messungen eine eindeutige Zuordnung von Signalen in den Massenspektren zu Fragmenten der Moleküle zu machen. Die Verwendung von mehreren Flavonolen war also nicht nur in Bezug auf die Untersuchung der Komplexbildungseigenschaften der Verbindungen, sondern auch im Hinblick auf das massenspektrometrische Verhalten der oxidierten Flavonole sinnvoll und notwendig.

### 2.3.4.2 PBI-EI/MS, PBI-NCI/MS

Massenspektrometrische Messungen mit Elektronenstoßionisation zur Charakterisierung von Flavonoiden werden bereits seit Jahrzehnten durchgeführt, und die charakteristischen Fragmentierungsreaktionen der verschiedenen Verbindungsklassen sowie etlicher Einzelverbindungen wurden intensiv erforscht [94]. Die zunächst im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Flavonole lieferten erwartungsgemäß die in der Literatur beschrieben

Spektren. Darauf aufbauend wurde anschließend die Fragmentierung der Benzofuranone erstmals untersucht.

Die Proben wurden durch ein Particle Beam Interface (PBI) in das Massenspektrometer eingebracht. Im Fließinjektions-Modus floß ein permanenter Strom des Eluenten in das Interface. Die Probenaufgabe erfolgte über ein HPLC-Mehrwegeventil. Zur massenspektrometrischen Charakterisierung der Referenzsubstanzen ohne HPLC-Trennung wurde als Eluent 100 % Acetonitril gewählt. Unter diesen Bedingungen war die Ausbeute an Partikeln, die in die Ionenquelle gelangen konnten, maximal. Ein Zumischen von wäßriger Essigsäure zum Eluenten, wie es für die HPLC-Trennung notwendig war, führte zu deutlichen Empfindlichkeitsverlusten.

Charakteristisch für die Massenspektren der Flavonole sind zwei Fragmente aus den Ringen A und B, die aus einer Spaltung des C-Rings durch eine Retro-Diels-Alder-Reaktion resultieren [94]. Die verschiedenen Substitutionsmuster in den hier vermessenen Flavonolen führten dementsprechend zu charakteristischen Massenspektren, bei denen der Molekularpeak  $[M^+]$  durchweg den Basispeak darstellte. Die relativen Intensitäten der Fragmente lagen in etwa zwischen 5 % und 15 % des Basispeaks.

Im Vergleich zu den Flavonolen lag der Molekularpeak bei den Benzofuranonen wie erwartet um 16 amu höher als der des jeweiligen Edukts der Oxidation. Dadurch wurden die Ergebnisse der NMR-Messungen gestützt. Das Fragmentierungsverhalten der Benzofuranone unterschied sich insofern von dem der Flavonole, daß  $[M^+]$  nicht den Basispeak darstellte und nur eine relative Intensität von unter 10 % hatte<sup>6</sup> (Abb. 2.27). Die Benzofuranone besitzen folglich eine vergleichsweise niedrigere massenspektrometrische Stabilität, was auf den Verlust der Aromatizität des C-Rings und die Ausbildung eines Fünfrings im Verlauf der Oxidation des Flavonols zurückgeführt werden kann.

Der zweite deutliche Unterschied zwischen den Spektren der Flavonole und Benzofuranone ist das Auftreten eines zusätzlichen Peaks im Spektrum der oxidierten Flavonole. Für die Benzofuranone mit einer Dihydroxysubstitution im B-Ring (aus Quercetin, Fisetin, Morin) ist dies die Masse  $m/z$  154, für das monohydroxy-substituierte oxidierte Kaempferol die Masse  $m/z$  138 (Tab. 2.7). Diese Fragmente ließen sich dementsprechend dem B-Ring zuordnen. Eine Bibliothekssuche sowie ein Vergleich mit in der Literatur angegebenen Massenspektren [95] von Verbindungen mit den Massen  $m/z$  154 bzw.  $m/z$  138 und den daraus möglicherweise resultierenden Fragmenten  $m/z$  137 und 109 bzw.  $m/z$  121 und 93 lieferte als mögliche Ergebnisse Dihydroxy- bzw. Monohydroxybenzoesäure (Molekularmassen von

---

<sup>6</sup>Unter gleichen Meßbedingungen war das Auftreten von  $[M^+]$  in den Spektren nicht immer reproduzierbar.

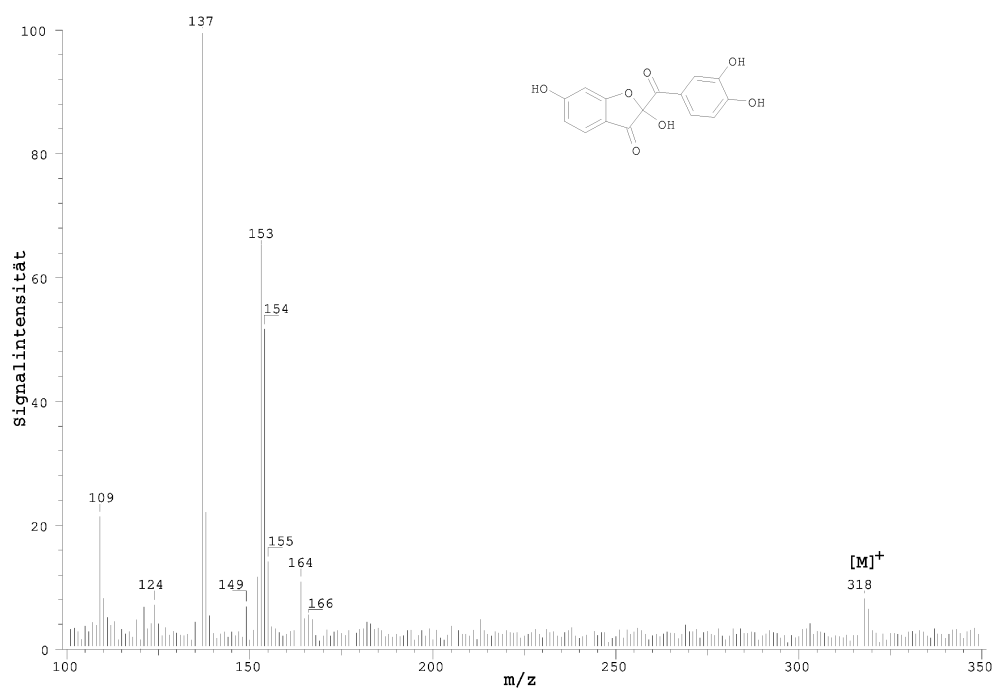


Abbildung 2.27: Massenspektrum des oxidierten Quercetin (EI, 70 eV).

Tabelle 2.7: Fragmente in den EI-Massenspektren der Flavonole und Benzofuranone (ox. = oxidiert): bei den Benzofuranonen zusätzlich auftretende Massen sind *hervorgehoben*.

Verbindung	M <sup>+</sup>	Fragmente [m/z]
Quercetin	302	302, 153, 137, 109
Quercetin ox.	318	<u>154</u> , 153, 137, 109
Kaempferol	286	286, 153, 121, 93
Kaempferol ox.	302	153, <u>138</u> , 121, 93
Morin	302	302, 285, 153, 137, 121
Morin ox.	318	<u>154</u> , 153, 137, <u>136</u> , <u>126</u> , 121
Fisetin	286	286, 137, 121, 120, 109
Fisetin ox.	302	<u>154</u> , 137, 121, 120, 109

154 amu bzw. 138 amu). Eine Zuordnung von diesen Massen zu Fragmenten mit anderen Strukturen als denen der Benzoessäurederivate ließ sich nicht sinnvoll durchführen. Dies bedeutete für das Fragmentierungsverhalten der Benzofuranone, daß wahrscheinlich in der Ionenquelle eine Umlagerung von OH-2 an die Carbonylgruppe des Benzoylrestes abgelaufen ist, die zu den entsprechenden Hydroxybenzoensäuren führte. Aus diesen Daten wurde ein Fragmentierungsschema abgeleitet (Abb. 2.28). Die Wechselwirkung zwischen dem B-Ring und der halbketalischen OH-Gruppe konnte auch bei der Fragmentierung im Ion trap MS festgestellt werden und wird daher weiter unten nochmals aufgegriffen (s. 2.3.4.3, S. 83).

Die zusätzlichen Fragmente, die im Spektrum des oxidierten Morin auftraten, sind auf eine Beeinflussung der Fragmentierung durch die OH-Gruppe an 2' zurückzuführen, wie sie auch für Morin selbst und andere 2'-Hydroxyflavonoide beschrieben ist [94].

Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Messungen mit EI bestätigten die Strukturzuordnung, die anhand der NMR-Daten gemacht wurde. Die Methode erfüllte die Voraussetzungen für ihren Einsatz zur selektiven massenspektrometrischen Detektion der Benzofuranone aber aus zwei Gründen nur eingeschränkt. Erstens war die Detektion von  $[M^+]$  nicht reproduzierbar möglich, da die Fragmentbildung im EI-Modus zu stark ausgeprägt war. Dadurch würde bei der Detektion der Verbindungen die Information über die Molekularmasse fehlen. Zweitens trat in den Spektren im Vergleich zu den Flavonolen nur ein zusätzlicher Peak auf. Da dessen Fragmentierung der von Hydroxybenzoensäuren entspricht, die weit verbreitete Pflanzeninhaltsstoffe sind [95], sind Fehlinterpretationen leicht möglich.

Aus diesen beiden Gründen wurde untersucht, ob sich die Chemische Ionisation (CI) besser zur Detektion der Benzofuranone eignet. Bei der CI wird ein Reaktandgas (hier: Methan) durch Beschuß mit Elektronen ionisiert und kann dann mit den Analytmolekülen in der Ionenquelle auf verschiedene Arten reagieren. Möglich sind

1. die Entstehung von Kationen durch Protonentransfer, Ladungsaustausch, elektrophile Addition oder Anionenabstraktion,
2. die Entstehung von Anionen durch Abspaltung eines Protons, oder
3. die Entstehung von Radikal-Anionen durch Einfang thermischer Elektronen mit niedriger Energie [91, 78].

Bei der Messung der Benzofuranone im positiven Modus der CI konnten keine Kationen ( $[M]^+$  oder  $[M+H]^+$ ) detektiert werden, so daß Möglichkeit (1) ausschied. Dahingegen wur-

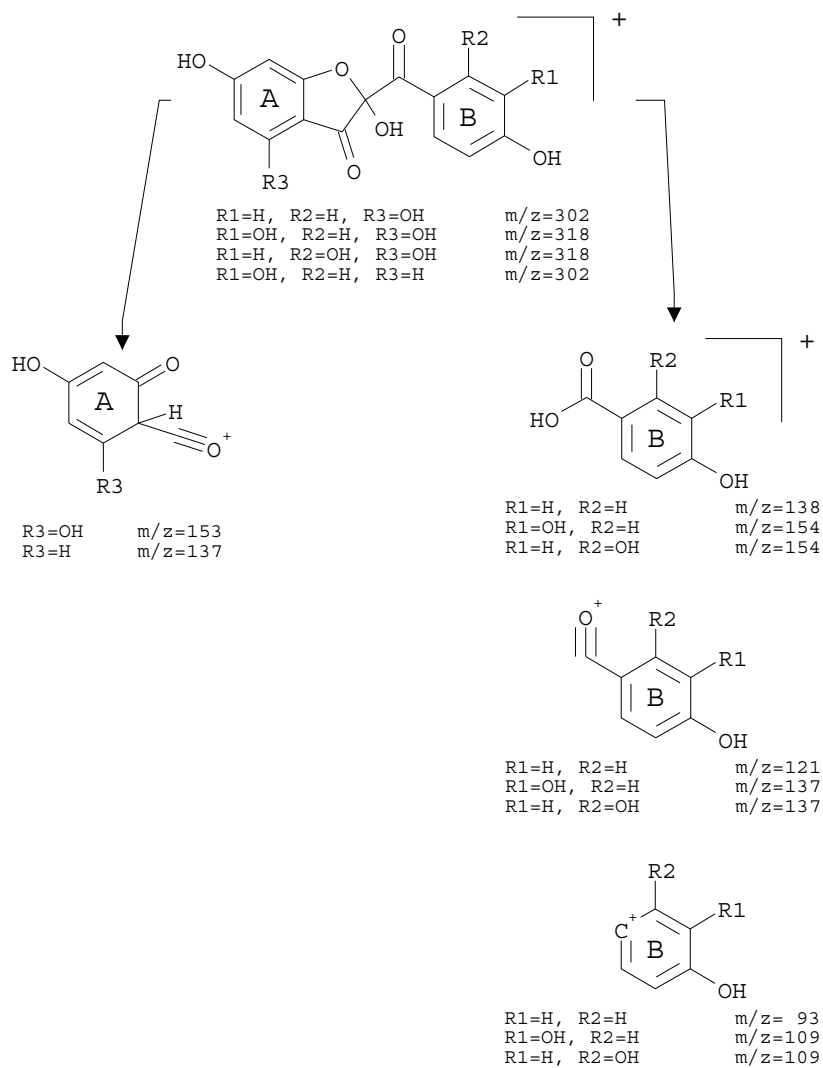


Abbildung 2.28: Fragmentierungsschema der untersuchten Benzofuranone (EI, positiv).

den bei allen der untersuchten Verbindungen bei Negativer Chemischer Ionisation (NCI) Signale bei den Massen  $[M]^-$ , nicht aber  $[M-H]^-$  registriert. Die Benzofuranone wurden also durch eine Elektroneneinfangreaktion ionisiert. Diese gilt als hoch selektive Ionisierungsmethode, da nur eine begrenzte Zahl von Analyten effizient Elektronen einfangen können [78].

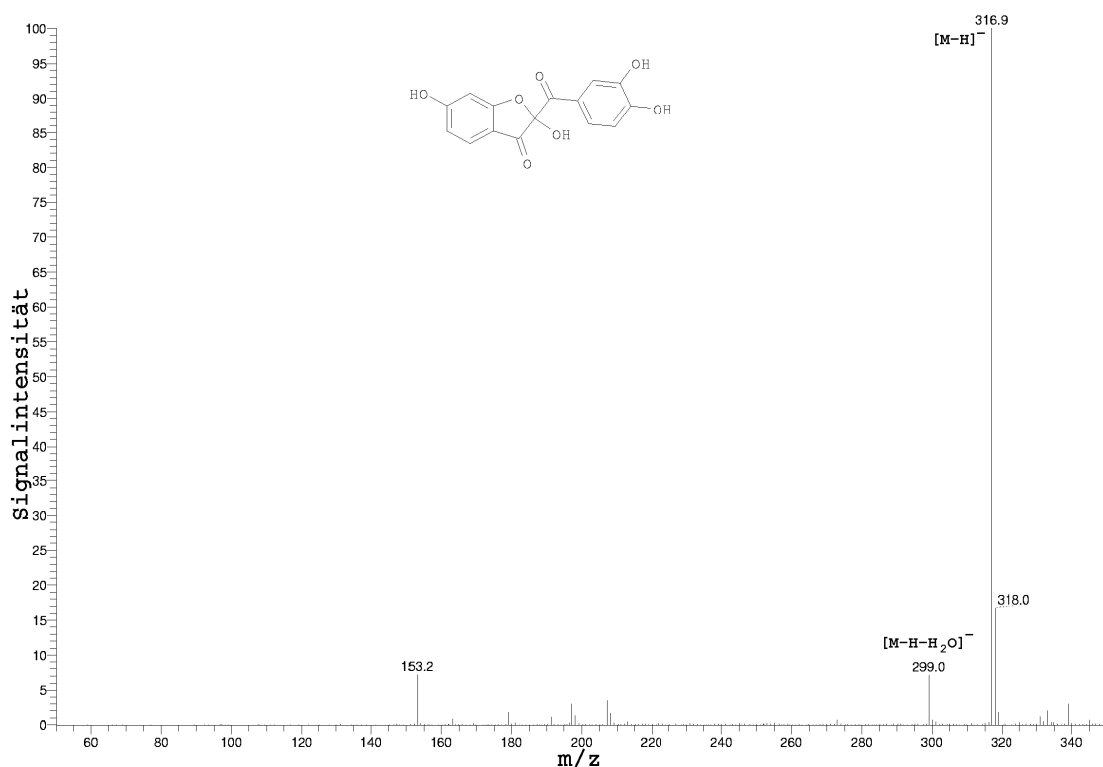
Im Verlauf der Messungen zeigte sich, daß das Verhalten der Analyten im Massenspektrometer stark variierte. Es konnten Spektren aufgenommen werden, in denen für alle untersuchten Verbindungen neben  $[M]^-$  keine weiteren Peaks registriert wurden. Unter den gleichen Meßbedingungen (Temperatur, Druck, Flußrate der HPLC) war später eine starke Fragmentierung aller untersuchten Verbindungen zu beobachten, bei der die Intensität von  $[M]^-$  nur noch zwischen 5 % und 30 % des Basispeaks betrug. Starke Unterschiede in der Signalintensität sowie in der Stärke der Fragmentierung wurden auch bei der Verwendung verschiedener Ionenquellen festgestellt. Reproduzierbare Bedingungen als notwendige Voraussetzung für eine Verwendung der sehr selektiven Negativen Chemischen Ionisation zur massenspektrometrischen Detektion der Benzofuranone ließen sich demnach nicht erreichen.

#### 2.3.4.3 ESI-Ion trap MS

Im Vergleich zu dem verwendeten PBI/EI-NCI-MS bot der Einsatz eines ESI-Ion trap MS mehrere wichtige Vorteile. Erstens war wegen der hohen Polarität der Benzofuranone eine deutlich höhere Empfindlichkeit bei Einsatz des Elektrospray-Interface zu erwarten [78, 77]. Zweitens versprach die Möglichkeit der gezielten Fragmentierung einzelner Massen in der Ionenfalle eine hohe Selektivität, die wie oben beschrieben mit EI nicht erreicht werden konnte.

Mittels ESI-Ion trap MS wurde sowohl das Fragmentierungsverhalten der Benzofuranone, als auch das der Flavonole untersucht. Zunächst wurde ermittelt, welche der beiden Detektionsarten (Kationen oder Anionen) die sensitivere und selektivere für die Benzofuranone ist. Darauf aufbauend wurden charakteristische Spektren aller Verbindungen aufgenommen, um ein Fragmentierungsschema herleiten zu können.

Wie aus den Versuchen mit CI zu erkennen war, können die Benzofuranone im Massenspektrometer leicht Anionen bilden. Diese Beobachtung wurde auch mit ESI-Ion trap MS bestätigt. Für alle Benzofuranone wurden Signale für die Masse  $[M-H]^-$  erhalten. Vor kurzem wurde von Häkkinen und Auriola [76] die massenspektrometrische Detektion von Flavonolen mit ESI-Ion trap MS und Kationendetektion beschrieben. Da die in der vor-



**Abbildung 2.29:** Massenspektrum des oxidierten Quercetin (ESI, Anionendetecktion, keine induzierte Fragmentierung: MS<sup>1</sup>).

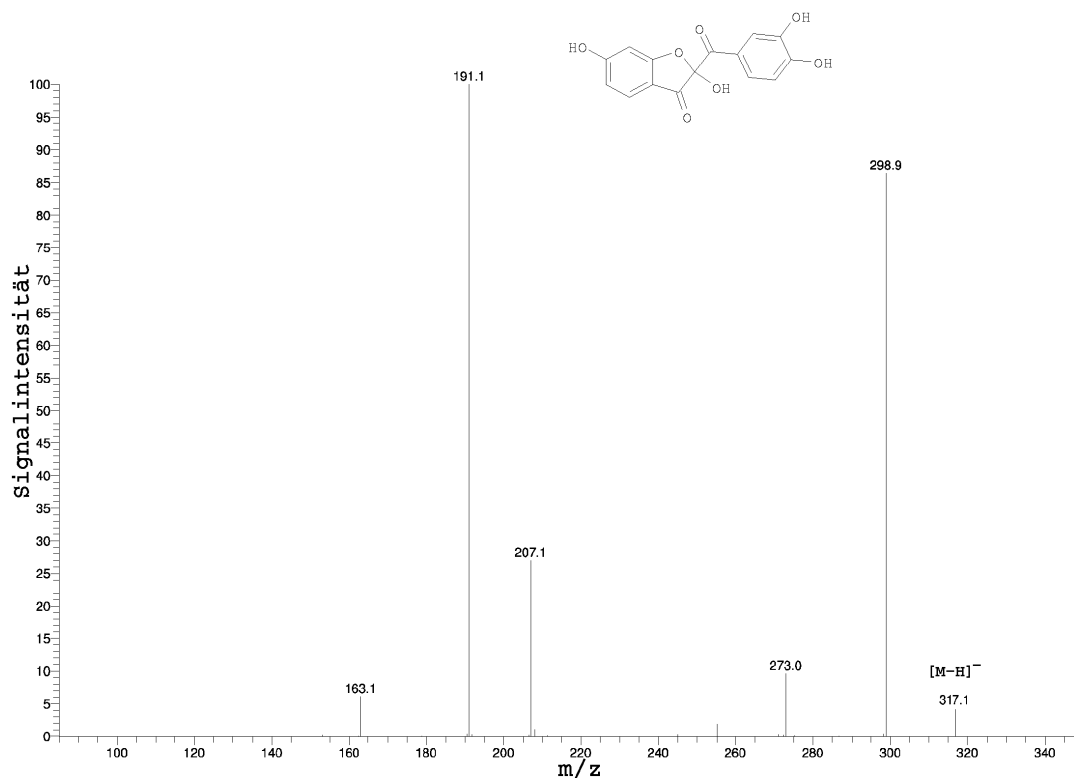
liegenden Arbeit untersuchten Verbindungen sich aber empfindlich mit Anionennachweis detektieren ließen, wurde ausschließlich diese stärker selektive Methode bei den Untersuchungen verwendet.

Die Massenzunahme um 16 amu gegenüber den Flavonolen im Laufe der Oxidationsreaktion wurde in den Spektren der Benzofuranone bestätigt. [M-H]<sup>-</sup> stellte in allen Fällen den Basispeak dar. Die im Vergleich zu den Flavonolen geringere massenspektrometrische Stabilität der Verbindungen wurde aber auch hier offenbar. Im Massenspektrum traten auch ohne *induzierte* Fragmentierung Bruchstücke auf (Abb. 2.29). Weil diese jedoch nur von schwacher Intensität waren, wurden, um weitere Aussagen über das Fragmentierungsverhalten der Verbindungen zu erhalten, die jeweiligen Pseudomolekularionen in der Ionenfalle energetisch angeregt. Dies wurde so durchgeführt, daß in den resultierenden Spektren die Intensität der entsprechenden Ausgangsionen jeweils etwa 10 % des neuen Basispeaks betrug<sup>7</sup>.

<sup>7</sup>Die in der Software einstellbaren Fragmentierungsenergien sind relative Werte ohne Einheit, die manuell für das gerade gemessene Spektrum zu variieren sind; konkrete Werte werden daher hier nicht angegeben.



### 2.3. DARSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG OXIDIERTER FLAVONOLE 85

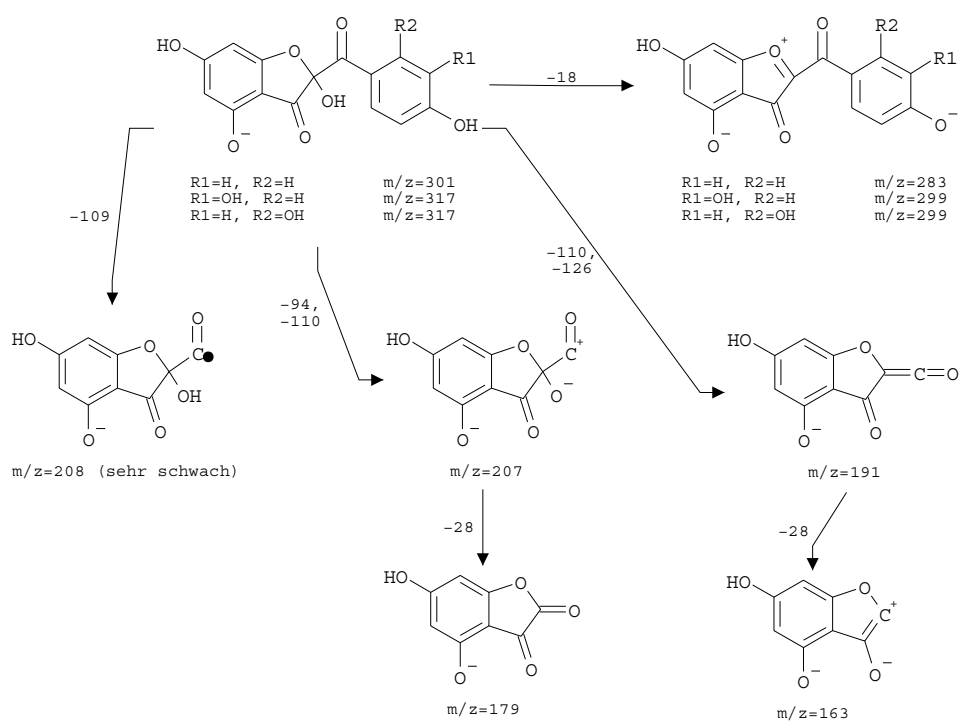


**Abbildung 2.30:** Massenspektrum ( $MS^2$ ) des oxidierten Quercetin (ESI, Anionendetektion, Fragmentierung von  $[M-H]^-$  ( $m/z$  317)).

Im ersten Fragmentierungsschritt ( $MS^2$ ) resultierten dadurch charakteristische Fragmentationen (Abb. 2.30), die sich deutlich von den mit EI und CI erhaltenen unterscheiden. Anschließend wurden diese Tochterionen gezielt in der Quelle angereichert und erneut fragmentiert ( $MS^3$ ). Aus diesen Daten konnte für alle oxidierten 5-OH-Flavonole<sup>8</sup> ein qualitatives Schema entwickelt werden (Abb. 2.31). Daraus ist zwar ersichtlich, daß gleiche Fragmente bei mehreren Verbindungen registriert werden konnten. Die Intensitätsmuster waren in den Spektren aber deutlich voneinander verschieden. Ebenso zeigt der Vergleich zwischen den Massenspektren der Benzofuranone mit denen der Flavonole jeweils gleicher Masse, daß hier zwar teilweise übereinstimmende Fragmente zu finden, deren Intensitätsverteilungen aber unterschiedlich sind (Abb. 2.32). Die angestrebte hohe Selektivität für die weiter unten beschriebene Detektion nach HPLC-Trennung war demnach auf jeden Fall gegeben.

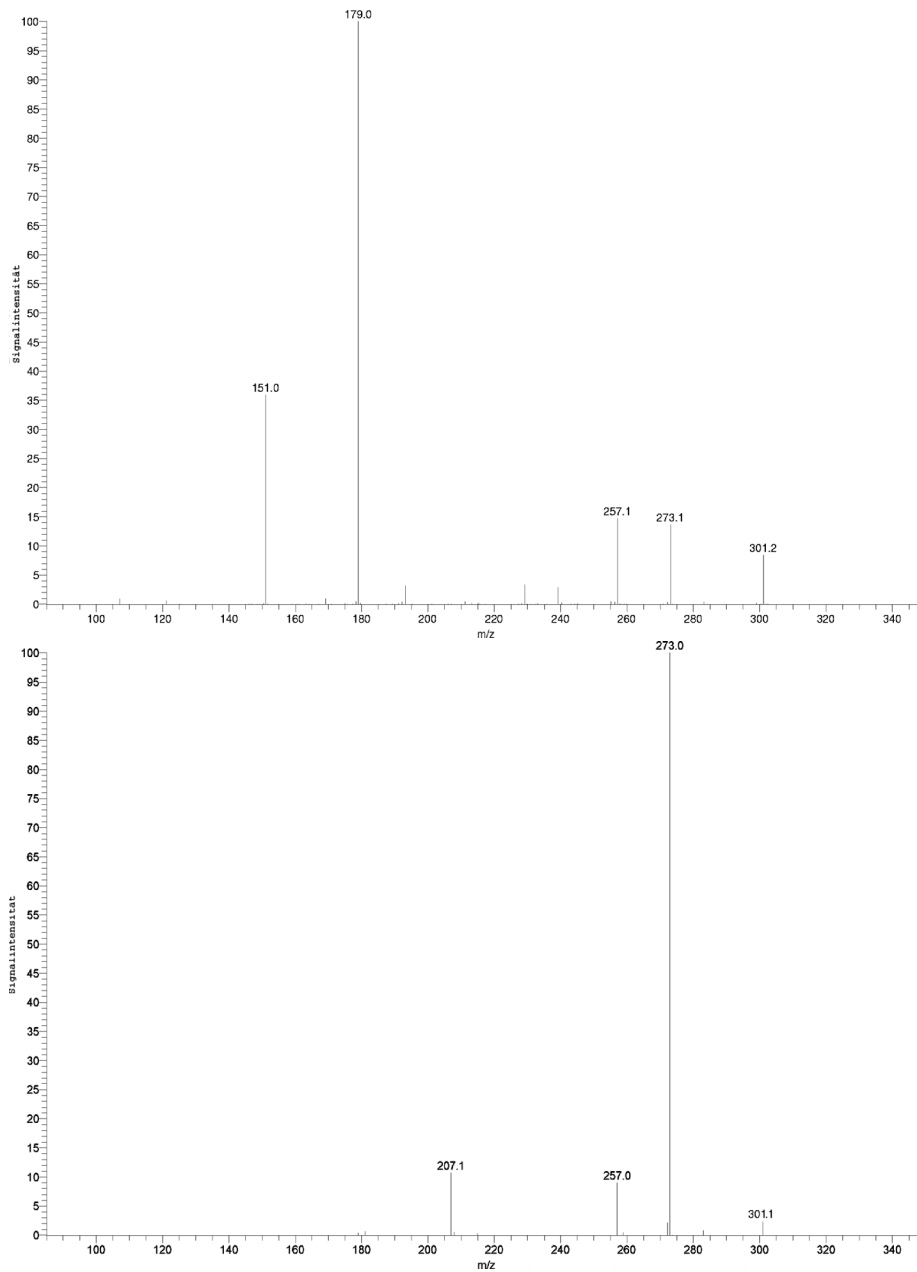
Auf die Interpretation der Spektren und auf Besonderheiten für die jeweiligen Benzofuranone soll nun näher eingegangen werden. Wie schon bei den EI-Spektren erläutert, gab

<sup>8</sup>Auf die Besonderheiten des oxidierten Fisetins wird weiter unten eingegangen.



**Abbildung 2.31:** Fragmentierungsschema (bis MS<sup>3</sup>) der untersuchten 5-OH-Benzofuranone (ESI, Anionendetektion).

### 2.3. DARSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG OXIDIERTER FLAVONOLE 87



**Abbildung 2.32:** Vergleich der Massenspektren ( $MS^2$ ) von Quercetin (oben) und oxidiertem Kaempferol (unten) (Anionendetektion, Fragmentierung von  $[M-H]^-$  ( $m/z$  301)).

es auch bei den hier diskutierten Ergebnissen Hinweise darauf, daß bei den Fragmentierungsreaktionen Wechselwirkungen zwischen dem Benzoylrest (B-Ring) und dem C-Ring auftreten. Die Substitution des B-Rings hat dabei Einfluß auf die Intensitätsverteilung der einzelnen Fragmente. Ein Verlust von Wasser (18 amu) konnte zwar bei allen untersuchten Benzofuranonen beobachtet werden, die Intensitäten der Massen  $m/z$  299 und  $m/z$  283 unterschieden sich aber beträchtlich. Beim oxidierten Kaempferol (nur eine OH-Gruppe im B-Ring) ist die relative Intensität von  $[M-H-H_2O]^-$  nur 2 %, während sie für die disubstituierten Oxidationsprodukte des Quercetin, Morin und Fisetin jeweils 90 %, 18 % und 15 % betragen. Dies könnte für eine Eliminierung von Wasser aus dem B-Ring selbst sprechen, es kann aber auch eine Protonierung von OH-2 durch eine der phenolischen OH-Gruppen oder umgekehrt in Betracht gezogen werden. Daß diese Wechselwirkung existiert, wird durch die Beobachtung gestützt, daß bei allen 5-OH-Benzofuranonen die Fragmente  $m/z$  207 und  $m/z$  191 auftreten, wenn auch in unterschiedlichen Intensitäten. Da die Zahl der OH-Gruppen des B-Rings dabei *qualitativ* keine Rolle spielt, muß angenommen werden, daß die Fragmente aus dem A- und C-Ring stammen. Die Differenzen von 110 amu ( $m/z$  317 –  $m/z$  207) und 126 amu ( $m/z$  317 –  $m/z$  191) (oxidiertes Quercetin und Morin) bzw. 94 amu ( $m/z$  301 –  $m/z$  207) und 110 amu ( $m/z$  301 –  $m/z$  191) (oxidiertes Kaempferol) können nur durch einen *gemeinsamen* Verlust des B-Rings mit dem OH-2-Proton (109 amu + 1 amu bzw. 93 amu + 1 amu) oder der gesamten OH-2-Gruppe (109 amu + 17 amu bzw. 93 amu + 17 amu) erklärt werden. Beide Fragmente stammen, wie MS<sup>3</sup>-Experimente zeigten, direkt aus  $[M-H]^-$  und nicht aus einem der anderen Fragmente. Sie spalten dann beide CO (28 amu) ab und resultieren in  $m/z$  179 und  $m/z$  163. Alle diese Fragmente treten wie schon  $m/z$  283 beim oxidierten Kaempferol in signifikant niedrigerer Intensität auf, was die Rolle des B-Rings bestätigt. Das oxidierte Fisetin weicht in soweit leicht von dem aufgestellten Schema ab, daß hier nur die Fragmente  $m/z$  191 und  $m/z$  163 (mittlerer Weg in Abb. 2.31, OH-5 fehlt), nicht aber  $m/z$  175 und  $m/z$  147 (rechter Weg, OH-5 fehlt) registriert wurden.

Zusätzlich zu den in dem Schema angegebenen Massen war bei allen vier Benzofuranonen im ersten Fragmentierungsschritt (MS<sup>2</sup>) ein Fragment bei  $m/z$  273 zu beobachten, das direkt aus dem jeweiligen  $[M-H]^-$  stammte. Diese Masse stellte beim oxidierten Kaempferol und Morin den Basispeak dar, während es im oxidierten Quercetin und Fisetin eine relative Intensität von 10 % bzw. 6 % hatte. Als Abspaltprodukte kommen CO (28 amu,  $m/z$  301 –  $m/z$  273) und CO<sub>2</sub> (44 amu,  $m/z$  317 –  $m/z$  273) in Betracht. Eine sinnvolle Zuordnung einer Struktur zu diesem Fragmentes läßt sich nicht machen, es kann aber als

diagnostische Masse für alle vier Verbindungen herangezogen werden.

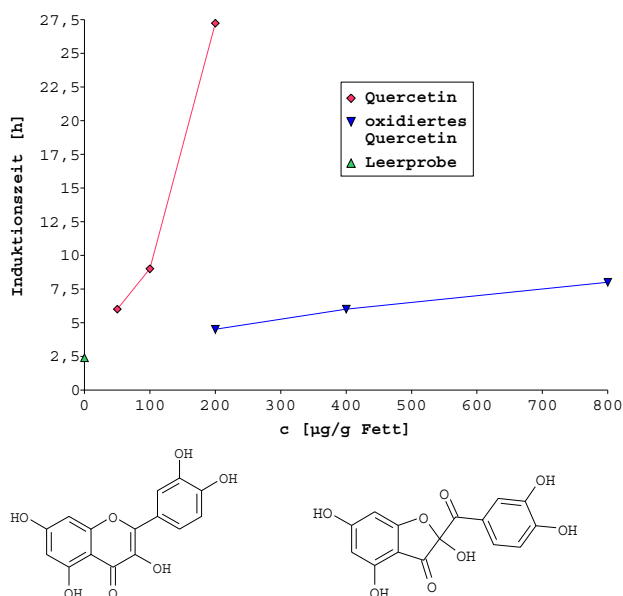
Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß die im Ion trap MS induzierte Fragmentierung der Benzofuranone sich mit den Strukturen, die NMR-spektroskopisch aufgeklärt wurden, eindeutig deckt und damit diese Ergebnisse untermauert. Die unterschiedlichen Strukturen der vier untersuchten Verbindungen resultieren in voneinander verschiedenen Massenspektren, die für das jeweilige Molekül charakteristisch sind. Die Mehrzahl der Fragmente findet sich bei allen Verbindungen gleichermaßen, und deren unterschiedliche Intensitätsverteilung wird eine selektive Identifizierung der Verbindungen nach HPLC-Trennung ermöglichen.

### 2.3.5 Antioxidative Eigenschaften

Für die Beurteilung der biologischen und lebensmitteltechnologischen Bedeutung der Oxidation der Flavonole ist von großem Interesse, inwieweit sich die Oxidation der Flavonole auf die antioxidativen Eigenschaften der Polyphenole auswirkt. Am Beispiel des oxidierten Quercetin, das im Vergleich zu dem Flavonol ein um 120 mV höheres Halbstufenpotential aufweist (s. 2.5.2.2, S. 96), wurde die antioxidative Wirksamkeit mit Hilfe von Rancimat-Tests untersucht.

Der Zusatz von phenolischen Antioxidantien zu Fett kann eine Verlängerung der Zeit bis zur vermehrten Entstehung flüchtiger Fettabbauprodukte bewirken [57]. Mit diesem Testsystem wurde untersucht, wie sich die Induktionszeiten in Abhängigkeit von der Konzentration an zugesetztem Quercetin und 2-(3,4-Dihydroxybenzoyl)-2-hydroxy-2H-1-benzofuran-3-on verändern. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.33 dargestellt.

Die graphische Darstellung zeigt, daß beide Verbindungen mit zunehmender Konzentration eine Verlängerung der Induktionszeit hervorriefen, also beide in diesem System antioxidativ wirkten. Der wesentlich geringere Anstieg der Kurve für das oxidierte Quercetin bedeutet aber, daß erwartungsgemäß durch die kationen-induzierte Oxidation die antioxidative Wirkung deutlich vermindert wurde. Daraus konnte geschlossen werden, daß für die antioxidative Wirksamkeit des Quercetin die 3',4'-Dihydroxy- und die 3-Hydroxy-Funktion im Aromaten gemeinsam verantwortlich sind. Der Wegfall von 3-OH durch die kationen-induzierte Oxidation bewirkte also eine deutliche Abnahme der antioxidativen Wirkung, auch wenn die 3',4'-Dihydroxyfunktion noch im Molekül vorhanden war. An diesem Beispiel wird erneut deutlich, daß - wie bei der komplexierenden Wirkung - für die Beurteilung der antioxidativen Wirksamkeit von Verbindungen die An- oder Abwesenheit einzelner funktioneller Gruppen nicht isoliert betrachtet werden darf. Vielmehr ist auch



**Abbildung 2.33:** Veränderung der Induktionszeiten der Oxidation von Schweineschmalz durch Zusatz von Quercetin und oxidiertem Quercetin.

hier entscheidend, in welcher strukturellen Umgebung diese funktionellen Gruppen stehen.

Eine quantitative Aussage über das Maß der Stärke als Antioxidans konnte aus den oben geschilderten Ergebnissen allerdings nicht entnommen werden. Sie dienten vielmehr als erster Anhaltspunkt für die große Bedeutung der in dieser Arbeit beschriebenen Oxidationsreaktionen. Es ist ersichtlich, daß Flavonole durch kationen-induzierte Oxidation in ihrer antioxidativen Wirksamkeit geschwächt werden, diese aber nicht ganz verloren geht. Ein direkter Schluß auf die Wirksamkeiten in biologischen Systemen kann jedoch nur durch zusätzlichen Vergleich mit mehreren anderen Testsystemen und Untersuchungen *in vivo* gewonnen werden.

### 2.3.6 Zusammenfassung und Diskussion

Die Oxidation von Flavonolen mit  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$  in wäßrigen Systemen führt zu 2-(Hydroxybenzoyl)-2-hydroxy-2H-1-benzofuran-3-onen (Abb. 2.26, S. 77). Durch die Anwendung ein- und zweidimensionaler NMR-Techniken wurden die Strukturen der Produkte erstmals uneindeutig charakterisiert. Die Verbindungen konnten dazu ausgehend von den Flavonolen im mg-Maßstab synthetisiert werden. Das vorgestellte einstufige Syntheseverfahren zeichnet sich im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen durch zwei Vorteile aus. Im Gegensatz zu der von Igarashi et al. [68] durchgeführten Oxidation von Quercetin

mit Cysteindiethylester unter gleichzeitiger Durchgasung mit Sauerstoff, Bestrahlung und Erwärmung, die eine Ausbeute von 0,5 % hatte, verliefen die hier beschriebenen Reaktionen quantitativ, eine aufwendige säulenchromatographische Aufarbeitung blieb somit erspart. Insbesondere im Bezug auf die im Vergleich zu Quercetin deutlich teureren Flavonole Kaempferol, Fisetin und Morin liegt darin ein wesentlicher Vorteil. Die kürzlich von Viborg et al. [67] vorgeschlagene elektrochemische Oxidation lieferte zwar ebenfalls hohe Ausbeuten, zu deren Durchführung wird aber eine Elektrolysezelle benötigt, mit der die Zahl der übergegangenen Elektronen gesteuert werden kann. Dieser apparative Aufwand ist bei der im Rahmen der vorliegenden Arbeit beschriebenen Methode nicht notwendig. Da sich die Oxidationsmittel  $\text{Fe}^{3+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$  leicht in den benötigten Mengen zudosieren lassen, greift das Argument von Viborg et al. [67], die chemische Oxidation von Flavonolen könne leicht zu komplexen Substanzgemischen führen, im vorliegenden Fall nicht.

Massenspektrometrische Verfahren wurden erstmals erfolgreich eingesetzt, um charakteristische Fragmentierungsschemata der oxidierten Flavonole zu ermitteln. Diese Ergebnisse, die die NMR-spektroskopischen Befunde zusätzlich stützen, sind Basis für eine selektive Detektion der Verbindungen nach HPLC-Trennung.

Mit der Oxidation der Flavonole ist naturgemäß eine Veränderung ihrer elektrochemischen Eigenschaften verbunden. Mithilfe von hydrodynamischer Voltammetrie wurden die Halbstufenpotentiale aller zwölf untersuchten Flavonoide bestimmt. Diese weitergehende Charakterisierung erlaubt Aussagen über die antioxidativen Eigenschaften der Reaktionsprodukte. Mit dem einfachen Testsystem des Rancimatens konnte gezeigt werden, daß die beschriebene Oxidation mit einer Verminderung der antioxidativen Wirksamkeit der Flavonole einhergeht. Diese Ergebnisse sind für weitere Untersuchungen über die biologische und lebensmitteltechnologische Bedeutung der Reaktion zu berücksichtigen.

## 2.4 Diskussion des Reaktionsverlaufs

Die Oxidation von Flavonolen mit  $\text{Cu}^{2+}$  oder  $\text{Fe}^{3+}$  zu 2-(Hydroxybenzoyl)-2-hydroxy-2H-1-benzofuran-3-onen ist bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. Von daher sollen an dieser Stelle die Einflußfaktoren für den Verlauf dieser Redoxreaktion kurz diskutiert werden.

Im Vergleich zu den Untersuchungen von Utaka und Takeda [49], die die Oxidation in wasserfreien alkoholischen Lösungen durchführten, ist die Rolle des Wassers hier von besonderer Bedeutung. Die stete Anwesenheit von Wasser in Lebensmitteln und biologi-

schen Materialien läßt erwarten, daß die Oxidation in diesen Matrices mit großer Wahrscheinlichkeit zu den 2-Hydroxybenzofuranonen führt. Zur grundlegenden Untersuchung von Oxidationsvorgängen in natürlichen Matrices ist demnach der hier gemachte Ansatz der wäßrigen Lösungen sinnvoller als das rein organische Arbeiten.

Auffällig war allerdings, daß das eingesetzte Acetonitril einen deutlichen Einfluß auf den Ablauf der Reaktion nahm. Die rosa Färbung im Verlauf der Oxidation trat ja nur dann auf, wenn sowohl Acetonitril als auch Wasser in den Lösungen vorhanden war, und das auch nur bei 3',4'-dihydroxysubstituierten Flavonolen. Dies steht teilweise im Gegensatz zu den Beobachtungen von Viborg et al. [67] bei der elektrochemischen Oxidation von Kaempferol und Quercetin. Nach Ihrer Aussage war die rosa Färbung auch in wasserfreier Lösung mit Quercetin zu beobachten. Da im Verlauf der Oxidation aber zunächst zwei Protonen abgegeben werden müssen, scheint die Anwesenheit von Wasser als Protonenakzeptor zwingend notwendig. Das rosa gefärbte Zwischenprodukt könnte dabei eine radikalische Verbindung sein, die bei höheren Konzentrationen an Acetonitril umso stabiler ist. Höhere Wasserkonzentrationen würden eine schnellere Weiterreaktion der Radikale fördern.

Im Hinblick auf Reaktionen in biologischen Systemen bleibt festzuhalten, daß in Modellsystemen kationen-induzierte Oxidationen sicherlich aussagekräftiger sind als rein elektrochemische. Dabei muß aber berücksichtigt werden, daß die Konzentrationsverhältnisse zwischen Oxidations- und Reduktionsmittel in natürlichen Matrices anders sind als in den hier beschriebenen Modell-Lösungen. Allerdings ist auch eine katalytische Wirkung der prooxidativen Kationen denkbar, die in der Matrix jeweils wieder zu den wirksamen Oxidationsstufen umgewandelt werden könnten, wie eingangs am Beispiel der Fenton-Reaktion erläutert (s. 1.3.1, S. 12).

Eine weitergehende mechanistische Betrachtung der ablaufenden Oxidationsreaktionen war nicht mehr Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Vielmehr wurde angestrebt, die chromatographische Analytik der dargestellten Verbindungen deutlich zu verbessern.



## 2.5 HPLC oxidiertes Flavonole

### 2.5.1 Einleitung

In beiden bisher in der Literatur beschriebenen Studien, in denen Benzopyrandione (bzw. Benzofuranone, da die verwendeten NMR-Techniken nicht aussagekräftig genug waren) als Oxidationsprodukte des Quercetin in Pflanzenmaterial nachgewiesen wurden, wurde präparativ und nicht analytisch gearbeitet [68, 69]. Dies erforderte eine umfangreiche säulenchromatographische Aufreinigung und mehrere Extraktionsschritte. In einem Fall wurde bisher die HPLC-Trennung zweier 2-(Hydroxybenzoyl)-2-hydroxybenzofuran-3-one bei gleichzeitiger Anwesenheit der Ausgangssubstanzen Quercetin und Kaempferol beschrieben, allerdings ohne Angabe von Chromatogrammen [67]. Dabei wurde ein linearer Gradient mit wechselnden Steigungen bis zu einem Anteil von 100 % Acetonitril an einer Purospher RP-18-Phase (4 mm × 250 mm, 5 µm) und Photodiodenarray-Detektion eingesetzt. Eine analytische Methode, die die chromatographische Trennung und den selektiven Nachweis der fünf hier untersuchten Benzofuranone zusammen mit Flavonen und Flavonolen möglich macht, mußte folglich erst entwickelt werden.

Zwar sind mehrere Verfahren zur HPLC von Flavonolen und Flavonen beschrieben. Die im Vergleich zu letzteren deutlich höhere Polarität der Benzofuranone verhinderte aber die unveränderte Übertragung dieser Verfahren auf die vorliegende Zielsetzung. Ausgehend von den Ergebnissen der oben beschriebenen Methode zur Chromatographie der Reaktionslösungen wurden entsprechend zwei weitere HPLC-Verfahren ausgearbeitet. Weil mit der Polystyroldivinylbenzol-Phase, die zur Untersuchung der stark kationenhaltigen Lösungen notwendig war, ein Gradient nicht erfolgreich eingesetzt werden konnte (s. 2.2.4, S. 55), wurde zu RP-Materialien auf der Basis von Kieselgel gewechselt. Es sollten neben üblichen Säulen mit 4 mm I.D. auch solche getestet werden, die bei einem I.D. von 2 mm eine Elution bei deutlich niedrigeren Flußraten erlauben. Dadurch konnte eine Anwendung der massenspektrometrischen Detektion mit dem Elektrospray-Interface ermöglicht werden, das nur bei niedrigen Eluentenströmen eine ausreichende Empfindlichkeit liefert [78].

Die Entstehung der Benzofuranone aus Flavonolen ist in verschiedenen Matrices denkbar. Die Oxidation könnte in flavonoidhaltigen Pflanzen selbst, oder nach deren Verzehr im Magen-Darm-Trakt, in Organen, im Blut oder auch Urin ablaufen. Gleichermäßen ist es denkbar, daß eine derartige Oxidationsreaktion in komplex zusammengesetzten Lebensmitteln, die auch Flavonoide enthalten, stattfindet, zumal vermehrt insbesondere Flavonolreiches Pflanzenmaterial wegen seiner antioxidativen Wirksamkeit bei der Herstellung von

Lebensmitteln angewendet wird. Die Analytik der oxidierten Flavonole muß entsprechend auf die zu untersuchende Matrix angepaßt werden können. Von dieser Überlegung ausgehend wurde angestrebt, möglichst selektive Detektionstechniken mit der Möglichkeit für eine qualitative Absicherung für die Benzofuranone einzusetzen. Die Chromatographie wurde so gestaltet, daß parallel oder sequentiell verschiedene Detektoren genutzt werden können, um die Verfahren nicht zuletzt auch bei unterschiedlichen Laborausstattungen erfolgreich einsetzen zu können.

## 2.5.2 Trennung an einer 4 mm I.D. RP-18 Phase

### 2.5.2.1 Photodiodenarray-Detektion

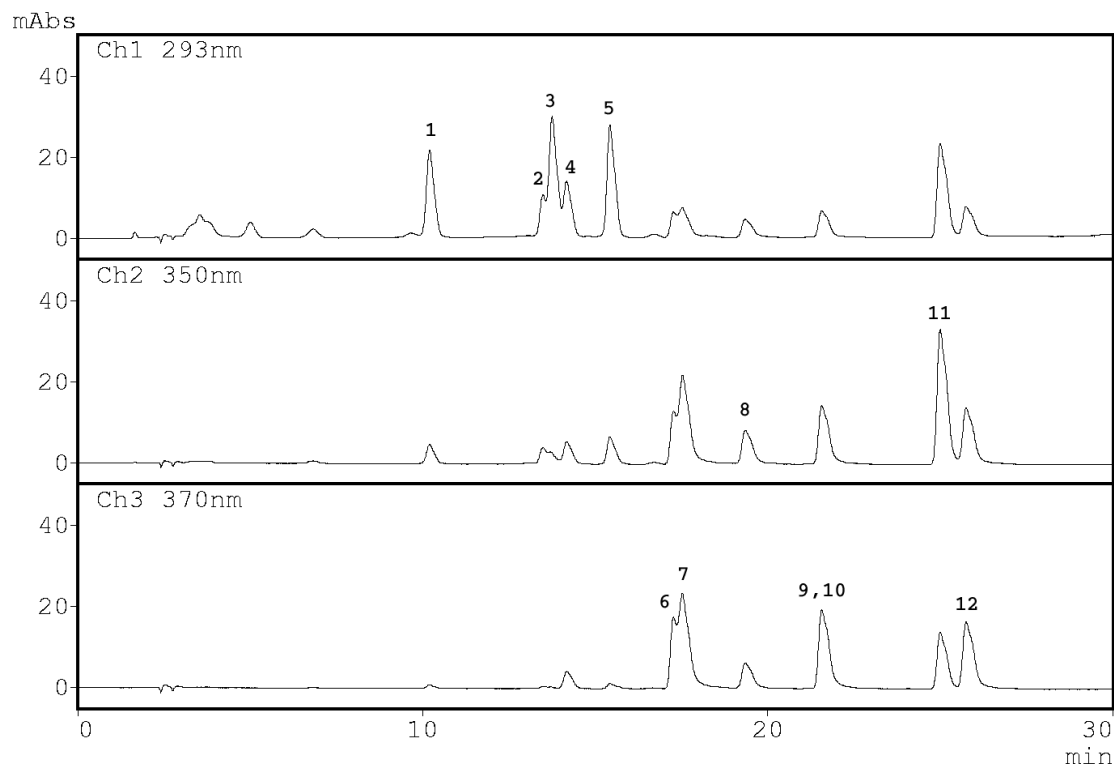
Aufbauend auf die Ergebnisse der HPLC-Trennung der Reaktionsgemische wurden mit den gleichen Eluenten unter Verwendung des Photodiodenarray-Detektors zwei normale HPLC-Säulen mit unterschiedlichen stationären Phasen getestet:

1. Superspher 100 RP18 endcapped,  $250 \times 4$  mm I.D.,  $5 \mu\text{m}$  (Merck)
2. Purospher 100 RP18 endcapped,  $250 \times 4$  mm I.D.,  $5 \mu\text{m}$  (Merck)

Bei einer Flußrate von 1,0 mL/min wurde die Trennung von fünf Benzofuranonen, zwei Flavonen und fünf Flavonolen angestrebt. Die eluierenden Substanzen wurden bei 293 nm (Benzofuranone), 350 nm (Flavone) und 370 nm (Flavonole) detektiert und über die gesamte Peakbreite jeweils Spektren von 240 nm bis 600 nm aufgezeichnet.

Der Vergleich der beiden stationären Phasen zeigte, daß das Superspher-Material für das Trennproblem ungeeignet war. Trotz Endcapping trat ein starkes Tailing der Flavonole auf, so daß eine zufriedenstellende Chromatographie nicht möglich war. Im Gegensatz dazu ließen sich mit der Purospher-Phase, die sich durch eine besondere Reinheit des verwendeten Kieselgels auszeichnet [96], bessere Ergebnisse erzielen. Trotzdem war auch hier ein leichtes Tailing der Peaks der Flavonole zu erkennen. Zudem war bei einigen der eingesetzten Verbindungen keine Basislinientrennung möglich, und Luteolin und Quercetin koeluierten. Diese Koelution ist bei Einsatz verschiedener stationärer Phasen beschrieben [30], und ließ sich auch durch Variation des Gradienten nicht wesentlich beeinflussen, so daß als Kompromiß zwischen Analysenzeit und Trennleistung ein linearer Gradient von 10 % zu 50 % Acetonitril in 30 min gewählt wurde (Abb. 2.34).

Zur Abschätzung der Leistungsfähigkeit der neu entwickelten Methode wurden aus den Kalibriergeraden der Referenzsubstanzen die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nach



Nr.	Verbindung	RT [min]
1	2-(3,4-Dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3-on	10,3
2	2-(3,4-Dihydroxybenzoyl)-2,6-dihydroxybenzofuran-3-on	13,5
3	2-(4-Hydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3-on	13,7
4	2-(2,3,4-Trihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3-on	14,1
5	2-(2,4-Dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3-on	15,4
6	Myricetin	17,2
7	Fisetin	17,5
8	Morin	19,4
9	Luteolin	21,4
10	Quercetin	21,4
11	Apigenin	23,7
12	Kaempferol	25,6

**Abbildung 2.34:** Trennung von Benzofuranonen, Flavonolen und Flavonolen ( $c=4 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ,  $20 \mu\text{L}$  injiziert,  $80 \text{ ng}$  absolut); Gradientenelution auf Purospher-Säule; Photodiodenarray-Detektion, Monitoring bei 293, 350, 370 nm.

DIN 32645 [97] berechnet. Die Nachweisgrenzen lagen für die Mehrzahl der untersuchten Verbindungen im Bereich um  $0,5 \mu\text{g/mL}$  (10 ng absolut), was im Bereich der von Crozier et al. [30] angegebenen Nachweisgrenzen von 5 ng absolut liegt. Für die angetrennten Verbindungen Fisetin und Myricetin lagen sie etwa doppelt so hoch, da die Bestimmung der Peakfläche durch die Überschneidung der Peaks mit einem größeren Fehler behaftet war.

Die Aufnahme der UV/Vis-Spektren der eluierenden Verbindungen mit dem Photodiodenarray-Detektor erlaubte eine eindeutige Zuordnung der Peaks, auch wenn nur eine Antrennung erreicht war<sup>9</sup>. Zudem weisen pflanzliche Lebensmittel in aller Regel ein typisches Muster an Flavonolen und Flavonen auf, bei dem nur zwei bis drei der Verbindungen gleichzeitig in höheren Konzentrationen vorkommen [36, 98, 99, 76], so daß eine leistungsfähige Untersuchung von natürlichen Matrices mit der entwickelten Methode möglich ist.

### 2.5.2.2 Elektrochemische Detektion

In der überwiegenden Zahl der publizierten Untersuchungen wurden bei der chromatographischen Analytik von Flavonolen und Flavonen Wellenlängendetektoren oder Massenspektrometer zur Detektion eingesetzt [75, 30, 25, 76, 100, 24, 101, 72, 99, 102]. Im Gegensatz dazu fanden elektrochemische Detektoren (ECD) wenig Beachtung. Jones et al. [103] konnten aber vor kurzem zeigen, daß sich die Bestimmung von Quercetin in menschlichem Blutplasma mittels HPLC und oxidativer elektrochemischer Detektion sehr gut durchführen läßt. Der Vorteil dieser Methodik liegt darin, daß der ECD selektiv nur die Verbindungen registriert, die bei dem eingestellten Potential oxidierbar sind. Durch die Wahl eines möglichst niedrigen Potentials, das noch den Nachweis der gesuchten Analyten erlaubt, können dadurch oft Matrixbestandteile aus den Chromatogrammen ausgeblendet werden. Außerdem erlaubt die in der Regel sehr hohe Empfindlichkeit eine Reduzierung der notwendigen Probenmenge [103]. Aus diesen Gründen wurde die elektrochemische Detektion auch auf ihre Eignung für die Detektion der hier untersuchten Benzofuranone geprüft.

Zur Einstellung eines geeigneten Potentials für die Detektion der Verbindungen ist die Kenntnis ihrer Halbstufenpotentiale unerläßlich. Die Höhe der Oxidationspotentiale der Polyphenole hängt von der Zahl und der Anordnung der Hydroxygruppen im Molekül sowie von den Meßbedingungen ab. Aus der Strukturaufklärung ging hervor, daß durch die

---

<sup>9</sup>Bei koeluierenden Verbindungen wurde das Spektrum der ersten Substanz im ansteigenden Peak, das der zweiten im absteigenden Peak ausgewählt.

Oxidation die Aromatizität des C-Rings der Flavonole aufgehoben wird und ein furanoides Halbketal resultiert. Durch diese strukturelle Veränderung ist zu erwarten, daß die Halbstufenpotentiale der Benzofuranone gegenüber denen der Flavonole deutlich verschoben sind. Rühling [104] konnte dies am Beispiel des oxidierten Quercetin mit zyklischer Voltammetrie nachweisen. Die ersten Oxidationsstufen lagen bei 480 mV für Quercetin und bei 680 mV für das entsprechende Benzofuranon. Hendrickson et al. [65] und Viborg et al. [67] haben zwar die elektrochemische Oxidation von Flavonolen beschrieben, nicht aber die elektrochemischen Eigenschaften der Produkte charakterisiert. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit mit der neu entwickelten HPLC-Methode und elektrochemischer Detektion hydrodynamische Voltagramme aller hier untersuchten zwölf Verbindungen aufgenommen. Die daraus abzulesenden Halbstufenpotentiale sind in Tabelle 2.8 aufgeführt.

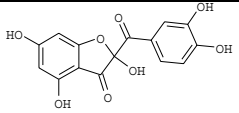
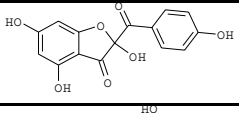
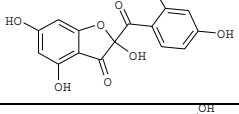
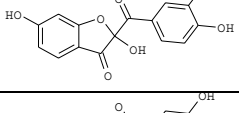
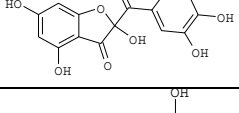
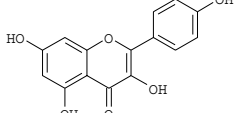
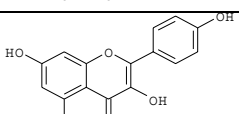
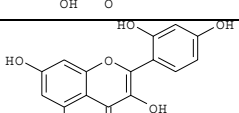
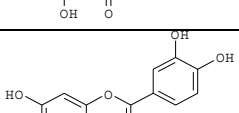
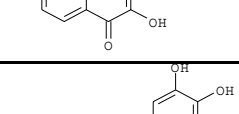
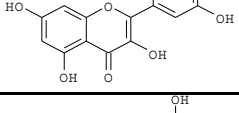
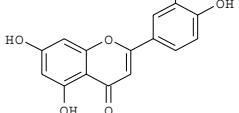
Die Werte korrelieren sehr gut mit den Strukturen der Verbindungen, die sich in drei Gruppen einteilen lassen:

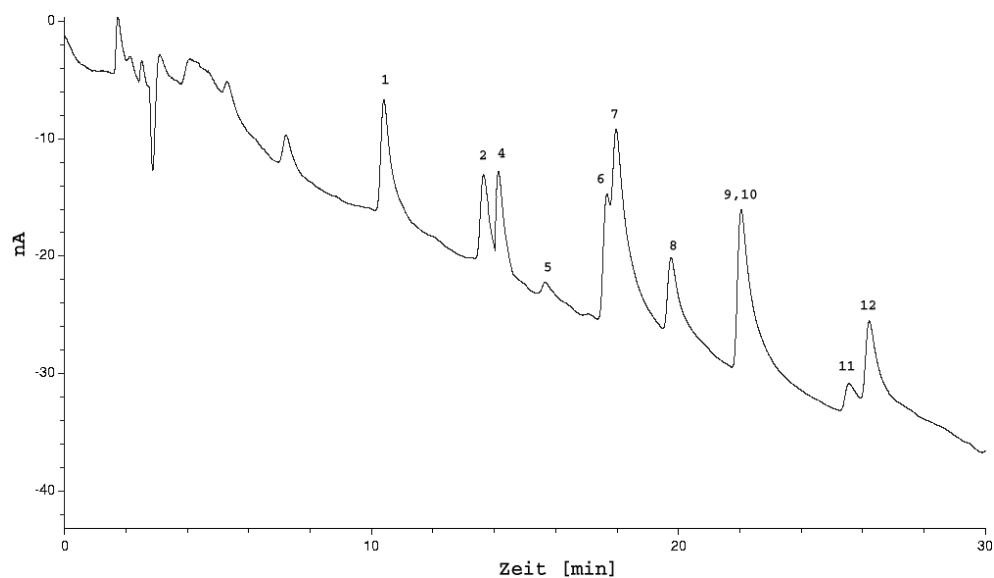
1. Flavonole: Halbstufenpotentiale um 460 mV, werden an der Anode des Detektors wahrscheinlich zu den Benzofuranonen oxidiert,
2. *o*-Dihydroxyphenole: Halbstufenpotentiale um 600 mV, durch die *o*-Dihydroxyfunktion ebenfalls oxidierbar, erwartungsgemäß allerdings weniger leicht als die Flavonole,
3. Monohydroxyphenole: Halbstufenpotentiale zwischen 1000 und 1100 mV, relativ schwer oxidierbar.

Für die elektrochemische Detektion aller Benzofuranone nach HPLC-Trennung bedeutete dies, daß bei genügend hohen Potentialen gemessen werden mußte. Bei einem Potential von 1100 mV, das für die vollständige Detektion des oxidierten Kaempferol angelegt werden müßte, war jedoch die Basislinie des verwendeten Detektors sehr instabil. Daher wurde bei einer Spannung von maximal 1000 mV gearbeitet. Unter diesen Bedingungen ließen sich die vier anderen Benzofuranone, sowie die Flavonole und Flavone detektieren (Abb. 2.35). Zusätzlich wurden zwei Verbindungen im Bereich von fünf und sieben Minuten detektiert, die beide aus der Referenzlösung des oxidierten Myricetin stammten. Diese konnte, wie oben erwähnt (s. 2.3.3.2, S. 63), nur als nicht genauer charakterisiertes Substanzgemisch dargestellt werden. Im Vergleich zu dem Chromatogramm der weiter unten beschriebenen UV-Detektion (Abb. 2.36, S. 102) ist gut zu erkennen, daß bei der elektrochemischen Detektion der jeweilige Response der einzelnen Verbindungen sehr unterschiedlich war.

Für die elektrochemische Detektion wurden ebenfalls aus den Kalibriergeraden der Referenzsubstanzen die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nach DIN 32645 [97] berechnet.

**Tabelle 2.8:** Halbstufenpotentiale  $E_{1/2}$  der untersuchten Flavonole, Flavone und Benzofuranone; ermittelt mit hydrodynamischer Voltammetrie (ox. Myricetin nicht eindeutig charakterisiert), (1: Flavonole, 2: *o*-Dihydroxyphenole, 3: Monohydroxyphenole)

Verbindung	Struktur	$E_{1/2}$ [mV]	Gruppe
Quercetin ox.		580	2
Kaempferol ox.		1100	3
Morin ox.		1080	3
Fisetin ox.		570	2
Myricetin ox.		630	2
Quercetin		460	1
Kaempferol		480	1
Morin		440	1
Fisetin		460	1
Myricetin		450	1
Luteolin		580	2
Apigenin		1020	3



Nr.	Verbindung	RT [min]
1	2-(3,4-Dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3-on	10,5
2	2-(3,4-Dihydroxybenzoyl)-2,6-dihydroxybenzofuran-3-on	13,8
4	2-(2,3,4-Trihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3-on	14,4
5	2-(2,4-Dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3-on	15,7
6	Myricetin	17,5
7	Fisetin	17,8
8	Morin	19,7
9	Luteolin	22,2
10	Quercetin	22,2
11	Apigenin	25,7
12	Kaempferol	26,3

**Abbildung 2.35:** Trennung von Benzofuranonen, Flavonolen und Flavonen ( $c=2 \mu\text{g/mL}$ ,  $20 \mu\text{L}$  injiziert,  $40 \text{ ng}$  absolut); Gradientenelution auf Purospher-Säule; elektrochemische Detektion bei  $1000 \text{ mV}$  (vs.  $\text{Ag/AgCl}$ ).

Diese lagen entgegen den Erwartungen durchweg höher als die der Wellenlängendetektion. Obschon die elektrochemische Detektion in der Regel sehr empfindlich ist, konnte mit dem eingesetzten Detektor nur eine relativ schlechte Sensitivität erreicht werden. So lagen die Nachweisgrenzen für sieben der untersuchten Verbindungen zwischen 1 und 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Die beiden Verbindungen mit den höchsten Halbstufenpotentialen (Apigenin und oxidiertes Morin) wiesen bei dem angelegten Potential von 1000 mV keine linearen Zusammenhänge zwischen Konzentration und Peakfläche auf, oxidiertes Kaempferol wurde nicht detektiert. Die schlechte Empfindlichkeit des Detektors muß auf dessen starke Basisliniendrift durch den zur Trennung notwendigen Gradienten zurückgeführt werden, so daß in den Kalibriergeraden insbesondere im unteren Konzentrationsbereich eine deutlich stärkere Fehlerbreite resultierte. Der Meßbereich von maximal 50 nA, der am Detektor eingestellt wurde, wurde allein durch den Gradienten schon ausgereizt. Eine Erhöhung der Geräteempfindlichkeit war dementsprechend ausgeschlossen.

Als Fazit läßt sich ziehen, daß die elektrochemische Detektion sich als grundsätzlich für die Analytik der Benzofuranone geeignet erwies. Es ist dann aber jeweils im Einzelfall der zu untersuchenden Matrix zu entscheiden, ob die höhere Selektivität des ECD Vorteile gegenüber der Verwendung eines Wellenlängendetektors bietet.

## 2.5.3 Trennung an einer 2 mm I.D. RP-18 Phase

### 2.5.3.1 UV-Detektion

Die Entwicklung eines geeigneten Gradienten bei niedriger Flußrate erfolgte zunächst unter Verwendung der UV-Detektion. Der eingesetzte Detektor mußte dabei die gleichzeitige Messung bei mehreren Wellenlängen ermöglichen. In dem gewählten Modus ("max-plot") wird zu jeder Zeit nur der momentan höchste Absorptionswert bei vorher gewählten Wellenlängen ausgegeben. Die Meßwellenlänge wechselt damit automatisch während der Aufnahme des Chromatogramms, so daß ein mehrfaches zeitabhängiges Umschalten der Meßwellenlänge dadurch umgangen wurde. Für die möglichst empfindliche Detektion aller eingesetzten Verbindungen wurden als Wellenlängen die jeweiligen Absorptionsmaxima von 293 nm (Benzofuranone), 350 nm (Flavone) und 370 nm (Flavonole) gewählt.

Folgende HPLC-Säulen wurden eingesetzt und auf ihre Eignung getestet:

1. Superspher 100 RP18, 125  $\times$  2 mm I.D., 5  $\mu\text{m}$  (Merck)
2. Discovery RP18 endcapped, 125  $\times$  2 mm I.D., 5  $\mu\text{m}$  (Supelco)



Die Anfangszusammensetzung des Eluenten aus Acetonitril und wäßriger Essigsäure wurde ausgehend von den Erfahrungen mit den 4 mm-Säulen variiert. Bei einem Anteil von 10 % Acetonitril zeigte sich eine genügend weite Abtrennung der am frühesten eluierenden der untersuchten Verbindungen, dem oxidierten Quercetin, vom Totvolumen. Darauf aufbauend konnte ein linearer Gradient entwickelt werden, der in 30 Minuten die Elution aller Verbindungen erlaubte.

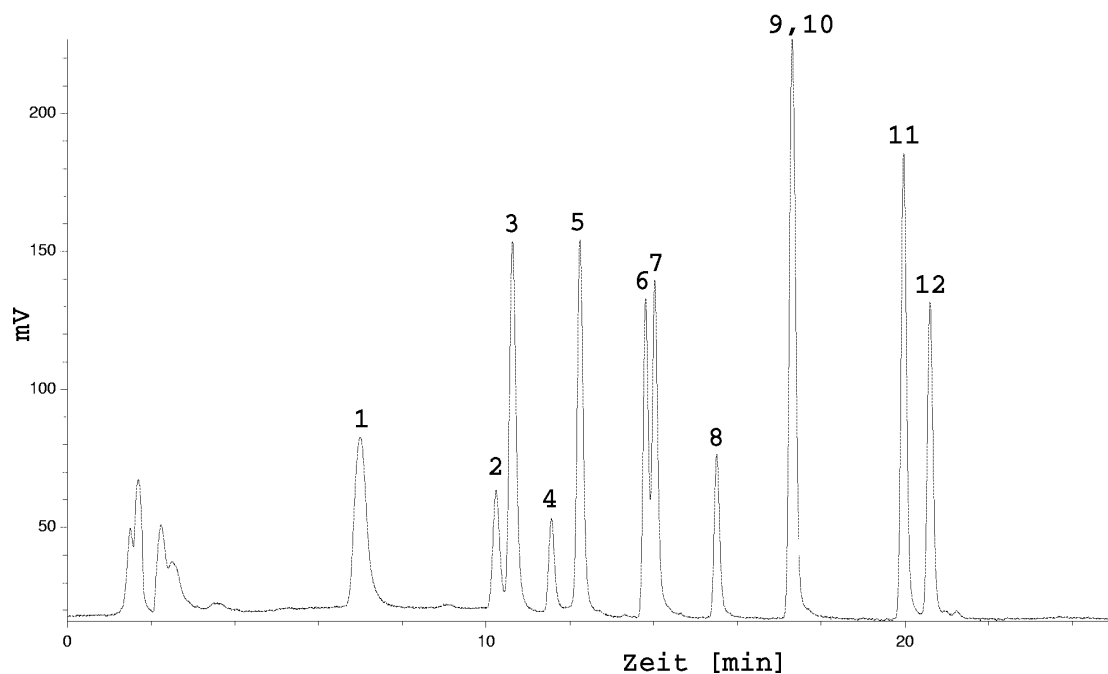
Das Superspher-Material erwies sich als geeignet für die Trennung der Benzofuranone. Die Peaks der Flavonole hingegen zeichneten sich durch ein nicht akzeptables Tailing aus. Dieses nachteilige chromatographische Verhalten von Flavonoiden wurde für unterschiedliche stationäre Phasen von Crozier et al. [30] beschrieben. Der von ihnen vorgeschlagene Ersatz von Essigsäure gegen Trifluoressigsäure zur Erzielung besserer Trennleistungen führte mit der hier verwendeten Superspher-Säule jedoch zu deutlich schlechteren Ergebnissen. Auf weitere Variation der mobilen Phase wurde verzichtet, da z.B. ein Ersatz der flüchtigen organischen Säuren durch Phosphatpuffer eine Anwendung der massenspektrometrischen Detektion verhindert hätte [78].

Wahrscheinlich beruhte das starke Tailing der Flavonole auf einer zu starken Wechselwirkung der 3-OH-Gruppe mit freien Silanol-Gruppen der stationären Phase. Durch den Wechsel zu einem "endcapped"-Material konnten diese nachteiligen Wechselwirkungen unterbunden werden.

Mit dieser stationären Phase ließ sich mit einem 30-minütigen linearen Gradienten von 8 % bis 50 % Acetonitril im Eluenten mit wäßriger Essigsäure als restlichem Bestandteil eine Trennung mit symmetrischen Peaks aller Verbindungen erreichen (Abb. 2.36).

Die angetrennten Peaks bei einer Retentionszeit von etwas über zwei Minuten stammen beide aus dem oxidierten Myricetin, das, wie oben erwähnt (s. 2.3.3.2, S. 63), ein Substanzgemisch darstellt. Die vergleichsweise niedrige Peakhöhe des oxidierten Fisetin (Nr. 2) rührt daher, daß die Messung bei 293 nm nicht genau dessen Absorptionsmaximum trifft (284 nm). Die Koelution von Luteolin und Quercetin, die auch literaturbeschrieben ist [30], ließ sich durch Variation des Gradienten nicht entscheidend verändern. Die deutlich voneinander verschiedenen UV/Vis- und Massenspektren der beiden Verbindungen lassen aber deren selektive Detektion zu.

Aus dem Chromatogramm kann sehr gut die hohe Empfindlichkeit der UV-Detektion abgelesen werden. Das Signal/Rausch-Verhältnis [105] bei einer injizierten Menge von 5 ng ( $c=1 \mu\text{g/mL}$ ) betrug beim oxidierten Quercetin 60:1, beim oxidierten Kaempferol bei geringerer Halbwertsbreite 130:1. Diese hohe Sensitivität ist zwar wünschenswert, jedoch verbie-



Nr.	Verbindung	RT [min]
1	2-(3,4-Dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3-on	7,00
2	2-(3,4-Dihydroxybenzoyl)-2,6-dihydroxybenzofuran-3-on	10,24
3	2-(4-Hydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3-on	10,63
4	2-(2,3,4-Trihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3-on	11,55
5	2-(2,4-Dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3-on	12,24
6	Myricetin	13,81
7	Fisetin	14,03
8	Morin	15,50
9	Luteolin	17,30
10	Quercetin	17,30
11	Apigenin	19,96
12	Kaempferol	20,60

**Abbildung 2.36:** Trennung von Benzofuranonen, Flavonolen und Flavonen ( $c=1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ,  $5 \mu\text{L}$  injiziert,  $5 \text{ ng}$  absolut); Gradientenelution auf 2 mm-Discovery-Säule; UV-Detektion bei 293, 350, 370 nm gleichzeitig ( $200 \text{ mV} = 0,020 \text{ AUFS}$ ).

tet die mangelnde Selektivität der UV-Detektion ihre Anwendung in der Routine-Analytik der untersuchten Verbindungen. Die Absorptionsmaxima der oxidierten Flavonole liegen mit etwa 290 nm dazu in einem zu niedrigen Bereich. Darüberhinaus ist zu erwarten, daß störende Matrixbestandteile, die bei den literaturbeschriebenen Bestimmungen der Flavonole und Flavone mehr oder weniger mit dem Totvolumen eluieren [36, 72, 37, 30, 99], bei der hier entwickelten Chromatographie mit den stärker polaren Benzofuranonen koeluieren können. Auf eine Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurde daher im Falle der UV-Detektion verzichtet. Die entwickelte HPLC-Methode ließ sich aber ohne weiteres für die Trennung vor der massenspektrometrischen Detektion einsetzen.

### 2.5.3.2 Massenspektrometrische Detektion

Zwar wurde oben (s. 2.3.4.2, S. 78) gezeigt, daß mit dem Particle Beam Interface und EI eine selektive Detektion der oxidierten Flavonole erreicht werden kann. Wegen der schlechten Durchlässigkeit des PBI für stark polare Verbindungen bei hohem Wasseranteil im Eluenten ist es aber nicht von Vorteil, diese Methode zur routinemäßigen Bestimmung der im Vergleich zu den Flavonolen ja deutlich polareren Benzofuranone heranzuziehen (s. 1.5.3.3, S. 32). Die entwickelte Gradientenelution wurde aus diesem Grund ausschließlich mit ESI und ion trap/MS angewendet.

Basierend auf dem mit Hilfe der Direktinjektion per Spritzenpumpe ausgearbeiteten Fragmentierungsschema für die Benzofuranone (Abb. 2.31, S. 86) wurde die Methode auf die massenspektrometrische Detektion nach HPLC-Trennung adaptiert. Im Hinblick auf die notwendige Empfindlichkeit war es erforderlich, die Zeit der Ionenanreicherung in der Ionenfalle zu steigern und zu optimieren. Denn im Gegensatz zu EI/CI-Quadrupol-Geräten ist bei Ionenfallen für eine Maximierung der Empfindlichkeit nicht die Kürze der Scanzeit entscheidend, sondern die möglichst lange Dauer der Fragmentanreicherung.

Neben der Optimierung der Empfindlichkeit war für eine selektive Detektion die Erstellung von Zeitfenstern für die Aufnahme der Massenspektren während der Chromatographie notwendig. Die vier untersuchten Verbindungen lassen sich nach ihren Molekularmassen in zwei Paare aufteilen. Die Oxidationsprodukte von Quercetin und Morin haben eine Molmasse von 318 g/mol, die von Kaempferol und Fisetin von 302 g/mol. Bedingt durch die Elutionsreihenfolge der Verbindungen war es erforderlich, drei Zeitfenster einzurichten, die in Tabelle 2.9 aufgelistet sind<sup>10</sup>. Die in der Ionenfalle gesammelte und fragmentierte Mas-

<sup>10</sup>Die verkürzten Retentionszeiten im Vergleich zu den oben (Abb. 2.36, S. 102) mit UV-Detektion beschriebenen Chromatogrammen rühren daher, daß die am MS verwendete HPLC-Pumpe über einen microbore-Pumpenkopf verfügt.

**Tabelle 2.9:** ESI-ion trap/MS: Ausgewählte Massen und Zeitfenster für die selektive Detektion von Benzofuranonen nach HPLC-Trennung

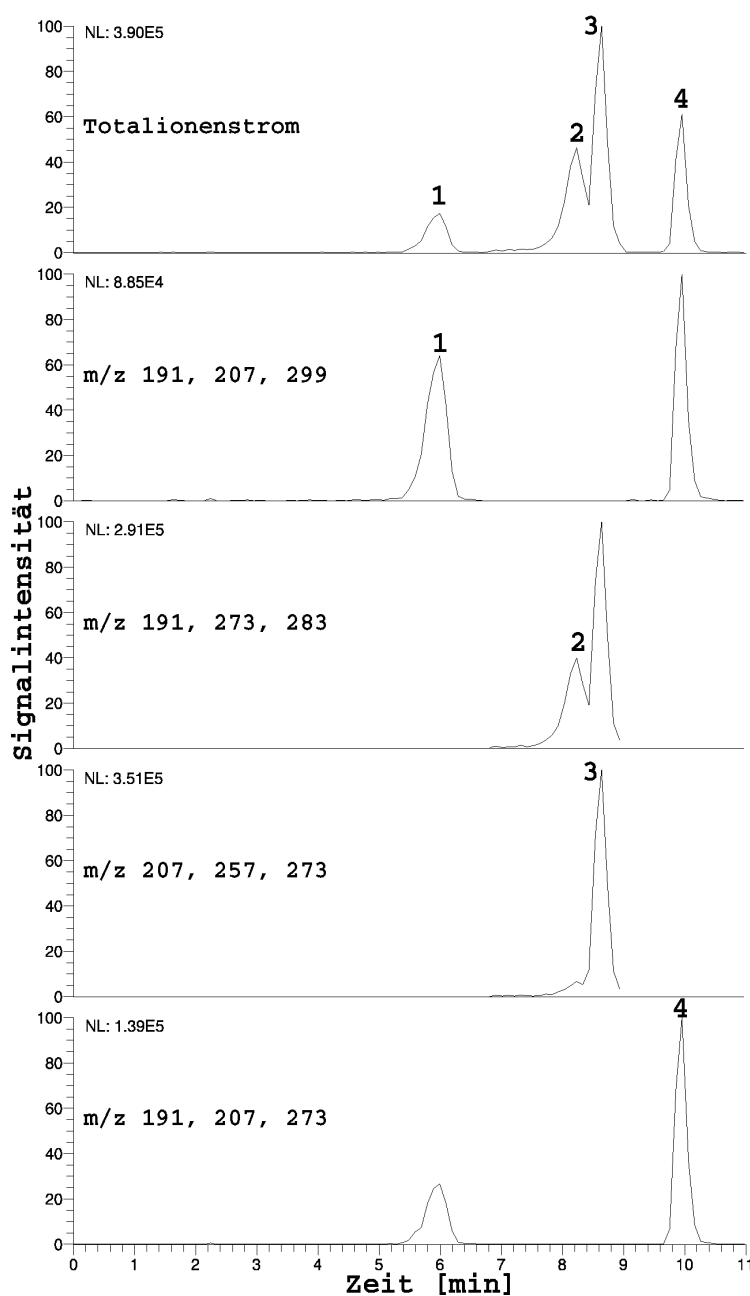
Zeit [min]	selektierte Masse [m/z]	für Verbindung	charakteristische Fragmente [m/z]
0,0 - 7,0	317	ox. Quercetin	191, 207, 299
7,0 - 9,0	301	ox. Fisetin ox. Kaempferol	191, 273, 283 207, 257, 273
9,0-11,0	317	ox. Morin	191, 207, 273

se ( $MS^2$ ) erlaubte folglich in jedem der drei Schritte die selektive Detektion des jeweilig eluierenden Benzofuranons. Eine weitere Fragmentierung ( $MS^3$ ) ist allerdings wegen der zu geringen Momentankonzentration der eluierenden Moleküle mit einem drastischen Verlust an Empfindlichkeit verknüpft und also nicht praktisch durchführbar. Die Massenspektren wurden, anders als im SIM-Modus bei EI/NCI, über den gesamten Bereich von m/z 85 bis m/z 350 aufgenommen. Dadurch war es möglich, nachträglich aus den Daten die charakteristischen Massen der Fragmente der jeweiligen Verbindungen auszuwählen. So wurden Chromatogramme erhalten, die für jede der untersuchten Verbindungen eine möglichst hohe Selektivität lieferten (Abb. 2.37).

Somit war erstmals ein Verfahren entwickelt, daß den selektiven und sensitiven Nachweis der oxidierten Flavonole auch mit massenspektrometrischer Detektion erlaubt. Damit wurde ein weiterer Grundstein für die leistungsfähige Analytik von Benzofuranonen in natürlichen Matrices gelegt.

#### 2.5.4 Zusammenfassung und Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals zwei leicht durchzuführende HPLC-Verfahren ausgearbeitet, die die Trennung von fünf Benzofuranonen neben fünf Flavonolen und Flavonen ermöglichen. Von den vier eingesetzten stationären Phasen erwies sich die Discovery RP18 endcapped-Säule mit einem Durchmesser von 2,1 mm als am besten geeignet. Sie konnte erfolgreich zur Kopplung mit massenspektrometrischer Detektion eingesetzt werden. Neben dem Massenspektrometer lieferte auch der Photodiodenarray-Detektor qualitative Informationen zur Absicherung der Identität der eluierenden Verbindungen. Ergänzend dazu ließen sich auch die UV-Detektion mit einem Mehrwellenlängendetektor und die elektrochemische Detektion anwenden. Insbesondere die UV-Detektion zeichnete sich durch eine hohe Empfindlichkeit aus, ihr fehlte es aber wegen der vergleichsweise niedrigen Wellenlängen der Absorptionsmaxima der Benzofuranone an der notwendigen Selektivität. Die



Nr.	Verbindung	RT [min]
1	2-(3,4-Dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3-on	5,99
2	2-(3,4-Dihydroxybenzoyl)-2,6-dihydroxybenzofuran-3-on	8,23
3	2-(4-Hydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3-on	8,64
4	2-(2,4-Dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3-on	9,96

**Abbildung 2.37:** Trennung der Benzofuranone ( $c=10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ,  $10 \mu\text{L}$  injiziert,  $100 \text{ ng}$  absolut); Gradientenelution auf 2 mm-Discovery-Säule; ESI-ion trap/ $\text{MS}^2$ -Detektion mit Zeitfenstern und charakteristischen Spuren für  $m/z$  317 (Peaks 1 und 4) und  $m/z$  301 (Peaks 2 und 3).

elektrochemische Detektion kann zwar je nach Matrix selektiver sein, wegen einer starken Basisliniendrift und stark verschiedenen Responses für die untersuchten Substanzen ist sie aber nur eingeschränkt anwendbar.

Die entwickelten HPLC-Verfahren sollen dazu herangezogen werden, den Nachweis von Benzofuranonen in verschiedenen natürlichen Matrices zu ermöglichen. Im folgenden wurde daher am Beispiel von Zwiebeln und Lauch die Eignung der Verfahren für diesen Zweck untersucht.

## 2.6 Analytik oxidierter Flavonole in biologischer Matrix

### 2.6.1 Einleitung

Das Vorkommen von Benzopyrandionen als Oxidationsprodukten des Quercetin wurde bisher in Rot-Klee und Zwiebeln beschrieben [68, 69]. Die zur Untersuchung dieser Matrices verwendeten Verfahren wurden jeweils im präparativen Maßstab durchgeführt, was eine Vielzahl von Aufreinigungsschritten erforderte. In keinem der beiden Fälle wurde untersucht, ob während der Aufarbeitung die Oxidation ablaufen kann, die letztlich zu dem Nachweis der Verbindungen führte. Eine leistungsfähige Analytik, die die gleichzeitige Untersuchung mehrerer oxidierter Flavonole erlaubt, ist noch nicht beschrieben.

Aus diesem Grund wurden die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten HPLC-Methoden zur Untersuchung von Zwiebeln und Lauch herangezogen. Zwiebeln wurden zum einen als Matrix ausgewählt, weil über das Auftreten des oxidierten Quercetin in diesem Lebensmittel bereits berichtet wurde [69]. Zum anderen bot sich die Zwiebel auch deshalb an, da sie vergleichsweise hohe Gehalte an Quercetin aufweist [72] und so die Analytik erleichtert. Zusätzlich wurde Lauch untersucht, der über eine relativ hohe Konzentration an Kaempferol verfügt [72]. Außerdem ist in frisch homogenisiertem Lauch eine weniger stark ausgeprägte Redoxaktivität zu erwarten, da Lauch im Vergleich zu Zwiebeln weniger reich an redoxaktiven schwefelhaltigen Verbindungen ist [5, 6].

### 2.6.2 Aufschluß und Extraktion

#### 2.6.2.1 Heißextraktion und Säureaufschluß von Glykosiden

Die Probenaufarbeitung wurde zunächst analog der in der Literatur zur Bestimmung von Flavonen und Flavonolen beschriebenen durchgeführt. Diese Verbindungen sind in Pflanzen zu einem großen Teil in Form von Glykosiden gebunden. Ob die beschriebene Oxidation der Flavonole zu Benzofuranonen auch bei einem glykosidisch vorliegenden Flavonol ablaufen kann, ist nicht bekannt. Bei einer Bindung des Zuckers an die für die Oxidation nicht notwendigen OH-Gruppen ist diese Reaktion aber durchaus denkbar.

Aufgrund der großen Vielzahl an möglichen Glykosiden ist eine Chromatographie der nativen Flavonoide kaum erfolgreich durchführbar. Aus diesem Grund ist es üblich, vor der HPLC-Trennung der Flavone und Flavonole diese durch mehrstündiges Kochen von zuvor gefriergetrocknetem Material mit salzsaurem Methanol aus ihren Glykosiden freizusetzen

und aus den Zellen zu extrahieren. Hertog et al. [72] haben umfangreiche Untersuchungen zur Optimierung der dazu notwendigen Aufschlußbedingungen vorgestellt, von denen ausgehend auch hier das Pflanzenmaterial aufgearbeitet wurde. Um eine kationen-induzierte Oxidation während der Aufarbeitung zu verhindern, wurde vor der sauren Extraktion ein antioxidativ wirksamer Komplexbildner zugesetzt [30]. Als Ausgangsmaterial wurden frische Zwiebeln und frischer Lauch verwendet, die unmittelbar nach dem Zerkleinern schockgefroren und gefriergetrocknet wurden. Zum Vergleich wurden zusätzlich käuflich erhältliche gefriergetrocknete Zwiebeln untersucht.

Da bisher nicht untersucht wurde, inwieweit die Benzofuranone unter den Bedingungen der Heißextraktion stabil sind, wurden mit oxidiertem Quercetin Versuche zur Wiederfindung durchgeführt. Bei einem Zusatz des Benzofuranons von  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  vor der Extraktion gefriergetrockneter Zwiebeln wurden Wiederfindungsraten von 57,4 und 62,7 % ermittelt. Dies zeigt, daß die für die Flavonole beschriebene Methode prinzipiell auch für Benzofuranone geeignet ist. Auf eine umfangreiche Optimierung der Extraktionsbedingungen für die oxidierten Flavonole wurde daher verzichtet.

Zur Untersuchung der Extrakte wurden sie zunächst frisch ohne weitere Aufreinigung in die HPLC injiziert. Anschließend wurde zur Aufkonzentrierung der Analyten die weiter unten beschriebene Festphasenextraktion eingesetzt. Zur Beobachtung von zeitlichen Trends in den Konzentrationen der Polyphenole wurden die Zwiebelextrakte bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert und über einen Zeitraum von zwei Wochen mehrmals vermessen. Damit sollte geprüft werden, ob in dem Extrakt eine Oxidation der freigesetzten Flavonole ablaufen kann.

### 2.6.2.2 Kaltextraktion

Neben der methanolischen Säurehydrolyse wurden die Gemüse auch durch eine Kaltextraktion mit Wasser aufgeschlossen. Dies diente dazu, die Reaktionen der Flavonole unter schonenderen Bedingungen zu untersuchen. Insbesondere die Aktivität von Enzymen wird in methanolischer Lösung stark vermindert, so daß eine Übertragung der Ergebnisse auf Vorgänge in lebenden Zellen bei der wäßrigen Kaltextraktion eher möglich sein sollte. Da allerdings durch das Fehlen des Säureaufschlusses die Konzentration an freien Flavonolen in den Extrakten erwartungsgemäß gering war, wurde vor der Extraktion Morin zu dem zerkleinerten Pflanzenmaterial zugegeben. Zusätzlich wurden die frischen Extrakte zur Verdünnung von Morin eingesetzt. So konnte der Einfluß der Extrakte auf dieses Flavonol direkt untersucht werden. Desweiteren wurde am Beispiel der Zwiebel versucht, das Quercetin durch eine schonende Säurehydrolyse bei pH 3 und  $40^\circ\text{C}$  aus den Glykosiden



freizusetzen. Damit sollte untersucht werden, ob unter diesen Bedingungen, die in lebensmitteltechnologischen Prozessen durchaus üblich sind, das oxidierte Quercetin nachweisbar ist.

### 2.6.3 Matrixabhängige Kalibrierung

Um quantitative Aussagen über das Vorkommen der Benzofuranone in der biologischen Matrix machen zu können, wurde die Kalibrierung und die daraus abgeleitete Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nach DIN 32645 [97] matrixabhängig durchgeführt. Zum Verdünnen der Referenzsubstanzen wurde ein frisch hergestellter Zwiebelextrakt der Heißextraktion und Säurehydrolyse verwendet. Die Quantifizierung erfolgte mit dem DAD.

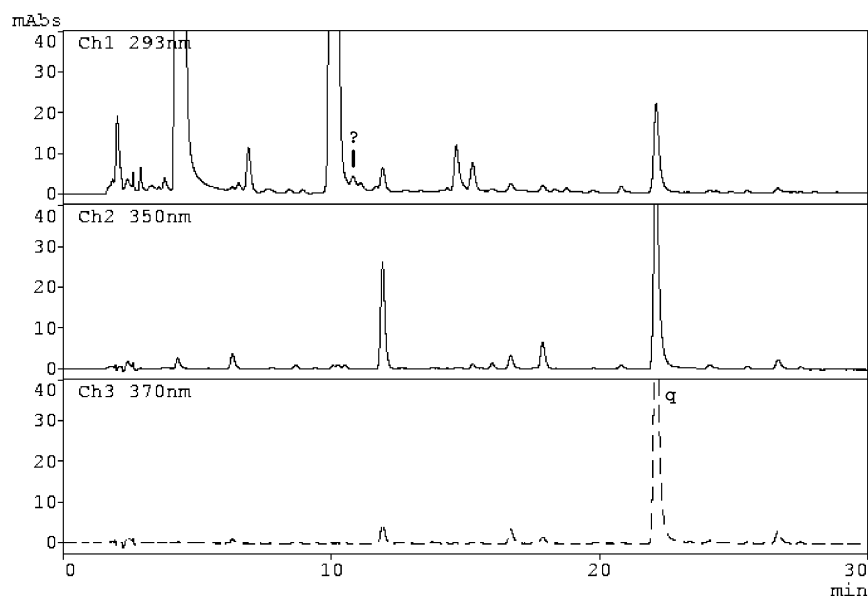
Die Nachweisgrenzen lagen für die Mehrzahl der untersuchten Verbindungen im gleichen Bereich (um  $0,5 \mu\text{g/mL}$ ,  $10 \text{ ng}$  absolut) wie mit der Kalibrierung ohne Matrix ermittelt (S. 94). Bei den Oxidationsprodukten von Quercetin und Fisetin, die als erste der Analyten eluieren, lagen sie um den Faktor zwei höher ( $0,84 \mu\text{g/mL}$  bzw.  $1,01 \mu\text{g/mL}$ ). Zur Retentionszeit des oxidierten Quercetin ist auch im Zwiebelextrakt ein kleiner Peak zu erkennen, dessen UV/Vis-Spektrum aber ein Maximum bei  $286 \text{ nm}$  und damit um  $6 \text{ nm}$  niedriger als das oxidierte Quercetin hat. In dem frischen Säureextrakt der Zwiebeln ist also das entsprechende Benzofuranon nicht nachweisbar ( $0,84 \mu\text{g/mL}$ ) (Abb. 2.38).

### 2.6.4 Aufreinigung und Anreicherung mittels Festphasenextraktion

#### 2.6.4.1 Einleitung

Die Flavonole und Flavone sind in den bisher untersuchten pflanzlichen Lebensmitteln in so hoher Konzentration vorhanden, daß eine Anreicherung im Rahmen der Probenvorbereitung in der Literatur nicht beschrieben wurde. Wegen der relativ hohen Selektivität der Detektion bei  $350$  und  $370 \text{ nm}$  und der Verwendung von Photodiodenarray-Detektoren oder Massenspektrometern wurde auch eine Abtrennung von mitextrahierten Matrixbestandteilen im Rahmen der Probenvorbereitung nicht beschrieben.

Da das hier untersuchte oxidierte Quercetin in dem frischen Extrakt nicht nachgewiesen werden konnte, mußte aber angestrebt werden, durch eine Anreicherung der Analyten eine Detektion im Spurenbereich zu ermöglichen. Dabei sollte gleichzeitig eine Abtrennung von Matrixbestandteilen erreicht werden. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß auch bei der Untersuchung biologischer Proben (z.B. Blut, Urin) auf einen eventuellen Gehalt an



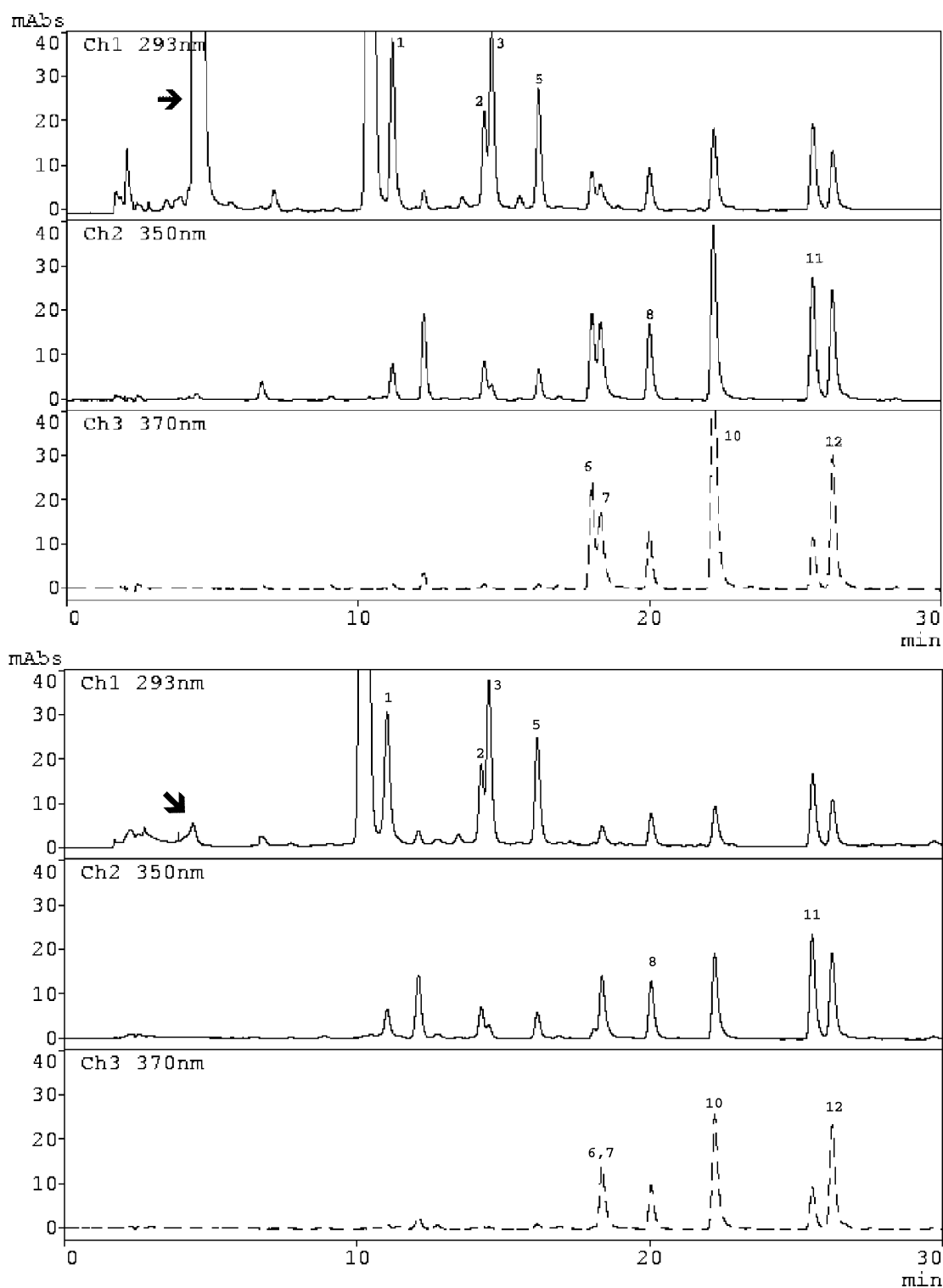
**Abbildung 2.38:** Zwiebelextrakt nach Säurehydrolyse; Gradientenelution auf Purospher-Säule; Photodiodearray-Detektion, Monitoring bei 293, 350, 370 nm (q: Quercetin, ?: oxidiertes Quercetin nicht nachweisbar).

oxidierten Flavonolen eine Spuren-Matrix-Trennung wahrscheinlich notwendig sein wird. Aus diesen Gründen wurde zunächst eine Festphasenextraktion für die Abtrennung von Matrixbestandteilen bei gleichzeitiger Anreicherung der Benzofuranone entwickelt.

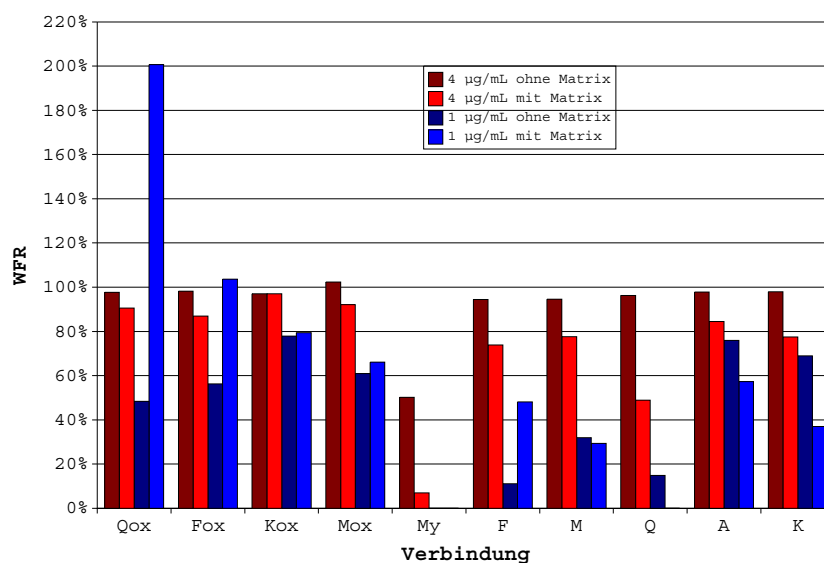
Zu diesem Zweck wurden verschiedene stationäre Phasen getestet (RP18-, Polyamid- und Aminophasen), die aber alle nicht geeignet waren, die Analyten in ausreichendem Maß zu retardieren. Der Einsatz von Polystyroldivinylbenzol-Harz als stationärer Phase erwies sich dagegen als erfolgversprechend. Das Material zeichnet sich durch eine hohe Kapazität aus und war in der Lage, die untersuchten Verbindungen bei der Probenaufgabe weitestgehend zu retardieren. Mit Gemischen aus oxidiertem Quercetin (polarste der untersuchten Verbindungen) und Kaempferol (unpolarste der untersuchten Verbindungen) wurde das Elutionsverhalten untersucht. Es zeigte sich, daß die Analyten so stark an die stationäre Phase gebunden werden, daß sie sich nur durch Einsatz von Tetrahydrofuran (THF) wieder eluieren lassen, während Methanol und Acetonitril als Eluenten zu schwach waren. Die THF-haltigen Lösungen verursachten allerdings in den nach der Festphasenextraktion aufgenommenen HPLC-Chromatogrammen ein stark nachteiliges Fronting der Peaks, insbesondere bei den Benzofuranonen. Aus diesem Grund war es auf jeden Fall notwendig, das THF unter Vakuum teilweise wieder zu entfernen. Durch die leichte Flüchtigkeit des Ethers konnte dabei bei vergleichsweise niedrigen und somit schonenden Temperaturen (35-40 °C)

gearbeitet werden. Dies ermöglichte zugleich eine Aufkonzentrierung der Analyten.

Mit der entwickelten Methode konnten Matrixbestandteile hoher Konzentration, die in den Chromatogrammen bei etwa fünf Minuten eluierten, weitestgehend abgetrennt werden (Abb. 2.39). Aus den Chromatogrammen ist aber auch erkennbar, daß die Verbindung, die kurz vor dem oxidierten Quercetin eluiert, aufgrund ihrer zu niedrigen Polarität durch die Festphasenextraktion nicht entfernt wurde.



**Abbildung 2.39:** Festphasenextraktion: Abreicherung von Matrixbestandteilen (→) (im oberen Chromatogramm Peakhöhe des Matrixbestandteils etwa 900 mAbs); Referenzsubstanzen ( $c=4 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) mit Zwiebelextrakt aus Heißextraktion verdünnt, vor (oben) und nach (unten) SPE, ohne Aufkonzentrierung (Nummern wie Abb. 2.34, S. 95).



**Abbildung 2.40:** Festphasenextraktion: Wiederfindungsraten (WFR) für zehn Flavonole, Flavone und Benzofuranone (4 µg/mL ohne Aufkonzentrierung, 1 µg/mL mit Aufkonzentrierung 5:2); Schwankungen der jeweiligen Doppelbestimmungen im Bereich zwischen 0,5 und 7,0 % (Einzelwerte in experimentellen Teil).

#### 2.6.4.2 Festphasenextraktion ohne Zusatz von Antioxidans

Die Festphasenextraktion wurde wie erwähnt zunächst unter Verwendung von nur zwei Verbindungen und ohne Matrix ausgearbeitet. Zur Beurteilung ihrer Leistungsfähigkeit war es anschließend notwendig, Wiederfindungsraten aller Analyten unter verschiedenen Bedingungen zu bestimmen. Um einen Überblick zu erhalten, wurden sie bei zwei Konzentrationen (ohne und mit Anreicherung) sowie ohne und mit Matrix (Zwiebelextrakt aus Heißextraktion) zunächst in einer Doppelbestimmung ermittelt (Abb. 2.40). Aus den Ergebnissen läßt sich erkennen, daß die Festphasenextraktion in dieser Form nicht unverändert für die vorliegende Aufgabe geeignet ist. Im einzelnen lassen sich mehrere Schlüsse ziehen:

1. Sehr gute WFR bei höherer Konzentration ohne Matrix,
2. Verluste an Flavonolen (insbesondere Myricetin und Quercetin) bei höherer Konzentration mit Matrix,
3. Schlechtere WFR bei geringerer Konzentration ohne Matrix, Verluste an Flavonolen bei Aufkonzentrierung (insbesondere Myricetin, Fisetin und Quercetin),
4. Bei geringerer Konzentration mit Matrix deutliche Zunahme von oxidiertem Quercetin und Fisetin bei Aufkonzentrierung.

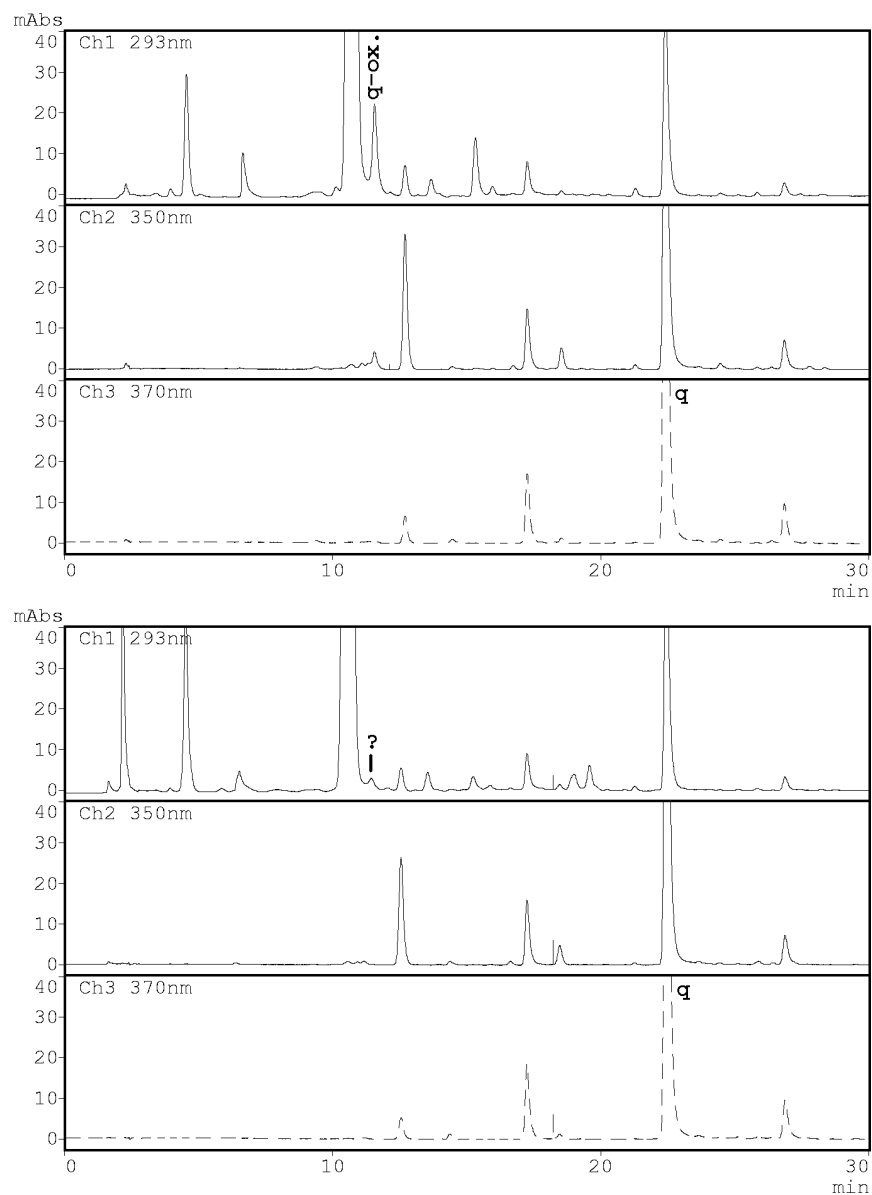
Ohne Matrix und ohne Anreicherung werden die Analyten zwar in ausreichender Weise retardiert und auch eluiert. Allerdings bewirkt die Matrix insbesondere bei niedriger Analytkonzentration und beim Einengen des THF-haltigen Eluats offensichtlich eine Oxidation der Flavonole. Die entwickelte Methode ist demnach zwar für die untersuchten Verbindungen grundsätzlich geeignet, allerdings hat die Matrix einen starken prooxidativen Einfluß. Das bedeutet aber, daß die Analyten unter den gewählten Bedingungen erst durch die Analytik gebildet werden und so die Ergebnisse gänzlich verfälscht werden. Die oben angesprochene Vermutung, daß bei den von Hirose et al. [69] veröffentlichten Ergebnissen zum Vorkommen von oxidiertem Quercetin in Zwiebeln das Flavonol evtl. bei der Probenaufarbeitung erst oxidiert wurde, wird durch diese Beobachtung gestützt.

#### 2.6.4.3 Festphasenextraktion mit Zusatz von Antioxidans

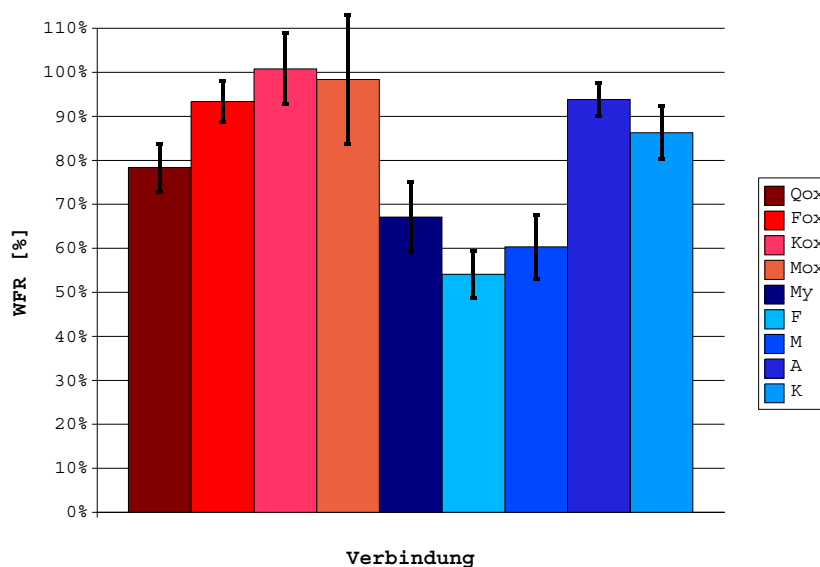
Eine robuste Analytik der Polyphenole muß in der Lage sein, die Oxidation während der Probenaufarbeitung zu verhindern. Aus diesem Grund wurde die entwickelte Festphasenextraktion dahingehend erweitert, daß zur Elution THF verwendet wurde, in dem Ascorbinsäure als Antioxidans in einer Konzentration von 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  gelöst wurde. Die Aufreinigung von Zwiebelextrakt mit dieser Methode zeigte, daß dadurch die Oxidation des Quercetins bei der Anreicherung unterbunden werden kann. In der Lösung mit Zusatz von Ascorbinsäure konnte das Benzofuranon nicht nachgewiesen werden, während es in der Lösung ohne Zusatz von Ascorbinsäure zu etwa 3,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  vorhanden war (Abb. 2.41). Nach einer Standzeit von etwa zwölf Stunden war in dieser Lösung Quercetin nicht mehr nachweisbar, sein Oxidationsprodukt lag hingegen in einer Konzentration von etwa 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  vor. In der anderen Lösung war es hingegen durch die Ascorbinsäure auch weiterhin nicht nachweisbar. Um eine verlässliche Aussage über das Vorhandensein von Benzofuranonen in natürlichen Matrices treffen zu können, ist also der Zusatz eines Antioxidans bei der Festphasenextraktion unverzichtbar.

Aus der Untersuchung des Zwiebelextraktes ging hervor, daß diese abgewandelte Methode qualitativ zur Analytik der Benzofuranone geeignet ist. Zur ihrer quantitativen Absicherung wurden die Wiederfindungsraten der Analyten bei der Festphasenextraktion ermittelt ( $n=6$ ). Dazu wurden die Analyten bei einer Konzentration von 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  eingesetzt, was im Bereich der Bestimmungsgrenzen liegt. Die Aufkonzentrierung erfolgte mit einem Faktor von 5:1 bis zu einer maximalen Konzentration von 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Die ermittelten Wiederfindungsraten lagen bei dieser Vorgehensweise in einem akzeptablen Bereich zwischen 80 und 100 % für die Benzofuranone, etwas niedriger für die



**Abbildung 2.41:** Zwiebelextrakt nach Säurehydrolyse, ohne Lagerung, Festphasenextraktion ohne (oben) und mit (unten) Zusatz von Ascorbinsäure zum THF, Anreicherung 5:2; Gradientenelution auf Purospher-Säule; Photodiodenarray-Detektion, Monitoring bei 293, 350, 370 nm (q: Quercetin, q-ox.: oxidiertes Quercetin, ?: oxidiertes Quercetin nicht nachweisbar).



**Abbildung 2.42:** Festphasenextraktion: Wiederfindungsraten (WFR) für neun Flavonole, Flavone und Benzofuranone ( $2 \mu\text{g}/\text{mL}$  vor der SPE, Aufkonzentrierung 5:1), Fehlerbalken kennzeichnen die relative Standardabweichung ( $n=6$ ).

Flavonole (Abb. 2.42). Das Quercetin, das in dem Extrakt vorhanden war, fand sich zu etwa 80 % in der angereicherten Lösung wieder (Vergleich der mittleren Peakflächen vor und nach SPE). Verluste der Flavonole sind zwar zu erkennen, aus den Werten läßt sich aber ablesen, daß es keine Anzeichen für ihre Oxidation zu Benzofuranonen im Verlauf der Probenaufarbeitung gibt.

Durch den Einsatz des Antioxidans Ascorbinsäure ist damit erstmals eine Aufarbeitung beschrieben, die eine eindeutige Analytik von Benzofuranonen zuläßt, ohne daß diese als Artefakte im Verlauf der Untersuchung entstehen. Bei der Übertragung dieser Methode auf andere Matrices ist natürlich Vorsicht geboten und in jedem Fall zu prüfen, ob ähnliche Einflüsse wie hier ebenfalls beobachtet werden können. Besonders für den Fall, daß eine Aufkonzentrierung notwendig scheint, muß vorab getestet werden, inwieweit die Ergebnisse durch die Methode selbst verfälscht werden können.



## 2.6.5 Ergebnisse der Chromatographie

### 2.6.5.1 Einleitung

Bei der vorangegangenen Beschreibung der Methodenentwicklung wurden bereits einige wesentliche Ergebnisse der Untersuchung der Pflanzenextrakte erwähnt. An dieser Stelle soll noch einmal kurz auf die Vor- und Nachteile der einzelnen neu entwickelten HPLC-Methoden zur Analytik der Benzofuranone in natürlicher Matrix eingegangen werden. Zudem werden weitere Ergebnisse der Untersuchung der Extrakte aus der Heiß- und der Kaltextraktion präsentiert.

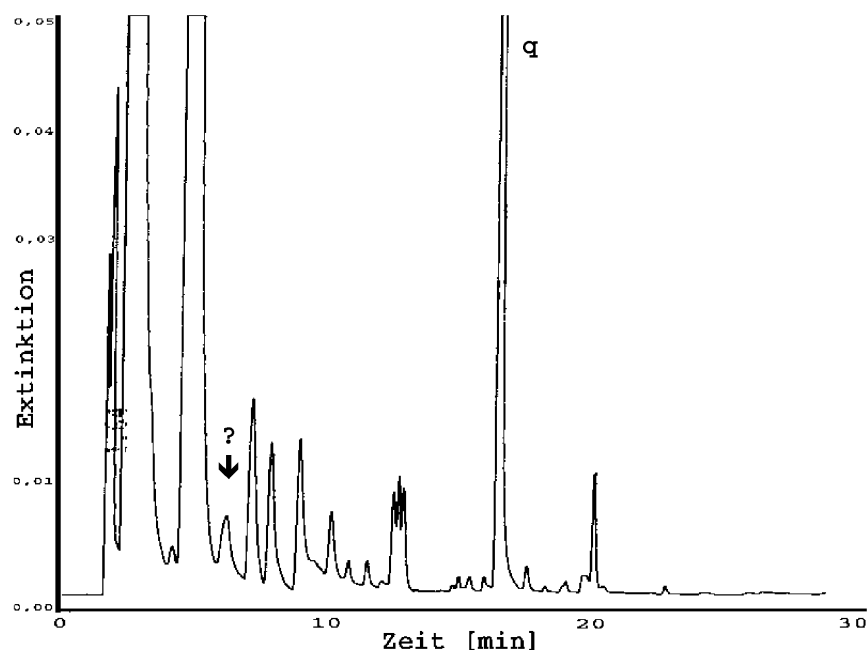
### 2.6.5.2 Vergleich der entwickelten chromatographischen Verfahren

Die entwickelten HPLC-Methoden erwiesen sich als grundsätzlich geeignet für die Untersuchung der Gemüseextrakte. Mit beiden HPLC-Säulen wurde eine Trennung von Analyten und Matrix erreicht.

**UV/Vis-Detektion** In den Zwiebelextrakten eluierte kurz vor dem oxidierten Quercetin eine Verbindung, die in hoher Konzentration in den Lösungen vorhanden war und durch ihr Absorptionsmaximum bei etwa 280 nm auch in den Chromatogrammen bei 293 nm deutlich störte. Eine Abtrennung dieser Verbindung mit Festphasenextraktion war, wie oben mit DAD gezeigt, nicht möglich.

Erwartungsgemäß war die zwar sehr sensitive UV-Detektion bei den für die Aufgabenstellung notwendigen niedrigen Wellenlängen also nicht ausreichend selektiv und lieferte natürlich auch keine weitere qualitative Information über die eluierenden Verbindungen (Abb. 2.43). Zwar war zu der Retentionszeit des oxidierten Quercetin (ca. 7 min) ein Peak zu erkennen, der auch bei einer Wellenlänge von 293 nm angezeigt wurde, es kann aber nicht abgesichert werden, ob es sich dabei tatsächlich um die gesuchte Verbindung handelt.

**Elektrochemische Detektion** Die elektrochemische Detektion bei einem konstanten Potential lieferte zwar ebenfalls keine qualitative Absicherung der eluierenden Verbindungen, hatte aber im Vergleich zur UV-Detektion einen wesentlichen Vorteil. Durch die Wahl des angelegten Potentials ließen sich die Matrixbestandteile ausblenden, die im Chromatogramm der UV-Detektion die größten Peaks ergaben. Bei einem Potential von 600 mV, das oberhalb des Halbstufenpotentials der Flavonole sowie der Oxidationsprodukte von Quercetin und Fisetin (s. Tab. 2.8, S. 98) liegt, wurden abgesehen von sehr früh eluierenden

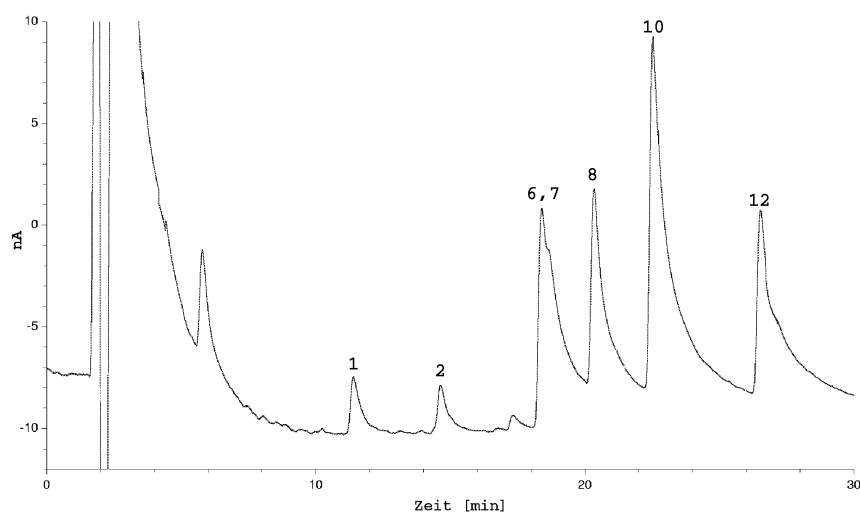


**Abbildung 2.43:** Zwiebelextrakt nach Säurehydrolyse, ohne Lagerung, ohne Festphasenextraktion; Gradientenelution auf 2 mm-Discovery-Säule; UV-Detektion bei 293, 350, 370 nm gleichzeitig (q: Quercetin, ?: Retentionszeit des oxidierten Quercetin).

Verbindungen nur die Analyten detektiert (Abb. 2.44). Zwar war hier die Basisliniendrift deutlich schwächer als bei 1000 mV, aufgrund der unter den gewählten Bedingungen geringeren Empfindlichkeit der elektrochemischen Detektion wurden jedoch alle quantitativen Bestimmungen mit dem DAD, sowie eine zusätzliche qualitative Absicherung mit ESI-ion trap/MS durchgeführt.

### 2.6.5.3 Extrakte aus Heißextraktion

**Photodiodenarray-Detektion** Mit dem Photodiodenarraydetektor wurde in den frischen Extrakten (Einwaage an gefriergetrocknetem Material: 0,500 g) Quercetin in Konzentrationen von etwa  $15 \mu\text{g/mL}$  detektiert. Bezogen auf die Aufarbeitung entspricht das Konzentrationen von ca.  $350 \text{ mg/kg}$  Frischgewicht. Dies liegt exakt im Bereich der Werte, die Hertog et al. [36] für Zwiebeln angegeben haben. Wie oben bereits erwähnt, konnte das aus Quercetin gebildete Benzofuranon in frischen Extrakten nicht nachgewiesen werden ( $0,84 \mu\text{g/mL}$ ). Ein qualitativer Unterschied zwischen den selbst gefriergetrockneten Zwiebeln und dem Handelsprodukt war nicht zu erkennen. Die Konzentration an Quercetin lag bei den selbst hergestellten um etwa 60 % höher. Da die Konzentrationen auf die Einwaage



**Abbildung 2.44:** Referenzsubstanzen ( $c=5 \mu\text{g/mL}$ ) mit Zwiebelextrakt aus Heißextraktion verdünnt, ohne Lagerung, ohne Festphasenextraktion; Gradientenelution auf Purospher-Säule; elektrochemische Detektion bei 0,60 V (vs. Ag/AgCl) (Nummern wie Abb. 2.34, S. 95).

an getrocknetem Material bezogen sind, lassen sie sich durch evtl. unterschiedliche Wassergehalte erklären. Ebenso spielen natürliche Schwankungen im Ausgangsmaterial und das Alter des Probenmaterials eine Rolle. Auch in Lauchextrakt war zwar Kaempferol, nicht aber dessen Oxidationsprodukt nachweisbar ( $0,25 \mu\text{g/mL}$ ). Das gleiche galt ebenso bei einem Einsatz von 2,00 g des gefriergetrockneten Materials zur Hydrolyse.

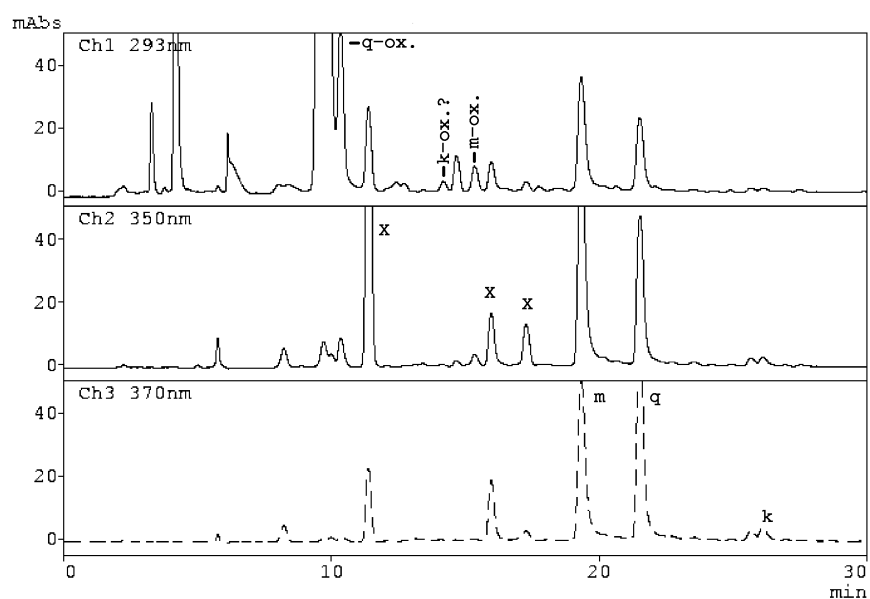
Zum Vergleich zu der von Hirose et al. [69] für das oxidierte Quercetin angegebenen Menge von fast 400 mg/100 g Zwiebeln wurde die minimal mit der neu entwickelten HPLC-Methode nachweisbare Menge berechnet. Bei einer Wiederfindung des oxidierten Quercetin bei der Heißextraktion von etwa 60 % und einer Nachweisgrenze von  $0,84 \mu\text{g/mL}$  bei der HPLC errechnet sich eine maximale Konzentration dieser Verbindung in den frischen Zwiebeln von 0,9 mg/100 g. Der hier gefundene Wert liegt also mindestens um den Faktor 400 unter dem bisher in der Literatur beschriebenen. Eine Oxidation von Quercetin zu dem entsprechenden Benzofuranon scheint folglich in Zwiebeln nicht die in der Literatur angegebene Rolle zu spielen.

Da aber die Anreicherung nach der Festphasenextraktion ohne Antioxidans gezeigt hatte, daß grundsätzlich Bestandteile des Zwiebelextraktes die Oxidation bewirken können, wurde versucht, die Ursachen dafür genauer einzugrenzen. Dazu wurden Extrakte über einen Zeitraum von zwei Wochen bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert und wiederholt in die HPLC injiziert. Im Vergleich zu den frischen Extrakten nahm dabei die Konzentration von Quercetin sowohl

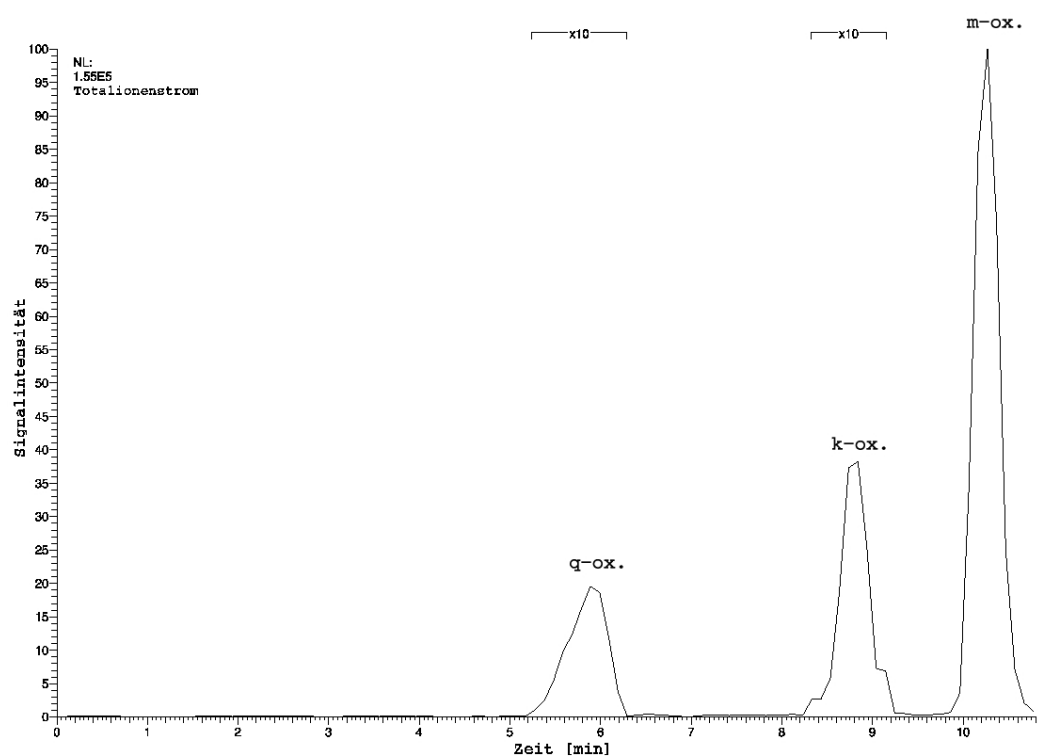
bei den selbst getrockneten Zwiebeln, wie auch bei dem Handelsprodukt kontinuierlich auf einen Wert von etwa 75 % der Anfangskonzentration ab. Gleichzeitig war aber kein Anstieg des Peaks für das oxidierte Quercetin festzustellen. In den stark verdünnten Lösungen ist also auch nach zwei Wochen das Benzofuranon nicht nachweisbar.

**ESI-ion trap/MS-Detektion** Es war Ziel, auch die massenspektrometrische Detektion auf ihre Eignung für die Untersuchung von biologischem Material zu untersuchen. Die bisherigen Ergebnisse zeigen aber, daß die oxidierten Flavonole nicht nativ in den Gemüseextrakten nachweisbar sind. Daher wurde für die Messung am MS ein Extrakt ohne Zusatz von Ascorbinsäure der Festphasenextraktion unterzogen. Dabei wurde der frische Zwiebelextrakt vor der SPE zusätzlich mit Morin versetzt. Da das oxidierte Morin fünf Minuten später eluiert als das oxidierte Quercetin und somit deutlich von den Störsubstanzen abgetrennt wird, war dieses Flavonol gut zur Untersuchung geeignet. Nach einer Reaktionszeit von einer Stunde wurde zur Kontrolle in die HPLC mit DAD injiziert. In der Lösung konnten erwartungsgemäß nach dieser Zeit keine oxidierten Flavonole nachgewiesen werden. Nach Festphasenextraktion ohne Zusatz von Ascorbinsäure und Aufkonzentrieren um den Faktor zehn wurden die Oxidationsprodukte sowohl von Quercetin, als auch von Morin nachgewiesen (Bestätigung durch UV/Vis-Spektren) (Abb. 2.45). Auffällig war, daß in dem Chromatogramm auch Peaks zu den Retentionszeiten von Kaempferol und oxidiertem Kaempferol zu sehen waren, wobei ersteres eindeutig durch das UV/Vis-Spektrum des Peaks belegt wurde. Es muß an dieser Stelle aber nochmals betont werden, daß die Benzofuranone erst bei der Aufkonzentrierung aus den jeweiligen Flavonolen gebildet werden und nicht nativ in dem Zwiebelextrakt nachweisbar sind.

In den DAD-Chromatogrammen ist deutlich zu erkennen, daß die störenden Matrixbestandteile im wesentlichen bei der Monitoring-Wellenlänge von 293 nm detektiert werden. Erwartungsgemäß ist die Selektivität bei 350 und 370 nm wesentlich höher, die Empfindlichkeit für die Benzofuranone aber auch deutlich niedriger. Die Lösung wurde daher mit der neu entwickelten HPLC-ESI-ion trap/MS-Methode analysiert. Die Untersuchung bestätigte, daß in der Probe die drei Benzofuranone vorhanden sind, die aus der Oxidation von Quercetin, Morin und Kaempferol resultieren (Abb. 2.46). Aus dem Chromatogramm geht sehr deutlich hervor, daß die massenspektrometrische Detektion eine sehr hohe Selektivität für die untersuchten Analyten bietet. Die bei der Wellenlängendetektion störenden Verbindungen werden hier nicht registriert. Auffällig ist allerdings, daß die Oxidationsprodukte von Quercetin und Kaempferol deutlich weniger empfindlich detektiert werden als



**Abbildung 2.45:** Zwiebelextrakt nach Säurehydrolyse, mit Morin versetzt, Festphasenextraktion ohne Antioxidans an HR-P-Kartusche, 10:1 aufkonzentriert; Gradientenelution auf Purospher-Säule; Photodiodearray-Detektion, Monitoring bei 293, 350, 370 nm (q-ox.: oxidiertes Quercetin, k-ox.: oxidiertes Kaempferol, m-ox.: oxidiertes Morin, m: Morin, q: Quercetin, k: Kaempferol, X: unbekannte Verbindungen).



**Abbildung 2.46:** Zwiebelextrakt nach Säurehydrolyse, mit Morin versetzt, Festphasenextraktion ohne Antioxidans an HR-P-Kartusche, 10:1 aufkonzentriert; Gradientenelution auf 2 mm-Discovery-Säule, ESI-ion trap/MS<sup>2</sup>-Detektion mit Zeitfenstern und charakteristischen Spuren für  $m/z$  317 (Peaks 1 und 3) und  $m/z$  301 (Peak 2) (q-ox.: oxidiertes Quercetin, k-ox.: oxidiertes Kaempferol, m-ox.: oxidiertes Morin) (Peaks 1 und 2 zehnfach vergrößert).

das von Morin. Quantitative Messungen wurden am MS zwar nicht durchgeführt, aus dem Chromatogramm ist aber abzulesen, daß für die ersten beiden Peaks unter den gewählten Bedingungen etwa die Hälfte der eingesetzten Konzentration noch sicher nachweisbar ist, während sie beim oxidierten Morin deutlich höher liegt. Die Stärke der massenspektrometrischen Detektion liegt daher sicher in der zweifelsfreien Absicherung der Ergebnisse der anderen HPLC-Methoden, während zur quantitativen Untersuchung die Photodiodenarray-Detektion besser geeignet scheint.

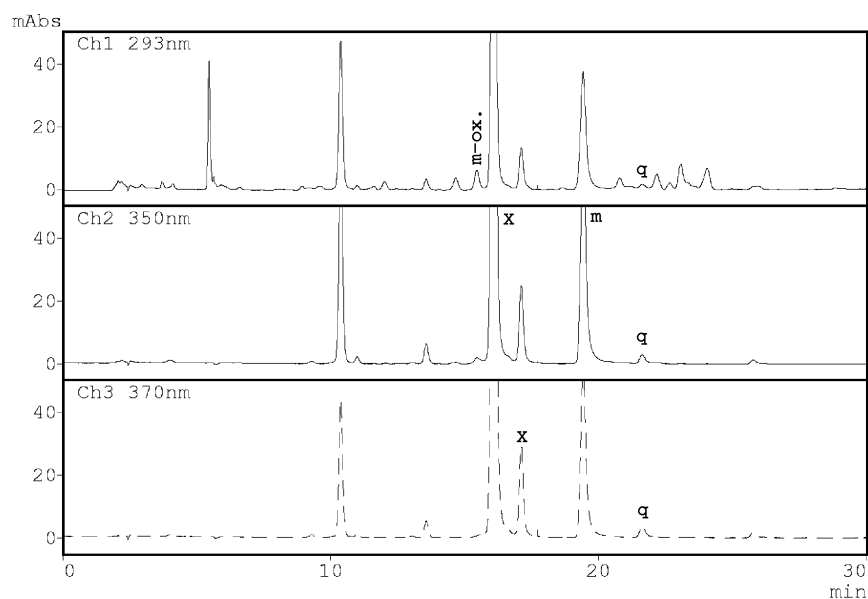
#### 2.6.5.4 Extrakte aus Kaltextraktion

Die Ergebnisse der Untersuchung der Zwiebelextrakte geben nicht darüber Auskunft, wodurch die Flavonole oxidiert wurden. Da bei der Heißextraktion die Aktivität von Enzymen aber mit großer Wahrscheinlichkeit verloren geht, wurden zusätzlich ähnliche Versuche mit frischen Zwiebeln und frischem Lauch durchgeführt.

**Zusatz von Morin vor dem Homogenisieren** Bei einer Zugabe von Morinlösung vor dem Homogenisieren des Pflanzenmaterials zeigte sich sowohl bei Zwiebeln, als auch bei Lauch, daß das Flavonol in dem Homogenisat nicht nachweisbar war, obwohl es in einer Menge zugesetzt wurde, die zu einer Konzentration von 10 µg/mL in der injizierten Lösung führen sollte. Während der fünfminütigen Zerkleinerung der Proben mit dem Ultraturax waren offensichtlich die enzymatischen oder chemischen Reaktionen in den aufgeschlossenen Zellen so stark, daß ein rasanter Abbau des Flavonols stattfindet. Das entsprechende Benzofuranon konnte jedoch weder im Zwiebel- noch im Lauchextrakt nachgewiesen werden.

Der Versuch, durch vorsichtiges Erwärmen bei einem pH-Wert von 3 die Hydrolyse von Quercetin oder auch dem Benzofuranon aus evtl. vorliegenden Glykosiden, bzw. die Oxidation von Morin zu erreichen, gelang nicht. Wie bei den rein wäßrigen Kaltextrakten (pH 6) waren auch hier die Oxidationsprodukte nicht nachweisbar.

**Zusatz von Morin nach dem Homogenisieren** Da die - unbekanntes - Abbaureaktionen während des Zerkleinerns der Probe so rasch abliefen, wurden weiterhin Extrakte nur mit Wasser hergestellt und diese nach dem Filtrieren zum Verdünnen der Referenzlösung von Morin verwendet. Anschließend wurden die Lösungen nach unterschiedlich langen Aufbewahrungszeiten in die HPLC injiziert. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Beobachtungen war hier das Flavonol deutlich stabiler. In der frischen Lösung wurde es zu etwa



**Abbildung 2.47:** Zwiebelextrakt nach Kaltextraktion mit Wasser, anschließend mit Morin versetzt, ohne Lagerung, Festphasenextraktion ohne Antioxidans an HRP-Kartusche, 10:1 aufkonzentriert; Gradientenelution auf Purospher-Säule; Photodiodenarray-Detektion, Monitoring bei 293, 350, 370 nm (m-ox.: oxidiertes Morin, m: Morin, q: Quercetin, X: unbekannte Verbindungen).

100 % wiedergefunden, war aber nach sechzig Minuten bis auf etwa 40 % der ursprünglichen Konzentration metabolisiert. Auch hier konnte das entsprechende Benzofuranon nicht nachgewiesen werden.

Analog zu den Untersuchungen der Heißextrakte wurde ebenfalls eine Festphasenextraktion mit zehnfacher Aufkonzentrierung ohne Zusatz von Ascorbinsäure durchgeführt. Auch hier war, wie bei den oben untersuchten Lösungen, erst nach Aufkonzentrierung ein Peak für das oxidierte Morin zu erkennen<sup>11</sup> (Abb. 2.47). Quercetin konnte ebenfalls nachgewiesen werden, erwartungsgemäß aber in geringerer Konzentration als nach Säurehydrolyse der Glykoside, während oxidiertes Quercetin nicht nachweisbar war.

Auffällig ist das Auftauchen eines intensiven Peaks kurz hinter dem oxidierten Morin, der bei den Heißextrakten nicht vorkommt, obwohl zu erwarten wäre, daß bei einer Kaltextraktion deutlich weniger Verbindungen mitextrahiert werden. Da aber der Säureaufschluß fehlt, kann es sich bei der Verbindung evtl. um ein Glykosid handeln. Eine weitere Aufklärung dieser Verbindung wurde aber nicht betrieben.

In frischem wäßrigen Zwiebelextrakt kann also auch eine Oxidation von Flavonolen

<sup>11</sup>In einem Blindversuch ohne Zwiebeln wurde kein oxidiertes Morin nachgewiesen.



zu Benzofuranonen ablaufen, sofern die Matrix mit den Flavonolen ohne Zusatz von Antioxidans aufkonzentriert wird. Welche Verbindungen dafür ausschlaggebend sind, kann aus den Ergebnissen aber nicht entnommen werden. Insbesondere zeigte sich, daß Metabolisationsreaktionen von Flavonolen in frischem, zerkleinerten Gemüse sehr schnell ablaufen können. Ob dabei die Zwischenstufe Benzofuranon durchlaufen wird, läßt sich anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht sagen. Es konnte aber deutlich herausgestellt werden, daß die HPLC-Methode zur Untersuchung unterschiedlich hergestellter Pflanzenextrakte gleichermaßen geeignet war.

### 2.6.6 Zusammenfassung und Diskussion

Die entwickelten HPLC-Methoden konnten zum Teil mit Erfolg auf die Analytik von Zwiebeln angewendet werden. Die UV/Vis-Detektion war erwartungsgemäß bei den relativ niedrigen Wellenlängen zu unspezifisch. Im Gegensatz dazu bot die elektrochemische Detektion den Vorteil, daß aus der Matrix mitextrahierte störende Verbindungen bei dem angelegten Potential teilweise nicht elektrochemisch aktiv waren. So wurden einige der Störsubstanzen aus den Chromatogrammen ausgeblendet, allerdings fehlte auch hier die zwingend notwendige qualitative Absicherung der eluierenden Verbindungen. Diese Informationen konnten mit der Photodiodenarray-Detektion und insbesondere der massenspektrometrischen Detektion erhalten werden. Für weitere Untersuchungen anderer Matrices sind daher diese beiden neu entwickelten Verfahren vorzuziehen.

Die Ermittlung der matrixabhängigen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Photodiodenarray-Detektion resultierte in ähnlichen Werten wie die ohne Matrix durchgeführte. Die früh eluierenden Verbindungen werden allerdings durch Interferenzen mit Matrixbestandteilen weniger empfindlich nachgewiesen. Zur Spuren-Matrix-Trennung und zur Anreicherung von Benzofuranonen aus natürlichen Matrices wurde eine Methode zur Festphasenextraktion entwickelt. Dabei zeigte sich, daß bei einer Aufkonzentrierung der Extrakte sowohl aus Heiß-, als auch aus Kaltextraktion die Oxidation von Flavonolen zu Benzofuranonen durch die Matrix stark begünstigt wird. Dies erhärtet die Vermutung, daß die in der Literatur [69] angegebene hohe Konzentration von oxidiertem Quercetin in Zwiebeln auf eine Artefaktbildung während der Aufarbeitung zurückzuführen ist. Dieser unerwünschte Effekt, der Fehlinterpretationen herausfordert, ließ sich durch Zusatz von Ascorbinsäure unterbinden. Damit steht erstmals ein Verfahren zur Anreicherung der oxidierten Flavonole aus natürlichen Matrices zur Verfügung.

Es konnte jedoch nicht weiter eingegrenzt werden, welche Faktoren in den Extrakten

zu der Oxidation beitragen. Zwar wurde beobachtet, daß im Verlauf der Lagerung von Heißextrakten die Konzentration an Flavonolen ab-, nicht aber die von Benzofuranonen zunahm. In Kaltextrakten ging ein Abbau wesentlich schneller vonstatten, aber auch hier konnten die Benzofuranone nicht nachgewiesen werden. Sollten sie in einem intermediären Schritt entstehen, so sind sie jedoch mit den angewandten Methoden nicht zu erfassen. An dieser Stelle konnte jedoch das analytische Rüstzeug zur Verfügung gestellt werden. Damit sollte es möglich sein, wesentlich gezielter und mit modernen Methoden die Oxidation von Flavonolen zu untersuchen, z.B. auch in gezielt isolierten Enzym- oder Zellsuspensionen, wie sie bei der photometrischen Untersuchung der Oxidation von Quercetin beschrieben wurden [73].

Die Analytik von Zwiebeln und Lauch diente als erster Schritt zur Untersuchung von natürlichen Matrices auf Oxidationsprodukte von Flavonolen. Es konnte gezeigt werden, daß die neu entwickelten HPLC-Methoden zu diesem Zweck geeignet sind. Sie sollten sich demnach auch auf die Untersuchung anderer Matrices übertragen lassen. Dabei ist stets zwingend zu beachten, daß die Untersuchungsbedingungen einen Einfluß auf das Entstehen der nachzuweisenden Analyten haben können. Die in der Literatur beschriebene Untersuchungsweise [68, 69] ist im Licht dieser Ergebnisse mehr als kritisch zu betrachten.

# Kapitel 3

## Experimenteller Teil

### 3.1 Allgemeines

#### 3.1.1 Feststoffe

Folgende Feststoffe wurden verwendet (Qualität: zur Analyse (p.a.), wenn nicht anders angegeben:

Verbindung	Hersteller	Bestell-Nr.
Ascorbinsäure $\geq 99$ %	Sigma	A-1417
Apigenin $\sim 95$ %	Sigma	A-3145
Brenzcatechin		
(+)-Catechin	Sigma	C-1251
<i>p</i> -Cymen-2,3-diol	*	
Fisetin 99 %	Fluka	46340
3-Hydroxyflavon 98 %+	Avocado	18110
1,2-Dimethyl-3-Hydroxy-4-pyridon	Acros	27874
Kaempferol 96 %	Fluka	60010
Kaempferol 90 %	Sigma	K-0133
Luteolin	Sigma	L-9283
3-Methoxyflavon	*	
Morin	Sigma	M-4008
Myricetin $\sim 97$ %	Fluka	70050
Quercetin Dihydrat	Sigma	Q-0125

Verbindung	Hersteller	Bestell-Nr.
Quercetin-3-methylether	*	
Thymol	Aldrich	112097
$\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$	Merck	101063
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Merck	102733
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ chem. rein	Riedel de Haen	618/6353
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$	Merck	
$\text{Na}_2\text{SO}_4$ geglüht (2 h bei 500 °C)	Merck	106649
$\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$	Merck	101116
Diethyldithiocarbaminsäure, Na-Salz $\cdot 3 \text{H}_2\text{O}$	Sigma	D-9428
Lewatit S100 (starker Kationentauscher)	Bayer	97-620

\**p*-Cymen-2,3-diol, sowie die 3-Methylether von 3-Hydroxyflavon und Quercetin wurden von Herrn Dr. Frank Hoyer am Chemischen Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover synthetisiert. Die Identität der Verbindungen wurde durch  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  und EI-MS bestätigt.

### 3.1.2 Flüssigkeiten

Folgende Flüssigkeiten in den angegebenen Qualitäten wurden verwendet:

Verbindung	Qualität	Hersteller	Bestell-Nr.
Acetonitril	ROTISOLV HPLC	Roth	7330
	R Chromasolv	Riedel-de Haen	34881
Diethylether	für Analyse, stabilisiert	Riedel-de Haen	32203
Essigsäure	min. 99,8 %, für Analyse	Riedel-de Haen	33209
Ethanol	technisch, 2 fach destilliert		
Methanol	G Chromasolv	Riedel-de Haen	34885
Salzsäure	25 %, zur Analyse	Merck	316.2500
Tetrahydrofuran	Chromasolv	Riedel-de Haen	34865
Trifluoressigsäure		Sigma	T-6508
Wasser	Millipore 18 M $\Omega$		
$\text{Cu}^{2+}$ als $\text{CuSO}_4$	wäßr. Lösung für die AAS; 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Baker	4771
$\text{Fe}^{3+}$ als $\text{FeCl}_3$	wäßr. Lösung für die AAS; 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Riedel-de Haen	35423

### 3.1.3 Lösungen

Zur Herstellung der Eluenten und Lösungsmittelgemische wurden (1) 20,0 g der Essigsäure mit Wasser auf 1000 mL aufgefüllt, woraus ein pH-Wert von 2,5 folgte, oder (2) 3,85 g Ammoniumacetat (0,05 mol) in ca. 900 mL Wasser gelöst, durch Zutropfen von Essigsäure 99,8 % ein pH-Wert von 4,0 eingestellt und mit Wasser auf 1000 mL aufgefüllt.

Stammlösungen der jeweiligen Referenzsubstanzen in einer Konzentration von 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  wurden jeweils in Acetonitril, Methanol und Ethanol angesetzt.

Die Stammlösungen der Phenole wurden zur Herstellung von Referenzlösungen auf eine Konzentration von 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  verdünnt. Dazu wurden je nach Untersuchungszweck die wäßrige Essigsäure, der Acetatpuffer oder Gemische von diesen mit den jeweiligen organischen Lösungsmitteln verwendet.

Die Stammlösungen von  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$  (wäßrige Lösungen für die AAS) wurden zur Herstellung von Referenzlösungen auf eine Konzentration von 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  verdünnt. Dazu wurden je nach Untersuchungszweck die wäßrige Essigsäure, der Acetatpuffer oder Gemische mit den jeweiligen organischen Lösungsmitteln verwendet.

Die Stammlösung von  $\text{Al}^{3+}$  ( $c=1000 \mu\text{g}/\text{mL Al}^{3+}$ ) wurde hergestellt, indem 347,3 mg  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$  in einem Polyethylen-Meßkolben in 25 mL Wasser gelöst wurden. Sie wurde zur Herstellung einer Referenzlösung mit einem Gemisch aus Acetonitril und der wäßrigen Essigsäure (30/70, v/v) auf eine Konzentration von 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  verdünnt.

Die Stammlösung von  $\text{Fe}^{2+}$  ( $c=1000 \mu\text{g}/\text{mL Fe}^{2+}$ ) wurde am Tag der Verwendung frisch hergestellt. Dazu wurden 127,2 mg  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$  in einem Polyethylen-Meßkolben in 25 mL Wasser gelöst. Sie wurde zur Herstellung einer Referenzlösung mit einem Gemisch aus Acetonitril und der wäßrigen Essigsäure (30/70, v/v) auf eine Konzentration von 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  verdünnt.

Die Lösungen der Polyphenole wurden bei 4 °C, die der Kationen bei Raumtemperatur in Polyethylenflaschen aufbewahrt.

## 3.2 Spektrophotometrie

### 3.2.1 UV/Vis-Spektroskopie

#### 3.2.1.1 Lösungen

Zur Herstellung der zu messenden Lösungen wurden 400  $\mu\text{L}$  der entsprechenden Referenzlösung ( $c=100 \mu\text{g/mL}$ ) in ein Eppendorf-Gefäß (Fassungsvermögen 2 mL, Material Polyethylen) pipettiert und mit 1600  $\mu\text{L}$  des Gemischs aus dem jeweiligen organischen Lösungsmittel und der wäßrigen Essigsäure versetzt. Die Menge von 1600  $\mu\text{L}$  wurde bei Zusatz von Lösungen der Kationen um das entsprechende Volumen reduziert. So wurden Lösungen erhalten, die genau 20  $\mu\text{g/mL}$  des Phenols und variable Mengen der einzelnen Kationen enthielten.

#### 3.2.1.2 Spektrenaufnahme

Die UV/Vis-Spektren der untersuchten Lösungen wurden mit folgenden Parametern aufgenommen:

Gerät	Spektrophotometer 930 (Kontron)
Methode	Zweistrahlmessung gegen das jeweilige Lösungsmittel
Küvetten	Quartz; 5 mm
Modus	Spektrenaufnahme
Meßbereich	240 - 600 nm
Schrittweite	1 nm
Geschwindigkeit	200 nm/min
Datenverarbeitung	integrierte Software (Kontron) Export als ASCII-Dateien

Zur Aufnahme mehrerer Spektren derselben Lösung nacheinander wurde als Probenzahl 6 und als Zeitverzögerung 5 min. gewählt.

#### 3.2.1.3 Zeitabhängige Messung

Die Messung der zeitabhängigen Zunahme der Extinktion in den Maxima der Oxidationsprodukte nach Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  zu den Flavonolen wurde mit den folgenden Parametern durchgeführt:

Gerät	Spektrophotometer 930 (Kontron)
Methode	Zweistrahlmessung gegen das jeweilige Lösungsmittel
Küvetten	Quartz; 5 mm
Modus	Zeitabhängige Messung
Wellenlänge	293 nm
Geschwindigkeit	1 Meßpunkt/min
Dauer	180 min
Datenverarbeitung	integrierte Software Version 9008 (Kontron) Export als ASCII-Dateien

### 3.2.1.4 Konzentrationsabhängige Messung

Die Messung der Änderung der Absorptionswerte in den Maxima der Flavonole und der oxidierten Flavonole in Abhängigkeit vom Konzentrationsverhältnis Flavonol:Kation wurde mit den folgenden Parametern durchgeführt:

Gerät	Spektrophotometer 930 (Kontron)
Methode	Zweistrahlmessung gegen das jeweilige Lösungsmittel
Küvetten	Quartz; 5 mm
Modus	Wellenlängenprogramm
Wellenlängen	293, 370, 420 nm
Datenverarbeitung	integrierte Software Version 9008 (Kontron)
	Export als ASCII-Dateien

## 3.2.2 Fluorimetrie

### 3.2.2.1 Lösungen

Alle Lösungen enthielten Acetonitril / wäßrige Essigsäure (2 g/100 mL) (30/70, v/v). Die Lösungen von Quercetin, Kaempferol, Morin und Apigenin hatten eine Konzentration von 5 µg/mL, die der Kationen Al<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup> und Fe<sup>3+</sup> eine Konzentration von 100 µg/mL, hergestellt durch Verdünnung aus den jeweiligen Referenzlösungen.

**Tabelle 3.2:** Anregungs- und Emissionsmaxima der Al<sup>3+</sup>-Komplexe der untersuchten Polyphenole (molares Verhältnis ~1:1; “-“: keine Fluoreszenz)

Flavonol	Anregung [nm]	Emission [nm]
Quercetin	425	476
Kaempferol	430	476
Morin	423	488
Apigenin	-	-

### 3.2.2.2 Spektrenaufnahme

Gerät	Spectrofluorometer SFM 23 (Kontron) Power Supply SFM 23 Igniter SFM 23
Küvetten	Quartz; 10 mm
Meßbereich	Anregung: 200 - 460 nm Emission: 440 - 800 nm
Geschwindigkeit	100 nm/min
Empfindlichkeit	Einstellung SENS: “MED”; Drehknopf auf 1,5
Datenverarbeitung	Schreiber: Kompensograph (Siemens); Eingang 100 mV; Vorschub: 20 mm/min

Zu 2000  $\mu\text{L}$  der Lösung des jeweiligen Polyphenols wurden in der Fluorimeterküvette 10  $\mu\text{L}$  der Al<sup>3+</sup>-Lösung pipettiert und mit einem Kunststoffspatel 10 s vermischt (molares Verhältnis 1:1). Nach einer Reaktionszeit von 10 min. wurden die Spektren aufgezeichnet.

Die Anregungs- und Emissionsmaxima in den aufgenommenen Spektren (Tab. 3.2) entsprachen den in der Literatur angegebenen [59].

Die Mischungen der Polyphenole mit Cu<sup>2+</sup> (2000  $\mu\text{L}$  Polyphenol + 22  $\mu\text{L}$  Cu<sup>2+</sup>) oder Fe<sup>3+</sup> (2000  $\mu\text{L}$  Polyphenol + 20  $\mu\text{L}$  Fe<sup>3+</sup>) zeigten keine Fluoreszenzaktivität (molares Verhältnis 1:1). Ebenso war die eingesetzten Lösungsmittel sowie die reinen Lösungen der Kationen und der Polyphenole nicht fluoreszierend.



**3.2.2.3 Veränderung der Fluoreszenz durch Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  oder  $\text{Fe}^{3+}$** 

Gerät	Spectrofluorometer SFM 23 (Kontron) Power Supply SFM 23 Igniter SFM 23
Küvetten	Quartz; 10 mm
Meßbereich	Anregungswellenlänge: s. Tab. 3.2 Emissionswellenlänge: s. Tab. 3.2
Empfindlichkeit	Einstellung SENS: "MED"; Drehknopf auf 2,0
Datenverarbeitung	Schreiber: Kompensograph (Siemens); Eingang 100 mV; Vorschub: 5 mm/min

Zu 2000  $\mu\text{L}$  der Lösung des jeweiligen Polyphenols wurden in der Fluorimeterküvette 10  $\mu\text{L}$  der  $\text{Al}^{3+}$ -Lösung pipettiert und mit einem Kunststoffspatel 10 s vermischt (molares Verhältnis 1:1). Nach einer Reaktionszeit von 10 min. wurden in zehnminütigen Abständen Lösungen von  $\text{Fe}^{3+}$  (4; 6; 10; 20; 60  $\mu\text{L}$ ) oder  $\text{Cu}^{2+}$  (4,4; 6,6; 11; 22; 66  $\mu\text{L}$ ) zugegeben, jeweils gerührt und die Änderung der Fluoreszenzintensität mit der Zeit aufgezeichnet (molare Verhältnisse Flavonol:Kation 5:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:5).

### 3.3 HPLC von Reaktionsmischungen Polyphenol/Kation

#### 3.3.1 HPLC-Säule

stationäre Phase	Parameter	Hersteller	Bestell-Nr.
Nucleogel RP 100-5/250	250×4,6 mm	Macherey-Nagel	719455

#### 3.3.2 Fluoreszenz-Detektion

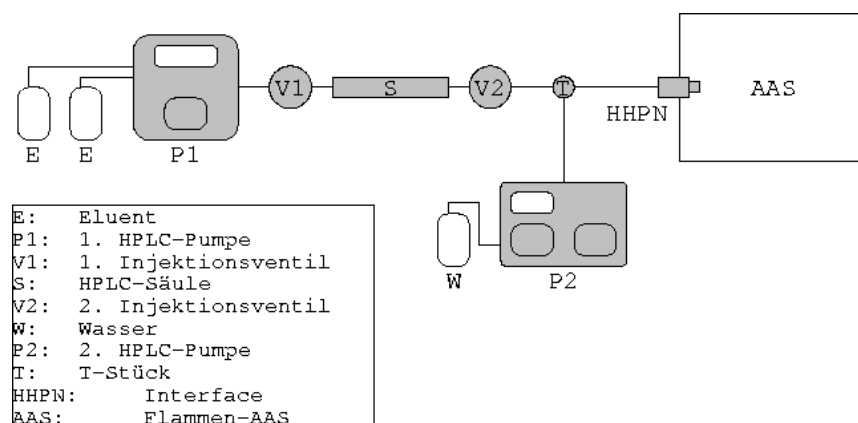
##### 3.3.2.1 Parameter

Pumpe	Maxi-Star K-1000, Edelstahl (Knauer)
Controller	eingebaut
Injektion	20 $\mu$ L Probenschleife, Knauer-Ventil, manuell
Eluenten	A: Acetonitril
	B: wäßrige Essigsäure (2 g/100 mL)
Zusammensetzung	28/72 (A/B), unter Vakuum im Ultraschallbad entgast
Flußrate	0,7 mL/min
Säule	Nucleogel RP 100-5/250, 250×4,6 mm (Macherey-Nagel)
Detektor	Fluorescence Detector LC 240 (Perkin Elmer)
(1) Detektion	Anregungswellenlänge: 425 nm Emissionswellenlänge: 476 nm Faktor: 256
(2) Spektrenaufnahme	Anhalten der Pumpe im Peakmaximum ("stopped-flow") Anregung: 200 - 450 nm Emission: 470 - 720 nm
Datenverarbeitung	eingebauter Thermoprinter Papiervorschub: 10 mm/min

##### 3.3.2.2 Lösungen

Alle Lösungen wurden in einem Gemisch aus Acetonitril / wäßrige Essigsäure (2 g/100 mL) (30/70, v/v) hergestellt.

Die Konzentration an Quercetin lag bei 40  $\mu$ g/mL, die von  $Al^{3+}$  zwischen 0,35 und 3,5  $\mu$ g/mL. Dazu wurden jeweils 800  $\mu$ L der Referenzlösung von Quercetin ( $c=100 \mu$ g/mL)



**Abbildung 3.1:** Schematischer Aufbau des HPLC-AAS-Systems.

in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und jeweils mit 7, 14, 35, 70  $\mu\text{L}$  der Referenzlösung von  $\text{Al}^{3+}$  ( $c=100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) versetzt (molare Verhältnisse Flavonol:Kation 10:1, 5:1, 2:1, 1:1). Anschließend wurde das Lösungsmittel bis zu einem Endvolumen von 2 mL zupipettiert und die Lösung umgeschüttelt. Nach einer Reaktionszeit von 10 min. wurde in die HPLC injiziert.

Die Beeinflussung der Peakhöhe durch  $\text{Fe}^{3+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$  wurde wie folgt gemessen. Die Konzentration an Quercetin lag bei 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , die von  $\text{Al}^{3+}$  bei 1,75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Dazu wurden jeweils 800  $\mu\text{L}$  der Referenzlösung von Quercetin ( $c=100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und mit 35  $\mu\text{L}$  der Referenzlösung von  $\text{Al}^{3+}$  ( $c=100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) versetzt (molares Verhältnis 2:1). Nach einer Reaktionszeit von 10 min. wurden Lösungen ( $c=100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) von  $\text{Fe}^{3+}$  (15; 30; 75; 150  $\mu\text{L}$ ) oder  $\text{Cu}^{2+}$  (17; 34; 85; 170  $\mu\text{L}$ ) zugegeben (molare Verhältnisse Flavonol:Kation 10:1, 5:1, 2:1, 1:1). Anschließend wurde das Lösungsmittel bis zu einem Endvolumen von 2 mL zupipettiert und die Lösung umgeschüttelt. Nach einer Reaktionszeit von 10 min. wurde in die HPLC injiziert.

### 3.3.3 HHPN-AAS-Detektion

#### 3.3.3.1 Parameter

Der Aufbau des Systems ist schematisch in Abbildung 3.1 dargestellt. Das zweite Injektionsventil diente zur Injektion der Kalibrierlösungen für das AAS. Die zweite HPLC-Pumpe wurde zum permanenten Zupumpen von Wasser vor dem HHPN-Interface verwendet. Durch die erhöhte Flußrate wurde eine stärkere Vernebelung des Eluenten im Interface erreicht. Dadurch ließ sich die Signalintensität am AAS um etwa 100 % steigern. Alle im

System verwendeten Kapillaren waren aus PEEK gefertigt.

Pumpe	Maxi-Star K-1000, PEEK (Knauer)
Controller	eingebaut
Entgasung	pneumatisch (Knauer)
Injektion	20 $\mu$ L Probenschleife, Knauer-Ventil, manuell
Eluenten	A: Acetonitril B: wäßrige Essigsäure (2 g/100 mL)
Zusammensetzung	28/72 (A/B)
Flußrate	0,7 mL/min
Säule	Nucleogel RP 100-5/250, 250 $\times$ 4 mm I.D. (Macherey-Nagel)
2. Injektion	20 $\mu$ L Probenschleife, Knauer-Ventil, manuell
2. Pumpe	Typ 64 (Knauer); Zupumpen von Wasser: 0,8 mL/min
Interface	HHPN (Knauer) Düsenplättchen: Titan, 20 $\mu$ m

### 3.3.3.2 AAS

Gerät	PU9100X (Unicam)
Brenngas	Acetylen
Hilfsgas	Luft
Lampe	Hohlkathodenlampe Cu, Nr. 354 (L.O.T. Oriol)
Wellenlänge	324,8 nm
Stromstärke	3 mA
Spaltbreite	2 nm
STAT	Brennerhöhe auf maximale Lichtdurchlässigkeit eingestellt
Datenverarbeitung	Eurochrom 2000 Software (Knauer)

### 3.3.3.3 Lösungen

Alle Lösungen wurden in einem Gemisch aus Acetonitril / wäßrige Essigsäure (2 g/100 mL) (30/70, v/v) hergestellt.

Das Vermögen der Nucleogel-Säule zur Adsorption von  $\text{Cu}^{2+}$  wurde wie folgt gemessen. Die Konzentrationen an  $\text{Cu}^{2+}$  lagen zwischen 2,1 und 16,8  $\mu\text{g/mL}$ . Dazu wurden jeweils 42, 84, 168, 336  $\mu\text{L}$  der Referenzlösung von  $\text{Cu}^{2+}$  ( $c=100 \mu\text{g/mL}$ ) in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel bis zu einem Endvolumen von 2 mL zupipettiert und umgeschüttelt. Die Lösungen wurden zur Kalibrierung des AAS hinter der HPLC-Säule, zur Aufnahme von Chromatogrammen vor der HPLC-Säule injiziert.

Die Beeinflussung der Retention von  $\text{Cu}^{2+}$  durch Quercetin wurde wie folgt gemessen. Die Konzentration an Quercetin lag bei  $40 \mu\text{g/mL}$ , die von  $\text{Cu}^{2+}$  zwischen  $2,1$  und  $16,8 \mu\text{g/mL}$ . Dazu wurden jeweils  $800 \mu\text{L}$  der Referenzlösung von Quercetin ( $c=100 \mu\text{g/mL}$ ) in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und jeweils mit  $42, 84, 168, 336 \mu\text{L}$  der Referenzlösung von  $\text{Cu}^{2+}$  ( $c=100 \mu\text{g/mL}$ ) versetzt (molare Verhältnisse Flavonol:Kation  $4:1, 2:1, 1:1, 1:2$ ). Anschließend wurde das Lösungsmittel bis zu einem Endvolumen von  $2 \text{ mL}$  zupipettiert und die Lösung umgeschüttelt. Die Lösungen wurden nach einer Reaktionszeit von  $15 \text{ min}$  verwendet. Sie wurden zur Kalibrierung des AAS hinter der HPLC-Säule, zur Aufnahme von Chromatogrammen vor der HPLC-Säule injiziert.

#### 3.3.3.4 Kalibrierung und Wiederfindungsrate

Die Kalibrierung wurde mit Lösungen von  $\text{Cu}^{2+}$  ohne und mit Zusatz von Quercetin durchgeführt. Anhand der Kalibrierfunktionen wurden die Flächen der Peaks der vor der Säule injizierten Lösungen in Konzentrationen umgerechnet und daraus die Wiederfindungsraten von  $\text{Cu}^{2+}$  in dem eluierenden Peak bestimmt ( $n=8$ ).

Die Wiederfindungsrate von  $\text{Cu}^{2+}$ , das vor der Säule injiziert wurde (ohne Zusatz von Quercetin) betrug  $101,1 \%$  ( $\pm 2,0 \%$ ).

Die Wiederfindungsrate von  $\text{Cu}^{2+}$ , das vor der Säule injiziert wurde (mit Zusatz von Quercetin) betrug  $100,4 \%$  ( $\pm 6,5 \%$ ).

### 3.3.4 Photodiodenarray-Detektion

#### 3.3.4.1 Parameter

Pumpe	Maxi-Star K-1000, Edelstahl (Knauer)
Controller	eingebaut
Entgasung	pneumatisch (Knauer)
Injektion	20 $\mu\text{L}$ Probenschleife, Knauer-Ventil, manuell
Eluenten	A: Acetonitril B: wässrige Essigsäure (2 g/100 mL)
Zusammensetzung	28/72 (A/B), unter Vakuum im Ultraschallbad entgast
Flußrate	0,7 mL/min
Säule	Nucleogel RP 100-5/250 , 250 $\times$ 4,6 mm (Macherey-Nagel)
Detektor	SPD-M10AVP Photodiodenarray-Detektor (Shimadzu)
Detektion	240 - 600 nm, 3D-Aufzeichnung
Datenverarbeitung	CLASS-M10A Software (Shimadzu)

#### 3.3.4.2 Lösungen

Alle Lösungen wurden in einem Gemisch aus Acetonitril / wässrige Essigsäure (2 g/100 mL) (30/70, v/v) hergestellt. Die Konzentration an Quercetin und Kaempferol lag bei je 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , die von  $\text{Cu}^{2+}$  bzw.  $\text{Fe}^{3+}$  zwischen 1,0 und 16,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Dazu wurden jeweils 400  $\mu\text{L}$  der Referenzlösung von Quercetin oder Kaempferol ( $c=100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und jeweils mit 21, 42, 84, 168, 336  $\mu\text{L}$  der Referenzlösung von  $\text{Cu}^{2+}$  ( $c=100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), bzw. 19, 38, 76, 152, 304  $\mu\text{L}$  der Referenzlösung von  $\text{Fe}^{3+}$  ( $c=100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) versetzt (molare Verhältnisse Flavonol:Kation 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4). Anschließend wurde das Lösungsmittel bis zu einem Endvolumen von 2 mL zupipettiert, die Lösung umgeschüttelt und nach einer Reaktionszeit von 15 min. in die HPLC injiziert.

Die Mischung aus Quercetin, Kaempferol,  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Al}^{3+}$  wurde wie folgt hergestellt. Die Konzentration an Quercetin und Kaempferol lag bei je 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , die von  $\text{Cu}^{2+}$  bei 2,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  und die von  $\text{Al}^{3+}$  bei 1,75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (molare Verhältnisse 1:1:0,5:1). Dazu wurden nacheinander je 400  $\mu\text{L}$  der Referenzlösungen von Quercetin und Kaempferol ( $c=100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert, mit 42  $\mu\text{L}$  der Referenzlösung von  $\text{Cu}^{2+}$  ( $c=100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) und 35  $\mu\text{L}$  der Referenzlösung von  $\text{Al}^{3+}$  ( $c=100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) versetzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel bis zu einem Endvolumen von 2 mL zupipettiert, die Lösung umgeschüttelt und nach einer Reaktionszeit von 15 min. in die HPLC injiziert.

## 3.4 Darstellung oxidierter Flavonole

### 3.4.1 Chemikalien

$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , Acetonitril, Salzsäure 0,01 mol/L und 1 mol/L verdünnt aus Salzsäure 25 %, starkes Kationentauscherharz Lewatit S100, Diethylether,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  gegläht

### 3.4.2 Durchführung

Die Flavonole standen in unterschiedlichen Mengen und Wassergehalten zur Verfügung. Entsprechend wurden 0,1 mmol oder 0,05 mmol des jeweiligen Flavonols als Feststoff in einen 100 mL Rundkolben eingewogen und durch Zugabe von 30 mL Acetonitril und 30 mL Salzsäure 0,01 mol/L bei 40 °C (Wasserbad) gelöst. Dazu wurden unter Rühren 83,3 mg (0,5 mmol) oder 41,7 mg (0,25 mmol)  $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  oder 50,0 mg (0,12 mmol)  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  gegeben. Die Lösung wurde für 14 h bei Raumtemperatur gerührt. Zur Überwachung des Reaktionsverlaufs wurden während des Rührens 40  $\mu\text{L}$  der Lösung abgenommen, mit einem Gemisch von Acetonitril und wäßriger Essigsäure 1:25 verdünnt und am Photometer vermessen (s. 3.2.1.2, S. 130). Zum Ionentausch wurde das in Wasser aufgeschlämmte Kationentauscherharz bis zu einer Höhe von etwa 5 cm in eine Glassäule (10 mm I. D.) gefüllt, mit 10 mL Salzsäure 1 mol/L sauer gestellt und bis zur Neutralität mit Wasser gewaschen. Die Reaktionslösung wurde unter zweimaligem Nachspülen mit je 5 mL Wasser auf die Säule gegeben und bei einer Flußrate von ca. 3 mL/min in einen Scheidetrichter (250 mL) eluiert. Die Säule wurde mit 10 mL Wasser nachgespült, das ebenfalls in den Scheidetrichter abließ. Die Reaktionsprodukte wurden dreimal mit je 30 mL Diethylether extrahiert, die vereinigten Phasen von Ether und Acetonitril über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und durch ein Faltenfilter in einen Rundkolben (250 mL) filtriert. Die Lösungsmittel wurden bei 40 °C zunächst bis zu einem Volumen von etwa 10 mL abrotiert, unter Nachspülen mit Diethylether quantitativ in einen Spitzkolben (25 mL) überführt und bis zur Trockne eingeeengt. Letzte Spuren der Lösungsmittel wurden an einer Ölvakuumpumpe über Nacht entfernt.

Zur Darstellung größerer Mengen der Benzofuranone konnte die Vorschrift erfolgreich auf Mengen von 0,3 mmol (ca. 90 mg) übertragen werden.

Die Angabe von prozentualen Ausbeuten, wie sie in der organischen Synthese üblich ist, kann bei den hier dargestellten mg-Mengen nicht sinnvoll durchgeführt werden. Zwar wurden bei den Synthesen die Ein- und Auswaagen bestimmt, die daraus berechneten Aus-

**Tabelle 3.3:** Photometrische Gehaltsbestimmung der Lösungen der Benzofuranone: Kalibrierfunktionen, Meßwerte (Extinktion E bei 293 bzw. 286 nm) und Berechnung ( $c_{\text{Messloesung}} = (E - b)/a$ ,  $c_{\text{Stammloesung}} = c_{\text{Messloesung}} \times 50$ ) (oxidiertes Myricetin nicht eindeutig charakterisiert)

	Qox	Fox	Kox	(Myox)	Mox
Steigung $a$	0,0419	0,0281	0,0451	0,0205	0,0321
Achsenabschnitt $b$	0,0373	0,0522	0,0445	0,0334	0,0462
Bestimmtheitsmaß $R^2$	0,9993	0,9965	0,9996	0,9950	0,9933
$E_{\text{Messloesung}}$	0,6917	0,6194	0,7147	0,2790	0,4795
$c_{\text{Messloesung}}$ [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	15,6	20,2	14,9	12,0	13,5
$c_{\text{Stammloesung}}$ [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	781,0	1010,6	742,9	599,6	675,3

beuten lagen aber zwischen 110 und 150 %. In den NMR-Spektren waren zudem teilweise noch Signale für den bei der Extraktion verwendeten Diethylether zu erkennen.

### 3.4.3 Lösungen der oxidierten Flavonole

Voraussetzung für den Einsatz von Lösungen der oxidierten Flavonole zur quantitativen HPLC ist, daß sie in genau bekannter Konzentration vorliegen. Da ein exaktes Einwiegen der Referenzsubstanzen wegen ihrer nicht bekannten Reinheit nicht möglich ist, wurden zunächst Lösungen mit nicht genau bekannter Konzentration hergestellt und dann photometrisch deren Gehalt bestimmt. Dazu wurden zunächst etwa 10 mg der jeweiligen Verbindung in einem Meßkolben in 10 mL Acetonitril gelöst (Stammlösung). Diese Lösungen wurden zur Herstellung von Referenzlösungen mit einem Gemisch aus Acetonitril / wäßrige Essigsäure (2 g/100 mL) (30/70, v/v) auf eine Konzentration von etwa 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  verdünnt. Die genaue Konzentrationsbestimmung dieser Lösungen wurde nach einer Verdünnung von 1:5 (Meßlösung, ca. 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) photometrisch durchgeführt.

Zur Kalibrierung am Photometer wurden jeweils Lösungen der fünf Flavonole ( $c=5, 10, 20 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) mit einem molaren Überschuß (5:1) an  $\text{Cu}^{2+}$  versetzt und nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten deren UV/Vis-Spektren aufgenommen (s. 3.2.1.2, S. 130). Nach dieser Zeit war die Oxidationsreaktion vollständig abgelaufen (Kontrolle durch Messung der Extinktion im Maximum der Flavonole), und die Extinktionen im Maximum des Oxidationsprodukts (293 nm bzw. 286 nm) wurden gemessen. Aus den Werten wurden Kalibriergeraden für jede der fünf Verbindungen aufgestellt, aus denen nach Messung der Extinktion der Meßlösungen deren exakte Konzentration errechnet wurden (Tab. 3.3). Anschließend konnten aus den Stammlösungen bekannter Konzentration Referenzlösungen



mit einer Konzentration von 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  hergestellt werden, die dann zur HPLC eingesetzt wurden.

### 3.4.4 Überprüfung des Ionentauschs mit AAS

#### 3.4.4.1 Parameter

Gerät	PU9100X (Unicam)
Brenngas	Acetylen
Hilfsgas	Luft
Lampe	Hohlkathodenlampe Cu, Nr. 354 (L.O.T. Oriol)
Wellenlänge	324,8 nm
Stromstärke	3 mA
Spaltbreite	2 nm
STAT	Brennerhöhe auf maximale Lichtdurchlässigkeit eingestellt
Probenzufuhr	Ansaugen
Datenaufnahme	Notieren der angezeigten Absorptionswerte

#### 3.4.4.2 Lösungen

Alle Lösungen wurden in einem Gemisch aus Acetonitril / wässrige Essigsäure (2 g/100 mL) (30/70, v/v) hergestellt. Zur Kalibrierung des AAS wurde die Referenzlösung von  $\text{Cu}^{2+}$  (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) auf 1,0; 2,1; 4,2 und 8,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  verdünnt. Als Probe wurden 2 mL der aus der Ionentauschersäule eluierenden Lösung genommen.

#### 3.4.4.3 Kalibrierung

Zur Einstellung des Nullpunkts des AAS wurde ein Gemisch aus Acetonitril / wässrige Essigsäure (2 g/100 mL) (30/70, v/v) angesaugt. Anschließend wurde bei vier Konzentrationen 2-fach kalibriert (Tab. 3.4).

#### 3.4.4.4 Probe

In der Lösung zur Oxidation von Quercetin betrug die eingesetzte Konzentration an  $\text{Cu}^{2+}$  ( $M_{\text{Cu}^{2+}}=63,5 \text{ g/mol}$ ) 529,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ :

**Tabelle 3.4:** Überprüfung des Ionentauschers: Kalibrierung für die Bestimmung von Kupfer mittels Flammen-AAS ( $A$ : Absorption,  $a$ : Steigung [mL/ $\mu$ g],  $c$ : Konzentration von  $\text{Cu}^{2+}$  [ $\mu$ g/mL],  $b$ : Achsenabschnitt)

Kalibrierfunktion $A = a \times c + b$		Bestimmtheitsmaß $R^2$
Steigung	Achsenabschnitt	
0,162	0,005	0,9960

$$0,5 \text{ mmol}/60 \text{ mL} \cong 0,83 \text{ mmol}/100 \text{ mL} \cong 8,3 \mu\text{mol}/\text{mL} \cong 529,2 \mu\text{g}/\text{mL}$$

Die Gleichung zur Berechnung der Konzentration an Kupfer in der Lösung, die nach Ionentausch am AAS vermessen wurde, lautet:

$$c(\text{Cu}) [\mu\text{g}/\text{mL}] = (A - b)/a$$

Mit  $b=0,005$  und  $a=0,162$  resultierte eine Konzentration der Meßlösung von 0,2  $\mu$ g/mL:

$$A = 0,035; \Rightarrow c(\text{Cu}) [\mu\text{g}/\text{mL}] = (0,035 - 0,003)/0,162 = 0,2 \mu\text{g}/\text{mL}$$

In der nach Ionentausch resultierenden Lösung lag die Konzentration an Kupfer bei 0,2  $\mu$ g/mL, es wurde also zu mindestens 99,9 % aus der Reaktionslösung entfernt.

## 3.5 Strukturaufklärung

### 3.5.1 Kernresonanzspektroskopie

#### 3.5.1.1 Eindimensional

15 bis 30 mg der zu untersuchenden Verbindung wurden in  $\text{CD}_3\text{CN}$  mit TMS als internem Standard aufgenommen. Die zu geringe Löslichkeit der Flavonole in Acetonitril machte ein Ausweichen auf  $\text{DMSO-d}_6$  erforderlich.

Die Spektren wurden mit einem Bruker A-300 Spektrometer bei Frequenzen von 300 MHz ( $^1\text{H-NMR}$ ) und 75 MHz ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) aufgenommen. In den  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren wurde die Lage der Signale den breitbandentkoppelten, die Multiplizitäten den DEPT-Spektren entnommen.

### 3.5.1.2 Zweidimensional

30 mg des oxidierten Quercetin wurden in  $\text{CDCl}_3$  gelöst. Die Spektren wurden mit einem Bruker Avance 500 Spektrometer bei Frequenzen von 500 MHz ( $^1\text{H}$ -NMR) und 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ -NMR) aufgenommen. Die Kopplungen zwischen den aromatischen Protonen wurden den HH-COSY-Spektren, die Kopplungen zwischen den aromatischen Protonen und den direkt damit verknüpften C-Kernen den HMQC-Spektren und die Kopplungen aller Protonen mit C-Kernen über zwei bis vier Bindungen den HMBC-Spektren entnommen.

### 3.5.2 Massenspektroskopie

#### 3.5.2.1 PBI-EI/MS, PBI-NCI/MS

Pumpe	HPLC-Pumpe 616 (Waters)
Controller	HPLC-Controller 600S (Waters)
Entgasung	kontinuierlich mit 10 mL/min Helium
Injektion	5 $\mu$ L Probenschleife, Rheodyne-Ventil, manuell
Eluenten	A: Acetonitril B: wässrige Essigsäure (2 g/100 mL)
Zusammensetzung	variabel zwischen 10/90 (A/B) und 100/0 (A/B)
Flußrate	0,3 mL/min
Interface	Particle Beam Interface mit Controller (Finnigan) Temperatur: 40 °C Heliumdruck: 6 bar
Massenspektrometer	Modell SSQ 710 (Finnigan)
EI-Parameter	250 °C; 70 eV
CI-Parameter	200 °C; 70 eV Methandruck: ca. 8000 mTorr
Scan-Parameter	Full scan: m/z 100 - m/z 350; 0,5 s
Datenverarbeitung	ICIS Software Ver. 8.3.0 (Finnigan)

#### 3.5.2.2 ESI-ion trap/MS

Probenzufuhr	eingebaute Spritzenpumpe
Flußrate	10-15 $\mu$ L/min
Interface	Electrospray Interface (Finnigan MAT) Temperatur: 200 °C Spannung: 4,28 kV
Massenspektrometer	Modell LCQ (Finnigan MAT)
Ionenfallen-Parameter	Anreicherungszeit 100 ms
Scan-Parameter	Full scan: m/z 80 - m/z 350
Optimierung	auf m/z 317 mit oxidiertem Quercetin
Fragmentierung	bis MS <sup>3</sup>
Datenverarbeitung	LCQ Navigator Software Ver.1.2 (Finnigan MAT)

**Tabelle 3.5:** Einwaagen der Polyphenole für die Messung der antioxidativen Wirksamkeit am Ranzimaten

Verbindung	Einwaage [mL]	Einwaage [ $\mu\text{g}$ ]	Fett [g]	c [ $\mu\text{g/g}$ ]
Quercetin	0,8	400	8,0	50
	1,6	800	8,0	100
	3,2	1600	8,0	200
Quercetin ox.	3,2	1600	8,0	200
	6,4	3200	8,0	400
	12,8	6400	8,0	800

### 3.5.2.3 Lösungen

Die zur Untersuchung der Massenspektren eingesetzten Lösungen wurden in einem Gemisch aus Acetonitril / wäßrige Essigsäure (2 g/100 mL) (30/70, v/v) aus den Referenzlösungen der Polyphenole ( $c=100 \mu\text{g/mL}$ ) auf eine Konzentration von  $10 \mu\text{g/mL}$  verdünnt.

## 3.6 Antioxidative Eigenschaften

### 3.6.1 Halbstufenpotentiale

Die Ermittlung der Halbstufenpotentiale mit hydrodynamischer Voltammetrie wird weiter unten im Zusammenhang mit der HPLC beschrieben (s. 3.7.3, S. 156)

### 3.6.2 Rancimat-Tests

Gerät	Rancimat 679 (Metrohm)
Temperatur	100 °C
Datenaufnahme	eingebauter Thermoprinter; Vorschub 1 cm/h

### 3.6.3 Lösungen

Zur Untersuchung der antioxidativen Eigenschaften von Quercetin und 2-(3,4-Dihydroxybenzoyl)-2-hydroxy-2H-1-benzofuran-3-on wurden unterschiedliche Volumina (Tab. 3.5) der jeweiligen Referenzlösung ( $c=100 \mu\text{g/mL}$ ) über Nacht in jeweils einem 25 mL Spitzkolben an einer Ölvakuumpumpe vom Lösungsmittel befreit. Anschließend wurden jeweils 8,0 g durch Erwärmen verflüssigtes Schweineschmalz (Penny-Markt, Hannover) und  $500 \mu\text{L}$  Acetonitril als Lösungsvermittler zugegeben und die Polyphenole im Ultraschallbad in dem

Fett gelöst. Für die Doppelbestimmung wurden zweimal je 3,0 g dieses Fetts in die Reaktionsgefäße des Rancimaten eingewogen und mit je zwei Tropfen Silikon-Entschäumer versetzt. Für die Leerprobe wurde Schweineschmalz ohne Zusatz der Polyphenole in gleicher Weise eingesetzt.

### **3.6.4 Auswertung**

Die Induktionszeiten der Oxidation des Schweineschmalzes wurden aus den Kurven der gegen die Zeit aufgetragenen Leitfähigkeiten abgelesen. Dazu wurden Tangenten an den waagerechten und den aufsteigenden Ast der jeweiligen Kurve angelegt und im Schnittpunkt der Tangenten die Zeit auf der x-Achse abgelesen.

## 3.7 HPLC von Flavonolen, Flavonen und oxidierten Flavonolen

### 3.7.1 HPLC-Säulen

stationäre Phase	Parameter	Hersteller	Bestell-Nr.
(1) Discovery C18	150×2,1 mm, 5 µm-Partikel	Supelco	504955-21
(2) Purospher RP-18 endcapped	250×4 mm, 5 µm-Partikel	Merck	1.50169.0001
(3) Superspher RP-18	125×2 mm, 4 µm-Partikel	Merck	1.50198.0001
(4) Superspher RP-18 endcapped	250×4 mm, 5 µm-Partikel	Merck	1.16858.0001

Die stationären Phasen (3) und (4) erwiesen sich wegen zu starken Tailings der Flavonole als ungeeignet für die Lösung der Trennprobleme.

### 3.7.2 Photodiodenarray-Detektion

#### 3.7.2.1 Parameter

Pumpe	Maxi-Star K-1000, Edelstahl (Knauer)
Controller	eingebaut
Entgasung	pneumatisch (Knauer)
Mischkammer	Dynamische Mischkammer (Knauer)
Injektion	20 µL Probenschleife, Knauer-Ventil, manuell
Eluenten	A: Acetonitril B: wäßrige Essigsäure (2 g/100 mL)
Gradient (linear)	00 min: 10/90 (A/B) 30 min: 50/50 35 min: 10/90 45 min: 10/90
Flußrate	1,0 mL/min
Säule	Purospher RP18 endcapped, 250×4 mm I.D., 5 µm (Merck) mit Vorsäule RP 18
Detektor	SPD-M10AVP Photodiodenarray-Detektor (Shimadzu)
Detektion	240 - 600 nm, Multi-Kanal und Peakspektren Monitoring bei 293, 350 und 370 nm
Datenverarbeitung	CLASS-M10A Software (Shimadzu)

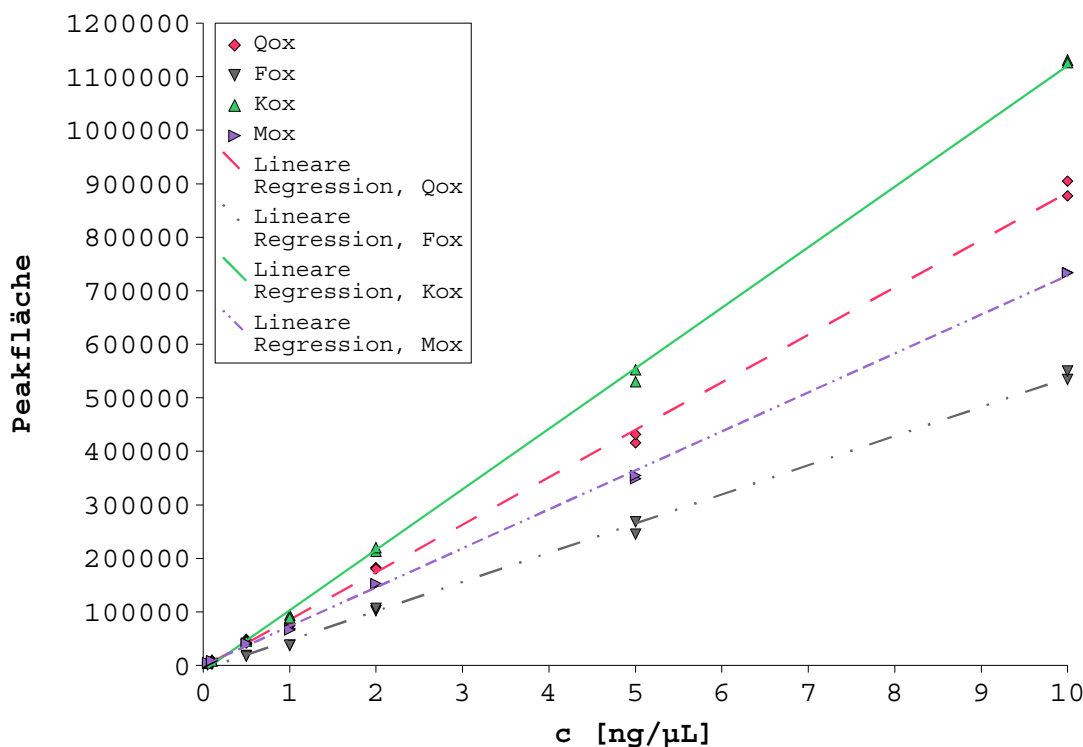


Abbildung 3.2: HPLC-DAD: Kalibriergeraden für die untersuchten Benzofuranone.

### 3.7.2.2 Lösungen

Alle Lösungen wurden in einem Gemisch aus Acetonitril / wässrige Essigsäure (2 g/100 mL) (30/70, v/v) hergestellt.

Die Referenzlösungen der Flavonole, Flavone und Benzofuranone ( $c=100 \mu\text{g/mL}$ ) wurden zur Entwicklung der chromatographischen Trennmethode und zur Kalibrierung auf Konzentrationen zwischen 0,05 und 10  $\mu\text{g/mL}$  verdünnt.

### 3.7.2.3 Kalibrierung

Die Kalibrierung wurde mit sieben verschiedenen Konzentrationen im Bereich zwischen 0,05 und 10  $\mu\text{g/mL}$  durchgeführt. Luteolin wurde nicht zur Kalibrierung eingesetzt, da es mit Quercetin koeluiert. Da die Konzentration des oxidierten Myricetin nicht bekannt war, wurde es ebenfalls nicht verwendet. Die Kalibriergeraden der Benzofuranone (Abb. 3.2), sowie die der Flavonole und Flavone (Abb. 3.3) waren in dem untersuchten Bereich linear. Die Kalibrierfunktionen sind in Tabelle 3.6, die nach DIN 32645 aus den Kalibriergeraden berechneten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in Tabelle 3.7 aufgeführt. Die Rohda-



### 3.7. HPLC VON FLAVONOLEN, FLAVONEN UND OXIDIERTEN FLAVONOLEN 149

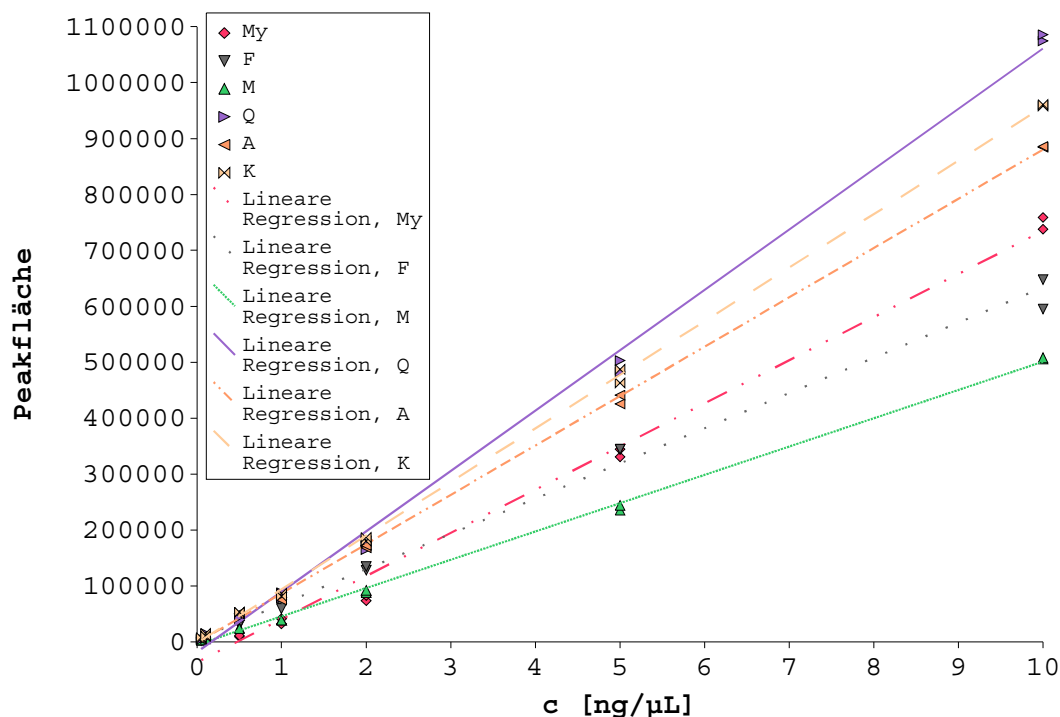


Abbildung 3.3: HPLC-DAD: Kalibriergeraden für die untersuchten Flavonole und Flavone.

Tabelle 3.6: Formeln der Kalibriergeraden der Benzofuranone, Flavonole und Flavone; Gradientenelution auf Purospher-Säule; Photodiodenarray-Detektion, Monitoring bei 293, 350, 370 nm (A: Peakfläche [mV×min], a: Steigung [ $\frac{mL \times mV \times min}{\mu g}$ ], c: Konzentration des Analyten [ $\mu g/mL$ ], b: Achsenabschnitt [mV×min])

Verbindung	Kalibrierfunktion $A = a \times c + b$		Bestimmtheitsmaß $R^2$
	Steigung	Achsenabschnitt	
Quercetin ox.	88660	-2992	0,9988
Fisetin ox.	54504	-7374	0,9981
Kaempferol ox.	113058	-9900	0,9993
Morin ox.	72799	463	0,9993
Myricetin	77184	-36814	0,9925
Fisetin	62965	4073	0,9948
Morin	50610	-5192	0,9986
Quercetin	107944	-18537	0,9970
Apigenin	88225	-1778	0,9994
Kaempferol	95855	-1980	0,9994

**Tabelle 3.7:** Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Benzofuranone, Flavonole und Flavone; Gradientenelution auf Purospher-Säule; Photodiodenarray-Detektion, Monitoring bei 293, 350, 370 nm (NWG: Nachweisgrenze, BG: Bestimmungsgrenze; berechnet aus den Kalibriergeraden nach DIN 32645 [97])

Verbindung	NWG [ $\mu\text{g/mL}$ ]	BG [ $\mu\text{g/mL}$ ]
Quercetin ox.	0,41	1,24
Fisetin ox.	0,52	1,56
Kaempferol ox.	0,31	0,93
Morin ox.	0,31	0,92
Myricetin	1,11	3,32
Fisetin	0,88	2,65
Morin	0,45	1,34
Quercetin	0,64	1,93
Apigenin	0,28	0,85
Kaempferol	0,28	0,84

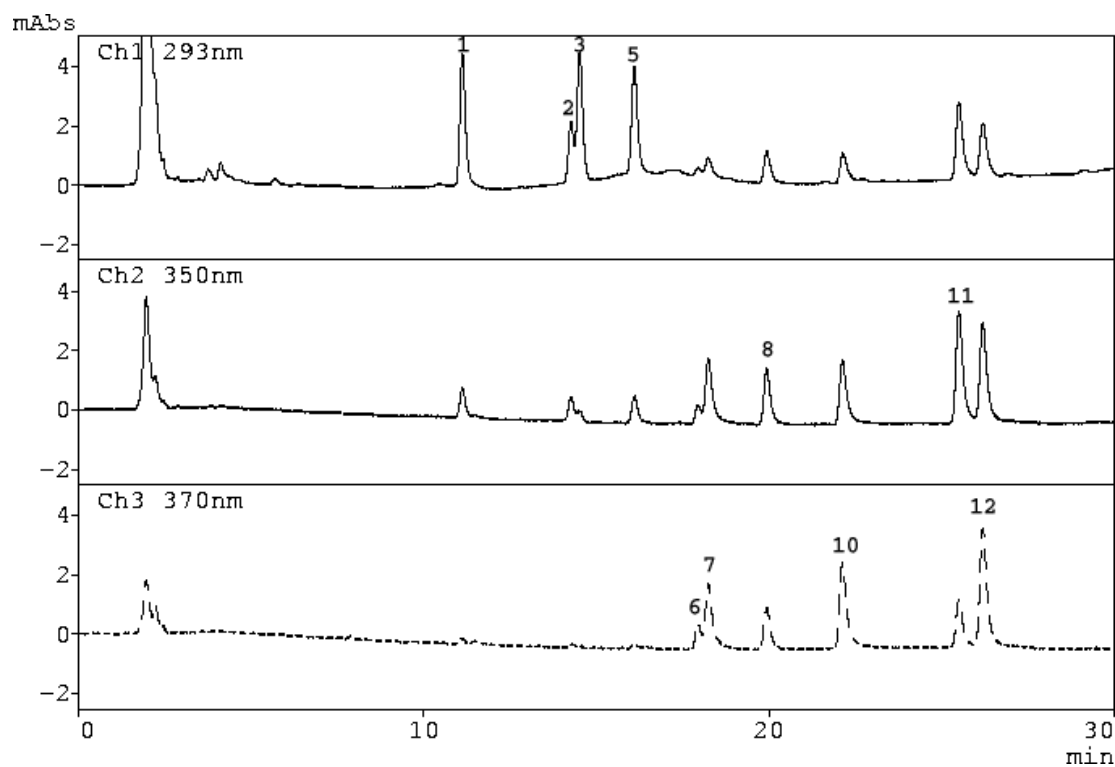
ten zur Berechnung der Kalibrierfunktionen und der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen finden sich in Tabelle 3.8. Abbildung 3.4 zeigt ein Chromatogramm der zur Kalibrierung eingesetzten Lösung im Bereich der Nachweisgrenzen bei  $0,5 \mu\text{g/mL}$ .

### 3.7. HPLC VON FLAVONOLEN, FLAVONEN UND OXIDIERTEN FLAVONOLEN 151

**Tabelle 3.8:** HPLC-DAD: Rohdaten (Peakflächen) und Berechnung der Kalibrierfunktionen und der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Benzofuranone, Flavonole und Flavone

c [ng/µL]	Qox	Fox	Kox	Mox	My	F	M	Q	A	K
0,05	4572	1483	4234	4963		2030	2459	4847	5220	5658
0,05	6784	2378	6222	5554		2673	3091	4169	8112	7368
0,1	7444	3915	9505	8493	4540	8704	7111	14514	12414	15102
0,1	9043	3195	8210	8991	3846		5069	6680	10505	10311
0,5	48950	18499	48490	40705	8924	30006	24447	37703	49696	52461
0,5	41735	17587	45478	42096	10985	31002	23156	43652	50769	52950
1	74936	38198	93929	69057	41168	67007	38708	87667	78219	86635
1	78676	37296	89173	66482	31948	59296	38790	78396	74542	81032
2	182495	102577	213595	150913	73743	128225	87846	164659	167896	180316
2	180651	106744	219899	153024	82909	134389	92047	178011	172016	186852
5	416277	245219	529791	348774	330406	344161	235091	482823	425134	462740
5	431587	268272	552506	355201	344166	344676	243807	502954	441343	487067
10	876892	534322	1130985	734485	737786	647489	505510	1074777	884401	958188
10	905079	550092	1126442	733130	759057	595139	507942	1085926	885633	960999
a	88660	54504	113058	72799	77184	62965	50610	107944	88225	95855
b	-2992	-7374	-9900	463	-36814	4037	-5192	-18537	-1778	-1980
r <sup>2</sup>	0,9988	0,9981	0,9993	0,9993	0,9925	0,9948	0,9986	0,9970	0,9994	0,9994
s <sub>yx</sub>	11326	8805	10811	6909	25501	16963	7004	21581	7710	8305
s <sub>x0</sub>	0,13	0,16	0,1	0,09	0,33	0,27	0,14	0,2	0,09	0,09
<b>Schnellschätzung</b>										
x (NG)	<u>0,46</u>	<u>0,58</u>	<u>0,34</u>	<u>0,34</u>	<u>1,19</u>	<u>0,97</u>	<u>0,5</u>	<u>0,72</u>	<u>0,31</u>	<u>0,31</u>
x (BG)	<u>1,38</u>	<u>1,74</u>	<u>1,03</u>	<u>1,02</u>	<u>3,57</u>	<u>2,91</u>	<u>1,49</u>	<u>2,16</u>	<u>0,94</u>	<u>0,94</u>
<b>Berechnung</b>										
x <sub>quer</sub>	2,66	2,66	2,66	2,66	2,66	2,66	2,66	2,66	2,66	2,66
Q <sub>x</sub>	161,15	161,15	161,15	161,15	161,15	161,15	161,15	161,15	161,15	161,15
m	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
n	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14
Wurzel	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06
alpha	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Quantil t	3,05	3,05	3,05	3,05	3,17	3,11	3,05	3,05	3,05	3,05
x <sub>NG</sub>	<u>0,41</u>	<u>0,52</u>	<u>0,31</u>	<u>0,31</u>	<u>1,11</u>	<u>0,88</u>	<u>0,45</u>	<u>0,64</u>	<u>0,28</u>	<u>0,28</u>
x <sub>BG</sub>	<u>1,24</u>	<u>1,56</u>	<u>0,93</u>	<u>0,92</u>	<u>3,32</u>	<u>2,65</u>	<u>1,34</u>	<u>1,93</u>	<u>0,85</u>	<u>0,84</u>

$$x_{NG} = s_{x0} \cdot t_{f\alpha} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{Q_x}}$$



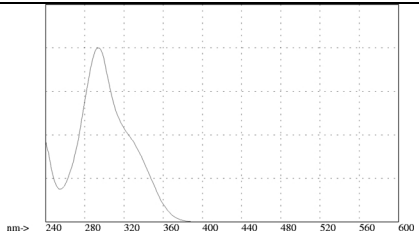
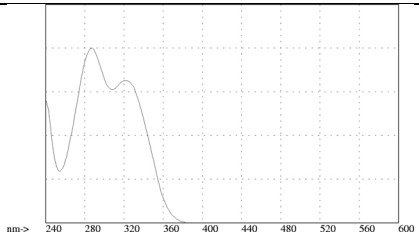
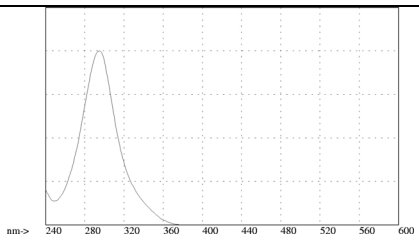
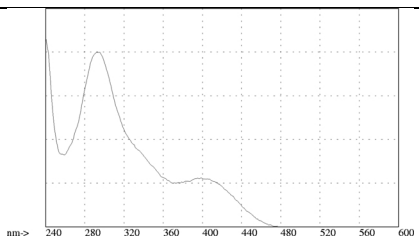
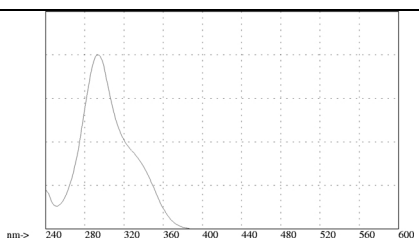
Nr.	Verbindung
1	2-(3,4-Dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3-on
2	2-(3,4-Dihydroxybenzoyl)-2,6-dihydroxybenzofuran-3-on
3	2-(4-Hydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3-on
5	2-(2,4-Dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3-on
6	Myricetin
7	Fisetin
8	Morin
10	Quercetin
11	Apigenin
12	Kaempferol

**Abbildung 3.4:** Trennung von Benzofuranonen, Flavonolen und Flavonen ( $c=0,5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ,  $20 \mu\text{L}$  injiziert,  $10 \text{ ng}$  absolut); Gradientenelution auf Purospher-Säule; Photodiodenarray-Detektion, Monitoring bei 293, 350, 370 nm.

#### **3.7.2.4 Peakspektren**

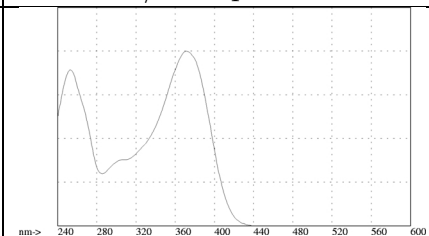
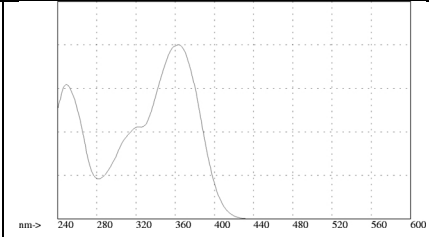
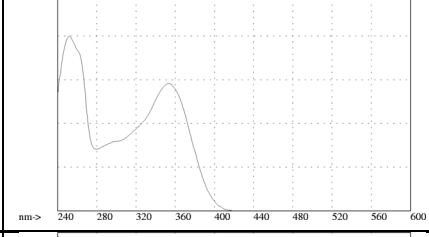
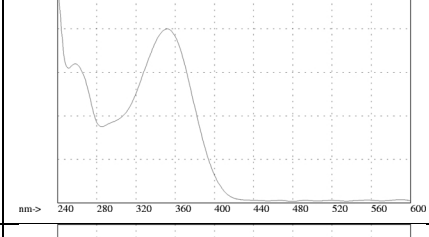
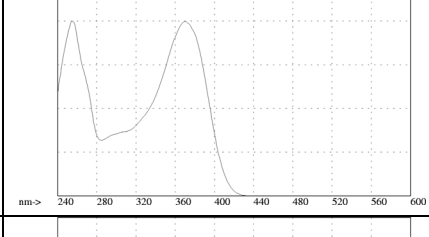
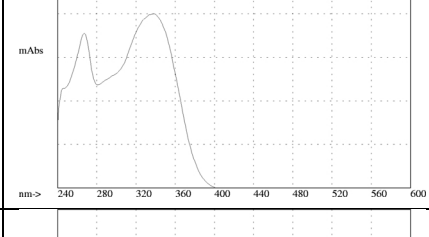
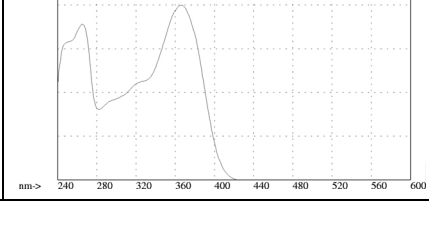
Die UV/Vis-Spektren (240 bis 600 nm) der eluierenden Verbindungen sind in den Tabellen 3.9 und 3.10 abgebildet (S. 154 und 155).

**Tabelle 3.9:** Retentionszeiten (RT) und UV/Vis-Spektren in den Peaks der Benzofuranone; Gradientenelution auf Purospher-Säule

Nr.	Verbindung	UV/Vis-Spektrum	RT [min]
1	2-(3,4-Dihydroxybenzoyl)- 2,4,6-trihydroxybenzofuran-3-on		11,3
2	2-(3,4-Dihydroxybenzoyl)- 2,6-dihydroxybenzofuran-3-on		14,5
3	2-(4-Hydroxybenzoyl)- 2,4,6-trihydroxybenzofuran-3-on		14,7
4	2-(2,3,4-Trihydroxybenzoyl)- 2,4,6-trihydroxybenzofuran-3-on		15,1
5	2-(2,4-Dihydroxybenzoyl)- 2,4,6-trihydroxybenzofuran-3-on		16,4

3.7. HPLC VON FLAVONOLEN, FLAVONEN UND OXIDIERTEN FLAVONOLEN 155

**Tabelle 3.10:** Retentionszeiten (RT) und UV/Vis-Spektren in den Peaks der Flavonole und Flavone; Gradientenelution auf Purospher-Säule

Nr.	Verbindung	UV/Vis-Spektrum	RT [min]
6	Myricetin		18,2
7	Fisetin		18,5
8	Morin		20,2
9	Luteolin		22,4
10	Quercetin		21,4
11	Apigenin		25,7
12	Kaempferol		26,4

### 3.7.3 Elektrochemische Detektion

#### 3.7.3.1 Parameter

Pumpe	Maxi-Star K-1000, Edelstahl (Knauer)
Controller	eingebaut
Entgasung	pneumatisch (Knauer)
Mischkammer	Dynamische Mischkammer (Knauer)
Injektion	20 $\mu\text{L}$ Probenschleife, Knauer-Ventil, manuell
Eluenten	A: Acetonitril B: wässrige Essigsäure (2 g/100 mL)
Gradient (linear)	00 min: 10/90 (A/B) 30 min: 50/50 35 min: 10/90 45 min: 10/90
Flußrate	1,0 mL/min
Säule	Purospher RP18 endcapped, 250 $\times$ 4 mm I.D., 5 $\mu\text{m}$ (Merck) mit Vorsäule RP18
Detektor	VA Detektor E 611 (Metrohm)
Detektion	Potential: +1000 mV gegen Ag/AgCl Empfindlichkeit: 50 nA

#### 3.7.3.2 Lösungen

Alle Lösungen wurden in einem Gemisch aus Acetonitril / wässrige Essigsäure (2 g/100 mL) (30/70, v/v) hergestellt.

Die Referenzlösungen der Flavonole, Flavone und Benzofuranone ( $c=100 \mu\text{g/mL}$ ) wurden zur Entwicklung der chromatographischen Trennmethode und zur Kalibrierung auf Konzentrationen zwischen 0,05 und 10  $\mu\text{g/mL}$  verdünnt.

#### 3.7.3.3 Hydrodynamische Voltammetrie

Zur Ermittlung der Halbstufenpotentiale der zwölf untersuchten Polyphenole wurden Chromatogramme der Lösungen mit einer Konzentration von 5  $\mu\text{g/mL}$  bei unterschiedlichen Potentialen aufgenommen. Es wurde je eine Doppelbestimmung im Bereich zwischen 300 und 1150 mV in Abständen von 50 mV durchgeführt. Die gemessenen Peakhöhen wur-



**Tabelle 3.11:** Formeln der Kalibriergeraden der Benzofuranone, Flavonole und Flavone; Gradientenelution auf Purospher-Säule; elektrochemische Detektion, 1100 mV ( $A$ : Peakfläche [ $\text{mV} \times \text{min}$ ],  $a$ : Steigung [ $\frac{\text{mL} \times \text{mV} \times \text{min}}{\mu\text{g}}$ ],  $c$ : Konzentration des Analyten [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ],  $b$ : Achsenabschnitt [ $\text{mV} \times \text{min}$ ])

Verbindung	Kalibrierfunktion $A = a \times c + b$		Bestimmtheitsmaß $R^2$
	Steigung	Achsenabschnitt	
Quercetin ox.	14309	2921	0,9777
Fisetin ox.	11338	1689	0,9875
Morin ox.	473	1158	0,6607
Myricetin	22188	-9071	0,9585
Fisetin	44760	-14851	0,9903
Morin	20187	-15206	0,9626
Quercetin	35380	-3455	0,9907
Apigenin	1440	4153	0,3938
Kaempferol	16480	-2692	0,9938

den in Relation zu der höchsten gemessenen Peakhöhe gesetzt und gegen das Potential aufgetragen. Die resultierenden hydrodynamischen Voltagramme finden sich in Abbildung 3.5.

### 3.7.3.4 Kalibrierung

Die Kalibrierung wurde im Bereich zwischen 0,05 und 10,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durchgeführt. Luteolin wurde nicht zur Kalibrierung eingesetzt, da es mit Quercetin koeluiert. Da die Konzentration des oxidierten Myricetin nicht bekannt war, wurde es ebenfalls nicht verwendet. Die Kalibriergeraden der Benzofuranone, die aus den *o*-diphenolischen Flavonolen Quercetin, Fisetin und Myricetin hervorgegangen waren (Abb. 159), sowie die der Flavonole (Abb. 161) waren in dem untersuchten Bereich linear. Das oxidierte Kaempferol wurde bei dem angelegten Potential nicht detektiert. Für Apigenin und das oxidierte Morin bestand kein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Peakfläche. Die Kalibrierfunktionen sind in Tabelle 3.11, die nach DIN 32645 aus den Kalibriergeraden berechneten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in Tabelle 3.12 aufgeführt. Die Rohdaten zur Berechnung der Kalibrierfunktionen und der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen finden sich in Tabelle 3.13.

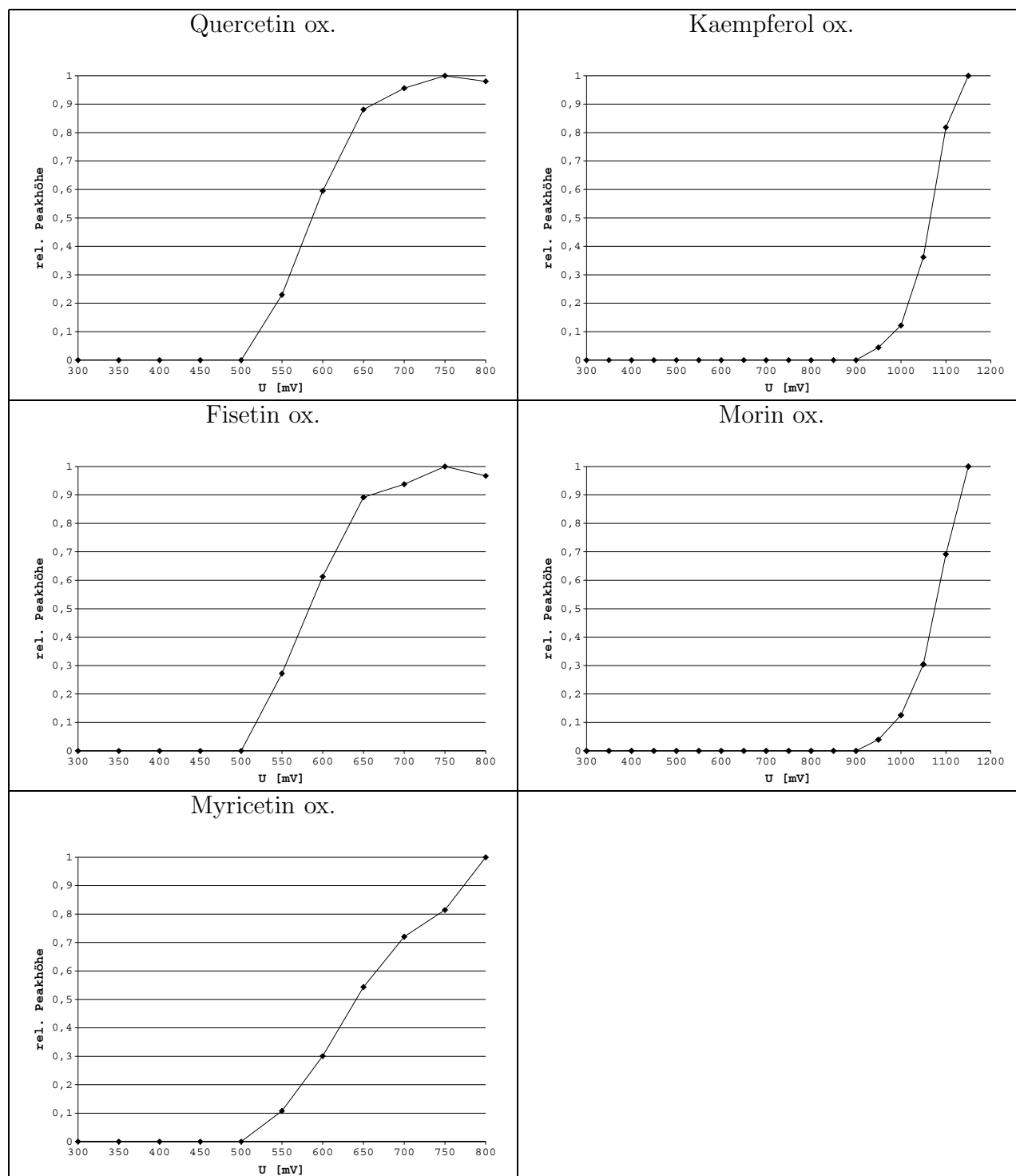
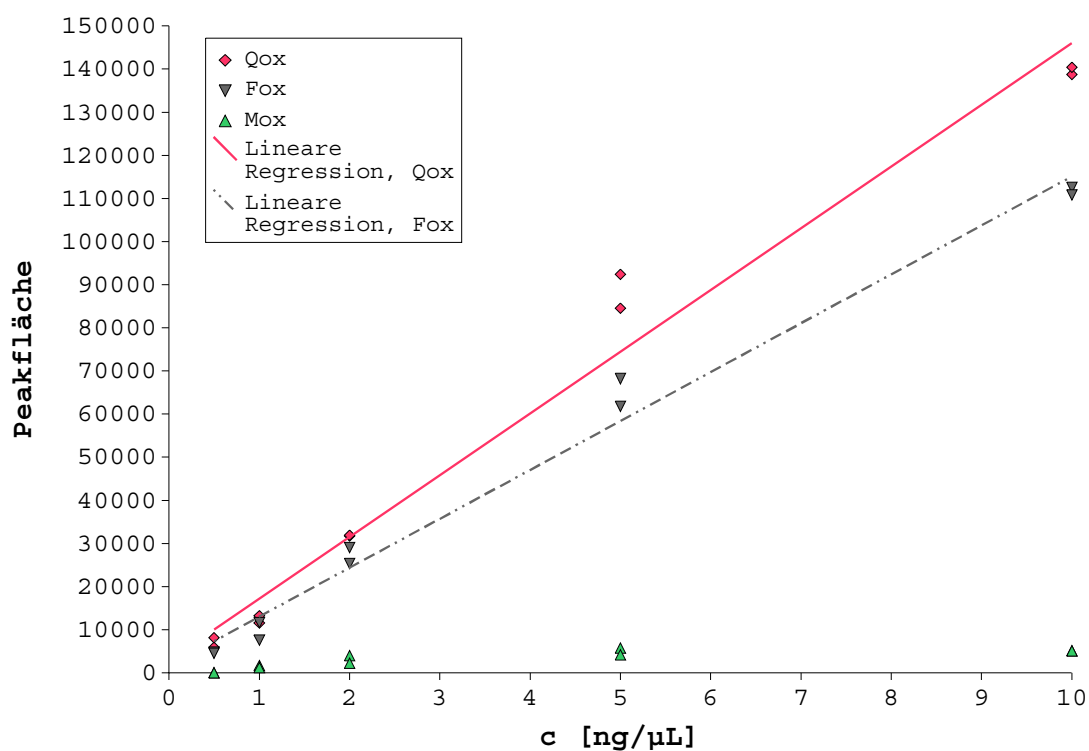


Abbildung 3.5: Hydrodynamische Voltammogramme der untersuchten Benzofuranone.



**Abbildung 3.6:** HPLC-ECD: Kalibriergeraden für die drei untersuchten Benzofuranone (oxidiertes Myricetin nicht injiziert, da Konzentration nicht bekannt; oxidiertes Kaempferol nicht erfaßt).

**Tabelle 3.12:** Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Benzofuranone, Flavonole und Flavone; Gradientenelution auf Purospher-Säule; elektrochemische Detektion, 1100 mV (NWG: Nachweisgrenze, BG: Bestimmungsgrenze; berechnet aus den Kalibriergeraden nach DIN 32645 [97])

Verbindung	NWG [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	BG [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]
Quercetin ox.	2,2	6,6
Fisetin ox.	1,6	4,9
(Morin ox.)		
Myricetin	3,1	9,3
Fisetin	1,5	4,4
Morin	2,9	8,6
Quercetin	1,5	4,4
(Apigenin)		
Kaempferol	1,2	3,5

**Tabelle 3.13:** HPLC-ECD: Rohdaten (Peakflächen) und Berechnung der Kalibrierfunktionen und der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Benzofuranone, Flavonole und Flavone

c [ng/μL]	Qox	Fox	Mox	My	F	M	Q	A	K
0,5	5917	4841	0	3503	12935	5537	14326	1312	7900
0,5	8116	4561	0	4399	11437	4973	16297	1398	7357
1	11569	7618	1646	9700	24116	7416	21901	2044	9118
1	13242	11634	1235	3046	25255	8036	19526	2573	10865
2	31726	29073	3953	24811	64226	32049	68706	10205	26533
2	31947	25366	2204	23310	69353	19985	66124	5451	27546
5	84566	61743	5753	112419	250971	61933	203352	25971	87862
5	92398	68214	4159	144256	193246	57544	179442	19392	87652
10	138777	112523	5078	194118	435859	198435	334199	12659	158184
10	140373	110816	5054	210694	420206	198972	350617	13814	159833
a	14309	11338	473	22188	44760	20187	35380	1440	16480
b	2921	1689	1158	-9071	-14851	-15206	-3455	4153	-2692
r <sup>2</sup>	0,9777	0,9875	0,6607	0,9585	0,9903	0,9626	0,9907	0,3938	0,9938
s <sub>yx</sub>	8492	5014	1332	18155	17380	15634	13477	7023	5132
s <sub>x0</sub>	0,59	0,44	2,82	0,82	0,39	0,77	0,38	4,88	0,31
<b>Schnellschätzung</b>									
x (NG)	<u>2,14</u>	<u>1,59</u>	<u>10,14</u>	<u>2,95</u>	<u>1,40</u>	<u>2,79</u>	<u>1,37</u>	<u>17,56</u>	<u>1,12</u>
x (BG)	<u>6,41</u>	<u>4,78</u>	<u>30,42</u>	<u>8,84</u>	<u>4,19</u>	<u>8,36</u>	<u>4,11</u>	<u>52,67</u>	<u>3,36</u>
<b>Berechnung</b>									
x <sub>quer</sub>	3,7	3,7	3,7	2,13	2,13	3,7	2,13	3,7	3,7
Q <sub>x</sub>	123,6	123,6	123,6	24,38	24,38	123,6	24,38	123,6	123,6
m	1	1	1	1	1	1	1	1	1
n	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Wurzel	1,1	1,1	1,1	1,13	1,13	1,1	1,13	1,1	1,1
alpha	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Quantil t	3,36	3,36	3,36	3,36	3,36	3,36	3,36	3,36	3,36
x <sub>NG</sub>	<u>2,19</u>	<u>1,63</u>	<u>10,4</u>	<u>3,11</u>	<u>1,48</u>	<u>2,86</u>	<u>1,45</u>	<u>18,00</u>	<u>1,15</u>
x <sub>BG</sub>	<u>6,57</u>	<u>4,9</u>	<u>31,2</u>	<u>9,34</u>	<u>4,43</u>	<u>8,58</u>	<u>4,35</u>	<u>54,01</u>	<u>3,45</u>

$$x_{NG} = s_{x0} \cdot t_{f;\alpha} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{Q_x}}$$

### 3.7. HPLC VON FLAVONOLEN, FLAVONEN UND OXIDIERTEN FLAVONOLEN 161

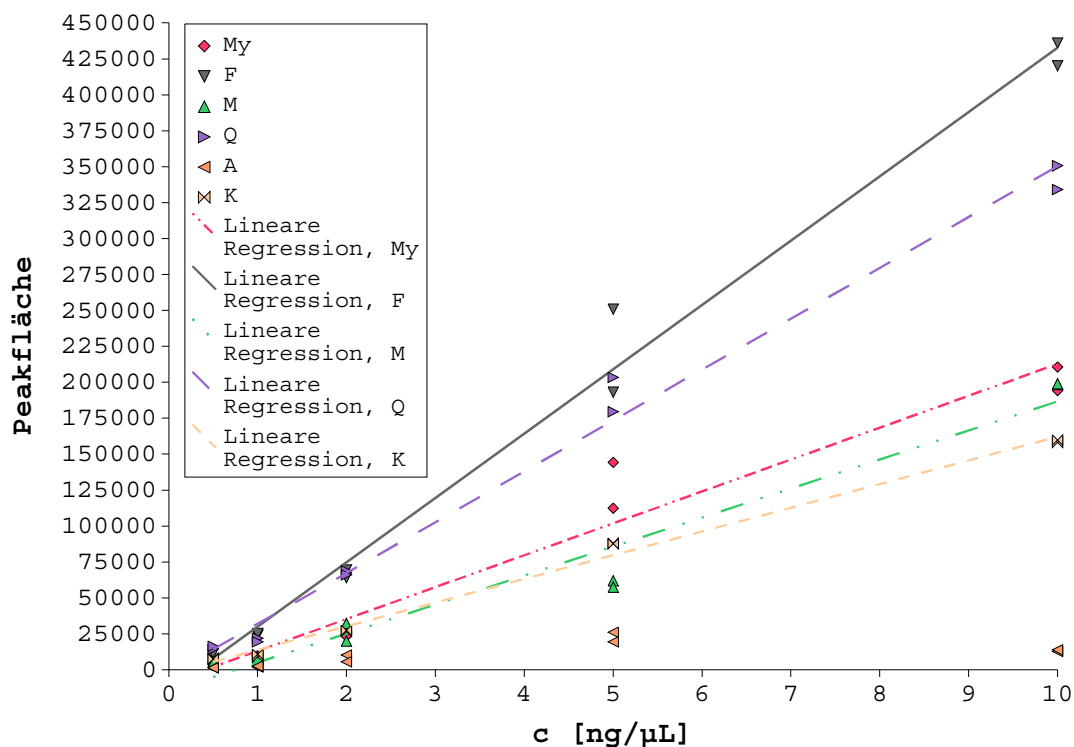


Abbildung 3.7: HPLC-ECD: Kalibriergeraden für die untersuchten Flavonole und Flavone.

## 3.7.4 UV-Detektion

### 3.7.4.1 Parameter

Pumpe	HPLC-Pumpe 616 (Waters)
Controller	HPLC-Controller 600S (Waters)
Entgasung	kontinuierlich mit 10 mL/min Helium
Injektion	5 $\mu$ L Probenschleife, Rheodyne-Ventil, manuell
Eluenten	A: Acetonitril B: wässrige Essigsäure (2 g/100 mL)
Gradient (linear)	00 min: 08/92 (A/B) 30 min: 50/50 35 min: 08/92 45 min: 08/92
Flußrate	0,3 mL/min
Säule	Discovery RP18 endcapped, 125 $\times$ 2,1 mm I.D., 5 $\mu$ m (Supelco)
Detektor	Variabler Wellenlängendetektor 490E (Waters)
Detektion	Gleichzeitig bei 293, 350 und 370 nm ("maxplot") AUFS=0,100
Datenverarbeitung	Eurochrom 2000 Software (Knauer)

### 3.7.4.2 Lösungen

Alle Lösungen wurden in einem Gemisch aus Acetonitril / wäßrige Essigsäure (2 g/100 mL) (30/70, v/v) hergestellt.

Die Referenzlösungen der Flavonole, Flavone und Benzofuranone ( $c=100 \mu\text{g/mL}$ ) wurden zur Entwicklung der chromatographischen Trennmethode auf Konzentrationen zwischen 0,1 und 10  $\mu\text{g/mL}$  verdünnt.

### 3.7.5 ESI-ion trap/MS-Detektion

#### 3.7.5.1 Parameter

Pumpe	Spectra System P4000 (Finnigan MAT)
Entgasung	kontinuierlich mit 10 mL/min Helium
Autosampler	Spectra System AS3000 (Finnigan MAT)
Injektion	10 $\mu\text{L}$
Eluenten	A: Acetonitril B: wäßrige Essigsäure (2 g/100 mL)
Gradient (linear)	00 min: 08/92 (A/B) 30 min: 50/50 35 min: 08/92 45 min: 08/92
Flußrate	0,3 mL/min
Säule	Discovery RP18 endcapped, 125×2,1 mm I.D., 5 $\mu\text{m}$ (Supelco)
Detektor	Spectra System UV6000LP (Finnigan MAT)
Detektion	240-600 nm
Interface	Electrospray Interface (Finnigan MAT) Temperatur: 200 °C Spannung: 4,28 kV
Massenspektrometer	Modell LCQ (Finnigan MAT)
Ionenfallen-Parameter	Anreicherungszeit 1000 mS
Scan-Parameter	Full scan: m/z 80 - m/z 350
Fragmentierung	0,0 - 7,0 min: m/z 317, rel. Energie: 16 % 7,0 - 9,0 min: m/z 301, rel. Energie: 16 % 9,0 - 11,0 min: m/z 317, rel. Energie: 16 %
Datenverarbeitung	LCQ Navigator Software Ver. 1.2 (Finnigan MAT)

### 3.7.5.2 Lösungen

Alle Lösungen wurden in einem Gemisch aus Acetonitril / wäßrige Essigsäure (2 g/100 mL) (30/70, v/v) hergestellt.

Die Referenzlösungen der Flavonole, Flavone und Benzofuranone ( $c=100 \mu\text{g/mL}$ ) wurden zur Entwicklung der chromatographischen Trennmethode und zur Optimierung der Detektion auf eine Konzentration von  $10 \mu\text{g/mL}$  verdünnt.

## 3.8 Analytik oxidierter Flavonole in biologischer Matrix

### 3.8.1 Probenvorbereitung

#### 3.8.1.1 Gefriertrocknung und Säurehydrolyse

Die Probenvorbereitung wurde analog der von Hertog et al. [72] und Crozier et al. [30] vorgeschlagenen wie folgt durchgeführt.

**Chemikalien und Lösungen** Methanol wurde mit Wasser auf eine Konzentration von 62,5 mL/100 mL verdünnt. Salzsäure 25 % wurde mit Wasser auf eine Konzentration von 6 mol/L verdünnt. Als Antioxidans wurden 5,6 g Diethyldithiocarbaminsäure, Na-Salz·3 H<sub>2</sub>O in 25 mL Wasser gelöst ( $c=1 \text{ mol/L}$ ).

**Vorbereitung** Frische Zwiebeln (*Allium cepa* L.) wurden von der äußeren Schale befreit und in ca. 5×5×5 mm große Stücke geschnitten (Einwaage 113,4 g), frischer Lauch (*Allium porrum*) wurde in schmale Ringe geschnitten (Einwaage 80,6 g). Die Stücke wurden sofort in einem Porzellanmörser mit flüssigem Stickstoff übergossen, mit einem Stößel grob zerkleinert, in einen Rundkolben 500 mL umgefüllt und bis zur Gewichtskonstanz gefriergetrocknet (Auswaage Zwiebel: 13,8 g, Lauch 7,2 g; Trockenmasse Zwiebel 12,2 %, Lauch 8,9 %). Die getrockneten Stücke wurden mit einer Küchenmaschine kleingemahlen und das Pulver bei -20 °C in einem Polyethylenprobengefäß für die weitere Untersuchung aufbewahrt. Zum Vergleich wurden käuflich erhältliche gefriergetrocknete Zwiebeln der Marke "Würzella" untersucht.

**Extraktion** 0,500 g der gefriergetrockneten Probe wurden in einem Rundkolben 100 mL mit 40 mL des wäßrigen Methanols, 10 mL der Salzsäure und 1 mL der Diethyldithiocar-

bamidsäure, Na-Salz versetzt. Dies ergab 50 mL einer Lösung von 1,2-molarer Salzsäure in 50 %igem wäßrigem Methanol. Die Extraktion erfolgte für 2 h bei 90 °C unter ständigem Rühren am Rückfluß, anschließend wurde die Lösung quantitativ in einen 100 mL Meßkolben überführt, nach dem Abkühlen mit Wasser auf 100 mL aufgefüllt und für fünf Minuten ins Ultraschallbad gestellt. Die Lösung hatte einen Methanolgehalt von 25 %. Zusätzlich wurde die Extraktion unter den gleichen Bedingungen mit einer Einwaage von 2,00 g getrockneten Zwiebeln durchgeführt.

Die so erhaltene Probenlösung wurde entweder zur Festphasenextraktion eingesetzt oder nach Membranfiltration direkt in die HPLC injiziert. Die Aufbewahrung der Lösungen erfolgte bei 4 °C in einer Braunglasflasche.

**Wiederfindung von oxidiertem Quercetin** Zur Bestimmung der Wiederfindung von oxidiertem Quercetin bei der Heißextraktion wurden vor der Extraktion 5.0 mL der Lösung des Benzofuranons ( $c=100 \mu\text{g/mL}$ ) zugegeben.

### 3.8.1.2 Kaltextraktion von frischem Gemüse

Neben der beschriebenen Säurehydrolyse der gefriergetrockneten Probe wurde auch eine Kaltextraktion von frischem Gemüse durchgeführt. Dazu wurde die Zwiebel von der äußeren Schale befreit und in ca.  $5 \times 5 \times 5$  mm große Stücke und der Lauch in schmale Ringe geschnitten. 5,0 g des Materials wurden in einem hohen Becherglas 100 mL entweder mit 40,0 mL Wasser oder mit 36,0 mL Wasser und 4,0 mL der Referenzlösung von Morin ( $c=100 \mu\text{g/mL}$ ) versetzt und am Ultraturrax für 5 min homogenisiert. Das erhaltene Homogenat wurde entweder nach Membranfiltration direkt in die HPLC injiziert, oder zur weiteren Verwendung durch ein Faltenfilter filtriert. Mit der erhaltenen klaren Lösung wurde Morin zur direkten Injektion auf  $10 \mu\text{g/mL}$ , zur Festphasenextraktion auf  $5 \mu\text{g/mL}$  verdünnt.

Außerdem wurde am Beispiel von Zwiebeln eine milde Säurehydrolyse versucht. Dazu wurden 5,0 g Zwiebelstücke mit 40 mL Wasser mit dem Ultraturrax homogenisiert und durch Zutropfen von Salzsäure ( $c=0,1 \text{ mol/L}$ ) auf einen pH-Wert von 3 eingestellt. Das Homogenat wurde im Wasserbad für drei Stunden bei 38-40 °C gehalten und regelmäßig umgerührt.



## 3.8.2 Festphasenextraktion

### 3.8.2.1 Parameter

Kartusche	CHROMABOND HR-P (500 mg) (Macherey-Nagel, Nr. 730117)
Konditionierung	5 mL Tetrahydrofuran 5 mL wäßrige Essigsäure
Probenaufgabe	5,00-15,00 mL Probelösung Gehalt an org. Lösungsmittel j 15 %
Spülen	5 mL Acetonitril/wäßrige Essigsäure (20/80, v/v)
Elution	5,00 mL Tetrahydrofuran mit Ascorbinsäure (1 mg/mL) oder 5,00 mL Tetrahydrofuran

Um Verluste der Analyten bei der Aufgabe der Analysenlösung auf die Festphasenkartusche zu vermeiden, war es wichtig, daß die Lösung einen möglichst geringen Anteil an organischem Lösungsmittel hatte. Zur Unterdrückung der Oxidation der Flavonole beim Aufkonzentrieren wurde zur Elution THF verwendet, in dem Ascorbinsäure in einer Konzentration von 1 mg/mL gelöst wurde.

Die eluierenden Lösungen wurden zur Entfernung des THF unter Vakuum bei 40 °C auf ca. 500 µL eingengt und mit Acetonitril/wäßrige Essigsäure (20/80, v/v) auf Volumina zwischen 1 mL und 5 mL aufgefüllt. Dadurch konnte eine Aufkonzentrierung der Analyten bis 5:1 erreicht werden.

### 3.8.2.2 Wiederfindungsraten

Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten der Festphasenextraktion wurden die gleichen Lösungen wie zur Kalibrierung der HPLC-DAD-Methode verwendet (s. 3.7.2, S. 147). Die quantitative Bestimmung erfolgte mit dem DAD.

**Ohne Zusatz von Ascorbinsäure zum THF** Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Zur Charakterisierung der Einflußparameter wurden die Wiederfindungsraten unter verschiedenen Bedingungen ermittelt:

1. 4 µg/mL (Faktor zwei bis fünf über der Bestimmungsgrenze): Verdünnung von 100 µg/mL auf 4 µg/mL mit Zwiebelextrakt; vor der SPE 5 mL dieser Lösung + 5 mL wäßrige Essigsäure (⇒ca. 15 % org. Lösungsmittel); keine Aufkonzentrierung nach der SPE.

**Tabelle 3.14:** Festphasenextraktion: Wiederfindungsraten (WFR) für zehn Flavonole, Flavone und Benzofuranone (n=2) (1.: 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ohne Zwiebelextrakt; 2.: 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  mit Zwiebelextrakt; 3.: 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ohne Zwiebelextrakt, Aufkonzentrierung 5:2; 4.: 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  mit Zwiebelextrakt, Aufkonzentrierung 5:2); Schwankungen zwischen den Einzelwerten der Doppelbestimmungen zwischen 0,5 und 7,0 %.

	WFR [%]									
	Qox	Fox	Kox	Mox	My	F	M	Q	A	K
1.	97,6	98,2	97,1	102,4	50,2	94,5	94,5	96,2	97,9	98,0
2.	90,5	86,9	97,1	92,2	6,9	73,9	77,7	49,0	84,5	77,5
3.	48,4	56,2	77,9	60,9	0,0	11,1	32,0	14,8	76,0	68,9
4.	200,6	103,7	79,4	66,0	0,0	48,2	29,4	0,0	57,3	37,0

2. 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Faktor zwei bis fünf über der Bestimmungsgrenze): Verdünnung von 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  auf 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  mit wäßriger Essigsäure; keine Aufkonzentrierung nach der SPE.
3. 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (im Bereich der Bestimmungsgrenze oder darunter): Verdünnung von 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  auf 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  mit Zwiebelextrakt; vor der SPE 5 mL dieser Lösung + 5 mL wäßrige Essigsäure ( $\Rightarrow$ ca. 15 % org. Lösungsmittel); Aufkonzentrierung 5:2.
4. 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (im Bereich der Bestimmungsgrenze oder darunter): Verdünnung von 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  auf 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  mit wäßriger Essigsäure; Aufkonzentrierung 5:2.

Zur Berechnung der Wiederfindungsraten wurden die Lösungen vor und nach der SPE injiziert und die resultierenden Peakflächen zueinander ins Verhältnis gesetzt. Die Ergebnisse der Bestimmungen finden sich in Tabelle 3.14.

**Mit Zusatz von Ascorbinsäure zum THF** Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde die Festphasenextraktion sechsmal durchgeführt. Um einen größeren Anreicherungsfaktor erreichen zu können, wurde eine Lösung in einer Konzentration von 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  eingesetzt. Dazu erfolgte die Verdünnung der neun Referenzsubstanzen (ohne Quercetin) von 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  auf 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  mit frischem Zwiebelextrakt aus der Heißextraktion; vor der SPE 5 mL dieser Lösung + 5 mL wäßrige Essigsäure ( $\Rightarrow$ ca. 15 % org. Lösungsmittel). Das eluierende THF wurde auf ca. 250  $\mu\text{L}$  eingengt und mit Acetonitril/wäßrige Essigsäure (20/80, v/v) auf 1000  $\mu\text{L}$  aufgefüllt ( $\Rightarrow$  Aufkonzentrierung 5:1).

Die zur Festphasenextraktion eingesetzte Referenzlösung wurde viermal in die HPLC injiziert und aus den Mittelwerten der Peakflächen und der matrixabhängigen Kalibrierung die tatsächlichen Konzentrationen der Verbindungen errechnet. Zur Berechnung der

**Tabelle 3.15:** Festphasenextraktion mit Zusatz von Ascorbinsäure: Wiederfindungsraten (WFR) für neun Flavonole, Flavone und Benzofuranone, 2 µg/mL mit Aufkonzentrierung 5:1

	Qox	Fox	Kox	Mox	My	F	M	A	K
c [µg/mL] vor SPE (n=4)	2,04	2,12	2,07	2,05	2,07	1,62	2,01	2,06	1,98
c [µg/mL] nach SPE (n=6)	7,99	9,90	10,41	10,10	6,57	5,51	5,95	9,55	8,57
WFR [%]	78,3	93,4	100,8	98,4	63,5	54,1	59,2	92,6	86,5
± [%]	7,3	4,6	8,2	14,9	12,1	9,8	11,8	3,5	7,3

Wiederfindungsraten wurden die Konzentrationen der nach der SPE erhaltenen Lösungen unter Berücksichtigung der Anreicherung von 5:1 zu diesen Konzentrationen ins Verhältnis gesetzt. Die Ergebnisse der Bestimmungen finden sich in Tabelle 3.15.

### 3.8.3 Chromatographie

#### 3.8.3.1 Parameter

Die Probenlösungen wurden mit allen der neu entwickelten HPLC-Methoden untersucht. Die Parameter wurden dabei im Vergleich zu den oben beschriebenen nicht verändert (HPLC-DAD: s. 3.7.2, S. 147; HPLC-ECD: s.3.7.3 , S. 156; HPLC-UV: s. 3.7.4, S. 161; HPLC-MS: s. 3.7.5, S. 162)

#### 3.8.3.2 Kalibrierung

Die Referenzlösungen der Flavonole, Flavone und Benzofuranone ( $c=100 \mu\text{g/mL}$ ) wurden zur Kalibrierung auf sieben Konzentrationen zwischen 0,1 und 10 µg/mL verdünnt. Zum Verdünnen wurde ein frischer Zwiebelextrakt aus der Heißextraktion verwendet (zum Vergleich siehe Kalibrierung 3.7.2.3, S. 148)

Luteolin wurde nicht zur Kalibrierung eingesetzt, da es mit dem natürlich in der Probe vorhandenen Quercetin koeluiert. Da die Konzentration des oxidierten Myricetin nicht bekannt war, wurde es ebenfalls nicht verwendet. Die Kalibriergeraden der Benzofuranone (Abb. 3.8), sowie die der Flavonole und Flavone (Abb. 3.9) waren in dem untersuchten Bereich linear. Die Kalibrierfunktionen sind in Tabelle 3.16, die nach DIN 32645 aus den Kalibriergeraden berechneten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in Tabelle 3.17 aufgeführt. Die Rohdaten zur Berechnung der Parameter finden sich in Tabelle 3.18. Abbildung 3.10 zeigt ein Chromatogramm der zur Kalibrierung eingesetzten Lösung im Bereich der Nachweisgrenzen bei 0,5 µg/mL.

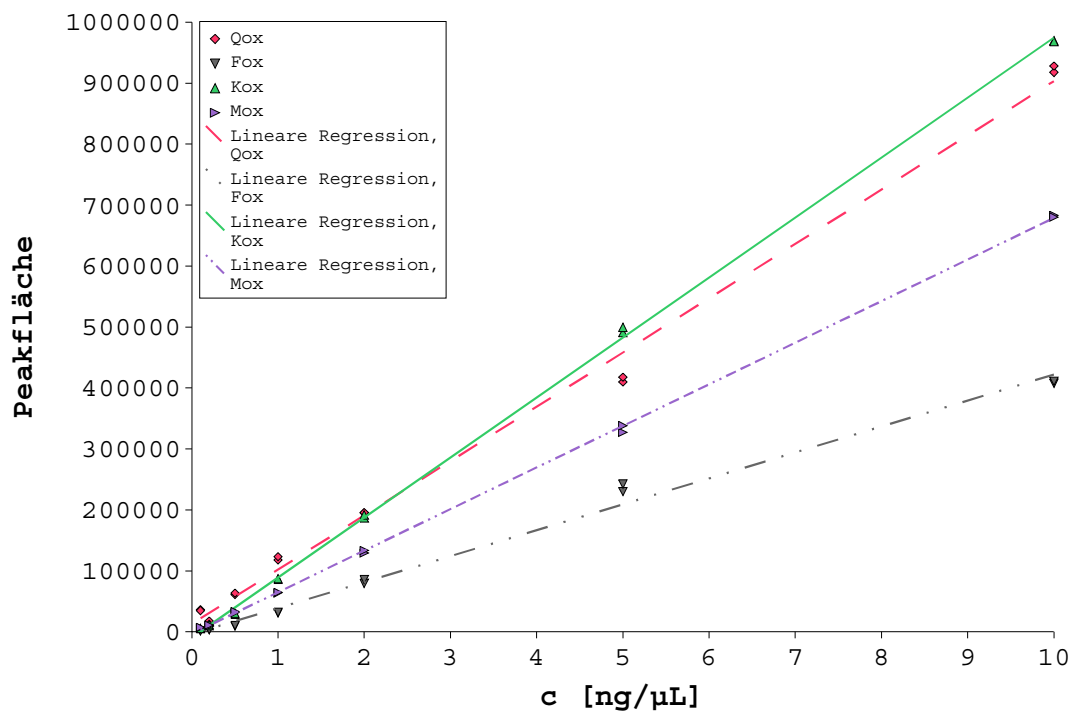


Abbildung 3.8: HPLC-DAD: Matrixabhängige Kalibriergeraden für die untersuchten Benzofuranone.

Tabelle 3.16: Formeln der matrixabhängigen Kalibriergeraden der Benzofuranone, Flavonole und Flavone; Gradientenelution auf Purospher-Säule; Photodiodenarray-Detektion, Monitoring bei 293, 350, 370 nm ( $A$ : Peakfläche [ $\text{mV} \times \text{min}$ ],  $a$ : Steigung [ $\frac{\text{mL} \times \text{mV} \times \text{min}}{\mu\text{g}}$ ],  $c$ : Konzentration des Analyten [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ],  $b$ : Achsenabschnitt [ $\text{mV} \times \text{min}$ ])

Verbindung	Kalibrierfunktion $A = a \times c + b$		Bestimmtheitsmaß $R^2$
	Steigung	Achsenabschnitt	
Quercetin ox.	89020	13163	0,9949
Fisetin ox.	42552	-3495	0,9927
Kaempferol ox.	98367	-9048	0,9995
Morin ox.	68212	-3158	0,9998
Myricetin	77426	-39440	0,9941
Fisetin	66112	-67	0,9979
Morin	50320	-6859	0,9991
Apigenin	83683	-374	0,9994
Kaempferol	96447	1952	0,9996

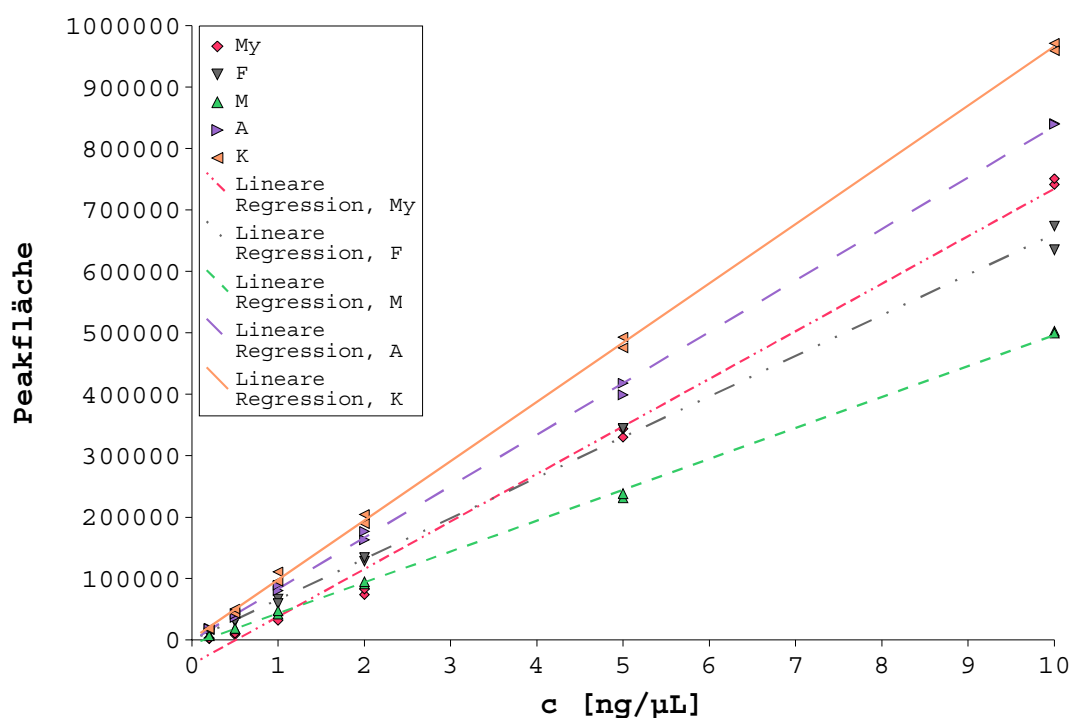


Abbildung 3.9: HPLC-DAD: Matrixabhängige Kalibriergeraden für die untersuchten Flavonole und Flavone.

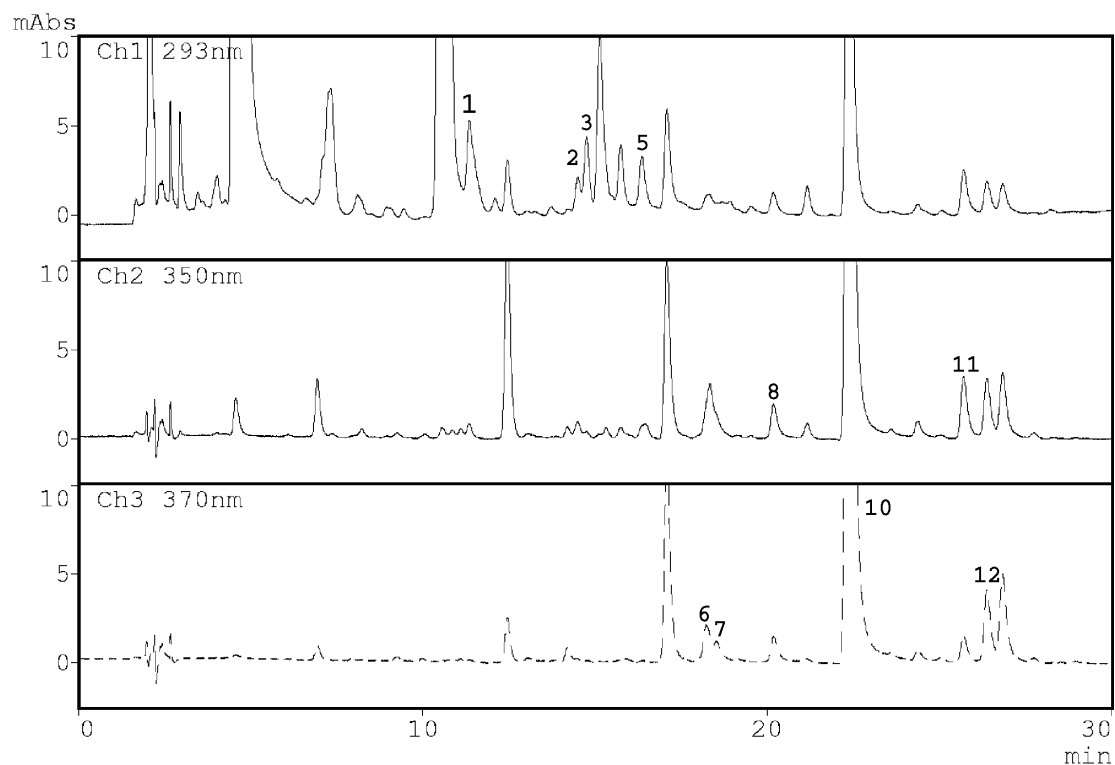
Tabelle 3.17: Matrixabhängige Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Benzofuranone, Flavonole und Flavone; Gradientenelution auf Purospher-Säule; Photodiodenarray-Detektion, Monitoring bei 293, 350, 370 nm (NWG: Nachweisgrenze, BG: Bestimmungsgrenze; berechnet aus den Kalibriergeraden nach DIN 32645 [97])

Verbindung	NWG [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	BG [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]
Quercetin ox.	0,84	2,52
Fisetin ox.	1,01	3,02
Kaempferol ox.	0,25	0,76
Morin ox.	0,18	0,55
Myricetin	0,98	2,95
Fisetin	0,58	1,75
Morin	0,38	1,15
Apigenin	0,30	0,91
Kaempferol	0,27	0,80

**Tabelle 3.18:** Matrixabhängige Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Benzofuranone, Flavonole und Flavone; Rohdaten und Berechnung

c [ng/µL]	Qox	Fox	Kox	Mox	My	F	M	Q	A	K
0,05	4572	1483	4234	4963		2030	2459	4847	5220	5658
0,05	6784	2378	6222	5554		2673	3091	4169	8112	7368
0,1	7444	3915	9505	8493	4540	8704	7111	14514	12414	15102
0,1	9043	3195	8210	8991	3846		5069	6680	10505	10311
0,5	48950	18499	48490	40705	8924	30006	24447	37703	49696	52461
0,5	41735	17587	45478	42096	10985	31002	23156	43652	50769	52950
1	74936	38198	93929	69057	41168	67007	38708	87667	78219	86635
1	78676	37296	89173	66482	31948	59296	38790	78396	74542	81032
2	182495	102577	213595	150913	73743	128225	87846	164659	167896	180316
2	180651	106744	219899	153024	82909	134389	92047	178011	172016	186852
5	416277	245219	529791	348774	330406	344161	235091	482823	425134	462740
5	431587	268272	552506	355201	344166	344676	243807	502954	441343	487067
10	876892	534322	1130985	734485	737786	647489	505510	1074777	884401	958188
10	905079	550092	1126442	733130	759057	595139	507942	1085926	885633	960999
a	88660	54504	113058	72799	77184	62965	50610	107944	88225	95855
b	-2992	-7374	-9900	463	-36814	4037	-5192	-18537	-1778	-1980
r <sup>2</sup>	0,9988	0,9981	0,9993	0,9993	0,9925	0,9948	0,9986	0,9970	0,9994	0,9994
s <sub>yx</sub>	11326	8805	10811	6909	25501	16963	7004	21581	7710	8305
s <sub>x0</sub>	0,13	0,16	0,1	0,09	0,33	0,27	0,14	0,2	0,09	0,09
<b>Schnellschätzung</b>										
x (NG)	<u>0,46</u>	<u>0,58</u>	<u>0,34</u>	<u>0,34</u>	<u>1,19</u>	<u>0,97</u>	<u>0,5</u>	<u>0,72</u>	<u>0,31</u>	<u>0,31</u>
x (BG)	<u>1,38</u>	<u>1,74</u>	<u>1,03</u>	<u>1,02</u>	<u>3,57</u>	<u>2,91</u>	<u>1,49</u>	<u>2,16</u>	<u>0,94</u>	<u>0,94</u>
<b>Berechnung</b>										
x quer	2,66	2,66	2,66	2,66	2,66	2,66	2,66	2,66	2,66	2,66
Q x	161,15	161,15	161,15	161,15	161,15	161,15	161,15	161,15	161,15	161,15
m	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
n	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14
Wurzel	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06
alpha	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Quantil t	3,05	3,05	3,05	3,05	3,17	3,11	3,05	3,05	3,05	3,05
x NG	<u>0,41</u>	<u>0,52</u>	<u>0,31</u>	<u>0,31</u>	<u>1,11</u>	<u>0,88</u>	<u>0,45</u>	<u>0,64</u>	<u>0,28</u>	<u>0,28</u>
x BG	<u>1,24</u>	<u>1,56</u>	<u>0,93</u>	<u>0,92</u>	<u>3,32</u>	<u>2,65</u>	<u>1,34</u>	<u>1,93</u>	<u>0,85</u>	<u>0,84</u>

$$x_{NG} = s_{x0} \cdot t_{f, \alpha} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{Q_x}}$$



Nr.	Verbindung
1	2-(3,4-Dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3-on
2	2-(3,4-Dihydroxybenzoyl)-2,6-dihydroxybenzofuran-3-on
3	2-(4-Hydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3-on
5	2-(2,4-Dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3-on
6	Myricetin
7	Fisetin
8	Morin
10	Quercetin
11	Apigenin
12	Kaempferol

**Abbildung 3.10:** Trennung von Benzofuranonen, Flavonolen und Flavonen, verdünnt mit Zwiebelextrakt aus Heißextraktion ( $c=0,5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ,  $20 \mu\text{L}$  injiziert,  $10 \text{ ng}$  absolut); Gradientenelution auf Purospher-Säule; Photodiodenarray-Detektion, Monitoring bei 293, 350, 370 nm.





# Kapitel 4

## Zusammenfassung und Ausblick

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse zu den Wechselwirkungen zwischen pflanzlichen Polyphenolen und verschiedenen Kationen stellen in zweierlei Hinsicht einen deutlichen analytischen Fortschritt dar. Zum einen sind sie bedeutsam im Hinblick auf die Spezies-Analytik von Polyphenol-Metall-Komplexen, zum anderen wurden neue Grundlagen für die leistungsfähige Untersuchung von oxidierten Flavonolen geschaffen.

Ausgehend von der Idee, mit chromatographischen Verfahren Komplexe aus verschiedenen antioxidativ wirksamen Polyphenolen und prooxidativ wirksamen Kationen in natürlichen Matrices nachweisen zu wollen, wurden in dieser Arbeit systematisch die Reaktionen zwischen diesen Verbindungen untersucht. Die Photometrie von Gemischen aus Referenzsubstanzen einer Vielzahl von Polyphenolen und der Kationen lieferte dabei schnell aussagekräftige Ergebnisse. Die Voraussetzungen in der Struktur der mutmaßlichen Liganden, die für eine meßbare Reaktion gegeben sein müssen, konnten auf diese Weise mit System erforscht werden. Dabei wurde offenbar, daß insbesondere Flavonole, die aufgrund ihrer positiven gesundheitlichen Wirkungen verstärkt wissenschaftliche Beachtung finden, mit den auch *in vivo* prooxidativ wirksamen Kationen  $\text{Fe}^{3+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$  deutliche Reaktionen zeigen. Durch die Verwendung verschiedener organischer Lösungsmittel in den untersuchten Lösungen wurde demonstriert, daß unterschiedliche analytische Bedingungen, wie sie für die HPLC üblich sind, einen starken Einfluß darauf haben, ob eine Komplexbildung oder eine Redoxreaktion zwischen den Reaktionspartnern bevorzugt ist.

Die Ergebnisse haben einen bedeutsamen Einfluß auf die Entscheidung, ob und wie eine Spezies-Analytik der Polyphenol-Metall-Komplexe in natürlichen Matrices durchgeführt werden kann. Die analytischen Bedingungen tragen dazu bei, daß eine wichtige Voraussetzung der Spezies-Analytik, nämlich daß der nachzuweisende Komplex durch die Untersu-

chung in seiner Beschaffenheit nicht wesentlich verändert wird, nicht erfüllt wird. Bisherige Untersuchungen zu dieser Thematik, in denen dieser Aspekt nicht beachtet wurde, müssen also im Licht der hier erzielten Ergebnisse neu bewertet werden.

Insbesondere in acetonitrilhaltigen Lösungen war eine schnelle Oxidation aller fünf untersuchten Flavonole sowohl durch  $\text{Fe}^{3+}$ , als auch durch  $\text{Cu}^{2+}$  zu beobachten. Die gleichen Reaktionen liefen auch bei hohen Wassergehalten in den Lösungen ab. Es kann daher davon ausgegangen werden, daß auch in natürlichen Matrices eine Wechselwirkung zwischen Flavonolen und prooxidativen Kationen zu den hier untersuchten Produkten führen kann. Mit einer neu entwickelten HPLC-Methode wurden diese Produkte näher untersucht. Durch den Einsatz einer stationären Phase aus Polystyroldivinylbenzol war es möglich, die Lösungen mit hohen Gehalten der jeweiligen Kationen direkt zu chromatographieren. Eine nachteilige Beeinflussung der Chromatogramme durch an der stationären Phase adsorbierte Kationen konnte durch die Wahl dieses Säulenmaterials umgangen werden. Die Chromatographie zeigte, daß in den Reaktionslösungen neben dem Edukt genau ein Oxidationsprodukt für das jeweilige Flavonol entstanden war. Aufbauend auf diese Methode wurde die HPLC-Analytik dieser Oxidationsprodukte deutlich vorangebracht.

Dazu wurde vorab aufgeklärt, welche chemische Struktur die oxidierten Flavonole haben. Da bisher in der Literatur unterschiedliche Vorschläge für verschieden dargestellte Oxidationsprodukte gemacht wurden, die nur teilweise spektroskopisch abgesichert waren und kein einheitliches Bild über die möglichen Redoxreaktionen abgeben, wurde zunächst eine einfache Synthesemethode entwickelt. Mit dieser Methode konnten die kationeninduzierten Oxidationsprodukte im mg-Maßstab dargestellt werden, und standen damit für eine detaillierte Stukturaufklärung zur Verfügung. Diese Stukturaufklärung, zu der ein- und zweidimensionale NMR-Techniken sowie verschiedene massenspektroskopische Verfahren herangezogen wurden, ergab, daß diese Verbindungen, 2-(Hydroxybenzoyl)-2-hydroxy-2H-1-benzofuran-3-one, im Zusammenhang mit der kationeninduzierten Oxidation von Flavonolen bisher nicht beschrieben wurden. Sie wurden kürzlich als Produkte der elektrochemischen Oxidation von Flavonolen nachgewiesen und als wichtige Biomarker für die antioxidative Wirkung von Flavonolen *in vivo* vorgeschlagen [67]. Mit den Benzofuranonen in einem Gleichgewicht stehende Benzopyrandione wurden mit präparativ analytischen Verfahren in Pflanzen nachgewiesen [68, 69]. Bis auf die HPLC-Trennung der Referenzsubstanzen zweier Flavonole und den daraus elektrochemisch dargestellten Oxidationsprodukten [67] sind bisher keine analytischen Verfahren zu deren Untersuchung publiziert.

Mit den in der vorliegenden Arbeit weiterhin entwickelten HPLC-Methoden zur Tren-

nung und zum Nachweis der Benzofuranone stehen diese Verfahren nun erstmals zur Verfügung. Durch die Verwendung zweier unterschiedlicher HPLC-Säulen, die bei verschiedenen Flußraten optimale Trennleistungen bringen, wurde die Detektion der Verbindungen mit mehreren sich ergänzenden Detektoren möglich. Die entwickelten Gradientenelutionen erlauben eine Trennung von elf verschiedenen Benzofuranonen, Flavonen und Flavonolen. Diese können mit Photodiodenarray-, elektrochemischer, UV/Vis- und massenspektroskopischer Detektion nachgewiesen werden. Aufgrund der Möglichkeit, mit den Chromatogrammen jeweils Spektren der eluierenden Verbindungen aufzeichnen zu können, sind insbesondere die Photodiodenarray- und die ESI-ion trap/MS-Detektion für eine weiterführende Analytik der Benzofuranone geeignet.

Dies konnte am Beispiel der Untersuchung von Zwiebeln und Lauch deutlich gezeigt werden. Auch mit der Belastung durch Matrixbestandteile waren die HPLC-Verfahren zum Nachweis der oxidierten Flavonole geeignet. Durch eine neu entwickelte Festphasenextraktion wurde zudem die teilweise Abtrennung dieser Störsubstanzen bei gleichzeitiger Aufkonzentrierung der Analyten möglich gemacht. Bei dieser Anreicherung kann es durch die Einwirkung nicht weiter charakterisierter Matrixbestandteile zur Bildung der Benzofuranone aus Flavonolen kommen. Diese unerwünschte Oxidation wurde durch Zusatz von Ascorbinsäure zu Eluenten der SPE unterbunden. Mit dieser neu entwickelten Aufarbeitungsmethode konnte gezeigt werden, daß die Benzofuranone in den untersuchten Pflanzenmaterialien nicht nativ nachweisbar sind. Die hohen Gehalte an oxidiertem Quercetin in Zwiebeln, die in der Literatur angegeben wurden [69], ließen sich mit den hier vorgestellten analytischen Verfahren nicht bestätigen.

Im Hinblick auf die Untersuchung weiterer Matrices, seien es Lebensmittel pflanzlichen Ursprungs, zusammengesetzte Lebensmittel oder biologische Proben, auf ihren Gehalt an oxidierten Flavonolen, ist in der vorliegenden Arbeit erstmals eine umfassende Analytik dieser Verbindungen präsentiert. Es wurde dabei aber auch offenbar, daß die Reaktionen der Flavonole in den Pflanzenmaterialien sehr komplex sind. Angesichts der zunehmenden bewußten Verwendung von Flavonoiden, und zwar hauptsächlich von Flavonolen, bei der Herstellung von Lebensmitteln, ist eine leistungsfähige Analytik von Metaboliten dieser Verbindungen dringend gefordert. Die vorliegende Arbeit legt einen wichtigen Grundstein für diesen Zweck.



# Kapitel 5

## Anhang



# Literaturverzeichnis

- [1] DIPLOCK, A. T., J.-L. CHARLEUX, G. CROZIER-WILLI, F. J. KOK, C. RICE-EVANS, M. ROBERFROID, W. STAHL und J. VI NA RIBES: *Functional food science and defence against reactive oxidative species*. Brit J Nutr, Suppl, 80:S77–S112, 1998.
- [2] SHAHIDI, F. und P. K. JANITHA P. D. WANASUNDARA: *Phenolic antioxidants*. Crit Rev Food Sci Nutr, 32:67–103, 1992.
- [3] AUST, S.D.: *Assessing the antioxidant activities of polyphenols*. Analisis Magazine, 25(8):M47–M49, 1997.
- [4] SIGEL, A. und H. SIGEL (Herausgeber): *Interrelations between free radicals and metal ions in life processes*, Band 36 der Reihe *Metal ions in biological systems*. Dekker, New York, Basel, Hong Kong, 1999.
- [5] BELITZ, H.-D. und W. GROSCH: *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, 3. Auflage, 1987.
- [6] TÄUFEL, A., W. TERNES, L. UNGER und M. ZOBEL (Herausgeber): *Lebensmittel-Lexikon*. Behr's, Hamburg, 3. Auflage, 1993.
- [7] ACWORTH, I. N. und B. BAILEY: *The Handbook of Oxidative Metabolism*. ESA, Inc., Chelmsford, Huntingdon, 1995.
- [8] MILLER, N.J., C. CASTELLUCIO, L. TIJBURG und C. RICE-EVANS: *The antioxidant properties of theaflavins and their gallate esters - radical scavengers or metal chelators ?* FEBS Letters, 392:40–44, 1996.
- [9] TANG, L. X., J. L. YANG und X. SHEN: *Effects of additional iron-chelators on Fe<sup>2+</sup>-initiated lipid peroxidation: evidence to support the Fe<sup>2+</sup>... Fe<sup>3+</sup> complex as the initiator*. J Inorg Biochem, 68:265–272, 1997.

- [10] ARORA, A. und G. M. STRASBOURG: *Development and validation of fluorescence spectroscopic assays to evaluate antioxidant efficacy. Application to metal chelators.* JAOCS, 9:1031–1040, 1997.
- [11] BROWN, J.E., H. KHODR, R.C. HIDER und C.A. RICE-EVANS: *Structural dependence of flavonoid interactions with Cu<sup>2+</sup> ions: implications for their antioxidant properties.* Biochem J, 330:1173–1178, 1998.
- [12] THOMPSON, M., C. R. WILLIAMS und G. E. P. ELLIOT: *Stability of flavonoid complexes of copper(II) and flavonoid antioxidant activity.* Anal Chim Acta, 85:375–381, 1976.
- [13] CORNELIS, R., F. BORGUET und J. DE KIMPE: *Trace elements in medicine. Speciation: the new frontier.* Anal Chim Acta, 283:183–189, 1993.
- [14] DAS, A. K., R. CHAKRABORTY, M. L. CERVERA und M. DE LA GUARDIA: *Metal speciation in solid matrices.* Talanta, 42:1007–1030, 1995.
- [15] DAS, A. K., R. CHAKRABORTY, M. L. CERVERA und M. DE LA GUARDIA: *Metal speciation in biological fluids - a review.* Microchim Acta, 122:209–246, 1996.
- [16] DAS, A. K. und R. CHAKRABORTY: *Electrothermal atomic absorption spectrometry in the study of metal ion speciation.* Fresenius J Anal Chem, 357:1–17, 1997.
- [17] HOLLEMAN, A. F. und E. WIBERG: *Lehrbuch der anorganischen Chemie.* Walter de Gruyter, Berlin, New York, 91.-100. Auflage, 1985.
- [18] TRAUTWEIN, A. (Herausgeber): *Bioinorganic chemistry: transition metals in biology and their coordination chemistry.* Wiley-VCH, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto, 1997.
- [19] SIGEL, A. und H. SIGEL (Herausgeber): *Iron transport and storage in microorganisms, plants, and animals*, Band 35 der Reihe *Metal ions in biological systems.* Dekker, New York, Basel, Hong Kong, 1998.
- [20] MÜLLER, M., M. ANKE und H. ILLING-GÜNTHER: *Aluminium in foodstuffs.* Food Chem, 61(4):419–428, 1998.
- [21] ZATTA, P., P. ZAMBENEDETTI und R. MILACIC: *Aluminium toxicity: The relevant role of the metal speciation.* Analisis Magazine, 26(6):M72–M76, 1998.



- [22] BORN, M., P.-A. CARRUPT, R. ZINI, F. BREE, J.-P. TILLEMENT, K. HOSTETT-MANN und B. TESTA: *Electrochemical behaviour and antioxidant activity of some natural polyphenols*. *Helv Chim Acta*, 79:1147–1158, 1996.
- [23] KOBER, F.: *Grundlagen der Komplexchemie*. Salle + Sauerländer, Frankfurt am Main, Berlin, München, Aarau, 1. Auflage, 1979.
- [24] ENGELHARDT, U. und R. GALENSA: *Analytiker Taschenbuch*, Band 15, Kapitel Analytik und Bedeutung von Polyphenolen in Lebensmitteln, Seiten 147–178. Springer, Berlin, Heidelberg, 1997.
- [25] HOLLMAN, P. C. H., M. G. L. HERTOOG und M. B. KATAN: *Role of dietary flavonoids in protection against cancer and coronary heart disease*. *Bioactive Comp Food*, 24:785–789, 1996.
- [26] HOLLMAN, P. C. H., M. G. L. HERTOOG und M. B. KATAN: *Analysis and health effects of flavonoids*. *Food Chem*, 57(1):43–46, 1996.
- [27] HOLLMANN, P. C. H. und M. B. KATAN: *Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man*. *Arch Tox (Suppl)*, 20:237–248, 1998.
- [28] TERNES, W.: *Wirkung antioxidativer Gewürzextrakte*. *Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung*, 35:176, 1996.
- [29] HARBORNE, J. B. (Herausgeber): *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. Chapman & Hall, London, 1994.
- [30] CROZIER, A., E. JENSEN, M. E. J. LEAN und M. S. McDONALD: *Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography*. *J Chrom A*, 761:315–321, 1997.
- [31] TAKAHAMA, U.: *Inhibition of lipoxygenase-dependent lipid peroxidation by quercetin: mechanism of antioxidative function*. *Phytochemistry*, 24(7):1443–1446, 1985.
- [32] MCANLIS, G. T., J. MCENENY, J. PEARCE und I. S. YOUNG: *The effect of various dietary flavonoids on the susceptibility of low density lipoproteins to oxidation in vitro using both metallic and non-metallic oxidising agents*. *Biochem Soc Transact*, 25:142S, 1997.

- [33] MEYER, A. S., M. HEINONEN und E. N. FRANKEL: *Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation*. Food Chem, 61(1/2):71–75, 1998.
- [34] SESTILI, P., A. GUIDARELLI, M. DACHÀ und O. CANTONI: *Quercetin prevents DNA single strand breakage and cytotoxicity caused by tert-butylhydroperoxide: free radical scavenging versus iron chelating mechanism*. Free Rad Biol Med, 25:196–200, 1998.
- [35] BUCKINGHAM, J. (Herausgeber): *Dictionary of organic compounds*. Chapman & Hall, London, 6. Auflage, 1995.
- [36] HERTOOG, M. G. L., P. C. H. HOLLMAN und M. B. KATAN: *Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands*. J Agric Food Chem, 40:2379–2383, 1992.
- [37] HERTOOG, M. G. L., E. J. M. FESKENS, P. C. H. HOLLMAN, M. B. KATAN und D. KROMHOUT: *Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study*. Lancet, 342:1007–1011, 1993.
- [38] LEWIS, E. J. und B. M. WATTS: *Antioxidant and copper binding properties of onions*. J Food Sci, 23:274–279, 1958.
- [39] BECKE-GOEHRING, M. und H. HOFFMANN: *Komplexchemie*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1970.
- [40] HARMS, J. und G. SCHWEDT: *Applications of capillary electrophoresis in element speciation analysis of plant and food extracts*. Fresenius J Anal Chem, 350:93–100, 1994.
- [41] DANGLES, O.: *Anthocyanin complexation and colour expression*. Analisis Magazine, 25(8):M50–M52, 1997.
- [42] DANGLES, O., M. ELHABIRI und R. BROUILLARD: *Kinetic and thermodynamic investigation of the aluminium-anthocyanin complexation in aqueous solution*. J Chem Soc Perk T, Seiten 2587–2596, 1994.
- [43] SPEIER, G., V. FÜLÖP und L. PÁRKÁNYI: *Chelated flavonol co-ordination in flavonolabis(triphenylphosphine)copper(I)*. J Chem Soc, Chem Commun, Seiten 512–513, 1990.

- [44] BALOGH-HERGOVICH, É., G. SPEIER und G. ARGAY: *The oxygenation of flavonol by copper(I) and copper(II) flavonolate complexes. The crystal and molecular structure of bis(flavonolato)copper(II)*. J Chem Soc, Chem Commun, Seiten 551–552, 1991.
- [45] BALOGH-HERGOVICH, É., J. KAIZER und G. SPEIER: *Synthesis and characterization of copper(I) and copper(II) flavonolate complexes with phthalazine ligand, and their oxygenation and relevance to quercetinase*. Inorg Chim Acta, 256:9–14, 1997.
- [46] LIPPAI, I., G. SPEIER, G. HUTTNER und L. ZSOLNAI: *Crystal and molecular structure of a ketocarboxylatocopper(II) intermediate in the oxygenation of a copper(I) flavonolate complex*. Chem Commun, Seiten 741–742, 1997.
- [47] PORTER, L. J. und K. R. MARKHAM: *The aluminium(III) complexes of hydroxyflavones in absolute methanol. Part II. Ligands containing more than one chelating site*. J Chem Soc (C), Seiten 1309–1313, 1970.
- [48] UTAKA, M., M. HOJO, Y. FUJII und A. TAKEDA: *Cupric ion-catalyzed dioxygenation of 1,2-cyclohexanediones. A nonenzymatic analog for quercetinase dioxygenation*. Chem Lett, Seiten 635–638, 1984.
- [49] UTAKA, M. und A. TAKEDA: *Copper(II)-catalysed oxidation of quercetin and 3-hydroxyflavone*. J Chem Soc, Chem Commun, Seiten 1824–1826, 1985.
- [50] WEDEPOHL, K.: *Zur Analytik von Metall-Flavonoid-Komplexen als Elementspezies in pflanzlichen Lebensmitteln*. Doktorarbeit, Universität Stuttgart, 1986.
- [51] WEBER, G.: *HPLC with electrochemical detection of metal-flavonoid-complexes isolated from food*. Chromatographia, 26:133–138, 1988.
- [52] SPEIER, G.: *Catechol dioxygenase chemistry: copper catecholte and semiquinone complexes and the mechanism of the oxidative cleavage reaction*. New J Chem, 18:143–147, 1994.
- [53] BUTCHER, R. J., G. DIVEN, G. ERICKSON, J. JASINSKI, G. M. MOCKLER, R. Y. POZDNIakov und E. SINN: *Binuclear copper(II) complexes containing phenols and catechols*. Inorg Chim Acta, 239:107–116, 1995.

- [54] VENEDIKTOV, E. A., O. G. TOKAREVA und N. O. KONSTANTINOVA: *Effect of complexation on quercetin oxidation with singlet oxygen*. Russ J Phys Chem, 70(7):1217–1219, 1996.
- [55] MARMOLLE, F., E. LEIZE, I. MILA, A. VAN DORSELAER, A. SCALBERT und A. M. ALBRECHT-GARY: *Polyphenol metallic complexes: characterization by electrospray mass spectrometric and spectrophotometric methods*. Analisis Magazine, 25(8):M53–M55, 1997.
- [56] KUNTIĆ, V., S. BLAGOJEVIĆ, D. MALESEV und Z. RADOVIĆ: *Spectrophotometric investigation of the Pd(II)-quercetin complex in 50% ethanol*. Monatshefte für Chemie, 129:41–48, 1998.
- [57] HUDSON, B. J. F. und J. I. LEWIS: *Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible Oils. Structural criteria for activity*. Food Chem, 10:47–55, 1983.
- [58] JANDER, G. und E. BLASIUS: *Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie*. S. Hirzel, Leipzig, 1986.
- [59] HOLLMAN, P. C. H., J. M. P. VAN TRIJP und M. N. C. P. BUYSMAN: *Fluorescence detection of flavonols in HPLC by postcolumn chelation with aluminium*. Anal Chem, 68:3511–3515, 1996.
- [60] DENG, H. und G. J. VAN BERKEL: *Electrospray mass spectrometry and UV/visible spectrophotometry studies of aluminium(III)-flavonoid complexes*. J Mass Spec, 33:1080–1087, 1998.
- [61] WEBER, G. und G. SCHWEDT: *Post-chromatographische Derivatisierungs- und Detektionstechniken zur Charakterisierung von Elementbindungsformen in Kaffee und Tee*. Fresenius J Anal Chem, 316:594–599, 1983.
- [62] WEDEPOHL, K. und G. SCHWEDT: *Zur Analytik von Kupfer/Flavonoid-Komplexen als Elementspezies in pflanzlichen Lebensmitteln*. Anal Chim Acta, 203:23–34, 1987.
- [63] CAIRNS, W. R. L., S. J. HILL und L. EBDON: *Directly coupled high performance liquid chromatography - inductively coupled plasma-mass spectrometry for the determination of organometallic species in tea*. Microchem J, 54:88–110, 1996.

- [64] LIPPAI, I. und G. SPEIER: *Quercetinase model studies. The oxygenation of flavonol catalyzed by a cationic 2,2'-bipyridine copper(II) flavonolate complex.* J Molecular Catalysis, 130:139–148, 1998.
- [65] HENDRICKSON, H. P., A. D. KAUFMAN und C. E. LUNTE: *Electrochemistry of catechol-containing flavonoids.* J Pharm Biomed Anal, 12(3):325–334, 1994.
- [66] MURARI, R., S. RANGASWAMI und T. R. SESHADRI: *Action of alkaline hexacyanoferrate(III) on quercetin.* Ind J Chem, 13:543–545, 1975.
- [67] VIBORG JØRGENSEN, L., C. CORNETT, U. JUSTESEN und L. H. SKIBSTED: *Two-electron Electrochemical Oxidation of Quercetin and Kaempferol Changes Only the Flavonoid C-ring.* Free Rad. Res., 29:339–350, 1998.
- [68] IGARASHI, K., C. KOMATSU und T. SHIMADA: *2,5,7,3',4'-Pentahydroxyflavan-3,4-dione as an intermediate product in the enzyme-catalyzed oxidation of quercetin.* Agric Biol Chem, 55(3):855–857, 1991.
- [69] HIROSE, Y., T. FUJITA, S. TANIMORI, H. HAYASHI, M. NAKAYAMA und N. SENDA: *Structure and formation mechanism of quercetin oxidation dimers from onion.* In: *36 th Symposium on the Chemistry of Natural Products*, Seiten 649–656, Higashi-Hiroshima, Japan, Oktober 1994.
- [70] PUREV, O. und F. POSPISIL: *Metabolism of quercetin in cell suspension culture of Nicotiana tabacum L.* Biologia Plantarum (Praha), 31(3):182–187, 1989.
- [71] LIPPAI, I., G. SPEIER, G. HUTTNER und L. ZSOLNAI: *(2,2'-Bipyridine)(flavonolato)copper(II) Perchlorate, (Cu(bpy)(fla))ClO<sub>4</sub>.* Acta Crystallographica, 53:1547–1548, 1997.
- [72] HERTOOG, M. G. L., P. C. H. HOLLMAN und D. P. VENEMA: *Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits.* J Agric Food Chem, 40:1591–1598, 1992.
- [73] JIMÉNEZ, M. und F. GARCÍA-CARMONA: *Oxidation of the Flavonol Quercetin by Polyphenol Oxidase.* J Agric Food Chem, 47:56–60, 1999.
- [74] JIMÉNEZ, M., J. ESCRIBANO-CEBRIÁN und F. GARCÍA-CARMONA: *Oxidation of the Flavonol Fisetin by Polyphenol Oxidase.* Biochim Biophys Acta, 1425:534–542, 1999.

- [75] CARERI, M., A. MANGIA und M. MUSCI: *Overview of the applications of liquid chromatography-mass spectrometry interfacing systems in food analysis: naturally occurring substances in food.* J Chrom A, 794:263–297, 1998.
- [76] HÄKKINEN, S. und S. AURIOLA: *High-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and diode array ultraviolet detection in the identification of flavonol aglycones and glycosides in berries.* J Chrom A, 829:91–100, 1998.
- [77] APFFEL, J. A. und R. G. NORDMAN: *Introduction to particle beam LC/MS.* Hewlett-Packard J, 6:69–76, 1990.
- [78] NIESSEN, W. M. A.: *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry*, Band 79 der Reihe *Chromatographic Science Series*. Dekker, New York, Basel, Hong Kong, 2. Auflage, 1999.
- [79] WEBER, G.: *Speciation of iron using HPLC with electrochemical and flame-AAS detection.* Fresenius J Anal Chem, 340:161–165, 1991.
- [80] DUNEMANN, L.: *Coupling techniques in speciation analysis.* Fresenius J Anal Chem, 342:802–804, 1992.
- [81] SANZ-MEDEL, A.: *Beyond total element analysis of biological systems with atomic spectrometric techniques.* Analyst, 120:799–807, 1995.
- [82] WEBER, G. und H. BERNDT: *Effective on-line coupling of HPLC and flame-AAS by means of hydraulic high pressure nebulization.* Chromatographia, 29(5/6):254–258, 1990.
- [83] EL-JAMMAL, A., P. LYNNE HOWELL, M. A. TURNER, N. LI und D. M. TEMPLETON: *Copper complexation by 3-hydroxypyridin-4-one iron chelators: structural and iron competition studies.* J Med Chem, 37:1994, 1994.
- [84] EL-JAMMAL, A. und D. M. TEMPLETON: *Electrochemical oxidation of some therapeutic 3-hydroxypyridin-4-one iron chelators.* Electrochim Acta, 38(15):2223–2230, 1993.
- [85] SKINNER, T. L., K. A. MEURER und R. A. YOKEL: *HPLC quantitation of a very hydrophilic 3-hydroxypyridin-4-one chelator using a simple separation procedure and the baseline file subtraction method.* J Chrom Sci, 34:52–57, 1996.

- [86] BALOGH-HERGOVICH, É., J. KAIZER, G. SPEIER, G. HUTTNER und L. ZSOLNAI: *Ligand- and solvent-dependence of the reaction of copper flavonolate 1,10-phenanthroline complexes with dioxygen*. J Inorg Biochem, 67:75, 1997.
- [87] CHRISTIAN, G. D.: *Analytical chemistry*. Wiley, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, 5. Auflage, 1994.
- [88] SARZANINI, C. und E. MENTASTI: *Determination and speciation of metals by liquid chromatography*. J Chrom A, 789:301–321, 1997.
- [89] SZPUNAR-LOBINSKA, J., C. WITTE, R. LOBINSKI und F. C. ADAMS: *Separation techniques in speciation analysis for organometallic species*. Fresenius J Anal Chem, 351:351–377, 1995.
- [90] WEBER, G.: *Speciation of tin in lemon juice: an example of trace metal speciation in food*. Anal Chim Acta, 200:79–88, 1987.
- [91] HESSE, M., H. MEIER und B. ZEEH: *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Thieme, Stuttgart, New York, 4. Auflage, 1991.
- [92] AGRAWAL, P. K. (Herausgeber): *Carbon-13 NMR of flavonoids*, Band 39 der Reihe *Studies in Organic Chemistry*. Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, 1989.
- [93] CROASMUN, W. R. und R. M. K. CARLSON (Herausgeber): *Two-dimensional NMR spectroscopy: applications for chemists and biochemists*. VCH, Weinheim, New York, Cambridge, 2. Auflage, 1994.
- [94] DREWES, S. E.: *Chroman and related compounds*, Band 2 der Reihe *Progress in mass spectrometry*. Verlag Chemie, Weinheim, 1974.
- [95] BOCCHI, C., M. CARERI, F. GROPPi, A. MANGIA, P. MANINI und G. MORI: *Comparative investigation of UV, electrochemical and particle beam mass spectrometric detection for the high-performance liquid chromatographic determination of benzoic and cinnamic acids and of their corresponding phenolic acids*. J Chrom A, 753:157–170, 1996.
- [96] *ChromBook*. Merck, Darmstadt, 2. Auflage, 1998.
- [97] NORMUNG E.V., DEUTSCHES INSTITUT FÜR (Herausgeber): *DIN 32645 - Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze. Ermittlung unter*

- Wiederholbedingungen. Begriffe, Verfahren, Auswertung.* Beuth, Berlin, 05. Auflage, 1994.
- [98] HERTOOG, M. G. L., P. C. H. HOLLMAN und B. VAN DE PUTTE: *Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices.* J Agric Food Chem, 41:1242–1246, 1993.
- [99] JUSTESEN, U., P. KNUTHSEN und T. LETH: *Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection.* J Chrom A, 799:101–110, 1998.
- [100] CHAVES, N., J. J. RÍOS, C. GUTIERREZ, J. C. ESCUDERO und J. M. OLÍAS: *Analysis of secreted flavonoids of Cistus ladanifer L. by high-performance liquid chromatography-particle beam mass spectrometry.* J Chrom A, 799:111–115, 1998.
- [101] HE, X., L. LIN und L. LIAN: *Analysis of flavonoids from red clover by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry.* J Chrom A, 755:127–132, 1996.
- [102] WATSON, D. G. und A. R. PITT: *Analysis of flavonoids in tablets and urine by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/mass spectrometry.* Rapid Comm Mass Spec, 12(4):153–156, 1998.
- [103] JONES, D. J. L., C. K. LIM, D. R. FERRY und A. GESCHER: *Determination of Quercetin in Human Plasma by HPLC with Spectrophotometric or Electrochemical Detection.* Biomed Chrom, 12:232–235, 1998.
- [104] RÜHLING, I.: *Anwendung voltammetrischer Verfahren in Kopplung mit der HPLC zur Charakterisierung redoxaktiver Wirkstoffe.* Doktorarbeit, Universität Hannover, 1999.
- [105] ENGELHARDT, H. und L. ROHRSCHEIDER: *Deutsche chromatographische Grundbegriffe zur IUPAC-Nomenklatur.* Technischer Bericht Arbeitskreis Chromatographie der Fachgruppe Analytische Chemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker, 1995.



# Abbildungsverzeichnis

1.1	Grundgerüste der einzelnen Klassen von Flavonoiden. . . . .	15
1.2	Strukturen und Trivialnamen der in dieser Arbeit untersuchten Phenole. . .	16
1.3	Schematische Beschreibung von möglichen Vorgängen und Einflußfaktoren bei der Reaktion von Polyphenolen mit Kationen. . . . .	18
1.4	Beschriebene Bindungsstellen für Kationen an Polyphenolen am Beispiel des Quercetin (Benennung in Anlehnung an [51]). . . . .	20
1.5	Gleichgewichts-Reaktion zwischen beschriebenen Oxidationsprodukten von Flavonolen (R=H, R=OH) [67]. . . . .	27
1.6	Schematischer Aufbau des verwendeten HPLC-AAS-Systems. . . . .	32
2.1	Veränderung des UV/Vis-Spektrums von 3-Hydroxyflavon durch Zugabe von Fe <sup>3+</sup> (molares Verhältnis 1:1, Reaktionszeit 15 min.). . . . .	37
2.2	Struktur von 1,2-Dimethyl-3-hydroxy-4-pyridon, das zu therapeutischen Zwecken als Chelatligand für Fe <sup>3+</sup> <i>in vivo</i> eingesetzt wird. . . . .	37
2.3	Veränderung des UV/Vis-Spektrums von Luteolin durch Zugabe von Fe <sup>3+</sup> (molares Verhältnis 1:1, Reaktionszeit 15 min). . . . .	38
2.4	Veränderung des UV/Vis-Spektrums von Kaempferol durch Zugabe von Fe <sup>3+</sup> (molares Verhältnis 1:1): Einfluß der Reaktionszeit. . . . .	39
2.5	Differenz der UV/Vis-Spektren von Quercetin mit und ohne Zugabe von Fe <sup>2+</sup> (molares Verhältnis 1:5, Reaktionszeit 36 h). . . . .	40
2.6	Veränderung des UV/Vis-Spektrums von Quercetin durch Zugabe von Fe <sup>3+</sup> (molares Verhältnis 1:1, Reaktionszeit: 15 min): Einfluß des organischen Lösungsmittels. . . . .	41
2.7	Veränderung des UV/Vis-Spektrums von 3-Hydroxyflavon durch Zugabe von Cu <sup>2+</sup> (molares Verhältnis 1:1, Reaktionszeit 15 min). . . . .	42
2.8	Zunahme der Extinktion bei 293 nm nach Zugabe von Cu <sup>2+</sup> zu einer Lösung von Quercetin (c(Q)=10 µg/mL, molares Verhältnis 1:1). . . . .	43

2.9	Zeitabhängige Veränderung des UV/Vis-Spektrums von Quercetin durch Zugabe von $\text{Cu}^{2+}$ (molares Verhältnis 1:1, Acetonitril-haltige Lösung). . . . .	43
2.10	Differenz der UV/Vis-Spektren von Quercetin mit und ohne Zugabe von $\text{Cu}^{2+}$ in ethanolisch wäßriger Lösung (molares Verhältnis 1:5, Reaktionszeit 24 h). . . . .	45
2.11	Änderung der Absorptionswerte in den Maxima bei 293 und 370 nm in Abhängigkeit vom molaren Verhältnis zwischen Quercetin (Q) und $\text{Cu}^{2+}$ . . . . .	46
2.12	UV/Vis-Spektren der Reaktionsprodukte von Quercetin mit $\text{Cu}^{2+}$ : Einfluß der Konzentrationsverhältnisse (Reaktionszeit 15 min). . . . .	47
2.13	Differenz der UV/Vis-Spektren von Kaempferol mit und ohne Zugabe von $\text{Al}^{3+}$ (molares Verhältnis 1:1, Reaktionszeit 15 min). . . . .	48
2.14	Chromatographie des $\text{Al}^{3+}$ -Komplexes von Quercetin (molares Verhältnis 1:1); isokratische Elution auf Polystyroldivinylbenzol-Phase, Fluoreszenz-Detektion. . . . .	54
2.15	Chromatographie von $\text{Cu}^{2+}$ : Vergleich der Referenzlösung von $\text{Cu}^{2+}$ (oben) mit der Reaktionsmischung von Quercetin und $\text{Cu}^{2+}$ (molares Verhältnis 2:1) (unten); isokratische Elution auf Polystyroldivinylbenzol-Phase, Detektion mit Flammen-AAS. . . . .	55
2.16	Trennung von Quercetin (Q), Kaempferol (K) und deren Reaktionsprodukten mit $\text{Cu}^{2+}$ (Q-ox., K-ox.) ( $c(\text{Q},\text{K})=20 \mu\text{g/mL}$ , $20 \mu\text{L}$ injiziert, molare Verhältnisse Q:Cu 1:1, K:Cu 1:1); isokratische Elution auf Nucleogel-Säule; Photodiodenarray-Detektion, Chromatogramme bei 293 und 370 nm. . . . .	57
2.17	Peakflächen der Flavonole und der zusätzlich eluierenden Verbindungen (Abb. 2.16) am Beispiel der Gemische von Quercetin mit $\text{Cu}^{2+}$ (Q: Quercetin, Q-ox.: oxidiertes Quercetin). . . . .	58
2.18	UV/Vis-Spektren in den Peaks der beiden zusätzlich eluierenden Verbindungen bei der Chromatographie der Gemische von Quercetin und Kaempferol mit $\text{Fe}^{3+}$ oder $\text{Cu}^{2+}$ (Abb. 2.16) (oben); Vergleich mit den UV/Vis-Spektren der Reaktionsgemische von Quercetin und Kaempferol mit einem Überschuß an $\text{Cu}^{2+}$ (Abschnitt 2.1.2.2, S. 42) (unten). . . . .	59
2.19	Trennung von Quercetin (Q), Kaempferol (K) und deren Reaktionsprodukten mit $\text{Cu}^{2+}$ (Q-ox., K-ox.) und $\text{Al}^{3+}$ (Al-Kompl.) ( $c(\text{Q},\text{K})=20 \mu\text{g/mL}$ , $20 \mu\text{L}$ injiziert, molares Verhältnis Q:K:Cu:Al 1:1:0,5:1); isokratische Elution auf Nucleogel-Säule; Photodiodenarray-Detektion. . . . .	60

2.20	$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren des oxidierten Quercetin in $\text{CD}_3\text{CN}$ : Vergleich der Produkte aus der Reaktion mit $\text{Cu}^{2+}$ (oben) und $\text{Fe}^{3+}$ (unten). . . . .	66
2.21	Mögliche Strukturen der Produkte der Oxidation von Quercetin mit $\text{Fe}^{3+}$ oder $\text{Cu}^{2+}$ (Basis: Daten der eindimensionalen NMR-Messungen). . . . .	68
2.22	HH-COSY-NMR des oxidierten Quercetin: Kopplung der aromatischen Protonen untereinander (linke und obere Spur: aromatische Protonen). . . . .	70
2.23	Ausschnitt aus dem HMQC-NMR des oxidierten Quercetin: Kopplung zwischen C-Kernen und ihren fünf direkt gebundenen aromatischen Protonen (obere Spur: aromatische Protonen; linke Spur: C-Kerne). . . . .	72
2.24	HMBC-NMR des oxidierten Quercetin: Korrelation zwischen C-Kernen und Protonen über zwei bis vier Bindungen hinweg (obere Spur: aromatische und phenolische Protonen; linke Spur: C-Kerne); Eingekreist sind die Signale, die für die Interpretation die größte Bedeutung haben (siehe Aufzählung im Text). . . . .	73
2.25	Ausschnitt aus dem HMBC-NMR des oxidierten Quercetin: die Kopplungen der beiden Carbonyl-C-Atome C-3 und C-4 mit den jeweiligen Protonen sind hier deutlich zu erkennen (Punkte 1. und 4. der Aufzählung im Text). . . . .	74
2.26	Strukturen und systematische Namen der durch kationen-induzierte Oxidation dargestellten oxidierten Flavonole (ox. Myricetin nicht eindeutig charakterisiert). . . . .	77
2.27	Massenspektrum des oxidierten Quercetin (EI, 70 eV). . . . .	80
2.28	Fragmentierungsschema der untersuchten Benzofuranone (EI, positiv). . . . .	82
2.29	Massenspektrum des oxidierten Quercetin (ESI, Anionendetektion, keine induzierte Fragmentierung: $\text{MS}^1$ ). . . . .	84
2.30	Massenspektrum ( $\text{MS}^2$ ) des oxidierten Quercetin (ESI, Anionendetektion, Fragmentierung von $[\text{M-H}]^-$ ( $m/z$ 317)). . . . .	85
2.31	Fragmentierungsschema (bis $\text{MS}^3$ ) der untersuchten 5-OH-Benzofuranone (ESI, Anionendetektion). . . . .	86
2.32	Vergleich der Massenspektren ( $\text{MS}^2$ ) von Quercetin (oben) und oxidiertem Kaempferol (unten) (Anionendetektion, Fragmentierung von $[\text{M-H}]^-$ ( $m/z$ 301)). . . . .	87
2.33	Veränderung der Induktionszeiten der Oxidation von Schweineschmalz durch Zusatz von Quercetin und oxidiertem Quercetin. . . . .	90

- 2.34 Trennung von Benzofuranonen, Flavonolen und Flavonen ( $c=4 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ,  $20 \mu\text{L}$  injiziert,  $80 \text{ ng}$  absolut); Gradientenelution auf Purospher-Säule; Photodiodenarray-Detektion, Monitoring bei 293, 350, 370 nm. . . . . 95
- 2.35 Trennung von Benzofuranonen, Flavonolen und Flavonen ( $c=2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $20 \mu\text{L}$  injiziert,  $40 \text{ ng}$  absolut); Gradientenelution auf Purospher-Säule; elektrochemische Detektion bei 1000 mV (vs. Ag/AgCl). . . . . 99
- 2.36 Trennung von Benzofuranonen, Flavonolen und Flavonen ( $c=1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ,  $5 \mu\text{L}$  injiziert,  $5 \text{ ng}$  absolut); Gradientenelution auf 2 mm-Discovery-Säule; UV-Detektion bei 293, 350, 370 nm gleichzeitig ( $200 \text{ mV} = 0,020 \text{ AUFS}$ ). . . . 102
- 2.37 Trennung der Benzofuranone ( $c=10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ,  $10 \mu\text{L}$  injiziert,  $100 \text{ ng}$  absolut); Gradientenelution auf 2 mm-Discovery-Säule; ESI-ion trap/MS<sup>2</sup>-Detektion mit Zeitfenstern und charakteristischen Spuren für  $m/z$  317 (Peaks 1 und 4) und  $m/z$  301 (Peaks 2 und 3). . . . . 105
- 2.38 Zwiebelextrakt nach Säurehydrolyse; Gradientenelution auf Purospher-Säule; Photodiodenarray-Detektion, Monitoring bei 293, 350, 370 nm (q: Quercetin, ?: oxidiertes Quercetin nicht nachweisbar). . . . . 110
- 2.39 Festphasenextraktion: Abreicherung von Matrixbestandteilen ( $\rightarrow$ ) (im oberen Chromatogramm Peakhöhe des Matrixbestandteils etwa 900 mAbs); Referenzsubstanzen ( $c=4 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) mit Zwiebelextrakt aus Heißextraktion verdünnt, vor (oben) und nach (unten) SPE, ohne Aufkonzentrierung (Nummern wie Abb. 2.34, S. 95). . . . . 112
- 2.40 Festphasenextraktion: Wiederfindungsraten (WFR) für zehn Flavonole, Flavone und Benzofuranone ( $4 \mu\text{g}/\text{mL}$  ohne Aufkonzentrierung,  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  mit Aufkonzentrierung 5:2); Schwankungen der jeweiligen Doppelbestimmungen im Bereich zwischen 0,5 und 7,0 % (Einzelwerte in experimentellen Teil). . 113
- 2.41 Zwiebelextrakt nach Säurehydrolyse, ohne Lagerung, Festphasenextraktion ohne (oben) und mit (unten) Zusatz von Ascorbinsäure zum THF, Anreicherung 5:2; Gradientenelution auf Purospher-Säule; Photodiodenarray-Detektion, Monitoring bei 293, 350, 370 nm (q: Quercetin, q-ox.: oxidiertes Quercetin, ?: oxidiertes Quercetin nicht nachweisbar). . . . . 115
- 2.42 Festphasenextraktion: Wiederfindungsraten (WFR) für neun Flavonole, Flavone und Benzofuranone ( $2 \mu\text{g}/\text{mL}$  vor der SPE, Aufkonzentrierung 5:1), Fehlerbalken kennzeichnen die relative Standardabweichung ( $n=6$ ). . . . . 116

2.43	Zwiebelextrakt nach Säurehydrolyse, ohne Lagerung, ohne Festphasenextraktion; Gradientenelution auf 2 mm-Discovery-Säule; UV-Detektion bei 293, 350, 370 nm gleichzeitig (q: Quercetin, ?: Retentionszeit des oxidierten Quercetin). . . . .	118
2.44	Referenzsubstanzen (c=5 µg/mL) mit Zwiebelextrakt aus Heißextraktion verdünnt, ohne Lagerung, ohne Festphasenextraktion; Gradientenelution auf Purospher-Säule; elektrochemische Detektion bei 0,60 V (vs. Ag/AgCl) (Nummern wie Abb. 2.34, S. 95). . . . .	119
2.45	Zwiebelextrakt nach Säurehydrolyse, mit Morin versetzt, Festphasenextraktion ohne Antioxidans an HR-P-Kartusche, 10:1 aufkonzentriert; Gradientenelution auf Purospher-Säule; Photodiodenarray-Detektion, Monitoring bei 293, 350, 370 nm (q-ox.: oxidiertes Quercetin, k-ox.: oxidiertes Kaempferol, m-ox.: oxidiertes Morin, m: Morin, q: Quercetin, k: Kaempferol, X: unbekannte Verbindungen). . . . .	121
2.46	Zwiebelextrakt nach Säurehydrolyse, mit Morin versetzt, Festphasenextraktion ohne Antioxidans an HR-P-Kartusche, 10:1 aufkonzentriert; Gradientenelution auf 2 mm-Discovery-Säule, ESI-ion trap/MS <sup>2</sup> -Detektion mit Zeitfenstern und charakteristischen Spuren für m/z 317 (Peaks 1 und 3) und m/z 301 (Peak 2) (q-ox.: oxidiertes Quercetin, k-ox.: oxidiertes Kaempferol, m-ox.: oxidiertes Morin) (Peaks 1 und 2 zehnfach vergrößert). . . . .	122
2.47	Zwiebelextrakt nach Kaltextraktion mit Wasser, anschließend mit Morin versetzt, ohne Lagerung, Festphasenextraktion ohne Antioxidans an HR-P-Kartusche, 10:1 aufkonzentriert; Gradientenelution auf Purospher-Säule; Photodiodenarray-Detektion, Monitoring bei 293, 350, 370 nm (m-ox.: oxidiertes Morin, m: Morin, q: Quercetin, X: unbekannte Verbindungen). . . . .	124
3.1	Schematischer Aufbau des HPLC-AAS-Systems. . . . .	135
3.2	HPLC-DAD: Kalibriergeraden für die untersuchten Benzofuranone. . . . .	148
3.3	HPLC-DAD: Kalibriergeraden für die untersuchten Flavonole und Flavone. . . . .	149
3.4	Trennung von Benzofuranonen, Flavonolen und Flavonen (c=0,5 ng/µL, 20 µL injiziert, 10 ng absolut); Gradientenelution auf Purospher-Säule; Photodiodenarray-Detektion, Monitoring bei 293, 350, 370 nm. . . . .	152
3.5	Hydrodynamische Voltogramme der untersuchten Benzofuranone. . . . .	158

3.6	HPLC-ECD: Kalibriergeraden für die drei untersuchten Benzofuranone (oxidiertes Myricetin nicht injiziert, da Konzentration nicht bekannt; oxidiertes Kaempferol nicht erfaßt). . . . .	159
3.7	HPLC-ECD: Kalibriergeraden für die untersuchten Flavonole und Flavone.	161
3.8	HPLC-DAD: Matrixabhängige Kalibriergeraden für die untersuchten Benzofuranone. . . . .	168
3.9	HPLC-DAD: Matrixabhängige Kalibriergeraden für die untersuchten Flavonole und Flavone. . . . .	169
3.10	Trennung von Benzofuranonen, Flavonolen und Flavonen, verdünnt mit Zwiebelextrakt aus Heißextraktion ( $c=0,5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ , $20 \mu\text{L}$ injiziert, $10 \text{ ng}$ absolut); Gradientenelution auf Purospher-Säule; Photodiodenarray-Detektion, Monitoring bei 293, 350, 370 nm. . . . .	171

# Tabellenverzeichnis

1.1	Systematische Namen der in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen entsprechend Chemical Abstracts [35] . . . . .	17
1.2	Mögliche koordinative Bindungsstellen (Abb. 1.4) in den untersuchten Phenolen (Abb. 1.2) . . . . .	21
1.3	In der Literatur beschriebene Produkte für die Oxidation von Flavonolen. (*: keine spektroskopischen Daten angegeben; **: Vorschläge ohne spektroskopische Absicherung) . . . . .	25
2.1	$^{13}\text{C}$ -NMR: chemische Verschiebungen und Multiplizitäten der C-Atome der oxidierten Flavonole in $\text{CD}_3\text{CN}$ (s: Singulett, d: Dublett) . . . . .	64
2.2	$^{13}\text{C}$ -NMR: Differenzen der chemischen Verschiebungen zwischen oxidierten Flavonolen (Fl. ox.) und Flavonolen (Fl.) . . . . .	64
2.3	$^1\text{H}$ -NMR: chemische Verschiebungen und Multiplizitäten der aromatischen Protonen der oxidierten Flavonole (s: Singulett, d: Dublett, dd:Doppel-Dublett, m: Multiplett) . . . . .	65
2.4	$^{13}\text{C}$ -NMR: chemische Verschiebungen der C-Atome von mit $\text{Cu}^{2+}$ oder $\text{Fe}^{3+}$ oxidiertem Quercetin, Vergleich mit Literaturdaten . . . . .	68
2.5	HH-COSY des oxidierten Quercetin: chemische Verschiebungen und Multiplizitäten der aromatischen Protonen (s: Singulett, d: Dublett, dd:Doppel-Dublett) . . . . .	71
2.6	HMBC-NMR des oxidierten Quercetin: Zuordnung der chemischen Verschiebungen und Kopplungen . . . . .	75
2.7	Fragmente in den EI-Massenspektren der Flavonole und Benzofuranone (ox. = oxidiert): bei den Benzofuranonen zusätzlich auftretende Massen sind <i>hervorgehoben</i> . 80	

2.8	Halbstufenpotentiale $E_{\frac{1}{2}}$ der untersuchten Flavonole, Flavone und Benzofuranone; ermittelt mit hydrodynamischer Voltammetrie (ox. Myricetin nicht eindeutig charakterisiert), (1: Flavonole, 2: <i>o</i> -Dihydroxyphenole, 3: Monohydroxyphenole) . . . . .	98
2.9	ESI-ion trap/MS: Ausgewählte Massen und Zeitfenster für die selektive Detektion von Benzofuranonen nach HPLC-Trennung . . . . .	104
3.2	Anregungs- und Emissionsmaxima der $Al^{3+}$ -Komplexe der untersuchten Polyphenole (molares Verhältnis $\sim 1:1$ ; “-“: keine Fluoreszenz) . . . . .	132
3.3	Photometrische Gehaltsbestimmung der Lösungen der Benzofuranone: Kalibrierfunktionen, Meßwerte (Extinktion $E$ bei 293 bzw. 286 nm) und Berechnung ( $c_{Messloesung} = (E - b)/a$ , $c_{Stammloesung} = c_{Messloesung} \times 50$ ) (oxidiertes Myricetin nicht eindeutig charakterisiert) . . . . .	140
3.4	Überprüfung des Ionentauschers: Kalibrierung für die Bestimmung von Kupfer mittels Flammen-AAS ( $A$ : Absorption, $a$ : Steigung [ $mL/\mu g$ ], $c$ : Konzentration von $Cu^{2+}$ [ $\mu g/mL$ ], $b$ : Achsenabschnitt) . . . . .	142
3.5	Einwaagen der Polyphenole für die Messung der antioxidativen Wirksamkeit am Ranzimaten . . . . .	145
3.6	Formeln der Kalibriergeraden der Benzofuranone, Flavonole und Flavone; Gradientenelution auf Purospher-Säule; Photodiodenarray-Detektion, Monitoring bei 293, 350, 370 nm ( $A$ : Peakfläche [ $mV \times min$ ], $a$ : Steigung [ $\frac{mL \times mV \times min}{\mu g}$ ], $c$ : Konzentration des Analyten [ $\mu g/mL$ ], $b$ : Achsenabschnitt [ $mV \times min$ ]) . . . . .	149
3.7	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Benzofuranone, Flavonole und Flavone; Gradientenelution auf Purospher-Säule; Photodiodenarray-Detektion, Monitoring bei 293, 350, 370 nm (NWG: Nachweisgrenze, BG: Bestimmungsgrenze; berechnet aus den Kalibriergeraden nach DIN 32645 [97] . . . . .	150
3.8	HPLC-DAD: Rohdaten (Peakflächen) und Berechnung der Kalibrierfunktionen und der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Benzofuranone, Flavonole und Flavone . . . . .	151
3.9	Retentionszeiten (RT) und UV/Vis-Spektren in den Peaks der Benzofuranone; Gradientenelution auf Purospher-Säule . . . . .	154
3.10	Retentionszeiten (RT) und UV/Vis-Spektren in den Peaks der Flavonole und Flavone; Gradientenelution auf Purospher-Säule . . . . .	155



3.11	Formeln der Kalibriergeraden der Benzofuranone, Flavonole und Flavone; Gradientenelution auf Purospher-Säule; elektrochemische Detektion, 1100 mV ( $A$ : Peakfläche [mV×min], $a$ : Steigung [ $\frac{mL \times mV \times min}{\mu g}$ ], $c$ : Konzentration des Analyten [ $\mu g/mL$ ], $b$ : Achsenabschnitt [mV×min] ) . . . . .	157
3.12	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Benzofuranone, Flavonole und Flavone; Gradientenelution auf Purospher-Säule; elektrochemische Detektion, 1100 mV (NWG: Nachweisgrenze, BG: Bestimmungsgrenze; berechnet aus den Kalibriergeraden nach DIN 32645 [97] . . . . .	159
3.13	HPLC-ECD: Rohdaten (Peakflächen) und Berechnung der Kalibrierfunktionen und der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Benzofuranone, Flavonole und Flavone . . . . .	160
3.14	Festphasenextraktion: Wiederfindungsraten (WFR) für zehn Flavonole, Flavone und Benzofuranone (n=2) (1.: 4 $\mu g/mL$ ohne Zwiebelextrakt; 2.: 4 $\mu g/mL$ mit Zwiebelextrakt; 3.: 1 $\mu g/mL$ ohne Zwiebelextrakt, Aufkonzentrierung 5:2; 4.: 1 $\mu g/mL$ mit Zwiebelextrakt, Aufkonzentrierung 5:2); Schwankungen zwischen den Einzelwerten der Doppelbestimmungen zwischen 0,5 und 7,0 %. . . . .	166
3.15	Festphasenextraktion mit Zusatz von Ascorbinsäure: Wiederfindungsraten (WFR) für neun Flavonole, Flavone und Benzofuranone, 2 $\mu g/mL$ mit Aufkonzentrierung 5:1 . . . . .	167
3.16	Formeln der matrixabhängigen Kalibriergeraden der Benzofuranone, Flavonole und Flavone; Gradientenelution auf Purospher-Säule; Photodiodenarray-Detektion, Monitoring bei 293, 350, 370 nm ( $A$ : Peakfläche [mV×min], $a$ : Steigung [ $\frac{mL \times mV \times min}{\mu g}$ ], $c$ : Konzentration des Analyten [ $\mu g/mL$ ], $b$ : Achsenabschnitt [mV×min]) . . . . .	168
3.17	Matrixabhängige Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Benzofuranone, Flavonole und Flavone; Gradientenelution auf Purospher-Säule; Photodiodenarray-Detektion, Monitoring bei 293, 350, 370 nm (NWG: Nachweisgrenze, BG: Bestimmungsgrenze; berechnet aus den Kalibriergeraden nach DIN 32645 [97]	169
3.18	Matrixabhängige Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Benzofuranone, Flavonole und Flavone; Rohdaten und Berechnung . . . . .	170



# Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
Abb.	Abbildung
amu	atomic mass units; Atomgewichtseinheiten [u]
AUFS	Absorption Units Full Scale; Vollausschlag des Detektors
c	Konzentration
CI	Chemische Ionisation
$\delta$	Chemische Verschiebung
DAD	(Photo)-Diodenarray-Detektor, -Detektion
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECD	Elektrochemischer Detektor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EI	Elektronenstoß Ionisation
ESI	Electrospray Ionisation
HHPN	Hydraulic High Pressure Nebulisation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography; Hochleistungsflüssigchromatographie
ICP	Inductively Coupled Plasma; Induktiv Gekoppeltes Plasma
I. D.	Innerer Durchmesser
$\lambda$	Wellenlänge
MS	Massenspektroskopie, Massenspektrometer
$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )
NCI	Negative Chemische Ionisation
NMR	Nuclear Magnetic Resonance; Kernmagnetische Resonanz (Spektroskopie)
n	nano ( $10^{-9}$ )
PBI	Particle Beam Interface
PEEK	Polyether-Etherketon
ppm	parts per million
RP	Reversed Phase; Umkehrphasen (Chromatographie)
RT	Retention Time; Retentionszeit
S.	Seite
s.	siehe
STAT	Slotted Tube Atomic Trap; Quarzrohr zur Atomanreicherung bei der Flammen-AAS
UV	Ultraviolett
Vis	Visible; Sichtbar
Tab.	Tabelle
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan



# Herstellerverzeichnis

Acros Organics	Geel, Belgien
Avocado Research Chemicals	Heysham, Großbritannien
Bayer	Leverkusen, Deutschland
Bruker	Reinstetten, Deutschland
Fluka	Deisenhofen, Deutschland
Knauer	Berlin, Deutschland
Kontron	Neufahrn, Deutschland
L.O.T. Oriol	Darmstadt, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
Merck Recipe	München, Deutschland
Metrohm	Herisau, Schweiz
Finnigan MAT	Bremen, Deutschland
Perkin Elmer	Überlingen, Deutschland
Riedel de Haen	Seelze, Deutschland
Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Shimadzu	Duisburg, Deutschland
Siemens	Ditzingen, Deutschland
Sigma-Aldrich	Deisenhofen, Deutschland
Supelco	Deisenhofen, Deutschland
Unicam	Kassel, Deutschland
Waters	Eschborn, Deutschland



# Danksagung

Diese Arbeit wurde an der Zentrumsabteilung für Chemische Analytik und Endokrinologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover unter der Anleitung von Prof. Dr. W. Ternes angefertigt.

---

Ich danke allen, die mich auf meinem bisherigen Lebensweg begleitet und diese Arbeit mit ermöglicht haben. Mein besonderer Dank gilt dabei

PROF. DR. W. TERNES für die anspruchsvolle Aufgabenstellung, die Ermöglichung dieser Arbeit und sein stetes Interesse an ihrem Fortgang

PROF. DR. H. C. KREBS, DR. GERD HAMSCHER UND DR. HOFER für ihre Hilfestellung bei der Messung und Interpretation der NMR- und Ion trap/MS-Spektren

HANNELORE TEGTMEYER, DONG QUANG PHAM UND HUBERT HAARSTRICH für das angenehme Arbeitsumfeld

JANNE HOTOPP UND KAREN SCHOLZ für die stets fröhliche Unterstützung im Labor

ANNEGRET BÜTHE für ihre wertvolle Unterstützung in Sachen MS und ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft, weit über fachliche Belange hinaus

DR. JÖRN KRÜGER, DR. IRINA RÜHLING, DR. SABINE RZEPKA UND SABINE STROMPEN für die außergewöhnlich gute fachliche Zusammenarbeit

DR. ASTRID MARLENE DROTTLEFF UND DR. EDBURGA LUCIA KRAUSE für die vielen Anregungen und die dauerhafte freundschaftliche Verbundenheit

DR. FRANK HOYER für die Erweiterung meines Horizonts in allerlei Hinsicht

SILKE MARIA KÖNIGSEDER und DR. JÜRGEN WITTE, meinen langjährigen Kommundnen/innen, für die exzellente private Infrastruktur

FRANZISKA JUNGBLUTH für alles, das sie mir ermöglicht hat

HANKA SCHMIDT für ihre Liebe und viele schöne Stunden





# Lebenslauf

Geburtstag, -ort	02. Juli 1968, Bernkastel-Kues
08.1974 - 07.1978	Grundschule Bernkastel-Kues
08.1978 - 06.1987	Nikolaus von Kues-Gymnasium Bernkastel-Kues
22.06.1987	Abitur
10.1987 - 12.1988	Grundwehrdienst Fernmeldebataillon 940, Daun
10.1988 - 05.1993	Studium der Lebensmittelchemie, Bergische Universität Gesamthochschule Wuppertal
15.04.1991	Zwischenprüfung für Lebensmittelchemiker
18.05.1993	Erstes Staatsexamen Lebensmittelchemie
06.1993 - 05.1994	Praktikum für Lebensmittelchemiker, Chemisches Untersuchungsinstitut der Städte Wuppertal und Solingen
14.07.1994	Zweites Staatsexamen Lebensmittelchemie
08.1994 - 04.1995	arbeitslos
04.1995 - 02.1999	Wissenschaftliche Hilfskraft, Zentrumsabteilung für Chemische Analytik und Endokrinologie, Tierärztliche Hochschule Hannover
04.1995 - 11.1999	Anfertigung der Dissertation, Zentrumsabteilung für Chemische Analytik und Endokrinologie, Tierärztliche Hochschule Hannover
seit 01.2000	Entwicklung und Projektmanagement Online Gewinnspiele selbständige Tätigkeit, Köln