



Technische  
Universität  
Braunschweig



# Polyphenole in schwarzem Tee (*Camellia sinensis*)

—

## Modelloxidationen, Lagerversuche und Fraktionierung von Thearubigenen

Ulf Wilhelm Stodt



Cuvillier Verlag Göttingen  
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag



Polyphenole in schwarzem Tee (*Camellia sinensis*) — Modelloxidationen,  
Lagerversuche und Fraktionierung von Thearubigenen





Polyphenole in schwarzem Tee (*Camellia sinensis*)

—

Modelloxidationen, Lagerversuche und Fraktionierung von Thearubigenen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Ulf Wilhelm Stodt

aus Bonn





## **Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek**

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen: Cuvillier, 2016

Zugl.: (TU) Braunschweig, Univ., Diss., 2015

1. Referent:	apl. Professor Dr. Ulrich Engelhardt
2. Referent:	Professor Dr. Peter Winterhalter
eingereicht am:	14.10.2015
mündliche Prüfung (Disputation) am:	04.12.2015

Druckjahr 2016

Dissertation an der Technischen Universität Braunschweig,  
Fakultät für Lebenswissenschaften

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2016

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

[www.cuvillier.de](http://www.cuvillier.de)

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2016

Gedruckt auf umweltfreundlichem, säurefreiem Papier aus nachhaltiger Forstwirtschaft.

ISBN 978-3-7369-9196-5

eISBN 978-3-7369-8196-6



## VORVERÖFFENTLICHUNGEN DER DISSERTATION

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### Publikationen

Stodt, U. W., Stark, J. & Engelhardt, U. H. Comparison of three strategies for the isolation of black tea thearubigins with a focus on countercurrent chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis* 43: 160–168 (2015). DOI: 10.1016/j.jfca.2015.07.002

Stodt, U. W., Werian, A. & Engelhardt, U. H. Schwarzteeherstellung: Oxidationsreaktionen – Ansätze zur Durchführung von Modelloxidationen mit tee eigenen und -fremden Enzymen sowie Beobachtung eines Matrixeffektes. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 111: 6–12 (2015).

Stodt, U. W., Blauth, N., Niemann, S., Stark, J., Pawar, V., Jayaraman, S., Koek, J. & Engelhardt, U. H. Investigation of Processes in Black Tea Manufacture through Model Fermentation (Oxidation) Experiments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62: 7854–7861 (2014). DOI: 10.1021/jf501591j

Stodt, U. & Engelhardt, U. H. Progress in the analysis of selected tea constituents over the past 20 years. *Food Research International* 53: 636–648 (2013). DOI: 10.1016/j.foodres.2012.12.052

### Tagungsbeiträge

Stodt, U. W., Werian, A. & Engelhardt, U. H.: Untersuchung eines Matrixeffektes von Teeblättern (*Camellia sinensis*) auf Fermentationsvorgänge. (Poster) 43. Deutscher Lebensmittelchemikertag Gießen, Gesellschaft Deutscher Chemiker, Frankfurt am Main (ISBN 978-3-936028-87-4) Kurzreferate, p. 228 (ATW 076) (2014).

Stodt, U. W., Niemann, S. & Engelhardt, U. H.: Stability of Black Tea Thearubigins under various Conditions. (Poster) 5. Braunschweiger Jungchemikertagung, JungChemikerForum der Gesellschaft Deutscher Chemiker, Braunschweig, p. 58 (2014).

Stodt, U. W., Blauth, N., Niemann, S. & Engelhardt, U. H.: Entwicklung eines Systems zur Durchführung von Modellfermentationen mit *Camellia sinensis* (Tee). (Poster) 42. Deutscher Lebensmittelchemikertag Braunschweig, Gesellschaft Deutscher Chemiker, Frankfurt am Main (ISBN 978-3-936028-80-5) Kurzreferate, p. 238 (ATW 068) (2013).



Stodt, U. W., Stark, J. & Engelhardt, U. H.: Insights into Black Tea Chemistry through Model Fermentations. (Poster) 6<sup>th</sup> World Congress on Polyphenols Applications Paris, Frankreich, International Society of Antioxidants in Nutrition and Health (ISBN 978-2-35609-062-1) p. 87 (2012).

Stodt, U. W. & Engelhardt U. H.: Applications of High-Speed Countercurrent Chromatography in Thearubigin Research. (Vortrag) Symposium on Analysis and Chemistry of Tea and Coffee, Jacobs University Bremen (2011).



## DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ulrich H. Engelhardt sehr herzlich für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis und das entgegengebrachte Vertrauen. Durch die vielen Freiheiten, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die stete Ansprechbarkeit hat mir das Arbeiten großen Spaß gemacht. Zudem bin ich sehr dankbar dafür, die Möglichkeit erhalten zu haben, durch Reisen nach Frankreich und Indien meinen Horizont auch über fachliche Themen hinaus zu erweitern.

Herrn Prof. Dr. Peter Winterhalter danke ich für die freundliche Unterstützung bereits während des Studiums und die Mitwirkung als Referent in der Prüfungskommission. Für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission danke ich Herrn Prof. Dr. Robert Kreuzig.

Der Firma Unilever danke ich für die Finanzierung und Begleitung des Projektes, insbesondere Dr. Sujatha Jayaraman sowie Dr. Jan Koek für die hilfreiche Unterstützung meiner Arbeit. Darüber hinaus danke ich Deepak Mhasavade, Vikas Pawar, Raghav Reddy und Prof. Dr. Nikolai Kuhnert.

Ein herzlicher Dank gebührt Janina Stark, Nadine Blauth, Steffi Niemann und Anne Weirian für die gute Zusammenarbeit und die wertvollen Beiträge, die sie im Rahmen ihrer Diplomarbeiten geleistet haben.

André H. Janßen danke ich für den tadellosen Korrekturleseservice. Ebenso bin ich Frau Carola Balcke für die Durchsicht des Quellenverzeichnisses und das Korrekturlesen meiner Veröffentlichungen sehr dankbar.

Der erfolgreiche Abschluss dieser Arbeit wäre außerdem nicht vorstellbar gewesen ohne die kollegiale Atmosphäre im Institut, die lebenserhaltende Versorgung mit Kuchen und manch anderen Leckereien, die netten Gespräche und außeruniversitären Aktivitäten sowie die entstandenen Freundschaften.

- Besonders hervorheben möchte ich meine Mitstreiter im Teelabor: Beate Maiwald, Christian Laue, Nils Kaiser, Rouba Horanni, David Birkholz, Claudia Thräne, Janina Stark, Claas Isemer, Brigitta Balling und Patricia Staps.
- Dank gebührt außerdem folgenden (z. T. ehemaligen) Institutsmitgliedern und -gästen: Gerold Jerz, Marita Baum, Fabian Weber, Christian Bork (ohne Deine täglichen überlangen E-Mails wäre ich allerdings mindestens ein Jahr früher fertig geworden), Sebastian Tolle, Kristin Voiges, Marcela Castro Benitez (u. a. für die hervorragende Reiseorganisa-



tion in Kolumbien), Miriam Rodriguez-Werner, Recep Gök, Annika Burmeister (für die Einblicke in die finnische Trinkkultur), Marko Rother (unseren Fußball-Erfolgstrainer), Daniela Cichosch, Julia Cuers, Stefanie Kuhnert, Bettina Klose, Mariana Neves-Vieira, Michaela Schafberg, Hauke Zinow, Eva Schmalfuß, Margret Brüggemann, Anne-Katrin Tschira, Philipp Ewald, Emmanuel Letsyo, Matthias Bol, Franziska Steingaß/ss, Josi Ostberg, Shipra Nagar, Qimeng Zhang, Heyuan Jiang, Junfeng Tan, Payam Hashemi und Felipe Jimenez Aspée.

Ein ganz besonders herzliches Dankeschön möchte ich meiner Familie, v.a. meinen Eltern, für die vielseitige Unterstützung aussprechen, die Ihr mir zu jeder Zeit entgegengebracht habt. Kleine Schwester, kleiner Bruder: Besten Dank für die vielen heiteren Stunden, mit denen Ihr mein Leben sehr bereichert habt!

Johanna, Dir kann ich gar nicht genug danken. Für Deine Hilfe, die Unterstützung und das Verständnis. Ich bin glücklich, dass Du stets an meiner Seite warst!

Es war eine tolle Zeit, auf die ich immer gerne zurückblicken werde. Vielen Dank dafür!





# INHALT

ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE .....	XIII
1 EINLEITUNG UND GRUNDLAGEN .....	- 1 -
1.1 TEE .....	- 1 -
1.1.1 Begriffsbestimmung und botanische Einordnung .....	- 1 -
1.1.2 Historie.....	- 3 -
1.1.3 Teekulturen.....	- 5 -
1.1.4 Wirtschaftsfaktor .....	- 6 -
1.1.5 Physiologische Wirkungen .....	- 7 -
1.2 VERARBEITUNG VON TEE .....	- 9 -
1.2.1 Grüner Tee .....	- 9 -
1.2.2 Schwarzer Tee.....	- 9 -
1.2.3 Weitere Teearten.....	- 13 -
1.2.4 Sortenvielfalt.....	- 14 -
1.3 INHALTSSTOFFE DES TEES.....	- 17 -
1.3.1 Nicht-polyphenolische Inhaltsstoffe .....	- 17 -
1.3.2 Polyphenole .....	- 19 -
1.3.2.1 <i>Definition und Klassifizierung</i> .....	- 19 -
1.3.2.2 <i>Flavonole, Flavone, Isoflavone, Flavanone und Anthocyanidine</i> .....	- 21 -
1.3.2.3 <i>Flavonole</i> .....	- 21 -
1.3.2.4 <i>Bildung von Schwarztee-Polyphenolen mittels enzymatisch katalysierter Oxidation</i> .....	- 23 -
1.3.2.5 <i>Thearubigene</i> .....	- 29 -
1.3.2.6 <i>Sonstige Oxidationsprodukte</i> .....	- 34 -
1.4 GEGENSTROMVERTEILUNGSCROMATOGRAPHIE .....	- 35 -
1.4.1 Prinzip und Grundlagen .....	- 35 -
1.4.2 Fließmittelsysteme.....	- 35 -
1.4.3 Die stationäre Phase .....	- 37 -
1.4.4 Hydrostatisches und hydrodynamisches Prinzip .....	- 37 -
1.4.5 Vor- und Nachteile.....	- 38 -
1.4.6 High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC).....	- 39 -



1.4.7	High-Performance Countercurrent Chromatography (HPCCC) .....	- 41 -
1.4.8	Spiral-Coil Low-Speed Rotary Countercurrent Chromatography (SCCCC) .....	- 42 -
2	ZIELSETZUNG .....	- 45 -
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....	- 47 -
3.1	MODELLOXIDATIONEN .....	- 47 -
3.1.1	Isolierung von Catechinen .....	- 47 -
3.1.1.1	Isolierung mittels CCC .....	- 47 -
3.1.1.2	Weitere Aufreinigung .....	- 50 -
3.1.2	Modellfermentationen mit endogenen Enzymen .....	- 53 -
3.1.2.1	Ausgangslage .....	- 53 -
3.1.2.2	Bestimmung des Restphenolgehaltes im Teeblattmaterial .....	- 53 -
3.1.2.3	Bestimmung der Enzymaktivität im Teeblattmaterial .....	- 55 -
3.1.2.4	Das Modelloxidationssystem .....	- 56 -
3.1.2.5	Allgemeine Beobachtungen .....	- 60 -
3.1.2.6	Abbau von Flavanolen mit PPO und POD .....	- 64 -
3.1.2.7	Reaktionsprodukte mit PPO und POD .....	- 65 -
3.1.2.8	Einfluss von PPO und POD .....	- 76 -
3.1.2.9	Auswertung mittels HPLC-DAD-ESI-MS <sup>n</sup> .....	- 82 -
3.1.2.10	Übersicht über die identifizierten Verbindungen und allgemeine Beobachtungen .....	- 99 -
3.1.3	Modellfermentationen mit Meerrettich-POD und extrahierter Blattmatrix .....	- 102 -
3.1.3.1	Oxidationen mit HR-POD .....	- 102 -
3.1.3.2	Zusatz einer Teeblattmatrix .....	- 104 -
3.1.4	Oxidationen ohne Enzyme .....	- 118 -
3.2	FRAKTIONIERUNG UND ISOLIERUNG VON THEARUBIGENEN .....	- 124 -
3.2.1	Vergleich verschiedener Methoden .....	- 124 -
3.2.1.1	Roberts'-Fraktionierung .....	- 124 -
3.2.1.2	Coffein-Fällung .....	- 124 -
3.2.1.3	Isolierung mittels XAD-7 und HSCCC .....	- 127 -
3.2.1.4	Vergleichsparameter .....	- 127 -
3.2.1.5	Vergleich .....	- 130 -
3.2.2	Weiterentwicklung der CCC-Methode .....	- 134 -



3.2.2.1	<i>Spiral-Coil CCC</i> .....	- 134 -
3.2.2.2	<i>Weiterentwicklung der HSCCC-Methode</i> .....	- 136 -
3.2.2.3	<i>Zusätzliche Trennung mittels HPCCC</i> .....	- 138 -
3.2.2.4	<i>Farbintensität</i> .....	- 143 -
3.2.3	Zusammenfassung Thearubigen-Isolierung .....	- 144 -
3.3	LAGERVERSUCHE .....	- 146 -
3.3.1	Einfluss der Temperatur .....	- 150 -
3.3.2	Einfluss des pH-Wertes .....	- 152 -
3.3.3	Einfluss von Additiven (Ascorbinsäure, Ethylparaben, Helium) .....	- 154 -
3.3.4	Weitere Beobachtungen .....	- 156 -
4	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....	- 159 -
5	MATERIAL UND METHODEN .....	- 163 -
5.1	TEEMATERIAL .....	- 163 -
5.2	CHEMIKALIEN UND LÖSUNGSMITTEL .....	- 164 -
5.3	GERÄTE UND PARAMETER .....	- 166 -
5.3.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie .....	- 166 -
5.3.1.1	<i>HPLC-DAD</i> .....	- 166 -
5.3.1.2	<i>Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (UHPLC-DAD)</i> .....	- 169 -
5.3.1.3	<i>Präparative HPLC (PräpHPLC-DAD)</i> .....	- 170 -
5.3.1.4	<i>Massenspektrometrie (HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup>)</i> .....	- 170 -
5.3.2	Gegenstromverteilungschromatographie .....	- 172 -
5.3.2.1	<i>High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC)</i> .....	- 172 -
5.3.2.2	<i>Spiral-Coil Low Speed Rotary Countercurrent Chromatography (SCCCC)</i> .....	- 174 -
5.3.2.3	<i>High-Performance Countercurrent Chromatography (HPCCC)</i> .....	- 175 -
5.3.3	Säulenchromatographie .....	- 176 -
5.3.3.1	<i>Amberlite XAD-7</i> .....	- 176 -
5.3.3.2	<i>Sephadex LH-20</i> .....	- 176 -
5.3.4	Photometrie .....	- 177 -
5.3.5	Zentrifugation .....	- 177 -
5.3.6	Rotationsverdampfung .....	- 177 -
5.3.7	Temperierung .....	- 177 -



5.3.7.1	Modelloxidationen .....	- 177 -
5.3.7.2	Extraktion von Flavanolen.....	- 178 -
5.3.7.3	Lagerversuche .....	- 178 -
5.3.8	pH-Wert-Bestimmung .....	- 178 -
5.3.9	Langzeitextraktion .....	- 178 -
5.3.10	Magnetrührer .....	- 178 -
5.3.11	Vortexer .....	- 178 -
5.4	METHODEN .....	- 179 -
5.4.1	Allgemeine Methoden .....	- 179 -
5.4.1.1	Bestimmung von Catechinen und Gallussäure mittels HPLC-DAD .....	- 179 -
5.4.1.2	Bestimmung von Theaflavinen mittels HPLC-DAD .....	- 180 -
5.4.1.3	Bestimmung von Theaflavinen mittels UHPLC-DAD.....	- 181 -
5.4.1.4	Abschätzung des Thearubingehaltes mittels HPLC-DAD.....	- 181 -
5.4.1.5	Analyse von Schwarztee-Extrakten mittels HPLC-DAD an einer Diol-Phase.....	- 182 -
5.4.1.6	Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu .....	- 182 -
5.4.1.7	Bestimmung der Farbintensität .....	- 182 -
5.4.1.8	Herstellung von XAD-7-Extrakten .....	- 183 -
5.4.1.9	Ermittlung geeigneter Lösungsmittelsysteme für die CCC .....	- 183 -
5.4.2	Isolierung von Thearubigenen .....	- 184 -
5.4.2.1	Roberts'-Fraktionierung .....	- 184 -
5.4.2.2	Coffein-Fällung.....	- 185 -
5.4.2.3	Isolierung mittels XAD-7 und HSCCC .....	- 186 -
5.4.2.4	Erweiterte Methode mittels HSCCC und HPCCC.....	- 186 -
5.4.3	Isolierung von Catechinen .....	- 187 -
5.4.3.1	Isolierung und Anreicherung von Catechinen mittels HSCCC .....	- 187 -
5.4.3.2	Aufreinigung von EGC an Sephadex LH-20.....	- 187 -
5.4.4	Modelloxidationen mit PPO und POD aus <i>C. sinensis</i> .....	- 188 -
5.4.4.1	Herstellung des polyphenolfreien Teeblattmaterials .....	- 188 -
5.4.4.2	Bestimmung des Restpolyphenolgehaltes .....	- 188 -
5.4.4.3	Bestimmung der Enzymaktivität im Teeblattmaterial .....	- 189 -
5.4.4.4	Durchführung der Modelloxidationen.....	- 191 -



5.4.5	Modellfermentationen mit Meerrettich-Peroxidase.....	- 193 -
5.4.5.1	Herstellung der Blattmatrix.....	- 193 -
5.4.5.2	Bestimmung des Restpolyphenolgehaltes in der Blattmatrix .....	- 193 -
5.4.5.3	Bestimmung der Enzymaktivität der HR-POD .....	- 193 -
5.4.5.4	Durchführung der Modelloxidation mit HR-POD und/oder Blattmatrix.....	- 193 -
5.4.6	Modelloxidationen ohne Enzyme .....	- 194 -
5.4.7	Lagerversuche .....	- 195 -
6	LITERATUR.....	- 197 -
7	ANHANG.....	- 217 -
7.1	HSCCC-TRENNUNGEN ZUR ISOLIERUNG VON THEARUBIGENEN.....	- 217 -
7.1.1	Isolierung mit HSCCC_System 6 (EtOAc/ <i>n</i> -BuOH/H <sub>2</sub> O im Tail-to-Head-Modus) .....	- 217 -
7.1.2	Isolierung mit HSCCC_System 7 ( <i>n</i> -BuOH/H <sub>2</sub> O im Tail-to-Head-Modus).....	- 218 -
7.2	HSCCC-TRENNUNGEN ZUR ANREICHERUNG VON CATECHINEN .....	- 219 -
7.3	UV-SPEKTREN CHARAKTERISTISCHER TEEBESTANDTEILE .....	- 220 -
7.4	VERWENDETE CHARGEN DES TEEBLATTPULVERS MIT AKTIVEN ENZYMEN .....	- 222 -
7.5	BESTIMMUNG VON THEAFLAVINEN MITTELS UHPLC.....	- 222 -
7.6	VERSUCHSPARAMETER DER OXIDATIONEN MIT MEERRETTICH-PEROXIDASE .....	- 224 -
7.7	LAGERVERSUCHE .....	- 225 -







## ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

(+)-C	(+)-Catechin
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
Asc	L(+)-Ascorbinsäure
BFF	Benzofuran-Ring-Forming-Fragmentation
c	Konzentration
CCC	Countercurrent Chromatography (Gegenstromverteilungschromatographie)
CG	(+)-Catechingallat
DehydroTS	Dehydrotheasinensin
EC	(-)-Epicatechin
ECQ	(-)-Epicatechin- <i>o</i> -chinon
ECG	(-)-Epicatechin-3- <i>O</i> -gallat
EGC	(-)-Epigallocatechin
EGCG	(-)-Epigallocatechin-3- <i>O</i> -gallat
EP	Ethylparaben (4-Hydroxybenzoesäureethylester)
ESI	Elektronen-Spray-Ionisation
EtOAc	Essigsäureethylester
FCG	Flavon-Glycoside
FOG	Flavonol-Glycoside
GC	(+)-Gallocatechin
GCG	(+)-Gallocatechin-3- <i>O</i> -gallat
GS	Gallussäure
HPCCC	High-Performance Countercurrent Chromatography (Hochleistungs-Gegenstromverteilungschromatographie)
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography (Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie)
HRF	Heterocyclic-Ring-Fragmentation
HSCCC	High-Speed Countercurrent Chromatography (Hochgeschwindigkeits-Gegenstromverteilungschromatographie)
H-t-T	Head-to-Tail
i. D.	innerer Durchmesser
i. Tr.	in der Trockenmasse
<i>i</i> -BuOH	2-Methylpropan-1-ol ( <i>iso</i> -Butanol)
LC	Liquid Chromatography (Flüssigkeitschromatographie)
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
n	Anzahl der Messwerte
<i>n</i> -BuOH	Butan-1-ol ( <i>n</i> -Butanol)
NP	Normal phase (Normalphase)
<i>n</i> -PrOH	1-Propanol
R	Korrelationskoeffizient
RDA	Retro-Diels-Alder-Reaktion



RP	reversed phase (Umkehrphase)
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Rt	Retentionszeit
SCCC	Spiral-Coil Low-Speed Rotary Countercurrent Chromatography
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
Std	Stunde(n)
tBME	<i>tert</i> -Butylmethylether
Temp.	Temperatur
TF	Theaflavin
TF-3'-G	Theaflavin-3'- <i>O</i> -gallat
TF-3-G	Theaflavin-3- <i>O</i> -gallat
TF-DG	Theaflavin-3,3'- <i>O</i> -digallat
TFs	Theaflavine (Oberbegriff für die Substanzklasse)
TG	Theogallin
TRs	Thearubigene
TS	Theasinensin



**„Wenn wi keen Tee hebben, muten wi starben.“**

Friesisches Sprichwort





# 1 Einleitung und Grundlagen

## 1.1 Tee

### 1.1.1 Begriffsbestimmung und botanische Einordnung

Als Tee werden umgangssprachlich fast alle Getränke bezeichnet, welche durch einen heißen, wässrigen Aufguss getrockneter Pflanzenteile wie z. B. Kamillenblüten oder Pfefferminzblätter hergestellt werden. Tee im eigentlichen Sinne stammt „ausschließlich aus Blättern, Blattknospen und zarten Stielen des Teestrauches *Camellia sinensis* L. O. Kuntze aus der Familie der Teegewächse (Theaceen), die nach den üblichen Verfahren bearbeitet sind“.<sup>1</sup> Bei Aufgussgetränken aus anderen Pflanzen wie Kräutern und Früchten handelt es sich dagegen um „teeähnliche Erzeugnisse“.<sup>1</sup> In anderen Sprachen wird dieser Unterscheidung durch eigene Terminologien Rechnung getragen (z. B. Spanisch: té ↔ infusión). Der in europäischen Sprachen zumeist ähnliche Begriff für „Tee“ entstammt der südostchinesischen Dialektbezeichnung „te“ oder „tay“. In (Südost-)Asien, Indien, Russland, der Türkei sowie der arabischen Welt haben sich dagegen Abwandlungen des südchinesischen Ausdruckes „ch’a“ durchgesetzt.<sup>2</sup>



**Abb. 1–1** Links: Farblithographie eines Zweiges von *Camellia sinensis* var. *sinensis* mit charakteristischen Merkmalen, 1–blühender Zweig, 2–Blüte im Längsschnitt, 3–Fruchtknoten im Querschnitt, 4–Stempel mit Kelch, 5–Staubgefäß, 6–Samen, 7–reife Frucht (verändert nach KÖHLER, 1897).<sup>3</sup> Rechts oben: Fotografie einer Blüte (Braunschweig, 2014). Rechts unten: Fotografie einer Frucht (Kerala, Indien, 2013).

## Einleitung und Grundlagen

*C. sinensis* (**Abb. 1–1**) ist im asiatischen Bergland heimisch, die genaue Herkunft ist jedoch nicht bekannt. Es handelt sich um einen stark verzweigten Strauch, der in freier Natur bis auf Baumhöhe (6–15 m) heranwächst. Dieser ist immergrün, mit dunkelgrünen, ledrig-glänzenden und länglichen Blättern, welche einen gezackten Rand aufweisen. Aus den weißen, angenehm riechenden Blüten gehen nach Fremdbestäubung ungenießbare Früchte mit 1–3 Samen hervor. Die Vermehrung kann über Samen oder Stecklinge erfolgen. Allgemein wird zwischen zwei Varietäten unterschieden, der chinesischen Teepflanze *C. sinensis* var. *sinensis* und der indischen Teepflanze *C. sinensis* var. *assamica*. Die chinesische Varietät unterscheidet sich durch kleinere Blätter und eine niedrigere Wuchshöhe sowie eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Umwelteinflüssen wie Frost und Trockenheit von der indischstämmigen Pflanze.<sup>4-5</sup> In Kultur werden hauptsächlich Hybride der beiden Varietäten einge-



**Abb. 1–2** Blick auf eine Teeplantage (Kolukkumalai Tea Estate, Tamil Nadu, Indien, 2013).

setzt. Damit die nachwachsenden Sprosse bequem geerntet werden können, werden diese als etwa hüfthohe Sträucher gehalten. Anbau und Ernte erfolgen in (sub-)tropischen Klimazonen ganzjährig und oft in höheren Lagen bis ca. 2500 m (**Abb. 1–2**). In Regionen, in denen die Durchschnittstemperatur im Winter deutlich unter 20 °C fällt, wird der Tee nur in den wärmeren Monaten geerntet. Die Hauptanbaugebiete liegen in Asien (China, Indien, Sri Lanka, Indonesien, Taiwan, Vietnam und Japan) sowie in Afrika (Kenia, Malawi), weniger in Südamerika (Argentinien), das sich traditionell auf die Produktion von Kaffee konzentriert.<sup>5-6</sup>

Aufgrund der klimatischen Bedingungen und der hohen Lohnkosten ist ein rentabler Anbau von *C. sinensis* in Europa nur bedingt möglich. Zwei etablierte Anbaugebiete sind jedoch in



## Einleitung und Grundlagen

der europäischen Peripherie zu finden, zum einen in der Türkei und zum anderen auf den Portugal zugehörigen Azoren.<sup>7</sup> Seit einigen Jahren wird Tee auch in der englischen Grafschaft Cornwall sowie in den schottischen Highlands produziert und kommerziell vermarktet. Dies ist durch den Nordatlantikstrom, welcher ein für diese Breiten ungewöhnlich mildes Klima erzeugt, möglich.<sup>8-9</sup> Auf dem mitteleuropäischen Festland finden sich in der Schweiz nahe des Lago Maggiore sowie in der Toskana kleine Teegärten.<sup>10-11</sup> Ferner wurden im Jahr 2014 in Freiburg auf vier Feldern Keimlinge von *C. sinensis* gepflanzt. Das Saatgut wurde im Rahmen einer Städtepartnerschaft mit Qingdao aus China geliefert; die erste Ernte wird für 2016 erwartet.<sup>12-13</sup>

Nach dem Pflücken der Teeblätter folgt deren Verarbeitung, wobei verschiedene Teearten hergestellt werden können. So wird grundsätzlich zwischen unfermentierten (grünen), teilfermentierten (oolong) und fermentierten (schwarzen) Tees differenziert (auf die Unterschiede und Herstellungsverfahren dieser Teearten wird in Abschnitt 1.2 eingegangen).<sup>14</sup>

### 1.1.2 Historie

Die Entdeckung des Tees reicht bis weit in die chinesische Geschichte zurück. In einer der bildreichen Legenden, die von der Entdeckung des Tees berichten, wird das Jahr 2737 v. Chr. genannt.<sup>5</sup> Zudem wird eine Verwendung zur Zeit der Zhou-Dynastie (1066–221 v. Chr.) angenommen.<sup>2, 15</sup> Derartige Angaben sind jedoch nicht ausreichend belegt. Um das Jahr 350 n. Chr. erfolgte eine erste dokumentierte Erwähnung in einem chinesischen Wörterbuch.<sup>16</sup> Einen wichtigen Beitrag zur Verbreitung des Teekonsums und zur Entstehung einer ausgeprägten Teekultur in China leistete eine fachliche Abhandlung aus dem Jahre 780 n. Chr., in welcher der Teemeister LuYu umfassend über die damaligen Anbautechniken, Verarbeitungs- sowie Zubereitungsmethoden des Tees berichtet.<sup>15</sup> Im alten China entwickelte das koffeinhaltige Getränk eine außerordentlich große kulturelle Bedeutung, so dass sich auch die chinesischen Kaiser ausgiebig mit der Kunst der Teezubereitung befassten. Als Zeichen der Wertschätzung wurde z. B. LuYu posthum per kaiserlichem Erlass der Titel „Tee-gott“ zuteil.<sup>15</sup> Ausgehend von China verbreitete sich der Teekonsum in die ganze Welt, zunächst in benachbarte Länder, insbesondere nach Japan, per Karawane über die Seidenstraße nach Zentralasien und später über die Teestraße bis nach Russland.<sup>2</sup> In Mitteleuropa wurde Tee erst im frühen 17. Jahrhundert im Zuge der Ausweitung der Handelswege nach China und Japan bekannt. Zu dieser Zeit erfolgte der Transport des Tees auf dem Seeweg nach Europa und oblag den Niederländern sowie später auch den Briten.<sup>17</sup> Wohl auf Betreiben der Niederländischen Ostindien-Kompanie veröffentlichte der Arzt CORNELIUS DEKKER

## Einleitung und Grundlagen

1667 ein Traktat, das die positiven gesundheitlichen Aspekte des Tees (gleichwohl unbelegt und stark übertrieben) herausstellte und so den Teeabsatz in Europa erhöhen sollte.<sup>18</sup> Cornelius Dekker wurde außerdem als Leibarzt an den Hof des Kurfürsten von Brandenburg berufen und führte auch dort das Teetrinken ein.<sup>18</sup> Der Teekonsum begann sich zu dieser Zeit in den Regionen nahe den Importhäfen in England, den Niederlanden und Ostfriesland sowie in den Großstädten zu etablieren, war allerdings zunächst noch den wohlhabenderen Bevölkerungsschichten vorbehalten. Tatsächlich dürfte der proklamierte medizinische Nutzen neben der anregenden Wirkung des Coffeins maßgeblich zur Akzeptanz des ungewohnten und bitteren Heißgetränks beigetragen haben.<sup>17</sup> Ein positiver Effekt auf die Gesundheit der Teekonsumenten ergab sich allerdings weniger aus den physiologisch wirksamen Inhaltsstoffen des Tees als vielmehr aus dem Umstand, dass der Tee Genuss in Konkurrenz zum Konsum alkoholischer Getränke stand; folglich wurde dem weit verbreiteten Alkoholismus entgegenwirkt.<sup>2, 19</sup> Darüber hinaus handelt es sich bei Tee um ein vergleichsweise sicheres Lebensmittel, da dieser mit kochendem und somit sterilem Wasser hergestellt wird.<sup>20</sup>

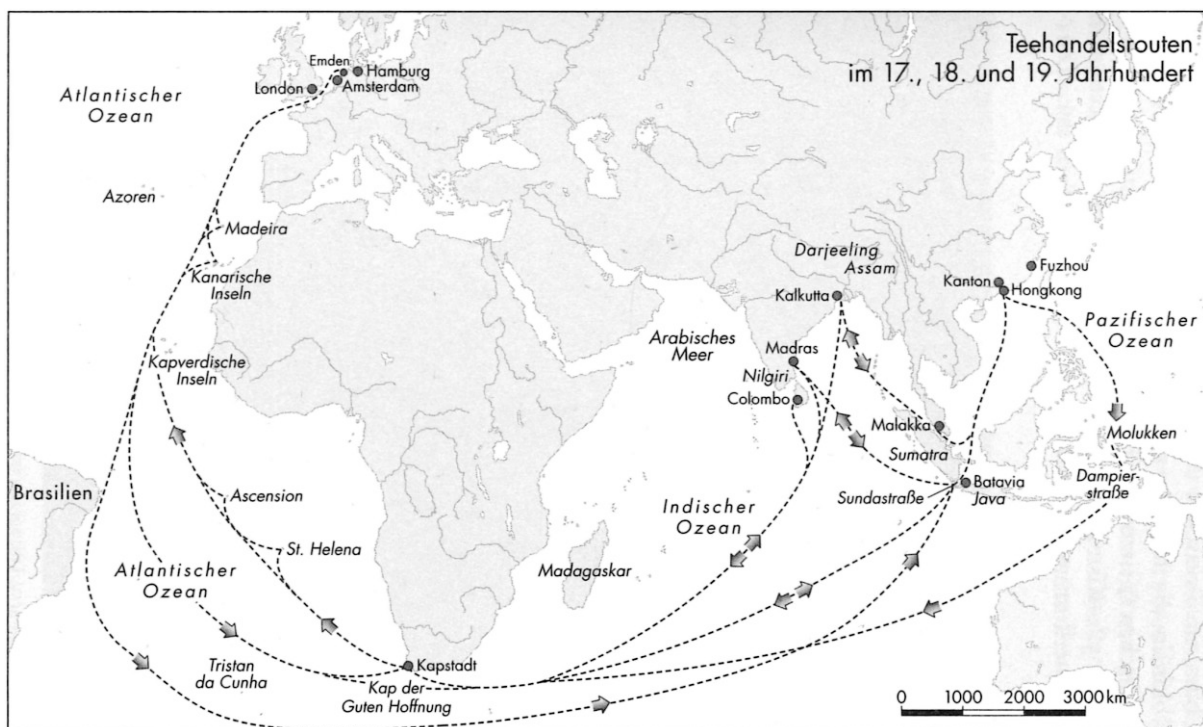
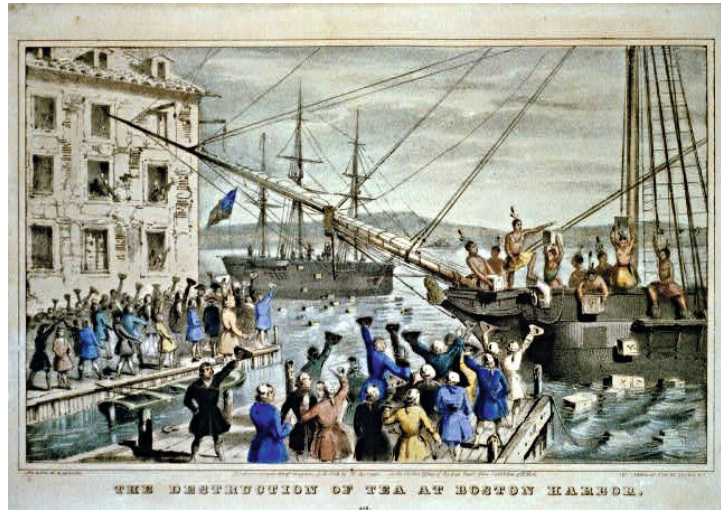


Abb. 1–3 Seerouten für den Teehandel im 17.–19. Jahrhundert (entnommen aus ROHRSEN, 2013).<sup>19</sup>

Der Tee erhielt auch eine politische Dimension. So konkurrierten europäische Staaten einerseits um die Kontrolle der Handelsrouten (**Abb. 1–3**), andererseits wurden von kolonialen Staaten, u. a. von Preußen, Konsumverbote erlassen. Konnten diese nicht durchgesetzt werden, folgten Steuern für die damals neuen Genussmittel (neben Tee auch Kaffee, Kakao und Tabak), welche teilweise bis heute bestehen.<sup>17</sup> Ferner kam dem Tee eine prominente Rolle in



den Unabhängigkeitsbestrebungen der britischen Kolonien auf dem Gebiet der heutigen USA zu. Aus Protest gegen die Erhebung von Importzöllen warfen als Indianer verkleidete Kaufleute und Bürger im Jahr 1773 ca. 350 Kisten Tee noch vor ihrer Entladung am Bostoner Hafen über Bord ins Meer (**Abb. 1–4**). Dieses Ereignis ging als *Boston Tea Party* in die amerikanische Geschichte ein.<sup>20</sup>



**Abb. 1–4** Links: Mit Tee beladene Männer auf dem Weg von Sichuan, China entlang einer Teeroute nach Tibet (Fotografie: Ernest Henry Wilson, 1908). Rechts: Handgefärbte Lithografie der Boston Tea Party von 1773 (Nathaniel Currier: *The Destruction of Tea at Boston Harbor*, 1846).

Im 19. Jahrhundert strebte England eine geringere Abhängigkeit von China an, das bis dahin fast als alleiniger Exporteur gewirkt hatte. Dabei machten es sich die Briten zunutze, dass ihr Major Robert Bruce 1823 im nordindischen Assam eine endemische Varietät der Teepflanze (*Camellia sinensis* var. *assamica*) entdeckt hatte. Nach einer Experimentierphase wurde in der britischen Kolonie erfolgreich Tee angebaut.<sup>21</sup> Die indischen Tee-Exporte stiegen in der Folge rasant an (von 65 Mio. englischen Pfund im Jahr 1895 auf 160 Mio. Pfund im Jahr 1899). Hierbei handelte es sich vornehmlich um den in England beliebten Schwarztee.<sup>18</sup>

### 1.1.3 Teekulturen

Der Genuss von Tee ist über die Jahrhunderte in vielen Ländern zu einem Bestandteil des Alltags geworden, wobei sich viele unterschiedliche Teekulturen entwickelt haben. So wird in Japan traditionell grüner Tee getrunken. Dies geschieht sowohl alltäglich als auch im Rahmen von Teezeremonien zu besonderen Anlässen. Gegenüber chinesischen Teezeremonien sind die Abläufe noch einmal stark verfeinert worden und werden von ausgebildeten Teemeistern festgelegt. Die japanische Teekultur ist eng mit dem Zen-Buddhismus verbunden.<sup>19, 22</sup> In der taiwanesischen Teekultur ist der halbfermentierte Oolong-Tee von großer Bedeutung.





## Einleitung und Grundlagen

Dagegen wird in Indien fast ausschließlich Schwarztee getrunken, welcher in manchen Regionen in Milch statt Wasser aufgekocht wird. In großen Teilen des arabischen Raumes wird schwarzer, meist stark gezuckerter Tee konsumiert und auch zu offiziellen Anlässen gereicht.<sup>2</sup> Während sich in Marokko und Tunesien grüner Tee kombiniert mit Minze großer Beliebtheit erfreut, wird der Tee im Jemen begleitend zum Kathkonsum getrunken und soll einer besseren Extraktion der Droge dienen. Ebenfalls große Teenationen sind Russland, die Türkei und der Iran, in denen sich der Gebrauch eines Samowars zur Herstellung starker Schwarzteeaufgüsse etabliert hat.<sup>2</sup> In Mitteleuropa ist insbesondere in England eine Tradition des Genusses von kräftigen Schwarztees zu unterschiedlichen Tageszeiten und unter Zusatz von Zucker und Milch entstanden („Afternoon tea“, „High tea“), die auch auf die Trinkgewohnheiten anderer westlicher Länder Einfluss genommen hat.<sup>19</sup> Erwähnenswert ist die norddeutsche Region Ostfriesland, die als eigenständiger Staat betrachtet mit einem Pro-Kopf-Verbrauch von ca. 300 L im Jahr die Liste der teetrinkenden Nationen anführen würde.<sup>23</sup> Kräftige Schwarztees (die sog. *Ostfriesische Mischung* – ein Blend auf der Basis von Assam- und zumeist Java-, Sumatra- oder Ceylon-Tees) mit Sahne und Kluntjes (grobem Kandiszucker) werden hier zu jeder Tageszeit genossen.<sup>19, 24</sup> Der Bedarf an geeignetem Geschirrtrog auch zur europäischen Entwicklung des Porzellans vor etwa 300 Jahren in Meißen bei. So wird das in Ostfriesland traditionell zugehörige Teeservice mit dem Dekor *Ostfriesische Rose* bereits seit ca. 250 Jahren verwendet.<sup>22, 24</sup>

### 1.1.4 Wirtschaftsfaktor

Tee ist das weltweit meistkonsumierte Getränk nach Wasser.<sup>25</sup> Dementsprechend hoch ist der Bedarf an Tee auf dem Weltmarkt und damit auch die wirtschaftliche Bedeutung des Teeanbaus in den Herkunftsländern. Die globale Teeproduktion erreichte 2014 eine Rekordmenge von 5,0 Mio. t, was einer Steigerung um fast 60% innerhalb von 10 Jahren entspricht. Dabei ist der Eigenverbrauch der Erzeugerländer überproportional stark angestiegen und machte 2014 mit 3,1 Mio. t fast zwei Drittel der gesamten Teeproduktion aus, während die Exportmengen nur um ca. 20% zugenommen haben.<sup>26-27</sup> Die Hauptanbauländer sind China, Indien, Kenia, Sri Lanka („Ceylon“) und Indonesien (in dieser Reihenfolge).<sup>23</sup> Trotz der deutlich geringeren Produktionsmengen tritt Kenia als Hauptexporteur an den Handelsmärkten auf, da im Gegensatz zu China und Indien weniger als 10% im eigenen Land verbraucht werden.

In Deutschland ist der Konsum in den vergangenen Jahren auf über 19 000 t angestiegen, es existiert jedoch weiterhin ein deutliches Nord-Süd-Gefälle.<sup>28</sup>



### 1.1.5 Physiologische Wirkungen

Teekonsum wurde früh als potentiell gesundheitsfördernd wahrgenommen. Bereits während der Tang-Dynastie (618–907 n. Chr.) schrieb der chinesische Pharmazeut Chen Zeng: „Eine Medizin ist immer nur eine Medizin für eine bestimmte Krankheit; Tee hingegen ist die Medizin für alle Krankheiten.“<sup>29</sup> Diese Einschätzung mag sehr optimistisch sein, gleichwohl ist der Einfluss des Tee Genusses auf eine Vielzahl gesundheitsrelevanter Parameter seit einigen Jahrzehnten tatsächlich Thema wissenschaftlicher Untersuchungen. Der Fokus dieser Forschung liegt zumeist auf den antioxidativ wirksamen Polyphenolen, die sowohl mit den Catechinen im grünen Tee als auch mit den Theaflavinen und Thearubigenen im schwarzen Tee einen großen Anteil der wasserlöslichen Bestandteile ausmachen.

Insbesondere aufgrund der hohen antioxidativen Aktivität wird Tee mit einem verringerten Risiko für diverse Krebsarten, kardiovaskuläre Erkrankungen sowie neuro-degenerative Krankheiten (Alzheimer, Parkinson) in Verbindung gebracht.<sup>30-31</sup> Intensive Forschungsarbeit *in vitro* und *in vivo* sowie epidemiologische Studien konnten eine Vielzahl von Hinweisen auf die vermuteten positiven Effekte finden. Hierbei ist die Bioverfügbarkeit ein kritischer Punkt, da diese bei Polyphenolen großen Schwankungen unterliegt. Zumindest die Catechine weisen aber eine vergleichsweise gute Bioverfügbarkeit auf.<sup>30, 32</sup> Eine große Zahl von Humanstudien konnte die vermuteten Wirkungen in vielen Bereichen nicht belegen oder ergab widersprüchliche Ergebnisse, so dass oftmals keine Evidenz für eine entsprechende Wirkung im Menschen vorliegt.<sup>33</sup> Beispielsweise zeigte die EPIC-Studie, eine umfassende und europaweit durchgeführte prospektive Kohortenstudie, keinen Beleg für den oft postulierten Zusammenhang zwischen Teekonsum und einem verringerten Magenkrebsrisiko, wies allerdings ein geringeres Darmkrebsrisiko durch flavonoidreiche Ernährung bei Frauen nach.<sup>34-35</sup>

Ferner ließen epidemiologische Studien, u.a. die EPIC-Studie, auf einen Effekt polyphenolreicher Ernährung gegen Typ-II Diabetes schließen.<sup>36-37</sup> Weitere Studien zeigten, dass Catechine sowie Theaflavine und Theasinensine (Bisflavanole) die Enzyme  $\alpha$ -Amylase und Maltase hemmen. Zusätzlich werden die Glucose-Transporter SGLT1 und GLUT2 inhibiert.<sup>38-39</sup> Dies führt zu einem verlangsamten Anstieg des Blutzuckerspiegels und könnte somit der Entwicklung eines Typ-II-Diabetes vorbeugen. In diesem Zusammenhang sind auch die vermuteten Wirkungen des grünen und schwarzen Tees gegen Fettleibigkeit, einem bekannten Risikofaktor für Diabetes, zu beachten, für die *in vitro* und *in vivo* Anzeichen gefunden wurden.<sup>29, 40</sup>

In Laborversuchen zeigte insbesondere grüner Tee antibakterielle und antivirale Effekte (u. a. gegen *Helicobacter pylori*, methycillin-resistenten *Staphylokokkus aureus* und Influenzavi-



## Einleitung und Grundlagen

ren).<sup>31, 41-42</sup> Auf potentiell entgiftende Eigenschaften von Schwarztee lässt die kovalente Bindung von Thearubigenen an die Neurotoxine von *Clostridium tetani* (Tetanus) und *Clostridium botulinum in vitro* schließen.<sup>43</sup> Im Tierversuch wurden hepatoprotektive Wirkungen gegenüber Aflatoxin- und ethanolinduzierten Schäden nachgewiesen.<sup>41, 44-45</sup>

Tee besitzt einen relativ hohen Fluoridgehalt von 0,8–2,0 mg/L im Aufguss und kann folglich der Kariesprophylaxe dienen.<sup>46</sup> Bei hohem Teekonsum, v. a. aus Teebeuteln, in denen der Tee besonders fein zerkleinert vorliegt, besteht jedoch die Gefahr einer Überschreitung der empfohlenen Aufnahmemenge von 2,9–3,8 mg am Tag und der Ausbildung einer Fluorose.<sup>47-49</sup>

Vergleichsweise wenig Beachtung wurde bisher den möglichen negativen Effekten des Teekonsums geschenkt. So kann der Coffeingehalt bei hohem Konsum zu Herzrhythmusstörungen und Bluthochdruck führen. Weiterhin wird vermutet, dass Coffein aufgrund seiner Fähigkeit Calcium zu binden die Knochendichte verringern könnte. Ein ähnlicher Effekt wird für Eisen angenommen, welches bei zeitnaher Aufnahme zum Tee durch Polyphenole gebunden werden könnte und somit in seiner Bioverfügbarkeit herabgesetzt würde.<sup>31, 49</sup> MAI et al. (2004) berichteten, dass Schwarzteekonsum negative Auswirkungen auf die Darmflora haben könnte.<sup>50</sup> Ferner enthält Tee relativ viel Aluminium (ca. 1 g/kg i. Tr.), wovon etwa 20 % in den Aufguss übergehen.<sup>46, 51-52</sup> Aluminium kann bei Überschreitung der tolerierbaren wöchentlichen Aufnahmemenge (TWI) im Körper akkumuliert werden und zeigt eine neurotoxische Wirkung.<sup>31, 53</sup> In jüngerer Vergangenheit ist Aluminium aufgrund des Verdachts, Alzheimer- und Brustkrebserkrankungen zu begünstigen und dessen gleichzeitiger Verwendung als Wirkstoff in Deodorants in das öffentliche Bewusstsein gerückt. Das Bundesinstitut für Risikobewertung erklärte in einer Stellungnahme, dass kein kausaler Zusammenhang mit Alzheimer- und Brustkrebserkrankungen besteht, der TWI-Wert für Aluminium allerdings bereits allein durch die Anwendung eines Deodorants erreicht bzw. überschritten werden kann. Somit ist jede zusätzliche Aufnahme aus Lebensmitteln als problematisch zu betrachten.<sup>53</sup>

Zur besseren Vermarktung von Tee als funktionellem Lebensmittel sind mehrere Anträge auf Zulassung von gesundheitsbezogenen Angaben, sog. Health Claims, bei der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) eingegangen. Diese, u. a. „Coffein hilft bei der Fettverbrennung“, „Die enthaltenen Polyphenole stellen einen schützenden Effekt für den Organismus sicher“ und „Schwarztee hilft die Aufmerksamkeit zu fokussieren“, wurden nach Prüfung negativ beschieden.<sup>54</sup>

## 1.2 Verarbeitung von Tee

### 1.2.1 Grüner Tee

Zur Herstellung von grünem Tee ist es notwendig, die frisch geernteten Teeblätter im ersten Schritt zu erhitzen, um die in den Blättern enthaltenen Enzyme zu inaktivieren und enzymatische Reaktionen zu unterbinden. Dabei sollen die Inhaltsstoffe, insbesondere die Flavan-3-ole, möglichst unverändert erhalten bleiben. Das Erhitzen erfolgt gemeinhin in großen Röstpfannen (v. a. in China üblich) oder durch das Dämpfen in heißem Wasserdampf (v. a. in Japan üblich).<sup>5, 25</sup> Anschließend werden die Blätter maschinell geformt und/oder zerkleinert. Am verbreitetsten ist das Rollen längs der Blattachse; einige Sorten werden auch traditionell zu kleinen Kugeln gerollt (chinesischer *Gunpowder*) oder zu flachen Nadeln geformt (japanischer *Sencha*- oder chinesischer *Long Jing*-Tee). Der so verarbeitete Tee wird getrocknet. Oft wiederholen sich Roll- und Trocknungsschritte mehrfach, bis ein Feuchtigkeitsgehalt von etwa 6 % erreicht wird.<sup>52</sup> Die drei Schritte *Enzymdeaktivierung* → *Rollen/Zerkleinerung* → *Trocknen* stellen die Basis der Grünteeherstellung dar, die in einer Vielzahl regionaler Variationen durchgeführt wird.



**Abb. 1–5** Links: Spross einer Teeepflanze mit Blattknospe und den beiden jüngsten Blättern. Mitte: Teeplückerinnen auf einer Plantage in Südindien. Rechts: frisch geerntete Teeblätter (Aufnahmen aus den Westghats bei Munnar, Indien, 2013).

### 1.2.2 Schwarzer Tee

Im Vergleich zum grünen Tee ist die Herstellung schwarzen Tees komplexer und erfordert weitere Verarbeitungsschritte. Die genauen Ursprünge der Schwarzteeherstellung sind nicht bekannt, werden aber im China der Tang-Dynastie (618–907 n. Chr.) vermutet.<sup>55</sup> Nachfolgend werden die wichtigsten Schritte in der Schwarzteeproduktion erläutert und in **Abb. 1–6** anhand von Fotografien schematisch dargestellt.



### Welken

Zunächst müssen die frisch gepflückten und noch festen Blätter gewelkt werden. Die bedeutendste Methode ist das Welken in Wannen, die einen siebartigen Boden besitzen (engl. *Trough Withering*). Dabei werden die Teeblätter in Schichten ausgebreitet und etwa 6–18 Stunden von unter dem Wannenboden befindlichen Lüftern mit Luft durchblasen. Um eine gleichmäßige Behandlung der Blätter zu erreichen, ist es möglich, den Luftstrom umzukehren, so dass abwechselnd auch Luft von oben durch das Blattbett gesaugt wird. Dieser Vorgang reduziert den Wassergehalt, macht die Blätter geschmeidiger und erhöht die Durchlässigkeit der Zellwände.<sup>25, 56-57</sup>

### Zellaufschluss

Im Anschluss an das Welken wird die Zellstruktur der Blätter maschinell durch Rollen, Quetschen, Schneiden und/oder Zerreißen aufgebrochen und das Blattmaterial durch den austretenden Zellsaft eingeweicht. Diese Mazeration der Teeblätter kann durch unterschiedliche Techniken erreicht werden. Mit Abstand am gebräuchlichsten sind die traditionelle orthodoxe Methode sowie die CTC-Methode. Daneben existieren weitere Technologien wie der Lowry-Tea-Processor, auf die wegen ihrer untergeordneten Bedeutung hier nicht näher eingegangen werden soll.<sup>58</sup>

Bei der orthodoxen Methode werden die welken Teeblätter durch eine unten offene, zylindrische Presse auf einen runden Tisch mit regelmäßigen Erhebungen aufgebracht. Währenddessen kreist der nur geringfügig höher angebrachte Zylinder über diesem Tisch und reißt dabei die Blätter mit. Durch den sich ergebenden Druck werden diese an den Erhebungen zerquetscht und gerollt. Dieser Vorgang soll die ursprüngliche Mazeration der Blätter durch Reiben zwischen den Handflächen nachbilden.<sup>57, 59</sup>

Auf den orthodoxen Rolltisch wird immer eine bestimmte Menge Tee aufgebracht, welche erst abgearbeitet wird, bevor wieder neuer Tee hinzugefügt wird. Die CTC-Maschinen werden hingegen mit einem konstanten Zufluss an Teeblättern versorgt. Da die Blätter hierbei nicht zu flach sein dürfen, müssen sie zunächst vorbehandelt werden. Dies erfolgt entweder durch ein kurzes Rollen auf dem orthodoxen Rolltisch oder mit dem ebenfalls kontinuierlich arbeitenden *McTear Rotorvane*, einer innen mit Schaufeln versehenen zylindrischen Trommel, welche die Blätter befördert, aber auch einen ähnlichen Rolleffekt hervorruft.<sup>57, 59</sup> Anschließend gelangen die Blätter in die CTC-Maschinen (CTC = Crush-Tear-Curl; engl.: Zerdrücken-Zerreißen-Rollen), wo sie durch zwei gegenläufig rotierende und mit Zacken versehene



## Einleitung und Grundlagen

Edelstahlrollen gequetscht werden. Je nach gewünschtem Feinheitsgrad der Blattstücke können mehrere CTC-Maschinen in Reihe geschaltet werden.<sup>58, 60</sup>

### Fermentation

Der charakteristische Schritt in der Schwarzteemanufaktur ist die sog. *Fermentation*. Die Mazeration der Blattzellen führt dazu, dass die im Cytoplasma lokalisierten Enzyme Polyphenoloxidase und Peroxidase mit den in den Zellvakuolen gespeicherten Flavan-3-olen (Catechinen) in Kontakt treten.<sup>61</sup> Im Zusammenspiel mit dem Sauerstoff aus der Umgebungsluft kommt es zu einer enzymatisch katalysierten Oxidation der Catechine und der Bildung rotbraun gefärbter Oxidationsprodukte, vornehmlich der Theaflavine und Thearubigene.<sup>62</sup> Ferner entstehen zahlreiche Aromastoffe, u. a. durch die Strecker-Reaktion von Aminosäuren mit oxidierten Flavan-3-olen sowie durch die Oxidation ungesättigter Fettsäuren.<sup>5, 63-64</sup> In Abschnitt 1.3.2.4 folgt eine ausführlichere Beschreibung der enzymatisch-oxidativen Vorgänge. Der Begriff *Fermentation* für diese Reaktionen beruht auf der lange Zeit fälschlicherweise verbreiteten Annahme, dass Mikroorganismen maßgeblich an den chemischen Prozessen beteiligt sind. Obwohl der Irrtum seit 1901 bekannt ist, ist die Bezeichnung *Fermentation* bis heute am gebräuchlichsten.<sup>5</sup> Zur korrekten Beschreibung dieses Verarbeitungsschrittes haben sich in der Fachliteratur auch die Termini *Oxidation* oder *Aeration* (gemäß ISO 3720:2011) etabliert.<sup>65</sup> In dieser Arbeit werden die beiden Begriffe *Fermentation* und *Oxidation* synonym verwendet.

Eine bis heute verbreitete Methode zur Durchführung der Fermentation ist das flache Auslegen der gerollten Teeblätter auf einem Zementboden in einem gut belüfteten Raum. Insbesondere für CTC-Tees werden auch kontinuierlich arbeitende Maschinen verwendet. Diese transportieren den Tee in Schichten auf perforierten Fließbändern, so dass sowohl von oben als auch von unten Luft zugeführt werden kann. Anhand der Geschwindigkeit der Fließbänder lässt sich die Fermentationsdauer regulieren. Diese ist abhängig von der Umgebungstemperatur (optimalerweise 25–29 °C) und dem Zerkleinerungsgrad des Tees; so ist die Oxidation bei den stark zerkleinerten Blättern eines CTC-Tees aufgrund der größeren Oberfläche und gründlicheren Durchmischung der Inhaltsstoffe nach etwa 45–90 min abgeschlossen, während nach orthodoxer Art gerollte Blätter 2–3 Stunden benötigen. Der Endpunkt des Oxidationsvorganges wird an der Farbe der Blätter erkannt.<sup>57, 59</sup>

Gegenüber der CTC-Methode ist die orthodoxe Methode schonender und wird bevorzugt für die Herstellung von Blatt-Tees eingesetzt, da das Blatt nicht vollständig in kleine Stücke

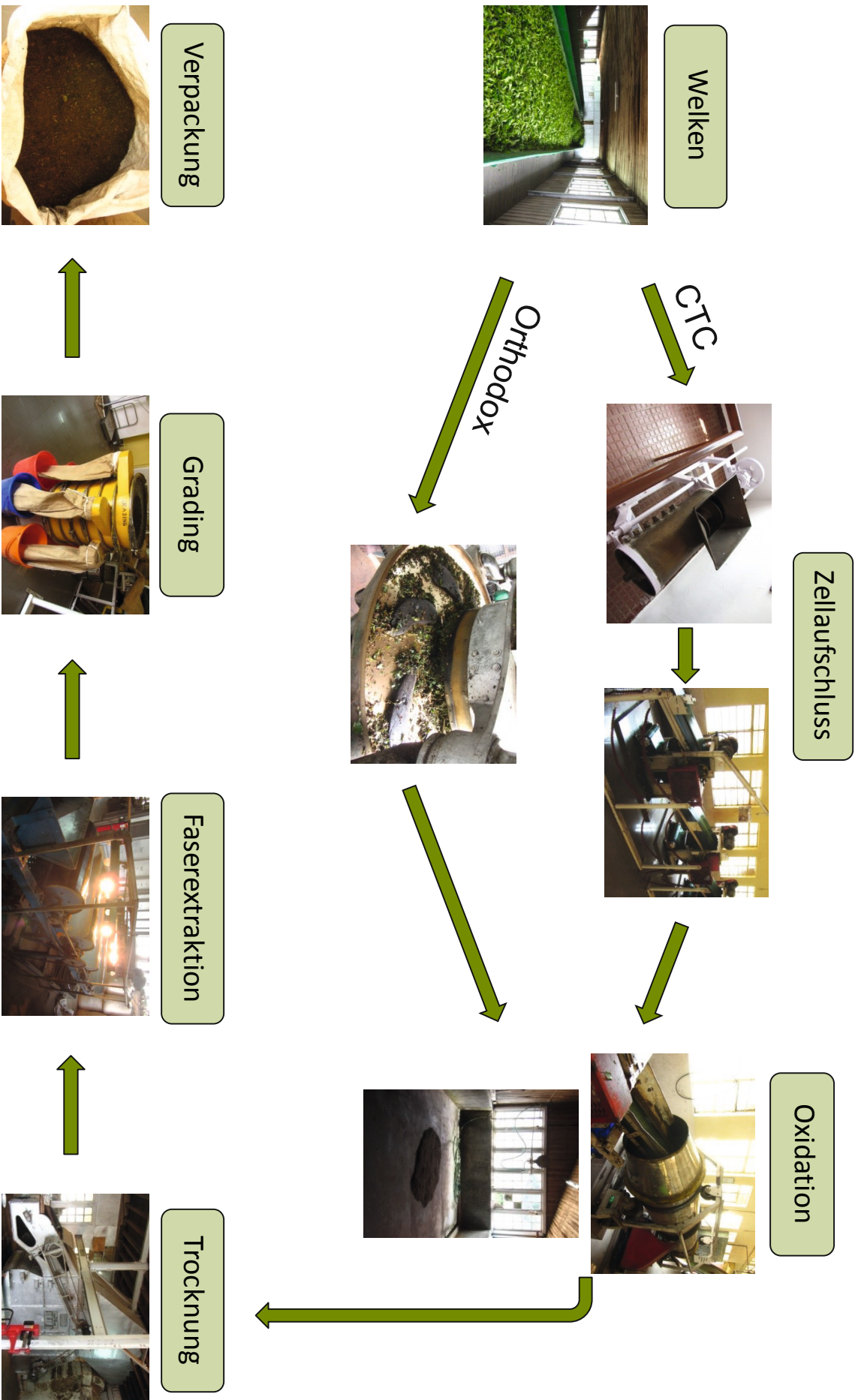


Abb. 1-6 Schematische Darstellung der einzelnen Verarbeitungsschritte während der Herstellung von schwarzem Tee (Aufnahmen aus dem Kanan Devan Tea Museum Munnar, Kerala und dem Kollukkumalai Tea Estate, Tamil Nadu, Indien, 2013).



## Einleitung und Grundlagen

zerrissen wird. Die CTC-Methode ist als kontinuierlich durchführbarer Prozess effektiver und führt üblicherweise zu dunkleren und kräftigeren Tees.

### Trocknung

Ist der gewünschte Fermentationsgrad erreicht, werden die Blätter getrocknet. Dies geschieht beispielsweise in einer Maschine, die der Tee auf durchbrochenen Metallschienen langsam durchläuft, während von außen heiße Luft (80–115 °C) zugeleitet wird. Durch die Hitze werden die Enzyme inaktiviert und der Fermentationsprozess gestoppt. Es kommt zum Abbau des Chlorophylls zugunsten des braun-schwarzen Phaeophytins.<sup>66</sup> Gleichzeitig wird der Wassergehalt auf etwa 3–4 % gesenkt und so die Haltbarkeit des Tees sichergestellt.<sup>57, 59,</sup>  
63

### Grading

Nach dem Trocknen werden die Blätter durch mehrstufige Siebverfahren anhand ihrer Größe in Blattgrade eingeteilt. Oft werden die Blattfasern vorab durch einen *Fibre Extractor* mittels elektrostatisch geladener Rollen entfernt.<sup>57-58</sup>

### **1.2.3 Weitere Teearten**

Während das Herstellungsverfahren von Schwarztee zumindest in groben Zügen definiert ist, ist dies bei anderen Teearten bisher entweder gar nicht oder nur sehr ungenau geschehen. Oolong-Tee wird allgemein als *halbfermentierter* Tee beschrieben, dessen Produktion der des schwarzen Tees ähnelt. Vorgaben für den Grad der enzymatischen Oxidation existieren nicht, so dass sowohl ein nur sehr geringfügig als auch ein fast vollständig oxidiertes Tee als Oolong bezeichnet werden kann.

Für den sog. *weißen Tee* fehlt eine international verbindliche Definition. Es besteht zum einen die Auffassung, dass weißer Tee ausschließlich aus den Blättern bestimmter, in der chinesischen Provinz Fujian heimischer Varietäten von *C. sinensis* hergestellt werden kann. Indessen wird auch in anderen Ländern „weißer Tee“ produziert, indem nur Blattknospen und sehr junge Blätter verarbeitet werden. Diese tragen an der Blattunterseite feine weiße Härchen, welche dem Blatt nach dem Trocknen einen weißen Schimmer verleihen. Nach der Ernte erfolgt eine schonende Trocknung der Blätter, bei der es zu einer leichten enzymatischen Oxidation kommen kann.<sup>67-69</sup>

Ferner existieren in China und Japan Tee-Spezialitäten, welche mit Hilfe von Mikroorganismen eine echte Fermentation durchlaufen, international jedoch von geringer Bedeutung sind. Noch am bekanntesten ist der chinesische *Pu-Erh*-Tee. Dieser wird traditionell durch das Pressen gedämpfter Grünteeblätter und eine anschließende bis zu 10-jährige Reifung





produziert. Durch gezielte Zugabe von Pilzkulturen kann die Reifung bei hoher Luftfeuchtigkeit und Temperatur auf wenige Monate verkürzt werden.<sup>68, 70-71</sup>

#### 1.2.4 Sortenvielfalt

Der Besuch eines modernen Teegeschäftes verdeutlicht schnell die enorme Sortenvielfalt des Tees, selbst wenn die teeähnlichen Erzeugnisse (Kräuter- und Früchtetees) außer Acht gelassen werden. Dabei spielen neben der Teeart auch die Anbauregion, der Erntezeitpunkt und weitere Details der Verarbeitung eine Rolle. Einige Beispiele für verschiedene Teearten und -sorten sind in **Abb. 1–7** dargestellt. Schon das Ernteverfahren ist für die spätere Qualität des Tees entscheidend. Da insbesondere junge Teeblätter einen guten Tee ergeben, werden für die hochwertigsten Tees nur die obere Blattknospe sowie die beiden darunter liegenden Blätter per Hand gepflückt und weiterverarbeitet („Two leaves and a bud“, **Abb. 1–5**).<sup>5, 63</sup> Für weniger hohe Qualitäten erfolgt die Ernte mittels Scheren oder gänzlich durch Maschinen, wobei auch ältere Blätter erfasst werden.<sup>25</sup> Die Beschaffenheit der geernteten Teeblätter wird in einigen Ländern, vornehmlich in Indien und dessen Nachbarstaaten, anhand einer historisch gewachsenen Kodierung gekennzeichnet. Für einen schwarzen Blatttee aus der indischen Region Darjeeling könnte diese beispielsweise lauten: Finest Tippy Golden Flowery Orange Pekoe (FTGFOP). Daraus lässt sich Folgendes entnehmen: Orange Pekoe = Standardqualität auf Basis der jüngsten 2–3 Blätter, enthält keine Blattknospen; Golden Flowery = junge Knospen enthalten; Tippy = viele Blattknospen enthalten; Finest = der Tee besteht bis zu einem Viertel aus Blattknospen und wurde i. d. R. von Hand verarbeitet. Die Qualitätsmerkmale werden dabei nicht ersetzt, sondern voreinander aufgereiht, soweit zutreffend. Somit entspräche der oben genannte Tee der höchsten Kategorie.<sup>57, 72</sup>

Die Bezeichnung eines Tees kann auch die Einteilung nach dem Siebverfahren (*Grading*, s.o.) anzeigen: Die vier Hauptgrade sind *Whole Leaf*, *Broken*, *Fannings* und *Dust*, welche in weitere Unterkategorien unterteilt werden können. Hierbei werden die stark zerkleinerten Reste als qualitativ geringwertig angesehen und v. a. für Teebeutel verwendet.<sup>63, 73</sup>

In Japan wird diese Terminologie nicht verwendet. Es findet sich dort allerdings eine ganz eigene Sortenvielfalt an grünen Tees (**Abb. 1–7**: Tees 1–3 und 7). Neben der Standard-Blatteesorte Sencha, die eine charakteristische Nadelform aufweist, ist die günstigere Variante Bancha verbreitet. Eine hochwertige Sorte ist der Gyokuro, für dessen Herstellung die Teepflanzen etwa 3–4 Wochen vor der Ernte abgedeckt werden, damit die Blätter der beschatteten Pflanzen mehr Chlorophyll synthetisieren und dadurch eine intensiv grüne Farbe erhalten.

## Einleitung und Grundlagen



**Abb. 1–7** Auswahl verschiedener Teearten und -sorten. 1–Matcha: Grüner Pulverttee (Japan); 2–Shincha: Grüner Blatttee aus der ersten Frühjahrsernte, oftmals beschattet (Japan); 3–Sencha: Grüner Alltagsblatttee (Japan); 4–Lung Ching (auch Drachenbrunntee): Hochwertiger Grüntee mit für China-Tee ungewöhnlicher Nadelform (China); 5–Gunpowder: Grüntee mit Blättern in Kugelform (China); 6–Grüner Blatttee mit vielen an ihrer weißlichen Behaarung erkennbaren Blattknospen (Südkorea); 7–Kukicha: Grüntee mit hohem Anteil an Blattstielen (Japan); 8–Formosa Oolong Ming Xiang: Halbfermentierter Tee mit großen, ganzen Blättern (Taiwan); 9–Darjeeling First Flush: Hochlandblatttee aus der Frühjahrsernte. Obwohl es sich offiziell um Schwarztee handelt, erfolgt keine vollständige Fermentation, so dass die Blätter z. T. ihre grüne Farbe behalten und die Zusammensetzung eher einem Oolong-Tee entspricht (Indien); 10–Munnar orthodox: Schwarzer Blatttee aus kaum zerkleinerten Blättern (Südindien); 11–Ceylon OP: Schwarzer Hochlandblatttee (Sri Lanka); 12–Ceylon BOP: Schwarzer Tee „Broken“ aus CTC-Manufaktur (Sri Lanka); 13–Assam FTGFOP: Schwarzer Blatttee der höchsten Qualitätsstufe mit sehr hohem Anteil an „goldenen“ Blattknospen (Indien); 14–Ostfriesentee: Blend verschiedener kräftiger Schwarztees unterschiedlicher Herkunft (zumeist CTC); 15–Typischer Teebeuteltee: Stark zerkleinerter CTC-Schwarztee (Kolumbien); 16–Instant-Tee: Aus aufgebühtem Schwarztee hergestellter und in heißem Wasser vollständig löslicher Tee-Extrakt.



## *Einleitung und Grundlagen*

Außerdem kann der Schattentee zu Matcha verarbeitet werden, einem fein gemahlenen Pulverttee, welcher für Teezeremonien verwendet wird.<sup>19, 52</sup> Gerösteter Tee sowie der hauptsächlich aus den Blattstielen bestehende Kukicha sind ebenfalls beliebt und werden im Sommer gerne kalt getrunken. Eine bekannte Spezialität ist der Genmaicha, ein Grüntee, dem gerösteter Reis beigemischt wird.<sup>19, 74</sup>

Abgesehen von solchen traditionellen Zusätzen (weitere Beispiele sind die Verwendung von Jasminblüten in China oder das Bergamottöl im Earl Grey Tee) hat die moderne Lebensmittelindustrie mit einer Vielzahl natürlicher und künstlicher Aromastoffe zu einer Diversifikation des Teesortiments beigetragen. Zudem wird Tee nicht mehr nur als Heißgetränk konsumiert, sondern auch in anderen Formen wie Teebonbons oder Eistee. Letzterer macht etwa 85 % des US-amerikanischen Teekonsums aus.<sup>72, 75</sup>



### 1.3 Inhaltsstoffe des Tees

Die Blätter von *C. sinensis* enthalten neben Wasser eine große Vielfalt an Komponenten wie Kohlenhydrate (Polysaccharide, Pektine, Zucker), Chlorophylle, Phenole und Polyphenole.<sup>25</sup>

<sup>76</sup> Auf einige Inhaltsstoffe wird nachfolgend eingegangen.

#### 1.3.1 Nicht-polyphenolische Inhaltsstoffe

##### Mineralstoffe

Tee enthält größere Mengen an Kalium (15 g/kg i. Tr.), Calcium (4 g/kg i. Tr.) und Magnesium (2 g/kg i. Tr.) sowie im Vergleich zu anderen Lebensmitteln viel Aluminium (1 g/kg i. Tr.), Mangan (0,8 g/kg i. Tr.) und Fluorid (0,2 g/kg i. Tr.).<sup>48, 51, 77</sup>

##### Purinalkaloide

Neben geringen Gehalten an Theobromin (0,05–0,5 % i. Tr.) und Theophyllin (< 0,05 % i. Tr.) sind größere Mengen des Purinalkaloids Coffein (2–5 % i. Tr.) im Tee vorhanden (**Abb. 1–8**).<sup>78</sup>

Die Gehalte sind in grünem und schwarzem Tee vergleichbar.<sup>25</sup> Aufgrund seiner anregenden Wirkung und des bitteren Geschmacks ist Coffein ein wertgebender Bestandteil des Tees.<sup>79</sup>

##### Proteine, Aminosäuren, Enzyme

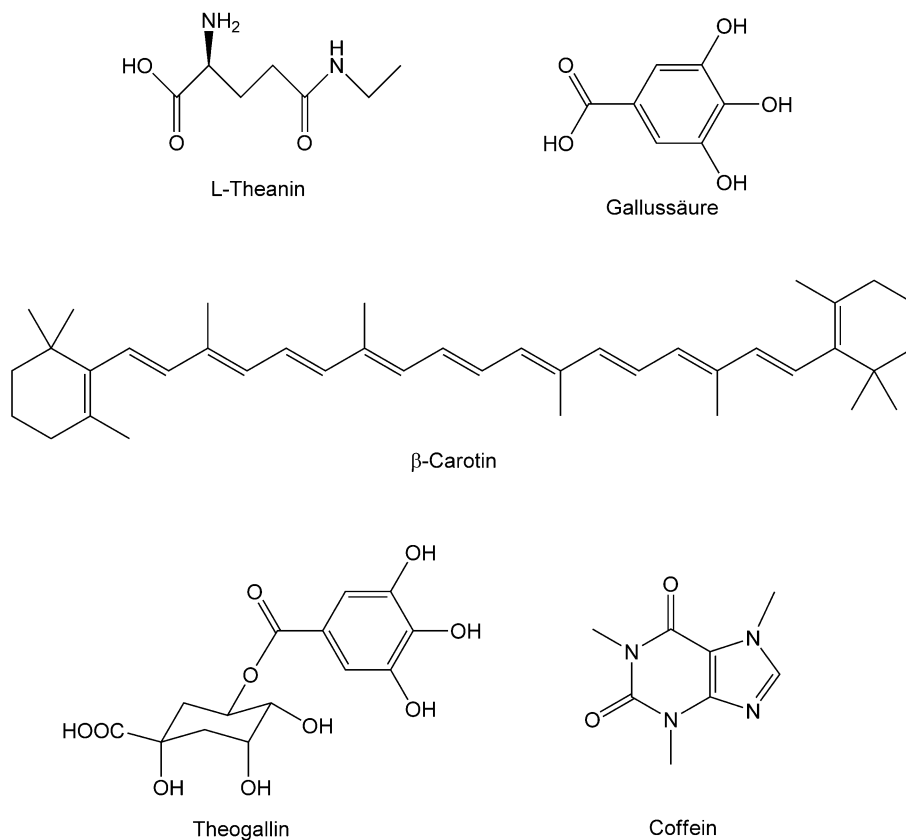
Proteine machen bis zu 30 % der Trockenmasse frischer Teeblätter aus. Da diese mit Wasser kaum extrahiert werden, sind sie von geringer Relevanz.<sup>25</sup> Erwähnenswert sind die 19 freien Aminosäuren, welche im Tee nachweisbar sind und eine gute Löslichkeit aufweisen (ca. 50 % innerhalb von 2 min Ziehzeit).<sup>77, 80-81</sup> Der Gehalt sinkt tendenziell mit dem Verarbeitungsgrad (weißer Tee > grüner Tee > Oolong > schwarzer Tee) und liegt durchschnittlich bei 1,3–2,5 % i. Tr. Davon entfallen 30–50 % auf das L-Theanin (5-N-Ethyl-L-glutamin, **Abb. 1–8**), das fast ausschließlich in *C. sinensis* vorkommt.<sup>68, 81</sup> Von großer Bedeutung sind Enzyme wie Polyphenoloxidase, Peroxidase oder Lipoxigenase (Abschnitte 1.2 und 1.3.2.4).<sup>25</sup>

##### Carotinoide, Lipide und Aromakomponenten

Des Weiteren stellen Carotinoide einen Bestandteil der Teeblätter dar (u. a. Neoxanthin und  $\beta$ -Carotin, **Abb. 1–8**). Ebenso wie die Lipide (z. B. Linol- und Linolensäure) gehen sie nur in geringem Maße in das Aufgussgetränk über, spielen aber eine nennenswerte Rolle in der Aromaentwicklung des schwarzen Tees. In Tee wurden bereits über 600 flüchtige Verbindungen nachgewiesen, welche in Abhängigkeit von der Teesorte stark variieren können und eine Reihe unterschiedlicher Klassen (u. a. Alkohole, Terpenoide und Lactone) umfassen.<sup>25</sup>

## Vitamine

Tee enthält die Vitamine C, E und K sowie Provitamin A ( $\beta$ -Carotin), Thiamin, Riboflavin, Nicotinsäure, Pantothersäure und Folsäure. Der Gehalt an Vitamin C im frischen Teeblatt ist vergleichbar mit dem von Zitronen, wird jedoch im Laufe der Verarbeitung und Lagerung sowie durch das Aufgießen mit heißem Wasser deutlich reduziert. Dagegen sind Thiamin, Riboflavin, Nicotin- und Pantothersäure nur in geringer Menge vorhanden, während im Falle der lipophilen Vitamine E und K sowie des Provitamins A die Extrahierbarkeit mit Wasser unzureichend ist. Bei hohem Teekonsum von etwa 1 L/Tag sind die Gehalte an Vitamin C und Folsäure geeignet, einen Beitrag zum Tagesbedarf zu leisten.<sup>76, 82</sup>



**Abb. 1–8** Strukturformeln einiger nicht-polyphenolischer Inhaltsstoffe von *C. sinensis*.

## Organische Säuren und Phenolsäuren

Im Tee wurden relativ hohe Gehalte an Oxalsäure und Chinasäure gefunden. Daneben sind einige Phenolsäuren wie die Gallussäure (**Abb. 1–8**) sowie Chlorogensäuren und *p*-Hydroxycimtsäuren vorhanden. Zu den Hauptbestandteilen eines Teeaufgusses gehört die Phenolsäure Theogallin (5-Galloylchinasäure, **Abb. 1–8**).<sup>25, 83-84</sup>



## 1.3.2 Polyphenole

### 1.3.2.1 Definition und Klassifizierung

Polyphenole zählen zu den sekundären Pflanzenstoffen und sind Bestandteile sämtlicher Pflanzen.<sup>85</sup> Aufgrund einer Vielzahl möglicher positiver gesundheitlicher Aspekte ist ihre Bedeutung für die menschliche Ernährung in den letzten Jahrzehnten zunehmend in den Fokus der Forschung gerückt (vgl. 1.1.5). Den Pflanzen dienen sie als Schutz vor Fraßfeinden und UV-Strahlung sowie außerdem durch ihre z. T. intensive Farbgebung in Blüten und Früchten zur Fortpflanzung.<sup>86-87</sup>

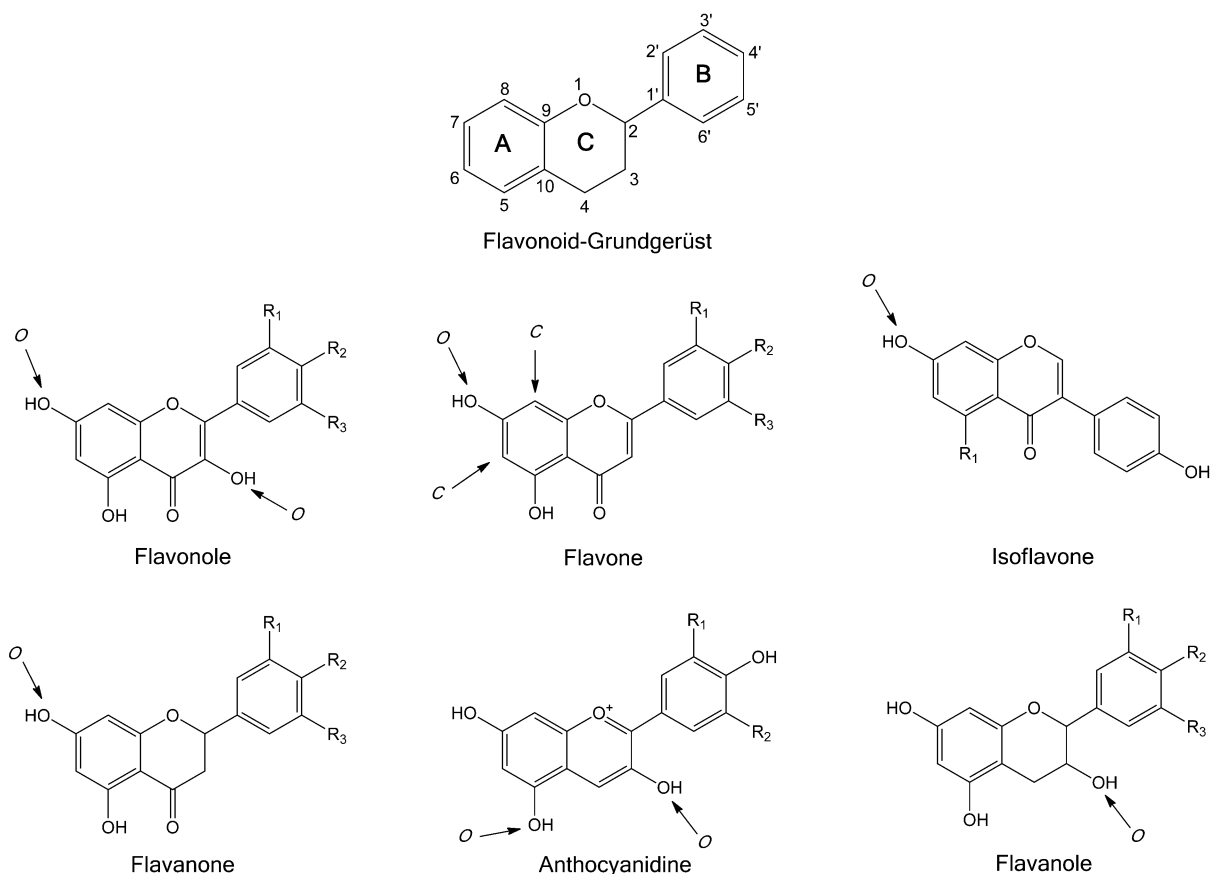
Im Teeaufguss stellen Polyphenole sowohl quantitativ als auch infolge ihrer sensorischen und physiologischen Eigenschaften die bedeutendste Substanzklasse dar. Hinsichtlich der Definition von *Polyphenolen* bestehen differente Ansichten. Der Versuch einer Definition von HASLAM aufbauend auf den Arbeiten von WHITE, BATE-SMITH und SWAIN (*WBSSH-Definition*) gilt inzwischen als veraltet. HASLAM definierte Polyphenole als wasserlösliche Substanzen mit einer Molekülmasse von 500-4000 Da sowie 5–7 Phenoleinheiten und 12–16 Hydroxylgruppen je 1000 Da.<sup>88-89</sup> Es folgte die Beschreibung von Polyphenolen als mehrfach (mindestens zweifach) hydroxylierten Aromaten, welche in der Fachliteratur weiterhin geläufig ist. Nach jüngerer Auffassung müssen hingegen mindestens zwei hydroxylierte aromatische Systeme vorhanden sein.<sup>90</sup> Eine Definition „echter Polyphenole“ wurde von QUIDEAU et al. (2011) vorgestellt, gemäß der zusätzlich die Biosynthese über den Shikimisäure- oder den Polyketidweg sowie die Abwesenheit einer stickstoffhaltigen funktionellen Gruppe in der Grundstruktur vorausgesetzt wird.<sup>89</sup> In dieser Arbeit wird der Begriff *Polyphenole* nur für Verbindungen mit mindestens zwei phenolischen Gruppen verwendet, so dass z. B. Phenolsäuren und deren Ester (*Depside*) wie 3-*O*-Caffeoylchinasäure oder Theogallin (**Abb. 1–8**) nicht davon erfasst werden.

Polyphenole lassen sich in Flavonoide, Stilbene und Lignane einteilen, welche wiederum in Untergruppen eingeteilt werden können.<sup>86, 89</sup> Außerhalb dieser drei Hauptpolyphenolklassen existiert im Tee noch die Gruppe der hydrolysierbaren Tannine, hauptsächlich vertreten durch das Strictinin (1-*O*-Galloyl-4,6-Hexahydroxydiphenoyl- $\beta$ -D-Glucose).<sup>91-93</sup> Die Biosynthese der Polyphenole ist komplex und erfolgt über unterschiedliche Syntheserouten. Nichtflavonoide Polyphenole werden über den Shikimisäure- (C6-C1-Körper) und den Phenylpropan-Weg (C6-C3-Körper) gebildet. Zur Biosynthese der Flavonoide bedarf es zunächst einer Kombination dieser beiden Synthesewege, die zur Bildung des *p*-Cumaroyl-CoA führt. Durch Ad-

dition dreier Einheiten des über den Malonsäureweg gebildeten Malonyl-CoA entsteht das Flavonoid-Grundgerüst.<sup>32</sup>

Da in den Blättern von *C. sinensis* v. a. Flavonoide enthalten sind, sollen diese im Folgenden näher betrachtet werden. Ihre Grundstruktur bildet ein C6-C3-C6-Gerüst aus zwei aromatischen Ringen (A und B), welche durch einen heterocyclischen Pyranring (C) miteinander verbunden sind (**Abb. 1–9**).<sup>85</sup>

Anhand von funktionellen Gruppen am Pyranring ist eine weitere Einteilung in Untergruppen möglich. Die sechs wichtigsten sind: Flavonole, Flavone, Isoflavone, Flavanone, Anthocyanidine und Flavanole (**Abb. 1–9**). Flavonoide sind häufig mit Zuckern konjugiert und tragen Hydroxylgruppen, insbesondere an den Positionen 5, 7 und 4'. Hierdurch wird ihre Wasserlöslichkeit erhöht.<sup>32, 86, 94</sup>



**Abb. 1–9** Grundgerüst der Flavonoide sowie Grundstrukturen der sechs wichtigsten Untergruppen. Als Hauptsubstituenten ( $R_{1,2,3}$ ) treten  $-H$  und  $-OH$ , seltener  $-OCH_3$  auf. Bevorzugte Positionen für  $O$ - und  $C$ -verknüpfte Glycoside sowie organische/phenolische Säuren sind durch Pfeile markiert.



### 1.3.2.2 Flavonole, Flavone, Isoflavone, Flavanone und Anthocyanidine

Am weitesten verbreitet sind die Flavonole, insbesondere Quercetin und Kaempferol. Im Tee treten sie v. a. in glycosylierter Form als Flavonol-3-*O*-Glycoside (FOG) auf. Beispiele sind das Kaempferol-3-*O*-glucosid (Astragalin) sowie das Quercetin-3-*O*-rhamnosid (Quercitrin). Ihr Gesamtgehalt liegt bei 0,5–2,5 % i. Tr. im Teeaufguss (berechnet als Aglycone).<sup>77, 95-96</sup> Wie SCHARBERT & HOFMANN (2005) berichteten, tragen FOG maßgeblich zu Adstringenz und Bitterkeit eines Teeaufgusses bei.<sup>79</sup> Flavone sind weniger verbreitet und bestehen meist aus Glycosiden des Apigenins und des Luteolins. Hauptquellen sind Sellerie und Petersilie. In *C. sinensis* sind geringe Mengen (<0,15 % i. Tr., berechnet als Aglycone) Flavon-C-Glycoside (FCG) wie Apigenin-8-*C*-glucosid (Vitexin) und Apigenin-6-*C*-glucosid (Isovitexin) enthalten.<sup>25, 86, 97-99</sup> Isoflavone sind als Phytoestrogene beschrieben und werden hauptsächlich in Leguminosen wie Soja gebildet.<sup>100</sup> In Tee spielen sie ebenso wenig eine Rolle wie die Flavanone, welche in hoher Konzentration nur in Citrusfrüchten vorhanden sind. Dort liegen sie als Glycoside vor und verleihen z. T. einen bitteren Geschmack (z.B. Naringin in Grapefruit).<sup>86</sup> Anthocyanidine sind in ihrer glycosylierten Form, den sog. *Anthocyanen*, als Farbpigmente verbreitet, wobei der Farbton durch den pH-Wert bestimmt wird. Hohe Gehalte finden sich z. B. in Beeren wie Aronia- und Holunderbeeren.<sup>86, 101</sup>

### 1.3.2.3 Flavanole

Der größte Anteil an Polyphenolen im grünen und weißen Tee entfällt auf die Flavan-3-ole. Aus diesem Grund gilt Tee neben Kakao, Wein und Aprikosen als eine Hauptquelle für Flavanole in der menschlichen Ernährung.<sup>86</sup> Flavanol-Glycoside spielen in Lebensmitteln eine untergeordnete Rolle, kommen aber beispielsweise in Getreide und Hülsenfrüchten vor.<sup>102-103</sup> Besonderes Strukturmerkmal der Flavanole ist die fehlende Doppelbindung am C-Ring zwischen Position 2 und 3, so dass an diesen Stellen jeweils ein Chiralitätszentrum vorhanden ist. In der Folge entstehen nach jeder Hydroxylierung am B-Ring vier neue Isomere, beispielsweise für das 3'-,4'-dihydroxylierte Flavan-3-ol die Isomere (+)-Catechin, (-)-Catechin, (-)-Epicatechin und (+)-Epicatechin. In der Natur werden nur die Isomere (+)-Catechin und (-)-Epicatechin sowie davon abgeleitete Verbindungen in relevanten Mengen synthetisiert.<sup>32, 104</sup> Flavan-3-ole bilden an der C3-Position häufig Ester mit Gallussäure, z. B. das (-)-Epicatechin-3-*O*-gallat (**Abb. 1–10**).<sup>104</sup>

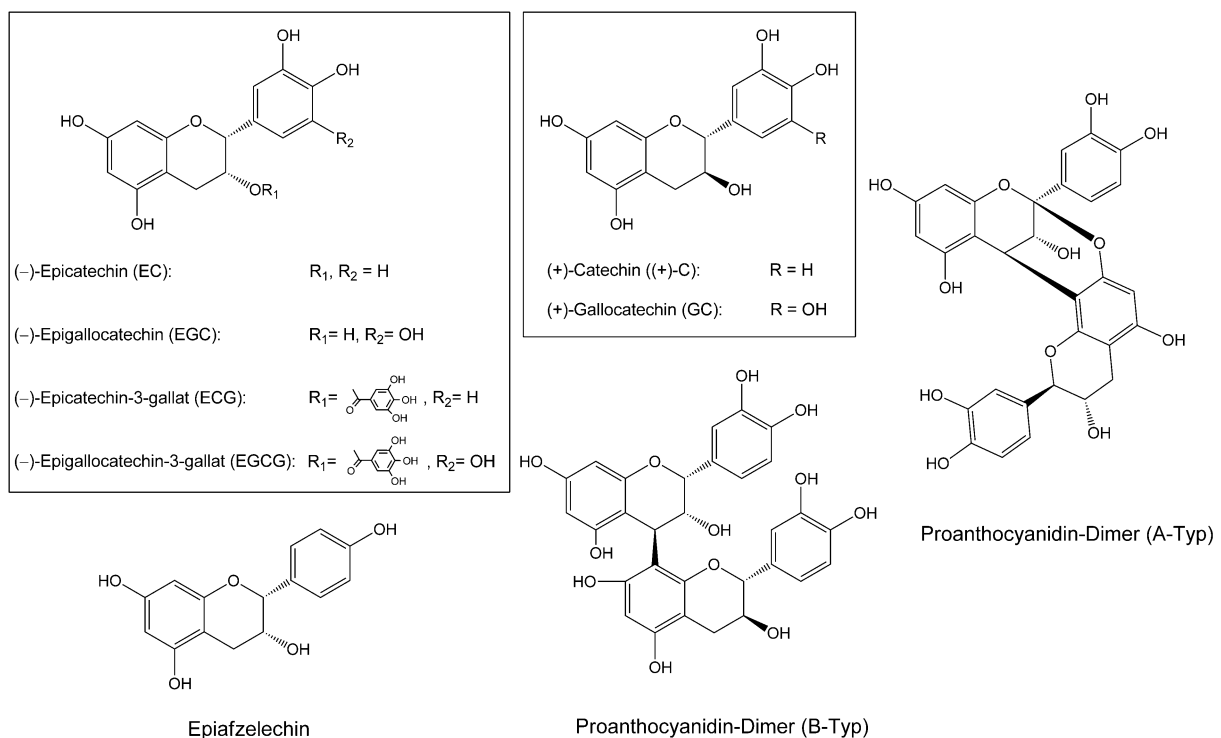
Im Tee sind die in monomerer Form vorliegenden Flavanole von großer Bedeutung. Dabei handelt es sich fast ausschließlich um die sog. *Catechine* (di- bzw. tri-hydroxylierter B-Ring) (**Abb. 1–10**). Außerdem ist (-)-Epiäfzelechin (4'-monohydroxyliert) in geringer Konzentration



## Einleitung und Grundlagen

vorhanden.<sup>32</sup> Quantitativ am bedeutendsten sind (–)-Epigallocatechingallat (EGCG), gefolgt von (–)-Epicatechingallat (ECG), (–)-Epigallocatechin (EGC) und (–)-Epicatechin (EC) sowie deren weniger häufig vorkommenden Epimeren (+)-Catechin ((+)-C), (+)-Gallocatechingallat (GCG) und (+)-Gallocatechin (GC).<sup>104-106</sup> Durch das Aufgießen mit heißem Wasser findet (insbesondere bei längerem Warmhalten) eine Epimerisierung der Catechine an der C2-Position statt.<sup>105</sup>

Durch Oligo- und Polymerisierung bilden Flavanole zudem die Subklasse der Proanthocyanidine (auch: *kondensierte Tannine*). Diese setzen sich vornehmlich aus (+)-C und (–)-EC-Einheiten, vereinzelt auch aus (–)-Epiafzelechin oder GC und EGC sowie deren Galloylestern zusammen. Es wird zwischen zwei Typen unterschieden. Typ B-Proanthocyanidine besitzen eine C–C-Bindung zwischen der Position C4 und C6 oder C8, während Proanthocyanidine des A-Typs eine zusätzliche Etherbindung an den Positionen C2 und C7 aufweisen (**Abb. 1–10**). Proanthocyanidine sind zu etwa 0,8% i. Tr. in grünem und zu 0,5% i. Tr. in schwarzem Tee enthalten.<sup>32, 92, 96</sup>



**Abb. 1–10** Strukturformeln einiger Flavanole im Tee (verändert nach STODT & ENGELHARDT, 2013).<sup>107</sup>

Die Flavanol-Gehalte sind stark von der Verarbeitung des Tees abhängig. Im Schwarztee dominieren oxidierte und oligomere Formen der Flavanole (u. a. Theaflavine, Bisflavanole, Thearubigene). Die dafür ursächlichen Reaktionen werden im Folgenden näher betrachtet.



### 1.3.2.4 Bildung von Schwarztee-Polyphenolen mittels enzymatisch katalysierter Oxidation

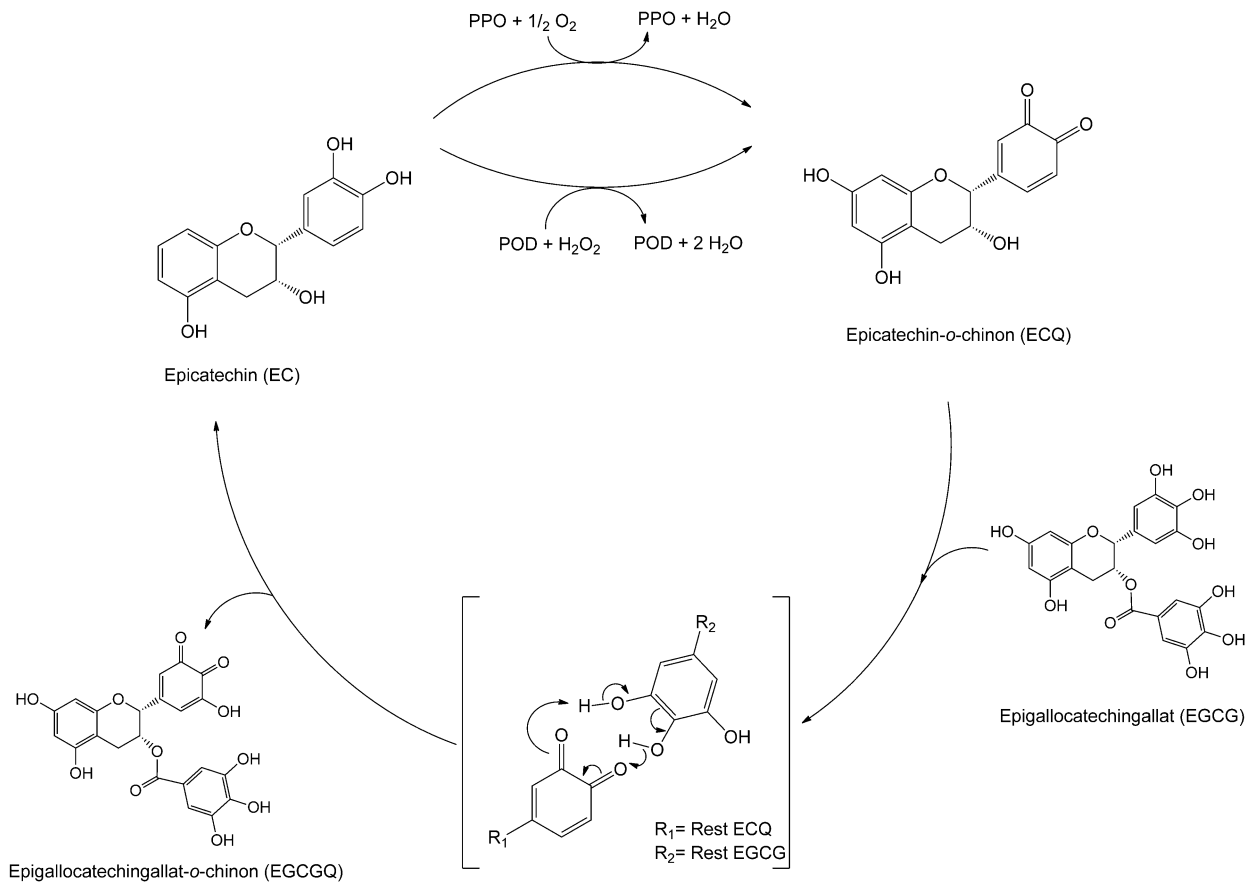
#### Enzymatisch katalysierte Einleitung der Oxidation und Modellsysteme

Die grundlegenden chemischen Prozesse in der Schwarzteeherstellung werden nach der Zerstörung der Zellstruktur durch enzymatisch katalysierte Oxidationsreaktionen an den Flavanolen eingeleitet. Von maßgeblicher Bedeutung ist das Enzym Polyphenoloxidase (PPO, EC 1.10.3.1), welches mit Sauerstoff als Cosubstrat die Oxidation des *ortho*-Diphenols am B-Ring initiiert. Es bildet sich ein *ortho*-Chinon, das eine hohe Reaktivität gegenüber Nucleophilen aufweist (**Abb. 1–11**).<sup>108-113</sup> Als Nebenprodukt dieser Reaktion entsteht Wasserstoffperoxid.<sup>114</sup> Dies geschieht bevorzugt bei der Oxidation von Catechinen des Pyrogallol-Typs (3',4',5'-trihydroxylierter B-Ring, z. B. EGC und EGCG) und führt zu einer Anreicherung des Wasserstoffperoxids in signifikanter Menge (im Modellversuch wurden Konzentrationen von 230–390 µM nachgewiesen). Wasserstoffperoxid dient dem Enzym Peroxidase (POD, EC 1.11.1.7) als Cosubstrat und katalysiert ebenfalls die Oxidation der Flavanole unter Bildung von *ortho*-Chinonen.<sup>111, 115-117</sup> Zusätzlich kommt es im Verlauf der Oxidation zur Freisetzung von Gallussäure, z. B. durch oxidative Spaltung von Galloylestern der Catechine, und somit zu einem Absinken des pH-Wertes.<sup>118-120</sup> Im frischen Blatt liegt dieser bei etwa 5,6, was auch in etwa dem pH-Optimum der PPO entspricht, während das Optimum der POD bei pH 4,7–5,0 liegt.<sup>110, 115, 121</sup> Infolge der Wasserstoffperoxid-Bildung und des sinkenden pH-Wertes steigt die Aktivität der POD im Laufe der Fermentation an und trägt damit entscheidend zum Oxidationsablauf bei. Die Bildung der *o*-Chinone ist in **Abb. 1–11** dargestellt. Aufgrund ihres Elektronenmangels verhalten sich die *o*-Chinone reaktiv, so dass sie zum Ausgangspunkt weiterer und nur zum Teil aufgeklärter Reaktionen werden, an denen die Enzyme in der Regel nicht beteiligt sind.<sup>122-123</sup> Es wurde berichtet, dass PPO bevorzugt Catechine in der Epi-Form und ohne Galloylfunktion sowie mit zweifach hydroxyliertem B-Ring (Catechol-Typ) oxidiert. Somit stellt EC das primäre Substrat unter den Tee-Catechinen dar.<sup>59, 119, 124-127</sup> Da das Redoxpotential der Flavanole in der Reihenfolge EGC < EGCG < ECG < EC ansteigt, kommt es nach der Bildung des Epicatechin-*o*-chinons (ECQ) zu Redoxreaktionen mit den anderen Catechinen, z. B. EGCG. Infolgedessen wird EGCG zum korrespondierenden *o*-Chinon (EGCGQ) oxidiert, während EC zurückgewonnen wird und erneut für die Enzyme PPO oder POD als Substrat zur Verfügung steht (**Abb. 1–11**).<sup>118, 120, 125-126, 128</sup>

Um die Bildung weiterer Reaktionsprodukte zu untersuchen, werden oftmals Modelloxidationen durchgeführt. Hierzu können sowohl Enzyme als auch chemische Oxidantien wie  $K_3Fe(CN)_6/NaHCO_3$  als Oxidationsmittel herangezogen werden, wobei letztere vornehmlich in

## Einleitung und Grundlagen

älteren Arbeiten zum Einsatz kamen.<sup>129-133</sup> Kürzlich wurde zudem über die Verwendung einer voltametrischen Methode zur elektrochemischen Oxidation von EGCG zu EGCGQ berichtet.<sup>134</sup> Bei der Verwendung von Enzymen sind frisches und zerkleinertes Teeblattmaterial sowie aus Tee extrahierte PPO eingesetzt worden.<sup>119, 124, 135-138</sup>



**Abb. 1–11** Schematische Darstellung der enzymatischen Oxidation und anschließenden Rückgewinnung des EC. Im ten Schritt wird das EC mit PPO und Sauerstoff bzw. POD und Wasserstoffperoxid zu dessen *o*-Chinon ECQ oxidiert. aufhin kommt es zur Redoxreaktion des B-Ringes mit dem B-Ring eines EGCG-Moleküls unter Bildung von EGCGQ und EC.

Ferner wurden Enzyme aus anderweitigen pflanzlichen Quellen, z. B. Meerrettich-Peroxidase (HR-POD) in Kombination mit Wasserstoffperoxid, genutzt.<sup>139-142</sup> Nach Modellversuchen mit Tee-PPO und (HR-)POD konnten außerdem Vergleiche zwischen den Reaktionsprodukten mit diesen unterschiedlichen Enzymen vorgenommen werden.<sup>110-111, 115</sup> BONNELY et al. (2003) beschrieben ein System, das durch die Verwendung frischer, polyphenolfreier Teeblätter ermöglicht, Fermentationen selektiv mit endogener PPO und/oder POD durchzuführen.<sup>143</sup> Auch enzymhaltige Homogenate anderer Pflanzen wie Bananen, Birnen oder Loquat sind geeignet, Reaktionen ähnlich derer im Tee einzuleiten und wurden hierzu mehrfach verwendet.<sup>144-149</sup> TANAKA et al. (2002a) untersuchten 62 Pflanzenhomogenate hinsichtlich ihrer Fä-



higkeit, aus EC und EGC das Oxidationsprodukt Theaflavin zu bilden; dies gelang in 46 Fällen.<sup>126</sup>

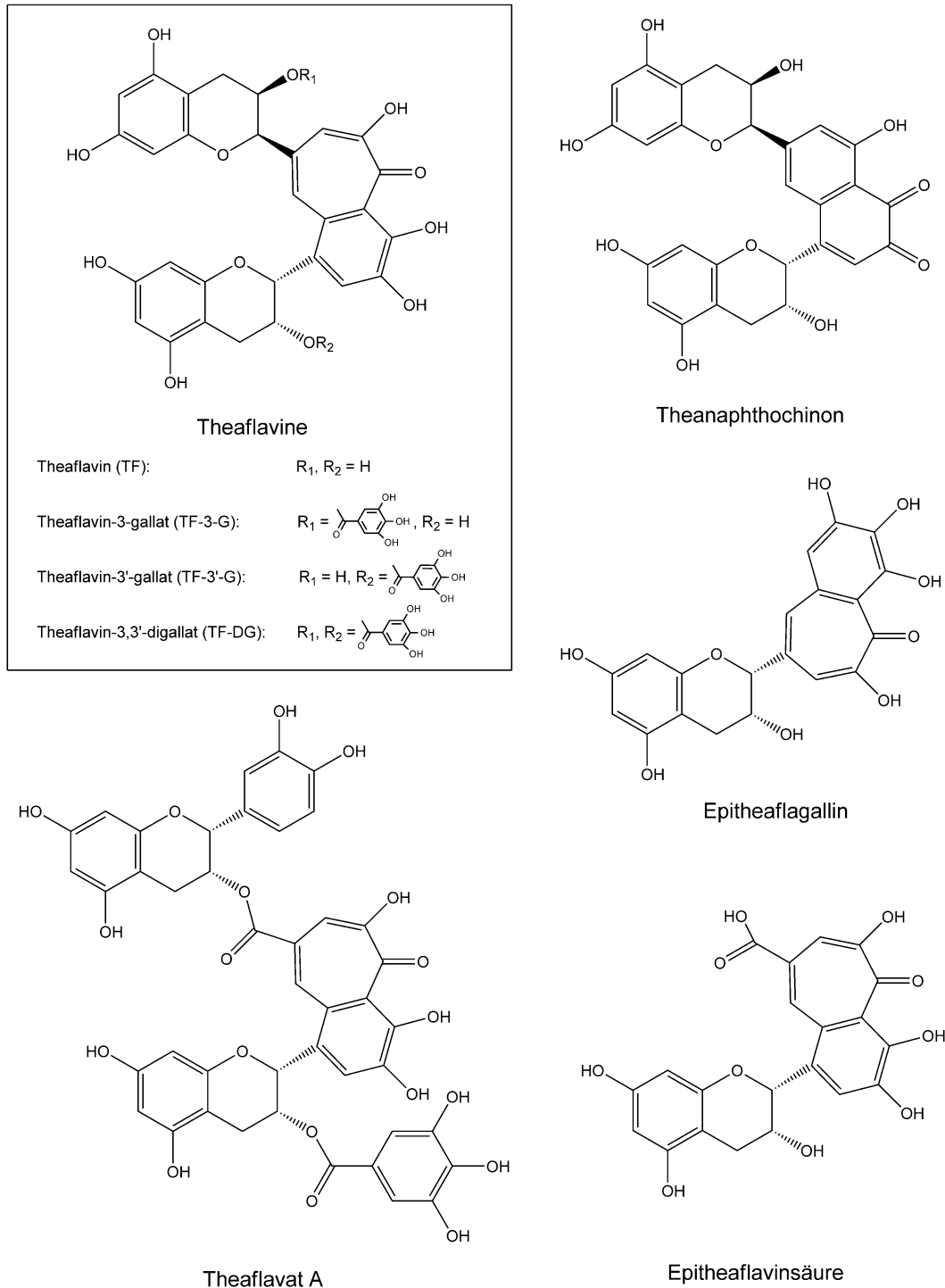
### Theaflavine und Derivate

*Theaflavin* (TF) und dessen Mono- und Digallatester (TF-3-G, TF-3'-G und TF-DG; **Abb. 1–12**) gehören zu den Hauptprodukten des Oxidationsprozesses (Gehalt: 0,07–1,45 % i.Tr.).<sup>106</sup> Gleichzeitig sind sie Ausgangspunkte für weitere Reaktionen. Theaflavine wurden schon früh im Schwarztee nachgewiesen und als wichtiger Inhaltsstoff erkannt.<sup>150-152</sup> Charakteristisch ist ihre intensiv orange-rote Farbe. Außerdem deuten Studien darauf hin, dass ein hoher Theaflavin-Gehalt in Schwarztee mit höheren Auktionspreisen korreliert und somit möglicherweise als Qualitätsmerkmal wahrgenommen wird.<sup>153-158</sup>

Prägendes Strukturmerkmal ist die 1',2'-Dihydroxy-3,4-Benzotropolon-Einheit, die durch Verknüpfung von zwei Catechinen (davon eines des Catechol-Typs und eines des Pyrogallol-Typs) entsteht. Während die Strukturen bekannt sind,<sup>129, 159-160</sup> ist der Bildungsmechanismus nicht gänzlich geklärt.<sup>128, 158-159</sup> Fraglich ist, ob zu Beginn der Reaktion beide Flavanole oder nur jenes mit dihydroxyliertem B-Ring als Chinone vorliegen. Für den ersten Fall wird eine Michael-Addition postuliert, welche nach Addition einer Carbonylgruppe zur Bildung eines Intermediates mit Bicyclo[3.2.1]octan-Struktur an den B-Ringen führt. Nach einer Decarboxylierung geht daraus das Theaflavin hervor.<sup>111, 135, 140-141</sup> Alternativ wird eine 2-stufige Addition zwischen *o*-Chinon und trihydroxyliertem B-Ring angenommen, bei der ebenfalls das Bicyclo[3.2.1]octan-Zwischenprodukt entsteht.<sup>127, 149, 161</sup> Die Bildung dieses Intermediates konnte nachgewiesen werden.<sup>162-163</sup> Neben den häufig auftretenden Galloylierungen an der C-3- und C-3'-Position wurden auch Theaflavin-tri- und tetra-gallate mit zusätzlicher Galloylfunktion an der Position C-5 und/oder C-5' gefunden.<sup>164</sup> Sind an der Bildung die in *C. sinensis* nur in vergleichsweise geringer Menge enthaltenen Epimere (+)-C und CG beteiligt, kommt es zur Bildung von Neo- bzw. Iso-Theaflavinen.<sup>165-166</sup> Deren Quantifizierung kann per HPLC-DAD<sup>90</sup> oder als Summenparameter mit der Flavognost-Methode<sup>167</sup> erfolgen.

Es sind weitere dimere Polyphenole mit 1',2'-Dihydroxy-3,4-Benzotropolon-Einheit im Tee bekannt. Zum einen handelt es sich dabei um die *Theaflavinsäuren*, welche 1970 erstmals in Modelloxidationen synthetisiert und 1972 in Tee nachgewiesen wurden. Ihre Bildung erfolgt durch die Reaktion eines Catechins des Catechol-Typs mit Gallussäure.<sup>118, 129, 131, 168-169</sup> So entsteht beispielsweise die Epitheflavinsäure (**Abb. 1–12**) durch Kondensation des B-Ringes von EC mit dem Pyrogallol-Ring der Gallussäure.

## Einleitung und Grundlagen



**Abb. 1–12** Strukturformeln der vier häufigsten Theaflavine sowie weiterer in schwarzem Tee nachgewiesener Polyphenole mit Benzotropolonstruktur (Theaflavat A, Epitheaflagallin, Epitheaflavinsäure) und eines Theaflavin-Derivates (Theanaphthochinon).

In jüngerer Zeit konnten bei Modellfermentationen Theaflavine mit zwei bzw. drei Benzotropolon-Einheiten synthetisiert werden (*Theadibenzotropolon A, B* und *C* sowie *Theatribenzotropolon A*). Bezüglich der *Theadibenzotropolone A* und *B* gelang der Nachweis auch in Schwarzteeproben.<sup>139-140</sup>



## Einleitung und Grundlagen

Zuvor war bereits über die *Theaflavate* A, B und C berichtet worden. Diese Flavanol-Di- und Trimere werden durch 1',2'-Dihydroxy-3,4-Benzotropolon-Einheiten gekennzeichnet, welche sich durch Verknüpfung eines dihydroxylierten B-Ringes mit der Galloylgruppe eines weiteren Flavanols gebildet haben (**Abb. 1–12**).<sup>127, 133, 165</sup>

Darüber hinaus sind im schwarzen Tee Oxidationsprodukte mit 1',2',3'-Trihydroxy-3,4-Benzotropolon-Einheit bekannt, deren zusätzliche Hydroxylgruppe aus der Beteiligung zweier Pyrogallol-Ringe an der vorhergehenden Kondensationsreaktion hervorgeht.<sup>91</sup> Erstmals gelang NONAKA et al. (1986) die Isolierung von *Theaflagallinen* (**Abb. 1–12**) aus Tee sowie deren Synthese mit Gallocatechinen und Gallussäure.<sup>170</sup> MATSUO et al. (2006, 2009) konnten zeigen, dass auch eine Herstellung aus zwei Catechinen des Pyrogallol-Typs in Abwesenheit von Gallussäure möglich ist. Die Reaktion verläuft ebenfalls über ein Intermediat mit Bicyclo[3.2.1]octan-Struktur, worauf die Bildung eines Proepitheaflagallins folgt. Dieses ist instabil und geht durch Spaltung am C-Ring zum korrespondierenden Theaflagallin über oder bildet durch Umlagerung ein *Hydroxytheaflavin*, welches sich von den Theaflavinen nur durch die zusätzliche Hydroxyl-Gruppe an der Benzotropolon-Einheit unterscheidet.<sup>148, 163</sup> Im Gegensatz zu den Theaflagallinen wurde Hydroxytheaflavin bisher nicht in Schwarztee nachgewiesen.<sup>123</sup>

Wie in mehreren Studien beobachtet wurde, werden die Theaflavine früh im Laufe des Fermentationsvorganges gebildet und unterliegen mit fortwährender Dauer einem Abbau.<sup>59, 95, 124-125, 151, 171-172</sup> Daher liegt die Vermutung nahe, dass weitere Oxidationsreaktionen ablaufen. Wie Modellversuche zeigten, wird Theaflavin allein nicht von PPO umgesetzt. Erfolgt jedoch eine Zugabe von EC, so ergibt sich ein schneller Abbau des Theaflavins, welches demnach als Nucleophil mit ECQ zu reagieren scheint. Eine entsprechende Reaktion mit EGC konnte nicht beobachtet werden, was auf das geringere Redoxpotential des EGC zurückgeführt wird.<sup>120, 128</sup> Als ein Hauptprodukt der Oxidation wurde von TANAKA et al. (2000) das *Theanaphthochinon* (**Abb. 1–12**) als rötliches Pigment isoliert. Die Bildung wurde in weiteren Modellversuchen bestätigt,<sup>142, 147</sup> ein Nachweis über die Anwesenheit in Tee erfolgte 2010.<sup>173</sup> Jüngst wurde über die Synthese eines neuartigen Oxidationsproduktes des Theanaphthochinons bei einer Modelloxidation mit HR-POD und Wasserstoffperoxid berichtet. Es wird angenommen, dass die *Theacoumarin* A genannte Verbindung auch bei der Schwarzteeherstellung gebildet wird.<sup>174</sup> Weitere in Modellversuchen erzeugte Oxidationsprodukte auf Theaflavinbasis sind das *Dehydrotheaflavin* sowie die *Bistheaflavine* A und B.<sup>144, 175</sup> Bei letzteren handelt es sich um dimere Theaflavine (bzw. tetramere Catechine), deren Verknüpfung an den Benzotropolon-Einheiten erfolgt ist. Analog dazu wurde die Bildung von *Bis-*



## Einleitung und Grundlagen

*theaflavat* A aus Theaflavat A beschrieben.<sup>127</sup> Ein Nachweis dieser Komponenten in schwarzem Tee ist bisher nicht erfolgt. Bereits ROBERTS (1958a) vermutete jedoch, dass der Abbau von Theaflavinen v. a. zur Bildung der sog. Thearubigene führt (s. Abschnitt 1.3.2.5).<sup>151</sup> Es ist daher naheliegend, dass die in den chemisch weniger komplexen Modellversuchen generierten Oxidationsprodukte zumindest in geringen Gehalten im Schwarztee enthalten sind oder als Zwischenstufen weiter umgesetzt werden.

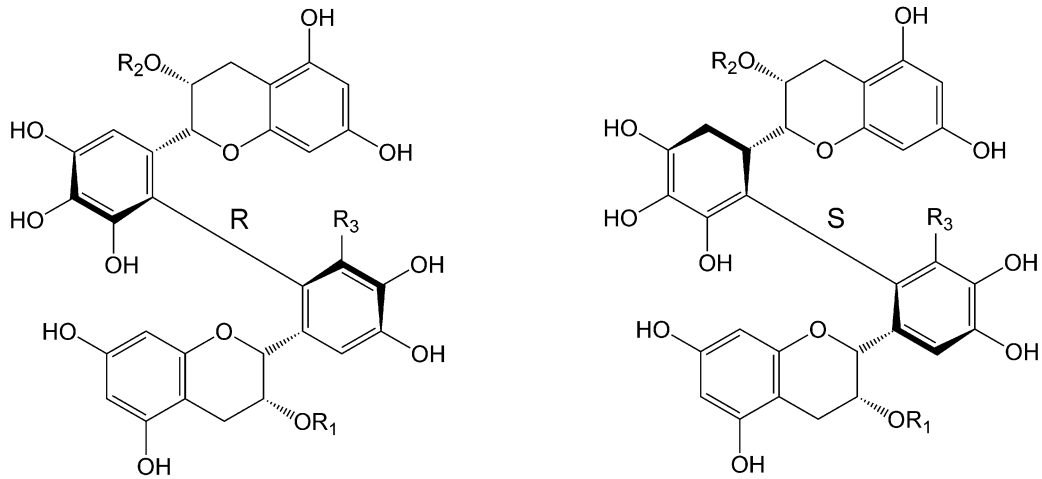
### Theasinensine (Bisflavanole)

*Theasinensine* (**Abb. 1–13**), auch *Bisflavanole* genannt, sind Flavanol-Dimere (bevorzugt vom Pyrogallol-Typ), die durch eine biphenylische C–C-Bindung an den 2'-Positionen der B-Ringe verknüpft sind. Damit entstehen sie über einen zweiten wichtigen Dimerisierungsmechanismus neben dem der Theaflavine. Nach der Beschreibung durch ROBERTS (1958c) erfolgte die Strukturaufklärung durch FERRETTI et al. (1968) und die Arbeitsgruppe um NISHIOKA.<sup>152, 176-179</sup> Gegenwärtig sind acht Theasinensine (A–H) bekannt, bei denen es sich jeweils um Atropisomerenpaare handelt (A↔D, B↔H, C↔G, F↔G).<sup>178, 180</sup> Parallel zur Bildung von Theasinensinen wurde die Entstehung eines als Oolongtheanin bezeichneten Dimers beobachtet.<sup>91, 178</sup> Nachfolgende Studien der Gruppe um TANAKA lassen den Schluss zu, dass ein Großteil der Theasinensine erst durch die Hitze einwirkung im letzten Herstellungsschritt, der Enzyminaktivierung und Trocknung, gebildet wird. Während der Fermentation entstehen die labilen Dehydrotheasinensine (zweifach verknüpfte Catechin-Dimere), welche oxidativ zum entsprechenden Oolongtheanin bzw. durch Disproportionierung zum entsprechenden Theasinensin-Paar umgesetzt werden.<sup>126, 148, 180-183</sup> Via enzymatischer Modelloxidation konnten LI et al. (2007) vier EGCG-Trimere des Theasinensin-Typs herstellen und als Phenazinderivate isolieren.<sup>181</sup> Interessanterweise wiesen diese neben der üblichen 2'–2'-Verknüpfung der B-Ringe eine gleichartige Bindung zwischen einem B-Ring und dem Pyrogallol-Ring eines Galloyl-Esters auf. Eine entsprechende Verknüpfung ist bei Dimeren bisher nicht bekannt und ein Vorkommen der Trimere in Schwarztee nicht bestätigt. Der Bisflavanolgehalt liegt bei etwa 0,05 % i. Tr. im Grüntee und ca. 0,65 % i. Tr. im Schwarztee.<sup>96</sup>

### Theacitrine

DAVIS et al. (1997) gelang die Isolierung der *Theacitrine* A–C, dreier gelber Substanzen aus Schwarztee mit neuartiger Grundstruktur (**Abb. 1–13**). Es handelt sich um Catechin-Dimere, die nach Reaktion der B-Ringe über ein C6-C1-C5-Gerüst verknüpft sind. Insbesondere in saurem Milieu verhalten sie sich instabil.<sup>184</sup> MATSUO et al. (2011) haben nach Durchführung von Modelloxidationen einen Bildungsmechanismus vorgeschlagen, der ähnlich dem der Theaflavine über ein Intermediat mit Bicyclo[3.2.1]octan-Struktur verläuft.<sup>149</sup>

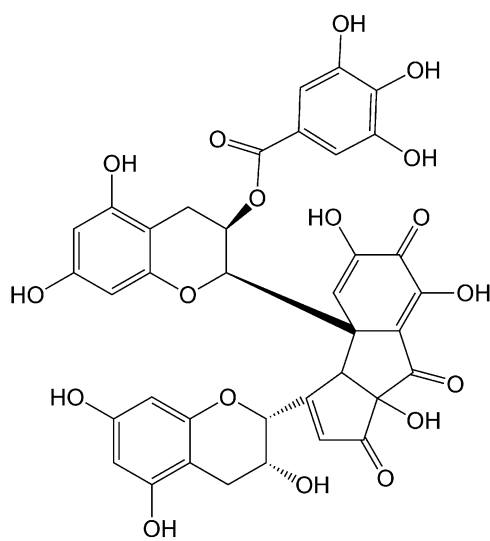
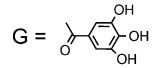
## Einleitung und Grundlagen



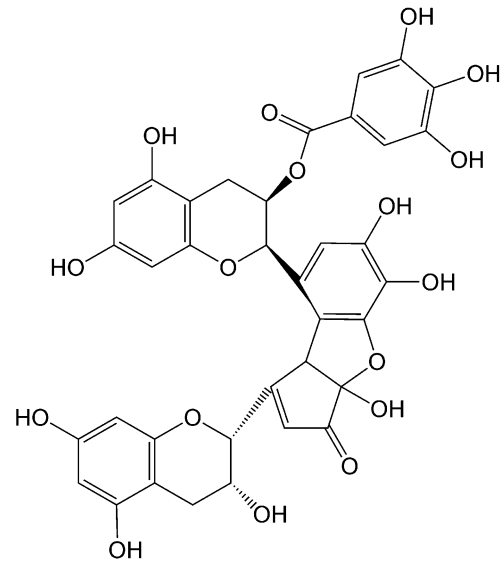
Theasinensine

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Theasinensin A	G	G	OH
Theasinensin B	G	H	OH
Theasinensin C	H	H	OH
Theasinensin F	G	G	H

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Theasinensin D	G	G	OH
Theasinensin H	G	H	OH
Theasinensin E	H	H	OH
Theasinensin G	G	G	H



Theacitrin A



Oolongtheanin

Abb. 1–13 Strukturformeln der Theasinensine, des Oolongtheanins sowie des Theacitrins A.

### 1.3.2.5 Thearubigene

Als Thearubigene (TRs) wird eine heterogene, hochkomplexe Gruppe (poly-)phenolischer Bestandteile in schwarzem Tee bezeichnet. TRs wurden bereits 1957 von ROBERTS et al. beschrieben. Im darauffolgenden Jahr wurde der Terminus *Thearubigene* als provisorischer Oberbegriff für alle braun gefärbten (poly-)phenolischen Pigmente mit sauren Eigenschaften im Tee eingeführt. Dieser wird bis heute benutzt.<sup>150 151</sup>



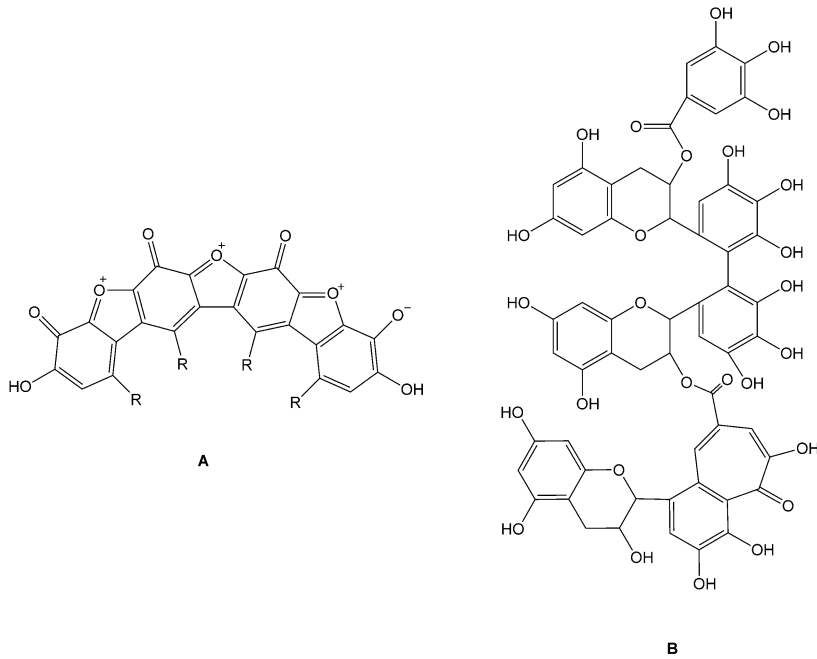


Abb. 1–14 Beispiele für vorgeschlagene Strukturformeln nach A: HASLAM (2003) und B: MENET et al. (2004).<sup>185-186</sup>

In zahlreichen Forschungsarbeiten konnte die Bedeutung dieser Substanzklasse als wertgebender Bestandteil des schwarzen Tees bestätigt werden. TRs stellen in den meisten Schwarztees die größte Gruppe phenolischer Komponenten dar und beeinflussen durch ihren Einfluss auf Farbe und Mundgefühl die sensorische Qualität des Tees.<sup>62, 137, 187-189</sup> Ferner sind gesundheitsfördernde Eigenschaften beschrieben worden (s. auch Abschnitt 1.1.5).<sup>41, 44-45, 190</sup>

Ungeachtet dieser Forschungen bestehen weiterhin große Lücken bezüglich der Bildungswege und chemischen Strukturen der TRs. Eine erste Fraktionierung wurde von ROBERTS et al. (1957) durchgeführt, die die TRs anhand ihrer Löslichkeit in Ethylacetat und *n*-Butanol in die sogenannten SI-, SII- und SIIa-Fractionen einteilten.<sup>150</sup> Diese Klassifizierung ist zu einem Standard in der Beschreibung von Thearubigen-Fractionen geworden und wird bis heute verwendet.<sup>191-193</sup> BAILEY et al. stellten 1991 eine alternative Einteilung vor. Anhand ihres chromatographischen Verhaltens bei der RP-HPLC wurden die phenolischen Komponenten des Schwarztees in drei Hauptgruppen unterteilt: Gruppe I umfasst diejenigen Inhaltsstoffe, welche von der Säule nicht retardiert wurden; Gruppe II enthält hingegen die Bestandteile, welche gut getrennt wurden. Diese Gruppe wurde in weitere Untergruppen (II.1–II.4) aufgeteilt. Die Substanzen, die nicht aufgelöst wurden und in einem breiten „Hügel“ (dem sog. *Hump*) eluierten, wurden einer dritten Gruppe zugeordnet.<sup>194</sup>

Konventionelle Strategien zur Trennung und Strukturaufklärung wie Isolierung und Aufreinigung einzelner Substanzen mittels Säulenchromatographie, Gegenstromverteilungschroma-



## Einleitung und Grundlagen

tographie oder präparativer HPLC sowie anschließender NMR-Spektroskopie sind aufgrund der hohen Komplexität der TRs nur eingeschränkt möglich. Zudem enthalten die Fraktionen nach ROBERTS et al. (1957) Verunreinigungen durch chemisch verwandte Polyphenole (Theaflavine, FOG, Catechine). Höhere Reinheitsgrade konnten mit Hilfe von HSCCC bzw. durch eine Fällung mit Coffein erzielt werden.<sup>195-196</sup>

Anhand von chemischen Abbauprodukten einer TR-reichen Fraktion schlossen OZAWA et al. (1996) darauf, dass TRs aus mehreren Flavanol-Einheiten aufgebaut sind, die über Bindungen am B-Ring (C6'-C6') oder zwischen C- und A-Ring (C4-C8, C4-C6) zu Polymeren verknüpft sind.<sup>197</sup>

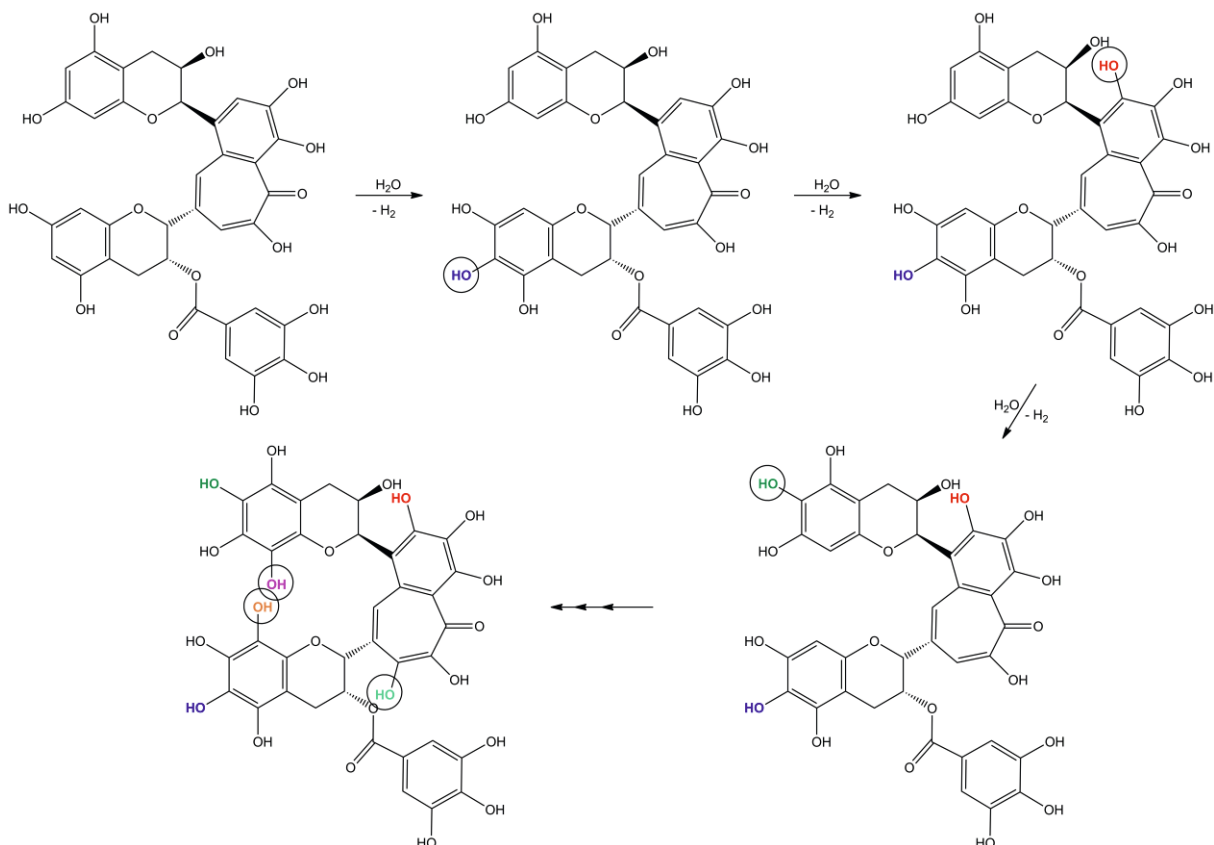
In theoretischen Überlegungen auf der Basis des bis dahin bekannten Wissens wurde 2003 eine planare, konjugierte Struktur der TRs durch oxidative Oligomerisierung am B-Ring angenommen. Mit der Bildung eines stabilen Anions würden sich die braune Farbe sowie die schwach sauren Eigenschaften erklären lassen (**Abb. 1-14**). Diese Hypothese konnte jedoch nie experimentell bestätigt werden.<sup>185</sup> MENET et al. (2004) nutzten MALDI-TOF Massenspektrometrie mit verzögerter Ionenextraktion (*delayed pulsed ion extraction*), um Ionen in der Quelle zu fragmentieren und aus den Fragmentmassen strukturelle Daten zu erhalten. Die Analyse angereicherter Schwarztee-Extrakte zeigte zahlreiche Signale mit m/z-Werten größer 1000. Aus der Auswertung wurde abgeleitet, dass es sich bei einem Teil der TRs um polymere Catechine mit variierendem Galloylierungsgrad handelt, während ein anderer Teil aus Catechin-Dimeren (z. B. Theasinensine) besteht, deren Gallatester eine Benzotropoloneinheit mit dem B-Ring anderer Flavane ausgebildet haben (**Abb. 1-14**).<sup>186</sup> In jüngerer Vergangenheit stellten Kuhnert et al. (2010) nach dem kombinierten Einsatz massenspektrometrischer Methoden die Hypothese einer oxidativen Kaskade auf.<sup>173, 198</sup> Dabei wurden 15 TR-Extrakte verwendet, welche zuvor mittels einer Mischung aus Coffein-Fällung und Roberts'-Fraktionierung erhalten worden waren.

Via MALDI-TOF-MS wurde zunächst ein Überblick über die Verteilung der Molekülmassen erhalten, anschließend folgte die Analyse mittels hochauflösender ESI-FT-ICR- (Elektronensprayionisations-Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz) Massenspektrometrie zur Aufklärung der Summenformel. Die komplexe Datenauswertung gelang unter Zuhilfenahme von Methoden aus dem Bereich der petrochemischen Analytik (van Krevelen- und Kendrick-Plot).

Anhäufungen bestimmter Massen (Cluster) deuteten darauf hin, dass die TRs aus bis zu 7 Catechin-Einheiten mit Molekülmassen von bis zu 2100 Da aufgebaut sind. Je TR-Fraktion

wurden 8000–10000 Signale detektiert, denen bis zu 1500 Summenformeln zugeordnet werden konnten. Aufgrund der hohen Anzahl an möglichen Isomeren können die einzelnen Fraktionen bis zu 30000 Substanzen enthalten. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde eine dreistufige Hypothese für die Bildung von TRs formuliert: Im ersten Schritt erfolgt eine Oligomerisierung der Catechine (2–7 Einheiten) basierend auf den vier bekannten Verknüpfungswegen der Theaflavine, Theasinensine, Theanaphthochinone und Theacitrine. Es folgt eine Oxidation zum *o*-Chinon, woraufhin eine nucleophile aromatische Addition von Wasser als Nucleophil stattfindet (formal: Einbau eines Sauerstoffatoms in eine aromatische C–H-Bindung). Dieser Schritt führt zu einer Verringerung des Redoxpotentials und begünstigt damit die erneute Oxidation zum *o*-Chinon, gefolgt von einer weiteren Addition von Wasser. Dadurch wiederholt sich der Vorgang kaskadenartig, bis alle verfügbaren Positionen substituiert wurden. Die dritte Stufe wird durch die Ausbildung eines Redox-Gleichgewichtes zwischen dem polyhydroxylierten Oligomer und seinem entsprechenden *o*-Chinon erreicht.

**Abb. 1–15** verdeutlicht den zweiten Schritt der oxidativen Kaskade am Beispiel der Polyhydroxylierung von TF-3-G.

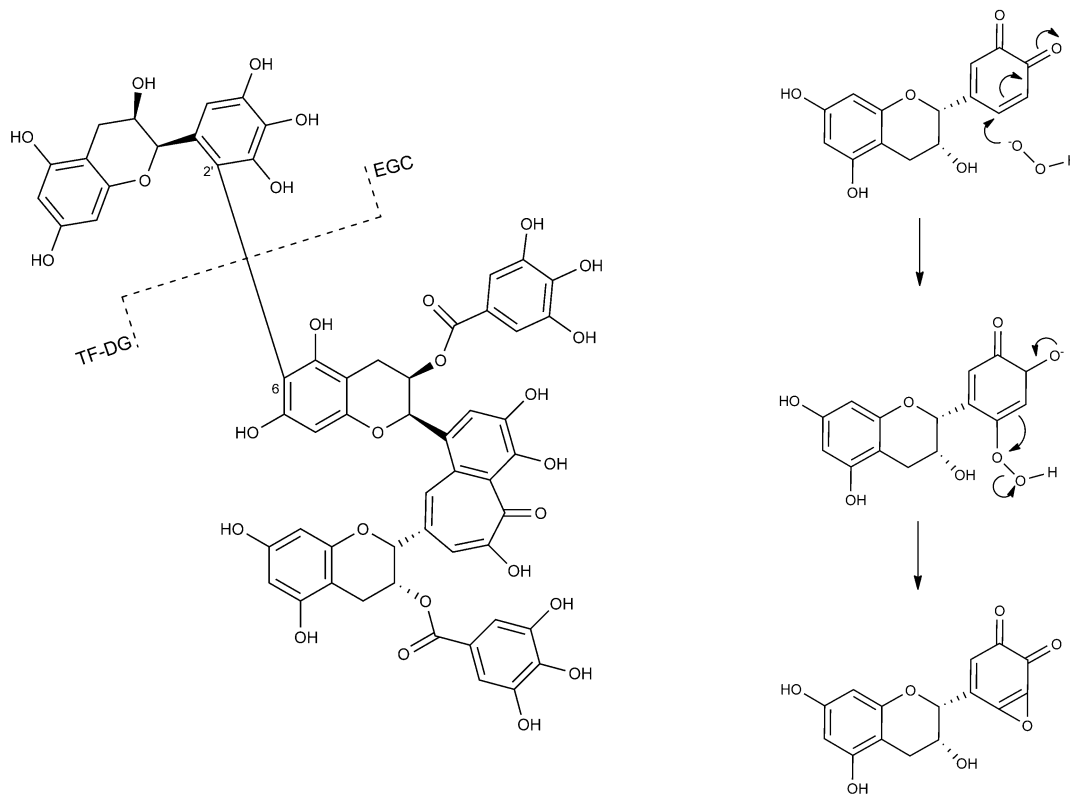


**Abb. 1–15** Ablauf des zweiten Schrittes der oxidativen Kaskade nach der Hypothese von KUHNERT et al. (2010) am Beispiel von Theaflavin-3-gallat (Graphik aus STODT & ENGELHARDT, 2013).<sup>107, 198</sup>

Die Hypothese wird durch die Arbeit von DRYNAN et al. (2012) unterstützt, welche auf Analysen mittels MALDI-TOF-MS beruht. Dabei wurden die gleichen 15 Schwarztee-Extrakte un-

tersucht und in jeder Probe 1000–4500 Signale detektiert, die sich im Bereich von Clustern mit  $m/z$  610, 760, 910, 1060, 1210, 1360, 1500 und 1650 konzentrierten. Innerhalb dieser Cluster zeigten sich Intervalle von +16 Da und –2 Da, so dass eine Addition von Sauerstoff bzw. eine Abspaltung von  $H_2$  denkbar ist.<sup>199</sup>

In weiteren Arbeiten konnten der Hypothese entsprechende polyhydroxylierte Derivate von Theasinensin und Theanaphthochinon mittels LC-ESI-MS<sup>n</sup> nachgewiesen und die Strukturen tri- und tetramerer Flavan-3-ole mit einer Theaflavin- bzw. Theasinensin-Grundstruktur aufgeklärt werden (**Abb. 1–16**).<sup>193, 200</sup> Darüber hinaus wurde auf Basis der massenspektrometrischen Ergebnisse ein weiterer Oxidationsmechanismus vorgeschlagen, bei dem Wasserstoffperoxid anstelle von Wasser als Nucleophil am oxidierten B-Ring angreift und zur Bildung von Epoxiden führt (**Abb. 1–16**).<sup>200</sup>



**Abb. 1–16** Links: Beispiel für ein Flavanol-Trimer, welches durch C-C-Bindung einer EGC-Einheit an Theaflavindigallat gebildet wird; rechts: hypothetische Oxidation eines Flavanol-Chinons durch nucleophilen Angriff von  $H_2O_2$  unter Bildung eines Epoxides am B-Ring.<sup>193, 200</sup>

Die Ergebnisse aus dem Arbeitskreis von KUHNER stellen möglicherweise nur einen Ausschnitt aus dem Gesamtbild dar, es handelt sich dabei jedoch um den bisher weitreichendsten Ansatz.

### Quantifizierung

Trotz der Fortschritte in der Strukturaufklärung ist bis heute keine Methode verfügbar, mit der sich Thearubigene zuverlässig quantifizieren lassen. In den meisten Fällen sind die Me-



## Einleitung und Grundlagen

thoden zu unspezifisch, so dass andere Teebestandteile wie FOG mitbestimmt werden.<sup>201-202</sup>

Ein Ansatz ist daher, den Gehalt indirekt durch die Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes und die Subtraktion möglichst vieler separat quantifizierbarer Komponenten abzuschätzen (s. Gleichungen 1–1 und 1–2).<sup>187</sup>

$$\text{Gesamtflavonoide} = \text{Gesamtphenole} - (\text{Gallussäure} + \text{Theogallin} + \text{Chlorogensäuren}) \quad (1-1)$$

$$\text{Thearubigene} = \text{Gesamtflavonoide} - (\text{Catechine} + \text{Theaflavine} + \text{Flavonole} + \text{Flavone}) \quad (1-2)$$

Dieses Verfahren ist allerdings durch die Vielzahl der zu bestimmenden Variablen fehleranfällig und mit einem hohen Zeitaufwand verbunden.

### 1.3.2.6 Sonstige Oxidationsprodukte

In der Literatur sind einige weitere Catechin-Dimere beschrieben. Es handelt sich weitgehend um einzelne Komponenten, deren Synthesemechanismen mutmaßlich eine untergeordnete Rolle innerhalb der Reaktionsabläufe in der Schwarzteeherstellung spielen.<sup>144-145, 175, 203-204</sup> Oftmals fehlt ein Nachweis über die Anwesenheit in authentisch fermentierten Tees, weshalb hierauf nicht näher eingegangen werden soll.

SHAO et al. (1995) berichteten über die Anwesenheit von TRs in Pu-Erh-Tee. Da jedoch keine Vorstufen wie Theaflavine nachgewiesen wurden, ist es denkbar, dass diese „Pu-Erh-Thearubigene“ gegenüber konventionell oxidierten TRs eine abweichende chemische Struktur besitzen.<sup>205</sup>

Des Weiteren sind Reaktionsprodukte aus Polyphenolen und weiteren Teebestandteilen beschrieben. So gelang TANAKA et al. (2005) die Isolierung von Ethylpyrrolidinonyl-Theasinensin A, welches sich aus einer Theasinensin A-Einheit und einem Strecker-Abbauprodukt des L-Theanins zusammensetzt. Dabei wurde gezeigt, dass im Rahmen des Strecker-Abbaus von Aminosäuren Aldehyde gebildet werden, womit sich möglicherweise auch die Bildung der bereits 1989 von HASHIMOTO et al. charakterisierten Oolonghomobisflavane A und B erklären lässt.<sup>206-207</sup> Außerdem konnte ein Dimer aus EGCG und Dehydroascorbinsäure isoliert werden.<sup>207</sup> In weiteren Arbeiten wurde das Theogallinin, ein Dimer aus EGCG und Theogallin, isoliert. Dieses ist ähnlich den Theasinensinen über eine biphenylische C–C-Bindung zwischen dem B-Ring des EGCG und der Pyrogallol-Einheit des Theogallins verknüpft. Zudem konnten zwei Bisflavonoide mit 2,2'-Verknüpfung der B-Ringe aus EGC bzw. EGCG und dem Flavonol-Glycosid Isomyricitrin isoliert werden.<sup>91</sup>



## 1.4 Gegenstromverteilungschromatographie

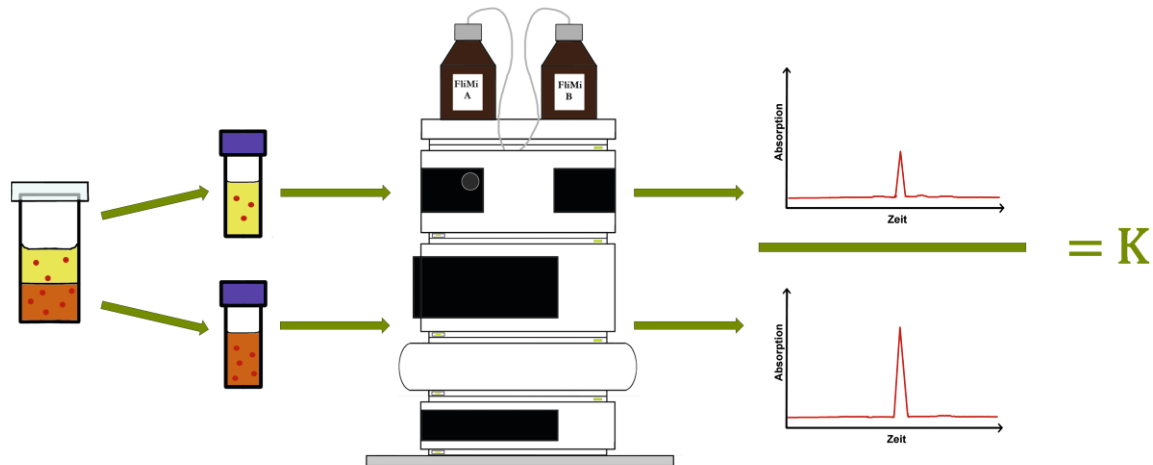
### 1.4.1 Prinzip und Grundlagen

Bei der Gegenstromverteilungschromatographie (engl.: *Countercurrent chromatography*, kurz CCC) handelt es sich um eine spezielle Form der flüssig-flüssig-Chromatographie. Diese wurde in ihrer modernen Form seit den 1960er-Jahren insbesondere durch Dr. YOICHIRO ITO entwickelt, Urformen wurden jedoch bereits 1934 beschrieben.<sup>208-210</sup> Die Trenntechnik basiert auf dem Prinzip zweier nicht miteinander mischbarer Phasen, von denen eine Phase die stationäre Phase bildet, durch welche sich die andere, mobile Phase hindurchbewegt. Streng genommen handelt es sich dabei um keinen echten „Gegenstrom“.<sup>211</sup> Der Analyt wird in gelöster Form (in der Regel in einer Mischung der beiden Phasen) in die mobile Phase eingebracht und durchläuft mit dieser die stationäre Phase. Hierbei kommt es zu Mischungs- und Entmischungsvorgängen, bei denen sich der Analyt entsprechend den Eigenschaften seiner Bestandteile in den beiden Phasen verteilt und von der stationären Phase retardiert wird. Die mobile Phase trägt somit die Inhaltsstoffe in zunehmendem Maße aufgetrennt mit sich.<sup>212</sup> Bei Austritt aus dem System kann das Eluat wie bei chromatographischen Trennungen üblich z. B. mit einem UV-Detektor detektiert und mit Hilfe eines Fraktionensammlers fraktioniert aufgefangen werden. Auch eine Kopplung an Massenspektrometer wurde bereits mehrfach beschrieben (z. B. ITO et al., 2008; MCGUIRE et al., 1995).<sup>213-214</sup> Während eines CCC-Laufs besteht allerdings die Möglichkeit, dass die Analyten eine zu starke Affinität entweder zur mobilen oder zur stationären Phase aufweisen, so dass sie ohne Auftrennung bereits im Moment des Durchbruchs der mobilen Phase eluieren oder aber in der Säule verbleiben bzw. erst nach sehr langer Trenndauer und in einem breiten Peak eluieren.

### 1.4.2 Fließmittelsysteme

Damit eine möglichst gleichmäßige Verteilung in den Phasen und somit eine gute Trennung gewährleistet werden kann, muss ein an das Trennproblem angepasstes 2-Phasensystem gewählt bzw. entwickelt werden. Sind in der Literatur für den gewünschten Anwendungsbereich keine Fließmittelsysteme beschrieben, können Vorversuche durchgeführt werden. Hierzu wird eine geringe Menge der Probe in wenigen Millilitern des Fließmittelsystems gelöst und nach gründlicher Durchmischung die Verteilung in den Phasen bestimmt (**Abb. 1–17**). Bei der Ermittlung geeigneter 2-Phasen-Systeme ist zudem auf eine ausreichend schnelle und saubere Trennung der Phasen zu achten.<sup>215</sup>

## Einleitung und Grundlagen



**Abb. 1–17** Schematische Darstellung der Bestimmung des Verteilungskoeffizienten  $K$ : Wenige mg Probe werden in einem Schnappdeckelglas in den beiden gegeneinander gesättigten Phasen des Fließmittelsystems gelöst. Anschließend werden die Phasen getrennt und mittels HPLC analysiert. Aus der Konzentration des Analyten in den beiden Phasen wird der Quotient berechnet ( $c_{\text{(stationäre Phase)}}$  /  $c_{\text{(mobile Phase)}}$ ). Dieser entspricht dem Verteilungskoeffizienten  $K$ .

Um dies zu ermöglichen, sollten die beiden Phasen des Fließmittels möglichst eine geringe Viskosität, eine hohe Grenzflächenspannung sowie einen hohen Dichteunterschied aufweisen.<sup>211, 216</sup> Aus der Verteilung des Analyten zwischen den beiden Phasen ergibt sich gemäß dem Nernst'schen Verteilungsgesetz der Verteilungskoeffizient  $K$ :<sup>212</sup>

$$K = \frac{c(\text{Probe})_{\text{stationäre Phase}}}{c(\text{Probe})_{\text{mobile Phase}}} \quad (1-3)$$

Dieser sollte im Bereich von 0,5–1,5 liegen.  $K$ -Werte von unter 0,5 führen aufgrund geringer Retention zu einer Elution der Substanzen mit dem Durchbruch der Fließmittelfront und somit zu einer schlechteren Auflösung. Verteilungskoeffizienten von über 1,5 erlauben dagegen zwar eine hohe Auflösung, erhöhen jedoch auch die Trenndauer und führen infolgedessen zu einer Verbreiterung der Peaks.<sup>211, 215</sup> Für viele Anwendungsbereiche sind bereits Fließmittel in der Literatur beschrieben. Ferner finden Fließmittelsysteme auf Basis der vier Komponenten Heptan/Ethylacetat/Methanol/Wasser (kurz HEMWat) vielfach Verwendung, da diese gute Eigenschaften für CCC-Trennungen aufweisen und durch Variation der jeweiligen Anteile der Komponenten für einen breiten Anwendungsbereich eingesetzt werden können.<sup>217</sup> Für sehr polare Trennungen kann ein Fließmittelsystem bestehend aus Ethylacetat/*n*-Butanol/Wasser (kurz EBUWat) verwendet werden.<sup>218</sup> Eine Reihe weiterer Fließmittelfamilien sind in der Literatur beschrieben (z. B. FRIESEN & PAULI, 2007; ITO, 2005).<sup>215, 217</sup>

Darüber hinaus kann zwischen verschiedenen Elutionsmodi gewählt werden. Die einzelnen Varianten sind abhängig vom jeweiligen Gerät und betreffen z. B. die Fluss- und Rotationsrichtung. Dadurch ist es beispielsweise möglich, im Rahmen einer Umkehr der Trennrichtung



die mobile und stationäre Phase zu vertauschen. Dies führt dazu, dass ein Analyt mit einem K-Wert von 2 im gewählten Fließmittelsystem und somit einer zu starken Retardation in der Folge einen K-Wert von 0,5 besitzt und schneller getrennt werden kann.<sup>215</sup> Sind in einer Probe Substanzen mit sehr unterschiedlichen K-Werten vorhanden, bieten sich Varianten wie der Dual Mode oder die Elusion Extrusion an. Kurz gefasst werden hierbei im Anschluss an eine zunächst normal durchgeführte Trennung die in der stationären Phase verbliebenen Komponenten durch das Einpumpen von frischer stationärer Phase aus der Säule gespült und können fraktioniert aufgefangen werden.<sup>211, 219-220</sup>

### 1.4.3 Die stationäre Phase

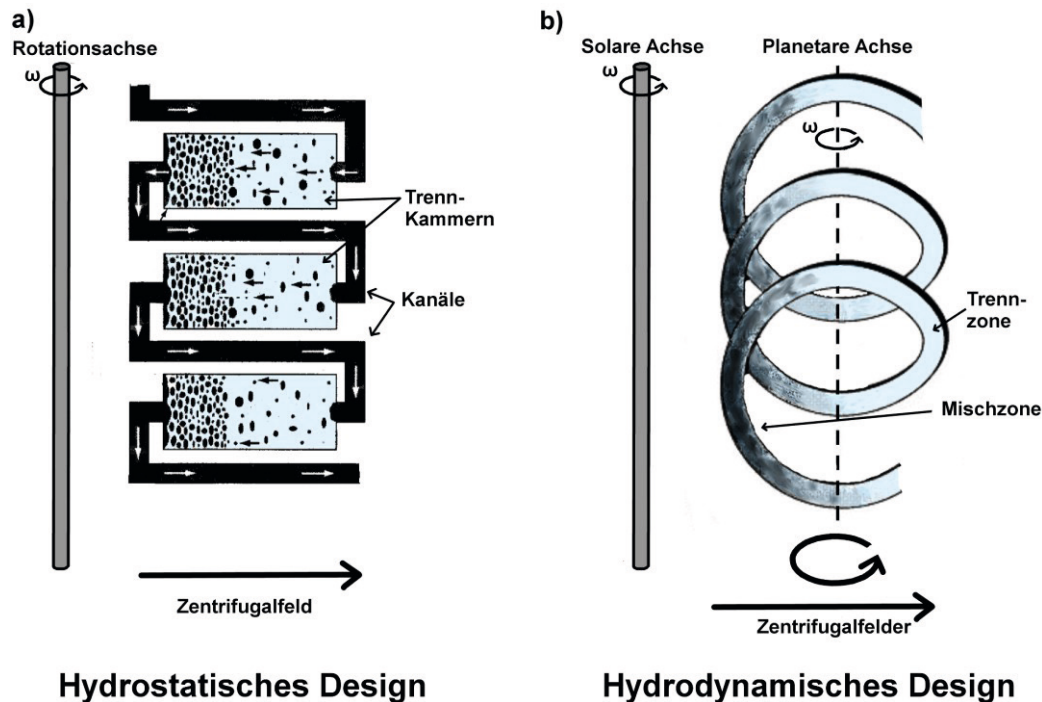
Eine grundsätzliche Schwierigkeit der Gegenstromverteilungschromatographie liegt darin, die flüssige stationäre Phase während der Trennung in quasikonstanter Position zu halten. In den ersten CCC-Geräten, der Droplet CCC, machte man sich hierzu die Schwerkraft zunutze. Diese vergleichsweise geringe Kraft bedingt jedoch lange Trenndauern, so dass in späteren Entwicklungen wesentlich stärkere Zentrifugalkräfte genutzt werden sollten.<sup>211, 221</sup>

In diesem Zusammenhang wird auch von der Retention der stationären Phase ( $S_F$ -Wert) gesprochen. Damit ist der Anteil der stationären Phase am gesamten Säulenvolumen (Coilvolumen) gemeint, welcher sich nach einer CCC-Trennung noch im Coil befindet. Durch das Einpumpen der mobilen Phase in die mit stationärer Phase gefüllte Säule wird notwendigerweise ein Teil der stationären Phase verdrängt. Es ist erstrebenswert, dass möglichst viel stationäre Phase in der Säule verbleibt, da ein großes Volumen der stationären Phase deren Ladekapazität erweitert. Somit wird bei einer Erhöhung der Retention auch die Auflösung der Peaks verbessert.<sup>222</sup> Ein hoher  $S_F$ -Wert wird u.a. durch eine hohe Rotationsgeschwindigkeit (= starkes Zentrifugalfeld), eine geringe Flussrate und eine schnelle Phasenbildung des Fließmittelsystems begünstigt.<sup>220</sup>

### 1.4.4 Hydrostatisches und hydrodynamisches Prinzip

Generell werden bei der CCC zwei Prinzipien unterschieden – die hydrostatische und die hydrodynamische Konfiguration. Vom hydrostatischen Prinzip spricht man, wenn in einem konstanten Zentrifugalfeld gearbeitet wird (entweder der Erdanziehungskraft oder mittels einer Rotationsachse erzeugt) und die Trennung in mehreren in Reihe geschalteten Kammern erfolgt (**Abb. 1–18 a**).<sup>211</sup> Eine Technik, der dieses Prinzip zugrunde liegt, ist die o.g. Droplet CCC, aber auch die modernere Centrifugal Partition Chromatography, kurz CPC.<sup>221, 223</sup>





**Abb. 1–18** Schematische Darstellung des hydrostatischen und hydrodynamischen Trennprinzips: *a)* Die schwere Phase (hellblau) dient als stationäre Phase und wird in den Trennkammern nach außen gedrückt. Aufgrund ihrer geringeren Dichte durchwandert die mobile Phase diese von außen nach innen und wird über einen schmalen Verbindungskanal zur nächsten Trennkammer geleitet, bis alle Kammern durchlaufen wurden. *b)* Auch hier wird die schwerere Phase nach außen gedrückt. Da das Zentrifugalfeld ständig die Richtung wechselt, entsteht jedoch ein Effekt wie bei einer archimedischen Schraube, wodurch die mobile Phase durch die stationäre Phase hindurch befördert wird. Die Verteilung des Analyten zwischen den Phasen findet vor allem in den Mischzonen nahe der Zentralachse statt (verändert nach BERTHOD et al., 2009).<sup>211</sup>

Heutzutage werden überwiegend Trenntechniken auf Basis des hydrodynamischen Prinzips angewandt. Hierbei handelt es sich typischerweise um Geräte, welche über eine Zentralachse sowie eine oder mehrere Planetenachsen verfügen und damit ein variables Zentrifugalfeld erzeugen. Infolgedessen wirkt der Coil wie eine archimedische Schraube und sorgt dafür, dass die stationäre Phase in diesem gehalten wird, während die mobile Phase entgegen der Schraubbewegung durch die stationäre Phase gepumpt wird (**Abb. 1–18 b**). Selbst bei einem Stopp der Pumpe würde die bereits in den Coils vorhandene mobile Phase durch die Bewegung der Coils weiterbefördert werden. Aus diesem Grund wurde der Begriff hydrodynamische CCC gewählt.<sup>211, 224</sup>

#### 1.4.5 Vor- und Nachteile

Die Gegenstromverteilungschromatographie bietet spezifische Vor- und Nachteile. So entfallen aufgrund des Verzichtes auf eine feste stationäre Phase die Anschaffungskosten für oftmals hochpreisige Trennsäulen. Auf der anderen Seite steht der mitunter hohe Verbrauch an Lösungsmitteln, der jedoch in Abhängigkeit der jeweiligen CCC-Technologie und insbesonde-



re des Maßstabes stark variiert. Maßnahmen zur Einsparung bzw. Rückgewinnung von Lösungsmitteln sind in der Literatur beschrieben.<sup>225</sup>

Die Abwesenheit einer festen stationären Phase verhindert außerdem das Auftreten irreversibler Adsorptionen. Daher kann in der Regel auf aufwendige Aufarbeitungen von Proben verzichtet werden.<sup>226</sup> Ferner profitiert die Gegenstromverteilungschromatographie erheblich davon, dass sich die Analyten im gesamten, oftmals sehr großen Volumen der stationären Phase lösen können.<sup>219-220, 222</sup> Einen limitierenden Faktor stellt jedoch die Löslichkeit der Probe im Fließmittelsystem dar. Kommt es zu Ausfällungen während der Trennung bzw. lässt sich die Probe gar nicht erst vollständig lösen, können Verstopfungen und damit ein Abbruch des Trennvorganges die Folge sein.

Da im Rahmen einer CCC-Trennung sowohl die mobile als auch die stationäre Phase zurückgewonnen werden, erfolgt theoretisch kein Probenverlust.<sup>219</sup>

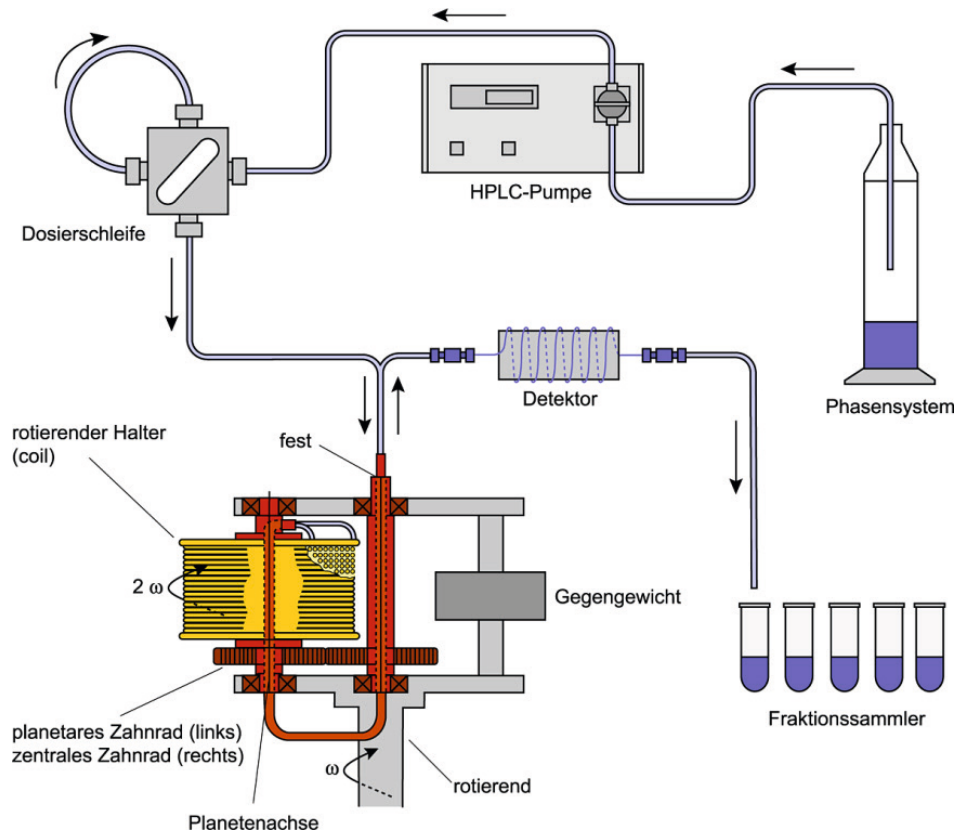
Einen großen Vorteil bietet die enorme Flexibilität bei der Wahl von stationärer und mobiler Phase, welche in Form des Fließmittelsystems individuell auf das Trennproblem angepasst werden können.<sup>227</sup> Zusätzlich tragen die unterschiedlichen Elutionsmodi zur Vielseitigkeit der CCC bei. Mit der Vielzahl an Möglichkeiten kann allerdings ein hoher Aufwand bei der Entwicklung geeigneter Fließmittelsysteme einhergehen. Hierbei können die o. g. Fließmittelfamilien oftmals eine Orientierung geben.

Aufgrund des geringen Probenverlustes, der hohen Flexibilität bezüglich stationärer und mobiler Phase, der fehlenden Gefahr irreversibler Adsorptionen und der Möglichkeit, Trennungen bis in den kg-Maßstab hinein durchzuführen, eignet sich die Gegenstromverteilungschromatographie vor allem für die präparative Trennung und Aufreinigung von Naturstoffen, u. a. von Flavonoiden, und hat sich in diesem Anwendungsbereich etabliert.<sup>211, 228-229</sup>

#### 1.4.6 High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC)

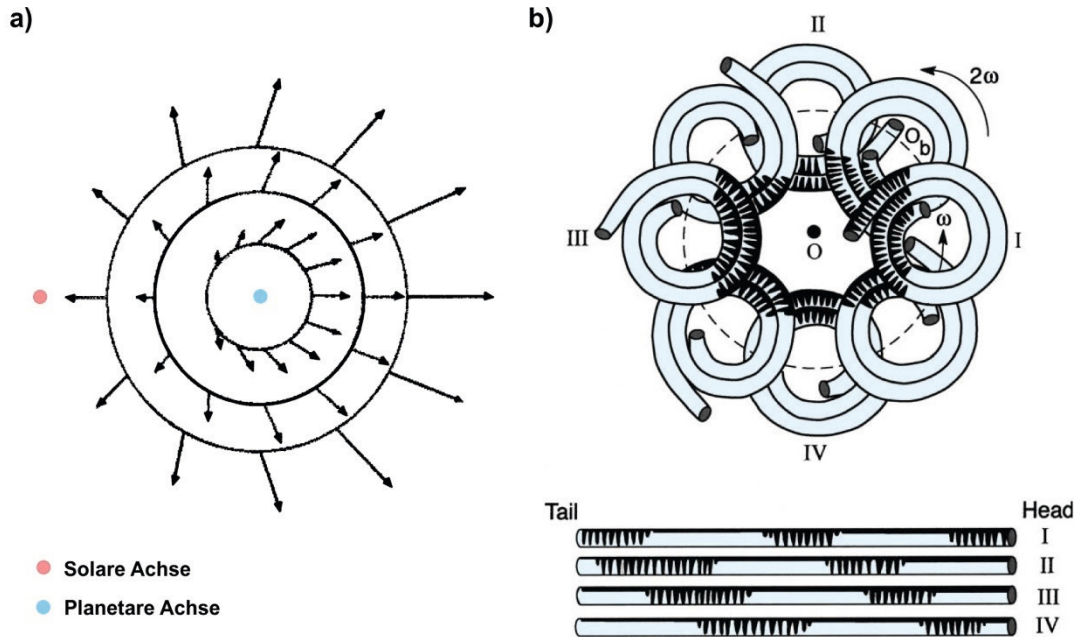
Die dichtunglose High-Speed CCC wurde in den 1980er-Jahren unter dem Namen *type-J synchronous multilayer coil planet centrifuge* entwickelt und ermöglichte erstmals die Durchführung von Trennungen innerhalb weniger Stunden anstelle von Tagen.<sup>224, 230</sup> Heute stellt sie eine der gebräuchlichsten CCC-Techniken dar. **Abb. 1–19** zeigt den schematischen Aufbau einer HSCCC-Anlage. Bei dieser Technik findet die Trennung in sog. *multi-layer Coils* statt. Dies sind Spulen aus mehreren Schichten der Trennsäule (in der Regel ein Teflonschlauch), welche koaxial um eine Rotationsachse gewickelt sind.

## Einleitung und Grundlagen



**Abb. 1–19** Schematische Darstellung einer HSCCC-Anlage: Das Fließmittel wird aus einem Vorratsgefäß mit Hilfe einer HPLC-Pumpe zum Coil gepumpt, welcher sich in Rotation um die eigene und eine Zentralachse befindet. Die Probe wird über eine Probenschleife injiziert. Nach Durchlaufen des Coils erfolgt die Detektion (z. B. UV) und das fraktionierte Auffangen des Eluates [Abb: Römpp Online, 2004].<sup>231</sup>

Das Funktionsprinzip basiert auf einer planetenähnlichen Bewegung, die durch einen oder mehrere miteinander verbundene Coils ausgeführt wird. Zum einen rotieren die Coils um die eigene Achse (planetare Rotation) und darüber hinaus in gleicher Richtung und gleicher Winkelgeschwindigkeit um eine Zentralachse (solare Rotation).<sup>219</sup> Es handelt sich somit um eine hydrodynamische CCC-Technik. Aufgrund der planetaren Rotation kommt es zu schnellen Richtungswechseln des Zentrifugalfeldes (**Abb. 1–20 a**), wodurch sich alternierende Mischungs- und Trennungsbereiche ausbilden (**Abb. 1–20 b** oben): Im Bereich nahe der Rotationsachse des Coils findet die Durchmischung der beiden Phasen statt, während im äußeren Bereich infolge der höheren Zentrifugalkraft eine Trennung der Phasen einsetzt. Da sich der Coil in Rotation befindet, die Mischzone aber immer eine Position nahe der Rotationsachse einnimmt, wandert diese entsprechend der Rotationsgeschwindigkeit durch den Schlauch (**Abb. 1–20 b** unten). Bei einer Geschwindigkeit von 800 rpm erfolgen so pro Sekunde 13 Mischungs- und Entmischungsvorgänge, womit sich die hohe Trennkraft dieser Technologie erklären lässt.<sup>215</sup>



**Abb. 1–20** a) Richtung der Zentrifugalkräfte, die während der Rotation auf den Coil wirken. Die Länge der Vektoren gibt die relative Stärke der Zentrifugalkraft an: Mit dem Abstand zu den beiden Rotationsachsen nehmen die Kräfte jeweils zu; im Bereich zwischen den Achsen wirken die Kräfte jedoch entgegengesetzt und schwächen sich dadurch gegenseitig (verändert nach Ito & CONWAY, 1984).<sup>224</sup> b) Oben: Darstellung der Mischzonen (schwarz-blau) und der Trennbereiche (blau) während einer vollständigen Rotation des Coils um die solare Achse. Unten: Alternierende Trenn- und Mischbereiche "wandern" durch die Säule (verändert nach Ito, 2005).<sup>215</sup>

HSCCC-Anlagen können im präparativen Maßstab betrieben werden und ermöglichen aufgrund der hohen Zentrifugalkräfte eine gute Retention der stationären Phase (bis 90%). Trennungen können entweder im *Head-to-Tail*-Modus oder in entgegengesetzter Richtung im *Tail-to-Head*-Modus durchgeführt werden. Beim *Head-to-Tail*-Modus dient die leichtere Phase als stationäre Phase, während die schwerere, mobile Phase ausgehend vom *Head-Ende* in Richtung des *Tail-Endes* der Trennsäule gepumpt wird. Im *Tail-to-Head*-Modus werden die Phasen umgekehrt, d.h. die schwerere Phase fungiert nun als stationäre Phase und die leichtere Phase wird vom *Tail-Ende* in Richtung des *Head-Endes* befördert.

Eine kompakte Anleitung zur Durchführung von HSCCC-Trennungen inkl. Erklärungen der Fachbegriffe, des Grundprinzips und Nennung von Anwendungsbeispielen ist in Form eines Fachartikels von Ito (2005) verfügbar.<sup>215</sup>

In dieser Arbeit wurde ein Triple-Coil-HSCCC verwendet, der bei Rotationsgeschwindigkeiten von 800–1000 rpm betrieben wird und im präparativen Maßstab eingesetzt werden kann (Gesamtcoilvolumen: 850 mL, maximale Probenaufgabe: ca. 2–3 g; vgl. Abschnitt 5.3.2.1).

#### 1.4.7 High-Performance Countercurrent Chromatography (HPCCC)

Die High-Performance CCC funktioniert ebenfalls auf Basis der planetaren Rotationsbewegung (J-type) und entspricht damit in ihrem Grundprinzip der HSCCC. Im Vergleich zu dieser

werden die Trennungen allerdings bei nochmals deutlich erhöhter Rotationsgeschwindigkeit durchgeführt. Hierdurch steigt die Zentrifugalkraft gegenüber der HSCCC vom etwa 20–160-Fachen der Erdbeschleunigung auf etwa das 240-Fache an, was eine deutlich verbesserte Retention der stationären Phase und eine größere Anzahl von Mischungs- und Entmischungsvorgängen zur Folge hat.<sup>215, 232</sup> Dies erlaubt wiederum den Einsatz höherer Flussraten und verbessert die Auflösung, so dass eine deutliche Verkürzung der Trennzeit vom Stunden- in den Minutenbereich resultiert.<sup>232</sup>

Das in dieser Arbeit verwendete Gerät erreicht eine Rotationsgeschwindigkeit von 1600 rpm und kann wahlweise im analytischen (Coilvolumen: 22 mL, maximale Probenaufgabe: ca. 150 mg) oder im semipräparativen Maßstab (Coilvolumen: 125 mL, maximale Probenaufgabe: ca. 600 mg; vgl. Abschnitt 5.3.2.3) betrieben werden.

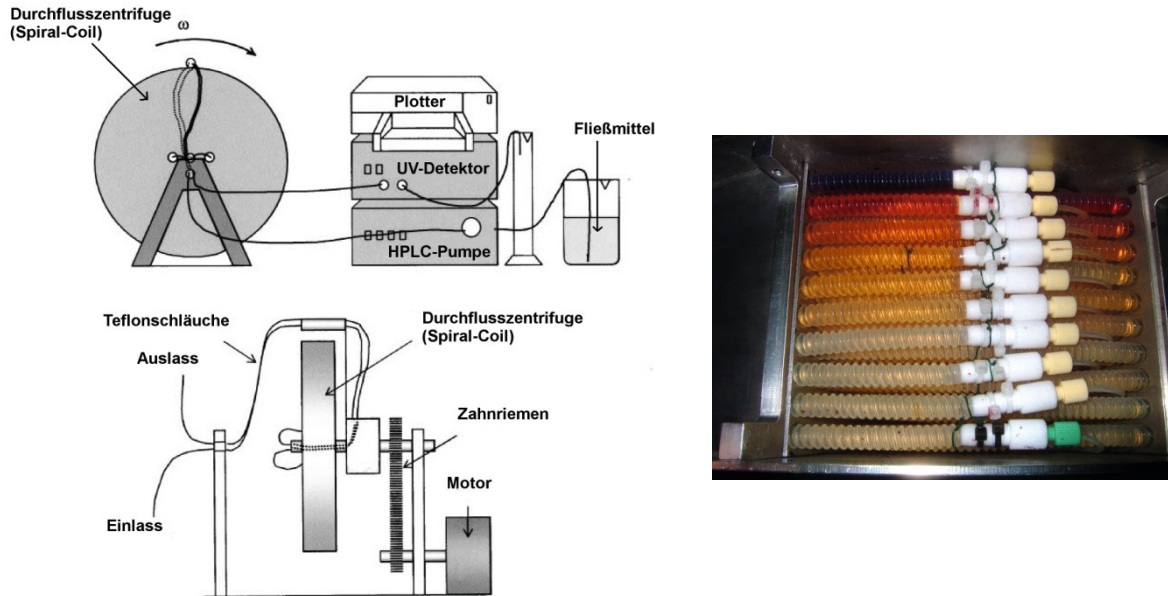
#### 1.4.8 Spiral-Coil Low-Speed Rotary Countercurrent Chromatography (SCCCC)

Als spezielle Weiterentwicklung für besonders polare Trennsysteme sind von Ito et al. (2003) Spiral-Disk Coils für die HSCCC vorgestellt worden.<sup>234</sup> Diese bewirken vor allem eine Steigerung der Retention der stationären Phase, wodurch auch eine Verringerung der Trenndauer ermöglicht wird. Dieser Effekt sollte auf die Low-Speed Rotary Countercurrent Chromatography (LSRCCC) übertragen werden, welche sich zwar durch hohe Probenaufgabemengen auszeichnet, jedoch aufgrund langer Trennzeiten im Bereich von mehreren Tagen einen Mangel an Effizienz aufweist.<sup>233</sup> Eine Besonderheit der LSRCCC ist die Verwendung sog. *convoluted tubes* (**Abb. 1–21** rechts). Dabei handelt es sich um Teflonschläuche, die ähnlich einem Schraubgewinde eine durchgehende Vertiefung aufweisen. An dieser Vertiefung kommt es über die gesamte Länge der Säule zu Verwirbelungen des Fließmittels, wodurch eine verbesserte Durchmischung der Phasen erreicht wird.

Aus diesen Überlegungen gingen Prototypen der sog. Spiral-Coil Low-Speed Rotary Countercurrent Chromatography (SCCCC) hervor.<sup>235</sup> Diese besitzen einen spiralförmig gewickelten Coil, welcher sich um die eigene Achse dreht. Auch hier kommen die convoluted tubes mit einem mittleren inneren Durchmesser von 8,5 mm zum Einsatz, wobei mehrere Spiralen zur Vergrößerung des Coilvolumens hintereinandergeschaltet werden können. Eine schematische Darstellung einer solchen Spiral-Disk sowie einer SCCC-Anlage findet sich in **Abb. 1–22 a** bzw. **Abb. 1–21**. Es handelt sich um eine hydrodynamische Technik, bei der die Retention der stationären Phase ebenfalls nach dem Prinzip der archimedischen Schraube erfolgt.

## Einleitung und Grundlagen

Neben der durch die Rotation erzeugten Zentrifugalkraft kommt der Gravitation eine wichtige Rolle zu. Damit keine andere Kräfte, insbesondere der *Spiral-Effekt*, überwiegen, sollte die maximale Rotationsgeschwindigkeit nicht über 150–200 rpm liegen.<sup>235</sup> Der sog. Spiral-Effekt entsteht durch die spiralförmigen Windungen, welche zusätzliche radiale Kräfte erzeugen. Diese pressen die Lösungsmittel, v. a. die schwerere Phase, in den äußeren Bereich der Spirale und können damit die Retention der stationären Phase erhöhen.



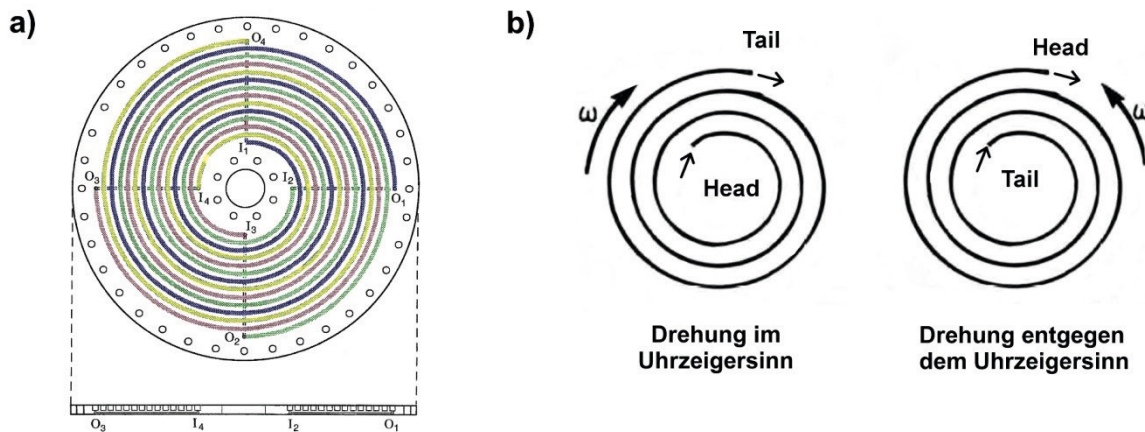
**Abb. 1–21** Links: Schematische Darstellung einer SCCCC-Anlage (verändert nach KÖHLER et al., 2004).<sup>233</sup> Rechts: Aufsicht auf den Coil einer SCCCC während der Trennung eines Schwarztee-Extraktes. Erkennbar sind die convoluted tubes mit ihrer „verdrehten“ Struktur, ebenso wie die parallele Anordnung der 10 Spiral-Disks. Anhand der Farbe ist außerdem die Verteilung der Probe gut sichtbar.

Aus der Geometrie der SCCCC ergeben sich acht verschiedene Elutionsmodi. Diese resultieren aus drei Variablen:

1. Wahl der mobilen Phase: **L** für Lower (= schwerere Phase) bzw. **U** für Upper (= leichtere Phase)
2. Flussrichtung der mobilen Phase: **I** für innen nach außen bzw. **O** für außen nach innen
3. Rotationsrichtung: **H** für Head-to-Tail (im Uhrzeigersinn) bzw. **T** für Tail-to-Head (gegen den Uhrzeigersinn)

Als Beispiel kann die in Abschnitt 3.2.2.1 beschriebene Trennung mit dem Fließmittelsystem aus EtOAc/*n*-BuOH/H<sub>2</sub>O (2:3:5, v/v) herangezogen werden. Dabei wird die wässrige, schwerere Phase als mobile Phase eingesetzt und von innen nach außen gepumpt. Die Rotation erfolgt im Uhrzeigersinn, wodurch die stationäre Phase in Richtung des Tail-Endes gedrückt wird. Folglich handelt es sich in diesem Beispiel um den Modus L-I-H (**Abb. 1–22 b**).





**Abb. 1–22 a)** Querschnitt einer Spiral-Disk mit 4 Kanälen für die HSCCC. Die vier Kanäle werden nacheinander von der mobilen Phase durchlaufen. Bei einem Fluss von innen nach außen bewegt sich die mobile Phase zunächst durch die blau gefärbte Spirale von I1 nach O1 und wird dann wieder Richtung Mittelpunkt zu I2 geleitet, um anschließend die grüne Spirale zu durchlaufen usw. Die Anordnung entspricht der einer Spiral-Disk für die SCCC, welche ein Volumen von ca. 560 mL besitzt (verändert nach Ito et al., 2003).<sup>234</sup>

**b)** Schematische Darstellung des Einflusses der Drehrichtung auf den Elutionsmodus. Als Beispiel wird die schwere Phase als mobile Phase jeweils von innen nach außen durch die Spirale gepumpt. Bei einer Rotation im Uhrzeigersinn (links) ergibt dies den Modus Head-to-Tail (L-I-H); bei einer Rotation gegen den Uhrzeigersinn (rechts) handelt es sich dagegen um den Modus Tail-to-Head (L-I-T) (verändert nach Ito et al., 2013).<sup>236</sup>

Der Spiraleffekt kommt nur dann zum Tragen, wenn die schwere Phase von innen nach außen bzw. umgekehrt die leichte Phase von außen nach innen eluiert werden soll. Um hiervon zu profitieren, sollte also ein entsprechender Trennmodus gewählt werden (L-I-H, L-I-T, U-O-H, U-O-T). Bisher ist die Trenntechnik der SCCC weitgehend unerforscht und es sind nur sehr wenige Anwendungsbeispiele wie z. B. die Isolierung von Proanthocyanidinen in der Literatur zu finden.<sup>101</sup>

Der in dieser Arbeit verwendete Prototyp besitzt 10 Disks mit einem Gesamtcoilvolumen von ca. 5,6 L (maximale Probenaufgabe: ca. 20–25 g, vgl. Abschnitt 5.3.2.2).



## 2 Zielsetzung

Hinsichtlich der Zusammensetzung von schwarzem Tee gibt es deutliche Wissenslücken. Dies lässt sich jedoch nicht auf ein mangelndes wissenschaftliches Interesse, sondern auf die hohe Komplexität der Inhaltsstoffe, konkret der sogenannten Thearubigene, zurückführen, die klassische analytische Herangehensweisen an ihre Grenzen bringt. Der Begriff Thearubigene stellt eine Sammelbezeichnung für im schwarzen Tee enthaltene Oxidationsprodukte dar, die im Rahmen der enzymatischen Oxidation v. a. aus Flavanolen gebildet werden und auf der Basis chemischer und sensorischer Eigenschaften sowie des chromatographischen Verhaltens zusammengefasst werden. Da die Thearubigene kaum charakterisiert sind, wird voraussichtlich infolge der fortschreitenden Erkenntnisgewinne eine differenziertere Nomenklatur für diese Substanzklasse notwendig werden.

Ein erstes Ziel dieser Arbeit ist es, die während der Teeherstellung ablaufenden Oxidationsreaktionen im Rahmen von Modellversuchen im kleinen Maßstab nachzuvollziehen, wofür vom Projektpartner Unilever R & D enzymhaltiges Teeblattpulver zur Verfügung gestellt wird. Durch die gezielte Auswahl von Substraten und die selektive (In-)Aktivierung der Enzyme Polyphenoloxidase bzw. Peroxidase sollen die Reaktionen vereinfacht und der Einfluss dieser Parameter auf die Bildung von Oxidationsprodukten untersucht werden. Damit einzelne Flavanoole variabel als Substrat eingesetzt werden können, muss ein Verfahren zur kostengünstigen und effektiven Isolierung dieser Substanzen entwickelt werden. Über den gesamten Versuchszeitraum der Modelloxidationen werden Proben entnommen und mittels HPLC-DAD analysiert, um den Konzentrationsverlauf der wichtigsten Komponenten verfolgen zu können. Ferner sollen Messungen via HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> durchgeführt werden und die Identifizierung von Teeinhaltsstoffen ermöglichen. Die Beobachtungen sollen Rückschlüsse auf die Reaktionsabläufe liefern und mit Daten aus der Literatur verglichen werden.

Trotz ihrer Heterogenität verhalten sich Thearubigene untereinander und gegenüber anderen Teebestandteilen wie den Theaflavinen chemisch ähnlich. Thearubigen-Standards, welche z. B. zur Erforschung physiologischer Eigenschaften in weitergehenden Arbeiten eingesetzt werden könnten, sind nicht erhältlich. Deshalb ist die Isolierung möglichst reiner Thearubigenfraktionen aus Schwarztee ein weiterer Aspekt dieser Arbeit. Bestehende Methoden sollen aufgegriffen, bewertet und ggf. weiterentwickelt und optimiert werden.

Aufgrund des Mangels an Standardsubstanzen konzentrierten sich Studien zu teebezogenen Fragestellungen vornehmlich auf die Inhaltsstoffe des grünen Tees. Ein Gesichtspunkt ist





### *Zielsetzung*

hierbei die Stabilität gelöster Teebestandteile über einen längeren Zeitraum, der beispielsweise für abgefüllte Getränke von Relevanz ist. Im abschließenden Teil der Arbeit sollen daher Lagerversuche mit einer zuvor gewonnenen Schwarzteefraktion Erkenntnisse über den Abbau von Thearubigenen und Theaflavinen im direkten Vergleich zu dem v. a. in grünem Tee vorkommenden EGCG liefern.

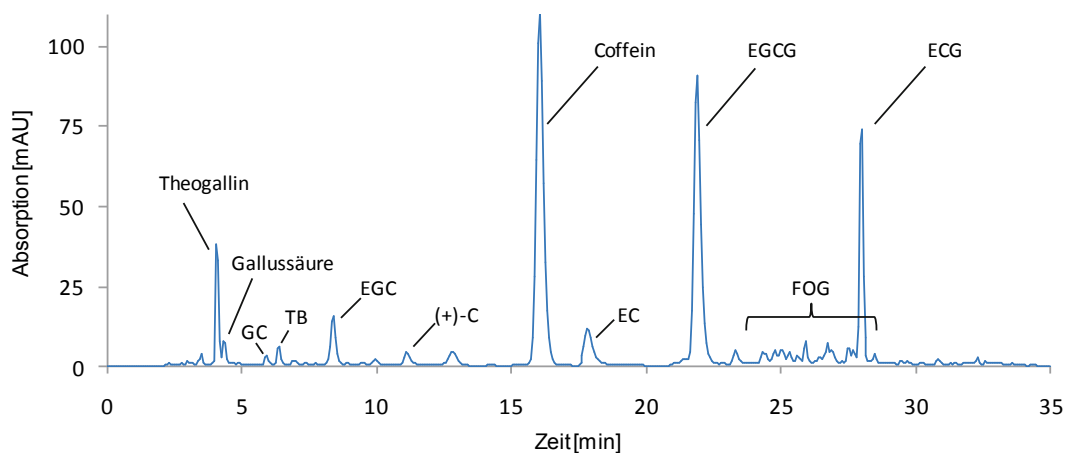
## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Modelloxidationen

#### 3.1.1 Isolierung von Catechinen

Zur Durchführung der Modellfermentationen wurden Catechine als Substrate für die Tee-Enzyme PPO und POD benötigt und sollten in definierten Kombinationen eingesetzt werden. Aufgrund ihres hohen Preisniveaus im kommerziellen Handel war es erforderlich, eine Strategie zur Isolierung der Catechine ECG, EGC und EGCG zu entwickeln.

Als Ausgangsmaterial bieten sich Extrakte unfermentierter Teesorten (grüner bzw. weißer Tee) an, da diese einen hohen Gehalt an ECG, EGC und insbesondere EGCG aufweisen. Dementsprechend wurde zunächst ein weißer Instanttee (gefriergetrockneter Extrakt aus weißem Tee) ausgewählt (**Abb. 3–1**). Später wurde überwiegend ein Grüntee-Extrakt verwendet, der unter dem Handelsnamen Sunphenon® 80SK als polyphenolreiches Nahrungsergänzungsmittel kommerziell vertrieben wird.



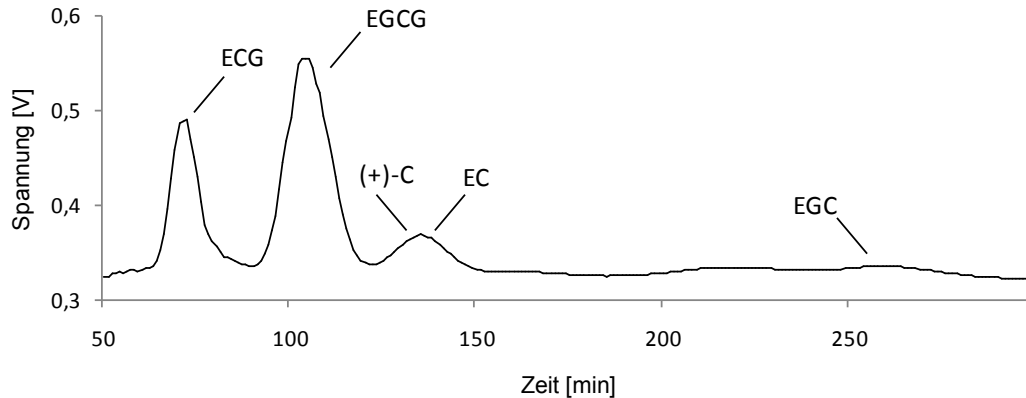
**Abb. 3–1** HPLC-DAD-Chromatogramm ( $\lambda=278$  nm, HPLC\_System 1) des weißen Instanttees und Zuordnung der charakteristischen Inhaltsstoffe.

##### 3.1.1.1 Isolierung mittels CCC

In apparativer Hinsicht versprach die HSCCC wegen ihrer hohen Trennkraft und Kapazität die aussichtsreichste Methode zu sein. Zudem ist in der Literatur die erfolgreiche Trennung von Catechinen aus grünem Tee mit dem Lösungsmittelsystem  $tBME/ACN/0,1\% TFA_{(aq)}$  (2:2:3, v/v) im Tail-to-Head-Modus beschrieben.<sup>237</sup> Da die darin verwendete HSCCC-Anlage einen sehr geringen Maßstab aufwies (Coilvolumen 40 mL, Probeaufgabemenge 0,1 mg), konnten andere Parameter der Methode nicht übernommen werden bzw. mussten angepasst wer-

## Ergebnisse und Diskussion

den. Ein erster Versuch mit dem so entwickelten HSCCC\_System 4 verlief positiv.<sup>107</sup> **Abb. 3-2** zeigt das erhaltene Chromatogramm der Trennung von 726 mg des Weißtee-Extraktes. In **Tab. 3-1** sind die zugehörigen Auswaagen nach Fraktionseinteilung und Gefrierdrying sowie die Hauptbestandteile der Probe gemäß HPLC-DAD-Analyse mittels HPLC\_System 1 aufgeführt.



**Abb. 3-2** HSCCC-Chromatogramm ( $\lambda=278$  nm) der Trennung von 726 mg eines Weißtee-Extraktes mit HSCCC\_System 4 und Zuordnung der Signale zu den Flavanolen (+)-C, EC, ECG, EGC und EGCG.<sup>238</sup>

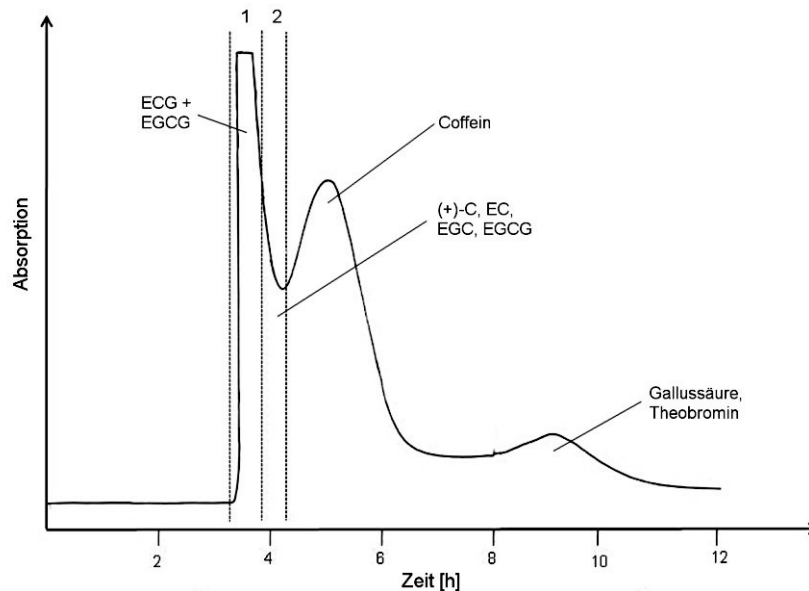
Es ist zu sehen, dass die Catechine ECG und EGCG bereits nach kurzer Zeit (ungefähr 70 bzw. 100 min) in chromatographischen Reinheiten von über 80 bzw. 90% erhalten wurden, wohingegen EC und insbesondere EGC später und mit geringerer Reinheit eluierten und (+)-Catechin nur in Mischfraktionen mit sehr niedrigem Reinheitsgrad gewonnen werden konnte. Die Auswaage des EGCG wurde als zufriedenstellend, die des ECG und EGC als noch akzeptabel und die des EC sowie des (+)-Catechins in Verbindung mit der unvollständigen Trennung als unzureichend bewertet.

**Tab. 3-1** Fraktionseinteilung und Auswaagen der HSCCC-Trennung von 726 mg eines Weißtee-Extraktes mit HSCCC\_System 4.

Fraktion	Reagenzgläser	Zusammensetzung ( $\lambda = 278$ nm)	Auswaage [mg]
1	3-6	84% ECG	19,4
2	7-12	20% ECG; 25% EGCG	9,0
3	13-19	91% EGCG	56,1
4	20-23	14% (+)-C; 18% EC; 29% EGCG	6,4
5	24-32	9% (+)-C; 64% EC	21,4
6	33-37	47% Gallussäure	2,6
7	38-47	11% Gallussäure	5,0
8	48-62	nicht identifiziert	18,9
9	63-69	60% EGC; 3% GC	26,9
10	70-85	35% EGC	20,0

## Ergebnisse und Diskussion

In weiteren Versuchen wurde die eingesetzte Probenmenge auf ca. 2 g erhöht und die Reinheit der erhaltenen Fraktionen durch ein engeres Zuschneiden der Peaks verbessert. Bei einem Einsatz von Sunphenon 80SK als Ausgangsmaterial konnten innerhalb eines Laufes bis zu 650 mg EGCG und 80 mg ECG mit chromatographischen Reinheiten ( $\lambda = 278 \text{ nm}$ ) von über 90 % isoliert werden.<sup>239</sup>



**Abb. 3-3** SCCC-Chromatogramm ( $\lambda = 278 \text{ nm}$ ) der Trennung von 20 g eines Weißtee-Extraktes mit SCCC\_System 2 und Einteilung der Fraktionen unter Angabe der Bestandteile.<sup>240</sup>

Mit dem Ziel, die Ausbeute eines Laufes weiter zu steigern, wurde die HSCCC-Methode auf die SCCC übertragen, so dass von der etwa zehnfach höheren Probenkapazität profitiert werden konnte. Während dieser Ansatz bei der Thearubigen-Isolierung erfolgreich verlief (vgl. Abschnitt 3.2.2.1), konnte die Trennung der Catechine nicht ohne Weiteres mit der SCCC nachvollzogen werden. Das Chromatogramm der Trennung von 20 g des Weißtee-Extraktes via SCCC\_System 2 ist in **Abb. 3-3** dargestellt. Wie eine Analyse der Fraktionen zeigte, wurden die Catechine lediglich angetrennt, weshalb ECG und EGCG zusammen in einer Mischfraktion (Fraktion 1) eluierten (**Tab. 3-2**). Gegenüber der Trennung mittels HSCCC blieb die Elutionsreihenfolge unverändert. Das Signal bei ca. 5 Stunden resultiert aus der Elution von Coffein. Da Coffein z. B. durch Komplexbildung mit Bestandteilen des Tees reagieren und auch Einfluss auf CCC-Trennungen nehmen kann, wurde der Versuch nach einer Entcaffeinierung des weißen Instanttees erneut vorgenommen.<sup>75, 238, 256</sup> Das erhaltene Chromatogramm und die Zusammensetzung der Fraktionen wiesen jedoch, abgesehen vom deutlich geringeren Coffeingehalt, keine Unterschiede auf.<sup>240</sup> Von einer weiteren Nutzung der SCCC wurde abgesehen und sämtliche folgenden Trennungen via HSCCC durchgeführt.



## Ergebnisse und Diskussion

Zusätzlich wurde untersucht, ob auf die Verwendung der potentiell gesundheitsschädlichen TFA verzichtet werden kann. Eine Substitution des Anteils an 0,1%iger TFA<sub>(aq)</sub> am Fließmittelsystem durch Wasser (= HSCCC\_System 5) übte keinen Einfluss auf den Trennvorgang aus, so dass der Einsatz gesundheitlich bedenklicher Chemikalien für die Isolierung von Catechinen reduziert werden konnte.<sup>241</sup> Ein Beispielchromatogramm für die Trennung von Sunphe-non 80SK mit HSCCC\_System 5 befindet sich in Anhang 7.2.

**Tab. 3-2** Fraktionseinteilung sowie Zusammensetzung und Auswaagen der Fraktionen 1 und 2 der SCCC-Trennung von 20 g Weißtee-Extrakt.

Fraktion	Reagenzgläser	Zusammensetzung ( $\lambda=278$ nm)	Auswaage
1	1–9	7 % EC, 42 % EGCG, 24 % ECG	3,84 g
2	10–18	5 % TG, 3 % GC, 17 % EGC, 2 % (+)-C, 9 % Coffein, 10 % EC, 16 % EGCG	1,29 g

### 3.1.1.2 Weitere Aufreinigung

Aufgrund der unzureichenden chromatographischen Reinheiten von ca. 50–65 % sollten die mit EC und EGC angereicherten HSCCC-Fractionen in einem weiteren Schritt aufgereinigt werden. Hierzu wurden zwei Ansätze verfolgt, zum einen die Verwendung einer präparativen HPLC und zum anderen die Säulenchromatographie an Sephadex LH-20.

#### Aufreinigung mittels präparativer HPLC

Um die mit EC und EGC angereicherten HSCCC-Fractionen zu trennen, wurde eine Methode für die präparative HPLC entwickelt (PräpHPLC\_System 1). Die damit erhaltenen Fraktionen wiesen chromatographische Reinheiten von lediglich 67–82 % auf. Da dies als ungenügend erachtet wurde und sich der Zeitaufwand für die Erlangung ausreichender Mengen als sehr hoch erwies, wurde der Ansatz einer Aufreinigung mittels präparativer HPLC nicht weiterverfolgt. Stattdessen wurde das vergleichsweise günstige Epicatechin ebenso wie (+)-Catechin käuflich erworben.

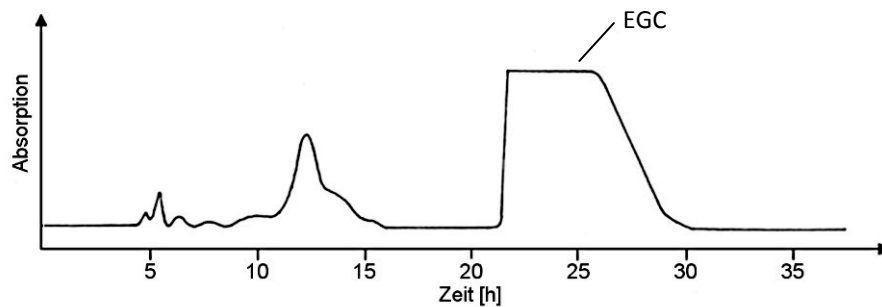
#### Aufreinigung an Sephadex LH-20

Die Aufreinigung des EGC erfolgte in Anlehnung an die Methode von ROBERTSON & BENDALL (1983) durch säulenchromatographische Trennung, wobei das Dextrangel Sephadex LH-20 als Säulenmaterial genutzt wurde.<sup>171</sup>

Zur Trennung wurden jeweils 1–3 mit EGC angereicherte und vereinigte HSCCC-Fractionen eingesetzt (Einwaagen: 220–435 mg). Nach 15–35 Stunden erfolgte die Elution eines breiten

## Ergebnisse und Diskussion

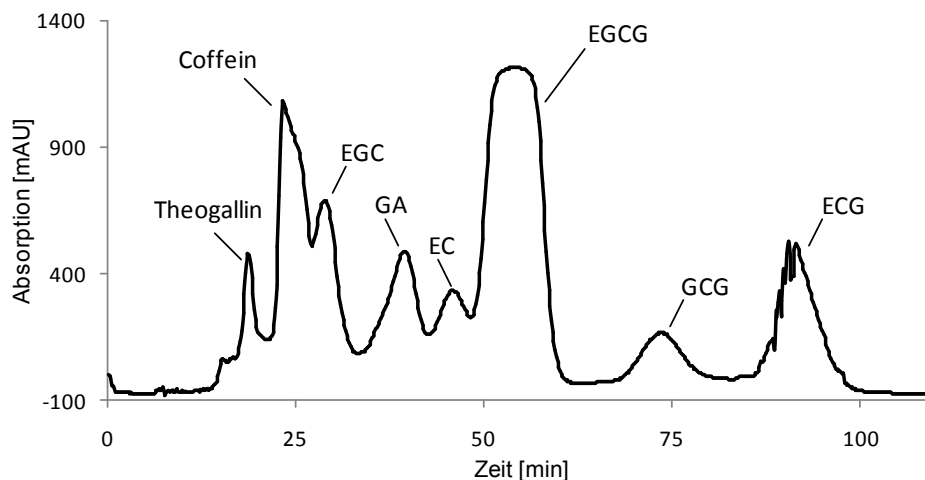
Signals, welches lyophilisiert wurde und Auswaagen von 132–335 mg aufwies (**Abb. 3–4**). Die Analyse mittels HPLC-DAD ergab chromatographische Reinheiten des EGC von 84–97%.<sup>239-240</sup>



**Abb. 3–4** Chromatogramm ( $\lambda=278$  nm) einer säulenchromatographischen Trennung von EGC-haltigen HSCCC-Fractionen via Sephadex LH-20.<sup>239</sup>

### Trennung mittels HPLC

Zu einem späteren Zeitpunkt wurde untersucht, ob sich das etablierte HSCCC-System auf die HPLC übertragen lässt. Deren geringere maximale Probenkapazität von 0,5 g stellt zwar einen Nachteil gegenüber der HSCCC dar, infolge einer kürzeren Trenndauer und möglicherweise besserer Trennung, insbesondere im Hinblick auf die Reinheit der EGC-Fraktion, könnte dieser allerdings aufgehoben werden. In **Abb. 3–5** ist das Chromatogramm einer Trennung von 0,5 g Sunphenon 80SK mit HPLC\_System 1 im Head-to-Tail-Modus dargestellt. Verglichen mit der HSCCC wurde eine größere Anzahl an Signalen erhalten. Nach Analyse der Reagenzglasfraktionen (HPLC\_System 1) wurden vier Hauptfraktionen eingeteilt, gefriergetrocknet und via HPLC\_System 1 analysiert (**Tab. 3-3**). Die übrigen Reagenzglasfraktionen wurden verworfen.



**Abb. 3–5** HPLC-Chromatogramm ( $\lambda=278$  nm) einer Trennung von 0,5 g Sunphenon 80SK mit HPLC\_System 1 zur Isolierung von Flavanolen.



## Ergebnisse und Diskussion

**Tab. 3-3** Fraktionseinteilung, Zusammensetzung und Auswaagen der Fraktionen der HPLC-Trennung von 0,5 g Sunphenon 80SK.

Fraktion	Reagenzgläser	Zusammensetzung ( $\lambda = 278 \text{ nm}$ )	Auswaage
1	28–29	42 % EGC, 10 % Coffein	26,4 mg
2	51–55	97 % EGCG	106,8 mg
3	73–75	73 % GCG + 12 % CG	2,3 mg
4	90–93	93 % ECG	6,7 mg

Die Auswertung zeigt, dass eine spürbare Verkürzung der Trenndauer erreicht werden konnte, die allerdings wegen der kleineren Probenaufgabemenge erwartungsgemäß mit geringeren Auswaagen der wichtigen Catechinfractionen (EGC, EGCG und ECG) einherging. Bemerkenswerterweise gelang eine deutliche Anreicherung von GCG in einem separaten Signal. Die Signale im vorderen Bereich des Chromatogramms erscheinen hingegen gestaucht, da hier keine Basislinientrennung erfolgt ist. Infolgedessen weist die EGC-Fraktion eine geringe chromatographische Reinheit von nur etwa 40 % auf, was u. a. durch das überlappende Coffein-Signal verursacht wird. Zum Zeitpunkt dieses Versuches lag bereits genügend Material für die geplanten Modellfermentationen vor, so dass auf eine Optimierung der HPLC-Trennung verzichtet wurde. Ein naheliegender Ansatz wäre die Ausführung im Tail-to-Head-Modus, um die früh eluierten Komponenten durch längere Retentionszeiten zu „entzerren“.

### Zusammenfassung

Die Trennung von Tee-Extrakten via HSCCC mit Fließmittelsystem HSCCC\_System 5 hat sich als zielführend erwiesen, um ausreichende Mengen ECG und EGCG mit Reinheitsgraden von über 90 % zu isolieren. Insbesondere das EGCG konnte mit hoher Reinheit und guten Ausbeuten gewonnen werden. Durch einen zusätzlichen Aufreinigungsschritt mittels Gelchromatographie gelang auch die Isolierung des EGC mit zufriedenstellender Reinheit.



### 3.1.2 Modellfermentationen mit endogenen Enzymen

#### 3.1.2.1 Ausgangslage

In Zusammenarbeit mit dem Projektpartner Unilever Research & Development sollten Modellfermentationen durchgeführt werden. Grundlage war ein Forschungsartikel von BONNELY et al. (2003), in dem eine schonende Methode zur Entfernung von Polyphenolen (v. a. von Flavanolen) aus frischen Teeblättern vorgestellt wird, ohne die Aktivität der endogenen Enzyme Polyphenoloxidase (PPO) und Peroxidase (POD) zu beeinträchtigen. Auf dieser Basis sind Modellversuche mit definierten Flavanol-Kombinationen (z. B. durch Zugabe von EC und EGCG) als Substrat unter Verwendung einer Teeblattmatrix mit endogenen Enzymen möglich. Darüber hinaus können die Enzyme durch Veränderung der Rahmenbedingungen während des Versuchs selektiv aktiviert oder inaktiviert werden. Somit ergibt sich die Gelegenheit, deren Einfluss auf die Oxidationsvorgänge genauer zu untersuchen. Zudem werden die hochkomplexen Reaktionen ein Stück weit vereinfacht und folglich besser nachvollziehbar.

Aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit von frischen Teeblättern in Deutschland wurde der erste Schritt, die Herstellung eines polyphenolfreien Teeblattmaterials, durch den Projektpartner in Indien vorgenommen und das gefriergetrocknete und zu einem feinen Pulver vermahlene Blattmaterial gekühlt nach Deutschland versandt. Das Extraktionsverfahren ist in Abschnitt 5.4.4.1 beschrieben und besteht aus mehrfachen Extraktionsschritten mit Aceton-Wasser-Gemischen in variierenden Verhältnissen bei ungefähr 0°C.

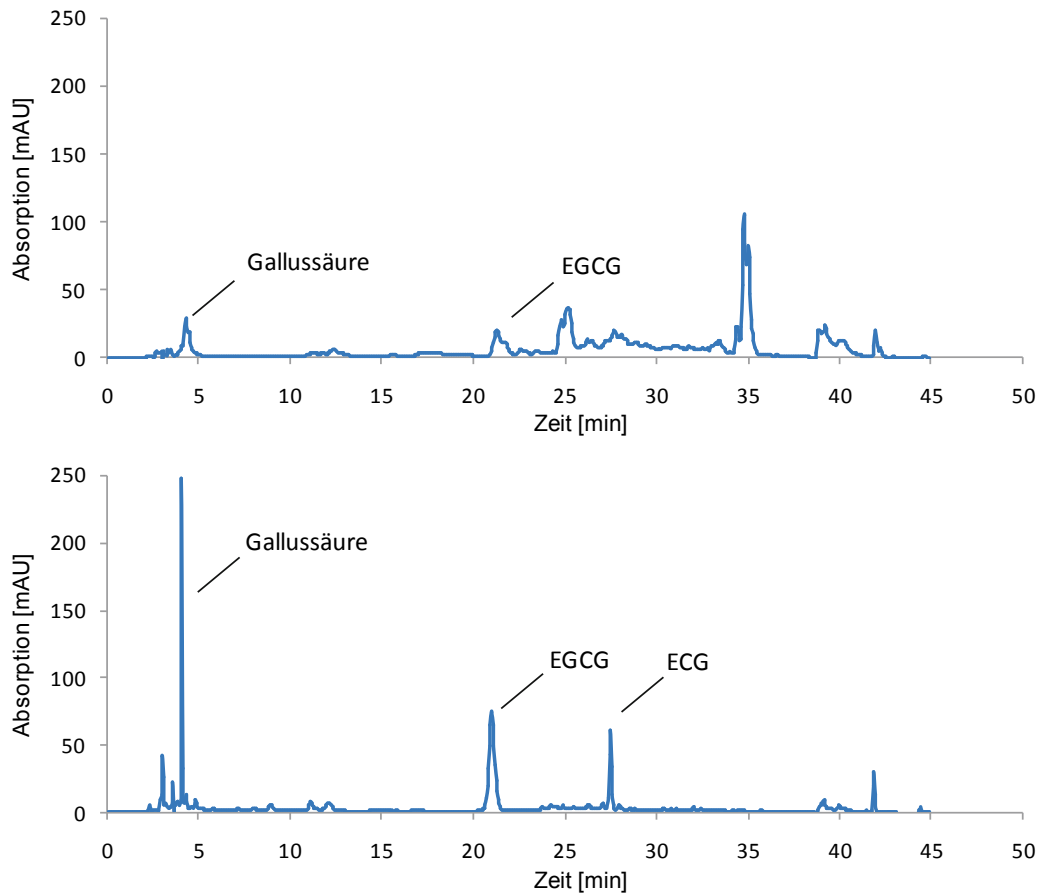
Im Rahmen des Projekts wurden insgesamt vier Chargen des extrahierten Teeblattpulvers zur Verfügung gestellt (s. Anhang 7.4). Die Lagerung des Blattmaterials erfolgte in luftdicht verschlossenen Behältern bei –18°C.

#### 3.1.2.2 Bestimmung des Restphenolgehaltes im Teeblattmaterial

Um auszuschließen, dass eventuell im Blattmaterial verbliebene Restgehalte die Ergebnisse der Modellfermentationen verfälschen, wurde der Gehalt an charakteristischen phenolischen Bestandteilen im extrahierten Teeblattpulver bestimmt. Dies geschah durch Extraktion des Blattpulvers mit 70%igem wässrigen Methanol bei 70°C und anschließender Analyse mittels HPLC-DAD (HPLC\_System 1, Abschnitt 5.4.4.2).<sup>242</sup> Mit 0,23–0,29 g/100 g Blattpulver zeigte das EGCG die höchsten Gehalte (**Tab. 3-4**).



## Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 3–6** HPLC-Chromatogramme ( $\lambda=278$  nm) der methanolischen Extrakte zur Bestimmung des Restpolyphenolgehaltes in den Teeblattchargen 1 (oben) und 2 (unten).<sup>240</sup>

Davon abweichend wies die erste Charge geringere Gehalte auf, wobei deren HPLC-Chromatogramm deutliche Rückstände von Oxidationsprodukten vermuten ließ (**Abb. 3–6**). Aufgrund dessen wurde Charge 1 nur für erste Versuche zur Erprobung des Oxidationssystems eingesetzt und die Ergebnisse nicht für weitergehende Auswertungen herangezogen. Die Gehalte in den Chargen 2–4 werden als unkritisch angesehen, da sie bei einem Einsatz von 0,5–1,0 g des Teeblattpulvers (dies entspräche im unwahrscheinlichen Fall einer vollständigen Extraktion 1,2–2,9 mg EGCG) im Vergleich zur zugesetzten Flavanolmenge von 80–120 mg in den Modellversuchen vernachlässigbar sind.

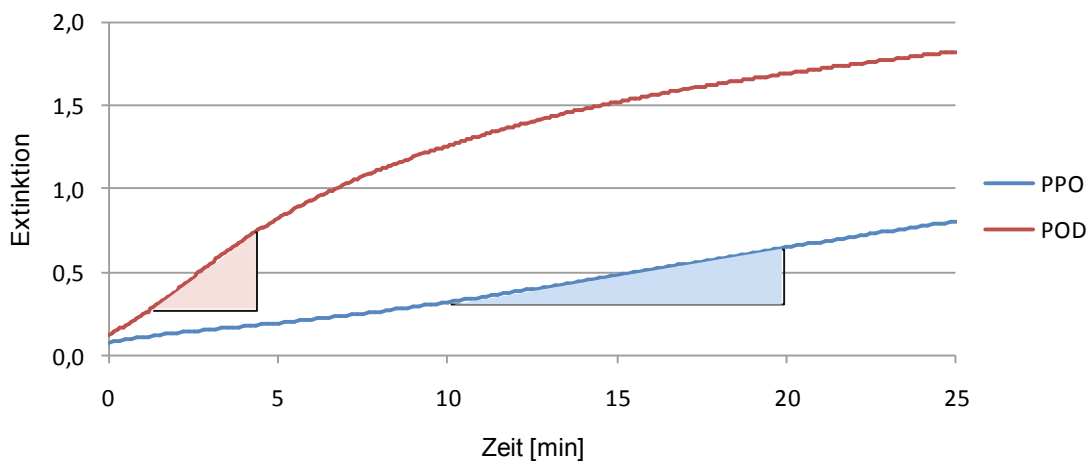
**Tab. 3-4** Gehalte an Gallussäure, Epicatechingallat und Epigallocatechingallat in den zugesandten Chargen des „polyphenolfreien“ Teeblattmaterials.<sup>239-241</sup>

Charge	Gehalt [g/100 g] an		
	Gallussäure	ECG	EGCG
1	0,05	n. b. <sup>a</sup>	0,10
2	0,09	0,07	0,29
3	0,09	0,08	0,26
4	0,09	0,08	0,23

<sup>a</sup> n. b. = nicht bestimmbar, da überlagert von anderen Signalen

### 3.1.2.3 Bestimmung der Enzymaktivität im Teeblattmaterial

Nach Erhalt des extrahierten und gefriergetrockneten Teeblattpulvers wurde jeweils die Aktivität der Enzyme PPO und POD gemessen, um sicherzustellen, dass keine gravierende Beeinträchtigung stattgefunden hat. Hierzu wird aus dem Blattpulver ein Enzymextrakt hergestellt, welcher temperiert und mit einer Catechin-Lösung zur Reaktion gebracht wird. Die von den Enzymen katalysierte Bildung eines Catechinchinons wird über einen Zeitraum von 25 min photometrisch bei einer Wellenlänge von 400 nm verfolgt. Durch die Wahl entsprechender Reaktionsbedingungen können die Enzymaktivitäten von PPO und POD separat bestimmt werden. Anschließend wird aus den Reaktionsverläufen im linearen Bereich die Steigung ermittelt und mit der Enzymtrockenmasse ins Verhältnis gesetzt (s. Abschnitt 5.4.4.2). Die Enzymtrockenmasse wird nach einer Dialyse (Molmassengrenze 14 kDa) des Enzymextraktes bestimmt.<sup>242</sup> In **Tab. 3-5** sind die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen dargestellt, **Abb. 3-7** zeigt den Reaktionsverlauf mit PPO und POD beispielhaft anhand der Charge 2.



**Abb. 3-7** Photometrische Messung der Umsetzung von (+)-Catechin mit PPO und POD bei 400 nm mit eingezeichneten Steigungsdreiecken zur Bestimmung der Enzymaktivität.

**Tab. 3-5** Aktivität von PPO und POD in den als Enzymquelle verwendeten Teeblattpulvern.<sup>239-241</sup>

Charge	Enzymaktivität [uA/(min · g)]	
	PPO	POD
1 <sup>a</sup>	84	168
2 <sup>a</sup>	34	134
3 <sup>a</sup>	52	149
4 <sup>a</sup>	20	15

<sup>a</sup> Aufgrund einer fehlerhaften Bestimmung der Enzymtrockenmasse wurde für die Berechnung der durchschnittliche Wert aus den Chargen 2-4 verwendet.



## Ergebnisse und Diskussion

Die Aktivitäten von PPO und POD liegen in einer Größenordnung mit den Daten von BONNELLY et al. (2003), die Werte von ca. 24 uA/(min·g) (PPO) bzw. 42 uA/(min·g) (POD) ermittelten.<sup>143</sup> Allerdings wurden im Teeblattpulver insbesondere im Falle der POD höhere als die zitierten Werte gemessen, so dass sich eine stärkere Diskrepanz zwischen den Aktivitäten der beiden Enzyme ergibt. Entsprechende Berichte von einer etwa fünffach höheren Aktivität der POD gegenüber der PPO in Teeblättern sind jedoch ebenfalls in der Literatur aufzufinden, was auf eine gute Eignung des Teeblattmaterials als realitätsnahe Enzymquelle schließen lässt.<sup>110, 243</sup>

Ausgenommen ist hierbei die Charge 4, welche durch insgesamt niedrige Aktivitätswerte von den anderen Chargen abweicht. Offenbar ist es entweder bei der Verarbeitung oder beim Transport zu einer stärkeren Beeinträchtigung der Aktivität gekommen. Oxidationen mit diesem Blattmaterial sind demzufolge nur nach einer Anpassung der Reaktionsbedingungen zur Erhöhung der Aktivität mit den Chargen 1–3 vergleichbar. Aufgrund der in der ersten Charge nachgewiesenen Oxidationsprodukte waren somit nur die Chargen 2 und 3 uneingeschränkt verwendbar.

### 3.1.2.4 Das Modelloxidationssystem

Um über den gesamten Versuchsverlauf hinweg Proben nehmen zu können, wurden die Modellfermentationen in wässriger Suspension durchgeführt. Als Reaktionsgefäß wurde ein Dreihalskolben eingesetzt, von dem je eine Öffnung für die Messung der Temperatur, die Zufuhr von Sauerstoff und die Entnahme der Proben genutzt wurde. Der Kolben wurde in ein temperierbares Wasserbad eingebracht, mit einem Rührkern versehen und das in wenigen Millilitern Wasser suspendierte enzymhaltige Teeblattmaterial vorgelegt. Zum Starten der Reaktion wurde das in Wasser gelöste und temperierte Substratgemisch zugegeben. Abhängig davon, ob PPO und POD gemeinsam oder nur eines der beiden Enzyme an den Oxidationsreaktionen beteiligt sein sollten, wurden folgende Rahmenbedingungen gewählt:

PPO: Das Reaktionsmedium wurde über den gesamten Reaktionszeitraum mit synthetischer Luft (20,5 Vol.-% O<sub>2</sub>; 79,5 Vol.-% N<sub>2</sub>) durchspült.

POD: In die Substratlösung wurde kurz vor Reaktionsbeginn Wasserstoffperoxid-Lösung gegeben. Zudem musste zur Deaktivierung der PPO der Kontakt mit Sauerstoff vermieden werden. Hierzu wurde die Substratlösung vorab mit Edelgas durchspült und der Versuch anschließend unter einer Edelgas-Atmosphäre durchgeführt.



## Ergebnisse und Diskussion

PPO + POD: In die Substratlösung wurde kurz vor Reaktionsbeginn Wasserstoffperoxid-Lösung gegeben. Außerdem wurde das Reaktionsmedium über den gesamten Versuchszeitraum mit synthetischer Luft (20,5 Vol.-% O<sub>2</sub>; 79,5 Vol.-% N<sub>2</sub>) durchspült.

Entsprechend der Angabe bei BONNELLY et al. (2003) wurde Helium in den ersten POD-Oxidationen als Inertgas verwendet.<sup>143</sup> Das Helium wurde später durch Argon ersetzt, da dieses aufgrund seiner im Vergleich zur Umgebungsluft höheren Dichte bei Öffnung des Kolbens nicht nach oben entweicht.<sup>242</sup>

Als Substrate kamen Kombinationen von je zwei Flavanolen sowie in einem Fall ein Gemisch der vier Hauptflavanole zum Einsatz. Die Flavanole wurden entweder kommerziell erworben oder mittels präparativer Methoden aus unfermentierten Tee-Extrakten isoliert (Abschnitt 3.1.1).

Die Durchführung der Oxidationen mit den Blattchargen 2 und 3 erfolgte in Blöcken bestehend aus jeweils drei Oxidationsversuchen, bei denen eine bestimmte Catechin-Kombination, beispielsweise EC und EGCG, unter Beteiligung eines oder beider Enzyme (entweder PPO+POD, nur PPO oder nur POD) umgesetzt wurde. Ein Vergleich der Ergebnisse innerhalb eines Blockes ermöglicht so die Untersuchung spezifischer Eigenschaften der Enzyme (Abschnitt 3.1.2.8), während eine Gegenüberstellung der Resultate aus den Versuchen unterschiedlicher Blöcke aber mit den gleichen Enzymen den Einfluss der Substrate abbildet (Abschnitte 3.1.2.6 und 3.1.2.7). Im Hinblick auf die Substrate wurden vorwiegend von beiden Enzymen katalysierte Oxidationen verglichen, da diese den Bedingungen der authentischen Fermentation am nächsten kommen.

Die Probenahme erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten und mit steigenden Abständen über den gesamten Versuchszeitraum. Nach Entnahme aller Proben wurde die Reaktion durch Zugabe einer Stopp-Lösung beendet. Außerdem wurden diejenigen Proben, die zur Analyse mittels HPLC-DAD bestimmt waren, mit einer EDTA-haltigen Stabilisierungslösung versetzt. Auf diese wurde bei den zur massenspektrometrischen Messung entnommenen Proben verzichtet, um das Messinstrument nicht zu belasten.

Die Analysen wurden mittels der HPLC\_Systeme 1 (Flavanole, Gallussäure, TRs) und 3 (Theaflavine) sowie des LC-MS\_Systems 1 vorgenommen. In **Abb. 3–8** sind Aufbau und Ablauf der Modellfermentations-Versuche schematisch dargestellt. Ferner gibt **Tab. 3-6** eine Übersicht über die verschiedenen durchgeführten Experimente. Aufgrund der begrenzt verfügbaren Menge an Teeblattmaterial wurden die Modelloxidationen jeweils als Einfachbestimmungen

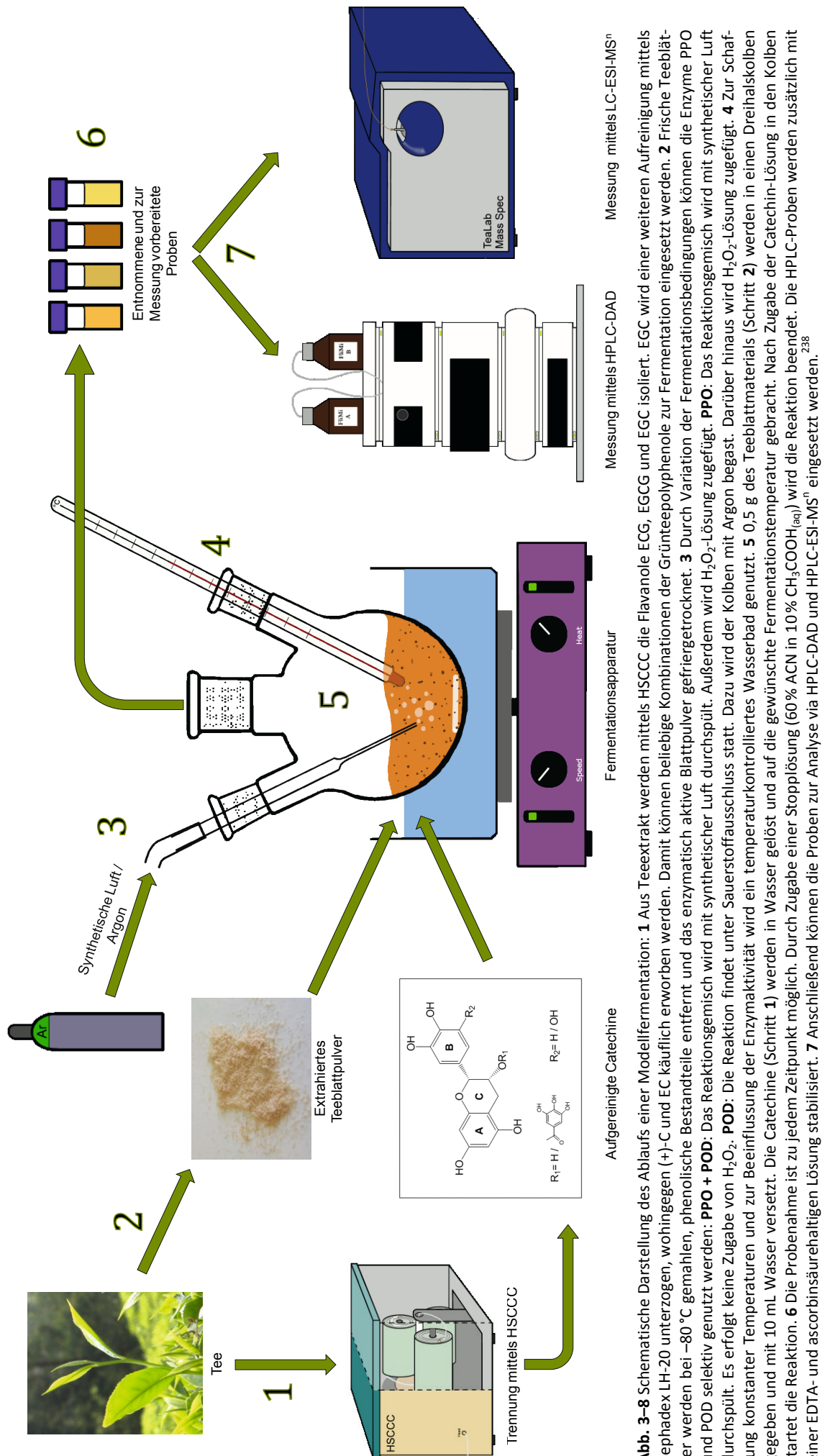


## Ergebnisse und Diskussion

durchgeführt. Versuchsreihen wie diejenige zur Untersuchung eines eventuellen Einflusses der Wassermenge zeigten, dass das System reproduzierbare Ergebnisse liefert (s. Abschnitt 3.1.2.5).

Tab. 3-6 Übersicht über die durchgeführten Modelloxidationsversuche.

Nr.	Teeblattpulver		aktive(s) Enzym(e)	Substrate	Einwaage je Substrat [mg]	Volumen [mL]	Temperatur [°C]
	Charge	Menge [g]					
MF-2.1	2	1,18	PPO + POD	ECG + EGCG	60	120	30
MF-2.2	2	0,80	PPO	C + EGCG	40	80	30
MF-2.3	2	0,80	PPO + POD	C + EGCG	40	80	30
MF-2.4	2	0,80	PPO	ECG + EGCG	40	80	30
MF-2.5	2	0,80	POD	ECG + EGCG	40	80	30
MF-2.6	2	0,79	PPO + POD	EC + EGC	40	80	30
MF-2.7	2	0,80	PPO	EC + EGC	40	80	30
MF-2.8	2	0,80	POD	EC + EGC	40	80	30
MF-2.9	2	0,80	PPO + POD	EC + EGCG	40	80	30
MF-2.10	2	0,80	PPO	EC + EGCG	40	80	30
MF-2.11	2	0,80	POD	EC + EGCG	40	80	30
MF-2.12	2	0,32	POD	C + EGCG	16	32	30
MF-3.1	3	1,00	PPO + POD	EC + EGCG	60	120	10
MF-3.2	3	0,56	PPO + POD	EC + EGCG	60	120	5
MF-3.3	3	0,55	PPO	EC + EGCG	60	120	5
MF-3.4	3	0,55	POD	EC + EGCG	60	120	5
MF-3.5	3	0,55	PPO + POD	EGC + ECG	60	120	5
MF-3.6	3	0,56	PPO	EGC + ECG	60	120	5
MF-3.7	3	0,55	POD	EGC + ECG	60	120	5
MF-3.8	3	0,55	PPO + POD	ECG + EGCG	60	120	5
MF-3.9	3	0,55	PPO	ECG + EGCG	60	120	5
MF-3.10	3	0,55	POD	ECG + EGCG	60	120	5
MF-3.11	3	0,55	PPO + POD	EGC + EGCG	60	120	5
MF-3.12	3	0,55	PPO + POD	EC + EGCG	60	100	30
MF-3.13	3	0,55	PPO + POD	EC + EGCG	60	60	30
MF-3.14	3	0,55	PPO + POD	EC + EGCG	60	80	30
MF-4.1	4	0,55	PPO + POD	EC + ECG	60	100	35
MF-4.2	4	0,55	PPO + POD	EC + ECG + EGC + EGCG	30	100	35
MF-4.3	4	1,00	PPO + POD	EC + EGC	60	100	35



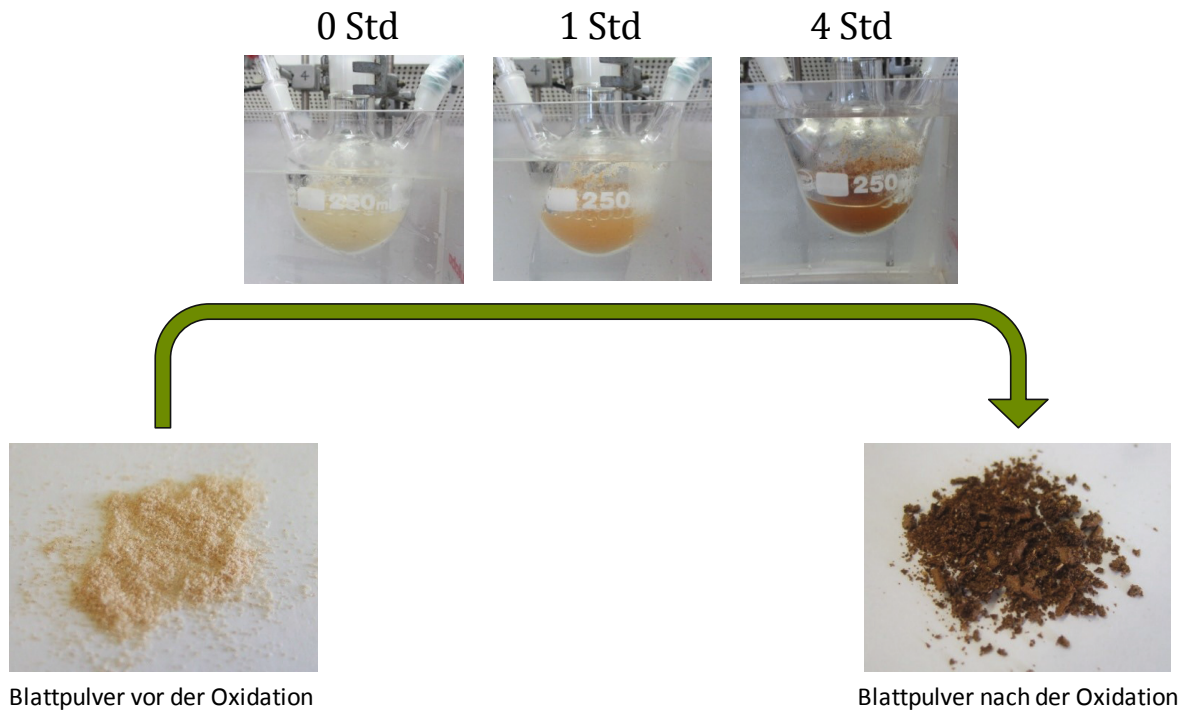
**Abb. 3-8** Schematische Darstellung des Ablaufs einer Modellfermentation: **1** Aus Teeextrakt werden mittels HSCCC die Flavanoie ECG, ECGG und EGC isoliert. EGC wird einer weiteren Aufreinigung mittels Sephadex LH-20 unterzogen, wohingegen (+)-C und EC käuflich erworben werden. Damit können beliebige Kombinationen der Grüntee polyphenole zur Fermentation eingesetzt werden. **2** Frische Teeblätter werden bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gemahlen, phenolische Bestandteile entfernt und das enzymatisch aktive Blattpulver gefriergetrocknet. **3** Durch Variation der Fermentationsbedingungen können die Enzyme PPO und POD selektiv genutzt werden: **PPO + POD**: Das Reaktionsgemisch wird mit synthetischer Luft durchspült. Außerdem wird  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung zugefügt. **POD**: Das Reaktionsgemisch wird mit synthetischer Luft durchspült. Es erfolgt keine Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$ . **POD**: Die Reaktion findet unter Sauerstoffabschluss statt. Dazu wird der Kolben mit Argon begast. Darüber hinaus wird  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung zugefügt. **4** Zur Schaffung konstanter Temperaturen und zur Beeinflussung der Enzymaktivität wird ein temperaturkontrolliertes Wasserbad genutzt. **5** 0,5 g des Teeblattpulvers (Schritt **2**) werden in einen Dreihalskolben gegeben und mit 10 mL Wasser versetzt. Die Catechine (Schritt **1**) werden in Wasser gelöst und auf die gewünschte Fermentationstemperatur gebracht. Nach Zugabe der Catechin-Lösung in den Kolben startet die Reaktion. **6** Die Probenahme ist zu jedem Zeitpunkt möglich. Durch Zugabe einer Stopplösung (60% ACN in 10%  $\text{CH}_3\text{COOH}_{(\text{aq})}$ ) wird die Reaktion beendet. Die HPLC-Proben werden zusätzlich mit einer EDTA- und ascorbinsäurehaltigen Lösung stabilisiert. **7** Anschließend können die Proben zur Analyse via HPLC-DAD und HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> eingesetzt werden.<sup>2,38</sup>



### 3.1.2.5 Allgemeine Beobachtungen

#### Farbentwicklung

Ein charakteristisches Merkmal des schwarzen Tees ist dessen rötlich-braune Farbe, welche primär durch die oxidativ gebildeten Theaflavine und Thearubigene verursacht wird.

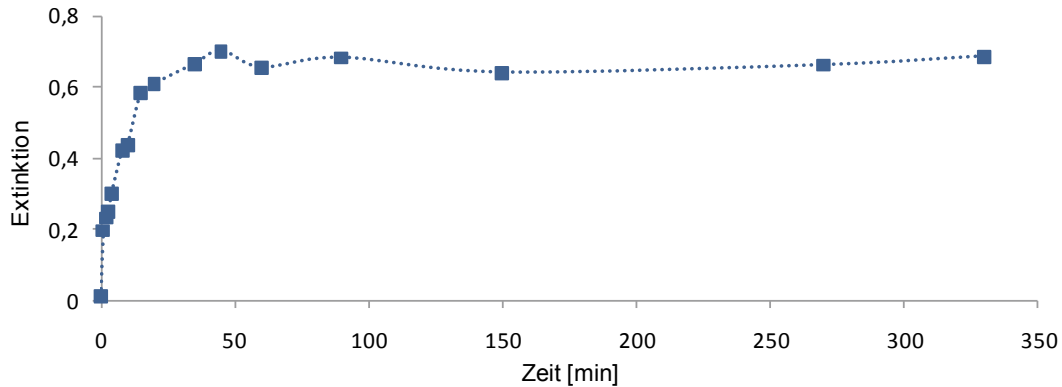


**Abb. 3–9** Farbveränderung während des Oxidationsvorganges von gelblich-weiß über orange zu braun (MF-3.5).

Resultierend aus dem vorangegangenen Extraktionsverfahren und der damit verbundenen Entfernung der Chlorophylle besitzt das in den Modelloxidationen verwendete Blattpulver eine blass-gelbliche Farbe. Alle weiteren zu Beginn der Versuche zugegebenen Komponenten sind farblos. Sobald das enzymhaltige Blattmaterial mit den Flavanolen in Kontakt tritt, entwickelt sich zunächst ein gelber, dann orange-roter Farbton, der mit zunehmender Dauer der Reaktion ins Bräunliche übergeht. In **Abb. 3–9** sind Aufnahmen des Teeblattpulvers vor und nach einer Oxidation sowie Fotografien des Reaktionskolbens zu Beginn und nach ein- bzw. vierstündiger Oxidation von EGC und ECG mit PPO und POD bei 5 °C (MF-3.5) zu sehen.<sup>242, 244</sup>

Diese Beobachtung entspricht den Erwartungen und deutet bereits vor der Auswertung der instrumentellen Analysen auf eine Bildung von TFs und TRs hin. Durch die Messung der Farbintensität der entnommenen Proben bei 460 nm wird die schnelle Farbbildung dokumentiert, wobei die Farbe im Falle der Oxidation MF-3.2 (EC und EGCG mit PPO und POD bei 5 °C)

nach etwa einer Stunde konstant bleibt (**Abb. 3–10**). Eine noch intensivere Braunfärbung, wie sie unter authentischen Bedingungen erfolgt, kann mit Hilfe des Modellsystems nicht erreicht werden, da hier auch Abbauprodukte des Chlorophylls zum Tragen kommen.



**Abb. 3–10** Entwicklung der Farbintensität bei 460 nm während der Modellfermentation MF-3.2.

#### Einfluss der Temperatur auf die Enzymaktivität

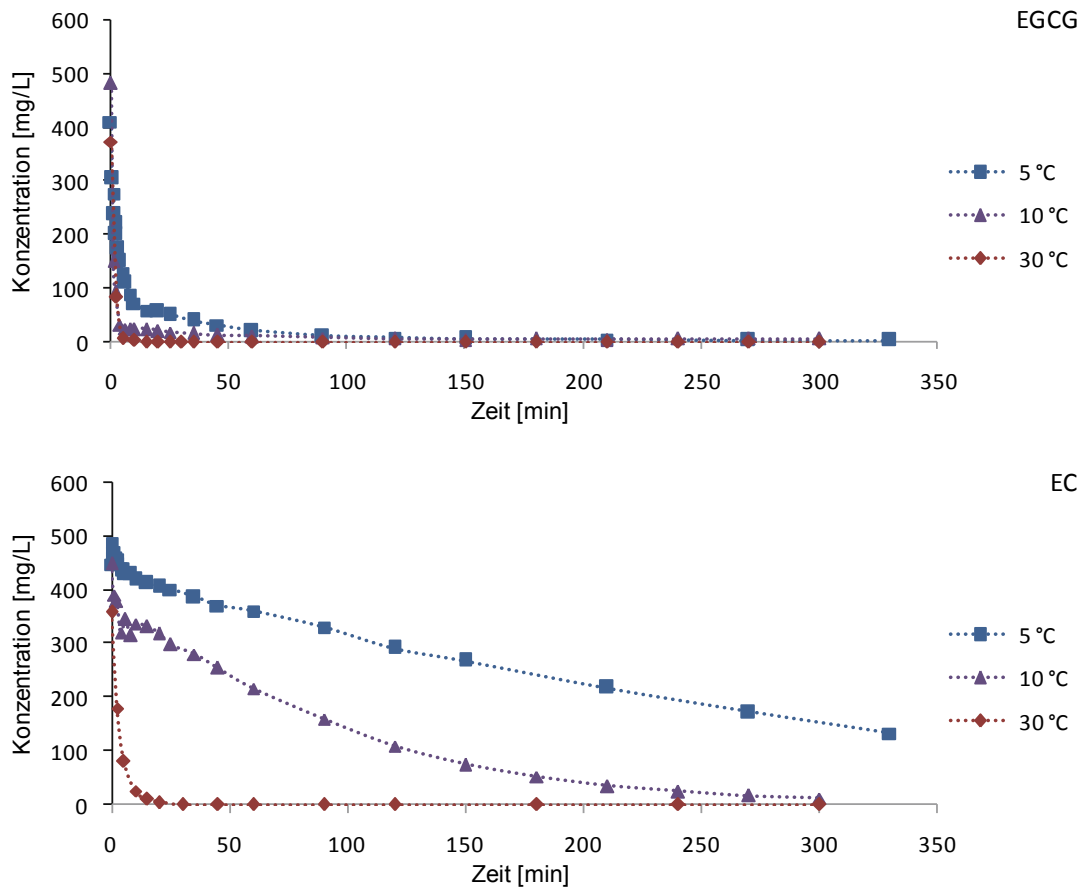
Bei der Durchführung der Versuche MF-2.1–2.12 bei 30 °C nahe dem Temperatur-Optimum der Enzyme (PPO: 40 °C; POD: 30 °C)<sup>143</sup> wurde eine unverzüglich einsetzende Reaktion beobachtet. Die Analyse der entnommenen Proben per HPLC-DAD (HPLC\_System 1 und 3) belegt eine rasche Umsetzung der Substrate mit vergleichbaren Reaktionsgeschwindigkeiten, wie sie unter Verwendung moderner Oxidationsmaschinen in der Schwarzteeherstellung erreicht werden. Nach Abschluss der ersten Versuchsreihe mit Blattcharge 2 wurde sowohl die Fermentationstemperatur als auch die eingesetzte Blattmenge verringert, um den Reaktionsverlauf detaillierter verfolgen zu können. Dafür wurde bei Zugabe von 0,55 g enzymhaltigen Blattmaterials eine geeignete Temperatur von 5 °C experimentell ermittelt (**Abb. 3–11**). Zusätzlich bietet die Temperaturreduktion den Vorteil einer stabileren PPO-Aktivität über den gesamten Versuchszeitraum, da diese nach einer Studie von CLOUGHLEY (1980) trotz des hohen Temperaturoptimums während Fermentationsreaktionen oberhalb von 15 °C zunehmend nachlässt.<sup>242, 245</sup>

Im Verlauf der Versuche mit Blattcharge 3 wurde eine Reduktion der Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet, woraufhin die Enzymaktivität des Blattmaterials erneut untersucht wurde (Abschnitt 3.1.2.3 und 5.4.4.3). Tatsächlich wurde trotz Lagerung bei –18 °C eine beträchtliche Verringerung der Aktivität beider Enzyme, insbesondere im Falle der POD, festgestellt (**Abb. 3–12**).<sup>239</sup> Spätere Modelloxidationen mit der 3. Charge des Teeblattpulvers (MF-3.12–3.14) wurden deshalb wieder bei 30 °C durchgeführt. Für die Experimente mit Blattcharge 4

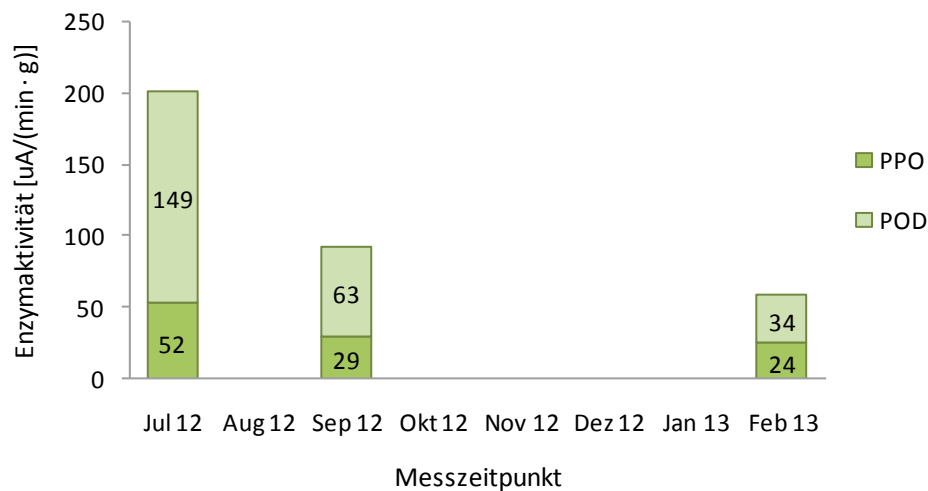


## Ergebnisse und Diskussion

(MF-4.1–4.3) wurde die Temperatur wegen der noch niedrigeren Aktivität auf 35 °C angepasst und die Enzymmenge im letzten Versuch (MF-4.3) fast verdoppelt.



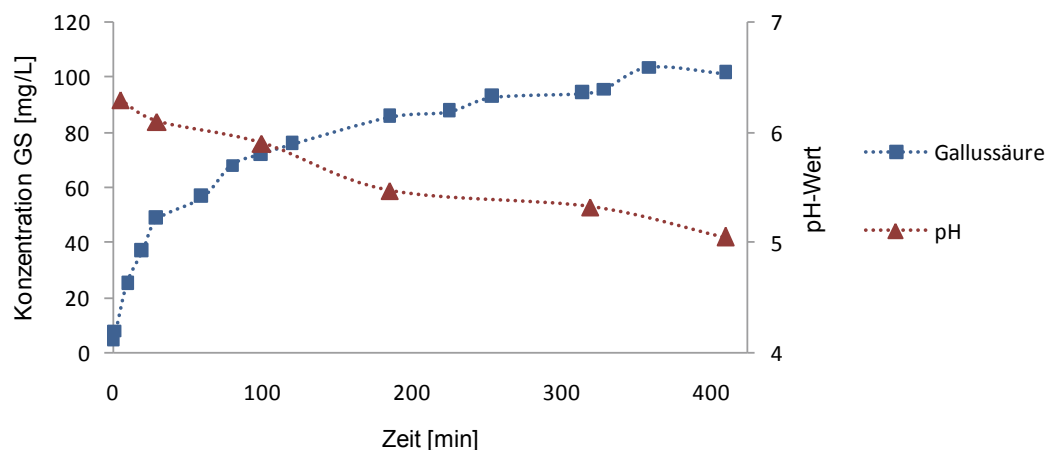
**Abb. 3–11** Einfluss der Temperatur auf die Abbaugeschwindigkeit von Epigallocatechingallat (oben) und Epicatechin (unten) während dreier Modelloxidationen bei 5, 10 und 30 °C (MF-2.9, -3.1 und -3.2).<sup>242</sup>



**Abb. 3–12** Aktivität von PPO und POD in dem als Enzymquelle verwendeten Teeblattpulver der Charge 3 in den Monaten Juli und September 2012 sowie Februar 2013.

### pH-Wert

In der Literatur beschriebene Modelloxidationssysteme verwenden in der Regel pH-Puffer, um eine optimale Umgebung für das jeweils eingesetzte Enzym zu schaffen. Die endogenen Tee-Enzyme PPO und POD besitzen ihr Aktivitätsoptimum bei pH 5,5 (PPO) bzw. 4,8–5,0 (POD).<sup>110, 115</sup> Da das von BONNELY et al. (2003) beschriebene Modell keines Pufferzusatzes bedarf, entfallen mögliche Limitierungen entnommener Proben gegenüber empfindlichen Analyseverfahren wie der Massenspektrometrie. Im Zuge der Modifikationen des Modellsystems und in Anbetracht der Gallussäure-Freisetzung (Abschnitt 3.1.2.7) wurde die Tauglichkeit ohne pH-Puffer erneut überprüft. Die Abhängigkeit des pH-Wertes von der Gallussäure-Konzentration im Verlauf der Oxidation MF-4.2 ist in **Abb. 3–13** dargestellt. Es zeigt sich, dass der pH-Wert zwar mit fortschreitender Dauer und steigender Gallussäure-Konzentration fällt, jedoch über den gesamten Versuchszeitraum innerhalb des geeigneten Bereiches bleibt.<sup>242</sup>



**Abb. 3–13** Verlauf von Gallussäure-Konzentration und pH-Wert während der Modelloxidation MF-4.2.

### Wassermenge

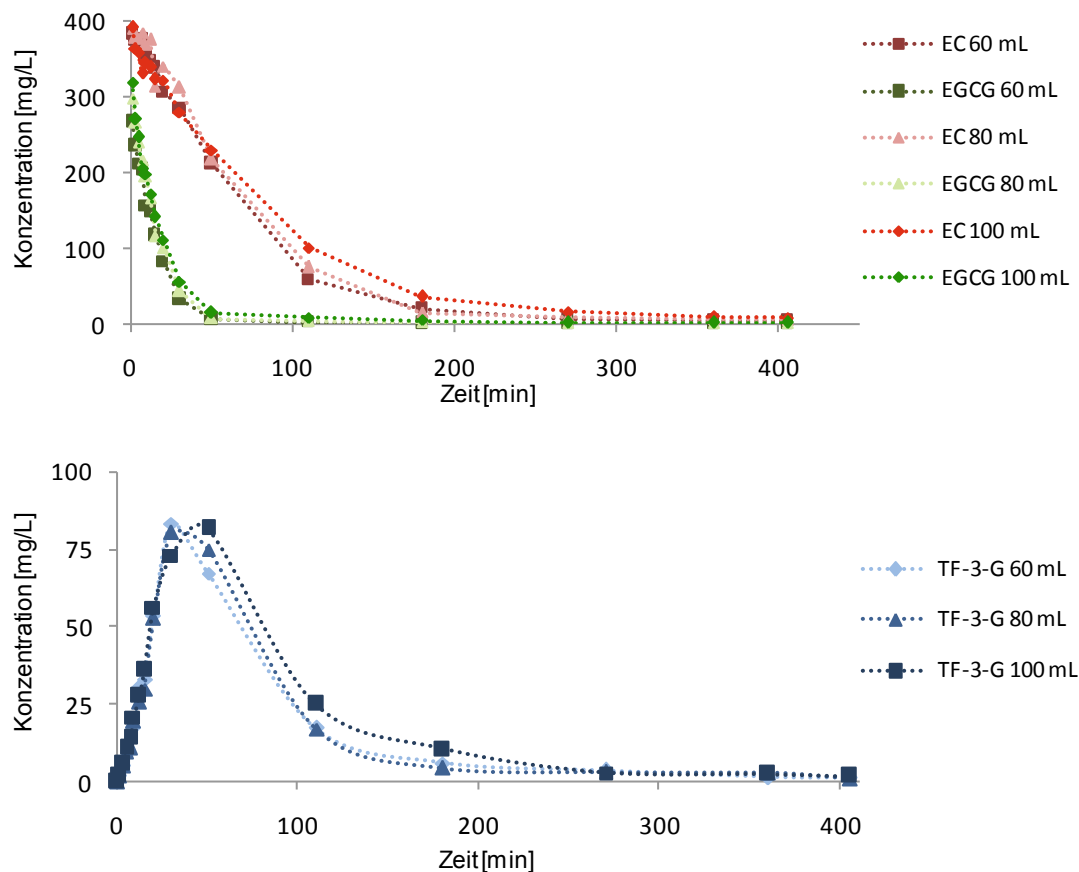
Die Modellfermentationen wurden in wässriger Suspension durchgeführt. Mit Hilfe dreier Versuchsansätze in unterschiedlichen Volumina (60, 80 und 100 mL) sollte überprüft werden, ob die Wassermenge einen Einfluss auf das Reaktionsgeschehen ausübt. Hierbei wurde jeweils die gleiche Menge an Ausgangsstoffen zugegeben. **Abb. 3–14** zeigt den Abbau von EC und EGCG und die daraus resultierende Bildung von TF-3-G. Um die Messwerte vergleichen zu können, wurden diese auf ein einheitliches Ausgangsvolumen von 100 mL umgerechnet.

Die Ergebnisse lassen keine signifikante Beeinflussung des Reaktionsverhaltens durch die Variation der Wassermenge erkennen.<sup>242</sup> Gleichwohl ist anzumerken, dass in allen Fällen Wasser im Überschuss vorlag und die Verhältnisse bei authentischen Fermentationen dies-

## Ergebnisse und Diskussion

bezüglich und auch hinsichtlich der Gleichmäßigkeit der Verteilung sämtlicher Reaktionspartner vom Modellsystem abweichen. Die gewählten Bedingungen waren allerdings zum Zwecke der Probenahme von Vorteil. Zudem macht ein Vergleich der Konzentrationskurven (**Abb. 3–14**) deutlich, dass das Modellsystem reproduzierbare Ergebnisse liefert.

Ein weiterer Aspekt im Zusammenhang mit der Wassermenge sind Verdunstungseffekte. Diese traten im Verlauf der Modellversuche, in denen synthetische Luft eingeleitet wurde (wodurch ein offenes System nötig war), insbesondere bei hohen Temperaturen (30/35 °C) auf. Demzufolge können die Gehaltsangaben v.a. bei späten Probenahmezeitpunkten zu hoch ausfallen.



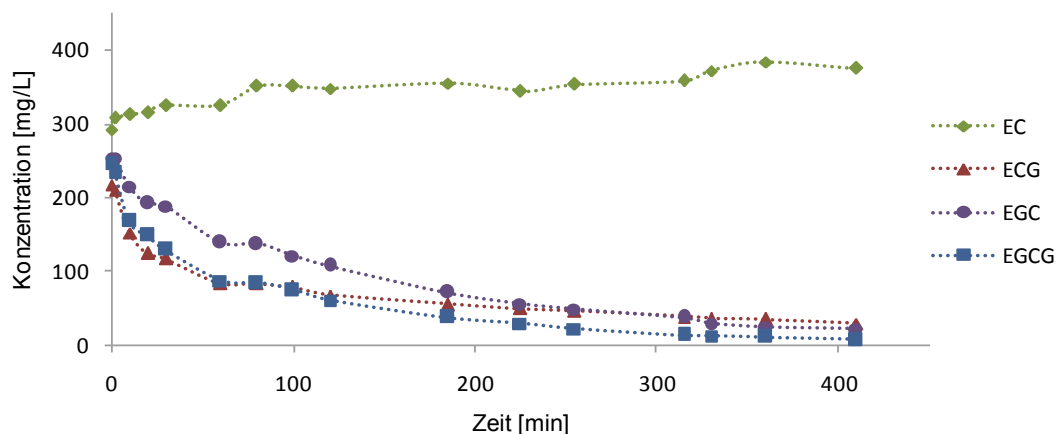
**Abb. 3–14** Umsetzung von je 60 mg EC und EGCG (Analyse mittels HPLC\_System 1, oben) und Bildung von TF-3-G (Analyse mittels HPLC\_System 3, unten) in unterschiedlichen Wasservolumina. Die Messwerte der Versuche mit 60 bzw. 80 mL wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf ein Ausgangsvolumen von 100 mL umgerechnet.

### 3.1.2.6 Abbau von Flavanolen mit PPO und POD

Während aller Fermentationsversuche mit PPO und POD (MF-2.1, -2.2, -2.6, -2.9, -3.2, -3.5, -3.8, -3.12, -4.1, -4.3) wurde beobachtet, dass bei Oxidationen zweier Catechine jeweils dasjenige mit einem geringeren Redoxpotential ((+)-C, EC > ECG > EGCG > EGC) einem schnelle-

ren und vollständigeren Abbau unterliegt (z. B. **Abb. 3–14**).<sup>242, 244</sup> Dies widerspricht den in der Literatur beschriebenen Substrataffinitäten der Enzyme, lässt sich jedoch mit dem in Abschnitt 1.3.2.4 und **Abb. 1–11** erläuterten Mechanismus erklären. Demnach kommt es im ersten Schritt der Reaktion zu einer enzymatisch katalysierten Oxidation des bevorzugten Catechins (im Gemisch EC + EGC wäre dies z. B. EC), welches anschließend als *ortho*-Chinon ein Catechin mit geringerem Redoxpotential oxidiert (im Beispiel wäre dies EGC) und dabei zurückgewonnen wird.

In der Modelloxidation MF-4.2, bei der die vier quantitativ wichtigsten Tee-Flavanole EC, ECG, EGCG und EGC eingesetzt wurden, wurde folgerichtig ein Abbau von ECG, EGCG und EGC festgestellt, wohingegen die Konzentration des EC nicht absank (**Abb. 3–15**).<sup>241</sup> Die ähnlichen Oxidationsgeschwindigkeiten von ECG, EGCG und EGC deuten darauf hin, dass das ECQ bei der Wahl eines Redox-Partners nicht selektiv vorgeht und etwa nur mit dem EGC reagiert, welches das geringste Redoxpotential aufweist.



**Abb. 3–15** Konzentrationsverlauf der Flavanole EC, ECG, EGC und EGCG während der Modelloxidation MF-4.2.

### 3.1.2.7 Reaktionsprodukte mit PPO und POD

#### Gallussäure

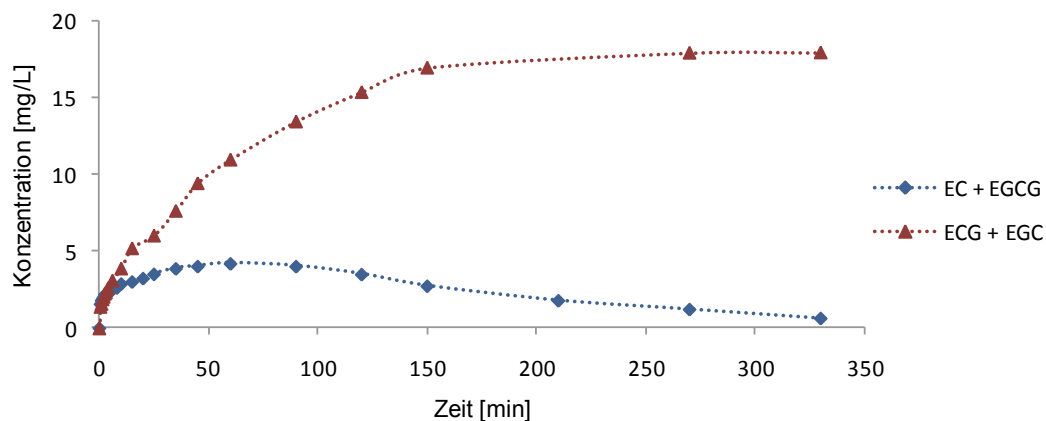
Die Bildung von Gallussäure während der Fermentation von Teeblättern ist lange bekannt und wurde bei sämtlichen Modelloxidationen beobachtet.<sup>171, 246</sup> Gemäß der Literatur handelt es sich bei dem Vorgang um eine oxidative Desgalloylierung.<sup>118-119</sup> Gleichzeitig kann es auch zu einer enzymatischen Spaltung der Esterbindung kommen, beispielsweise durch Tannase oder PPO.<sup>118, 247</sup> Die gebildeten Gallussäuremengen waren teilweise sehr gering, insbesondere im Falle der Oxidationen MF-2.6 und MF-4.3, bei denen nur nicht-galloylierte Flavanole als Substrate Verwendung fanden. Hierbei ist der Nachweis geringer Gallussäure-

## Ergebnisse und Diskussion

Konzentrationen auf Rückstände im Blattmaterial und in den Flavanolen zurückzuführen. Alle weiteren Versuche mit galloylierten Catechinen zeigten mehr oder weniger starke Freisetzungen von Gallussäure.<sup>239-241</sup>

Wie in **Abb. 3–16** dargestellt, wurden vornehmlich zwei Arten von Konzentrationsverläufen beobachtet, bei denen es jeweils zunächst zu einer Bildung von Gallussäure kommt. Im Verlauf der Modelloxidation wird diese entweder mit verringerter Geschwindigkeit bis zum Versuchsende freigesetzt oder kontinuierlich abgebaut.

Es ist nicht direkt ersichtlich, aus welchem Grund die Gallussäure bei einigen Versuchen einem Abbau unterliegt. In der Literatur ist vornehmlich von einer Freisetzung die Rede, BONNELLY et al. (2003) beschrieben jedoch ebenfalls einen Verlauf analog zu MF-3.5 (**Abb. 3–16**).<sup>143</sup> Auffällig ist, dass dies nur solche Versuche betrifft, in denen EC als Edukt eingesetzt wurde. Werden EC und ECG einzeln mit PPO und Gallussäure oxidiert, reagiert die Gallussäure nach Untersuchungen von BERKOWITZ et al. (1971) bevorzugt mit EC unter Bildung von Epitheflavinsäure als Zwischenprodukt, bevor weitere Umsetzungen zu TRs stattfinden.<sup>118</sup> Somit könnte der Abbau durch eine Reaktion des ECQ mit der Gallussäure zustande kommen, da dieser in etwa ab dem Zeitpunkt begann, zu dem das jeweilige Partner-Catechin verbraucht war.



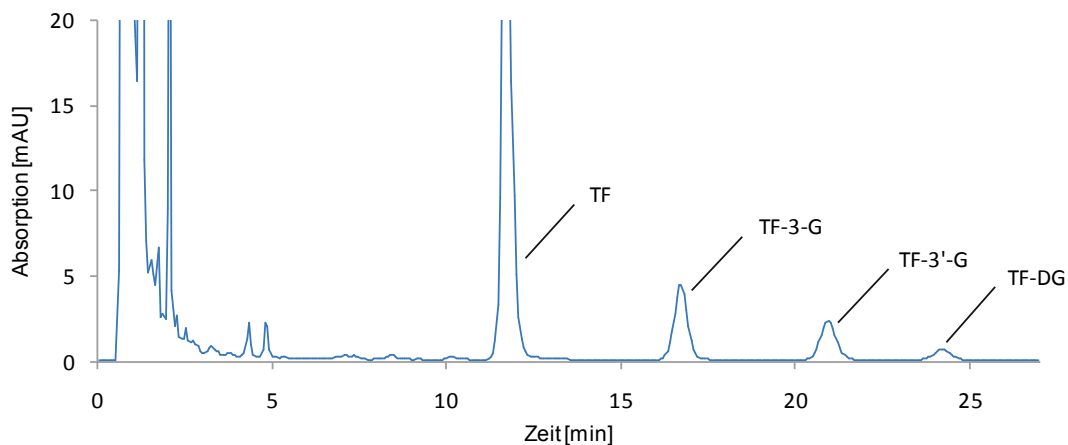
**Abb. 3–16** Verlauf der Gallussäure-Konzentrationen während der Oxidationen MF-3.2 und -3.5.

Ferner wurde eine Tendenz zu höheren maximalen Gallussäure-Konzentrationen festgestellt, wenn das Substrat mit der größten Affinität zur PPO eine Galloylfunktion besitzt. Gemäß BERKOWITZ et al. (1971) katalysiert PPO auch die Spaltung der Esterbindung.<sup>118</sup> Dies könnte erklären, weshalb während einer Oxidation von EC mit EGCG, in der EC als Primärs substrat auftritt, geringere Gallussäurefreisetzungen gemessen wurden als in einer Oxidation von ECG und EGC mit ECG als Primärs substrat (**Abb. 3–16**).

### Theaflavine

Wie in Abschnitt 1.3.2.4 beschrieben, stellen die Theaflavine ein Primärprodukt des oxidativen Catechin-Abbaus dar. Durch die oxidative Kopplung zweier Catechine, von denen je eines einen *o*-dihydroxylierten bzw. einen *vic*-trihydroxylierten B-Ring trägt, kommt es zur Bildung dimerer Verbindungen, die über eine zentrale 1',2'-Dihydroxy-3,4-Benzotropolon-Einheit verknüpft sind.

Der Nachweis erfolgte mittels HPLC\_System 3, welches anhand einer Kalibrierung mit externen Standards eine Quantifizierung von TF, TF-3-G, TF-3'-G und TF-DG ermöglicht. In **Abb. 3-17** ist ein Beispielchromatogramm von der Fermentation MF-4.2 dargestellt, bei der die vier Haupttheaflavine gebildet wurden.

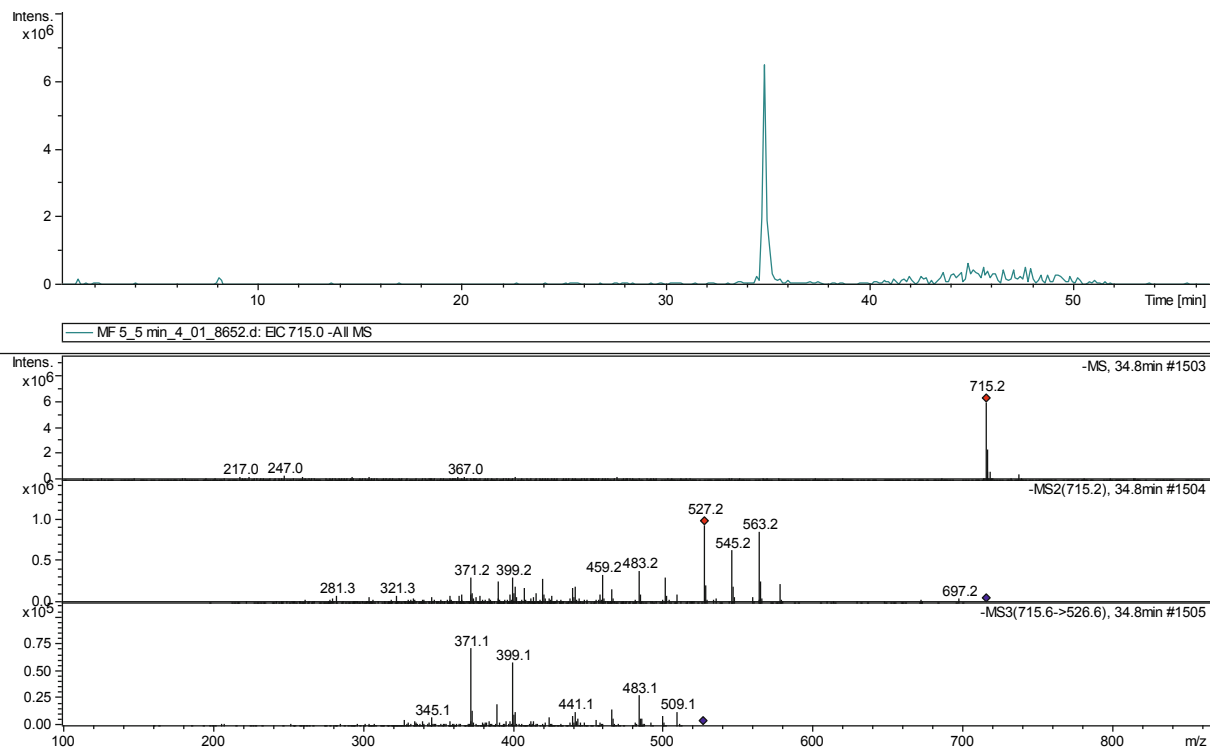


**Abb. 3-17** Chromatogramm ( $\lambda=274$  nm) der Theaflavinbestimmung mittels HPLC\_System 3 in einer nach 330 min entnommenen Probe von MF-4.2.

Infolge der Verwendung von (+)-Catechin bei der Oxidation MF-2.3 entstand mit hoher Wahrscheinlichkeit das Neotheaflavin-3-gallat als Hauptprodukt. Ein sicherer Nachweis war mangels Standard nicht möglich. Allerdings besaß das gebildete Produkt gegenüber seinem Epimer TF-3-G und dem TF-3'-G eine veränderte Retentionszeit und wurde im Massenspektrum mit identischem Masse-zu-Ladungsverhältnis und Fragmentierungsmuster detektiert (**Abb. 3-18**).<sup>240</sup>

Entsprechende Beobachtungen wurden für ein Nebenprodukt gemacht, welches in gleicher Weise als Neotheaflavin zugeordnet wurde. Die Quantifizierung der Neotheaflavine erfolgte mangels Standards mit den gleichen Kalibrierfunktionen, die auch für die korrespondierenden Epimere TF-3-G resp. TF verwendet wurden. Daher müssen die ermittelten Gehalte als Näherungen betrachtet werden. Die große Ähnlichkeit der Responsefaktoren von (+)-C und EC (s. Abschnitt 5.4.1.1) deutet jedoch darauf hin, dass zwischen den Epimeren nur ein geringer Unterschied besteht.

## Ergebnisse und Diskussion



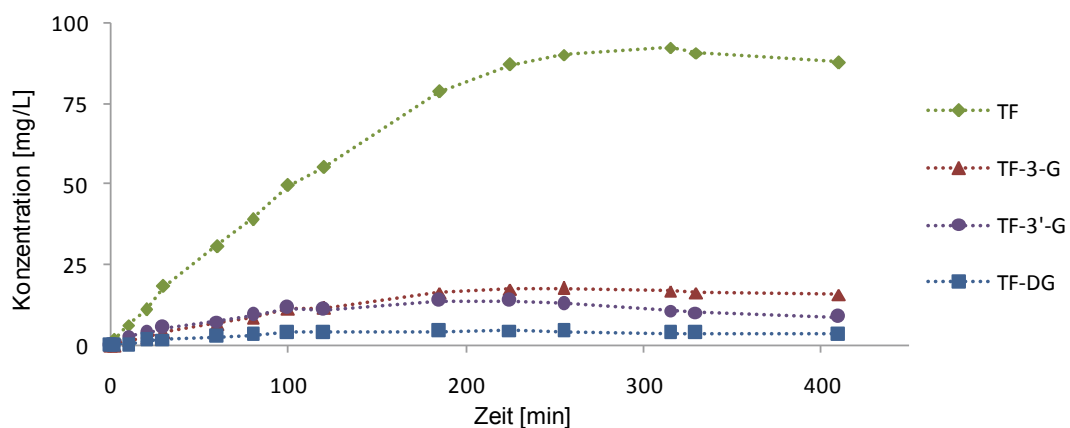
**Abb. 3-18** HPLC-ESI-MS<sup>n</sup>-Spektren einer nach 5min entnommenen Probe der Modelloxidation MF-2.3. *Oben:* Extracted-Ion-Chromatogramm ( $m/z = 715 \pm 0,5$ ; negativer Modus). *Unten:* Fragment-Spektren ( $MS^1$ – $MS^3$ ) des Hauptsignals bei 34,8 min.

**Tab. 3-7** Kombinationen von Flavanolen, die in Modelloxidationen mit PPO und POD eingesetzt wurden und daraus gebildete und per HPLC-DAD (HPLC\_System 3) nachgewiesene Theaflavine. In Fettschrift hervorgehobene Produkte traten jeweils als Hauptprodukt auf. <sup>a</sup> Geringe Mengen an TF-3-G via LC-MS nachweisbar, wahrscheinlich als Folge von Verunreinigungen im isolierten ECG.

Eingesetzte Flavanole	Produkte
EC + EGC	<b>Theaflavin</b>
EC + EGCG	<b>Theaflavin-3-gallat</b> , Theaflavin
ECG + EGCG	<b>Theaflavin-3,3'-digallat</b> , Theaflavin-3-gallat, Theaflavin-3'-gallat, Theaflavin
(+)-C + EGCG	<b>Neotheaflavin-3-gallat</b> , Neotheaflavin
ECG + EGC	<b>Theaflavin-3'-gallat</b> , Theaflavin
EGC + EGCG	Keine Theaflavinbildung
EC + EGC	Keine Theaflavinbildung <sup>a</sup>
EC + ECG + EGC + EGCG	<b>Theaflavin</b> , Theaflavin-3-gallat, Theaflavin-3'-gallat, Theaflavin-3,3'-digallat

In **Tab. 3-7** sind die acht untersuchten Catechin-Kombinationen und die daraus gebildeten Theaflavine aufgeführt.<sup>242</sup> Mitunter konnten neben dem erwarteten Hauptprodukt weitere TFs nachgewiesen werden, bei denen es sich jeweils um desgalloylierte Derivate des Hauptproduktes handelt. Eine Galloylfunktion kann sowohl vom Präkursor (EGCG, ECG) als auch vom bereits entstandenen Theaflavin (TF-3-G, TF-3'-G, TF-DG) abgespalten werden. Neben der Freisetzung von Gallussäure wird der Ablauf derartiger Reaktionen dadurch bestätigt, dass bei einer Oxidation der vier Hauptcatechine (MF-4.2) das TF in höherer Konzentration entstand, als dies aufgrund der eingesetzten Catechine zu vermuten war (**Abb. 3-19**).<sup>242</sup>

In den Versuchen MF-3.11 und -4.1 wurden erwartungsgemäß keine Theaflavine gebildet, da hier die dihydroxylierten Flavanole EC und ECG bzw. die trihydroxylierten Flavanole EGC und EGCG paarweise oxidiert wurden und somit keine Ausgangsstoffe zur Bildung der 1',2'-Dihydroxy-3,4-Benzotropolon-Einheit vorlagen.

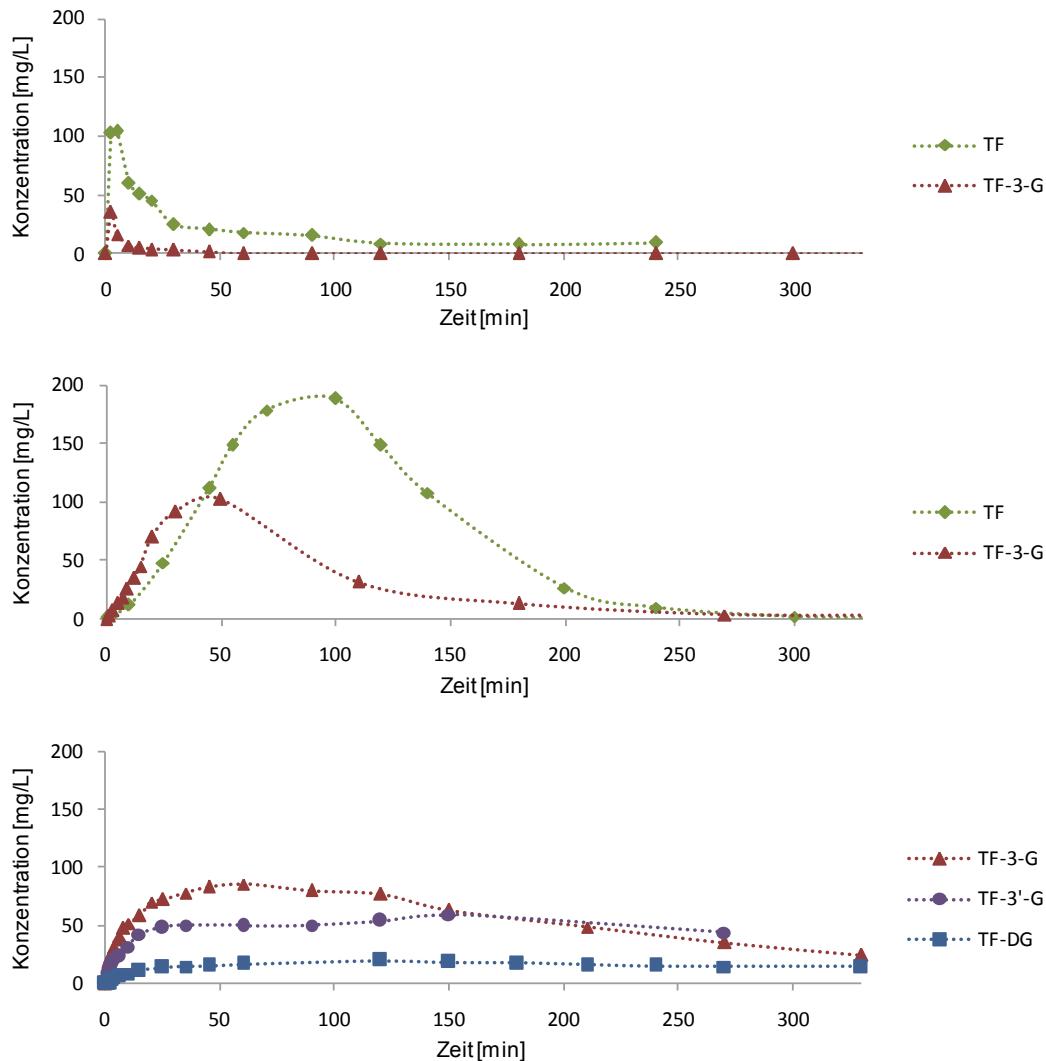


**Abb. 3-19** Theaflavinbildung im Verlauf der Modelloxidation MF-4.2.<sup>242</sup>

**Abb. 3-20** zeigt die Bildung von TF und TF-3-G bei 30 °C als Hauptprodukte der Modelloxidationen MF-2.6 bzw. MF-2.9 (oben) sowie MF-3.12 resp. MF-4.3 (mittig). Die Versuche MF-3.12 und MF-4.3 wurden mit Blattmaterial mit geringerer Enzymaktivität durchgeführt. Wie ein Vergleich der Graphen deutlich macht, läuft die Reaktion verzögert ab. Ferner ist gut zu erkennen, dass die Theaflavin-Konzentrationen nach dem Erreichen eines Maximums wieder abnehmen. Ebenso wie der Anstieg der Gehalte erfolgt auch der Abfall mit verringerter Geschwindigkeit. Demzufolge hängt die Umsetzung der Theaflavine ebenso wie die der Catechine von der Aktivität der Enzyme ab. Eine genauere Auswertung der Theaflavinbildung während der Modellversuche MF-2.1–2.12 ist nicht möglich, weil die hohe Enzymaktivität eine größere Anzahl an Probenahmen innerhalb der ersten zehn Minuten erfordert hätte.



## Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 3–20** Bildung von Theaflavinen während unterschiedlicher Modellversuche. Die Versuchsdaten wurden nach verwendeter Blattcharge und Temperatur so angeordnet, dass jeweils vergleichbare Enzymaktivitäten vorlagen. *Oben:* MF-2.6 (TF) und MF-2.9 (TF-3-G) bei 30°C. *Mitte:* MF-4.3 (TF) und MF-3.12 (TF-3-G) bei 35 bzw. 30°C. Aufgrund der höheren Eduktkonzentrationen wurden die ermittelten Gehalte rechnerisch auf das Niveau der anderen Oxidationen angeglichen. *Unten:* MF-3.2 (TF-3-G), MF-3.5 (TF-3'-G) und MF-3.8 (TF-DG) bei 5°C.

In **Abb. 3–20** (unten) sind außerdem die Konzentrationen an TF-3-G, TF-3'-G und TF-DG im Verlauf der Versuche bei 5 °C (MF-3.2, -3.5, -3.8) dargestellt. Ähnlich wie der Abbau der Catechine ist auch die Bildung der TFs bei niedrigeren Temperaturen stark verlangsamt. Die Bildungsgeschwindigkeiten des TF-3-G zeigen während der Oxidationen MF-3.2 und MF-3.12 (**Abb. 3–20** mittig und unten) keinen besonders großen Unterschied, was auf eine in etwa vergleichbare Enzymaktivität in den beiden Versuchen hindeutet. Gleichwohl findet der Abbau des TF-3-G im Falle der Oxidation bei 5 °C langsamer statt. Folglich scheint für den weiteren Reaktionsverlauf der TFs neben der Enzymaktivität auch die Temperatur eine Rolle zu spielen. Eine entsprechende Beobachtung wurde für das TF-DG gemacht, welches bei 5 °C



## Ergebnisse und Diskussion

(MF-3.5 und MF-3.8, **Abb. 3–20** unten) keinem signifikanten Abbau unterliegt, aber bei 30 °C und hoher Enzymaktivität (MF-2.1, Daten nicht abgebildet) gänzlich umgesetzt wird.<sup>240-242</sup>

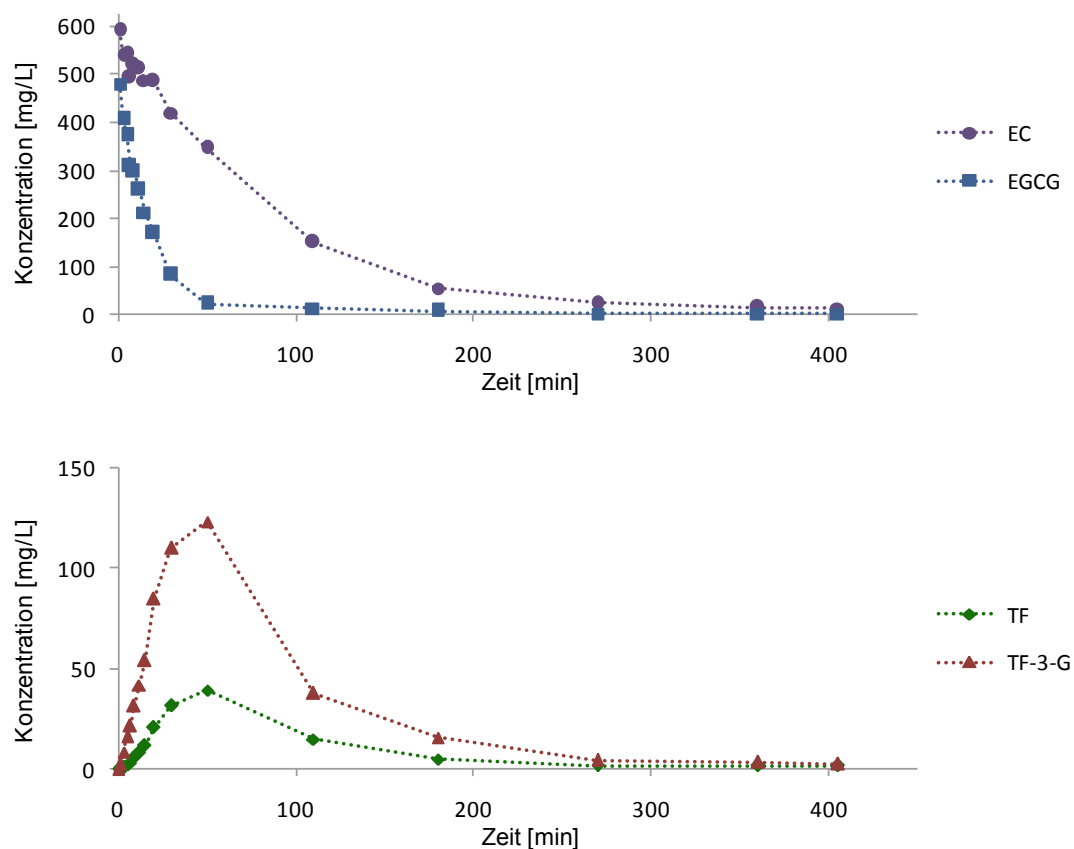
Im direkten Vergleich der Hauptprodukte der Flavanol-Oxidationen (**Abb. 3–20**) zeigt sich ebenfalls, dass deren maximale Konzentration mit steigendem Galloylierungsgrad sinkt. Als Ursache kommt zumindest teilweise die bereits erwähnte Bildung desgalloylierter Nebenprodukte zum Tragen.

Die während der Modellversuche MF-3.1– MF-4.3 beobachteten Theaflavingehalte deuten auf eine höhere Stabilität von TF-DG und TF-3'-G im Vergleich zu TF und TF-3-G hin. Daher bestand zunächst die Annahme, dass die 3'-O-Position einen bevorzugten Angriffspunkt darstellt.<sup>242</sup> Werden jedoch die Konzentrationskurven des Hauptproduktes und seines Nebenproduktes innerhalb eines Versuches betrachtet (z. B. TF-3-G und TF in Versuch MF-3.2), so kann dies nicht bestätigt werden. Vielmehr trat ein Theaflavinabbau (ähnlich dem Abbau der Gallussäure) immer dann auf, wenn EC als Substrat anwesend war. Der Abbau begann, sobald das Partner-Catechin vollständig umgesetzt worden war (**Abb. 3–21**). Eine mögliche Erklärung findet sich in der Literatur,<sup>120, 128</sup> wonach Theaflavin zwar kein Substrat für PPO ist (in Bezug auf POD bestehen widersprüchliche Berichte),<sup>110, 115, 171, 248</sup> allerdings durch ECQ oxidiert wird. Mit EGCG wurde diese Beobachtung hingegen nicht gemacht. Folglich wurde darauf geschlossen, dass die Redoxpotentiale der Theaflavine zwischen denen von EC und EGC liegen. Da die TFs in dieser Arbeit bei Anwesenheit von EGCG und ECG entweder keine oder nur geringe Abbauraten zeigten, wird angenommen, dass die Redoxpotentiale dieser Flavanole bzw. ihrer *o*-Chinone ebenfalls zu gering sind, um eine Oxidation der Theaflavine herbeizuführen.

Während aller Modellversuche mit den Chargen 3 und 4 (MF-3.1–MF-4.3) wurde ein Abbau von TFs ausschließlich bei Anwesenheit von EC als einzig verbliebenem Catechin beobachtet. Dahingegen nahmen die TF-Konzentrationen bei den Oxidationen mittels Charge 2 (MF-2.1–MF-2.12), welche bei deutlich höherer Enzymaktivität durchgeführt wurden, durchweg schnell ab. Mit Ausnahme der Serie ECG + EGCG (MF-2.1, -2.4, -2.5) wurden diese Versuche immer in Anwesenheit von EC oder (+)-C durchgeführt, wobei letzteres ein noch höheres Redoxpotential aufweist und somit ein Theaflavin-Abbau nach obiger Theorie zu erwarten war. Die Oxidationen von ECG + EGCG im Versuchsblock MF-2.1, -2.4, -2.5 ergaben einen Abbau der Theaflavine TF-3-G, TF-3'-G und TF-DG, was in der Versuchsreihe MF-3.8–MF-3.10 mit der gleichen Substratkombination nicht beobachtet wurde. Bei genauerer Betrachtung der Konzentrationsverläufe der Oxidationen mit Charge 2 fällt weiterhin auf, dass die Thea-

## Ergebnisse und Diskussion

flavine z. T. noch nach vollständiger Umsetzung aller Flavanole (mit verminderter Geschwindigkeit) abgebaut werden. Daher scheint noch ein weiterer Faktor zu existieren. Die Versuchsreihen (MF-2.1–MF-2.12 ↔ MF-3.1–MF-3.11) unterscheiden sich in der Enzymaktivität, der zugesetzten Menge an Blattmaterial und der Temperatur. Möglicherweise führen die höhere Temperatur und/oder die größere Blattmenge zur Aktivierung eines weiteren im Blattmaterial enthaltenen Tee-Enzyms, das mit den Theaflavinen direkt oder indirekt reagiert. Eine weitergehende Betrachtung der Umsetzung von TFs mit POD und einer Blattmatrix folgt in Abschnitt 3.1.3.



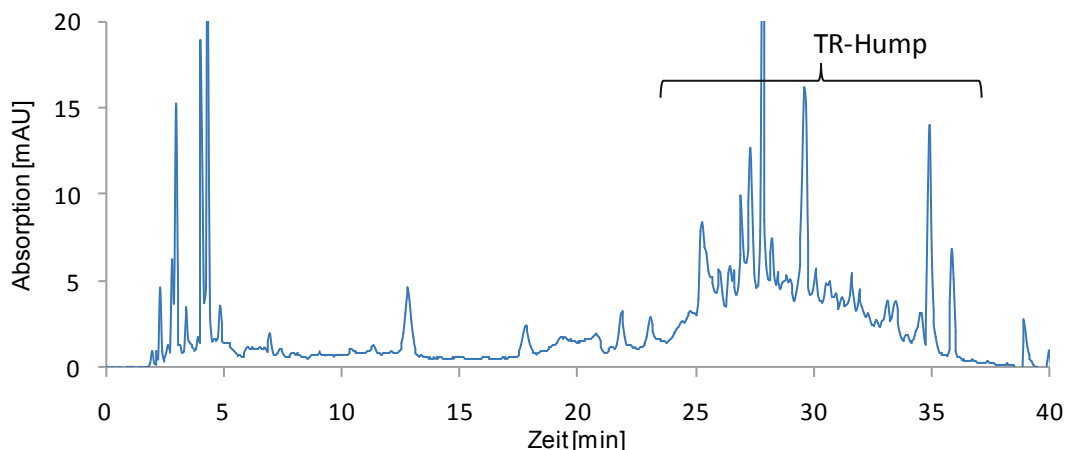
**Abb. 3–21** Konzentrationsverläufe der Oxidation MF-3.12. *Oben*: Substrate EC und EGCG; *unten*: gebildete Theaflavine TF-3-G (Hauptprodukt) und TF (Nebenprodukt).

### Thearubigene

Neben der Bildung von TFs konnte mittels HPLC-DAD-Analyse (HPLC\_System 1) die Entwicklung eines Thearubigen-„Humps“ während der Modellfermentationen beobachtet werden (**Abb. 3–22**).

Wie in Abschnitt 1.3.2.5 und 3.2.1.4 erläutert, gestaltet sich die Analytik der TRs schwierig, da keine zuverlässige Methode zur Quantifizierung der heterogenen Substanzklasse existiert. Als Indikator für den TR-Gehalt einer Probe wurde deshalb jeweils die Fläche des gesamten Humps bei 278 nm abzüglich der Flächen aller oberhalb aus dem Hügel herausragenden Peaks ermittelt. Ein alternatives Vorgehen zur Gehaltsabschätzung ist die indirekte Bestimmung über bekannte und quantifizierbare Komponenten. Anhand der gemessenen Konzentrationen wird der TR-Gehalt wie folgt berechnet (Gleichung 3–1):

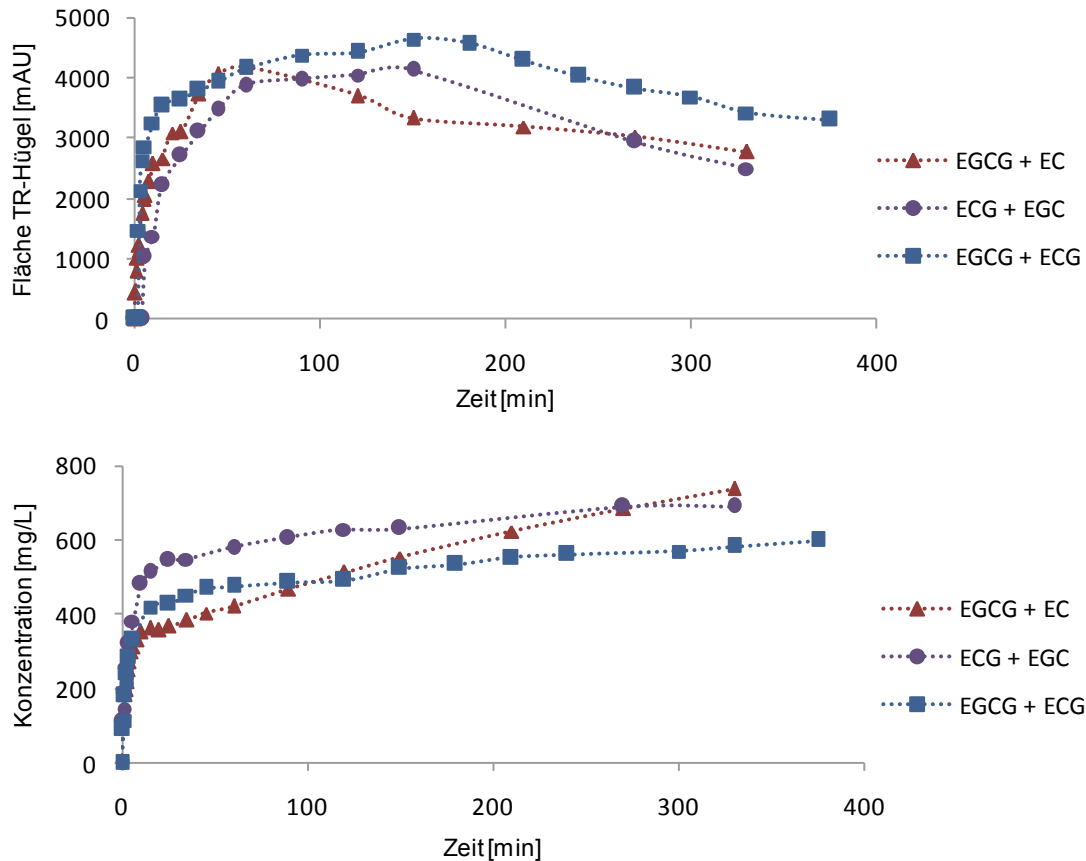
$$\begin{aligned} \text{Thearubigengehalt} = & \text{Flavanolgehalt zum Zeitpunkt 0} - (\text{Flavanolgehalt} & (3-1) \\ & + \text{Theaflavingehalt} + \text{Gallussäuregehalt zum} \\ & \text{Zeitpunkt der Probenahme}) \end{aligned}$$



**Abb. 3–22** HPLC-Chromatogramm ( $\lambda = 278 \text{ nm}$ ) der Reaktionslösung aus Modelloxidation MF-2.1 nach 10 min mit TR-Hump im Retentionsbereich von ca. 23–37 min.

**Abb. 3–23** zeigt eine Gegenüberstellung der beiden Quantifizierungsmethoden anhand der Modelloxidationen MF-3.2, -3.5 und -3.8. Bei beiden Herangehensweisen wird ein steiler Anstieg des TR-Gehaltes innerhalb der ersten Minuten angezeigt. Im weiteren Verlauf nehmen die Flächen des TR-Humps nur noch langsam zu und beginnen nach ca. 50–150 min wieder leicht abzufallen, während die berechneten Gehalte mit verminderter, aber in etwa konstanter Geschwindigkeit kontinuierlich bis zum Versuchsende ansteigen.<sup>242</sup>

## Ergebnisse und Diskussion



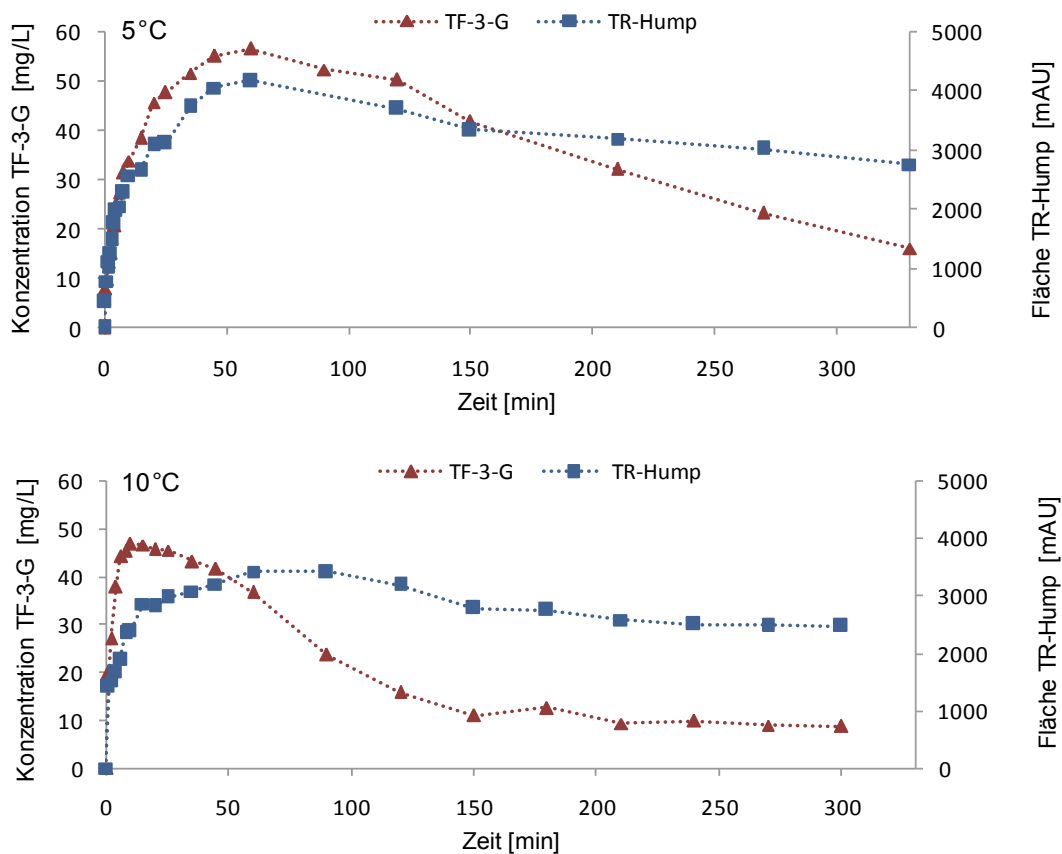
**Abb. 3–23** Bildung von TRs während dreier Modellfermentationen mit unterschiedlichen Flavanol-Kombinationen bei 5 °C (MF-3.2: EGCG + EC, MF-3.5: ECG + EGC, MF-3.8: EGCG + ECG), abgeschätzt anhand der Fläche des TR-Hügels bei 278 nm (oben) bzw. einer Gehaltsberechnung gemäß Formel 3–1 (unten).

Umsetzungen innerhalb der Thearubigene wie weitere Oligomerisierungsreaktionen und Hydroxylierungen bleiben bei beiden Methoden unerfasst. Allerdings könnte der leichte Abfall der Fläche des TR-Humps auf solche Reaktionen zurückzuführen sein, wenn die höhermolekularen Oxidationsprodukte eine geringere relative Absorption aufweisen.<sup>242</sup> Außerdem werden mit steigender Reaktionsdauer zunehmend Signale im vorderen Bereich des HPLC-Chromatogramms detektiert (**Abb. 3–22**). Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um Abbauprodukte der TRs/TFs oder um TRs der Gruppe I nach BAILEY et al. (1991), welche per HPLC nicht retardiert werden und dementsprechend mit dem Totvolumen eluieren.<sup>194</sup> Bei der flächenbasierten Methode werden diese Komponenten nicht mit einbezogen, während sie in den Berechnungen als TRs erfasst werden. Die Analyse über die Fläche besitzt somit den Vorteil, auf einer tatsächlich auf dem TR-Gehalt basierenden Größe zu beruhen, wohingegen sich die Berechnung nur auf anderweitige Parameter stützt.

Gemäß den Ergebnissen läuft die Bildung einer Thearubigenfraktion innerhalb kurzer Zeit nach Beginn der Oxidationsreaktionen ab. Es ist anzunehmen, dass im Anschluss weitere Reaktionen stattfinden, beispielsweise gemäß der Theorie einer oxidativen Kaskade. Diese

## Ergebnisse und Diskussion

beeinflussen zwar die Beschaffenheit der Fraktion, haben aber keine substantielle Auswirkung auf die Quantität der TRs im Tee. Die HPLC-Messungen weisen darauf hin, dass die Fermentationsdauer eines Tees weniger den TR-Gehalt beeinflusst, als vielmehr die Zusammensetzung dieser Gruppe. Wie in **Abb. 3–24** dargestellt, scheint die Bildung der TRs weniger stark von der Enzymaktivität abzuhängen als die Bildung und Umsetzung der TFs. Bei Modelloxidationen mit niedriger Enzymaktivität (MF-3.2, -3.5, -3.8) wurde eine ähnliche Bildungsgeschwindigkeit der TFs und TRs beobachtet, während die Theaflavin-Bildung bei leicht erhöhter Enzymaktivität (MF-3.1) gegenüber der TR-Bildung beschleunigt ablief. Aufgrund der überaus schnellen Bildung beider Substanzklassen können bei sehr hoher Enzymaktivität (MF-2.1, -2.3, -2.6, 2.9) keine eindeutigen Aussagen getroffen werden.<sup>239-240</sup>



**Abb. 3–24** Vergleich der Konzentration von TF-3-G mit der Fläche des TR-Humps bei unterschiedlicher Enzymaktivität während der Oxidationen MF-3.2 (5 °C, oben) und MF-3.1 (10 °C, unten).



### 3.1.2.8 Einfluss von PPO und POD

Die oben beschriebenen Ergebnisse beziehen sich weitgehend auf Modelloxidationen unter gleichzeitiger Verwendung beider endogener Tee-Enzyme (PPO und POD). In diesem Abschnitt sollen nun die unterschiedlichen Einflüsse der einzelnen Enzyme betrachtet werden. Hierzu wurden die Bedingungen während der Oxidationen so angepasst, dass jeweils nur ein Enzym arbeiten konnte. Kernelemente der Auswertung sind die Versuchsblöcke MF-3.2–MF-3.4, MF-3.5–MF-3.7 sowie MF-3.8–MF-3.10. In **Abb. 3–25** bis **Abb. 3–27** sind die Konzentrationsverläufe wesentlicher Bestandteile der jeweiligen Versuchsreihen dargestellt. Diese werden durch die mit Charge 2 erzielten Ergebnisse ergänzt, welche allerdings wegen der sehr schnellen Reaktionsabläufe nur bedingt aussagekräftig sind.

#### Allgemeine Beobachtungen

Wie **Abb. 3–25** bis **Abb. 3–27** zeigen, verlaufen die Reaktionen mit POD zunächst praktisch identisch zu den Oxidationen mit beiden Enzymen. Dies lässt darauf schließen, dass die Enzyme zueinander in Konkurrenz stehen, wobei der Einfluss der POD zu Beginn der Umsetzungsreaktionen überwiegt. Ein klarer Unterschied der POD-Oxidation gegenüber den PPO + POD-Oxidationen wird erst ab dem Zeitpunkt erkennbar, zu dem das erste Flavanol vollständig verbraucht ist. Dann treten die durch die POD katalysierten Reaktionen in den Hintergrund und der Einfluss der PPO wird deutlich. Die charakteristischen Unterschiede zwischen den PPO- und POD-Oxidationen belegen das erfolgreiche Ausschalten des jeweils anderen Enzyms.

Gegenüber den Experimenten mit POD-Beteiligung weisen die nur mit PPO durchgeführten Versuche deutliche Abweichungen auf. Sie verlaufen zudem insgesamt langsamer, was sich mit der geringeren Enzymaktivität begründen lässt.

Im Folgenden werden die Einflüsse der Enzyme in Bezug auf charakteristische Bestandteile beschrieben.

#### Flavanole

Bei alleiniger Umsetzung mit PPO unterscheidet sich die Abbaukinetik der Flavanole deutlich von der, die in Anwesenheit von POD beobachtet wird. So erfolgt der Konzentrationsrückgang mit PPO sehr viel gleichmäßiger und in den meisten Fällen fast linear. Der vollständige Verbrauch des Partner-Catechins hat dabei keinen Einfluss auf die Abbaugeschwindigkeit des verbleibenden Flavanols (z. B. **Abb. 3–25**: EC und EGCG in Versuch MF-3.3).<sup>242</sup>



## Ergebnisse und Diskussion

Modelloxidationen	
MF-3.2:	PPO + POD
MF-3.3:	PPO
MF-3.4:	POD

---

Substrate:	EC + EGCG
Temperatur:	5 °C

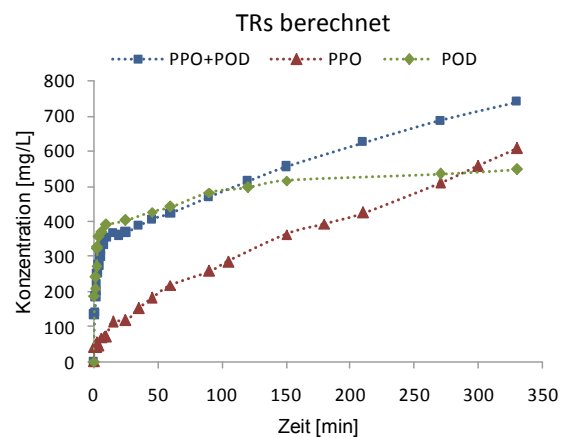
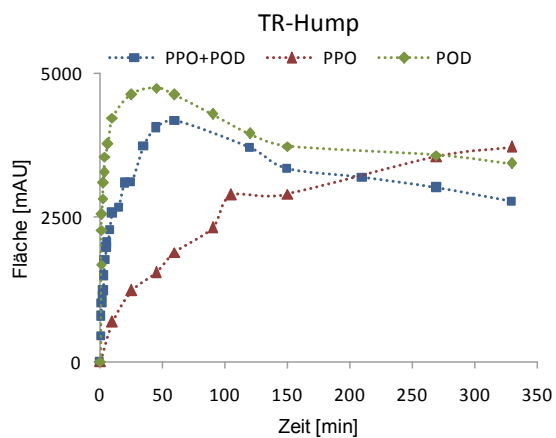
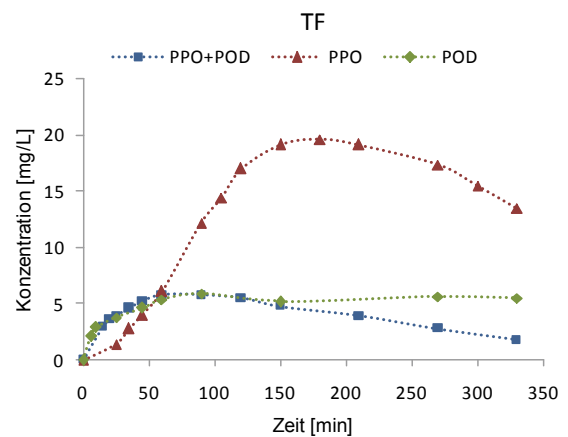
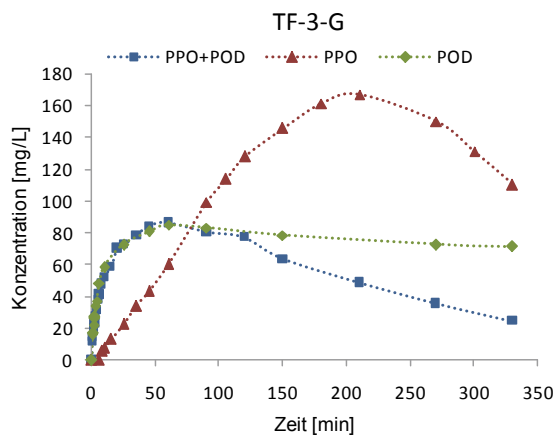
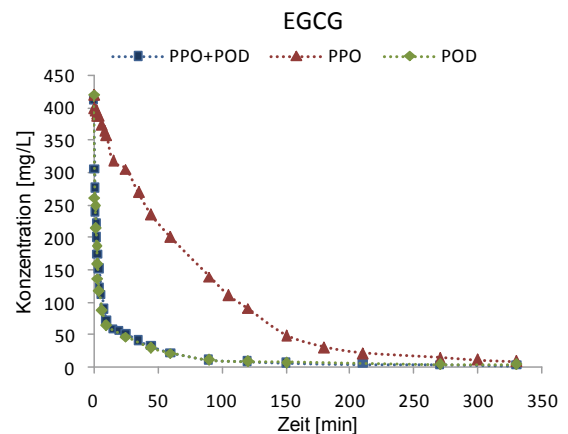
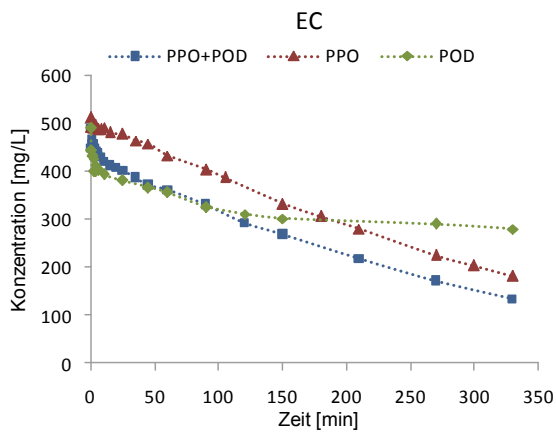
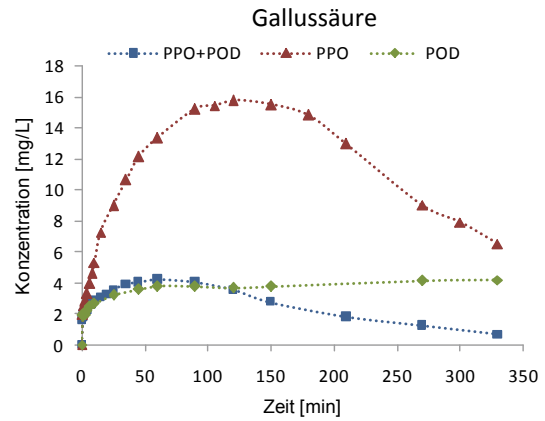
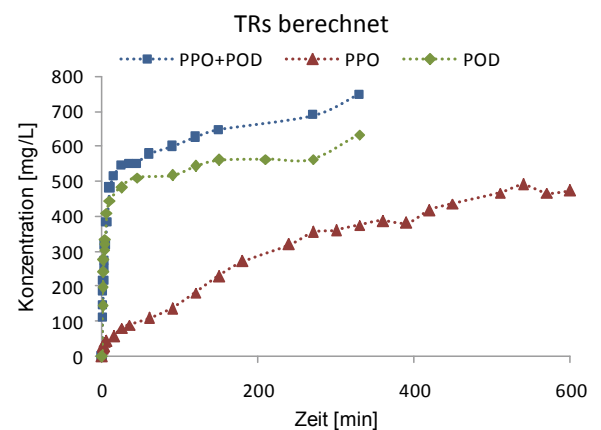
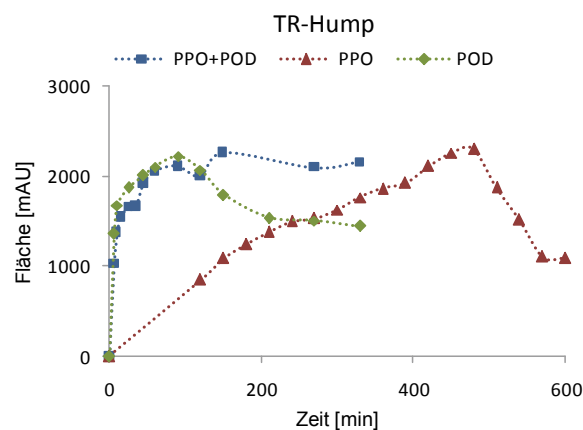
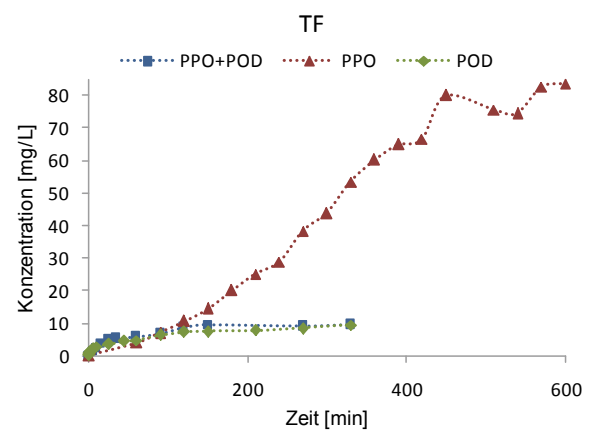
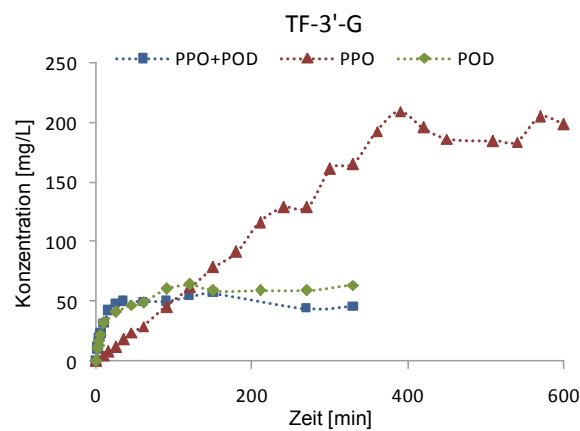
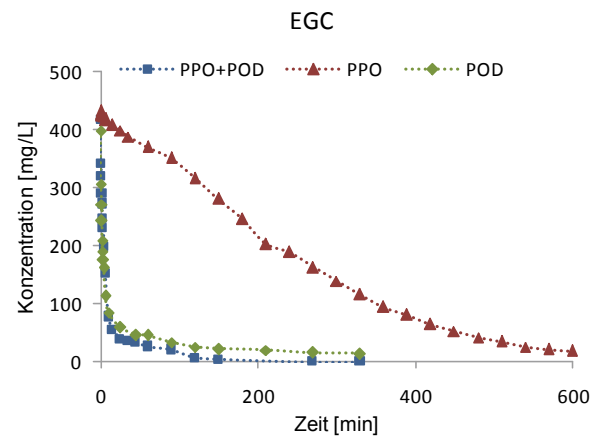
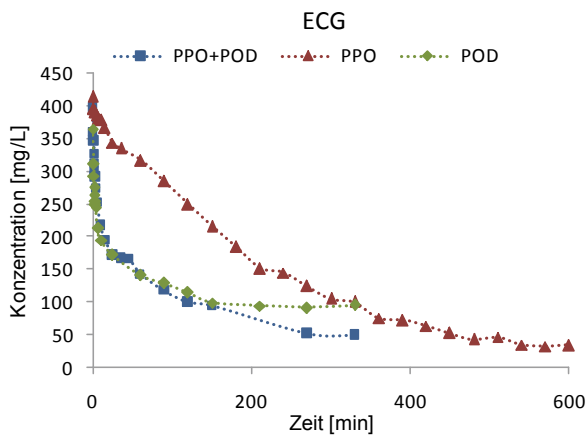
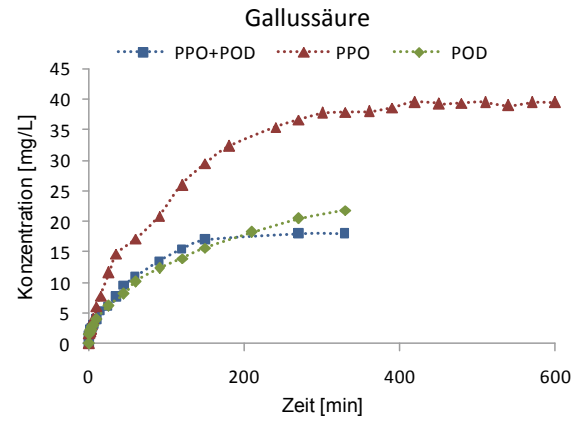


Abb. 3–25 Übersicht über den Einfluss der Enzyme auf Abbau und Bildung wesentlicher Bestandteile des Versuchsblocks MF-3.2–MF-3.4.



## Ergebnisse und Diskussion

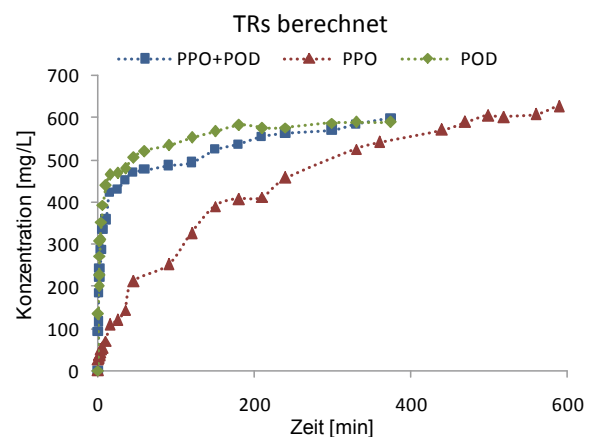
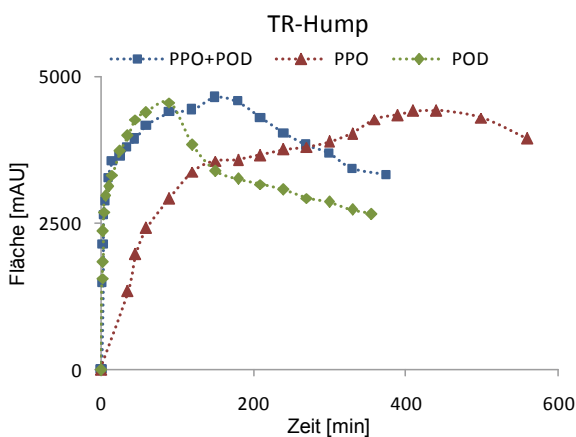
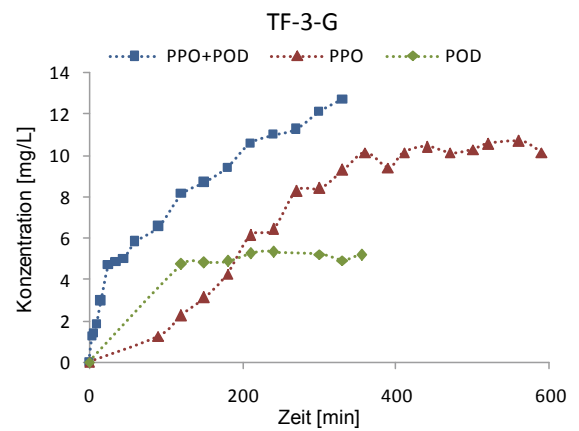
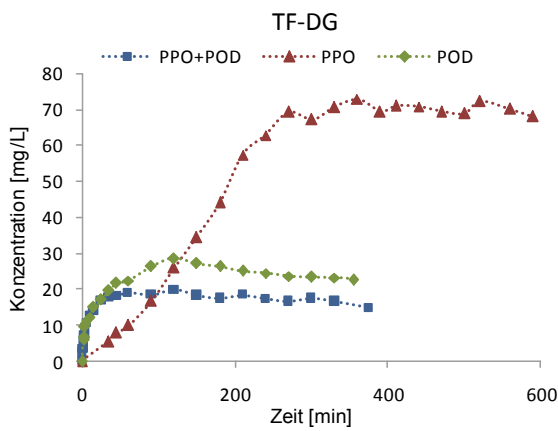
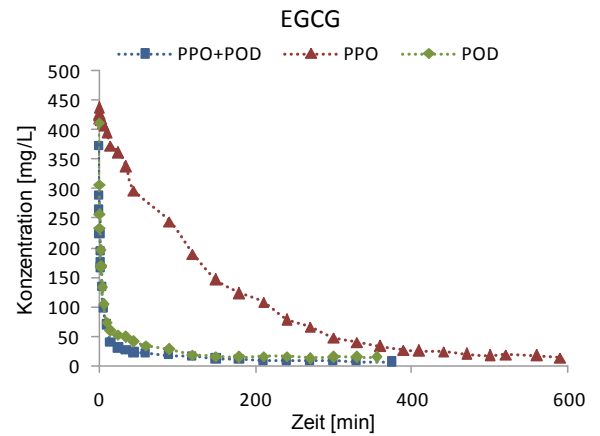
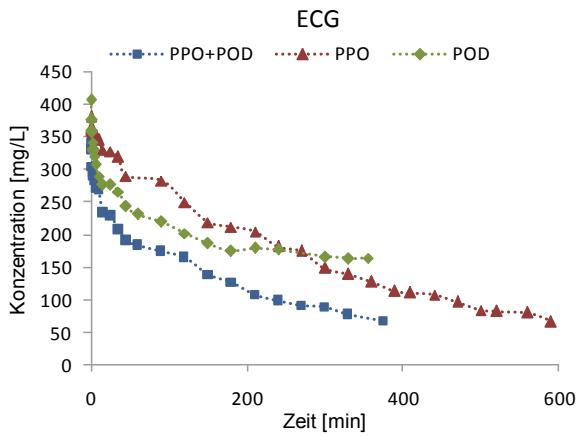
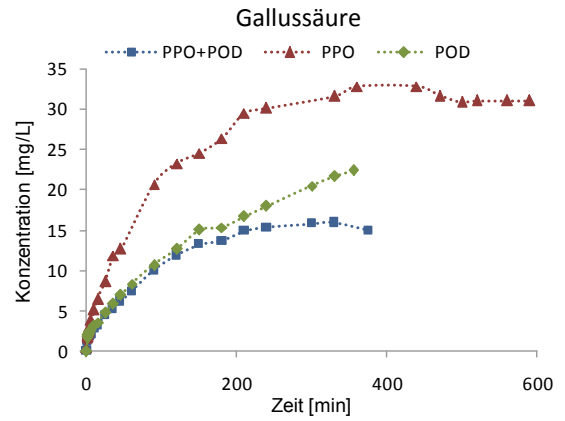
Modelloxidationen	
MF-3.5:	PPO + POD
MF-3.6:	PPO
MF-3.7:	POD
<hr/>	
Substrate:	ECG + EGC
Temperatur:	5 °C



**Abb. 3-26** Übersicht über den Einfluss der Enzyme auf Abbau und Bildung wesentlicher Bestandteile des Versuchsblocks MF-3.5–MF-3.7.

## Ergebnisse und Diskussion

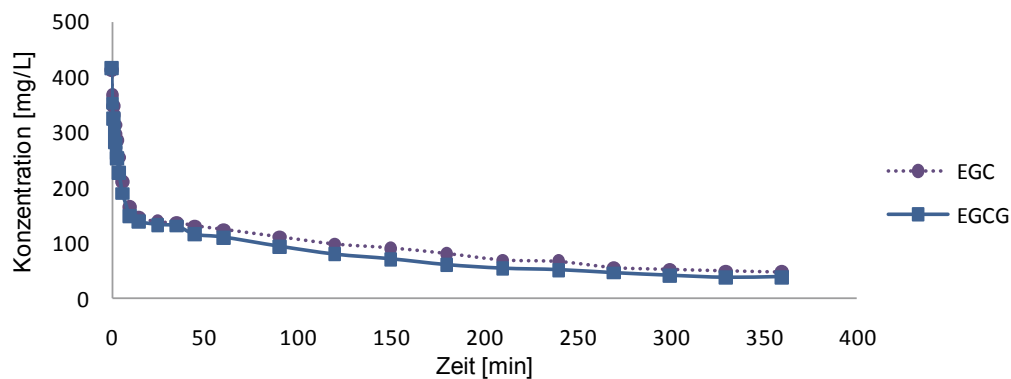
Modelloxidationen	
MF-3.8:	PPO + POD
MF-3.9:	PPO
MF-3.10:	POD
<hr/>	
Substrate:	ECG + EGCG
Temperatur:	5 °C



**Abb. 3-27** Übersicht über den Einfluss der Enzyme auf Abbau und Bildung wesentlicher Bestandteile des Versuchsblocks MF-3.8–MF-3.10.

## Ergebnisse und Diskussion

Die Umsetzung der Flavanole mit POD erfolgt dagegen exponentiell, die Reaktionsgeschwindigkeit ist jedoch von der Anwesenheit eines Partner-Flavanols abhängig. Catechine mit dreifach hydroxyliertem B-Ring (EGC, EGCG) wurden im direkten Vergleich jeweils schneller abgebaut als zweifach hydroxylierte (EC, ECG). Bemerkenswerterweise kam die Umsetzung des EC bzw. ECG zum Erliegen, sobald das jeweilige Partner-Catechin (EGC oder EGCG) verbraucht war (**Abb. 3–25** bis **Abb. 3–27**). Die POD scheint demnach eine besonders hohe Affinität zu EGC und EGCG zu besitzen. Eine Bevorzugung eines dieser beiden Catechine wurde nicht festgestellt.<sup>242</sup> Gestützt wird diese Beobachtung durch den Versuch MF-3.11, in dem EGC und EGCG bei der Umsetzung durch PPO und POD praktisch identische Abbauraten aufwiesen (**Abb. 3–28**).



**Abb. 3–28** Abbau von EGC und EGCG während der Oxidation MF-3.11 mit PPO und POD.

### Gallussäure

Wie bereits beschrieben, findet im Verlauf der Teeherstellung eine Freisetzung von Gallussäure statt. Dies wurde auch in den Versuchen mit nur einem Enzym beobachtet (**Abb. 3–25** bis **Abb. 3–27**). Während der Oxidationen mit PPO war eine auffallend starke Bildung festzustellen, was im Einklang mit der Literatur steht.<sup>118, 242</sup>

Außerdem ähneln die Konzentrationsverläufe der POD-Versuche erneut denen der Oxidationen mit beiden Enzymen. Eine deutliche Abweichung der Kurvenverläufe ergibt sich erst nach der vollständigen Umsetzung eines der Catechine, so dass die Freisetzung in direktem Zusammenhang zum Flavanol-Abbau zu stehen scheint. Der Unterschied zwischen den POD- und PPO + POD-Experimenten äußert sich in einem Abfall bzw. einer gestoppten Konzentrationszunahme bei Anwesenheit von PPO. Bei den reinen PPO-Oxidationen liegen die Gehalte jedoch deutlich höher. Offenbar überwiegt zu diesem fortgeschrittenen Zeitpunkt der Fermentation, zu dem nur noch geringe Mengen der Flavanole zur Verfügung stehen, die von



## Ergebnisse und Diskussion

der PPO katalysierte Oxidation der Gallussäure (s. Abschnitt 3.1.2.5). Dies erklärt auch die Abnahme des Gallussäuregehaltes in Versuch MF-3.3.

### Theaflavine

Die Theaflavin-Kurven in **Abb. 3–25** bis **Abb. 3–27** verdeutlichen, dass die Flavanole durch PPO in einem wesentlich höheren Grad zu den Benzotropolonderivaten umgesetzt werden, als dies in Anwesenheit von POD geschieht. So liegt das Konzentrationsmaximum des Haupttheaflavins bei einer PPO-Oxidation durchschnittlich um etwa das Doppelte über dem eines Modellversuchs mit POD oder PPO + POD.<sup>242</sup> Die bevorzugte Bildung von TFs durch PPO wurde bereits von Dix et al. (1981) berichtet und kann somit bestätigt werden.<sup>115</sup>

Bei gemeinsamer Anwesenheit von EC und PPO (MF-3.3) ist der bereits in Abschnitt 3.1.2.5 für MF-3.2 (EC + EGCG mit beiden Enzymen) beschriebene Abbau der Theaflavine zu beobachten (**Abb. 3–25**). Die Gehaltsabnahme beginnt auch mit der einzelnen PPO erst nach fast vollständiger Umsetzung des EGCG. In der Modellfermentation mit POD (MF-3.4) verhalten sich die TFs nach Erreichen ihres Maximalgehaltes hingegen weitgehend stabil. Diese Beobachtung ist ein weiterer Beleg dafür, dass die POD nach Abbau des EGCG keine Oxidation des EC katalysiert, die sich in einer Reduzierung der TF-Gehalte äußern würde.

Ist statt des EC ECG zugegen, zeigen die Theaflavine auch in den Versuchen mit Einzelenzymen keine nennenswerte Abnahme (**Abb. 3–26** und **Abb. 3–27**).

### Thearubigene

Die Bildung von Thearubigenen verläuft sowohl mit POD als auch mit PPO + POD zügig und erreicht nach Auswertung der Flächen des TR-Hügels nach etwa 50–100 min ein Maximum (**Abb. 3–25** bis **Abb. 3–27**). Im Anschluss fällt die Fläche wieder ab. Gemäß den berechneten Gehalten erfolgt innerhalb der ersten 10 min ein steiler Konzentrationsanstieg, woraufhin die Gehalte bis zum Versuchsende mit deutlich verminderter Geschwindigkeit weiter zunehmen. Wird nur PPO eingesetzt, so erfolgt die TR-Generierung laut beider Bestimmungsmethoden klar langsamer, wobei sich die Gehalte gegen Ende der Versuche an die mit POD-Beteiligung erreichten Werte annähern.<sup>242</sup> Die verzögerte TR-Bildung durch PPO lässt sich zum einen mit der geringeren Enzymaktivität, v. a. aber mit der unter PPO-Katalyse begünstigten Theaflavin-Bildung begründen.

Die Entstehung der Thearubigene erfolgt mit beiden Enzymen, läuft jedoch nicht gleich schnell ab. Dabei deuten die unterschiedlichen Umsetzungsraten der Flavanole sowie die deutlich stärkere TF-Bildung mit PPO auf verschiedene oder zumindest anders gewichtete Reaktionswege hin. Somit ist anzunehmen, dass die mit POD gebildeten Thearubigene eine

andere Zusammensetzung aufweisen als diejenigen, welche nur unter PPO-Beteiligung entstanden sind. Letztere weisen vermutlich einen höheren Anteil an Komponenten mit einem Benzotropolon-Gerüst bzw. einer davon abgeleiteten Struktur auf.

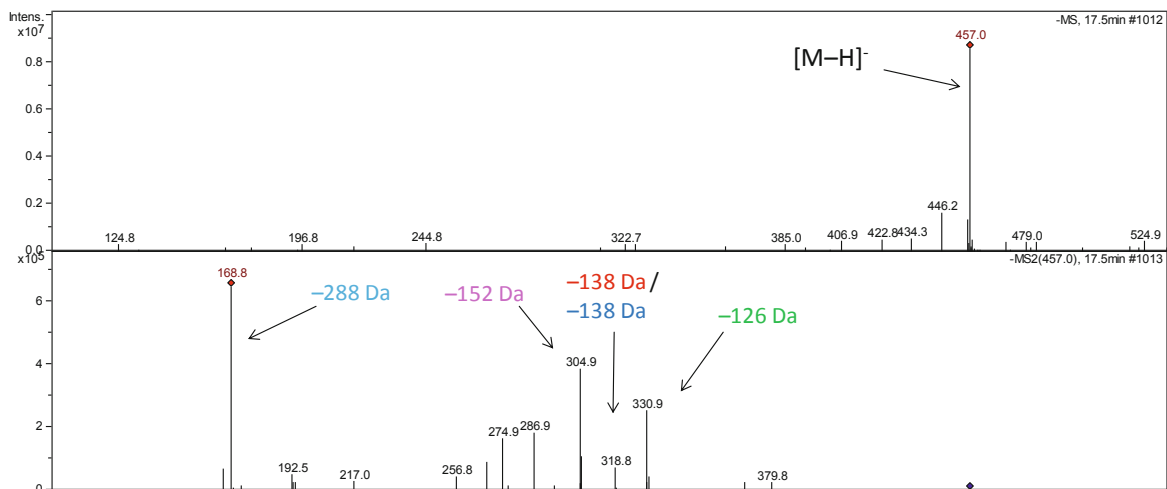
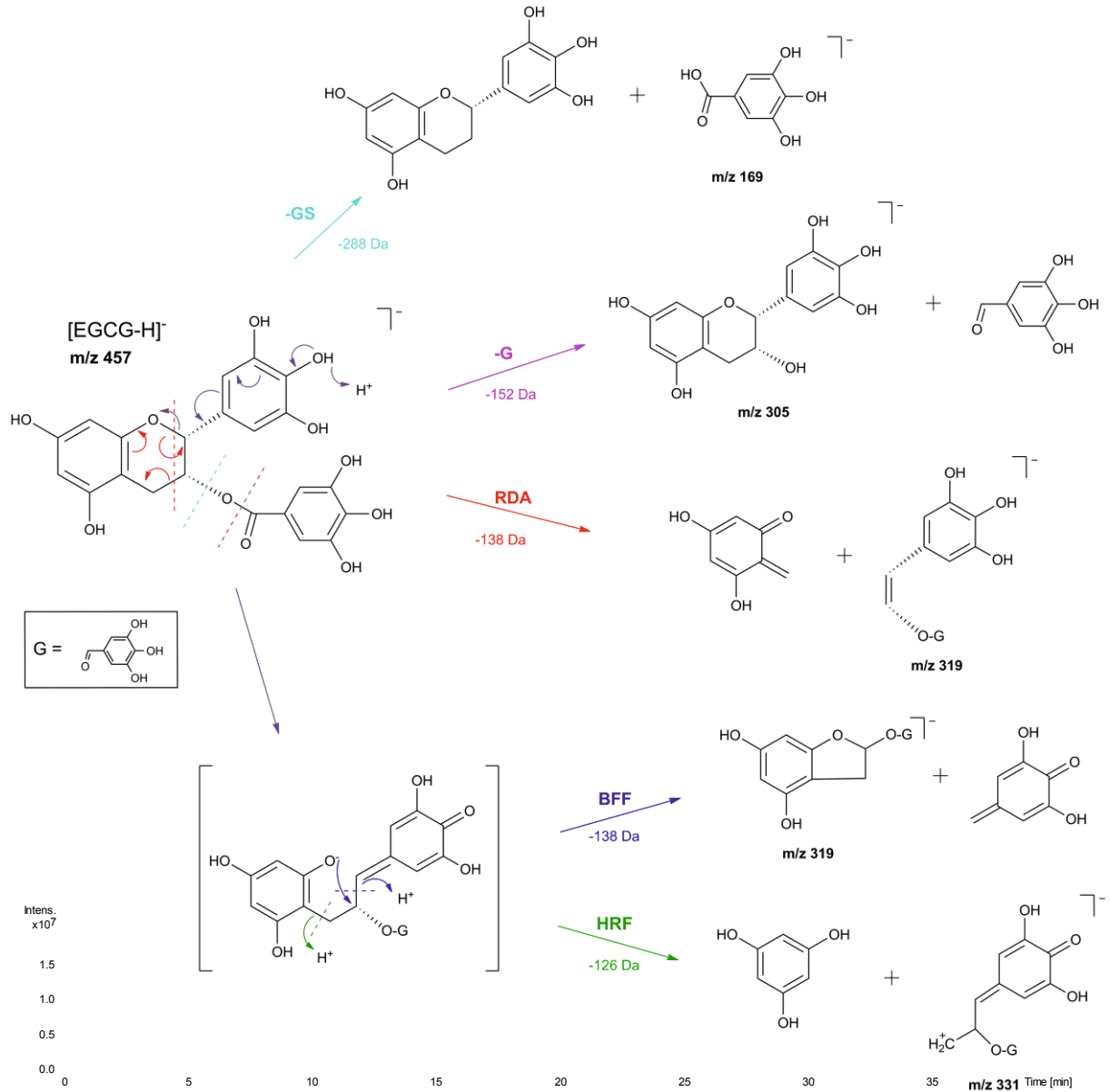
### 3.1.2.9 Auswertung mittels HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup>

Um die Identifizierung weiterer Oxidationsprodukte zu ermöglichen, wurden Proben aus den Modellfermentationen mittels HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup> (LC-MS\_System 1) im negativen Modus untersucht. Dabei werden die Analyten ionisiert und erscheinen in Form von Pseudomolekülen  $[M-H]^-$  als Basissignale in den Chromatogrammen.

Die Auswertung erfolgte einerseits durch gezieltes Suchen nach  $m/z$ -Werten bekannter Oxidationsprodukte (s. Abschnitt 1.3.2.4) und andererseits durch Überprüfen der größeren Signale im *Total-Ion-Chromatogramm*. Darüber hinaus wurden die MS<sup>2</sup>- und MS<sup>3</sup>-Fragmentspektren zur Identifizierung der jeweiligen Substanzen herangezogen. Für weit verbreitete und gut charakterisierte Komponenten wie die Flavanole und daraus aufgebaute Proanthocyanidine sind die unterschiedlichen Fragmentierungsmechanismen weitgehend bekannt, während zu den Oxidationsprodukten im Tee nur wenige detaillierte Angaben in der Literatur zu finden sind.<sup>249-251</sup> Aufgrund der strukturellen Verwandtschaft sind jedoch bei diesen Komponenten ähnliche Fragmentierungen zu erwarten. Eine Übersicht über drei typische Fragmentierungsreaktionen von Flavanolen und Flavanolderivaten ist in **Abb. 3–29** am Beispiel des Epigallocatechin-3-gallats dargestellt. Es handelt sich dabei um die *Retro-Diels-Alder-Fragmentierung* (RDA), die *Benzofuran-Ring-Forming-Fragmentation* (BFF) sowie die *Heterocyclic-Ring-Fragmentation* (HRF). Darüber hinaus werden die bei galloylierten Flavanolen häufig auftretenden Abspaltungen von Gallussäure (GS) bzw. der Galloylfunktion (G) gezeigt. Zur Veranschaulichung sind im unteren Teil der **Abb. 3–29** die in einer Probe von MF-3.11 aufgenommenen MS<sup>1</sup>- und MS<sup>2</sup>-Spektren von EGCG abgebildet.

Für die Auswertung wurden die Modellfermentationen MF-3.2, -3.5, -3.8, -3.11 und MF-4.1–MF-4.3 ausgewählt. Jeder dieser Versuche wurde mit PPO und POD durchgeführt, wobei jeweils eine andere Substratkombination eingesetzt wurde. Im Folgenden werden die Hauptsignale der einzelnen Modellversuche detailliert aufgeführt, interpretiert und möglichen Reaktionsprodukten zugeordnet. Oftmals wurden Flavanole identifiziert, welche nicht als Substrat zugesetzt worden waren und geringe Signalintensitäten aufwiesen. Hierbei handelt es sich um Verunreinigungen der verwendeten Flavanole bzw. um extrahierte Rückstände aus den Teeblättern.

## Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 3–29** Oben: Schematische Darstellung typischer ESI-MS/MS-Fragmentierungsmechanismen von Flavanolen und ihren Derivaten am Beispiel des EGCG. Unten: MS<sup>1</sup>- und MS<sup>2</sup>-Spektren von EGCG (negativer Modus, m/z = [M-H]<sup>-</sup>).



## Ergebnisse und Diskussion

### EC + ECG

Zunächst soll Versuch MF-4.1 (EC + ECG) betrachtet werden (**Tab. 3-8**). Da als Substrate zwei Catechine mit B-Ring des Catechol-Typs eingesetzt wurden, war keine Bildung von Theasinensinen, Theacitrinen oder Theaflavinen zu erwarten. In den Massenchromatogrammen wurden u. a. Verbindungen mit Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von 729 sowie 577 gefunden, was auf die Bildung von Dimeren aus EC und ECG ( $m/z$  729) bzw.  $2 \times$  EC ( $m/z$  577), sog. *Dehydrodicatechinen*, hindeutet. Theoretisch gehören auch die Theasinensine zu den Dehydrodicatechinen, ebenso wie die Subklasse der Proanthocyanidine, die sich aufgrund ihrer Fähigkeit zur Bildung farbiger Anthocyanidine durch Erhitzen in saurem Milieu abgrenzen lässt. Wie in Abschnitt 1.3.2.3 erläutert, besitzen Proanthocyanidine vom B-Typ eine Interflavan-Bindung zwischen C8 und C4 oder C6, während B-Typ-Dehydrodicatechine über C6' und C6 oder C8 verknüpft sind.<sup>252</sup> Die Vermutung, dass es sich um Catechin-Dimere handelt, lässt sich anhand der Fragmentierung untermauern. In **Abb. 3-30** sind mögliche Fragmente eines Dimers aus EC und ECG dargestellt, welche in den gemessenen Signalen 6–8 und 10 ( $m/z$  729) nachgewiesen wurden. Gemäß Literatur handelt es sich bei der Verbindung mit  $m/z$  577 (**Tab. 3-8**, Signal 4) wahrscheinlich um ein Dehydrodicatechin des B-Typs (charakteristische Fragmentationen:  $m/z$  439, 393 und 269 bei Abwesenheit von 451).<sup>253</sup>

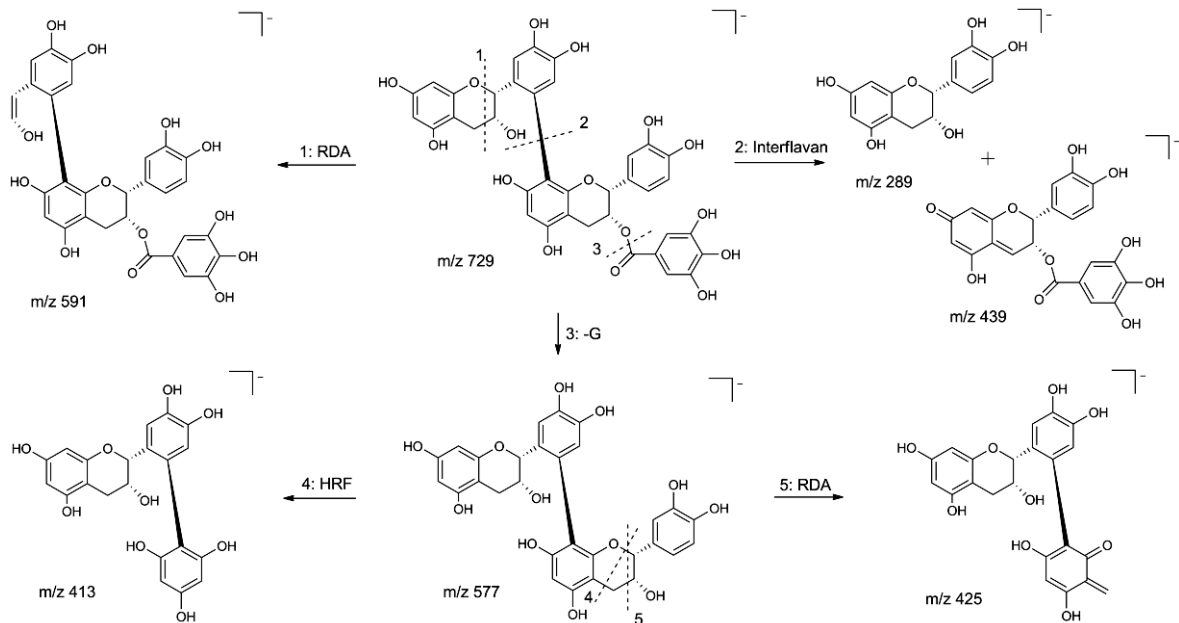
**Tab. 3-8** In Proben der Modelloxidation MF-4.1 (EC+ECG) mittels HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> nachgewiesene Signale und Zuordnungsvorschläge, wo möglich.

Signal	Zuordnungsvorschlag	Rt [min]	[M-H] <sup>+</sup> m/z	MS <sup>2</sup> m/z	MS <sup>3</sup> m/z	UV/Vis [nm]
1	Gallussäure	2,8	169	<u>125</u>	-	231, 273
2	unbekannt	3,2	457	<u>269/257/377/413</u>	241	-
3	unbekannt	3,7	565	<u>323/211</u>	211/280/139	-
4	EC-Dimer	11,6	577	<u>439/393/559/425/269/241</u>	421/377/395	231, 281
5	EC	13,4	289	<u>245/205/203</u>	203/187	232, 278
6	EC-ECG-Dimer	26,5	729	<u>577/439/395/269/559</u>	381/449/269	231, 280
7	EC-ECG-Dimer	27,0	729	<u>439/269/591/257/395/577</u>	312/354/283	231, 278
8	EC-ECG-Dimer	28,4	729	<u>439/413/287/577/371/591</u>	288/317	231, 277
9	ECG	28,8	441	<u>289/245/169</u>	245/205	231, 278
10	EC-ECG-Dimer	29,4	729	<u>439/413/287/457/577</u>	288/287	235, 280
11	EC-EGC-Dimer	29,9	591	<u>439/289/301</u>	289/301/215	232, 278
12	Epitheaflavinsäure	32,8	427	<u>227/383/365/257</u>	200	231, 279, 377
13	TF-3-G	35,0	715	<u>563/545/527/483/389</u>	377/395/241	-
14	Theaflavat B	35,7	699	<u>427/383/289/227/549/271/561</u>	227/383/365	231, 278, 397

Signal 11 (**Tab. 3-8**) scheint ebenfalls von einem Flavanol-Dimer zu stammen, wobei das Pseudomolekülion mit  $m/z$  591 auf eine Beteiligung von EGC schließen lässt. Da auch Spuren

## Ergebnisse und Diskussion

von TF-3-G nachgewiesen werden konnten, muss eine Verunreinigung mit EGC vorgelegen haben. EGC war in den analysierten Proben (45 min und 120 min) hingegen nicht mehr nachweisbar.



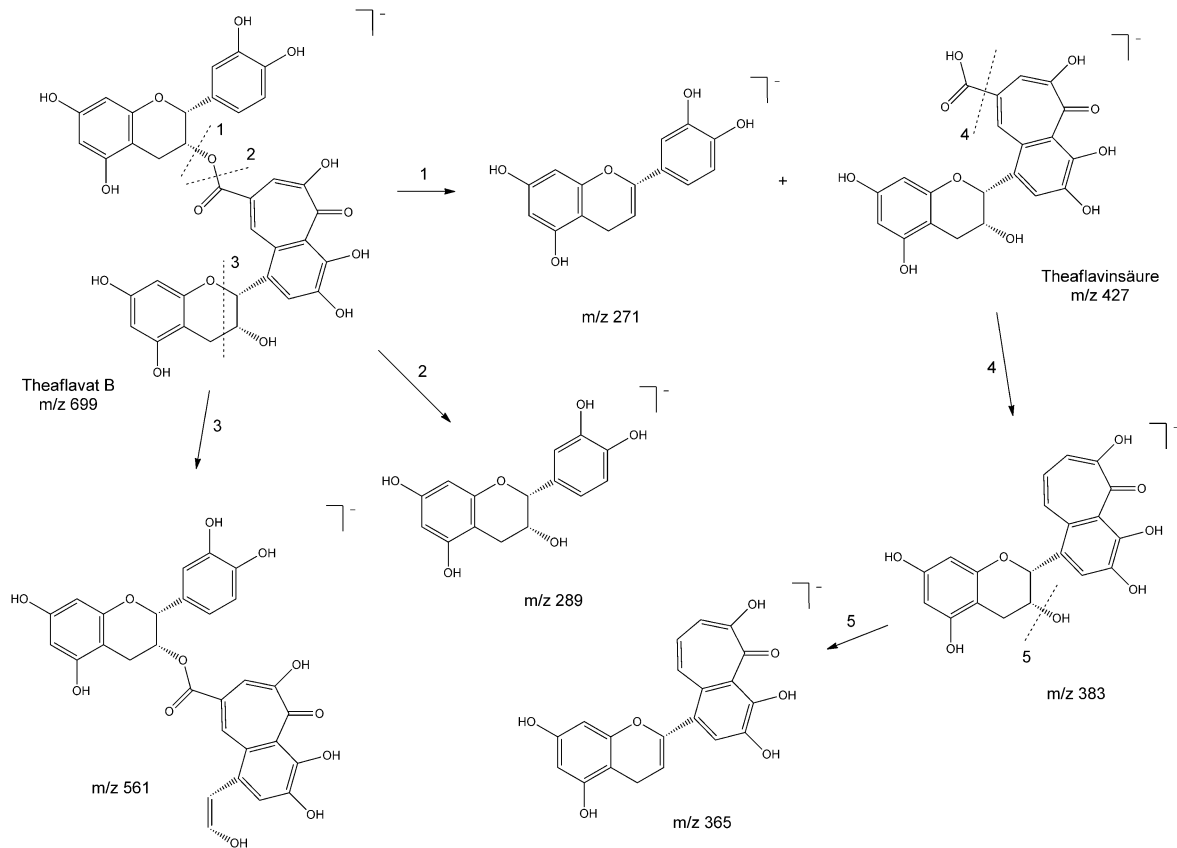
**Abb. 3–30** Vorgeschlagene Fragmentierungsmechanismen eines Flavanol-Dimers aus EC und EGC bei Messung mittels ESI-MS<sup>n</sup> im negativen Modus ( $m/z = [M-H]^-$ ).

Ferner wurden Verbindungen mit  $m/z$  427 und 699 detektiert und anhand der Fragmentenspektren als Theaflavinsäure bzw. Theaflavat B identifiziert. Theaflavinsäure besitzt wie die Theaflavine eine Benzotropolon-Einheit, die durch Kondensation des B-Ringes eines EC- oder (+)-C-Moleküls mit Gallussäure entsteht. Da sowohl EC als auch Gallussäure in der Reaktionslösung vorlagen, wird davon ausgegangen, dass es sich um die Epi-Form handelt. Das Theaflavat B wird auf ähnlichem Wege wie die Theaflavinsäure gebildet, an die Stelle der Gallussäure tritt jedoch die Galloyleinheit eines ECG-Moleküls. Da auch diese Verbindung im Oxidationsmedium vorlag, ist die Bildung plausibel. Interessanterweise entsteht als Hauptfragment des Theaflavats B im MS<sup>2</sup>-Spektrum offenbar Theaflavinsäure. In **Abb. 3–31** sind mögliche Fragmentierungsmechanismen für das Theaflavat B dargestellt.

Die Signale 2 ( $m/z$  457) und 3 ( $m/z$  565) konnten nicht identifiziert werden. Obwohl das Masse-zu-Ladungsverhältnis des Signals 2 mit ECG übereinstimmt, ist diese Zuordnung aufgrund der abweichenden Fragmentenspektren und Retentionszeiten auszuschließen. Möglicherweise handelt es sich bei dem Ion um ein aus ECG gebildetes Epoxid entsprechend dem von YASSIN et al. (2014) (s. Abschnitt 1.3.2.5, **Abb. 1–16**) postulierten Mechanismus.<sup>200</sup>



## Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 3–31** Vorgeschlagene Fragmentierungsreaktionen von Theaflavat B und Theaflavinsäure bei Messung mittels ESI-MS<sup>n</sup> im negativen Modus ( $m/z = [M-H]^-$ ).

### EGC + EGCG

Im Versuch MF-3.11 wurden die Catechine EGC und EGCG zur Reaktion gebracht und nach Messung via HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup> die in **Tab. 3-9** aufgeführten Signale in der Reaktionslösung nachgewiesen. Aufgrund der jeweils dreifach hydroxylierten B-Ringe war bei dieser Substratkombination nicht mit der Bildung von Theaflavinen zu rechnen. Vielmehr wurde die Entstehung von Theasinensinen bzw. deren Vorstufen, den Dehydrotheasinensinen, erwartet. Tatsächlich wiesen mehrere Signale  $m/z$ -Werte auf, die sich diesen Substanztypen zuordnen lassen. Da es sich bei den Theasinensinen um 2'-2'-verknüpfte dimere Catechine handelt, sind ihre Pseudomolekülonen allerdings wegen identischer  $m/z$ -Werte nicht von anderen einfach verknüpften Dimeren zu unterscheiden. Für die einzelnen Isomerenpaare der Bisflavanole sind jedoch Informationen zum Fragmentierungsverhalten in der Literatur vorhanden.<sup>96, 254-256</sup> Ein Vergleich mit den Messwerten zeigt, dass die Angaben für Theasinensin A und D gut mit den Daten des Signals 10 (**Tab. 3-9**) übereinstimmen. Somit handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine der beiden Verbindungen. Bei Signal 5, dessen  $m/z$  von 761 dem Atropisomerenpaar Theasinensin B/H entspricht, wurde ein ähnliches Fragmentierungsmuster festgesellt. Mögliche Fragmentierungsreaktionen dieser Komponenten sind in



## Ergebnisse und Diskussion

**Abb. 3–32** dargestellt. Signal 1 könnte auf diese Weise dem Theasinensin C oder E zugeordnet werden, die sehr frühe Elution nach 2,6 min und damit noch vor der Gallussäure erscheint allerdings als unwahrscheinlich für diese Verbindung.

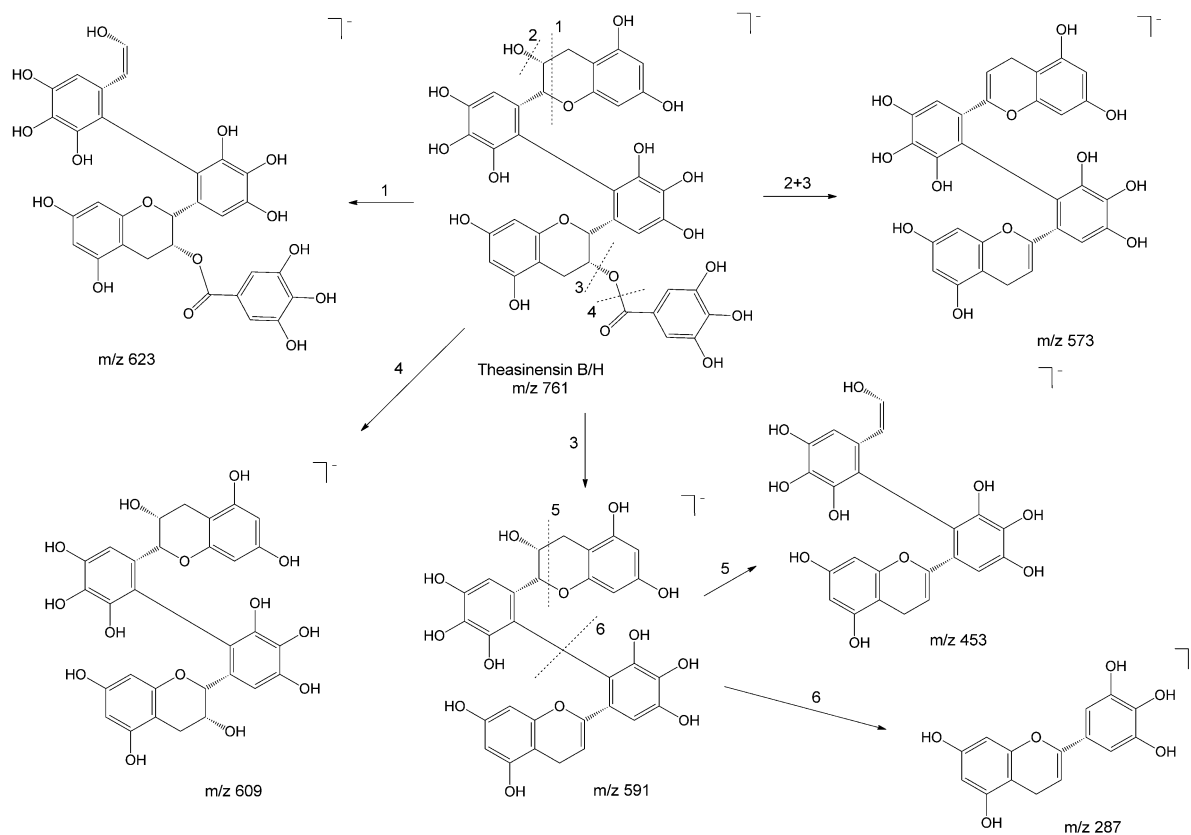
**Tab. 3-9** In Proben der Modelloxidation MF-3.11 (EGC+EGCG) mittels HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> nachgewiesene Signale und Zuordnungsvorschläge.

Signal	Zuordnungsvorschlag	Rt [min]	[M-H] <sup>-</sup> m/z	MS <sup>2</sup> m/z	MS <sup>3</sup> m/z	UV/Vis [nm]
1	Theasinensin C/E	2,6	609	<u>591</u> /471/453/344	573/447/367	234, 272
2	DehydroTS C	2,7	625	<u>581</u> /563/607/425	563/545	234, 272
3	Gallussäure	2,8	169	-	-	-
4	DehydroTS H/ EGC-EGCG-Dimer	4,5	759	<u>607</u> /407/451/590/509	469/315/481	233, 274
5	Theasinensin B/H	5,7	761	<u>591</u> /609/454/623/573	453/287/573/ 425	233, 274
6	EGC	6,1	305	<u>219</u> /179	177/201	232, 271
7	DehydroTS B	8,3	777	<u>734</u> /759/698/452	563/419	233, 275
8	DehydroTS H/ EGC-EGCG-Dimer	8,4	759	<u>243</u> /607/427/428/296/741	197	234, 274
9	DehydroTS B	11,0	777	<u>733</u> /759/455	545/563	234, 274
10	Theasinensin A/D	15,0	913	<u>591</u> /609/743/761/573	287/573/405	234, 274
11	EGCG	17,3	457	<u>169</u> /331/269/305	125	232, 272
12	DehydroTS A	21,3	929	<u>715</u> /885/723/697	545/527/563	-
13	Desgalloyl- Oolongtheanin	24,7	579	<u>561</u> /543/435/533/395/423	308/391/363/ 533	-
14	DehydroTS AQ/ EGCG-Dimer	26,1	911	<u>759</u> /589/723/893	463/589	232, 278
15	Theacitrin A/B	27,8	759	<u>607</u> /589/621/463/741	469/589/481/ 427	232, 275, 376
16	ECG	28,9	441	<u>289</u> /169	245/205	232, 276
17	Theacitrin C	31,3	911	<u>589</u> /759/463/607	463/409/432	232, 279, 345–445 (ansteigend)
18	DehydroTS AQ/ EGCG-Dimer	31,7	911	<u>608</u> /579/757	301/326/408	232, 278

In größerer Zahl wurden Basispeaks detektiert, welche anhand ihrer m/z-Werte den Dehydrotheasinensinen zugeordnet werden können. Gemäß Literatur werden diese während der Fermentation gebildet und auf nicht-enzymatischem Wege (v. a. im Rahmen der thermischen Einwirkung bei der Trocknung) in die stabilere Form der Theasinensine umgewandelt.<sup>161</sup> Daneben ist auch die Entstehung der Theacitrine A–C als Produkte von EGC und EGCG zu erwarten, deren Molekülmassen (760 bzw. 912 g/mol) sich mit denen der Dehydrotheasinensine H und AQ überschneiden. Im Falle der Theacitrine müssten die UV-Spektren Absorptionsbanden im Bereich von 350–450 nm aufweisen, was mit guter Übereinstimmung auf die Sig-

## Ergebnisse und Diskussion

nale 15 ( $m/z$  759) und 17 ( $m/z$  911) zutrifft. Laut DAVIS et al. (1997) zeigt Theacitrin A ( $M = 760$  g/mol) ein UV/Vis-Absorptionsmaximum bei 379 nm, MATSUO et al. (2011) berichten von einem linearen Absorptionsanstieg des Theacitrins C ( $M = 912$  g/mol) im Bereich zwischen 350 und 450 nm.<sup>149, 184</sup> Für eine sichere Identifizierung über die Fragmentspektren fehlen detaillierte Referenzwerte. KUHNERT et al. (2010) beobachteten folgende Fragmente für das Monogallat (Theacitrin A/B):  $MS^2$ :  $m/z$  607, 741;  $MS^3$ :  $m/z$  589, 427, 301.<sup>198</sup> Abgesehen von dem Fragment mit  $m/z$  301 wurden diese auch in den eigenen Messungen gefunden, z. T. allerdings mit geringer Intensität ( $m/z$  741, 427). **Abb. 3–33** zeigt Vorschläge für die Bildung der nachgewiesenen Fragmente des Signals 15 (**Tab. 3-9**).

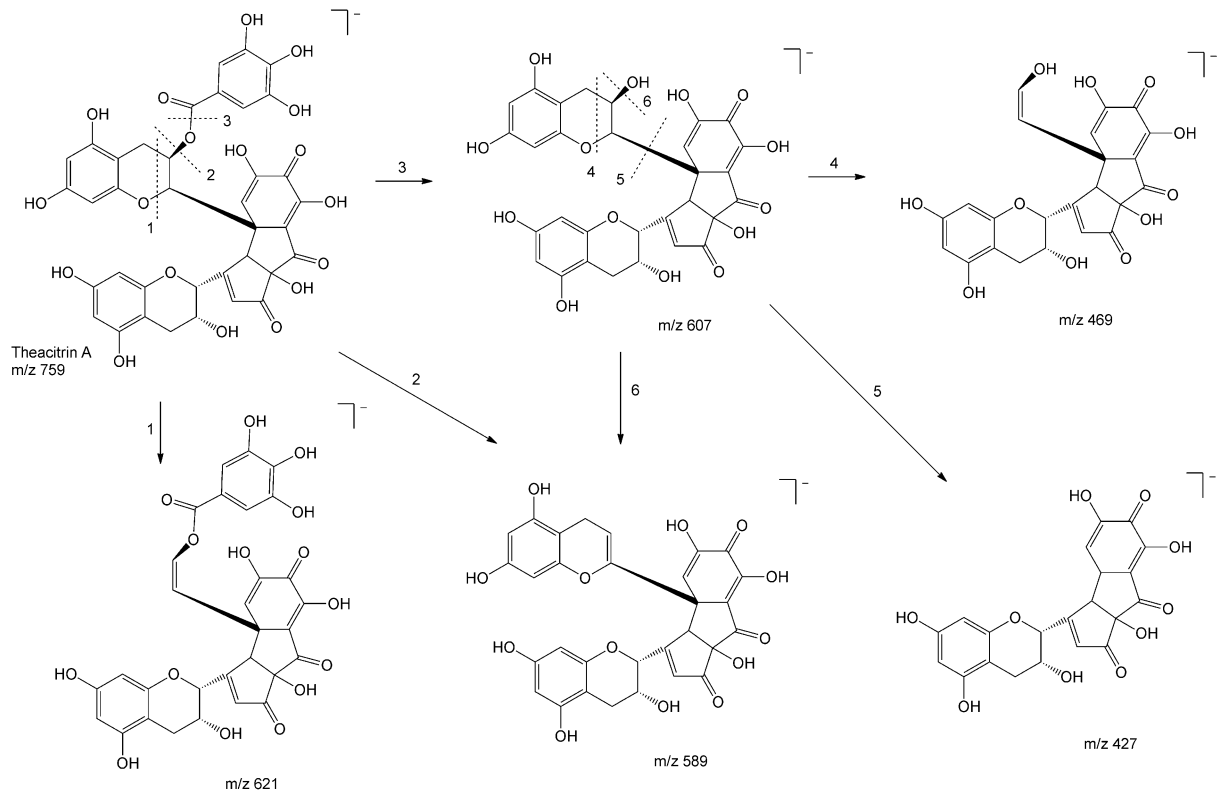


**Abb. 3–32** Vorgeschlagene Fragmentierungsreaktionen von Theasinensin B/H bei Messungen mittels ESI- $MS^n$  im negativen Modus ( $m/z = [M-H]^-$ ).

Bei den verbleibenden Signalen 4, 8, 14, 17 und 18 mit  $m/z$  579 bzw. 911 könnte es sich um die bereits erwähnten Dehydrotheasinensine handeln. Eine sichere Identifizierung ist allerdings mangels genauerer Kenntnisse über die Fragmentierungsmuster nicht möglich. Darüber hinaus können die mehrfach aufgetretenen Signale mit  $m/z$  911 und 759 auch aus zweifach verknüpften EGC-EGCG- bzw. EGCG-Dimeren resultieren. Dass mehrere der nachgewiesenen Pseudomolekülonen mit den für (Dehydro-)Theasinensine erwarteten  $m/z$ -Werten übereinstimmen, macht eine Bildung dieser Substanzen aber sehr wahrscheinlich. Außerdem

## Ergebnisse und Diskussion

zeigen die Retentionszeiten und -reihenfolgen Parallelen zu einem mit ähnlichem Fließmittelsystem erhaltenen HPLC-Chromatogramm nach TANAKA et al. (2010), die die Peaks den (Dehydro-)Theasinensinen zuordneten.<sup>123</sup>



**Abb. 3–33** Vorgeschlagene Fragmentierungen des Signals 15, welches mittels ESI-MS<sup>n</sup> im negativen Modus ( $m/z = [M-H]^-$ ) einem Theacitrin-monogallat zugeordnet wurde.

Interessant ist auch das Signal 13 (**Tab. 3-9**) mit  $m/z$  579, welches jedoch kein auswertbares UV/Vis-Spektrum aufwies. Ein entsprechender Teeinhaltsstoff mit einer Molekülmasse von 580 g/mol ist (Epi-)Theaflavinsäure-3-gallat. Aufgrund des Fragmentierungsmusters und der eingesetzten Substrate kann dieser allerdings nahezu ausgeschlossen werden. Eher wäre die Bildung von Hydroxytheaflavin oder Desgalloyl-Oolongtheanin denkbar, welche die gleiche Molekülmasse aufweisen und gemäß MATSUO et al. (2006) durch Oxidation von EGC entstehen können. Hydroxytheaflavin wird über Proepitheaflagallin gebildet, während das Desgalloyl-Oolongtheanin als Abbauprodukt aus Dehydrotheasinensin C hervorgeht.<sup>148</sup> Da in der Literatur keine Informationen zu den Fragmentierungsmechanismen dieser Verbindungen gefunden wurden, kann keine eindeutige Zuordnung erfolgen. Das Fragmentierungsmuster weist jedoch deutliche Parallelen zu einer dem Desgalloyl-Oolongtheanin strukturell sehr ähnlichen Verbindung auf (**Abb. 3–34**). Diese als *EGC-Dimer P2* bezeichnete Substanz wurde von NEILSON et al. (2007) durch künstliche Verdauung von EGC synthetisiert und zeigt Fragmente mit  $m/z$  423, 561, 395, 543 und 435.<sup>256</sup> In den eigenen Messwerten tauchen diese

Tochterionen ebenfalls auf (**Tab. 3-9**), so dass es sich bei Signal 13 mit hoher Wahrscheinlichkeit um Desgalloyl-Oolongtheanin handelt. Der Nachweis eines möglicherweise dem Dehydrotheasinensin C entsprechenden Signals und die Abwesenheit von Proepitheafлагallin unterstützen diese These.

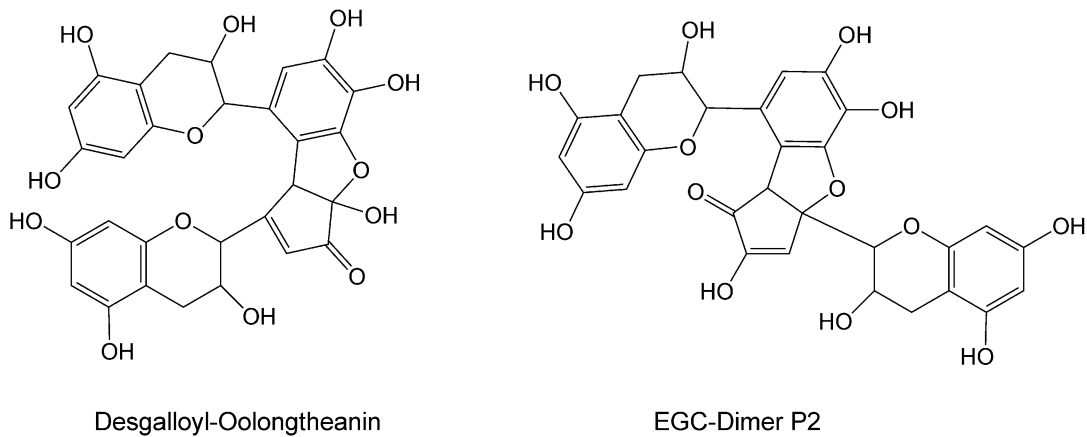


Abb. 3-34 Strukturformeln von Desgalloyl-Oolongtheanin und EGC-Dimer P2.

### EC + EGC

Während der oxidativen Umsetzung der Flavanole EC und EGC in Versuch MF-4.3 konnten die in **Tab. 3-10** aufgeführten Verbindungen mittels LC-MS\_System 1 nachgewiesen werden. Die Signale 1–4, 6, 8 und 16 lassen sich den zugegebenen Substraten und den erwarteten Reaktionsprodukten wie Theaflavin zuordnen. Der Nachweis des EGC-Epimers GC (Signal 5) erfolgte nur in den zu späteren Zeitpunkten entnommenen Proben und lässt sich mit der Durchführungstemperatur von 35 °C erklären, die eine Epimerisierung begünstigt.<sup>105</sup> Ferner wurde ein EC-Dimer mit  $m/z$  577 detektiert (Signal 7). Die Signale 9 und 14 besitzen ebenfalls ein Masse-zu-Ladungsverhältnis von 577, deren  $MS^2$ - und  $MS^3$ -Muster deuten indes auf einen anderen Verbindungstyp hin, was durch das Absorptionsmaximum des Signals 14 bei 364 nm im UV/Vis-Spektrum bekräftigt wird. Aufgrund der sehr ähnlichen  $MS^2$ - und  $MS^3$ -Spektren handelt es sich wahrscheinlich um Isomere. TANAKA et al. (2002b) berichteten von der Bildung einer Substanz mit  $m/z$  577  $[M-H]^-$  und einem UV/Vis-Absorptionsmaximum bei 360 nm während der Oxidation von EC und EGC mit polyphenolfreiem Teeblatthomogenat. Die Strukturaufklärung ergab ein Theaflavin-Derivat, welches den Trivialnamen Dehydrotheaflavin erhielt.<sup>175</sup> Es erscheint daher plausibel, dass die Signale 9 und 14 einem Isomerenpaar dieser Verbindung zugeordnet werden können.

Bezüglich der Signale 11–13 mit  $m/z$  851, die sehr ähnliche Fragmentationen und UV/Vis-Spektren aufweisen, ist eine Identifizierung nicht gelungen. Die Masse-zu-Ladungsverhältnisse der Pseudomolekülonen entsprechen zwar dem des Theaflavats A, al-



## Ergebnisse und Diskussion

lerdings zeigen weder die Fragmente noch die Retentionszeiten eine Übereinstimmung. In Anbetracht der UV/Vis-Maxima im Bereich von 352–366 nm und der relativ hohen Molekülmasse wäre die Bildung eines trimeren Flavanols nach Ablauf mindestens einer Kondensationsreaktion zwischen zwei B-Ringen eine mögliche Erklärung.

**Tab. 3-10** In Proben der Modelloxidation MF-4.3 (EC+EGC) mittels HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> nachgewiesene Signale und Zuordnung zu bekannten Substanzen, wo möglich.

Signal	Zuordnungsvorschlag	Rt [min]	[M-H] <sup>-</sup> m/z	MS <sup>2</sup> m/z	MS <sup>3</sup> m/z	UV/Vis [nm]
1	Theasinensin C/E	2,6	609	<u>469</u> /471/591/481/439	453/343	232, 274
2	Gallussäure	2,8	169	-	-	-
3	DehydroTS C	2,9	625	<u>581</u> /563/545	563/545	232, 270
4	DehydroTS E	3,9	607	439/481/ <u>589</u> /451	563/545/437	232, 272
5	GC	4,1	305	<u>179</u> /219	164	-
6	EGC	6,0	305	<u>219</u> /179	159/135	-
7	EC-Dimer	12,2	577	<u>439</u> /425/393/269	421/377	232, 278
8	EC	13,3	289	<u>245</u> /205/203	203/188	232, 278
9	Dehydrotheaflavin	15,4	577	<u>409</u> /559/365/243	243/391	-
10	EGCG	17,6	457	<u>169</u> /331/305/375	-	-
11	unbekannt	24,9	851	<u>617</u> /833/713/443	455/443	231, 366
12	unbekannt	26,5	851	<u>617</u> /833/713/443	270/461	232, 352
13	unbekannt	27,8	851	<u>833</u> /815/707/617	815/651	232, 352
14	Dehydrotheaflavin	28,9	577	<u>409</u> /365/395/559	391/243	232, 280, 364
15	TF-Abbauprodukt	34,6	535	<u>379</u> /397/355/241	241/361/343	232, 382, 450
16	TF	35,0	563	<u>241</u> /379/545/407	197/213/223	232, 375, 460

Mit abnehmender TF-Konzentration (Signal 16) wurde bemerkenswerterweise die Entstehung des Signals 15 beobachtet. Dieses weist Analogien zu den Fragmentationen des TF auf (m/z 379, 241) und besitzt ein ähnliches UV/Vis-Spektrum, so dass es sich wahrscheinlich um ein Derivat des Theaflavins handelt. Eine genaue Identifizierung war nicht möglich; denkbar ist das als Abbauprodukt des Theaflavins bekannte Theanaphthochinon (M=534 g/mol) in der reduzierten, nicht-chinoiden Form (M=536 g/mol) gemäß der Beschreibung von TANAKA et al. (2000), die ein um 2 Masseneinheiten größeres Pseudomolekülion als erwartet detektierten.<sup>257</sup> Dies ist jedoch nicht immer der Fall, sondern hängt von den Bedingungen in der jeweiligen Lösung ab. Unter der Prämisse, dass tatsächlich das reduzierte Theanaphthochinon vorliegt, lassen sich sinnvolle Fragmentierungsreaktionen für die MS<sup>2</sup>-Tochterionen mit m/z 397 (RDA-Fragmentierung an einem flavanolischen C-Ring), 379 (RDA + Wasserabspaltung) und 355 (Spaltung der Bindung zwischen C- und B-Ring in einer der Flavanoleinheiten) postulieren.

Das jüngst von KUSANO et al. (2015) als weiteres Abbau- bzw. Oxidationsprodukt des Theaflavins charakterisierte Theacoumarin mit m/z 521 konnte nicht nachgewiesen werden.<sup>174</sup>



## Ergebnisse und Diskussion

### EC + EGCG

In den Proben des Modellversuchs MF-3.2 wurden die in **Tab. 3-11** aufgelisteten Komponenten inklusive des Hauptproduktes TF-3-G detektiert. Neben einer Reihe von Substanzen, die bereits in den oben beschriebenen Versuchen nachgewiesen wurden, waren die Signale 10 und 11 von besonderem Interesse. Diese konnten zwei literaturbekannten Bestandteilen des Schwarztees, dem Epitheafлагallin-3-gallat (Signal 10) und dem Theadibenzotropolon (Signal 11), zugeordnet werden. Aufgrund der im Reaktionsmedium vorliegenden Verbindungen ist die Bildung dieser Substanzen plausibel. So kann Epitheafлагallin-3-gallat durch eine Kondensation des B-Ringes von EGCG mit dem aromatischen System der Gallussäure entstehen. Die dabei gebildete 1',2',3'-Trihydroxy-3,4-Benzotropolon-Einheit erklärt die beobachtete UV-Absorption bei 378 nm. In **Abb. 3-35** sind Vorschläge für die Fragmentierungswege der detektierten Tochterionen dargestellt.

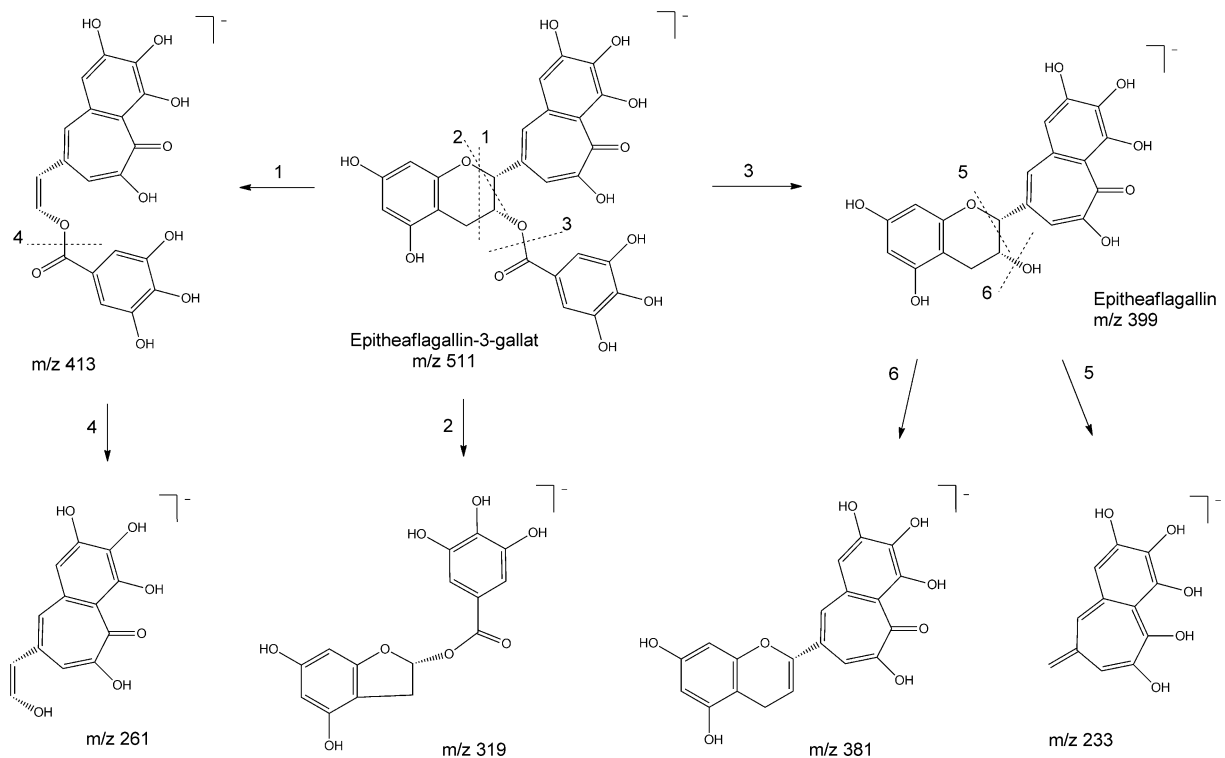
**Tab. 3-11** In Proben der Modelloxidation MF-3.2 (EC+EGCG) mittels HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> nachgewiesene Signale und Zuordnungsvorschläge.

Signal	Zuordnungsvorschlag	Rt [min]	[M-H] <sup>-</sup> m/z	MS <sup>2</sup> m/z	MS <sup>3</sup> m/z	UV/Vis [nm]
1	Gallussäure	2,8	169	125	-	225, 270
2	(+)-C	8,1	289	245/205/203	203	232, 278
3	EC-Dimer	12,8	577	439/425/393/269	377/421	232, 278
4	EC	13,1	289	245/203/205	203/161	232, 278
5	EGCG	17,6	457	169/331/305	125	232, 272
6	ECG	29,1	441	289/245	245	232, 276
7	EC-Dimer	30,7	577	289/425/245/439	245/205	232, 274
8	DehydroTS AQ/ EGCG-Dimer	31,9	911	455/741/605/579/623	315/285/409/ 327	-
9	Epitheaflavinsäure	32,7	427	227/383/365/257	155/199	231, 274, 382
10	Epitheafлагallin-3-gallat	34,4	551	399/295/233/261/381/337/ 413/319	233/381/355/ 273	231, 279, 303, 378, 438
11	Theadibenzotropolon	34,6	973	545/427/527/955/835/ 419/407	419/407/389/ 527/439	232, 278, 384
12	TF	34,8	563	241/379/407/545/524	213	231, 278, 377
13	TF-3-G	35,9	715	527/563/545/371/399	371/399/483	231, 272, 376, 460

Hinsichtlich des Theadibenzotropolons (Signal 11, m/z 973) kommen drei Verbindungen in Frage (Theadibenzotropolon A-C), die alle eine molekulare Masse von 974 g/mol aufweisen und aus einer Kondensation zweier B-Ringe (Bindung des Theaflavin-Typs) sowie eines B-Ringes mit der Pyrogallol-Einheit einer Galloylfunktion (Bindung des Theaflavat-Typs) hervorgehen. Sie sind als Produkte der Reaktion eines EGCG-Moleküls in zentraler Position mit zwei EC-Einheiten beschrieben. Das Fragmentierungsmuster (MS<sup>2</sup>) des nachgewiesenen Sig-

## Ergebnisse und Diskussion

nals 11 stimmt hervorragend mit Angaben aus der Literatur überein.<sup>139-140</sup> Zwischen den Isomeren A–C ist anhand dessen jedoch keine Unterscheidung möglich.



**Abb. 3–35** Vorgeschlagene Fragmentierungswege für Epitheaflagallin-3-gallat bei Analyse mittels ESI-MS<sup>n</sup> im negativen Modus ( $m/z = [M-H]^-$ ).

### EGC + ECG

Im Folgenden wird die Modelloxidation von EGC und ECG (MF-3.5) betrachtet. Eine Übersicht über die mittels HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup> detektierten Signale gibt **Tab. 3-12**.

Neben dem für diese Substratkombination charakteristischen Produkt TF-3'-G (Signal 16) wurde eine Reihe von Substanzen identifiziert, die in den bereits beschriebenen Versuchen gefunden wurde (Signale 1–7, 9, 14 und 15). Beachtenswert ist das Signal 7. Dieses entspricht dem Signal 13 (**Tab. 3-9**) aus Versuch MF-3.11 (EGC + ECG), bei dessen Auswertung eine vage Zuordnung zum Desgalloyl-Oolongtheanin erfolgt ist. Durch die erneute Detektion bei einer Oxidation unter Beteiligung von EGC und Bildung von Dehydrotheasinensin C wird diese Annahme unterstützt. Darüber hinaus wurde ein aussagekräftiges UV/Vis-Spektrum mit einem Maximum bei 342 nm erhalten.

Ferner wurden einige neue Signale nachgewiesen. So wurde neben dem Theaflavat B auch dessen Galloyl-ester, das Theaflavat A (Signal 17, **Tab. 3-12**), gefunden und anhand des Fragmentierungsverhaltens (MS<sup>2</sup> und MS<sup>3</sup>) identifiziert. Die Bildung erfolgt aus zwei ECG-Einheiten und ist damit für diesen Versuch schlüssig. Analog zur Bildung von Theaflavinsäure



## Ergebnisse und Diskussion

aus Theaflavat B (vgl. **Abb. 3–31**) wurde hier die Abspaltung von Theaflavinsäure-3-gallat mit  $m/z$  579 beobachtet. Das UV/Vis-Spektrum mit einem lokalen Maximum bei 402 nm untermauert die Identifizierung des Signals als Theaflavat A. Von einer Verschiebung in den längerwelligen Bereich gegenüber Theaflavat B berichteten auch Lin et al. (2008).<sup>95</sup>

Zudem wurde das Signal 13 als Epitheaflavinsäure-3-gallat identifiziert, welche in ihrer desgalloylierten Variante bereits in Versuch MF-4.1 nachgewiesen wurde. Die Entstehung lässt sich durch eine Reaktion des ECG mit freigesetzter Gallussäure erklären.

Bei einer Retentionszeit von 34,4 min wurde das Signal 12 mit  $m/z$  533 detektiert. Das Masse-zu-Ladungsverhältnis weist auf Theanaphthochinon hin. Auch das lokale Maximum des UV/Vis-Spektrums bei 446 nm befindet sich in relativ guter Übereinstimmung mit Daten aus der Literatur (440 nm).<sup>83</sup> Allerdings ließ sich das Fragmentierungsverhalten nicht nachvollziehen, so dass keine sichere Zuordnung des Signals zu Theanaphthochinon erfolgen konnte.

**Tab. 3-12** In Proben der Modelloxidation MF-3.5 (EGC+ ECG) mittels HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> nachgewiesene Signale und Zuordnungsvorschläge, wo möglich.

Signal	Zuordnungsvorschlag	Rt [min]	[M-H] <sup>-</sup> m/z	MS <sup>2</sup> m/z	MS <sup>3</sup> m/z	UV/Vis [nm]
1	DehydroTS C	2,6	625	<u>581</u> /563/545/607	563/545/425/ 419/395	232, 270
2	Gallussäure	2,8	169	-	-	-
3	EGC	6,0	305	<u>219</u> /179	177/201	232, 270
4	EC	13,3	289	<u>245</u> /205/203	203/227	232, 278
5	EGCG	18,1	457	<u>169</u> /331/305	125	232, 272
6	EGC-Dimer	19,9	607	<u>589</u> /427/451/439	315/361/571	-
7	Desgalloyl-Oolongtheanin	25,0	579	<u>561</u> /533/551/441/413/381	380/391/363/ 533/ 499	232, 278, 342
8	unbekannt	26,5	743	<u>453</u> /315/327/285	315/327	231, 278
9	ECG	28,9	441	<u>289</u> /169	245/205	232, 276
10	Epitheaflagallin	32,4	399	<u>233</u> /261/381/273	187/205/215	231,279,302, 374, 437
11	unbekannt	33,6	453	<u>315</u> /327/285	287/298/297/ 269	232, 274, 374
12	Theanaphthochinon	34,4	533	<u>515</u> /349/505/305/471/165	349/305/453/ 425/471	231, 274, 372, 446
13	Epitheflavinsäure-3-gallat	34,5	579	<u>227</u> /383/365/535	-	231, 274, 374
14	TF	34,7	563	<u>241</u> /545/379/407	213/199	238, 272, 375, 459
15	Theaflavat B	35,7	699	<u>427</u> /289/383/549/409/227	227/383/365	235, 278, 386
16	TF-3'-G	36,4	715	<u>563</u> /545/407	407/545/389/ 363	231, 272, 376, 460
17	Theaflavat A	37,1	851	<u>579</u> /535/701/365	535/227/365/ 383/427	235, 281, 402



## Ergebnisse und Diskussion

Weniger strittig ist die Identifizierung des Signals 10 als Epitheaflagallin anhand des Fragmentierungsverhaltens und des UV/Vis-Spektrums. Hier sind deutliche Parallelen zum korrespondierenden 3-Gallat erkennbar, welches in Versuch MF-3.2 (**Tab. 3-11**) nachgewiesen wurde. Die Bildung in der Reaktionslösung durch Kondensation zweier EGC-Moleküle oder einer EGC-Einheit mit Gallussäure ist nachvollziehbar.

Die Signale 8 und 11 (**Tab. 3-12**) konnten nicht zugeordnet werden. Im Falle des Signals 8 könnte es sich um ein über zwei Interflavanbindungen verknüpftes Dimer aus EGC und ECG handeln. Auffällig ist, dass das Hauptfragmention mit  $m/z$  453 dem Signal 11 zu entsprechen scheint und die beiden Substanzen somit offenbar strukturell verwandt sind.

### ECG + EGCG

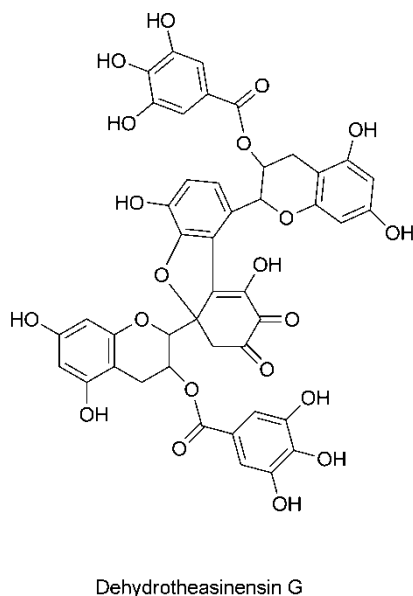
**Tab. 3-13** In Proben der Modelloxidation MF-3.8 (ECG + EGCG) mittels HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> nachgewiesene Signale und Zuordnungsvorschläge, wo möglich.

Signal	Zuordnungsvorschlag	Rt [min]	[M-H] <sup>+</sup> m/z	MS <sup>2</sup> m/z	MS <sup>3</sup> m/z	UV/Vis [nm]
1	Gallussäure	2,8	169	125	-	228, 269
2	unbekannt	3,7	565	323/211	211/280	-
3	(+)-C	7,9	289	245/205/203	203/230/184	232, 280
4	EC	13,4	289	245/205/203	203/187	232, 278
5	EGCG	18,3	457	169/331/379/305	125	231, 275
6	DehydroTS A	23,8	929	885/715/697/455	715/733	230, 274
7	Theasinensin F/G	25,2	897	-	-	231, 276
8	unbekannt	28,1	947	929/911/455/605/759	912/778/626/456	-
9	Theasinensin F/G	28,6	897	-	-	231, 277
10	ECG	28,9	441	289/331/169/245	245/205	231, 277
11	DehydroTS G/ ECG-EGCG-Dimer	31,4	895	605/289/453/467/435	453/435/315	231, 276
12	unbekannt	32,0	455	317/289/329/303/269/199	227/273/299	231, 278
13	Epitheaflagallin-3-gallat	34,3	551	399/233/295/261/381	233/381	231, 278, 374
14	TF	34,7	563	241/545/379/407	-	231, 278, 378
15	Theaflavat B	35,7	699	427/383/289/227/365	227/383/365	-
16	TF-3-G	35,8	715	-	-	-
17	TF-DG	36,4	867	697/715/389/527/545	-	231, 279, 378
18	TF-3'-G	36,4	715	-	-	-
19	Theaflavat A	37,2	851	579/535	227/365/383/535/427	231, 280, 400

Die Analyse der Proben der Modellfermentation MF-3.8 mit ECG und EGCG führte zur Detektion der in **Tab. 3-13** wiedergegebenen Signale. Neben der Identifizierung der vier Haupttheaflavine (Signale 14 und 16–18) konnten weitere Verbindungen zugeordnet werden, die bereits genannt wurden (Signale 1, 3–6, 10, 13). Die Entstehung dieser Substanzen aus den

eingesetzten Substraten ist gemäß den bekannten Synthesewegen möglich und schlüssig. Davon ausgenommen sind die Theaflavate A und B, für deren Bildung die Anwesenheit von EC notwendig ist. Da im Verlauf des Versuchs eine Zunahme des EC-Gehaltes beobachtet wurde (entweder durch Extraktion aus dem Blattmaterial oder durch oxidative Desgalloylierung des ECG), lässt sich der Nachweis dieser Verbindungen in den zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt der Oxidation entnommenen Proben erklären.

Die Signale 2 ( $m/z$  565) und 8 ( $m/z$  947) konnten keiner Substanz zugeordnet werden. Bei letzterem könnte es sich möglicherweise um ein Derivat des Dehydrotheasinensins A handeln. Auch die Identität des Peaks bei 32,0 min ( $m/z$  455) ist unklar. Die Fragmente deuten auf ein Flavanol-Grundgerüst hin, so dass oxidierte Derivate des EGCG oder des ECG, z. B. [EGCG–2H] oder [ECG+O–2H], in Frage kommen. Demzufolge ist die Bildung eines Epoxids mit Wasserstoffperoxid gemäß der Hypothese von YASSIN et al. (2014) ebenfalls denkbar.<sup>200</sup>



**Abb. 3–36** Strukturvorschlag für Dehydrotheasinensin G.

Sehr interessant ist das Signal 11 mit  $m/z$  895, bei dem es sich um ein Dehydrotheasinensin als Vorstufe der Theasinensine F und G ( $M = 898$  g/mol) handeln könnte. Tatsächlich wurden zwei schwache Signale mit dem der Theasinensine entsprechenden Masse-zu-Ladungsverhältnis von 897 detektiert. Es ist jedoch keine Fragmentierung der Pseudomolekülonen erkennbar, die eine Identifizierung ermöglichen könnte. Aufgrund der eingesetzten Substratkombination aus ECG und EGCG ist die Entstehung dieser Bisflavanole zu erwarten, so dass auch die Bildung eines entsprechenden Dehydrotheasinensins als Vorstufe plausibel ist. Nach eigenem Kenntnisstand wurde bisher für die Theasinensine F und G im Gegensatz zu den anderen Atropisomeren-Paaren (TS A↔D, TS B↔H, TS C↔D) von keiner derartigen Vorstufe berichtet.

Es ist jedoch kein Grund bekannt, der deren Bildung entgegenstehen würde. Gemäß der bisher verwendeten Nomenklatur würde die Verbindung mit  $m/z$  895 als Dehydrotheasinensin G bezeichnet werden. Ein Strukturvorschlag ist in **Abb. 3–36** dargestellt. Eine Zuordnung der Fragmentionen ist nicht gelungen. Somit kann es sich auch um ein anderes Dimer aus ECG und EGCG mit zwei Interflavan-Bindungen handeln. Eine eindeutige Identifizierung ist anhand der vorliegenden Daten nicht möglich.



## Ergebnisse und Diskussion

### EC + ECG + EGC + EGCG

**Tab. 3-14** In Proben der Modelloxidation MF-4.2 (EC+ECG+EGC+EGCG) mittels HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> nachgewiesene Signale und Zuordnungsvorschläge, wo möglich.

Signal	Zuordnungs- vorschlag	Rt [min]	[M-H] <sup>+</sup> m/z	MS <sup>2</sup> m/z	MS <sup>3</sup> m/z	UV/Vis [nm]
1	Theasinensin C/E	2,6	609	470/471/469/591/453	453/343	-
2	DehydroTS C	2,7	625	581/563/545/607	563/545/395	-
3	Gallussäure	3,0	169	125	-	-
4	GC	4,0	305	179/219/221	164	232, 274
5	DehydroTS H	4,6	759	607/469/589/451/481	469/343/481/ 315	233, 272
6	Theasinensin B/H	5,6	761	591/609/533/453	573/447/287	233, 274
7	EGC	6,0	305	219/179	177/201	232, 271
8	(+)-C	7,9	289	245/205/203	203/227	232, 278
9	DehydroTS B	8,3	777	733/759/607/563	563/595	234, 274
10	DehydroTS H	8,7	759	607/741/427/451/589	427/451/589	233, 276
11	unbekannt	10,0	633	301	257/284	232, 270
12	DehydroTS B	10,8	777	-	-	-
13	unbekannt	10,8	579	561/543/423/405	417/405/499	-
14	EC-Dimer	12,1	577	425/439/269/241	-	-
15	EC	13,0	289	245/205/203	203/227	232, 278
16	EGCG	17,4	457	169/331/305	125	232, 272
17	GCG	21,6	457	169/331/305	125	232, 276
18	EC-EGCG-Dimer/ ECG-EGC-Dimer	25,6	745	455	285/299/325	231, 281
19	EC-EGCG-Dimer/ ECG-EGC-Dimer	27,4	745	455/532	-	231, 274
20	ECG	29,0	441	289/169	245/205	232, 275
21	Epitheaflagallin	32,5	399	233/273/381/261	187/205/215	233, 279, 378
22	Epitheaflavinsäure	32,8	427	227/383/365	-	231, 281, 379
23	Epitheaflagallin-3- gallat	34,4	551	399/295/261/337/273	-	232, 274, 376, 469
24	TF-Abbauprodukt	34,7	535	379/397/355	241/213/361	-
25	TF	35,0	563	407/545/379/389/241	241/363/389	238, 272, 375, 459
26	TF-3-G	36,1	715	527/563/483/545/389	407/361/483	232, 272, 375, 459
27	TF-3'-G	36,7	715	563/407/545/527/577	407/361/483	-
28	TF-DG	36,7	867	-	-	-

Die massenspektrometrische Auswertung des Versuchs MF-4.2 ist in **Tab. 3-14** dargestellt. In dieser Modelloxidation wurden alle vier Hauptcatechine als Substrate eingesetzt, so dass die Ausgangsstoffe theoretisch die Bildung aller zuvor beobachteter Oxidationsprodukte erlauben würden. Tatsächlich konnten vergleichsweise viele Signale detektiert werden. Davon weisen drei Anzeichen dimerer Flavanole (Dehydrodicatchine, Signale 14, 18, 19) auf. Darüber hinaus wurden Substanzen mit Benzotropolon-Einheit (Signale 21–23, 25–28) gefunden



## *Ergebnisse und Diskussion*

und mehrere Komponenten identifiziert, bei denen es sich wahrscheinlich um 2',2'-verknüpfte Bisflavanole handelt (Signale 1, 2, 5, 6, 9, 10, 12).

Auffällig ist das Fehlen einiger Verbindungen, die in den vorangegangenen Versuchen nachgewiesen wurden und mit deren Bildung folglich auch in diesem Experiment zu rechnen war. Dies lässt sich dadurch begründen, dass bei Anwesenheit einer größeren Auswahl von Reaktionspartnern ein Teil der Reaktionen bevorzugt abläuft und somit andere (z. B. die Entstehung von Theaflavaten) in den Hintergrund treten.



### 3.1.2.10 Übersicht über die identifizierten Verbindungen und allgemeine Beobachtungen

Abschließend wird in **Tab. 3-15** eine Übersicht über die wichtigsten Oxidationsprodukte und ihre Bildung während der jeweiligen Modellversuche gegeben.

**Tab. 3-15** Übersicht über gebildete Verbindungen und ihren Nachweis in den jeweiligen Modellversuchen. ✓ = Verbindung sicher oder mit hoher Wahrscheinlichkeit nachgewiesen; (✓) = Verbindung vermutlich anwesend (keine eindeutige Zuordnung möglich); <sup>a</sup> = Freisetzung geringer Mengen infolge von Verunreinigungen.

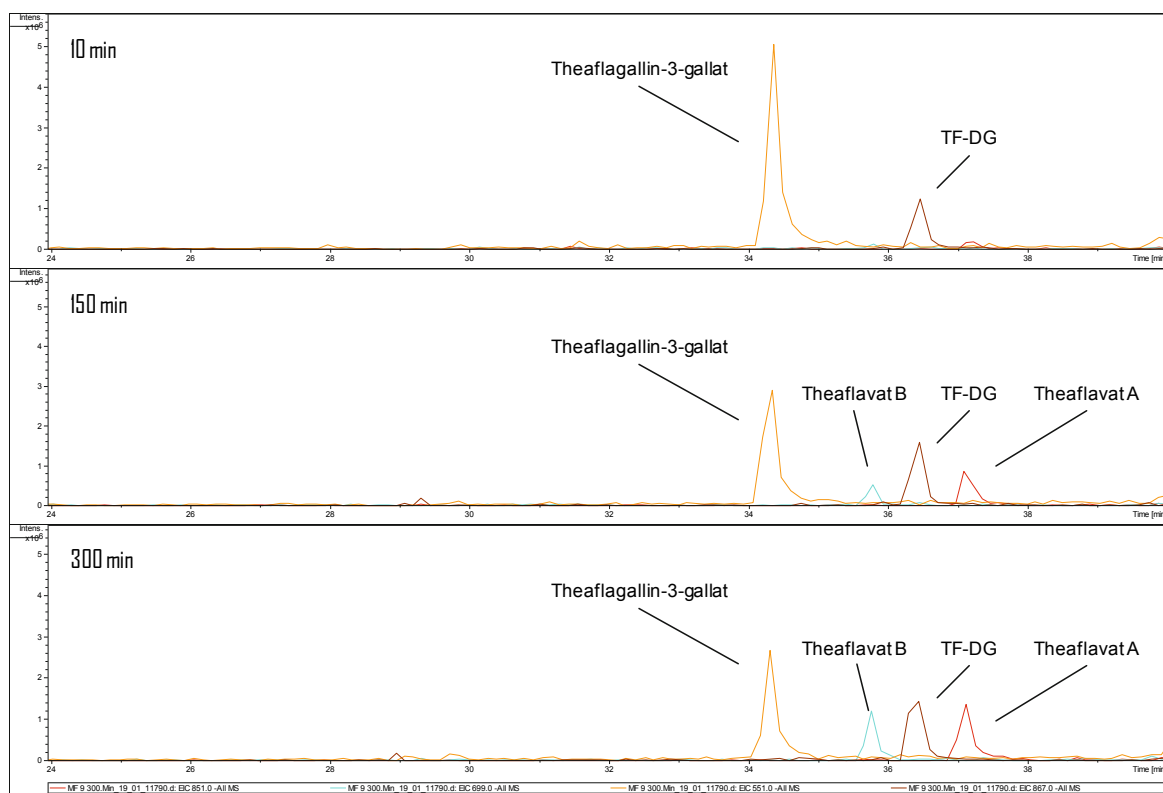
Verbindung	[M-H] <sup>-</sup> m/z	MF-4.1 EC + ECG	MF-3.11 EGC + EGCG	MF-4.3 EC + EGC	MF-3.2 EC + EGCG	MF-3.5 ECG + EGC	MF-3.8 ECG + EGCG	MF-4.2 EC + ECG + EGC + EGCG
Gallussäure	169	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
TF	563			✓	✓	✓	✓	✓
TF-3-G	715				✓		✓	✓
TF-3'-G	715	✓ <sup>a</sup>				✓	✓	✓
TF-DG	867						✓	✓
Epitheafflavinsäure	427	✓			✓			✓
Epitheafflavinsäure-3-gallat	579					✓		
Epitheafflagallin	399					✓		✓
Epitheafflagallin-3-gallat	551				✓		✓	✓
Theaflavat A	851					✓	✓	
Theaflavat B	699	✓				✓	✓	
Theadibenzotropolon	973				✓			
Dehydrotheaflavin	577			(✓)				
Desgalloyl-Oolongtheanin	579		✓					
Theanaphthochinon	533/ 535			(✓)		(✓)		(✓)
Theacitrin A/B	759		(✓)					
Theacitrin C	911		(✓)					
Theasinensin A/D	913		✓					
Theasinensin B/H	761		✓					✓
Theasinensin C/E	609		✓	✓				✓
Theasinensin F/G	897						(✓)	
DehydroTS A	929		✓				✓	
DehydroTS AQ	911		(✓)		(✓)			
DehydroTS B	777		(✓)					(✓)
DehydroTS C	625		(✓)	(✓)		(✓)		(✓)
DehydroTS E	607			(✓)		(✓)		
DehydroTS G	895						(✓)	
DehydroTS H	759		(✓)					(✓)

Es wurde in erster Linie eine qualitative Auswertung vorgenommen, die der Identifizierung charakteristischer Oxidationsprodukte diene. Anhand der Intensität der Signale bei unterschiedlichen Probenahmezeitpunkten lassen sich auch Aussagen über die Bildungsgeschwindigkeiten treffen. Als Beispiel sind in **Abb. 3-37** die Extracted-Ion-Chromatogramme von

## Ergebnisse und Diskussion

Theaflagallin-3-gallat, Theaflavin-3,3'-digallat sowie Theaflavat A und B zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Modellfermentation MF-3.8 dargestellt. Demnach erfolgt die Bildung der Theaflagalline offenbar sehr schnell, wobei deren Konzentration bereits innerhalb der ersten Stunde wieder zu fallen beginnt. Das TF-DG entsteht ebenfalls zügig, erreicht die Maximalkonzentration allerdings erst nach etwa ein bis zwei Stunden und unterliegt im weiteren Verlauf nur einem geringfügigen Abbau (vgl. Abschnitt 3.1.2.7, **Abb. 3–20**). Indes steigen die Gehalte an Theaflavat A und B vergleichsweise langsam, aber kontinuierlich bis zum Versuchsende an.

Ferner wurde anhand der Substratkombination EGCG + EC ein Vergleich zwischen den Enzymen PPO und POD vorgenommen. Dazu wurden die gemäß den MS-Auswertungen während der Versuche MF-3.2–MF-3.4 gebildeten Oxidationsprodukte einander gegenübergestellt. Bezüglich der qualitativen Zusammensetzung wurden keine bedeutenden Unterschiede festgestellt, wohingegen in quantitativer Hinsicht Abweichungen erkennbar waren. Dieser Umstand war bereits aus den HPLC-DAD-Daten der Hauptkomponenten (Abschnitt 3.1.2.8) hervorgegangen und wurde keiner näheren Betrachtung unterzogen.



**Abb. 3–37** Extracted-Ion-Chromatogramme von m/z551 (Theaflagallin-3-gallat), m/z867 (TF-DG), m/z851 (Theaflavat A) und m/z 699 (Theaflavat B) in Proben der Modelloxidation MF-3.8, welche nach 10, 150 bzw. 300 min entnommen wurden.



## *Ergebnisse und Diskussion*

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das Modellsystem in der Lage ist, die Oxidation von Flavanolen zu katalysieren und eine Reihe bekannter Teeinhaltsstoffe zu synthetisieren. Die selektive Auswahl von Substraten und Enzymen sowie die Veränderbarkeit diverser Parameter wie Zeit, Temperatur und Konzentrationen ermöglichen einen flexiblen Einsatz zur Untersuchung konkreter Fragestellungen unter vereinfachten Bedingungen. Dennoch bleiben die Abläufe komplex und führen neben einigen charakteristischen Primärprodukten zur Bildung einer unübersichtlichen Anzahl gering konzentrierter Verbindungen. Die betrachteten Tee-Enzyme besitzen einen unterschiedlichen Einfluss auf die stattfindenden Umsetzungen, jedoch ohne die Reaktionsmechanismen grundlegend zu verändern.





### 3.1.3 Modellfermentationen mit Meerrettich-POD und extrahierter Blattmatrix

Die Durchführung der Modellfermentationen unter Verwendung von enzymatisch aktivem Teeblattpulver (Abschnitt 3.1.2) weist eine Reihe von Vorteilen auf, zeigte aber auch Schwächen. Insbesondere die Beschaffung des Teeblattpulvers außerhalb von Anbauregionen und der schnelle Verlust an Enzymaktivität können in der Praxis Probleme bereiten. Daher sollte ein alternativer Ansatz erarbeitet und hinsichtlich des Oxidationsverhaltens mit dem oben beschriebenen Modell verglichen werden.

Als Enzymquelle wurde die Meerrettich-Peroxidase (engl. *horseradish peroxidase*, HR-POD) gewählt, welche auf kommerziellem Wege schnell und unkompliziert verfügbar ist. Zudem wurde die HR-POD bereits in einer Reihe von Veröffentlichungen als Oxidationsmittel für Catechine eingesetzt (Abschnitt 1.3.2.4).

Die Analyse erfolgte in erster Linie mittels HPLC-DAD. Zur Quantifizierung der Catechine wurden dabei die HPLC\_Systeme 1 und 2 herangezogen, während die TFs zunächst mit HPLC\_System 4 bestimmt wurden. Im Verlauf der Untersuchungen wurde eine neue, effizientere Methode für die Theaflavin-Analyse via Ultra-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (UHPLC) entwickelt, die die Trennung von TF, TF-3-G, TF-3'-G und TF-DG innerhalb von nur 4,5 min ermöglicht (UHPLC\_System 1). Ein Beispielchromatogramm sowie die Kalibriergeraden befinden sich in Anhang 7.5.

#### 3.1.3.1 Oxidationen mit HR-POD

Für die ersten Experimente wurden als Basis-Substratkombination je ca. 50 mg EC und EGCG ausgewählt. Die Enzymmenge wurde nach Vorversuchen so angepasst, dass eine Durchführung mit adäquater Geschwindigkeit bei Raumtemperatur realisierbar war. Aufgrund der äußerst hohen Aktivität der HR-POD ( $> 300\,000 \text{ uA}/(\text{min} \cdot \text{g})$ ) gemäß Abschnitt 5.4.4.3) wurden hierzu lediglich 0,5 mg des Enzyms benötigt.<sup>258-259</sup>

Die Reaktionslösung wies ein Volumen von 100 mL sowie eine Wasserstoffperoxid-Konzentration von 6,5 mmol/L auf und wurde beständig mit synthetischer Luft durchspült. In Abschnitt 5.4.5 ist die genaue Durchführung beschrieben. Die Probenahme erfolgte analog zu den Modelloxidation mit endogenen Enzymen.

Die Beobachtungen lassen Parallelen zu den Versuchen mit dem enzymhaltigen Teeblattmaterial erkennen. So entwickelte sich innerhalb weniger Minuten eine deutliche Orangefärbung der Reaktionslösung. Die Analytik mittels HPLC-DAD und UHPLC-DAD zeigte den Abbau der Catechine, insbesondere von EGCG, und die gleichzeitig einsetzende Bildung von TF-3-G

(Abb. 3–38). Nach 15 min scheinen die Umsetzungen im Wesentlichen abgeschlossen zu sein. Die Gehalte der drei Hauptkomponenten (EC, EGCG, TF-3-G) blieben stabil bzw. stiegen geringfügig an, was auf eine langsame Verdunstung des Wassers in der Oxidationslösung zurückzuführen ist. Die Reproduzierbarkeit der Konzentrationsverläufe im neuen Modellsystem ist gegeben (Abb. 3–38).<sup>258</sup>

Im direkten Vergleich zur Oxidation von EC und EGCG mit endogener POD (Versuch MF-3.4, Abschnitt 3.1.2.8) werden jedoch auch Unterschiede offenbar. So fällt der Abbau des EC deutlich schwächer aus und das EGCG wird nicht gänzlich, sondern nur bis zu einem Restgehalt von durchschnittlich etwa 38 mg/L umgesetzt. Weitere Diskrepanzen treten bei einer Gegenüberstellung der HR-POD-Oxidationen und der Versuche mit endogener POD und PPO (MF-3.1, MF-3.2, MF-3.12) zutage. Hierbei findet ein vollständiger Abbau der Flavanole und zusätzlich eine Umsetzung der gebildeten Theaflavine statt, die mit HR-POD nicht beobachtet wurde.

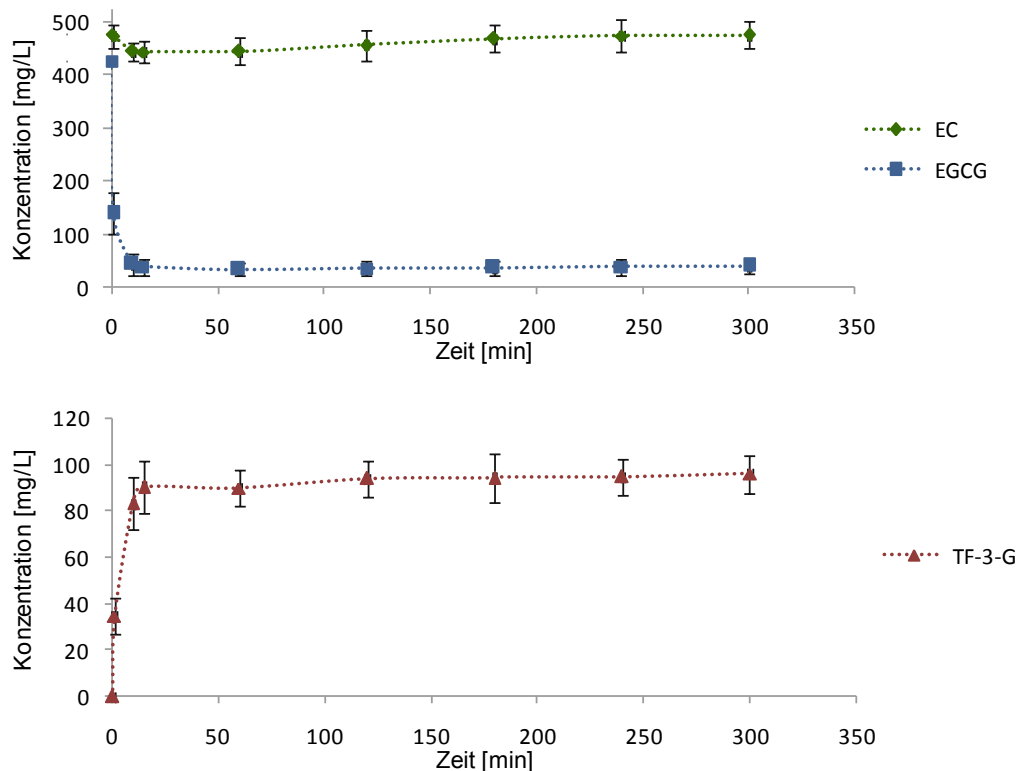


Abb. 3–38 Oxidation von EC und EGCG mit HR-POD in Anwesenheit von  $H_2O_2$  und  $O_2$  ( $n = 3$ ). Oben: Abbau der Flavanole. Unten: Bildung der Theaflavine.

### 3.1.3.2 Zusatz einer Teeblattmatrix

Durch den Zusatz einer *Teeblattmatrix* sollten realistischere Bedingungen während der HR-POD-Oxidationen geschaffen werden. Bisher wurde nach eigener Kenntnis neben den enzymatischen Wirkungen von keinem weiteren signifikanten Einfluss der Teeblätter auf das Oxidationsgeschehen berichtet. Als Matrix wurde ein handelsüblicher, chinesischer Grüntee (*Gunpowder*) gewählt (s. **Abb. 1–7**). Grüner Tee hat den Vorteil, in seiner Zusammensetzung weitgehend frischen Teeblättern zu entsprechen, weil bei der Herstellung das Hauptaugenmerk auf die Inaktivierung der Enzyme und das Entfernen von Feuchtigkeit gerichtet wird (s. Abschnitt 1.2.1).<sup>258</sup>

#### 3.1.3.2.1 Ermittlung einer geeigneten Extraktionsmethode

Damit die Modelloxidationen wie gewohnt mit definierten Substratkombinationen durchgeführt werden konnten, mussten die phenolischen Bestandteile des Grüntees eliminiert werden. Hierzu sollte eine effektive und gleichsam schonende Extraktionsmethode entwickelt werden, weshalb zunächst ein Screening mit verschiedenen Verfahren vorgenommen wurde.<sup>259</sup> Diese sind in **Tab. 3-16** aufgeführt. Relevante Parameter waren die Wahl des Lösungsmittels, das Volumen, die Temperatur, die Extraktionszeit sowie die Anzahl an Wiederholungen. Darüber hinaus wurde geprüft, ob sich eine Zerkleinerung des Tees und die damit verbundene Vergrößerung der Oberfläche vorteilhaft auswirken.

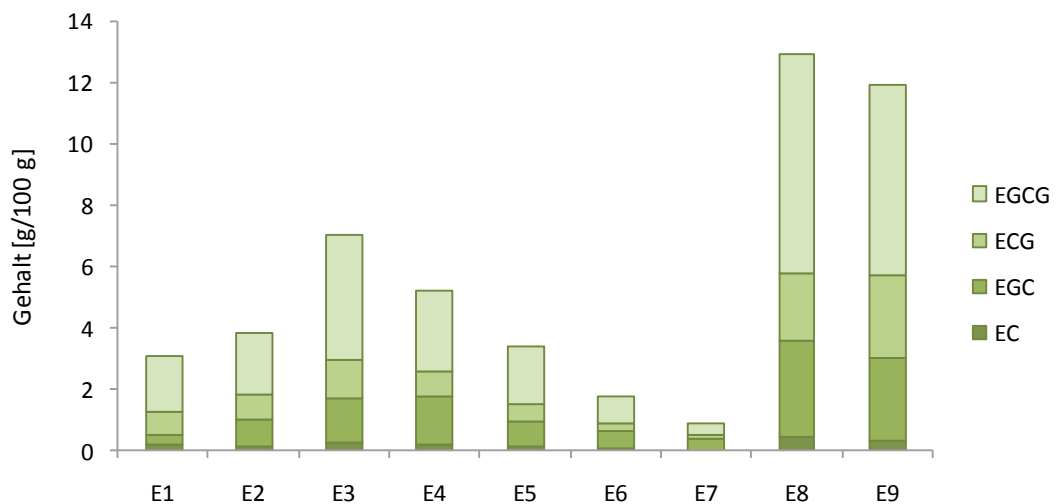
Im Anschluss an die Extraktion wurden die Blätter erneut gemäß ISO 14502-2 extrahiert, um deren Restpolyphenolgehalt per HPLC-DAD (HPLC\_System 1) zu bestimmen (Abschnitt 3.1.2.2 bzw. 5.4.5.2). Die nach den jeweiligen Extraktionsverfahren verbliebenen Gehalte an EC, ECG, EGC und EGCG sind in **Abb. 3–39** dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass die besten Ergebnisse mit Wasser (E1) und 70%igem wässrigem Methanol (E2–E7) erzielt wurden und eine mehrfache Durchführung (E5 ↔ E6) sowie eine moderate Temperaturzufuhr (E4 ↔ E5) der Extraktion dienlich sind. Eine Zerkleinerung der Blätter steigert die Extraktionsrate ebenfalls, insbesondere bei Raumtemperatur (E3 ↔ E4, E2 ↔ E5).

Folglich erzielte Methode E7 die umfassendste Extraktion der Polyphenole und wurde für die zukünftigen Versuche herangezogen. Die extrahierten Teeblätter wurden gefriergetrocknet und bis zur Verwendung trocken und verschlossen gelagert.<sup>258-259</sup>

## Ergebnisse und Diskussion

**Tab. 3-16** Untersuchte Vorgehensweisen zur Extraktion von phenolischen Bestandteilen aus Grüntee.

Nr.	Einwaage [g]	Blätter zerkleinert?	Lösungsmittel	Volumen [mL]	Temperatur	Extraktionszeit
E1	5,30	-	Wasser	je 5000	RT	3 x 60 min
E2	2,46	-	70% Methanol <sub>(aq)</sub>	75	50°C	15 min
E3	1,64	-	70% Methanol <sub>(aq)</sub>	je 50	RT	15 min + 10 min
E4	1,97	✓	70% Methanol <sub>(aq)</sub>	je 50	RT	15 min + 10 min
E5	2,37	✓	70% Methanol <sub>(aq)</sub>	75	50°C	15 min
E6	1,85	✓	70% Methanol <sub>(aq)</sub>	je 50	50°C	2 x 15 min
E7	1,30	✓	70% Methanol <sub>(aq)</sub>	je 100	40°C	3 x 15 min
E8	2,00	✓	Aceton	je 75	RT	3 x 15 min
E9	1,25	✓	Ethylacetat	je 75	30°C	3 x 15 min



**Abb. 3-39** Im Grüntee verbliebene Gehalte an EC, EGC, ECG und EGCG nach Extraktion mit den Methoden E1-E9.

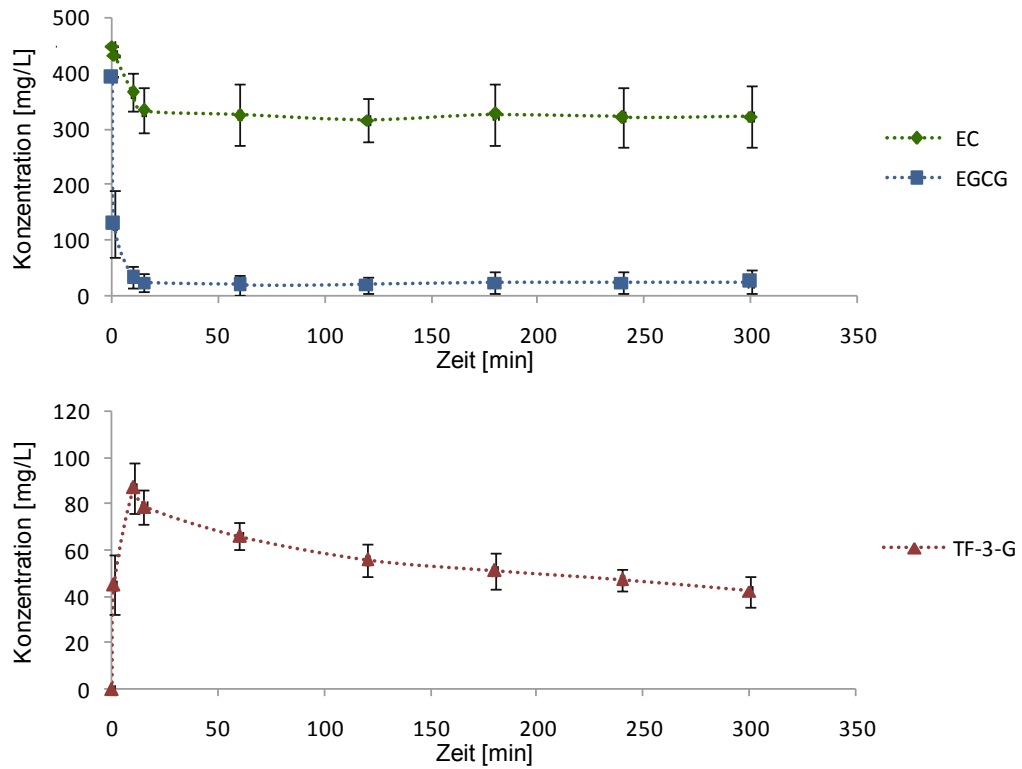
### 3.1.3.2.2 Katalytischer Effekt

Von der so erhaltenen Blattmatrix wurden 0,5 g zum Oxidationsansatz gegeben; alle anderen Parameter blieben gegenüber Abschnitt 3.1.3.1 unverändert. In **Abb. 3–40** sind die Konzentrationsverläufe der Flavanole und Theaflavine während der Modellfermentationen graphisch dargestellt. Der Vergleich mit **Abb. 3–38** macht einige Unterschiede deutlich. Demnach werden sowohl EC als auch EGCG in Anwesenheit der Teeblattmatrix stärker abgebaut. Besonders auffällig ist darüber hinaus die Abnahme der TF-3-G-Konzentration, nachdem diese ca. 15 min nach Reaktionsbeginn ihren Höhepunkt erreicht hat.<sup>258</sup>

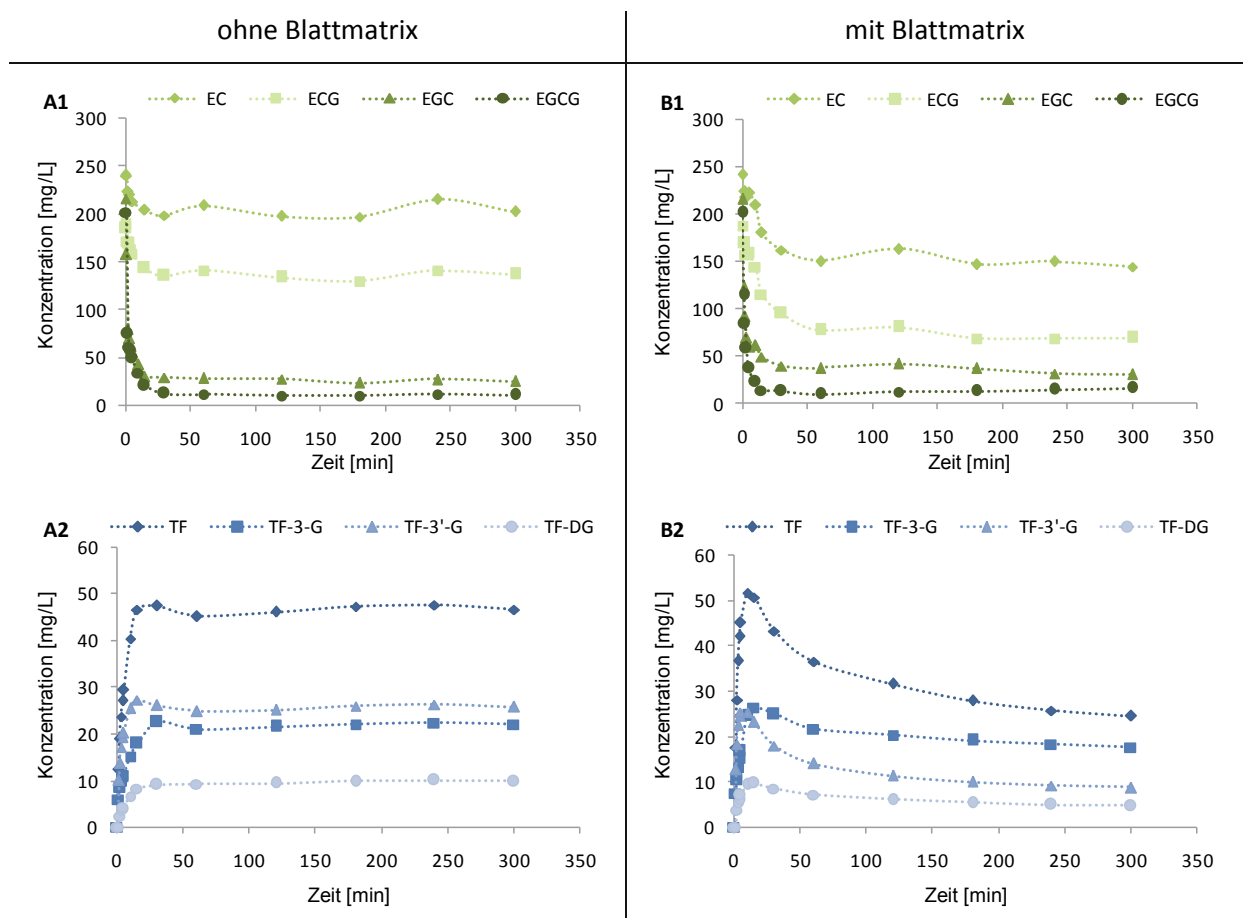
Die Effekte erwiesen sich als reproduzierbar und wurden auch beobachtet, wenn je ca. 25 mg der vier Hauptcatechine gemeinsam oxidiert wurden. In **Abb. 3–41** sind die Entwicklungen der Flavanol- und Theaflavin-Konzentrationen bei Modellfermentationen mit und ohne Blattmatrix einander gegenübergestellt.<sup>258</sup> Insbesondere am Beispiel des EC und ECG ist zu erkennen, dass die Catechine zu einem höheren Grad umgesetzt werden. Ähnlich den Modellversuchen mit endogener POD findet der Abbau der Flavanole vom Pyrogallol-Typ (EGCG, EGC) mit HR-POD ebenfalls bevorzugt statt (**Abb. 3–41**, Graphen A1 und B1). Ferner werden erwartungsgemäß die vier Haupttheaflavine gebildet (**Abb. 3–41**, Graphen A2 und B2). Wie bei der Fermentation MF-4.2 mit endogener PPO und POD entsteht TF als Hauptprodukt, dessen Begünstigung fällt mit HR-POD jedoch geringer aus. Ebenso wie das bei der Oxidation von EC und EGCG gebildete TF-3-G verhalten sich die TFs gegenüber der HR-POD stabil und werden nur in Gegenwart der Blattmatrix abgebaut. Die Umsetzung der TFs beginnt direkt nach dem Erreichen der Maximalkonzentrationen nach etwa 10–15 min, erfolgt zunächst schnell und verlangsamt sich mit fortschreitender Dauer, so dass innerhalb der fünfstündigen Versuchslaufzeit kein vollständiger Abbau festzustellen war.

Um auszuschließen, dass der beschriebene Vorgang nur mit dem *Gunpowder*-Tee auftritt, wurden die Oxidationen von EC und EGCG mit zwei weiteren Grünteesorten untersucht. Zum Einsatz kamen ein chinesischer (*Lung Ching*) sowie ein indischer (*Darjeeling*) Tee. Wie aus **Abb. 3–42** hervorgeht, beschränken sich die beobachteten Umsetzungen von EC und TF-3-G nicht auf den *Gunpowder*-Tee. Die von den Blattmatrizes ausgehende Einflussnahme auf das Oxidationsgeschehen erfolgt dabei in vergleichbarem Umfang.<sup>258</sup>

## Ergebnisse und Diskussion

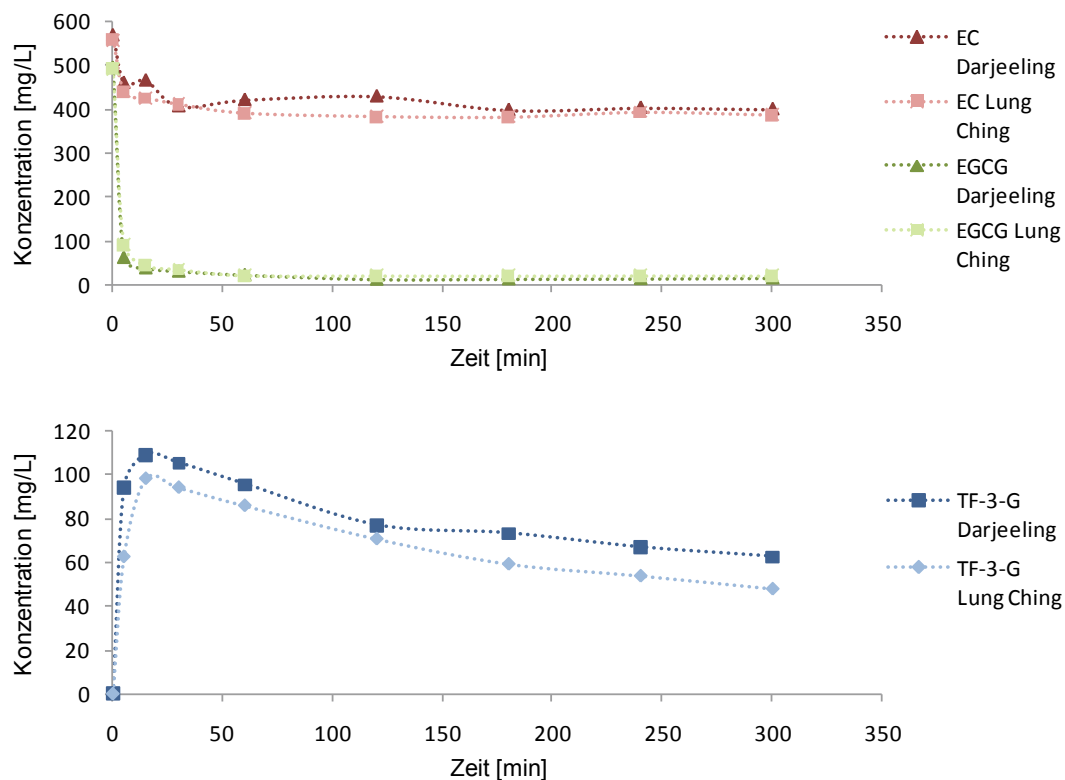


**Abb. 3–40** Oxidation von EC und EGCG mit HR-POD in Anwesenheit von  $H_2O_2$  und  $O_2$  ( $n = 3$ ). *Oben*: Abbau der Flavanole. *Unten*: Bildung der Theaflavine.



**Abb. 3–41** Umsetzung der Catechine und Bildung von Theaflavinen mit HR-POD,  $H_2O_2$  und  $O_2$  in Abwesenheit (A1, A2) sowie in Gegenwart einer Blattmatrix aus Gunpowder-Grüntee (B1, B2).

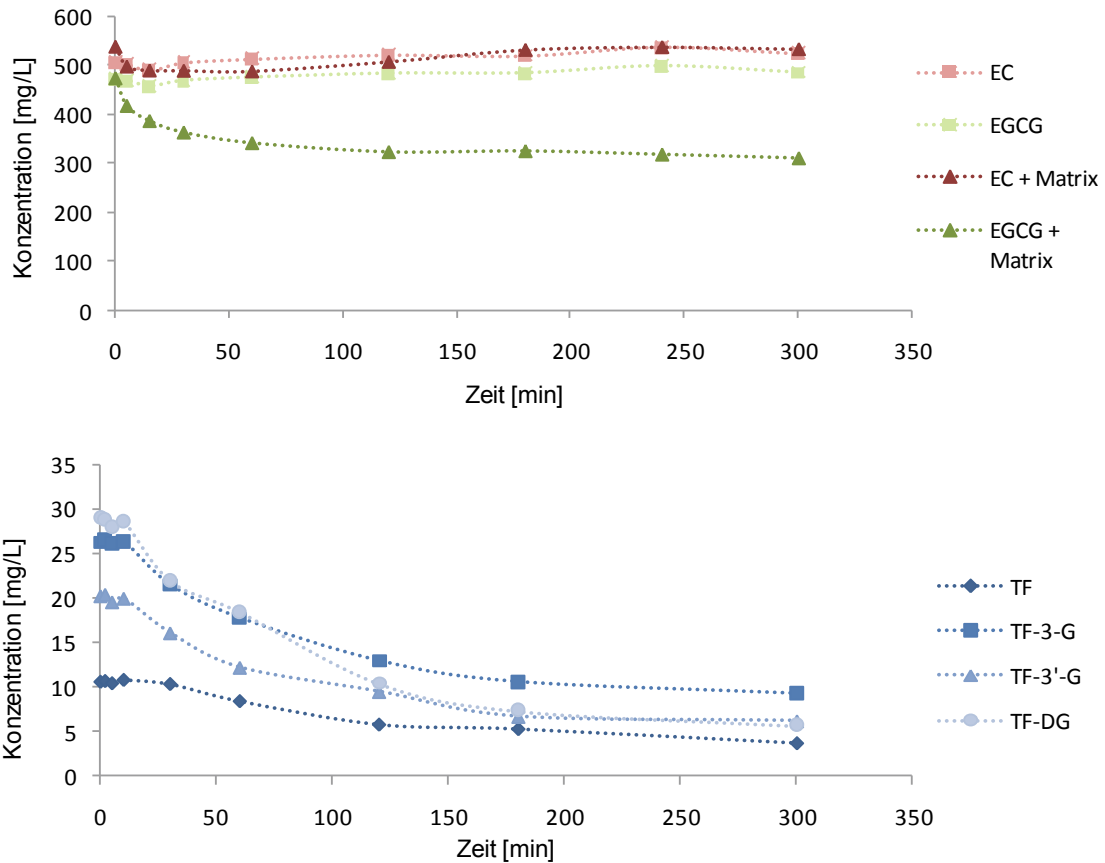
## Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 3–42** Verlauf der EC- und EGCG-Gehalte (oben) sowie des TF-3-G-Gehaltes (unten) während der Modelloxidation mit HR-POD,  $H_2O_2$  und  $O_2$  in Anwesenheit von Blattmatrices aus grünem Darjeeling- resp. Lung Ching-Tee.

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob die oben beschriebenen Effekte tatsächlich durch die Blattmatrices verursacht werden. Hierzu wurden wässrige Lösungen sowohl einer Kombination von EC und EGCG als auch einer Theaflavin-Mischung hergestellt und deren Konzentrationsverläufe über einen Zeitraum von fünf Stunden untersucht. Es erfolgte weder ein Zusatz von HR-POD und Wasserstoffperoxid, noch wurden die Lösungen mit Sauerstoff durchspült, so dass alle Faktoren, die als Auslöser für eine Reaktion der Edukte in Frage kommen (außer Wasser und die Edukte selbst), ausgeschaltet waren. Dabei konnte kein nennenswerter Abbau der Polyphenole festgestellt werden (**Abb. 3–43**). Es folgten weitere Ansätze unter Zugabe der Gunpowder-Blattmatrix, woraufhin sich zuvor nicht beobachtete Umsetzungen der Edukte ergaben. Im Falle der EC/EGCG-Kombination blieb das EC weitgehend stabil, während das EGCG signifikant umgesetzt wurde. Ebenso war eine beachtliche Abnahme der Theaflavin-Konzentrationen zu erkennen (**Abb. 3–43**). Diese Beobachtung ist auch insofern interessant, dass der Theaflavin-Abbau in Abwesenheit von Catechinen geschieht. In den Versuchen mit endogenen Tee-Enzymen erfolgte eine Umsetzung der Theaflavine nur bei gleichzeitiger Anwesenheit eines Catechins (Abschnitt 3.1.2.7).

## Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 3-43** Oben: Konzentrationsverläufe von EC und EGCG in An- und Abwesenheit einer Blattmatrix. Unten: Konzentrationsabnahme von Theaflavinen in Gegenwart einer Blattmatrix.

Die Reaktionen sind damit direkt auf die Präsenz der Blattmatrizes zurückzuführen. Von diesen scheint eine Art katalytischer Effekt auf die polyphenolischen Bestandteile (sowohl Edukte als auch Produkte) des Modellsystems auszugehen, welcher einen Abbau dieser Komponenten zur Folge hat.<sup>258</sup>

### 3.1.3.2.3 Mögliche Ursachen

#### Metallkationen

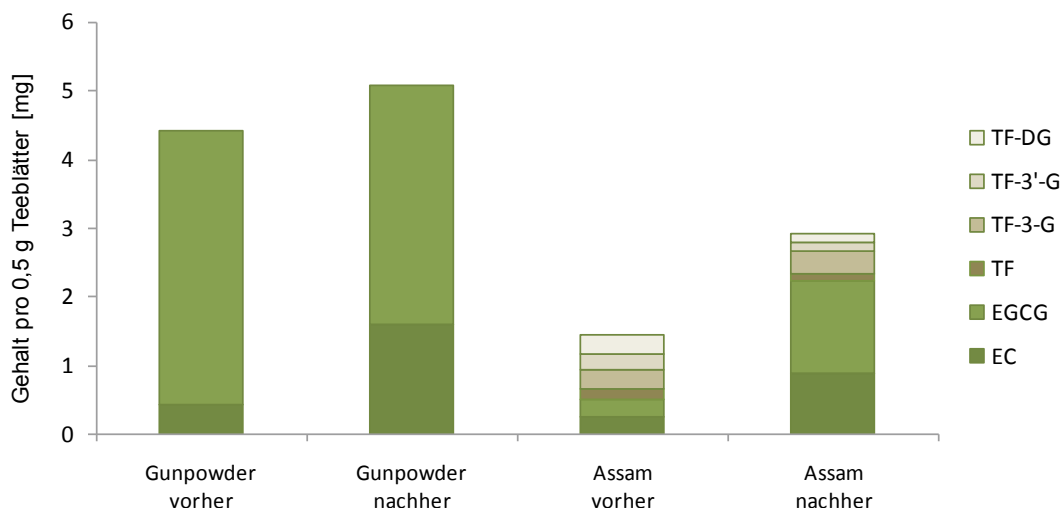
Eine erste Vermutung fiel auf Metallkationen, die aus den Teeblättern freigesetzt werden könnten. Die Ionen verschiedener Metalle wie Kupfer oder Nickel sind für ihre katalytischen Wirkungen bekannt, weshalb sie für eine Reihe von Anwendungen genutzt werden. Aufgrund der Extraktion der Teeblätter vor ihrem Einsatz in den Modellversuchen erscheint eine nennenswerte Freisetzung solcher Ionen allerdings unwahrscheinlich. Zur Überprüfung wurden EC und EGCG in Anwesenheit von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) im ansonsten unveränderten Oxidationssystem mit HR-POD, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> und Gunpowder-Blattmatrix umgesetzt. Dabei fungiert die EDTA als Komplexbildner, welcher durch seine Struktur und Ladung in der Lage ist, Metallkationen in Chelatkomplexen zu binden und somit gegenüber ander-



weitigen Reaktionen zu blockieren. Die Analyse der Polyphenolgehalte im Verlauf der Oxidation zeigte jedoch erneut die charakteristischen Merkmale des Matrixeffektes. Infolgedessen wurden Metallkationen als Ursache ausgeschlossen.<sup>258</sup>

### Adsorption

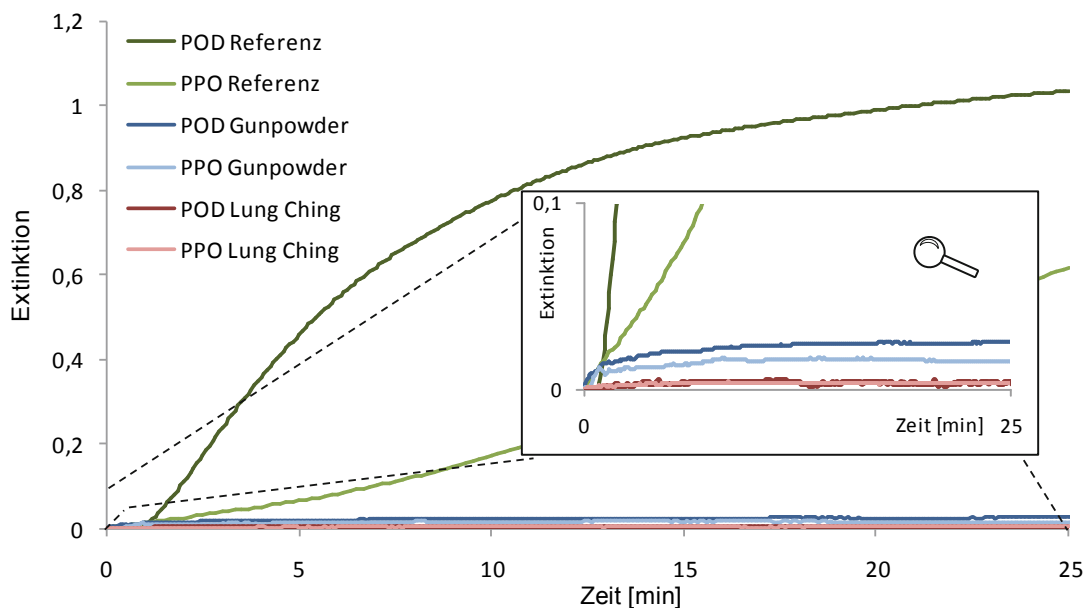
Ferner wurde die Möglichkeit einer Adsorption der Catechine und TFs an die Blattpartikel erwogen, da dies eine Verringerung der Konzentration in der Lösung zur Folge hätte. Es wurde 1 g der aufbereiteten Blattmatrix in zwei Äquivalente aufgeteilt, um deren Polyphenolgehalt vor und nach dem Einsatz in einer Modellfermentation zu ermitteln. Eine Hälfte wurde nach ISO 14502-2 extrahiert und mittels HPLC-DAD der Gehalt an EC, EGCG und TFs bestimmt, mit der anderen Hälfte wurde eine Modelloxidation (EC, EGCG, HR-POD, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und O<sub>2</sub>) durchgeführt und dann gemessen. Im Falle einer Adsorption an die Blattmatrix ist nach dem Einsatz im Modellversuch mit einem Anstieg der extrahierten Gehalte zu rechnen. Die Versuche wurden mit einem Gunpowder-Grüntee und einem Assam-Schwarztee durchgeführt. Den Ergebnissen in **Abb. 3–44** kann entnommen werden, dass im grünen Tee weder vor noch nach der Anwendung TFs nachweisbar sind. Somit ist eine Anlagerung von Theaflavinen an die Blattmatrix auszuschließen. Hinsichtlich der Flavanole wurde zwar ein Anstieg festgestellt, allerdings ist dieser mit etwa 1 mg pro 0,5 g Blattmatrix zu vernachlässigen.<sup>258-259</sup>



**Abb. 3–44** Gehalte an EC, EGCG und Theaflavinen in zwei Blattmatrizes jeweils vor und nach dem Einsatz in Modellversuchen.

Restenzymaktivität von PPO/POD

In der Literatur sind vereinzelt Angaben zu finden, wonach sowohl PPO<sup>260</sup> als auch POD<sup>110</sup> während der Teeherstellung nicht vollständig inaktiviert werden. Die Resultate einer Aktivitätsstudie zu PPO beziehen sich auf schwarzen Tee und zeigten, dass nach dem Firing (der Trocknung) noch eine Restaktivität vorhanden war.<sup>260</sup> Während der Lagerung schwand diese jedoch und konnte nach sechs Monaten nicht mehr nachgewiesen werden. Andere Studien berichteten von einem Nachlassen der PPO-Aktivität bereits im Verlauf der Fermentation, wohingegen in Bezug auf die POD eine stabilere Aktivität verzeichnet wurde.<sup>245, 261</sup> CLOUGHLEY (1981) beschrieb zudem den Grad der Enzyminaktivierung in Abhängigkeit von der Dauer einer Behandlung mit heißem Dampf. Demnach zeigte PPO nach 4-minütiger Behandlung keine Aktivität mehr, während POD noch eine geringe Aktivität besaß, welche in Spuren auch nach 8 min noch nachweisbar war.<sup>262</sup>



**Abb. 3-45** Photometrische Aktivitätsbestimmung ( $\lambda=400$  nm) von PPO und POD in den Blattmatrices aus Gunpowder- und Lung Ching-Grüntee. Als Referenz dient das von Unilever zur Verfügung gestellte enzymatisch aktive Teeblattpulver (Charge 2).

Aus diesen Gründen wurden die Enzymaktivitäten von PPO und POD gemäß der Methode nach Abschnitt 5.4.4.3 bestimmt. In **Abb. 3-45** sind die Aktivitätskurven für zwei aus Grüntee hergestellte Blattmatrices sowie das enzymatisch aktive Teeblattpulver von Unilever (Charge 2) als Referenz dargestellt.<sup>258</sup> Die Extinktionen des Lung Ching-Tees zeigten praktisch keine Zunahme (je 0,003 mit PPO und POD nach 30 min), die des Gunpowders stiegen minimal (0,016 mit PPO bzw. 0,027 mit POD nach 25 min). Dabei ist kein linearer Bereich zur Ermitt-



## *Ergebnisse und Diskussion*

lung der Steigung erkennbar, schon allein aufgrund der in diesem Bereich deutlich sichtbaren Messschwankungen. Der Vergleich mit der Referenz verdeutlicht, dass die Blattmatrizes nur äußerst geringe Absorptionswerte kaum oberhalb der Grundlinie erzielen. Somit kann eine zur Beeinflussung der Versuche ausreichende Aktivität von PPO oder POD nicht festgestellt werden.

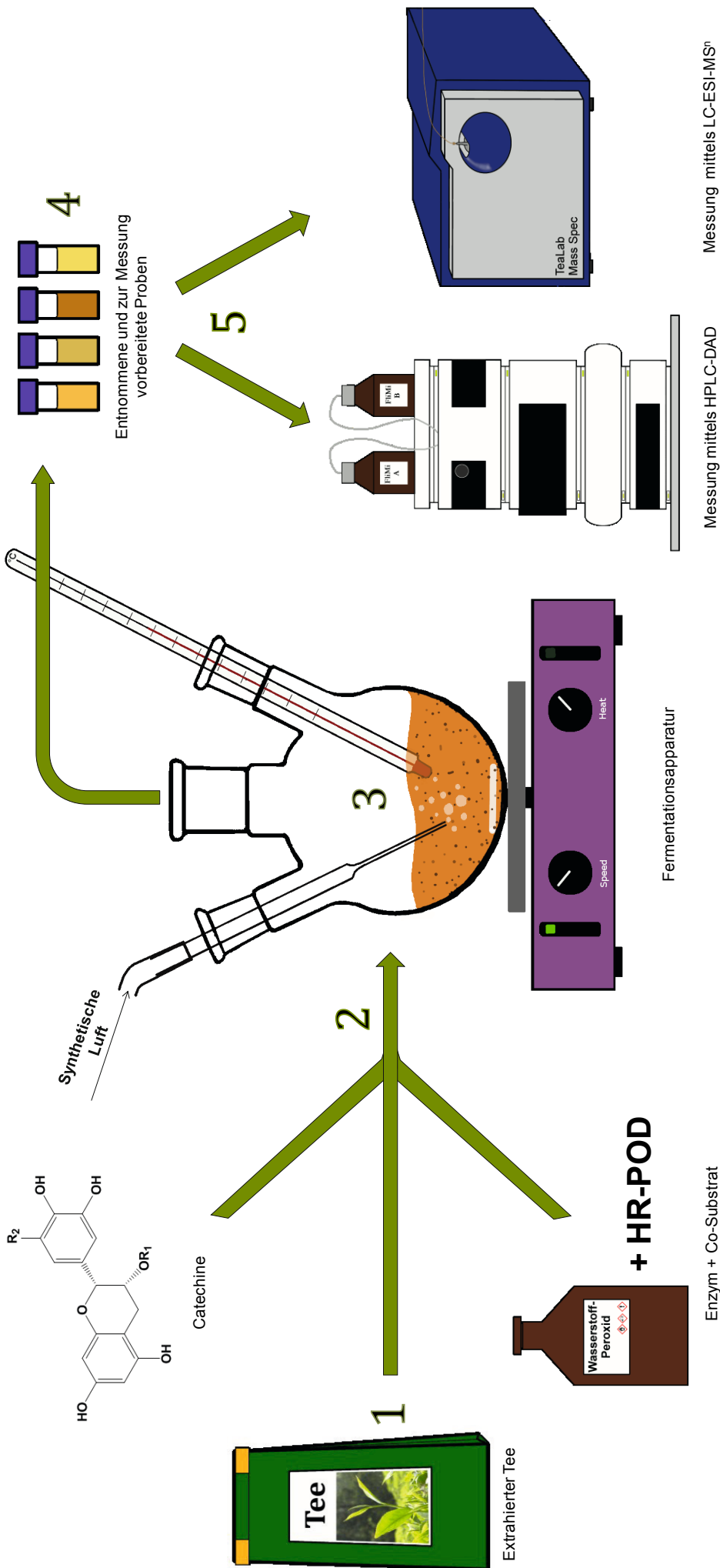
Dieser Befund wird zudem von den eigenen Ergebnissen mit dem Unilever-Blattpulver gestützt, in welchem trotz Lagerung bei  $-18^{\circ}\text{C}$  die Enzymaktivität innerhalb weniger Monate wesentlich zurückging. Überdies war der Gunpowder-Tee bereits mehrere Jahre bei Raumtemperatur und ohne Luftabschluss aufbewahrt worden. Eine Restaktivität von PPO oder POD wird damit als Grund für den beobachteten Matrixeffekt ausgeschlossen.

Die Ursache für die durch die Blattmatrizes ausgelösten Umsetzungen ist folglich weiter ungeklärt. Denkbar ist, dass in den Teeblättern verbliebene Inhaltsstoffe, beispielsweise reaktive Substanzen, ein bisher unbeachtetes, hitze- und lagerbeständiges Enzym oder aktive Rückstände eines denaturierten Enzyms an den Oxidationsprozessen beteiligt sind.<sup>258</sup> Im Falle der Enzyme wären z. B. Laccase (EC 1.10.3.2) und Catalase (EC 1.11.1.21), die ebenfalls Oxidationsreaktionen an Phenolen katalysieren, in Betracht zu ziehen.<sup>83, 113, 115, 122</sup>

### *3.1.3.2.4 Zusammenfassung und Bewertung des neuen Oxidationssystems*

**Abb. 3–46** zeigt eine schematische Darstellung des Aufbaus und der Funktionsweise des entwickelten Modellfermentations-Systems. Alle für die Durchführung benötigten Komponenten sind auf einfachem Wege kommerziell erhältlich. Im Falle der Catechine ist aus Kostengründen eine Isolierung, z. B. gemäß Abschnitt 3.1.1/5.4.3, zu erwägen. Auch andere Substanzen wie Theaflavine können als Edukte eingesetzt werden.

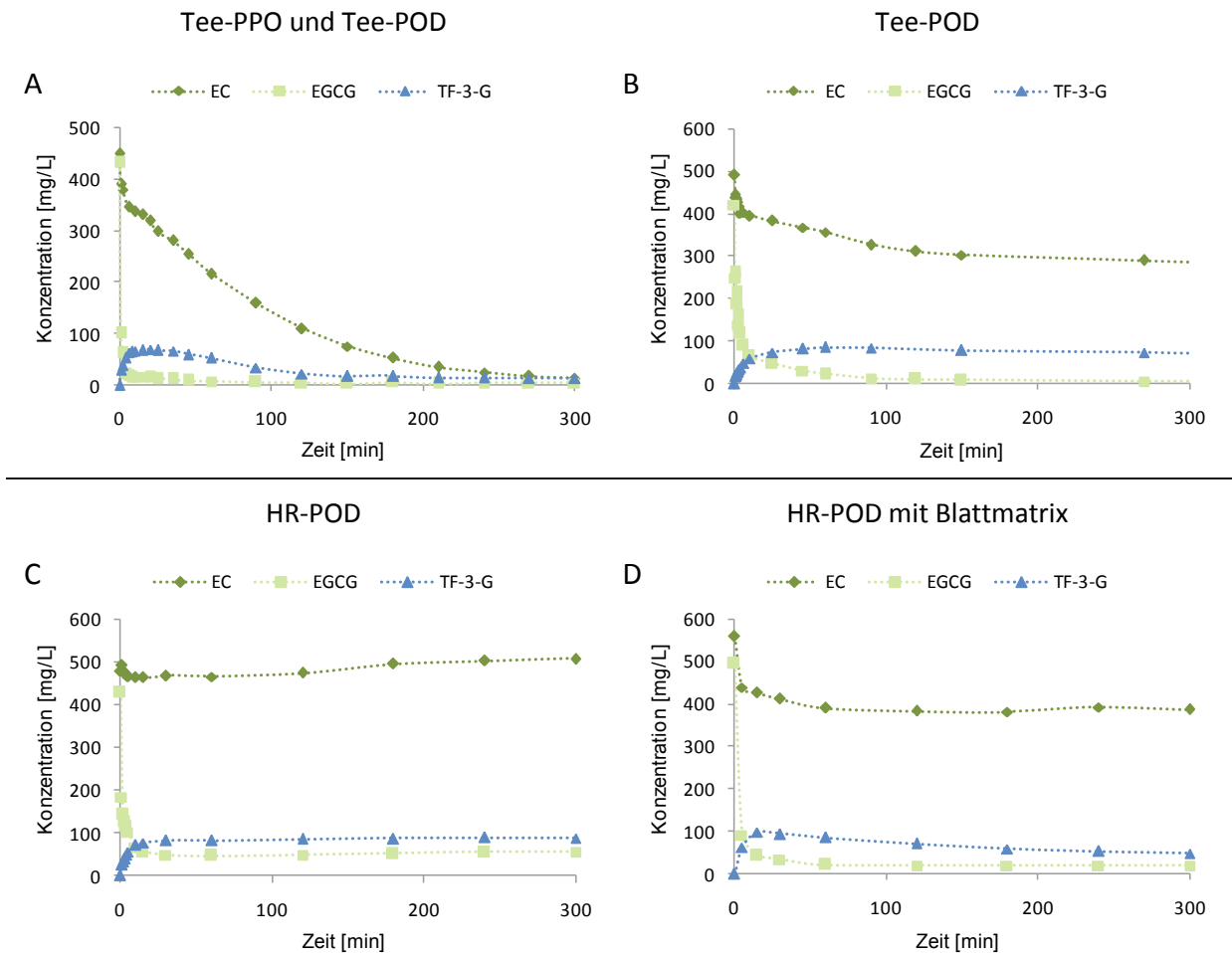
Abgesehen von der Extraktion der Teeblattmatrix und einer eventuellen Isolierung der Catechine sind keine weiteren Vorbereitungsschritte erforderlich. Die Reagenzien werden eingewogen, gelöst und durch Vereinigung zur Reaktion gebracht. Bei stark schwankenden Umgebungstemperaturen oder zur Untersuchung des Temperatureinflusses ist die Verwendung eines temperaturkontrollierten Wasserbades angeraten. Die Probenahme kann jederzeit erfolgen, wobei die Reaktion durch sofortige Zugabe einer Stopplösung zur entnommenen Probe beendet werden muss.



**Abb. 3–46** Schematische Darstellung des Modellfermentations-Systems mit Meerrettich-Peroxidase und Teeblattmatrix: **1** Kommerziell erhältlicher Tee mit inaktivierten Enzymen wird gemahlen, durch lige Extraktion mit 70%igem Methanol<sub>(aq)</sub> (je 15 min bei 40 °C) von phenolischen Bestandteilen befreit und gefriergetrocknet. **2** Catechine werden in Wasser gelöst, in den Reaktionskolben überführt und mit synthetischer Luft durchspült. Um die Reaktion zu starten, werden die extrahierte Teeblattmatrix, Wasserstoffperoxid-Lösung und zuletzt HR-POD zugegeben. **3** Die Reaktion kann bei Raumtemperatur geführt werden. Dabei wird die Suspension stets mit einem Magnetrührer durchmischt und die synthetische Luft bis zum Reaktionsende zugeführt. Unterliegt die Umgebungstemperatur stärkeren Gen, so wird die Verwendung eines temperierbaren Wasserbades empfohlen. **4** Zu beliebigen Zeitpunkten können Proben entnommen werden. Durch Zugabe einer Stopp-Lösung (60% ACN in 10% CH<sub>3</sub>COOH<sub>(aq)</sub>) wird die Reaktion beendet. Die HPLC-Proben werden zusätzlich mit einer EDTA- und ascorbinsäurehaltigen Lösung stabilisiert. **5** Die Proben können zur Analyse mittels HPLC und LC-MS<sup>n</sup> eingesetzt werden.



## Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 3–47** Umsetzung von EC und EGCG zu TF-3-G unter vier unterschiedlichen Bedingungen: A – mit endogener Tee-PPO und -POD, B – mit endogener Tee-POD, C – mit Meerrettich-POD, D – mit Meerrettich-POD und Teeblattmatrix.

Um die Aussagekraft der Methode beurteilen und einordnen zu können, ist in **Abb. 3–47** eine Übersicht von vier Oxidationen mit unterschiedlichen Enzym-/Matrix-Kombinationen dargestellt.<sup>258</sup> Es handelt sich jeweils um Umsetzungen von EC und EGCG, so dass als Hauptprodukt TF-3-G entsteht. Graph A gibt den Einfluss beider endogener Tee-Enzyme auf das Reaktionsgeschehen wieder und kann dementsprechend als Referenz angesehen werden. Da für diese Versuche ein Teeblattpulver als Enzymquelle verwendet wurde, sind auch hier Matrixeffekte denkbar. Die Auswirkungen einer Teeblattmatrix wurden gezielt untersucht und werden v. a. bei einem Vergleich der Graphen C und D deutlich, welche den Oxidationsverlauf mit HR-POD in Ab- und Anwesenheit einer Blattmatrix abbilden. In Gegenwart der Blattmatrix nimmt die Flavanol-Konzentration stärker ab und es erfolgt ein Abbau des gebildeten TF-3-G.

In den Graphen B und D sind Versuche gegenübergestellt, die beide mit POD (in einem Fall aus Tee, im anderen aus Meerrettich) und in Anwesenheit von Teeblattpartikeln durchgeführt wurden, so dass Gemeinsamkeiten zu erwarten waren. Tatsächlich weisen die Kurven-



## Ergebnisse und Diskussion

verläufe einige Parallelen auf. In den ersten Minuten sinken die Flavanol-Konzentrationen, insbesondere die des EGCG, rapide ab, bevor sich die Reaktion verlangsamt und nach ca. 60–90 min zum Erliegen kommt. Gleichzeitig entsteht TF-3-G. Dieses zeigt bei Oxidationen mit endogener POD nach etwa 15 min stabile Gehalte, während es bei einem Einsatz von HR-POD in Kombination mit einer Blattmatrix abgebaut wird. In den Versuchen (MF-3.2–MF-3.4) wurde beobachtet, dass ein Abbau der Theaflavine bei geringen Temperaturen nur in Anwesenheit aktiver PPO erfolgt (s. Graph A). Folglich besitzt das vorgestellte Modell mit HR-POD und Blattmatrix eine größere Nähe zur Oxidation mit beiden Enzymen, als es Systeme bieten, in denen ausschließlich POD verwendet wird.

Ferner ist bei den Modellfermentationen ein abruptes Ende der Catechin-Abnahme (Graph C) bzw. eine Verringerung der Abbaugeschwindigkeit (Graphen A, B, D) zu erkennen, die mit einer Inaktivierung der POD zusammenhängen könnte. Weitergehende Versuche hatten deutliche Hinweise darauf gegeben, dass die Peroxidase bereits nach kurzer Zeit inaktiviert wird. Dies wird möglicherweise durch Oxidationsprodukte ausgelöst, indem diese an das aktive Zentrum binden oder es könnte eine sog. Selbstmord-Inaktivierung stattfinden, wobei radikalische Zwischenprodukte zu einer Fragmentierung und einem Herauslösen des essentiellen Kupfers aus dem Enzym führen. Für PPO ist ein derartiges Verhalten in der Literatur beschrieben.<sup>122, 264</sup> Die Konzentrationsabnahme der Flavanole im weiteren Verlauf der Reaktion mit endogener PPO und POD (Graph A) ist mit der Anwesenheit von PPO zu erklären. Während der Oxidationen mit Tee-POD sowie mit HR-POD und Blattmatrix erfolgt eine geringere und begrenzte Umsetzung zwischen Minute 15 und 90 (Graph B) resp. Minute 15 und 60 (Graph D), was mit der Anwesenheit der Blattpartikel in Zusammenhang zu stehen scheint.

Hinsichtlich der Thearubigene wurde in den HPLC-Chromatogrammen (HPLC\_System 1) der HR-POD-Oxidationen die Bildung eines vergleichbaren TR-Hügels wie bei den Modellfermentationen mit endogenen Enzymen beobachtet. Oftmals war die Fläche größer, wenn eine Blattmatrix beteiligt war, eine klare Aussage lässt sich allerdings nicht treffen. Es erscheint jedoch plausibel, dass durch den Theaflavin-Abbau eine höhere Menge an TRs gebildet wurde.

Analog zu den Modelloxidationen mit endogenen Enzymen wurde ein Teil der HR-POD-Proben mittels HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup> analysiert. Zum Vergleich wurde der Versuchsblock MF-3.2–MF-3.4 mit der Substratkombination EC + EGCG herangezogen. Die in den Experimenten mit tee-eigenen Enzymen nachgewiesenen Signale wurden denen aus HR-POD-Oxidationen



## Ergebnisse und Diskussion

des EC und EGCG sowohl mit als auch ohne Einsatz einer Blattmatrix gegenübergestellt. Dabei war von Interesse, ob sich die Matrix auf die Zusammensetzung der Proben auswirkt. Die in **Tab. 3-17** aufgeführten Hauptsignale lassen einen offenbar von der Enzymquelle (Tee ↔ Meerrettich) abhängigen Unterschied erkennen. So wurden in den HR-POD-Proben einige zusätzliche Signale detektiert, die z.T. aus dimeren Catechinen resultieren. Ein Vergleich der HR-POD-Reaktionen mit und ohne Beteiligung einer Blattmatrix zeigt jedoch keine grundlegende Diskrepanz, abgesehen von der Freisetzung geringer Flavanolmengen aus der Blattmatrix.

**Tab. 3-17** Übersicht über die zugeordneten Oxidationsprodukte von EC und EGCG nach Umsetzungen mit endogenen Tee-Enzymen bzw. HR-POD mit und ohne Blattmatrix; <sup>a</sup> = Freisetzung geringer Mengen infolge von Verunreinigungen.

Verbindung	Rt [min]	[M-H] m/z	MS <sup>2</sup> m/z	MF-3.2–MF-3.4 (endogene Enzyme)	HR-POD ohne Matrix	HR-POD mit Matrix
Gallussäure	3,4	169	125	✓	✓	✓
EC-Dimer	5,0	759	607/589/469/283		✓	✓
unbekannt	5,5	761	591/609/453		✓	✓
unbekannt	8,4	759	607/741/427		✓	✓
unbekannt	8,4	745	575/593/607/437	✓	✓	✓
(+)-C	8,5	289	245/205/203	✓ <sup>a</sup>		✓ <sup>a</sup>
unbekannt	9,5	633	301/463			✓
unbekannt	11,0	777	455/733/759		✓	✓
EC-Dimer	12,3	577	439/425/393/269	✓	✓	✓
EC	13,7	289	245/203/205	✓	✓	✓
DehydroTS AQ/ EGCG-Dimer	15,7	911	759/589/607/741/427		✓	✓
EGCG	17,7	457	169/331/305	✓	✓	✓
EGCG-Dimer	21,7	913	591/743/761		✓	✓
unbekannt	23,9	929	715/885/527/455		✓	✓
DehydroTS AQ/ EGCG-Dimer	26,1	911	759/589/741/409/463		✓	✓
unbekannt	28,1	947	929/911/455/605/759		✓	✓
ECG	28,9	441	289/245	✓ <sup>a</sup>		✓ <sup>a</sup>
EC-Dimer	30,6	577	289/425/245	✓	✓	
unbekannt	31,1	729	389/515/559/331	✓	✓	✓
DehydroTS AQ/ EGCG-Dimer	31,5	911	455/741/605/579/623	✓	✓	
Epitheaflavinsäure	32,6	427	227/383/365/257	✓		
Epitheaflagallin-3-gallat	34,2	551	399/295/337/233	✓	✓	✓
Theanaphthochinon	34,2	533	515/505/349/471/165	✓	✓	✓
Theadibenzotropolon	34,5	973	545/407/383/930	✓	✓	✓
TF	34,5	563	241/379/407/545/524	✓	✓	✓
TF-3-G	35,3	715	371/527/563/545/399	✓	✓	✓
unbekannt	35,9	685	559/667/519/641	(✓)	✓	✓



## *Ergebnisse und Diskussion*

Nennenswert ist die Abwesenheit von Epitheaflavinsäure in den HR-POD-Proben. Möglicherweise wird deren Entstehung durch andere Reaktionen gehemmt oder die HR-POD ist in der Lage, direkt mit dem Benzotropolonderivat zu reagieren. Von dieser Komponente abgesehen konnten jedoch alle in den Versuchen mit endogenen Enzymen identifizierten Verbindungen auch von HR-POD gebildet werden.

Abschließend kann festgehalten werden, dass das vorgestellte Modell unter Verwendung von HR-POD in Verbindung mit einer polyphenolfreien Blattmatrix gegenüber Systemen, in denen ausschließlich eine Fremdperoxidase eingesetzt wird, im Vorteil ist, da die Unterschiede zur authentischen Fermentation z.T. durch die Blattmatrix ausgeglichen werden. Allerdings ist die Abwesenheit der PPO als klarer Nachteil zu bewerten. Unterschiede zwischen endogenen Enzymen und der HR-POD können außerdem aus den Isoenzymen resultieren, aus denen sich sowohl die Tee-PPO als auch die Tee-POD zusammensetzt.<sup>111, 265</sup> Diesen ungeachtet entsprechen die nachgewiesenen Oxidationsprodukte weitgehend denen, die auch im Modellsystem mit endogenen Enzymen sowie in authentischen Teeproben vorliegen.



### 3.1.4 Oxidationen ohne Enzyme

In der Literatur wurde beschrieben, dass Wasserstoffperoxid auch als solches Oxidationsreaktionen von Flavanolen bewirken kann.<sup>266</sup> Es sollte überprüft werden, ob ähnliche Reaktionen bei den im Modellsystem vorliegenden Bedingungen (ca. 0,05%iges Wasserstoffperoxid, Einleitung synthetischer Luft) ebenfalls auftreten.

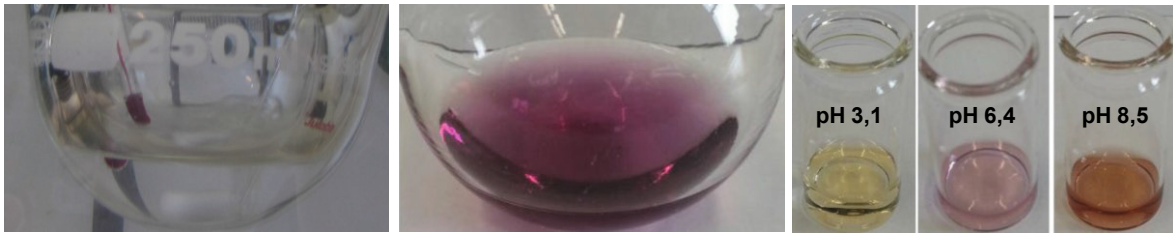
Hierzu wurden die Flavanole EC und EGCG einzeln in wässriger Lösung vorgelegt und der Versuch durch Zugabe von Wasserstoffperoxid-Lösung und Zufuhr synthetischer Luft gestartet (s. Abschnitt 5.4.5). Eine Übersicht über die Versuche befindet sich in **Tab. 3-18**. Insbesondere während der ersten Versuchsdurchführung mit EGCG fand eine starke Verdunstung des Wassers statt, da ein geringes Volumen von nur 30 mL eingesetzt wurde und die Temperatur 35 °C betrug. Dies führte zu einer vollständigen Verdampfung der Reaktionslösung innerhalb von etwa vier Stunden, wobei es zu einer Anreicherung des Wasserstoffperoxids kam. Aufgrund dessen wurden die weiteren Versuche bei 21 °C und in einem Volumen von 40 mL durchgeführt. Im Verlauf der sechsstündigen Reaktionen verhielten sich beide Flavanol-Lösungen optisch stabil (keine Farbänderung). Die Analyse mittels HPLC (HPLC\_System 1) zeigte im Falle des EGCG die zunehmende Bildung eines Signals bei 25,8 min, die EC-Proben wiesen ein Signal bei 10,1 min auf. Somit laufen offenbar auch in Abwesenheit von Enzymen Oxidationsreaktionen ab.<sup>241</sup>

**Tab. 3-18** Übersicht über die Einwaagen und Reaktionsbedingungen der Oxidationen ohne Enzyme.

Nr.	Edukt	Einwaage [mg]	Wassermenge [mL]	Temperatur [°C]
1	EGCG	69,9	30	35
2	EGCG	70,5	40	21
3	EC	70,5	40	21

Eine interessante Beobachtung wurde nach Beendigung des ersten Versuches mit dem im Kolben getrockneten Rückstand gemacht, da nach Zugabe von Wasser eine intensiv violett gefärbte Lösung entstand (**Abb. 3-48**). Bei erneuter Durchführung (**Tab. 3-18**, Nr. 2) fielen die Verdunstungseffekte deutlich schwächer aus, weshalb ein Teil der Reaktionslösung nach sechsstündiger Reaktionsdauer im Stickstoffstrom getrocknet wurde. Bei Aufnahme des Rückstandes in Wasser zeigte sich erneut eine violette Farbe. Die Zugabe geringer Mengen an Ameisensäure resp. Natriumhydroxid-Lösung hatte jeweils eine Farbänderung hin zu gelblich im sauren Milieu bzw. rot-bräunlich in alkalischer Umgebung zur Folge, so dass eine pH-Abhängigkeit des Farbstoffes vorliegt (**Abb. 3-48**).<sup>241</sup>

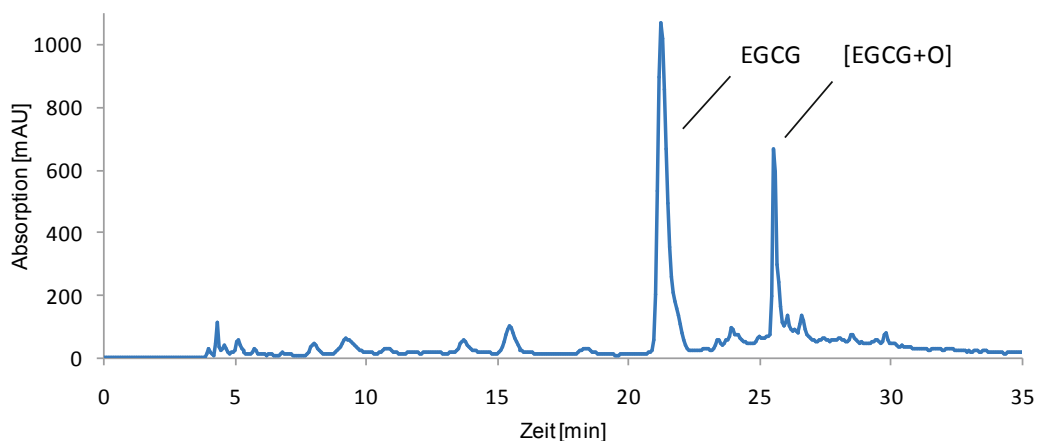
## Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 3–48** Links: Farblose Reaktionslösung mit EGCG und Wasserstoffperoxid. Mitte: Violette Lösung nach Verdampfen der Reaktionslösung und Aufnehmen des Rückstands in Wasser (Fotografie: Steffi Niemann). Rechts: Verhalten der Lösung bei pH 3,1; 6,4 und 8,5 (Fotografie: Steffi Niemann).

Eine Violett-Färbung trat nur bei Oxidationen des EGCG auf. Im Gegensatz zum EC wurde das EGCG selbst isoliert und war nicht frei von Verunreinigungen, wodurch sich mehr Ausgangsstoffe zur Oxidation und insbesondere auch zur Reaktion untereinander anboten. Da die Farbe erst nach vollständiger Trocknung des Kolbeninhaltes und erneutem Lösen des Rückstands sichtbar wurde, laufen die entscheidenden Vorgänge offenbar erst bei sehr hoher Wasserstoffperoxid-Konzentration oder dem direkten Kontakt mit Luftsauerstoff ab.

Um diese Beobachtungen und die möglicherweise entstandenen Oxidationsprodukte zu untersuchen, wurde die violette Lösung via HPLC-DAD analysiert. Das erhaltene HPLC-Chromatogramm ist in **Abb. 3–49** wiedergegeben und zeigt neben dem EGCG-Peak ein deutliches Signal bei 25,5 min, welches aus einem kleinen Hump ähnlich dem der TRs herausragt.<sup>241</sup>



**Abb. 3–49** HPLC-Chromatogramm ( $\lambda=278$  nm) der violett gefärbten Lösung mit HPLC\_System 1.

Weiterhin wurden Proben der EC- bzw. EGCG-Oxidationen (je nach 60 und 360 min entnommen) sowie der violetten Lösung per HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> (LC-MS\_System 1) gemessen. Die im negativen Modus gefundenen Signale sind in **Tab. 3-19–Tab. 3-21** dargestellt.



## Ergebnisse und Diskussion

### EC-Oxidation

In der Oxidationslösung des EC wurde neben dem EC-Pseudomolekülion mit  $m/z$  289 (Signal 7) ein Signal mit  $m/z$  305 (Signal 3) detektiert (**Tab. 3-19**). Die Massenzunahme von 16 Da weist auf den Einbau eines Sauerstoffatoms hin. Demgegenüber zeigt das Signal 8 ein eher unerwartetes Masse-zu-Ladungsverhältnis von 273, was der Abspaltung eines Sauerstoffatoms entspricht. Dessen Hauptfragmente im  $MS^2$ - und  $MS^3$ -Spektrum korrespondieren ebenfalls mit denen des EC abzüglich einer Masse von 16 Da (**Tab. 3-19**) und können folglich als Anhaltspunkt dafür gesehen werden, dass die Grundstruktur des EC in der Substanz erhalten geblieben ist. Auffällig ist außerdem eine Gruppe von insgesamt sieben Signalen mit  $m/z$  577 mit zum Teil sehr ähnlichen Fragmentierungsmustern. Die Masse stimmt mit der zweier EC-Moleküle überein, welche über eine Ether- oder eine C–C-Brücke verknüpft sind (EC + EC – 2 H). Gemäß den Fragmentierungsmustern handelt es sich vermutlich um dimere B-Typ-Proanthocyanidine und Dehydrocatechine.<sup>250, 253, 267-268</sup>

**Tab. 3-19** Liste während der Oxidation von EC mit  $H_2O_2$  und  $O_2$  detektierter Signale und Zuordnungsvorschläge.

Signal	Rt [min]	Zuordnungsvorschlag	[M–H] <sup>–</sup> m/z	MS <sup>2</sup> m/z	MS <sup>3</sup> m/z
1	3,5	EC-Epoxid	303	<u>165</u> /167/261	125
2	5,8	B-Typ Dehydrodicatichin	577	<u>559</u> /393	421/541
3	8,0	[EC + O]	305	<u>287</u> /125	125/161
4	10,9	B-Typ Dehydrodicatichin	577	<u>559</u> /393	421/335
5	12,7	B-Typ Proanthocyanidin-Dimer	577	<u>425</u> /407	407
6	13,1	B-Typ Dehydrodicatichin	577	<u>439</u> /269/425	421/377
7	13,9	EC	289	<u>245</u> /205/203/179	203/161
8	24,3	[EC – O]	273	<u>229</u> /187/255	187
9	26,3	B-Typ Dehydrodicatichin	577	<u>425</u> /287/439	287
10	29,4	B-Typ Dehydrodicatichin	577	<u>439</u> /425/329	377/421
11	31,0	B-Typ Dehydrodicatichin	577	<u>289</u> /425/245	245/205

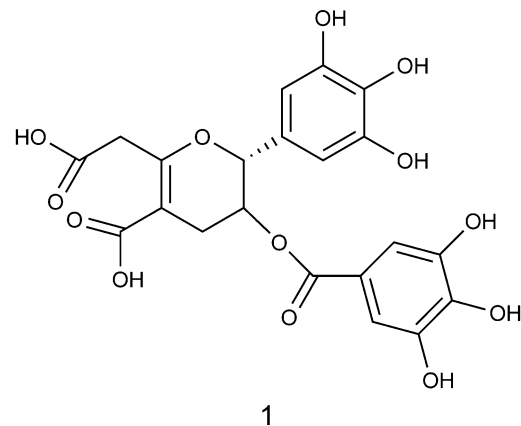
Des Weiteren könnte eine Bildung von EC-Epoxiden gemäß YASSIN et al. (2014) erfolgt sein (**Abb. 1–16**).<sup>200</sup> So wurde mit geringer Intensität das Signal 1 ( $m/z$  303) detektiert, dessen  $MS^2$ -Hauptfragment mit  $m/z$  165 möglicherweise aus einer Retro-Diels-Alder-Spaltung am C-Ring hervorgeht. Andere Fragmente konnten nicht zugeordnet werden.

Ein von ZHU et al. (2000) beschriebenes Reaktionsprodukt von EC mit Wasserstoffperoxid wurde nicht nachgewiesen.<sup>266</sup>

### EGCG-Oxidationen

Während der EGCG-Oxidation entstanden abgesehen von dem EGCG-Pseudomolekülion mit  $m/z$  457 (Signal 6) zwei Verbindungen mit  $m/z$  473 (Signale 1 und 4), bei denen es sich wahrscheinlich um ein einfach oxidiertes EGCG handelt (**Tab. 3-20**). Im  $MS^2$ -Hauptfragment des Signals 4 zeigt sich ein Massenverlust von 154 Da gegenüber dem Mutterion. Dieser lässt sich mit einer RDA-Spaltung am C-Ring erklären, sofern sich das zusätzliche Sauerstoffatom am A-Ring befindet. Die anderen Fragmente ( $m/z$  303, 169) gehen aus einer Abspaltung der Galloylfunktion hervor. Dagegen weist das Signal 1 nach Wasserabspaltung ein Fragment mit  $m/z$  455 auf, welches dem Signal 7 zu entsprechen scheint. Interessanterweise wurde dieses Signal ( $m/z$  455, 32 min) in der Modellfermentation MF-3.2 mit EGCG und EC ebenfalls detektiert. Der Nachweis in beiden Systemen deutet darauf hin, dass auch im Modellsystem nach Abschnitt 3.1.2.4 Reaktionen ablaufen, die von den Enzymen unabhängig sind.

ZHU et al. (2000) charakterisierten ein Produkt **1** (**Abb. 3-50**) der Oxidation von EGCG mit Wasserstoffperoxid, das ein Masse-zu-Ladungsverhältnis von 477 und eine Öffnung am A-Ring mit zwei Carboxylgruppen besitzt.<sup>266</sup> In den Proben wurden zwei Peaks (Signale 2 und 3) mit entsprechendem  $m/z$ -Wert detektiert. Diese eluieren in kurzer Folge und weisen ähnliche Fragmente auf, deren Intensitäten jedoch variieren. Möglicherweise handelt



**Abb. 3-50** Oxidationsprodukt **1** des EGCG mit Wasserstoffperoxid nach ZHU et al. (2000).

es sich dabei um Isomere. Gemäß dem  $MS^2$ -Tochterion bei  $m/z$  433 ( $-44$  Da) wird offenbar eine Carboxylfunktion abgespalten. Die daraus gebildeten  $MS^3$ -Fragmente weisen neben der Trennung der Esterbindung ( $m/z$  281) und Abspaltung von Wasser ( $m/z$  415) ein Signal bei  $m/z$  389 auf, so dass die Abspaltung einer weiteren Carboxylfunktion vermutet wird. Das Vorliegen der in der Literatur beschriebenen Verbindung **1** ist damit sehr wahrscheinlich. Interessanterweise wurde im Massenspektrum ein intensiveres Signal bei  $m/z$  461 detektiert, welches formal  $[1 - O]$  entspricht (Signal 5). Da die Fragmentationen z. T. mit denen des Signals 3 abzüglich 16 Da übereinstimmen, ist als Hauptprodukt ein Desoxy-Derivat von **1**

## Ergebnisse und Diskussion

denkbar. Eine Bildung dimerer Verbindungen, wie im Falle des EC beobachtet, wurde nicht festgestellt.

**Tab. 3-20** Liste während der Oxidation von EGCG mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> detektierter Signale und Zuordnungsvorschläge.

Signal	Rt [min]	Zuordnungsvorschlag	[M-H] <sup>-</sup> m/z	MS <sup>2</sup> m/z	MS <sup>3</sup> m/z
1	5,6	[EGCG + O]	473	<u>455</u> /169	317/199/269/ 241/303/169
2	9,7	<b>1</b>	477	<u>219</u> /169/325/433	201/125
3	10,5	<b>1</b>	477	<u>433</u> /219/169/325	415/169/389/281
4	12,4	[EGCG + O]	473	<u>319</u> /303/169	167
5	15,2	[ <b>1</b> - O]	461	<u>417</u>	169/265/125/ 399/373
6	17,9	EGCG	457	<u>169</u> /331/305/197/287	125
7	32,0	[EGCG - 2H]	455	<u>317</u> /241/199/269/169	271

Die Untersuchung einer aus der violetten Lösung entnommenen Probe zeigt klare Abweichungen gegenüber den farblosen Lösungen (**Tab. 3-21**). So wurde das Signal m/z 461 ([**1** - O]) mit merklich geringerer Intensität nachgewiesen, während das der Verbindung **1** zugeordnete Signal nicht mehr detektierbar war. Mit fast gleicher Retentionszeit eluierte an dessen Stelle eine Komponente mit m/z 433 (Signal 2), die dem Hauptfragment von **1** nach Abspaltung einer Carboxylgruppe entspricht. Ferner ist eine Gruppe von insgesamt 6 neuen Oxidationsprodukten mit m/z 480 (Signale 8–13) und sehr ähnlichen MS<sup>2</sup>-Spektren entstanden, was auf eine gemeinsame Grundstruktur hinweist.

Oxidierete EGCG-Derivate mit m/z 473 sind auch hier vorhanden (Signale 1, 6 und 7), weichen allerdings bezüglich ihrer Retentionszeiten und Fragmentierungsspektren von denen in der farblosen Lösung ab. Alle Signale zeigen typische Ionen für eine Fragmentierung am Gallates-ter (m/z 321, 303, 169) sowie für eine heterocyclische Ringspaltung (m/z 347). Dies deutet auf eine intakte Grundstruktur des EGCG hin. Da die Verbindung bei 26,6 min (Signal 6) die höchste Intensität nach der des EGCG besitzt, wurde diese dem Peak im HPLC-Chromatogramm bei 25,5 min zugeordnet (**Abb. 3-49**).

Welches Reaktionsprodukt für die Ausbildung der violetten Farbe verantwortlich ist, ist unbekannt. In der Literatur wird das Auftreten eines blau-violetten Farbtons bei der Oxidation von Theaflavinen mit POD und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> beschrieben und mit der Bildung von Chinonen an der Benzotropolon-Einheit erklärt.<sup>110, 115, 269</sup> Eine Theaflavin-Bildung wäre im vorliegenden Falle durch Verunreinigungen des EGCG mit anderen Catechinen denkbar. Hinzu kommt, dass das



## Ergebnisse und Diskussion

EGCG infolge der Abspaltung der Galloylfunktion dazu beigetragen haben könnte, geeignete Reaktionspartner für die Bildung von Substanzen wie Epitheaflagallin-3-gallat freizusetzen. Theaflavine oder Theaflagalline wurden jedoch nicht nachgewiesen.

**Tab. 3-21** Liste in der nach der Oxidation von EGCG mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> erhaltenen violetten Lösung detektierter Signale und Zuordnungsvorschläge.

Signal	Rt [min]	Zuordnungsvorschlag	[M-H] <sup>-</sup> m/z	MS <sup>2</sup> m/z	MS <sup>3</sup> m/z
1	9,2	[EGCG + O]	473	<u>321</u> /303/259/169/347	177
2	11,0	[1 - COO]	433	<u>389</u> /263/169	219/263/169
3	12,7	unbekannt	455	169/ <u>319</u> /379	167
4	15,2	[1 - O]	461	<u>417</u>	169/265/125/399
5	18,0	EGCG	457	<u>169</u> /331/305	125
6	26,6	[EGCG + O]	473	<u>169</u> /319/321/347/303	125
7	27,7	[EGCG + O]	473	<u>169</u> /319/321/347/303	125
8–13	12,0; 15,6; 24,6; 25,4; 27,0; 28,9	unbekannt	480	<u>319</u> /462/471/386/169	217/191/167

Eine alternative Möglichkeit besteht in der Bildung eines Anthocyanidins. Bei diesen handelt es sich um die Aglycone der Anthocyane, verbreitete Pflanzenfarbstoffe mit pH-abhängigem Farbton.<sup>270</sup> Beispiele sind Cyanidin und Delphinidin, von deren Anwesenheit in Tee bereits berichtet wurde.<sup>271</sup> Aufgrund seiner strukturellen Nähe zum EGCG käme insbesondere das Delphinidin in Betracht, welches in Form seines 3-Gallates eine Molmasse von 456 Da besitzt. Tatsächlich ist in der violetten Lösung ein Pseudomolekülion mit m/z 455 vorhanden (Signal 3), dessen Fragmentierungsmuster sich aber von dem des Delphinidins unterscheidet.<sup>272</sup> Des Weiteren ist das Farbverhalten in Abhängigkeit vom pH-Wert zum Teil unstimuliert. So weisen Anthocyanidine zwar im pH-Bereich 6–7 eine violette Farbe auf, zeigen in saurer Lösung jedoch infolge veränderter Auxochrome eine rote oder blaue und in basischer Umgebung eine blaue oder grüne Tönung.<sup>270</sup>

Der Ursprung der violetten Färbung bleibt damit ungeklärt.

## 3.2 Fraktionierung und Isolierung von Thearubigenen

### 3.2.1 Vergleich verschiedener Methoden

Aufgrund des unvollständigen Wissens über die Bestandteile des schwarzen Tees, insbesondere die Thearubigene, wurden Verfahren verglichen, die der Fraktionierung bzw. Isolierung von Thearubigenen dienen. Bei den verwendeten Methoden handelt es sich um die Roberts'-Fraktionierung, die Fällung mit einem Überschuss an Coffein sowie eine Trennung mittels HSCCC nach vorheriger säulenchromatographischer Aufreinigung an XAD-7-Adsorberharz. Bemerkenswert ist, dass bei allen drei Verfahren die Lösungsmittel Wasser, Ethylacetat und *n*-BuOH eingesetzt werden.

#### 3.2.1.1 Roberts'-Fraktionierung

Die Roberts'-Fraktionierung ist die älteste Methode zur Beschreibung der Thearubigene und wurde 1957 von ROBERTS et al. entwickelt.<sup>150</sup> Sie umfasst eine flüssig-flüssig-Extraktion eines wässrigen Teeaufgusses mit Ethylacetat im ersten und mit *n*-Butanol im zweiten Schritt. Aus der Ethylacetatphase wird durch zweimaliges Fällern mit Chloroform resp. Ether die sog. SI-Fraktion gewonnen. Nach der Trennung von butanolischer und wässriger Phase wird letztere angesäuert und ein weiteres Mal mit *n*-Butanol extrahiert. Der wässrige Rückstand wird verworfen. Durch Fällung mit Ether werden aus den vereinigten butanolischen Extrakten die sog. SII- und SIa-Fractionen erhalten.

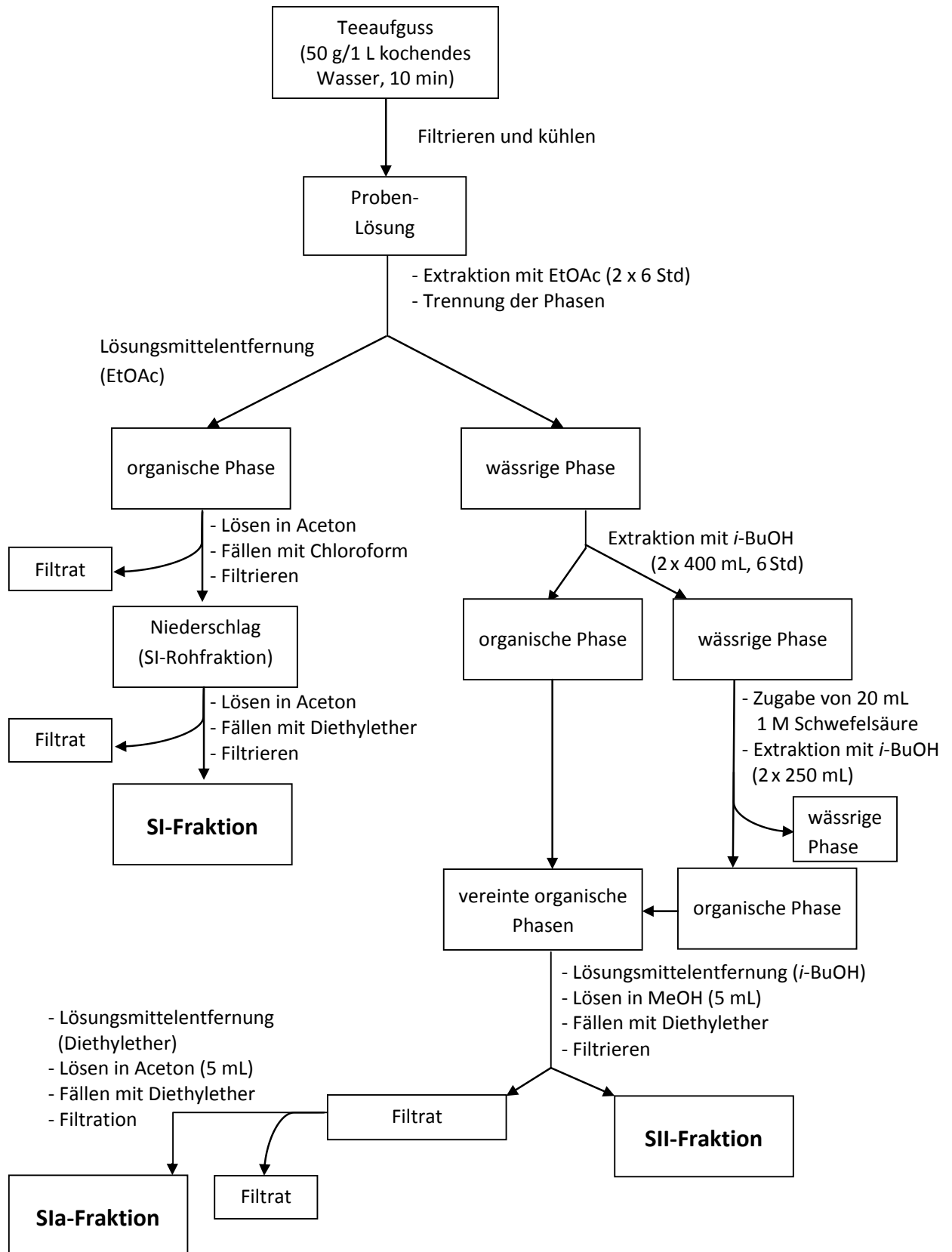
Erste Versuche zeigten, dass das ursprünglich von ROBERTS et al. (1957) beschriebene Verfahren mit einem hohen Zeit- und Arbeitsaufwand einhergeht.<sup>150</sup> Aus diesem Grund wurde eine verkürzte Version nach BAILEY et al. (1994) getestet, welche sich zwar als zeitsparender erwies, jedoch geringere Ausbeuten lieferte.<sup>191</sup> Um ein Gleichgewicht zwischen Zeitaufwand und Ausbeute zu finden, wurde daher eine Kombination der beiden Ansätze entwickelt. Dies gelang mit der in **Abb. 3–51** dargestellten Methode.<sup>273</sup>

#### 3.2.1.2 Coffein-Fällung

Coffein bildet mit Polyphenolen einen in kaltem Wasser schwerlöslichen Komplex, der nach der üblichen Herstellung eines Schwarzteeaufgusses somit erst im Laufe des Abkühlvorganges als rot-brauner Niederschlag sichtbar wird. Seitens der Polyphenole reagieren v. a. die Thearubigene und Theaflavine.<sup>274</sup>



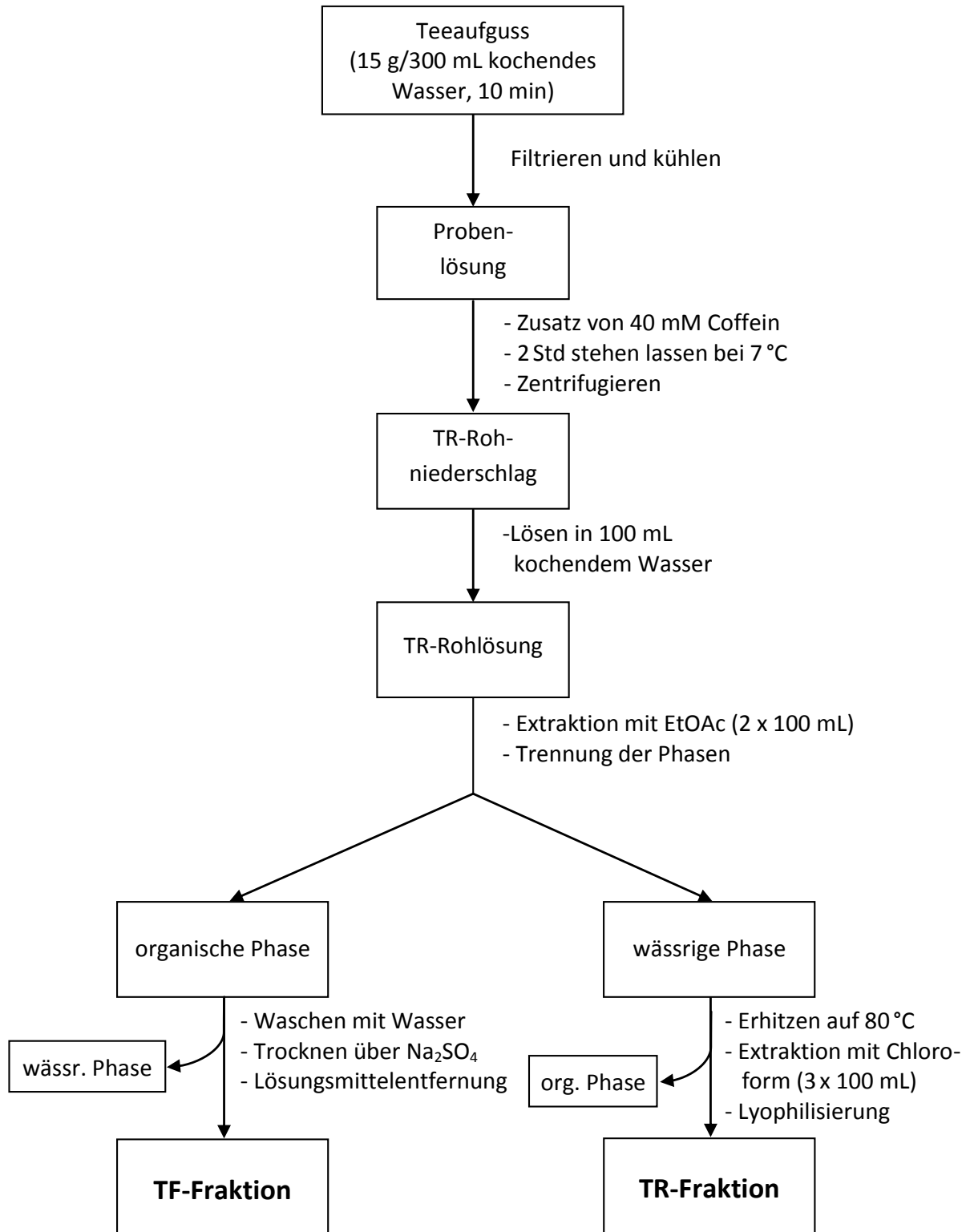
## Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 3-51** Schematische Darstellung der Thearubigen-Fraktionierung mittels modifizierter Roberts'-Fraktionierung nach Abschnitt 5.4.2.1.



## Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 3–52** Schematische Darstellung der Thearubigen-Isolierung mittels Coffein-Fällung nach KUHNERT et al. (2010), s. auch Abschnitt 5.4.2.2.<sup>173</sup>

In der Fachliteratur ist der Effekt auch als *Tea-Creaming* bekannt. Die Reaktion kann genutzt werden, um nach Zugabe von Coffein im Überschuss die polyphenolischen Bestandteile eines Schwarztees zu isolieren. Durch erneutes Lösen in heißem Wasser und eine flüssig-flüssig-Extraktion mit Ethylacetat werden die Polyphenole ähnlich der Roberts'-Fraktionierung in zwei Fraktionen aufgetrennt. Verschiedene Varianten dieses Verfahrens sind in der Literatur beschrieben, von denen für diese Arbeit die Methode nach KUHNERT et al. (2010) ausgewählt wurde.<sup>173, 195</sup> Die experimentelle Vorgehensweise ist in **Abb. 3–52** schematisch dargestellt.<sup>273</sup>

### 3.2.1.3 Isolierung mittels XAD-7 und HSCCC

WEDZICHA et al. (1990) beschrieben ein Verfahren zur Isolierung von Thearubigenen aus einem wässrigen Teeaufguss mittels HSCCC-Trennung unter Verwendung von Lösungsmittelsystemen aus der sog. EBUWat-Familie (Ethylacetat/*n*-Butanol/Wasser).<sup>275</sup> Indem eine säulenchromatographische Aufreinigung des Teeaufgusses an Amberlite XAD-7-Adsorberharz vorgeschaltet wurde, entwickelten DEGENHARDT et al. (2000) diese Methode weiter.<sup>196</sup> Der zusätzliche Aufreinigungsschritt dient der Abtrennung hydrophiler und dadurch mit der Thearubigenfraktion coelulierender Proteine und Polysaccharide. Dabei bindet das Adsorberharz die phenolischen Bestandteile, so dass störende Substanzen mit Wasser von der Säule gespült werden können. Die Phenole werden anschließend mit Methanol eluiert und nach Gefriertrocknung für die HSCCC eingesetzt. Eine schematische Darstellung des Verfahrens findet sich in **Abb. 3–53**.<sup>273</sup>

### 3.2.1.4 Vergleichsparameter

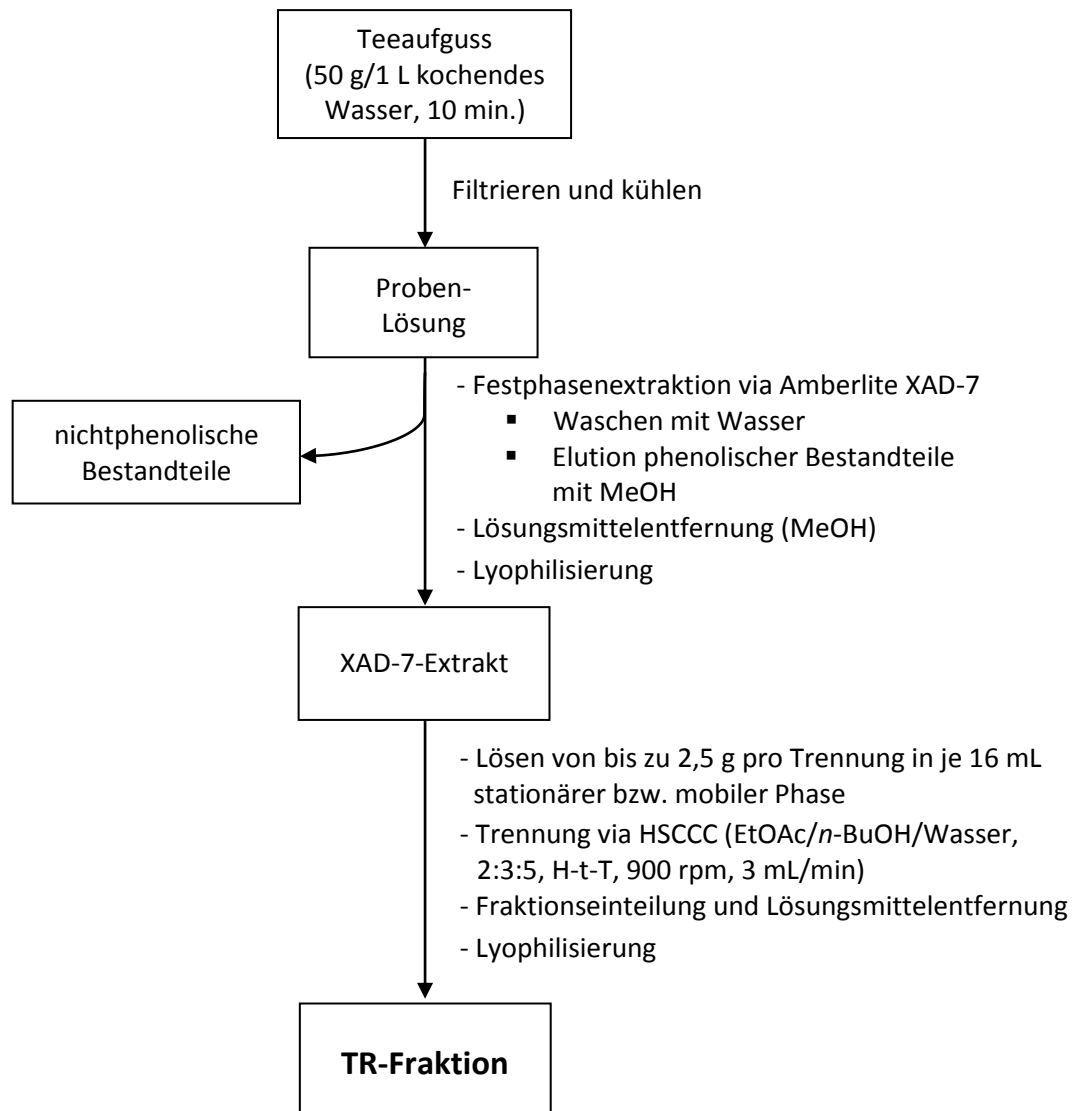
Es wurden drei Kategorien festgelegt, anhand derer die Methoden verglichen werden sollten:

- Zeitaufwand
- Ausbeute
- Reinheit

Unter *Zeitaufwand* ist die gesamte benötigte Zeit für eine Durchführung der Methode in Verbindung mit der dafür erforderlichen Arbeitsintensität zu verstehen.

Die *Ausbeute* gibt die prozentuale Ausbeute an TR-reichen Fraktionen an. Unter Einbeziehung des üblichen Maßstabes der jeweiligen Methode kann damit auch die absolute Menge an Material abgeschätzt werden, welche erhalten wird.

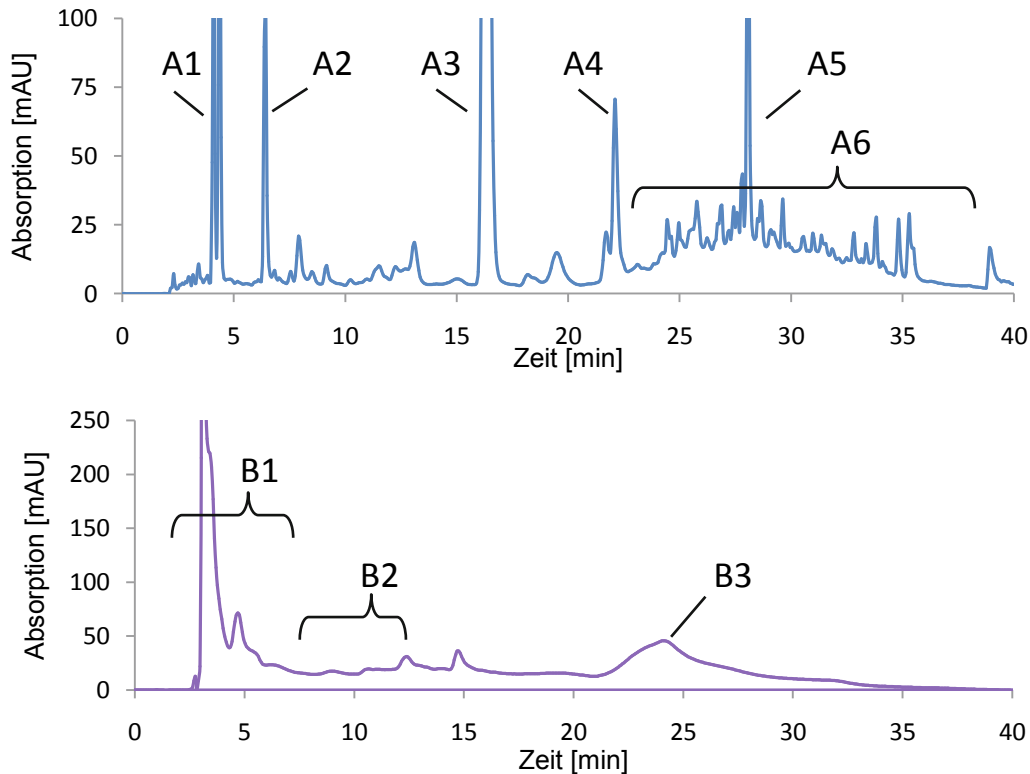
## Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 3–53** Schematische Darstellung der Thearubigen-Isolierung mittels XAD-7-Extraktion und Gegenstromverteilungschromatographie nach DEGENHARDT et al. (2000), s. auch Abschnitt 5.4.2.3.<sup>196</sup>

Der Faktor *Reinheit* drückt den Anteil der gewünschten Thearubigene an allen Inhaltsstoffen einer Fraktion aus. Aufgrund der Komplexität der Thearubigene und des daraus resultierenden Mangels an zuverlässigen Verfahren zur Quantifizierung erwies sich dieser Punkt als problematisch. Ein Ansatz bestand darin, den TR-Gehalt mit Hilfe einer ISO-Methode zur Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes in Tee unter Verwendung des Folin-Ciocalteu-Reagenzes abzuschätzen (s. Abschnitt 5.4.1.6).<sup>276</sup> Die erhaltenen Ergebnisse entsprachen jedoch nicht den Erwartungen und fielen mit Werten von durchschnittlich ca. 50% relativ niedrig aus. Zudem zeigten Fraktionen wie die SI-Fraktion, die vergleichsweise viele unerwünschte Mono- und Dimere enthalten, einen erhöhten Phenolgehalt. Dies liegt insbesondere darin begründet, dass die Methode mit Gallussäure kalibriert wird, deren Verhalten eher dem der monomeren Flavanole entspricht, wohingegen die Thearubigene einen gering-

geren relativen Responsefaktor besitzen. Außerdem weist das Verfahren eine mangelnde Spezifität auf: Da auch andere oxidierbare Substanzen erfasst werden können, ist nicht sichergestellt, dass der ermittelte Gehalt ausschließlich Phenolen zuzuordnen ist.<sup>277</sup>



**Abb. 3–54** HPLC-Chromatogramme ( $\lambda = 278 \text{ nm}$ ) eines wässrigen Aufgusses aus Sumatra-Schwarztee. *Oben* (blau): Messung mit einer Luna®-Umkehrphasensäule (HPLC\_System 1). *Unten* (violett): Messung mit einer Diol-Normalphasensäule (HPLC\_System 5). Die Signale sind wie folgt zuzuordnen: **A1**: Gallussäure, Theogallin; **A2**: Theobromin; **A3**: Coffein; **A4**: EGCG; **A5**: ECG; **A6**: TRs, FOG; **B1**: mono-, dimere Bestandteile; **B2**: FOG; **B3**: TRs.

Aufgrund dessen wurde auf die Analyse mittels HPLC zurückgegriffen und der Begriff *Reinheit* als die Fläche des TR-Hügels bei  $\lambda = 278 \text{ nm}$  (abzüglich aller evtl. daraus herausragenden Peakflächen) bezogen auf die Gesamtfläche eines Chromatogramms definiert. Es handelt sich somit um die chromatographische Reinheit. Zu diesem Zweck wurden zwei HPLC-Systeme eingesetzt. Zum einen wurde eine etablierte Methode nach ISO 14502-2 verwendet (s. Abschnitt 5.4.1.1), welche die charakteristischen Teebestandteile, insbesondere die Catechine (+)-C, EC, ECG, EGC und EGCG sowie Coffein und Gallussäure, als diskrete Peaks darstellt und deren Quantifizierung erlaubt (**Abb. 3–54** oben).<sup>278</sup> Thearubigene eluieren in der bekannten Form als Hügel mit vergleichsweise hoher Retentionszeit, es findet jedoch eine Coelution mit anderen Bestandteilen wie Theaflavinen und FOG statt. Deshalb wurde ein zweites HPLC-System herangezogen, bei dem eine Diol-Säule zum Einsatz kommt. Im Gegensatz zur Säule des ersten Systems handelt es sich hierbei um eine Normal-Phase anstelle ei-

ner Umkehr-Phase. Wie KELM et al. (2006) berichteten, kann damit die mit den TRs chemisch verwandte Gruppe der Proanthocyanidine anhand ihres Polymerisationsgrades getrennt werden, so dass die Elution in der Reihenfolge Mono-, Di-, Tri-, ..., Polymere erfolgt.<sup>279</sup> Um die Übertragbarkeit auf Teepolyphenole zu testen, wurden verschiedene Tee-Extrakte mit einer ähnlichen Methode aus der Literatur analysiert. Dabei sollen Proanthocyanidin-Polymere ab einem Polymerisationsgrad von > 5 in Form eines einzelnen, theoretisch quantifizierbaren Peaks eluieren.<sup>280</sup> Die untersuchten Teeproben zeigten ein ähnliches Verhalten: Bei einer Trennung mit HPLC\_System 5 eluieren die Thearubigene nach ca. 24 min, wohingegen kleinere Moleküle wie Catechine, Coffein und Theaflavine (3–7 min) sowie FOG (8–12 min) geringere Retentionszeiten aufweisen (**Abb. 3–54** unten).<sup>273</sup>

### 3.2.1.5 Vergleich

Die Ergebnisse des Methodenvergleiches sind in **Tab. 3-22** zusammengefasst. Anhand der HPLC-Chromatogramme der wichtigsten Fraktionen wird deren Reinheitsgrad in **Abb. 3–55** veranschaulicht. Die angegebenen Ausbeuten wurden ausschließlich mit demselben Tee, einem Sumatra-Schwarztee (Broken Orange Pekoe Fannings), ermittelt. Bei der Durchführung der Methoden mit anderen Schwarztees (UL Assam, UL South India, Ostfriesische Broken-Mischung und Instanttee) zeigten sich z. T. starke Abweichungen in Bezug auf die Ausbeute. In allen Fällen lag diese höher als bei der Verwendung des Sumatratees. Eine Abhängigkeit der Faktoren Reinheit und Zeitaufwand von der jeweiligen Teesorte wurde hingegen nicht beobachtet. Hinsichtlich der Bewertung von Reinheit und Ausbeute sollte beachtet werden, dass diese Parameter miteinander verknüpft sind – eine geringere Reinheit geht oftmals mit einer höheren Ausbeute einher und umgekehrt.<sup>273</sup>

So ergibt die *Roberts'-Fraktionierung* bei hohem Zeit- und Arbeitsaufwand im Vergleich die höchsten Ausbeuten, die erhaltenen Fraktionen weisen jedoch die geringste Reinheit auf. Ein Vorteil dieses Verfahrens ist die Aufteilung der Thearubigene in drei Fraktionen und dementsprechend drei TR-Subklassen. Allerdings handelt es sich dabei lediglich um eine Anreicherung, keinesfalls um eine Isolierung von Thearubigenen. Dies trifft v. a. auf die mittels Ethylacetat erhaltene SI-Fraktion zu, welche einen großen Anteil an Monomeren und Theaflavinen enthält. Als Hauptfraktion setzt sich die SII-Fraktion neben einem deutlich erkennbaren TR-Hump (**Abb. 3–55**) vor allem aus Coffein und FOG zusammen.<sup>273</sup>



## Ergebnisse und Diskussion

**Tab. 3-22** Vergleich dreier Methoden zur Fraktionierung und Isolierung von Thearubigenen.<sup>273</sup>

Methode	Zeitaufwand	Ausbeute <sup>a</sup> bezogen auf		Reinheit
		getrocknete Teeblätter	extrahierbare Anteile <sup>b</sup>	
Roberts'-Fraktionierung	hoch (3–4 Tage, hoher Aufwand)	mittel		gering (viele non-TRs)
		„SII“: 2,30 ± 0,65 % <sup>c,e</sup>	7,42 ± 2,09 % <sup>c,e</sup>	
		total: 3,68 ± 1,04 % <sup>c,e</sup>	11,9 ± 3,36 % <sup>c,e</sup>	
Coffein-Fällung	mittel (1–2 Tage, hoher Aufwand)	gering		mittel (einige non-TRs, Coffein)
		„TR“: 0,73 ± 0,27 % <sup>d,e</sup>	2,36 ± 0,87 % <sup>d,e</sup>	
		total: 2,74 ± 0,41 % <sup>d,e</sup>	8,84 ± 1,34 % <sup>d,e</sup>	
XAD-7 + HSCCC	hoch (4–5 Tage, moderater Aufwand)	gering		hoch (wenige non-TRs)
		0,75 ± 0,08 % <sup>d</sup>	2,42 ± 0,26 % <sup>d</sup>	

<sup>a</sup> Für die Roberts'-Fraktionierung und die Coffein-Fällung werden zusätzlich zur Gesamtausbeute die Hauptfraktionen „SII“ bzw. „TR“ angegeben.

<sup>b</sup> Berechnet auf der Basis einer gemessenen Extraktionsrate von 31% festen Bestandteilen bei der Herstellung eines Teeaufgusses aus dem verwendeten Sumatra-Schwarztee.

<sup>c</sup> Mittelwert ± SD (n = 4).

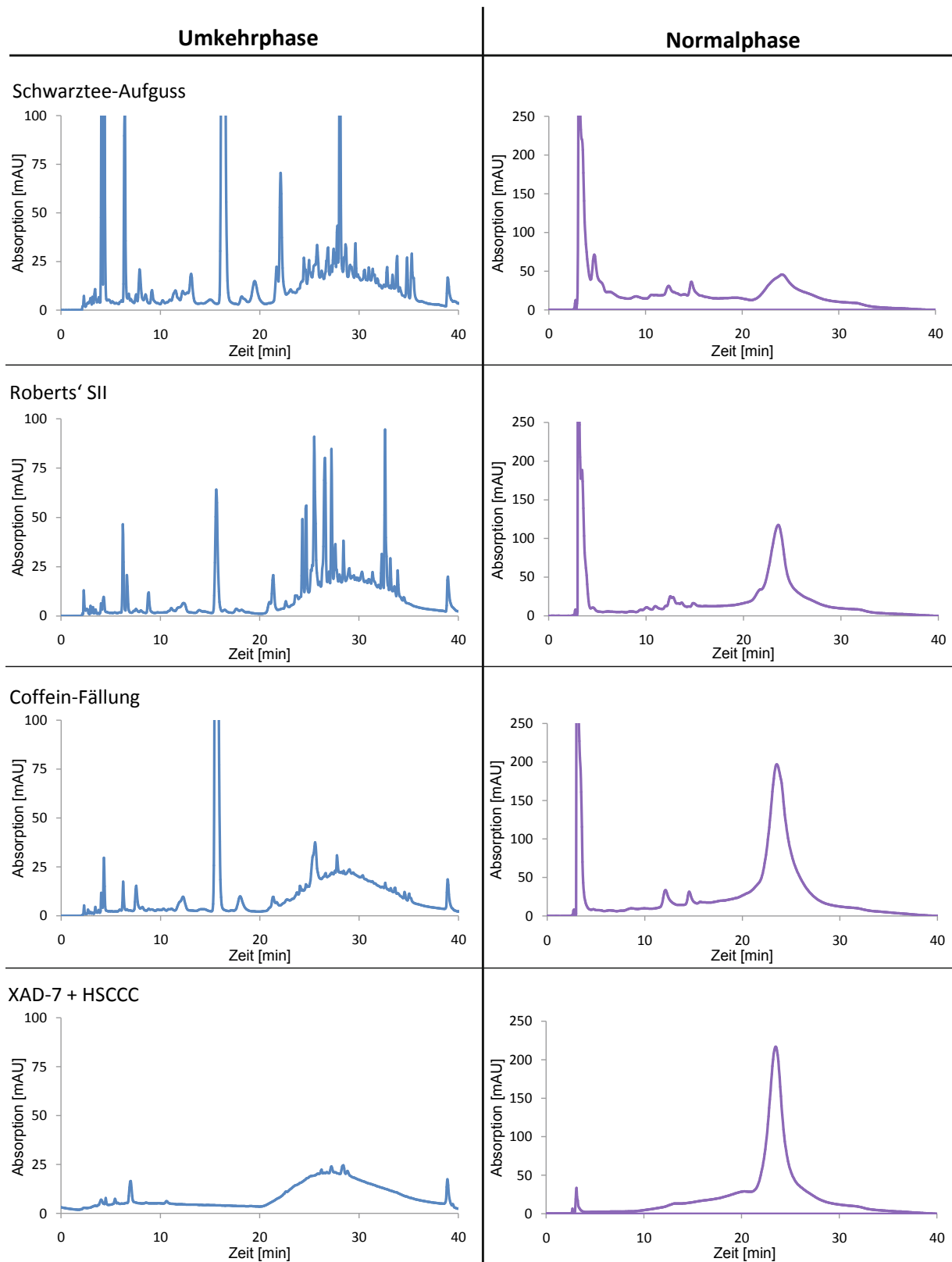
<sup>d</sup> Mittelwert ± SD (n = 3).

<sup>e</sup> Werte z. T. in Zusammenarbeit mit Janina Stark im Rahmen eines studentischen Forschungspraktikums ermittelt.

Auf dem Wege der *Coffein-Fällung* wurden zwei Fraktionen gewonnen, die in Bezug auf die enthaltenen Thearubigene Parallelen zur SI- („TF“-Fraktion) bzw. SII-Fraktion („TR“-Fraktion) der Roberts'-Fraktionierung aufweisen. Mit  $0,73 \pm 0,27\%$  fällt die Ausbeute für die ausschlaggebende „TR“-Fraktion geringer aus, die Reinheit ist jedoch deutlich höher, wie **Abb. 3–55** anhand der verringerten Anzahl und Fläche einzelner Peaks im linken RP-HPLC-Chromatogramm bzw. des größeren Polymerpeaks im rechts abgebildeten NP-HPLC-Chromatogramm verdeutlicht. Der hohe Coffeingehalt resultiert aus der Coffeinzugabe im Versuch sowie einer offenbar unvollständigen Entcoffeinierung. Für diese Methode spricht die schnelle Durchführbarkeit innerhalb von 1–2 Tagen.

Die Isolierung via HSCCC aus einem XAD-7-Extrakt ergibt in der Durchführung nach DEGENHARDT et al. (2000) nur eine TR-Fraktion, welche direkt mit und kurz nach dem Durchbruch der Lösungsmittelfront eluiert, während die meisten anderen Komponenten auf dem Coil verbleiben (**Abb. 3–56**).

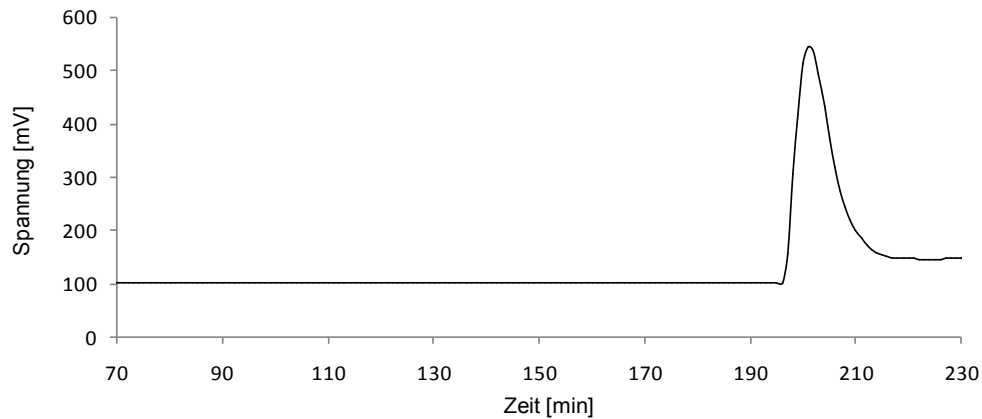
## Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 3–55** Vergleich verschiedener Extrakte aus Sumatra-Schwarztee anhand von HPLC-Chromatogrammen ( $\lambda = 278 \text{ nm}$ ), welche mittels RP-HPLC (links, blau, HPLC\_System 1) und NP-HPLC (rechts, violett, HPLC\_System 5) erhalten wurden. Von oben nach unten: Wässriger Extrakt aus Schwarzteeblättern  $\rightarrow$  SII-Fraktion der Roberts'-Fraktionierung  $\rightarrow$  „TR“-Fraktion der Coffein-Fällung  $\rightarrow$  Fraktion 1 der HSCCC-Trennung nach DEGENHARDT et al. (2000).

## Ergebnisse und Diskussion

Dabei entsprechen die isolierten TRs hauptsächlich der SII-Gruppe nach ROBERTS' Klassifizierung. Die Ausbeute ist mit  $0,75 \pm 0,08\%$  vergleichbar mit der „TR“-Fraktion der Coffeinfällung. In der Literatur ist eine Ausbeute von 1,5% angegeben.<sup>196</sup> Bei einer Wiederholung des Versuches unter Verwendung von südindischem Tee konnte mit einer Ausbeute von 1,3% ein ähnlicher Wert erzielt werden. Auffällig ist, dass eine auch im Vergleich zur Coffeinfällung deutlich verbesserte Reinheit des Extraktes erreicht wird und in den HPLC-Chromatogrammen nur geringe Verunreinigungen zu erkennen sind (**Abb. 3–55**).<sup>273</sup>



**Abb. 3–56** HSCCC-Chromatogramm ( $\lambda = 278$  nm, HSCCC\_System 1) der Trennung eines XAD-7-Extraktes von Sumatra-Schwarztee. Nach ca. 200 min erfolgt der Durchbruch der mobilen Phase und zeitgleich die Elution der TR-Fraktion (Fraktion 1). Die Trennung wird nach vollständiger Elution des Peaks gestoppt.

Der Vergleich zeigt die spezifischen Vor- und Nachteile jedes Verfahrens. Um größere Fraktionen unterschiedlicher TRs zu erhalten, bieten sich weiterhin Varianten der Roberts'-Fraktionierung an, sofern auf hohe Reinheitsgrade und eine schnelle Durchführbarkeit verzichtet werden kann. Die Coffeinfällung ist diesbezüglich effizienter und führt mit der „TR“-Fraktion in kurzer Zeit zu einem TR-Extrakt mit guter Reinheit. Allerdings fällt die Ausbeute deutlich geringer aus, was ebenfalls auf die HSCCC-Trennung des mittels XAD-7-Extraktion vorgereinigten Tees zutrifft. Diese Methode liefert jedoch die mit Abstand reinste TR-Fraktion und zeigt die beste Reproduzierbarkeit hinsichtlich der Ausbeuten. Aus diesen Gründen wurde das gegenstromverteilungschromatographische Verfahren für weitere Optimierungsarbeiten ausgewählt (Abschnitt 3.2.2).

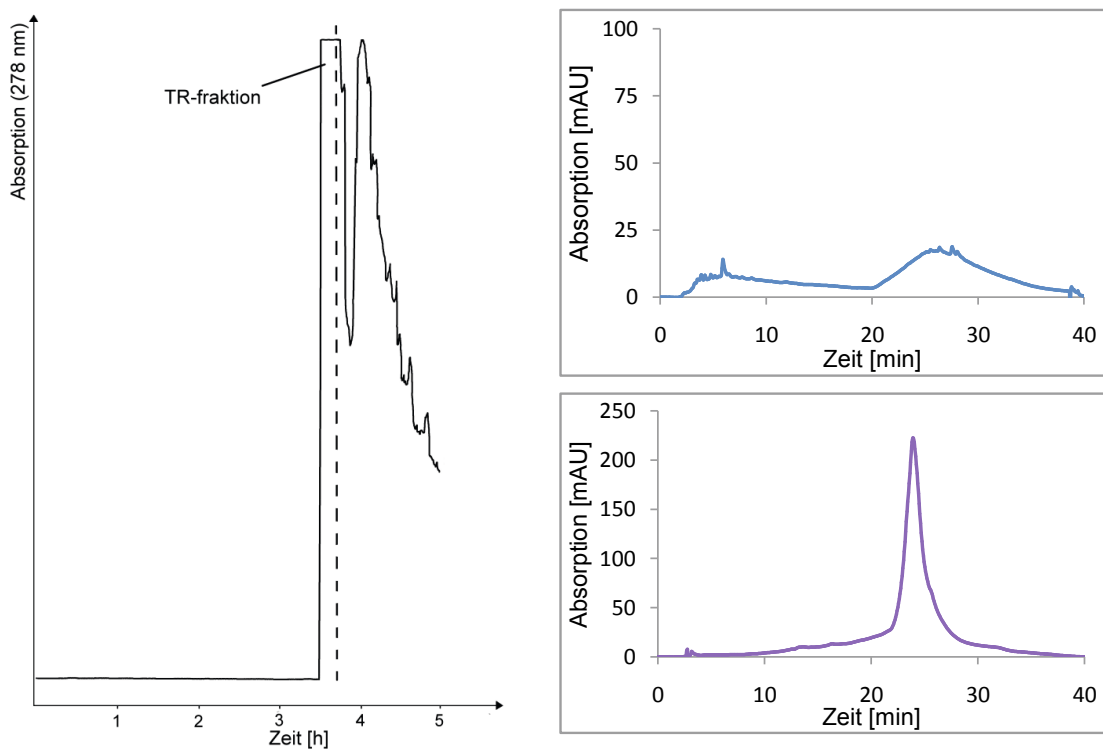
Interessanterweise wurde festgestellt, dass die TR-Fractionen mit der höchsten Reinheit in allen Fällen an einer besonders intensiven Braunfärbung erkennbar waren. Diese Beobachtung wird in Abschnitt 3.2.2.4 näher behandelt.



### 3.2.2 Weiterentwicklung der CCC-Methode

#### 3.2.2.1 Spiral-Coil CCC

Die absolute Ausbeute, welche in einem HSCCC-Lauf von der relevanten TR-Fraktion erhalten wird, ist mit durchschnittlich 108 mg aus 2 g XAD-7-Extrakt gering. Um Thearubigene im Gramm-Maßstab zu isolieren, sind zahlreiche Trennläufe mit der HSCCC erforderlich. Daher erschien es sinnvoll, zu testen, ob der Maßstab mit Hilfe der Spiral-Coil CCC vergrößert werden kann. Zu diesem Zweck wurde das HSCCC-Verfahren nach Abschnitt 3.2.1.3 auf die in Abschnitt 1.4.8 beschriebene SCCC-Anlage übertragen. Es wurden 21 g eines XAD-7-Extraktes aus Sumatra-Schwarztee zur Trennung mittels SCCC\_System 1 eingesetzt. In **Abb. 3–57** ist das erhaltene Chromatogramm dargestellt, die Fraktionseinteilung sowie die jeweiligen Auswaagen finden sich in **Tab. 3-23**.



**Abb. 3–57** links: SCCC-Chromatogramm ( $\lambda = 278$  nm, SCCC\_System 1) der Trennung eines XAD-7-Extraktes aus Sumatra-Schwarztee. Der Durchbruch der mobilen Phase erfolgt nach ca. 210 min. und führt direkt zur Elution der besonders TR-reichen Fraktion 1; rechts: HPLC-Chromatogramme ( $\lambda = 278$  nm) der SCCC-Fraktion 1 (oben: RP-HPLC mit HPLC\_System 1; unten: NP-HPLC mit HPLC\_System 5).

Wie aus dem SCCC-Chromatogramm (**Abb. 3–57** links) hervorgeht, eluiert die relevante Fraktion 1 bereits innerhalb von 4 Stunden. Die Trenndauer ist somit vergleichbar mit der HSCCC-Trennung. Allerdings weicht das Chromatogramm von dem der HSCCC-Methode ab,

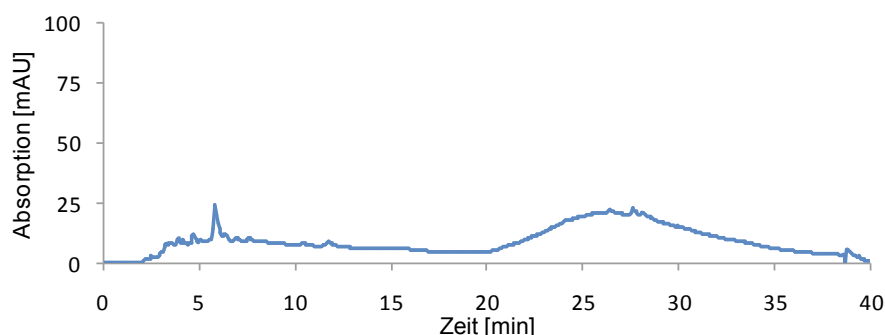
## Ergebnisse und Diskussion

da dort nur ein einzelner Peak erhalten wurde. Die Fraktionseinteilung erfolgte anhand des Chromatogramms und der Farbe der Reagenzglasfraktionen. Nach dem Durchbruch der mobilen Phase war eine tiefbraune Färbung festzustellen, welche mit zunehmender Retentionszeit an Intensität verlor.

**Tab. 3-23** Fraktionseinteilung der SCCC-Trennung eines XAD-7-Extraktes aus Sumatra-Schwarztee.

Fraktion	Reagenzgläser	Zusammensetzung ( $\lambda = 278 \text{ nm}$ )	Auswaage [mg]
1	1–4	90% TR-Hump	911
2	5–8	87% TR-Hump	700
3	9–12	77% TR-Hump	386
4	13–16	77% TR-Hump	399
5	18–19	68% TR-Hump, 5% Theobromin	121
6	20–22	64% TR-Hump, 10% Theobromin	155
7	23–29	50% TR-Hump, 20% Theobromin	253
8	30–31	35% TR-Hump, 26% Theobromin	16
Coil (Teil)	Coil	Catechine und Hump (v. a. FOG)	1514

Außerdem zeigen die HPLC-Chromatogramme der Fraktion 1 (**Abb. 3–57** rechts), dass die Reinheit derjenigen der HSCCC-Fractionen entspricht. Die Auswaage von Fraktion 1 ergab nach Gefriertrocknung 911 mg und entspricht 0,63% bezogen auf das Gewicht der eingesetzten Schwarzteeblätter. Damit liegt sie nur geringfügig unter der der HSCCC-Trennungen ( $0,75 \pm 0,08\%$ ). Wie das HPLC-Chromatogramm der Fraktion 2 (**Abb. 3–58**) verdeutlicht, weist auch diese Fraktion noch eine gute Reinheit auf. Demzufolge hätte eine etwas großzügigere Fraktionseinteilung zu einer höheren Ausbeute bei ähnlicher Reinheit geführt.<sup>273</sup>



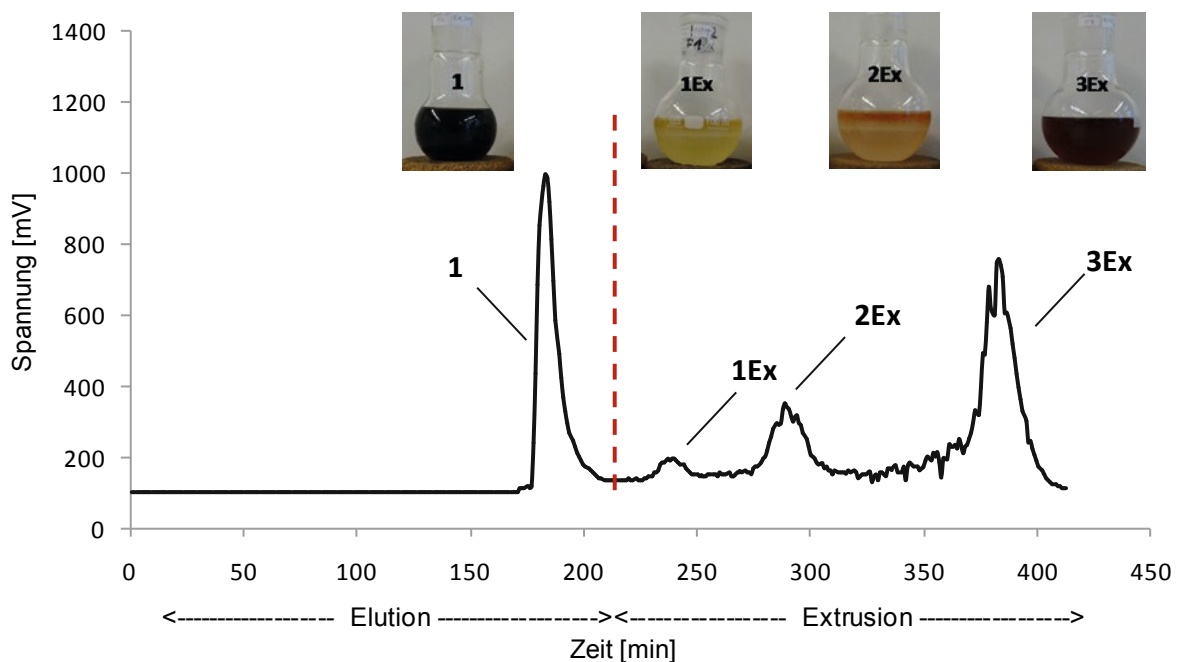
**Abb. 3–58** RP-HPLC-Chromatogramm ( $\lambda = 278 \text{ nm}$ ) der SCCC-Fraktion 2 (HPLC\_System 1).

Es konnte somit gezeigt werden, dass das Verfahren auf die SCCC übertragbar ist und aufgrund des vergrößerten Maßstabs bei vergleichbarer Trenndauer und Reinheit der Extrakte deutlich an Effizienz gewinnt.

### 3.2.2.2 Weiterentwicklung der HSCCC-Methode

Darüber hinaus sollte die Methode nach DEGENHARDT et al. (2000) auch unter Verwendung der HSCCC weiter optimiert werden.<sup>196</sup> Einen naheliegenden Ansatzpunkt stellte das Fließmittelsystem dar.

Durch die Substitution des *n*-Butanols mit *iso*-Butanol wurde eine Verbesserung in der praktischen Durchführung erreicht, da sich letzteres im Anschluss an die Trennung leichter von den Fraktionen entfernen lässt (HSCCC\_System 2). Außerdem deutet ein Vergleich der Auswaagen, die bei der Trennung eines XAD-7-Extraktes aus UL South India Schwarztee mit *n*- bzw. *iso*-Butanol erzielt wurden, darauf hin, dass mit *iso*-Butanol höhere Ausbeuten der Fraktion 1 erzielt werden können. Um diese Beobachtung sicher belegen zu können, hätte allerdings eine größere Anzahl an Wiederholungen unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt werden müssen.<sup>273</sup>



**Abb. 3–59** HSCCC-Chromatogramm ( $\lambda = 278 \text{ nm}$ , HSCCC\_System 2) der Trennung eines entcaffeinerten XAD-7-Extraktes aus UL South India Schwarztee. Die gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt, bei dem die Trennung gestoppt und die auf dem Coil verbliebene stationäre Phase fraktioniert ausgepumpt wurde. Peak 1 entspricht der HSCCC-Fraktion 1 nach Abschnitt 3.2.1.5 (vgl. **Abb. 3–56**). Peak 3Ex gehört zu einer zweiten, weniger reinen TR-Fraktion. Die Fotografien zeigen die aufgefängenen Fraktionen vor der Entfernung des Fließmittels.

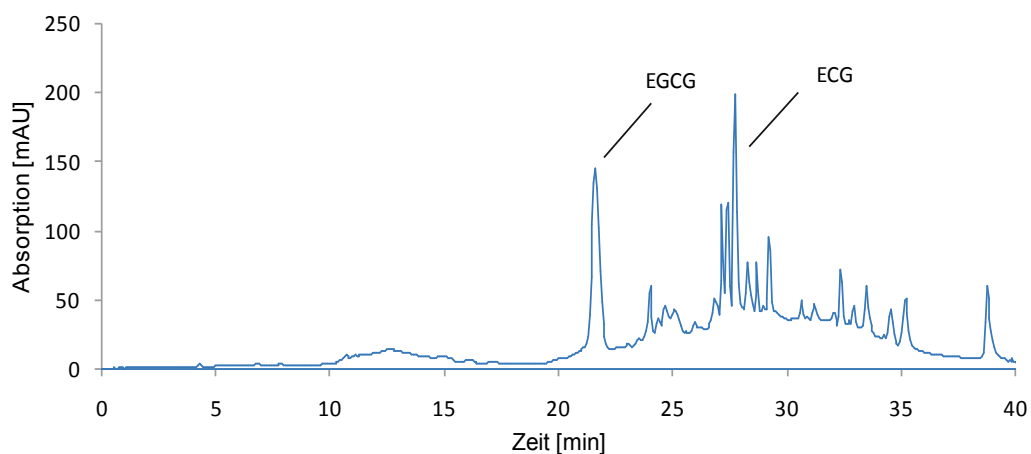
Eine Entcaffeinierung mittels Dichlormethan wurde als zusätzlicher Aufreinigungsschritt nach der XAD-7-Extraktion vorgenommen. Folglich erhöht sich die Menge an TR-Fraktion, welche bei gleicher Probeneinwaage mit einem HSCCC-Lauf erhalten wird. Entgegen einem Bericht von WEDZICHA et al. (1990) hatte die Entfernung des Coffeins keinen negativen Einfluss auf die HSCCC-Trennung.<sup>273, 275</sup>

## Ergebnisse und Diskussion

**Tab. 3-24** Fraktionseinteilung und Auswaagen einer HSCCC-Trennung (HSCCC\_System 2) von 1,10 g eines entcoffinierten XAD-7-Extraktes aus UL South India Schwarztee.

Fraktion	Reagenzgläser	Zusammensetzung ( $\lambda = 278 \text{ nm}$ , HPLC_System 1)	Farbe	Auswaage [mg]
1	7-10	70 % sauberer TR-Hump, ca. 20 % Hump im vorderen Bereich	dunkelbraun	208
1Ex	23-27	55 % Theobromin, 3 nicht identifizierte Substanzen bei 3,9; 8,5 und 21,2 min	gelblich	43
2Ex	40-44	75 % Coffein	schwachrosa	66
3Ex	73-77	9 % EGCG, 6 % ECG, Rest TRs, FOG, TFs	braun	198
Zwischenfraktionen	alle restlichen	-	gelblich	355
$\Sigma$				869

Da die prozentuale Ausbeute an TR-Fractionen gering ausfällt (z. B. maximal 1,8 % mit UL South India Schwarztee), wurde im Anschluss an den Trennvorgang eine fraktionierte Extrusion der im Coil verbliebenen stationären Phase durchgeführt (s. HSCCC\_System 2). **Abb. 3-59** zeigt das resultierende Chromatogramm eines entcoffinierten XAD-7-Extraktes des UL South India Schwarztees und die Fraktionseinteilung. Die Auswaagen sind in **Tab. 3-24** aufgeführt. Neben dem bereits beschriebenen TR-Peak 1 tritt kurz vor Abschluss des Extrusionsvorganges ein weiterer großer Peak 3Ex auf. Bei diesem Peak handelt es sich somit um die am wenigsten polare Fraktion des Tee-Extraktes, wohingegen Peak 1 die polarste Fraktion darstellt. Wie in **Abb. 3-59** illustriert, weist die Fraktion 3Ex eine braune Farbe auf. Die Analyse mittels HPLC-DAD bestätigt, dass auch in dieser Fraktion Thearubigene angereichert wurden (**Abb. 3-60**).<sup>273</sup>



**Abb. 3-60** HPLC-Chromatogramm ( $\lambda = 278 \text{ nm}$ , HPLC\_System 1) der HSCCC-Fraktion 3Ex.



## Ergebnisse und Diskussion

Demzufolge kann durch das fraktionierte Auspumpen des Coils eine zweite TR-Fraktion gewonnen werden, was zudem die auffallend geringe Ausbeute an Fraktion 1 erklärt. Offenbar eluiert darin nur ein Teil der Thearubigene, während eine größere Menge auf dem Coil verbleibt und mit der angewandten Methode keine ausreichende Aufreinigung erfährt. Im Gegensatz zu Fraktion 1 sind in Fraktion 3Ex allerdings weitere phenolische Bestandteile wie FOG, ECG und EGCG enthalten.

### Trennung im Tail-to-Head-Modus

Versuchsweise wurde die Trennung auch im Tail-to-Head-Modus durchgeführt. Hierbei sollte untersucht werden, ob es infolge der umgekehrten Elutionsreihenfolge möglich ist, alle nicht-TRs mit der mobilen Phase zu eluieren und somit in der stationären Phase eine annähernd reine TR-Fraktion (ähnlich der oben beschriebenen Fraktion 1) zu erhalten. Die Trennung von 2,54 g XAD-7-Extrakt mit HSCCC\_System 6 zeigte, dass nach Elution eines einzelnen großen Peaks tatsächlich eine solche Fraktion im Coil zurückbleibt. Allerdings fiel die Auswaage noch geringer als bei der Trennung in Head-to-Tail-Richtung aus, womit kein Vorteil gegenüber dem etablierten System erzielt wurde.

Da Thearubigene sehr polar sind, wurde das polarste Fließmittelsystem der EBUWat-Familie, Butanol/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v; HSCCC\_System 7), für einen weiteren Versuch ausgewählt, um eine bessere Verteilung der Thearubigene zu erreichen.<sup>215, 218</sup> 2,94 g eines XAD-7-Extraktes aus Sumatra-Schwarztee wurden mit Ethylacetat extrahiert und anschließend zur Trennung mittels HSCCC eingesetzt. Diese verlief ähnlich der mit HSCCC\_System 1 und brachte im Vergleich keinen Vorteil mit sich. Außerdem trat nach Durchbruch der mobilen Phase ein „Säulenbluten“, d. h. eine gleichzeitige Elution stationärer Phase, auf. Möglicherweise liegt dieser unerwünschte Effekt in der hohen Viskosität des Fließmittelsystems begründet, welche die Trennung der Phasen beeinträchtigt. Die Chromatogramme, Fraktionseinteilungen und Auswaagen der Trennungen mit HSCCC\_System 6 bzw. 7 können in Anhang 7.1 eingesehen werden.

### **3.2.2.3 Zusätzliche Trennung mittels HPCCC**

Im Folgenden wurde versucht, durch eine erneute Trennung mittels CCC eine weitere Aufreinigung oder im optimalen Fall eine Aufteilung der nach 3.2.2.2 erhaltenen TR-Fractionen in zwei oder mehrere Subfraktionen zu erreichen.

Da es sich bei den per HSCCC erhaltenen TR-Fractionen jeweils um geringe Mengen unter 0,5 g handelte, wurde für diesen Schritt die HPCCC ausgewählt, die die Möglichkeit bietet, semi-präparative Mengen in weniger als 30 min zu trennen (s. Abschnitt 1.4.7). Mit den in



## Ergebnisse und Diskussion

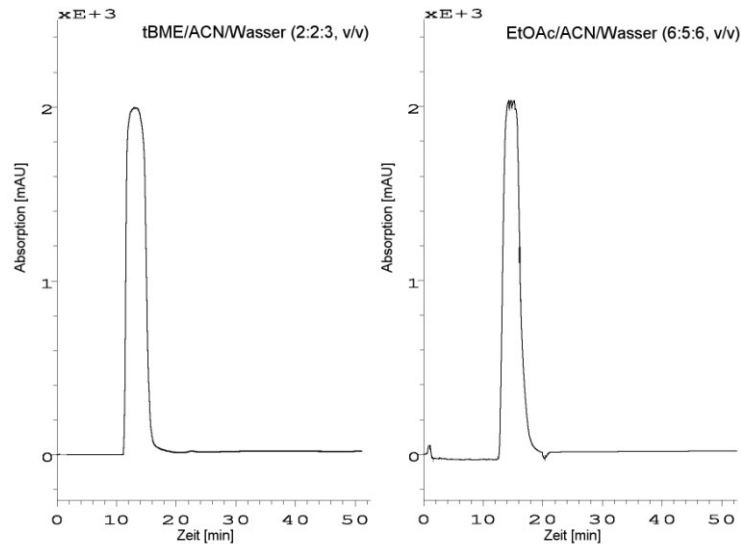
**Tab. 3-25** aufgeführten Lösungsmittelkombinationen wurde zunächst ein Screening nach geeigneten polaren Lösungsmittelsystemen durchgeführt (s. Abschnitt 5.4.1.9). Eine Phasentrennung erfolgte in den Lösungsmittelgemischen 1–6, wobei Nr. 6 drei Phasen ausbildete. Nach Zugabe weniger mg eines TR-Extraktes zeigten jedoch nur noch die Lösungsmittelkombinationen 4 und 5 eine ausreichend schnelle und saubere Phasentrennung.

**Tab. 3-25** Potentielle Lösungsmittelsysteme für die CCC-Trennung von Thearubigenen, welche in einem Screeningverfahren nach Abschnitt 5.4.1.9 getestet wurden. Die Zahlenwerte geben die jeweiligen Volumenanteile wieder.

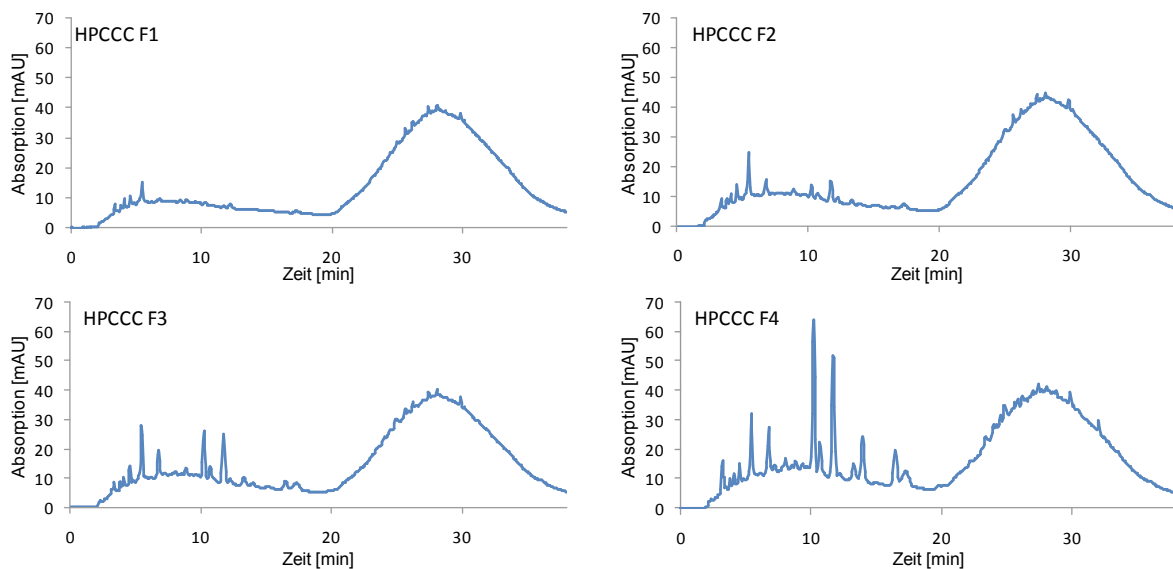
Nr.	Hexan	EtOAc	tBME	n-PrOH	i-BuOH	Aceton	MeOH	ACN	H <sub>2</sub> O
1		1			4				5
2		2	2		3				5
3			2		2				4
4			2					2	3
5		1						1	1
6	1	1						1	1
7					1	1	1		1
8					1			1	1
9					1		1		1
10					1	1			1
11					1			1	
12						1			1
13		2		3					5

Auf Basis dieser beiden Ansätze wurden Trennungen mit HPCCC\_System 1 (tBME/ACN/Wasser, 2:2:3, v/v) und HPCCC\_System 2 (EtOAc/ACN/H<sub>2</sub>O; 6:5:6; v/v) vorgenommen. Als Proben dienten die HSCCC-Fractionen 1 nach 3.2.2.2 aus UL South India bzw. UL Assam Schwarztee. Wie aus den in **Abb. 3–61** dargestellten Chromatogrammen hervorgeht, eluieren die Thearubigene bereits nach etwa 15 min in einem Peak. Somit ist eine Aufteilung in klar unterscheidbare Subfraktionen nicht erfolgt. Der Peak wurde auf mehrere Reagenzgläser verteilt aufgefangen und daraus jeweils vier Fraktionen gebildet, deren Auswaagen eine Rückgewinnungsquote der eingesetzten Proben von 75–78% ergaben. Die Fraktionen wurden mittels HPLC analysiert, wobei in den höheren Fraktionen zunehmend Verunreinigungen gefunden wurden (**Abb. 3–62**). Dabei übertrafen die HPCCC-Fractionen 1 und 2 die eingesetzten HSCCC-TR-Extrakte hinsichtlich deren Reinheit. Im direkten Vergleich wurden die besseren Ergebnisse mit dem HPCCC\_System 1 erzielt.<sup>273</sup>

## Ergebnisse und Diskussion



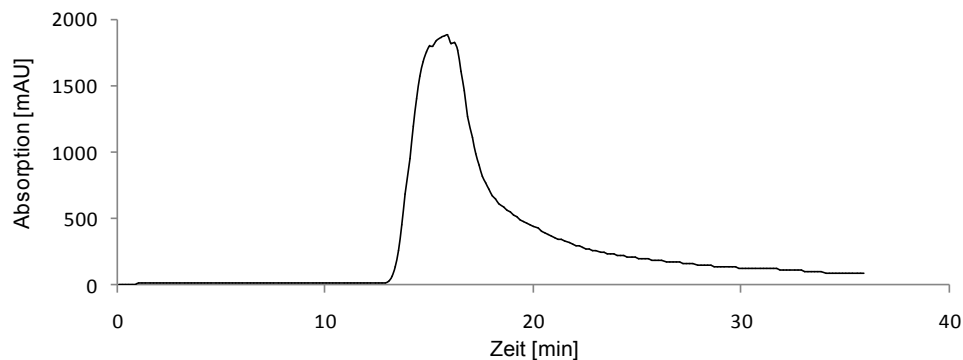
**Abb. 3–61** HPLC-Chromatogramme ( $\lambda = 278 \text{ nm}$ ) der HPLC\_Systeme 1 (links) und 2 (rechts).



**Abb. 3–62** Gegenüberstellung der HPLC-Chromatogramme ( $\lambda = 278 \text{ nm}$ , HPLC\_System 1) der mittels HPCCC\_System 1 (tBME/Acetonitril/Wasser) erhaltenen Fraktionen 1–4.

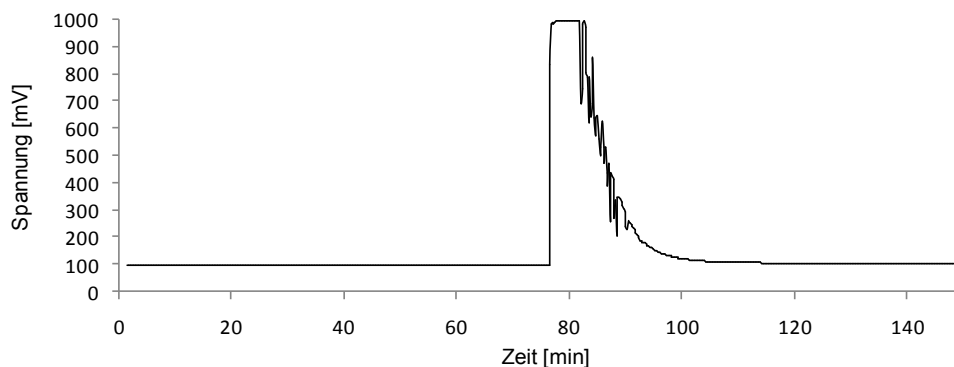
Der Einfluss einer Säurezugabe auf das Retentionsverhalten der Probe in den beiden Phasen des Lösungsmittelsystems wurde getestet. Mit dem Fließmittelsystem Ethylacetat/Acetonitril/1%ige Essigsäure<sub>(aq)</sub> (6:5:6, v/v; HPCCC\_System 3) zeigte sich kein offensichtlicher Unterschied gegenüber der Trennung mit HPCCC\_System 2. Die Substitution von Wasser mit 1%iger Essigsäure im HPCCC\_System1 führte hingegen zu einer massiven Verschlechterung der Phasentrennung, so dass von einem Testlauf abgesehen wurde. Bei Verwendung von 1%iger Ameisensäure und Zugabe von wenig Ethanol zur Verbesserung der Phasentrennung war eine Trennung jedoch möglich (HPCCC\_System 4). Dabei wurde der typische TR-Peak beobachtet, welcher allerdings ein deutliches Tailing aufwies; eine klare Auf-

trennung der Probe hat nicht stattgefunden (**Abb. 3–63**). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Einsatz von Säuren in CCC-Fließmitteln zur Thearubigen-Isolierung nicht weiterverfolgt.



**Abb. 3–63** HPLC-Chromatogramm ( $\lambda = 278 \text{ nm}$ ) der Trennung einer HSCCC-TR-Fraktion aus UL South India Schwarztee mit HPLC\_System 4 unter Verwendung von 1%iger Ameisensäure.

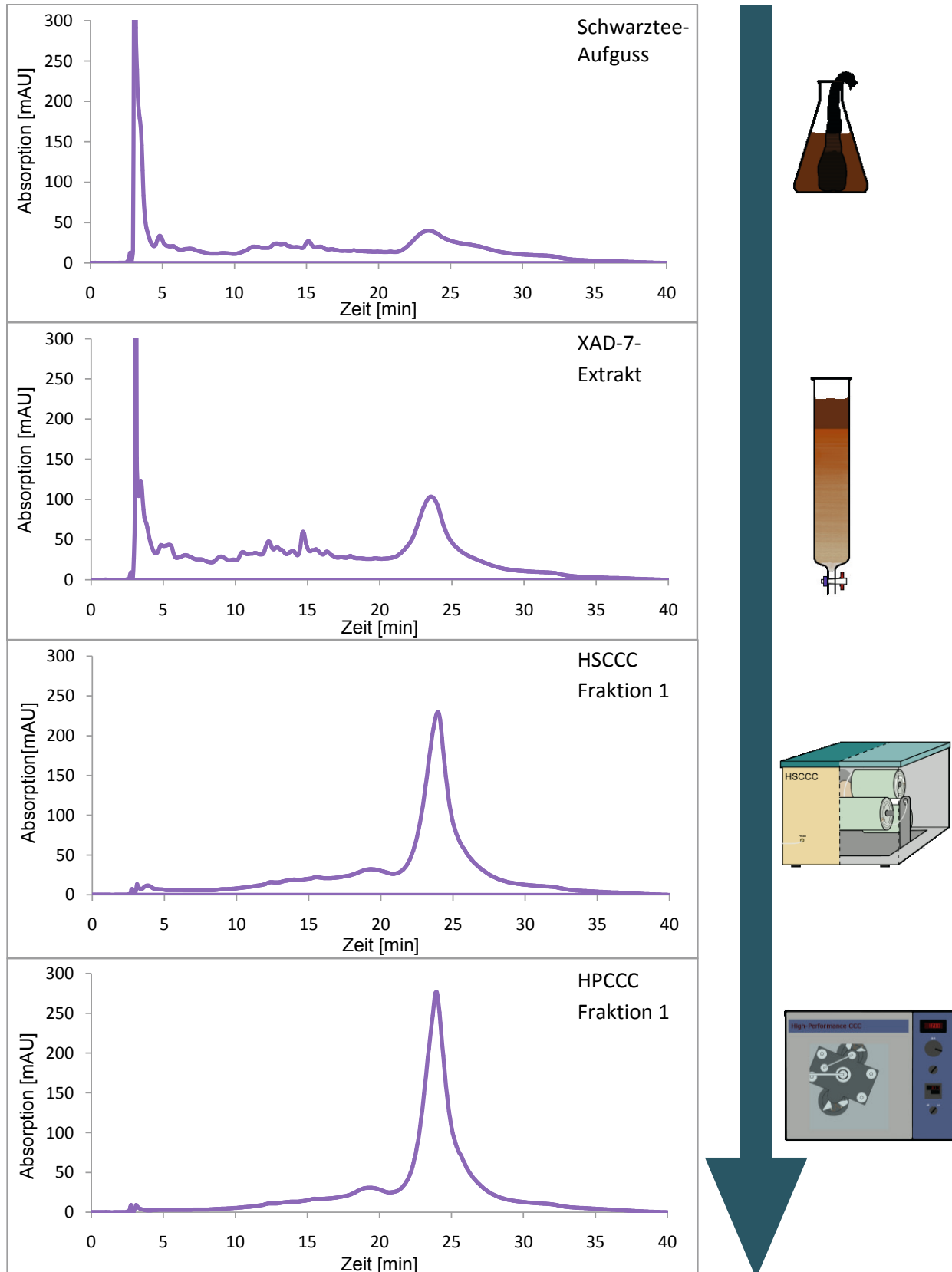
**Abb. 3–65** gibt einen Überblick über die wichtigsten Schritte der ausgearbeiteten Methode zur Isolierung einer TR-Fraktion aus Schwarztee. Anhand der HPLC-Chromatogramme ist der Reinheitsgrad ersichtlich, der vom ursprünglichen Schwarzteeaufguss (in diesem Fall aus UL South India) über den XAD-7-Extrakt und die Fraktion 1 der HSCCC-Trennung bis zur HPLC-Fraktion 1 deutlich anstieg. Im Hinblick auf eine Vergrößerung des Maßstabes wurde untersucht, ob das HPLC\_System 1 auf die HSCCC übertragbar ist untersucht. Eine Trennung mit dem daraus abgeleiteten HSCCC\_System 3 konnte die mittels HPLC erzielten Ergebnisse in Bezug auf die Probenrückgewinnung mit 91% sogar übertreffen und lieferte Fraktionen von vergleichbarer Reinheit. Die Trenndauer lag mit ca. 100 min allerdings deutlich über den mittels HPLC erreichten Zeiten (**Abb. 3–64**). Im Vergleich zu den Trennzeiten, die mit HSCCC\_System 1 und 2 nötig sind, beträgt diese jedoch nur etwa die Hälfte. Das neu entwickelte Lösungsmittelsystem käme somit auch als zeitsparende Alternative für diese Fließmittelsysteme in Frage, wurde allerdings nicht mit XAD-7-Extrakten getestet.



**Abb. 3–64** HPLC-Chromatogramm ( $\lambda = 278 \text{ nm}$ ) der mit HSCCC\_System 3 durchgeführten Trennung einer TR-reichen HSCCC-Fraktion nach 3.2.2.2 aus UL South India Schwarztee. Der Durchbruch der mobilen Phase und die Elution der TR-Fraktion erfolgen nach etwa 80 min.



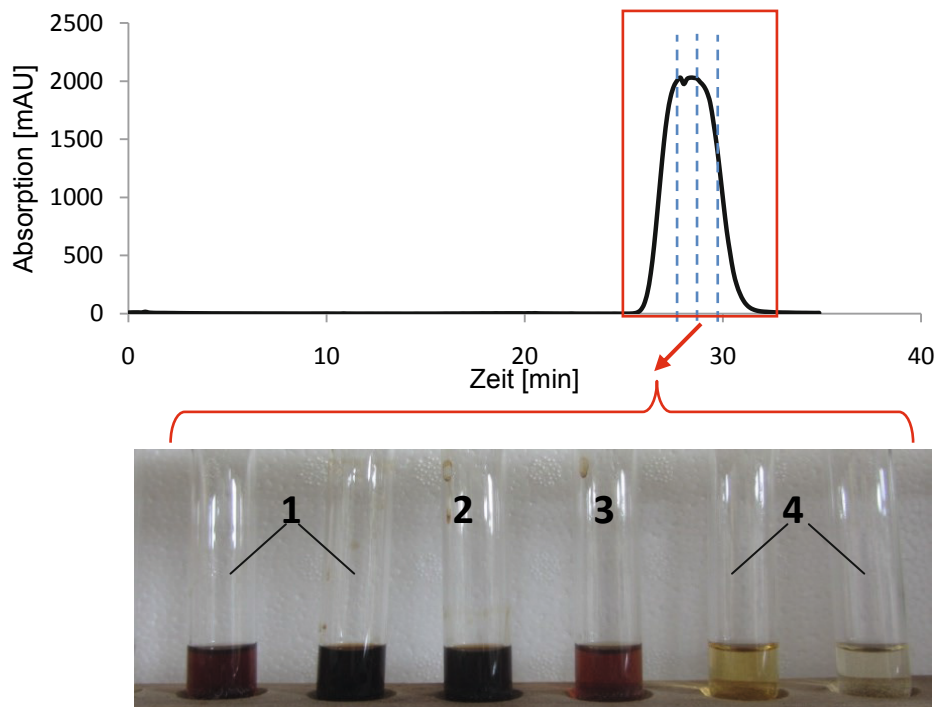
## Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 3–65** Schrittweise Aufreinigung einer Thearubigenfraktion aus schwarzem Tee mittels Säulenchromatographie, HS- und HPCCC, veranschaulicht anhand von HPLC-Chromatogrammen ( $\lambda = 278 \text{ nm}$ ,  $c = 0,5 \text{ mg/mL}$ , HPLC\_System 5, Probe: UL South India).<sup>273</sup>

### 3.2.2.4 Farbintensität

Bei den oben beschriebenen Versuchen wurde wiederholt beobachtet, dass Fraktionen mit einem hohen TR-Gehalt eine intensive Braunfärbung aufweisen (vgl. **Abb. 3–59**). Da dieser subjektive Eindruck auch die Folge von Konzentrationsunterschieden in den Extrakten sein kann, wurde eine photometrische Bestimmung der Farbintensität (*total colour*) nach einer etablierten Methode durchgeführt (s. Abschnitt 5.4.1.6).<sup>189, 201</sup>



**Abb. 3–66** HPCCC-Chromatogramm ( $\lambda = 278 \text{ nm}$ ) der Trennung eines mittels HSCCC nach Abschnitt 3.2.2.2 erhaltenen TR-Extraktes aus UL Assam Schwarztee (HPCCC\_System 1). Anhand der gestrichelten Linien ist die Einteilung des Peaks in 4 Fraktionen ersichtlich. Die Fotografie unterhalb zeigt die Verteilung des Peaks auf Reagenzgläser durch den Fraktionensammler und veranschaulicht die Farbverteilung.

Die Ergebnisse sind ausschnittsweise in **Abb. 3–67** dargestellt und bestätigen die zuvor getätigten Beobachtungen. So ist die Farbintensität der besonders reinen Fraktionen 1 der CCC-Trennungen höher als die der mittels Roberts'-Fraktionierung oder Coffein-Fällung erhaltenen Extrakte. Ferner steigen die Werte parallel zur Reinheit der Tee-Extrakte aus **Abb. 3–65** an. Diesen Effekt zeigen auch die Fraktionen eines einzelnen Peaks (**Abb. 3–66**). Somit ist die mittels CCC erhaltene Thearubigenfraktion 1 maßgeblich für die Farbe eines Schwarzteeaufgusses verantwortlich und überwiegt in dieser Eigenschaft gegenüber den Theaflavinen. Dieser Sachverhalt könnte für die industrielle Produktion von Tee-Erzeugnissen von Interesse sein, da eine intensive (dunkle) Farbgebung in vielen Ländern als wichtiges Qualitätsmerkmal

des Schwarztees betrachtet wird (z. B. Indien, Iran, Ägypten) bzw. in stärker verarbeiteten Produkten ein hoher Teegehalt suggeriert werden kann (z. B. in Eistees).<sup>2, 273</sup>

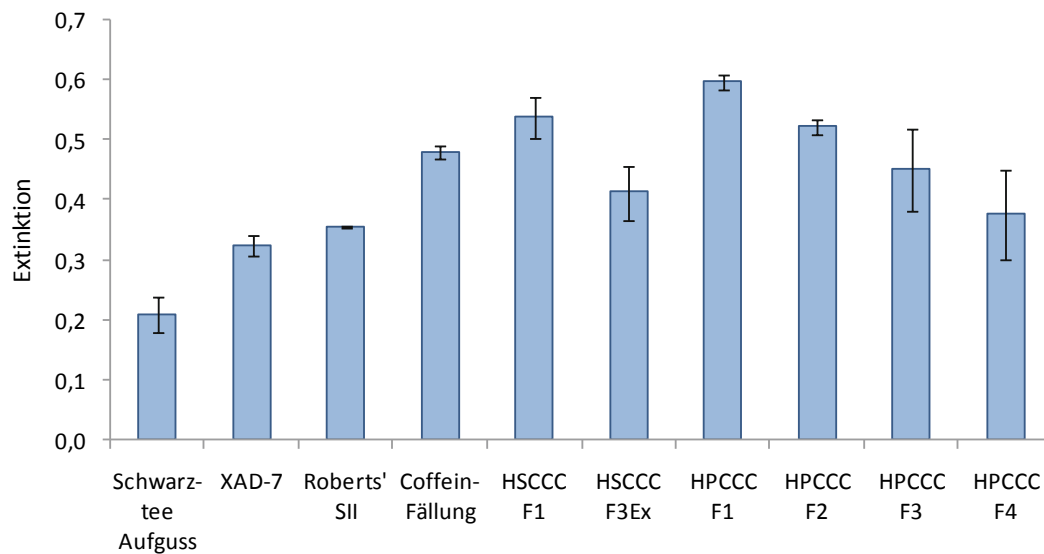


Abb. 3-67 Farbintensität ( $\lambda = 460 \text{ nm}$ ) von Schwarztee und daraus gewonnenen thearubigenreichen Extrakten.

### 3.2.3 Zusammenfassung Thearubigen-Isolierung

In einem Vergleich dreier etablierter Methoden zur Fraktionierung und Anreicherung von Thearubigenen konnte gezeigt werden, dass die klassische Roberts'-Fraktionierung zwar relativ hohe Ausbeuten liefert, dies jedoch auf Kosten der Reinheit erfolgt und mit einem hohen Aufwand einhergeht. Dagegen kann durch die Fällung mit Coffein in relativ kurzer Zeit eine stark angereicherte Thearubigen-Fraktion erhalten werden. Für die Isolierung eines sehr reinen Thearubigen-Extraktes hat sich die HSCCC als Methode der Wahl erwiesen. Diese wurde im Folgenden einer Prüfung und Weiterentwicklung unterzogen, um Handhabung, Ausbeute und Reinheit zu verbessern.

Das vorgestellte Verfahren erlaubt die Trennung eines Tee-Extraktes in zwei TR-reiche Fraktionen, von denen eine nur sehr wenige Verunreinigungen enthält. Durch eine weitere CCC-Trennung mit neu ausgearbeiteten Lösungsmittelsystemen konnte die Reinheit nochmals gesteigert werden, die erhoffte Fraktionierung in weitere Subfraktionen wurde jedoch nicht erreicht. Es wurde eine positive Korrelation zwischen der Reinheit der TR-Fraktionen und ihrer Farbintensität festgestellt. Somit enthält die isolierte TR-Fraktion insbesondere diejenigen Thearubigene, welche für die charakteristische Farbe des Schwarztees verantwortlich sind.



## *Ergebnisse und Diskussion*

Die prinzipielle Möglichkeit einer Vergrößerung des Maßstabes um das 10-Fache wurde durch die Verwendung der SCCCC anstelle der HSCCC für die erste Trennung und der HSCCC anstelle der HPCCC im zweiten Schritt aufgezeigt und experimentell demonstriert.

Gemäß Literaturangaben enthalten getrocknete Schwarzteeblätter 6–36 % Thearubigene.<sup>281-282</sup> Demgegenüber fallen die erhaltenen Ausbeuten gering aus. Neben einer unvollständigen Extraktion der Teeblätter bei der Herstellung des Aufgusses wird als Hauptgrund angenommen, dass Thearubigene aufgrund ihres uneinheitlichen Trennungsverhaltens nicht in die beschriebenen TR-Fractionen übergehen.

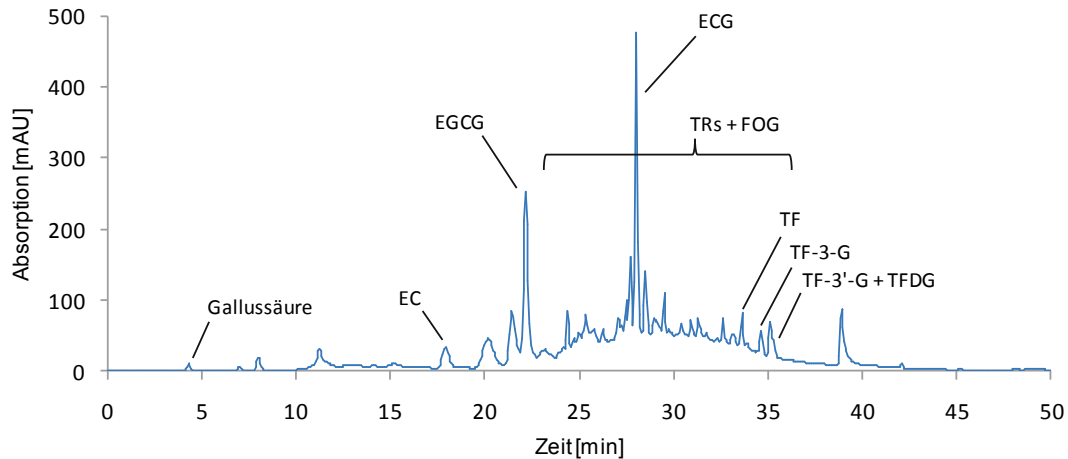
Die Einführung einer HPLC-Methode unter Verwendung einer Diol-Säule zur Analyse von Schwarztee-Extrakten hat sich in Kombination mit der etablierten HPLC-Methode nach ISO 14502-2 als sehr hilfreich für die Beurteilung der Zusammensetzung und Reinheit der Fractionen erwiesen.

### 3.3 Lagerversuche

Bei vielen Lebensmitteln ist die Haltbarkeit ein wichtiger Faktor in der Herstellung und weiteren Vermarktung. Im Falle klassischer Teeprodukte (loser Tee, Teebeutel) sowie in geringerem Maße auch von Instant-Tees ist eine vergleichsweise lange Haltbarkeitsdauer durch die Trocknung und damit einhergehende Verringerung der Wasseraktivität sichergestellt, sofern die anschließende Lagerung trocken, kühl und weitgehend luftdicht verschlossen erfolgt.<sup>262, 283-287</sup> Die Senkung des Wassergehaltes beugt dabei nicht nur mikrobiellem Wachstum vor, sondern verhindert auch viele chemische Veränderungen. Beispiele für chemische Reaktionen sind Epimerisierungen und Oxidationen, wobei Untersuchungen gezeigt haben, dass Flavonoide tendenziell umso leichter reagieren, je mehr Hydroxylgruppen sie besitzen.<sup>248, 288-289</sup> Diese Umsetzungen führen mit der Zeit zu einer veränderten Zusammensetzung in trinkfertigen Produkten wie Eistees. So wurde in Teegetränken auf Grünteebasis ein Anteil von 45 % GCG am Gesamtcatechingehalt ermittelt, der sich fast ausschließlich auf die Epimerisierung des eigentlichen Hauptflavanols EGCG während der Pasteurisation und Lagerung zurückführen ließ.<sup>290</sup> In diesem Zusammenhang stellt sich auch die Frage nach der Stabilität der Analysenlösungen im Labor. Neben Studien zum Einfluss von Verarbeitung<sup>291</sup> und Maßnahmen zur Abtötung von Mikroorganismen<sup>292-293</sup> ist in der Literatur nur eine begrenzte Anzahl an Untersuchungen bekannt, die sich mit der Langzeitstabilität von aufgebühtem Tee bzw. gelösten Tee-Extrakten befassen. Dabei liegt der Fokus fast ausschließlich auf der Stabilität von Grüntee-Catechinen, während das Verhalten von schwarzteehaltigen Lösungen bzw. Getränken bisher kaum erforscht ist.<sup>294</sup>

Aus diesem Grund wurde in einem Nebenprojekt eine kleine Versuchsreihe zum Lagerverhalten durchgeführt.<sup>241, 295</sup> Als Probenmaterial wurden vereinigte HSCCC-Fractionen aus zuvor mittels XAD-7 aufbereiteten Teeaufgüssen (Sumatra und Ostfriesentee) ausgewählt. Der Tee-Extrakt entspricht dabei der Fraktion 3Ex (s. Abschnitt 3.2.2.2 und **Abb. 3–59**) und ist mit TRs, TFs und FOG sowie Flavanolrückständen angereichert (**Abb. 3–68**). Es wurde eine Stammlösung von 2,5 g/L in 20%igem wässrigen Acetonitril angesetzt, deren Konzentration in den Probenlösungen beibehalten wurde. Durch den Zusatz des Acetonitrils wurde ein mikrobielles Wachstums verhindert, da in dieser Studie vornehmlich die chemischen Veränderungen betrachtet werden sollten. Einem mikrobiellen Verfall lässt sich in der Industrie durch Pasteurisation resp. Autoklavieren vorbeugen. Zu Vergleichszwecken wurde ein Ansatz in reinem Wasser gelöst und bei Raumtemperatur gelagert. Alle anderen Proben dienten der Untersuchung des Einflusses dreier Faktoren.

## Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 3–68** HPLC-Chromatogramm ( $\lambda = 278 \text{ nm}$ , HPLC\_System 1) des gelösten Tee-Extraktes ( $c = 2,5 \text{ g/L}$ ), welcher als Ausgangslösung für die Lagerversuche verwendet wurde.

Der erste Faktor war die *Temperatur*. Hierzu wurden die Proben im Tiefkühlschrank bei  $-18^\circ\text{C}$ , im Kühlschrank bei ca.  $4^\circ\text{C}$ , bei Raumtemperatur (ca.  $20^\circ\text{C}$ ) bzw. in einem Heizblock bei  $40^\circ\text{C}$  gelagert.

Ferner sollte der Einfluss des *pH-Wertes* betrachtet werden. Da die Probenlösung ( $c = 2,5 \text{ g/L}$ ) bereits einen pH-Wert von 2 aufwies, wurde dieser auch für den sauren pH-Bereich ausgewählt. Für die Lagerung in neutralem bzw. alkalischem Milieu wurde der pH-Wert der jeweiligen Ansätze mit 10%iger Natronlauge auf 7 bzw. 10 eingestellt und die Proben anschließend bei Raumtemperatur gelagert.

Da Getränke oft mit *stabilisierenden Zusatzstoffen* versehen werden, sollten außerdem mögliche haltbarkeitsverlängernde Effekte eines Zusatzes von Ascorbinsäure (Asc, E 300) bzw. Ethylparaben (4-Hydroxybenzoesäureethylester, EP, E 214 bzw. als Natriumsalz E 215) sowie der Lagerung unter einer Schutzgasatmosphäre aus Helium untersucht werden. Die Ascorbinsäure wurde hier mit einer Konzentration von  $0,3 \text{ g/L}$  ( $\cong 1,7 \text{ mM}$ ) zugegeben, was etwa dem Gehalt in Fruchtsäften entspricht. Ethylparaben ist ein in Getränken unüblicher und nur in wenigen Lebensmitteln zugelassener Konservierungsstoff; die gebräuchlichen und in der EU für Tee-Extrakte und aromatisierte Getränke zugelassenen Konservierungsstoffe Sorbin- und Benzoessäure (E 200–E 203 bzw. E 210–E 213) weisen jedoch HPLC-Retentionszeiten im Bereich des TR-Hügels auf.<sup>241</sup> Ähnlich wie die Ascorbinsäure wird das Ethylparaben aufgrund seiner antioxidativen, v.a. aber wegen seiner antimikrobiellen Wirkung eingesetzt. Vorbehaltlich der Matrixunterschiede erscheint es interessant zu prüfen, ob von dem Ethylparaben eine stabilisierende Wirkung auf die polyphenolischen Teebestandteile ausgeht. Der Zusatz



## Ergebnisse und Diskussion

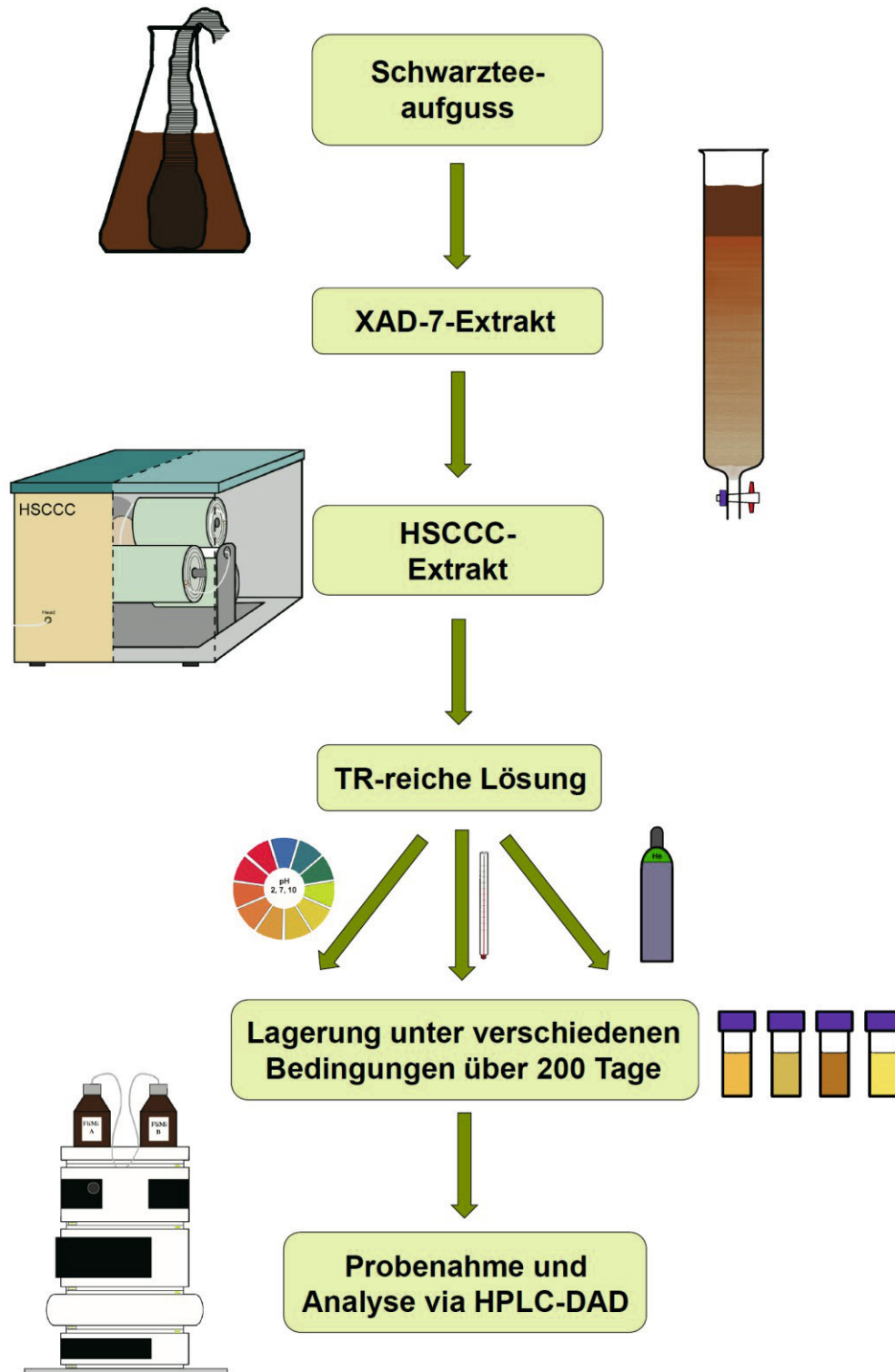
erfolgte entsprechend dem Grenzwert für Sorbin- bzw. Benzoessäure in flüssigen Teekonzentraten in einer Konzentration von 0,6 g/L ( $\cong$  3,6 mM).<sup>296</sup>

In **Abb. 3–69** findet sich ein Schema der Versuchsdurchführung. Eine Übersicht über die insgesamt 10 unterschiedlichen Ansätze gibt **Tab. 3-26**. Von jedem Ansatz wurden zwei Probenlösungen hergestellt, in HPLC-Vials überführt und fest verschlossen. Die Anzahl der Vials richtete sich nach der geplanten Zahl an Messpunkten, wobei stets Doppelbestimmungen durchgeführt wurden. Anschließend wurden die Proben über einen Gesamtzeitraum von 200 Tagen unter Lichtausschluss gelagert. Probenahmen erfolgten innerhalb der ersten 69 Tage mit abnehmender Frequenz; eine letzte Probe wurde nach 200 Tagen analysiert. Dies geschah mittels HPLC-DAD (HPLC\_System 1). Da die Messdauer einer Sequenz mit allen 20 pro Zeitpunkt entnommenen Proben bei etwa 22 Stunden lag, kann die „Wartezeit“ im Autosampler (bei 10°C) somit zu Verfälschungen geführt haben, die mit zunehmender Lagerzeit der Proben jedoch nicht mehr ins Gewicht fiel.<sup>297</sup>

**Tab. 3-26** Zusammensetzung und Lagerbedingungen der 10 Probenansätze für die Stabilitätstests mit einem angereicherten Schwarztee-Extrakt (c = 2,5 g/L).<sup>295</sup>

Ansatz	Lösungsmittel	Lagertemperatur	pH	Zusätze
Tiefgekühlt	20% Acetonitril <sub>(aq)</sub>	-18 °C	2	-
Gekühlt	20% Acetonitril <sub>(aq)</sub>	+4 °C	2	-
Erwärmt	20% Acetonitril <sub>(aq)</sub>	+40 °C	2	-
Raumtemperatur/ pH 2	20% Acetonitril <sub>(aq)</sub>	RT	2	-
pH 7	20% Acetonitril <sub>(aq)</sub>	RT	7	-
pH 10	20% Acetonitril <sub>(aq)</sub>	RT	10	-
Ascorbinsäure	20% Acetonitril <sub>(aq)</sub>	RT	2	Ascorbinsäure (c = 0,3 g/L)
Ethylparaben	20% Acetonitril <sub>(aq)</sub>	RT	2	Ethylparaben (c = 0,6 g/L)
Helium	20% Acetonitril <sub>(aq)</sub>	RT	2	Heliumatmosphäre
Vergleich	Wasser	RT	2	-

## Ergebnisse und Diskussion



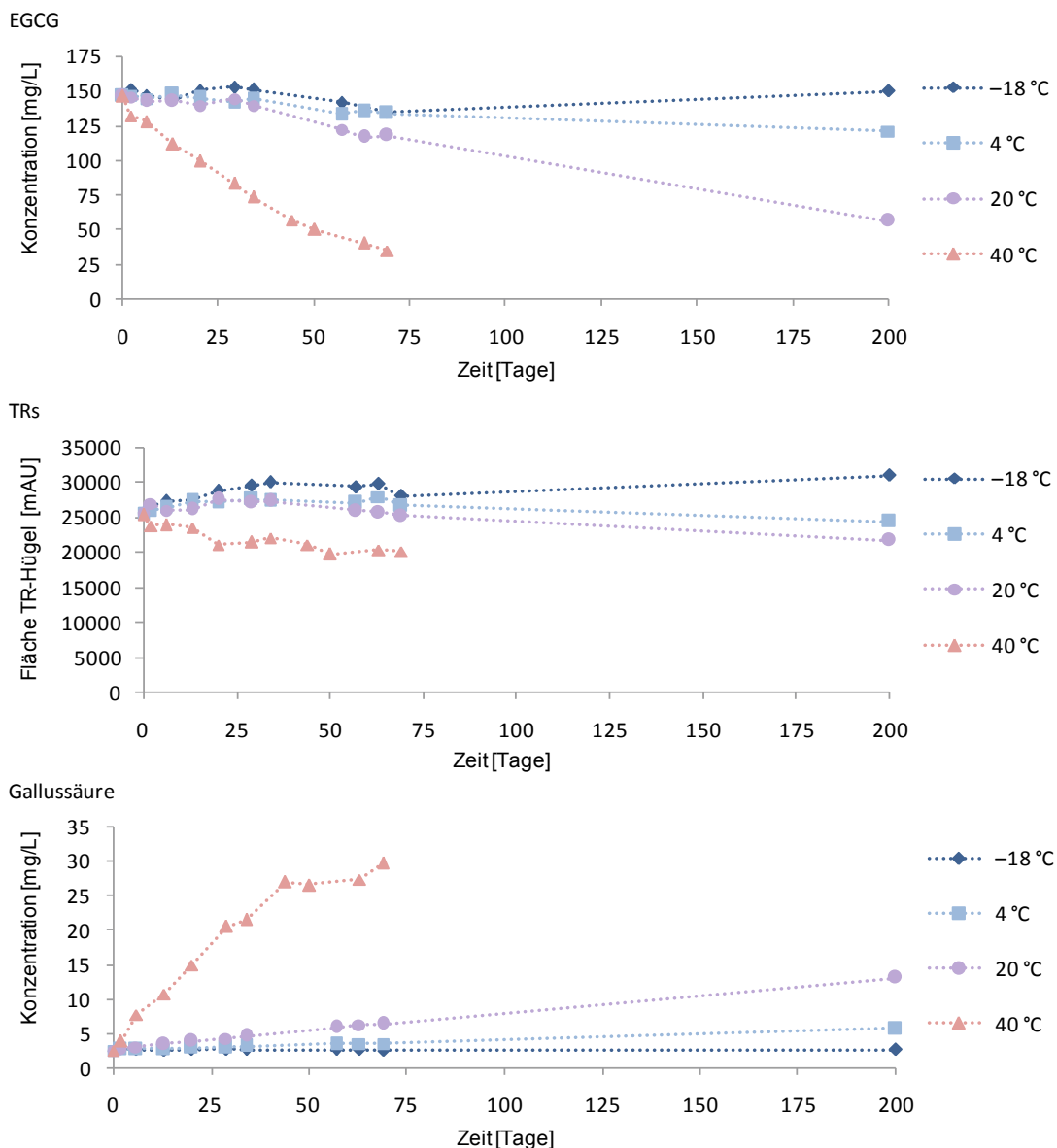
**Abb. 3–69** Schematische Darstellung des Lagerversuchs: **(1)** – Ansetzen eines Schwarzteeaufgusses mit kochendem Wasser (Konzentration: 50 g/L, 10 min Ziehzeit). **(2)** – Adsorptionschromatographie an XAD-7 zur Entfernung nicht-phenolischer Bestandteile. **(3)** – Anreicherung von TRs und anderen Inhaltsstoffen mittels HSCCC. **(4)** – Herstellung der Probenlösungen (2,5 g/L in 20% Acetonitril<sub>(aq)</sub>)\*, evtl. unter Zusatz von Additiven bzw. Säure oder Lauge. **(5)** – Lagerung der unterschiedlichen Probenansätze gemäß den gewählten Bedingungen (Temperatur, pH, Zusätze, s. **Tab. 3-26**). **(6)** – Entnahme von Proben zu verschiedenen Zeitpunkten während der ersten 69 Tage. Eine letzte Probe wird nach 200 Tagen entnommen\*\* und mittels HPLC-DAD (HPLC\_System 1) analysiert, um die Entwicklung der Gehalte von EGCG, GS und den TRs zu verfolgen. \*Zusatz von Acetonitril zur Vermeidung mikrobiellen Wachstums. \*\*Die erwärmten Proben (40 °C) wurden nur für 69 Tage gelagert.<sup>295</sup>



## Ergebnisse und Diskussion

Untersucht wurden die Konzentrationen von EGCG und Gallussäure sowie die Fläche des TR-Hügels. Die Freisetzung der Gallussäure erfolgt mutmaßlich nur zu einem geringen Teil aus EGCG und vielmehr aus den Di- und Oligomeren wie den TFs und TRs, so dass sowohl eine Verringerung der Catechin-Konzentration als auch die Bildung von Gallussäure Indikatoren für chemische Umsetzungen darstellen. Zusätzlich wird die Fläche des TR-Humps beobachtet, um Hinweise darüber zu erhalten, ob die TRs durch längere Lagerdauern nennenswerte Änderungen erfahren und ggf. in ihrem Gehalt ab- oder zunehmen. Das HPLC\_System 1 erlaubt außerdem grobe Aussagen bezüglich des TF-Gehaltes zu treffen. Diese eluieren im Bereich des TR-Humps (s. **Abb. 3–68**) und werden auf Basis der addierten Peakflächen (bei  $\lambda = 278 \text{ nm}$ ) beurteilt.

### 3.3.1 Einfluss der Temperatur



**Abb. 3–70** Einfluss der Lagertemperatur auf die Gehalte an EGCG (oben) und Gallussäure (unten) sowie die Fläche des TR-Hügels (mittig).



## Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse sind in **Abb. 3–70** dargestellt und zeigen, dass das Verhalten der drei beobachteten Komponenten gut überein stimmt. Sofern die Lagerung bei  $-18$  bzw.  $4$  °C erfolgte, konnten innerhalb der ersten 69 Tage jeweils lediglich geringe Gehaltsunterschiede nachgewiesen werden, mit einem leichten Vorteil bei der Tiefkühlagerung. Diese Resultate stimmen mit den Angaben in der Literatur überein.<sup>254, 298</sup> Bei Raumtemperatur kam es in dieser Zeit zu einem leichten Abfall des EGCG-Gehaltes sowie der TR-Fläche bzw. zu einem leichten Anstieg der Gallussäure-Konzentration, was auf langsam ablaufende Umsetzungsreaktionen schließen lässt. Diese Trends setzten sich bis zum 200. Tag fort: Bei  $-18$  °C erfolgten keine signifikanten Abbaureaktionen, wohingegen bei Lagerung im Kühlschrank leichte Veränderungen beobachtet wurden. Die bei Raumtemperatur aufbewahrten Proben wiesen zu diesem Zeitpunkt klare Gehaltsänderungen auf.<sup>295</sup>

Bei allen Bestandteilen sticht der Effekt einer Lagerung bei  $40$  °C hervor. Unverzüglich nach Versuchsbeginn treten Reaktionen auf, welche einen Abbau des EGCG, eine Freisetzung von Gallussäure und eine Verringerung der Fläche des TR-Humps bewirken. Werden die Gehalte bei  $-18$  °C als Referenzwerte angesehen, so bedingt eine Temperatur von  $40$  °C Konzentrationsänderungen, die um ein Vielfaches über denen liegen, die bei Raumtemperatur beobachtet wurden.<sup>295</sup> Der Abbau des EGCG kann nur z.T. auf eine Epimerisierung zurückgeführt werden, da gemäß Literatur bis etwa  $40$  °C anderweitige Abbaureaktionen dominieren, bei denen es auch zur Bildung von Theasinensinen kommen kann.<sup>105, 254, 299</sup>

Die HPLC-Chromatogramme zeigen, dass die in der Stammlösung noch deutlich erkennbaren Theaflavin-Peaks (**Abb. 3–68**) schon nach einer 20-tägigen Lagerung bei  $40$  °C nicht mehr nachweisbar waren. Bei Raumtemperatur war dies erst am 200. Tag der Fall, bereits nach 69 Tagen konnten jedoch nur noch Bruchteile der ursprünglichen Peakflächen detektiert werden. Die Theaflavin-Signale der im Kühlschrank gelagerten Proben waren nach 200 Tagen zwar reduziert, aber noch deutlich zu erkennen, während bei den tiefgekühlten Proben kein merklicher Abbau erfolgt war. Somit muss es in einem Teil der Proben zu einer Umsetzung dieser charakteristischen Schwarzteekomponenten gekommen sein, wobei deren Empfindlichkeit gegenüber Wärme größer zu sein scheint als die des EGCG. Von einer Instabilität der TFs gegenüber Wärmeeinwirkung haben bereits Su et al. (2003) berichtet.<sup>300</sup>

Die Entwicklungen der Gehalte an EGCG, Gallussäure und den TRs sind damit sowohl innerhalb der durchgeführten Versuche als auch im Vergleich mit Daten aus der Literatur konsistent. Für Teeinhaltsstoffe wie Catechine und Theaflavine wurde bei längerer Lagerzeit und in Abhängigkeit von der Temperatur ein Abbau bestätigt. Ferner lassen die Ergebnisse den



## Ergebnisse und Diskussion

Schluss zu, dass auch die Thearubigene durch Aufbewahrung bei einer Temperatur von 40 °C, welche in tropischen Ländern oder bei Lagerung an einem sonnigen Standort nicht ungewöhnlich ist, negativ beeinflusst werden. Der messbare Effekt fällt bei den TRs zwar geringer aus, unterliegt allerdings den Beschränkungen der Methode. Folglich könnten einer vergleichsweise geringen Änderung der Fläche auch umfassende strukturelle Umwandlungen vorausgegangen sein. Bemerkenswert ist, dass es tatsächlich zu einem Abfall der Fläche kommt und somit die Umsetzung anderer Komponenten wie der Flavanole offenbar nicht oder nur zu einem geringen Teil zur Bildung TR-artiger Substanzen führt.

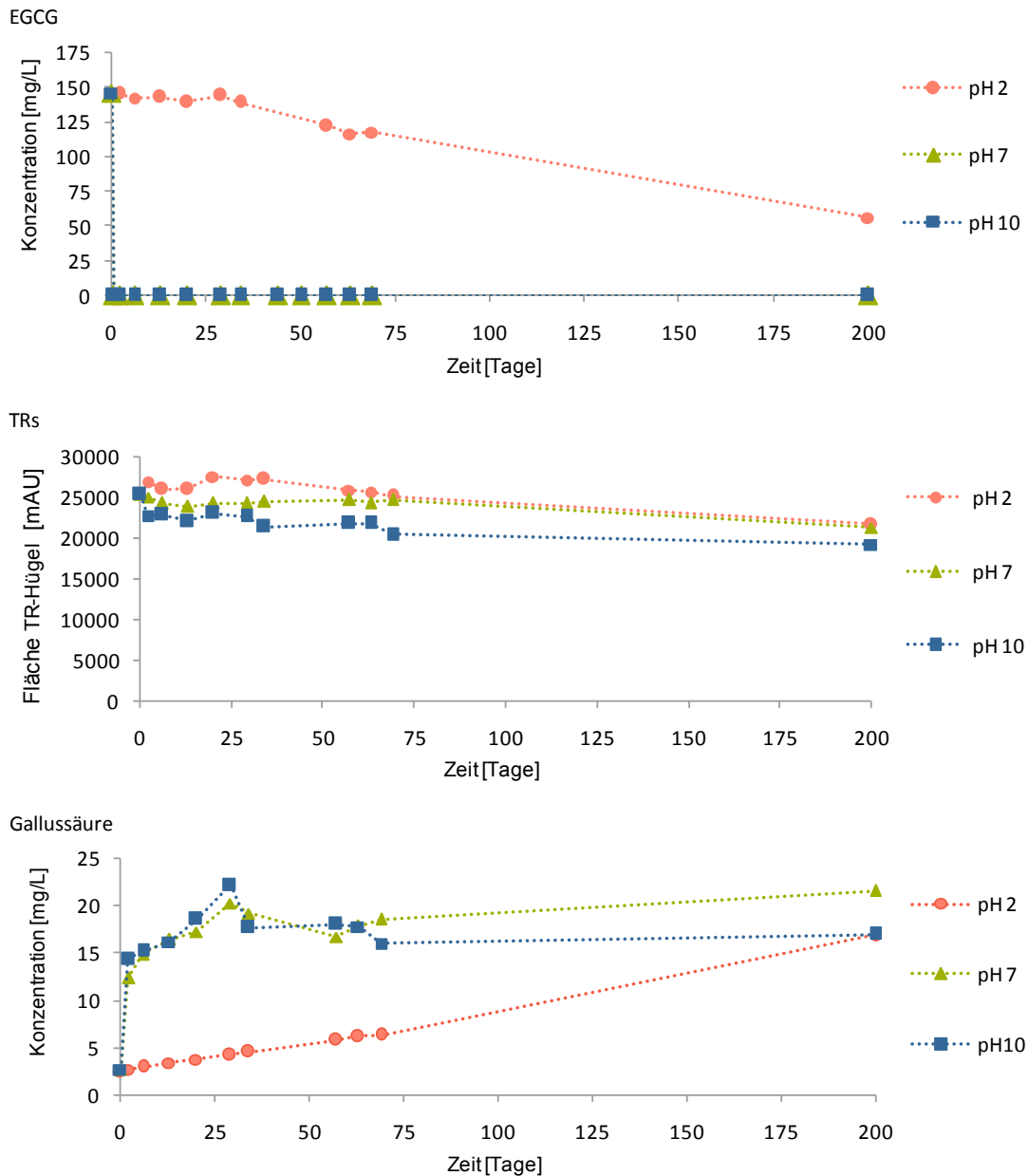
Auf der anderen Seite geht aus den Ergebnissen hervor, dass unter den gegebenen Bedingungen (20% Acetonitril, keine weiteren Matrixbestandteile) eine mindestens halbjährige Lagerung und ohne nennenswerte Qualitätseinbußen der polyphenolischen Bestandteile möglich ist, sofern eine konsequente Kühlung erfolgt.

### 3.3.2 Einfluss des pH-Wertes

Das Verhalten bei einer Lagerung in saurer, neutraler und alkalischer Umgebung bei Raumtemperatur lässt ebenfalls klare Schlüsse zu (**Abb. 3–71**). So äußerte sich eine auch in der Literatur (z. B. CHEN et al., 2001; NEILSON et al., 2007)<sup>256, 290</sup> bekannte Instabilität des EGCG in neutralem und basischem Milieu darin, dass bereits bei der ersten Messung wenige Stunden nach Einstellung des pH-Wertes kein EGCG mehr nachweisbar war. ZHU et al. (1997) berichteten von einem vollständigen Abbau einer Mischung von Grüntee-Catechinen bei pH-Werten größer 8 innerhalb weniger Minuten und bei pH 7,4 innerhalb von 3 Stunden.<sup>301</sup> Ein neutraler pH-Wert führt gemäß WANG & HELLIWELL (2000) zu einer schnelleren Epimerisierung von EGCG, zudem kommt es laut HATANO et al. (2004) zur Bildung monomerer und dimerer Oxidationsprodukte, u. a. Theasinensin A.<sup>105, 302</sup> Durch eine Lagerung bei pH 2 konnte hingegen eine Stabilisierung des EGCG-Gehaltes innerhalb der ersten ca. 30 Tage erreicht werden. Danach nimmt die Konzentration linear ab und es ergibt sich nach 200 Tagen ein Gehalt von etwa 35 % des Ursprungswertes.<sup>241</sup>

Die Gallussäure-Konzentration steigt bei pH 7 und 10 direkt nach Versuchsbeginn sprunghaft an und nimmt im Anschluss weiter zu. Bei pH 2 zeigte sich hingegen ein moderater, fast linearer Konzentrationsanstieg über den gesamten Versuchszeitraum. Bezüglich der Thearubigene ist nur bei pH 10 ein leichter Abfall der Fläche zu verzeichnen, während sich diese im sauren und neutralen Umfeld nahezu konstant verhält.<sup>241</sup>

## Ergebnisse und Diskussion



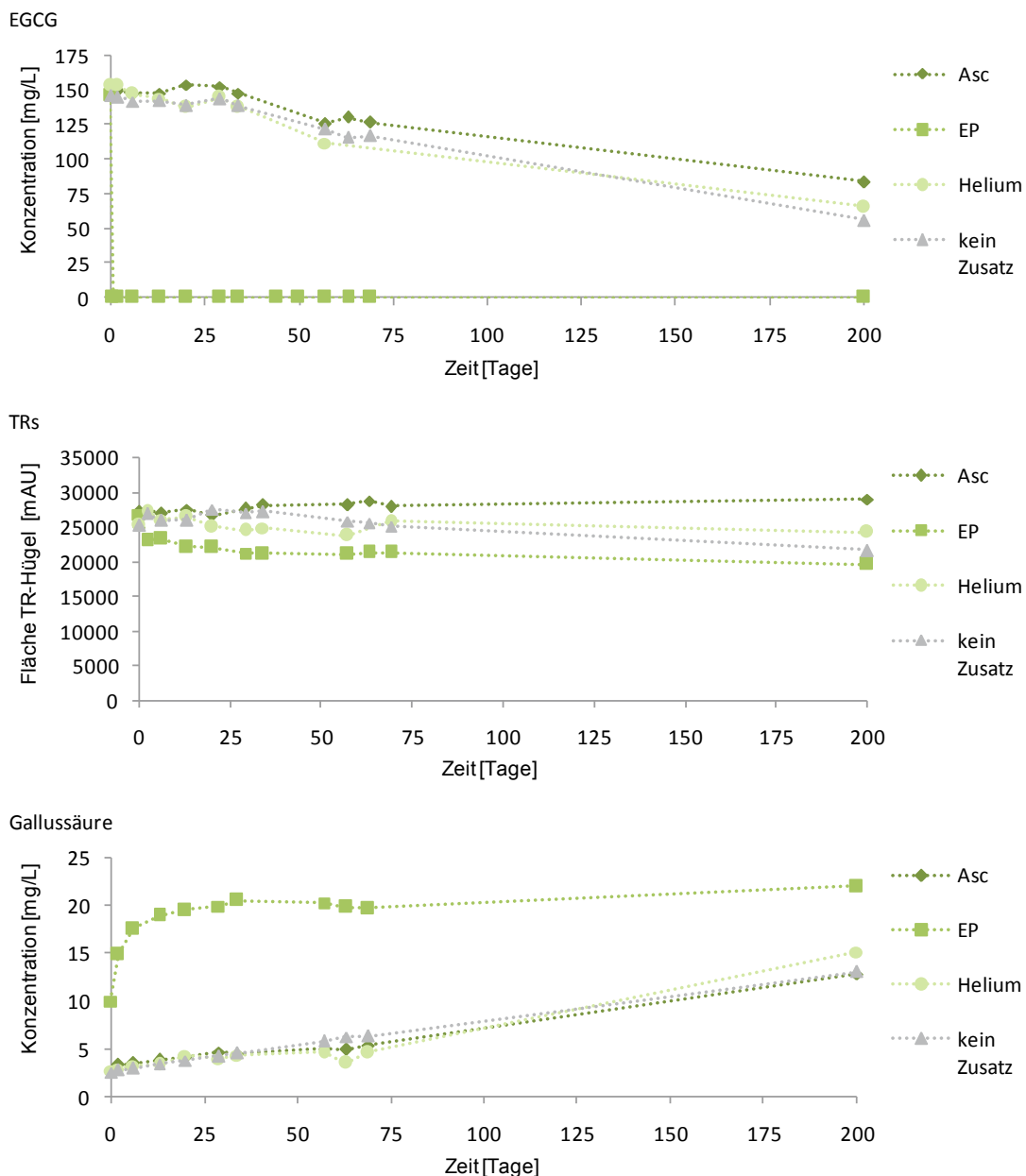
**Abb. 3–71** Einfluss des pH-Wertes auf den Gehalt an EGCG (oben) und Gallussäure (unten) sowie die Fläche des TR-Hügels (mittig).

Demgegenüber wurden die Theaflavin-Peaks bei pH 10 innerhalb von wenigen Stunden vollständig abgebaut. Bei pH 7 wurden ebenfalls abnehmende Peakflächen festgestellt, bis diese bei der Messung am 13. Tag nicht mehr nachweisbar waren. Im sauren Milieu verhielten sich die TF-Peaks länger stabil, waren jedoch nach 69 Tagen kaum noch und am 200. Tag gar nicht mehr zu detektieren. Diese Erkenntnisse stimmen mit den Ergebnissen einer Studie von JHOO et al. (2005) überein, in der die Stabilität von TFs bei pH 5,5; 7,4 und 8,5 untersucht wurde.<sup>142</sup> Dabei wurde bei pH 5,5 innerhalb von 24 Stunden keine Umsetzung festgestellt, wohingegen bei pH 7,4 über 60% und bei pH 8,5 mehr als 80% der eingesetzten Theaflavine einem Abbau unterlagen, u. a. zu Theanaphthochinon.

## Ergebnisse und Diskussion

Um negative Begleiterscheinungen bei der Lagerung schwarz- und grünteehaltiger Lösungen bzw. Getränke zu vermeiden, sollten diese in jedem Fall einen sauren pH-Wert aufweisen. Laut Literatur<sup>290, 301</sup> bieten sich pH-Werte kleiner 4 an. Der in den Versuchen gewählte pH-Wert von 2 erlaubte eine Stabilisierung des EGCG bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von etwa 30 Tagen, bevor dessen Konzentration zu sinken begann. Die Freisetzung von Gallussäure erfolgte dagegen von Beginn an mit linearer Geschwindigkeit.

### 3.3.3 Einfluss von Additiven (Ascorbinsäure, Ethylparaben, Helium)



**Abb. 3-72** Einfluss verschiedener Zusätze auf den Gehalt an EGCG (oben) und Gallussäure (unten) sowie die Fläche des TR-Hügels (mittig).



## Ergebnisse und Diskussion

**Abb. 3–72** gibt die Konzentrationen von EGCG und Gallussäure sowie die Fläche des TR-Hügels im Verlauf der Stabilitätstests nach Zugabe von Ascorbinsäure, Ethylparaben und Helium neben einer Referenzprobe ohne Zusätze (pH 2/RT) wieder.

Die Zweckmäßigkeit einer Beigabe des als Antioxidationsmittel zugelassenen Zusatzstoffes Ascorbinsäure ist in der Literatur umstritten. ZHU et al. (2003) und SANG et al. (2005) berichteten von einer protektiven Wirkung gegenüber oxidativen Abbaureaktionen an Catechinen.<sup>254, 303</sup> ZIMMERMANN & GLEICHENHAGEN (2011) kamen hingegen in ihren Untersuchungen zu dem Schluss, dass die stabilisierenden Eigenschaften lediglich auf die Absenkung des pH-Wertes zurückzuführen seien, während SU et al. (2003) gar einen intensivierten Catechin-Abbau beobachteten.<sup>300, 304</sup> Eine Studie, in der Teepulver mit Ascorbinsäure versetzt wurde, zeigte sowohl einen positiven als auch einen negativen Effekt in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit.<sup>287</sup>

Die in dieser Arbeit erhaltenen Resultate bei einer Ascorbinsäure-Zugabe (**Abb. 3–72**) zeigen einen schwach stabilisierenden Effekt auf das EGCG und die TRs.<sup>295</sup> Die Gallussäure-Konzentration entwickelte sich jedoch praktisch identisch zur Vergleichsprobe. Demnach könnte die Ascorbinsäure in geringem Maße dazu beitragen, diejenigen Oxidationsreaktionen zu unterbinden, die ohne eine Abspaltung der Galloylfunktion aus den polyphenolischen Verbindungen verlaufen.

Der Zusatz von Ethylparaben führte zu einem schnellen und vollständigen Abbau von EGCG; die TR-Fläche nahm ebenfalls merklich ab. Gleichzeitig stieg die Gallussäure-Konzentration schnell an, was auf eine Freisetzung aus den Polyphenolen oder eine Bildung aus dem chemisch verwandten Ethylparaben nach Oxidation und Esterhydrolyse schließen lässt. Auch die Theaflavine waren nach wenigen Stunden nicht mehr nachweisbar.<sup>241</sup>

Laut Literatur wirken sich hohe Sauerstoff-Konzentrationen negativ auf die Stabilität von Tee und Teegetränken aus.<sup>254, 262</sup> Die Lagerung der Teelösung unter einer Helium-Atmosphäre offenbarte jedoch keine protektiven Einflüsse auf das EGCG und die TRs (**Abb. 3–72**).<sup>295</sup> Möglicherweise hätte die Lösung vorab zusätzlich mit Helium gespült werden sollen, um gelösten Sauerstoff auszutreiben und so eine verbesserte Schutzwirkung zu erreichen.

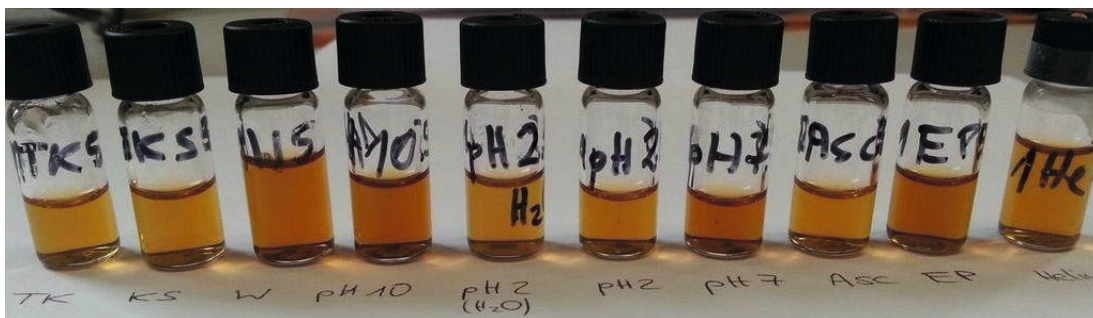
Abschließend erscheint gemäß den erhaltenen Ergebnissen nur ein Zusatz von Ascorbinsäure als tendenziell sinnvoll. Die widersprüchlichen Angaben zur Wirkung der Ascorbinsäure in der Literatur sowie das beobachtete Verhalten der Schwarzteelösung nach Zugabe von Ethylparaben lassen allerdings darauf schließen, dass die vornehmlich wegen ihrer antioxidativen Eigenschaften eingesetzten Substanzen in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der

Teelösung auch prooxidativ wirken können. Daher sollte die Verwendung von Ascorbinsäure hinsichtlich ihrer Eignung in der jeweiligen Matrix geprüft werden. Die Lagerung unter einer Schutzgasatmosphäre führte zu keiner Verbesserung der Haltbarkeit.

### 3.3.4 Weitere Beobachtungen

Wie oben beschrieben, wurde zu Vergleichszwecken ein Doppelansatz nur in Wasser gelöst. Die Lagerung erfolgte bei pH 2 und Raumtemperatur ohne Zusätze. Damit unterscheiden sich die Vergleichsproben von dem Ansatz *Raumtemperatur/pH 2* (s. **Tab. 3-26**) lediglich hinsichtlich der Abwesenheit des Acetonitrils. Die beobachtete Stabilität der Inhaltsstoffe war während des ersten Monats vergleichbar (jeweils kaum Konzentrationszu- bzw. abnahmen), im zweiten Monat wurden bei beiden Ansätzen sinkende EGCG- und TR-Gehalte registriert, die bei den ausschließlich in Wasser gelösten Proben stärker ausfielen. Die Freisetzung von Gallussäure erfolgte bei beiden Ansätzen in praktisch identischem Umfang. Allerdings wurde nach 40 Tagen eine Trübung der Vergleichsproben festgestellt, welcher mutmaßlich ein mikrobielles Wachstum zugrundelag. Infolge dieser sich verstärkenden Trübung wurden die Proben bis zum 69. Tag nur noch nach erneuter Mikrofiltration zur Messung eingesetzt, während auf eine weitergehende Lagerung bis zum 200. Tag verzichtet wurde.

Die Gegenüberstellung des Raumtemperatur/pH 2-Ansatzes mit den Vergleichsproben in Wasser bekräftigt somit die Annahme, dass der Zusatz von Acetonitril keine relevanten, unerwünschten chemischen Veränderungen zur Folge hat. Darüber hinaus bestätigen die nach einem Monat auftretenden Trübungen und verstärkt einsetzenden Abbaureaktionen der Vergleichsproben, dass ein Schutz gegen mikrobielles Wachstum notwendig und durch die Beigabe des Acetonitrils gewährleistet ist.



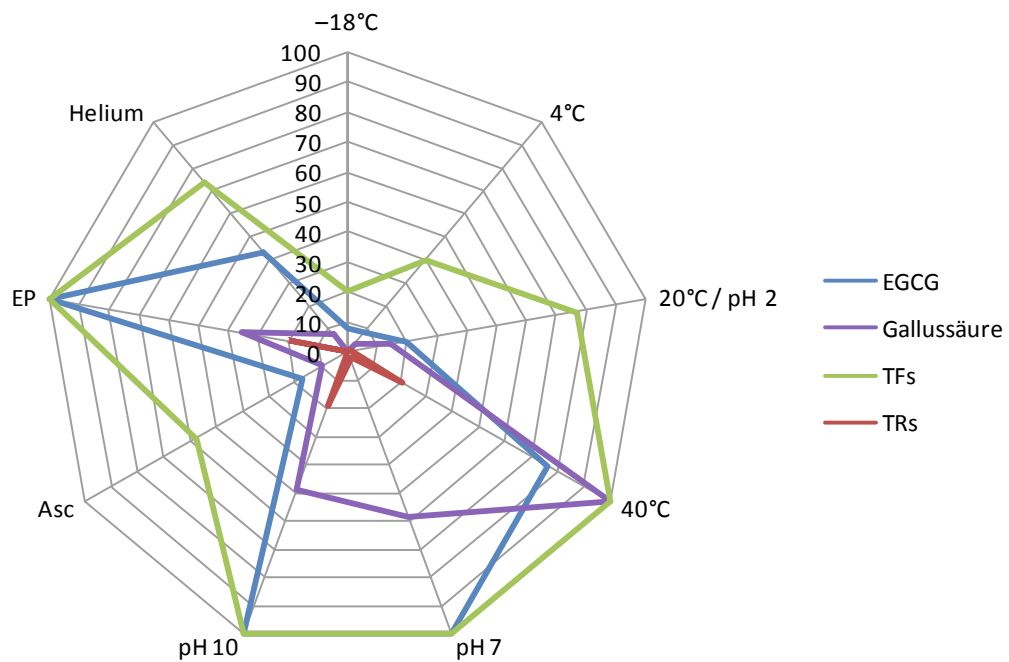
**Abb. 3-73** Farben der Probenlösungen nach 20-tägiger Lagerung bei folgenden Bedingungen (v.l.n.r.):  $-18^{\circ}\text{C}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $40^{\circ}\text{C}$ , pH 10, pH 2 (Vergleichsprobe), pH 2/ $20^{\circ}\text{C}$ , pH 7, Zusatz von Asc, Zusatz von EP, unter Heliumatmosphäre (Fotografie: Steffi Niemann, 2013).

Neben der Trübung in den Vergleichslösungen waren auch bei den anderen Ansätzen optische Unterschiede festzustellen. Die Lösungen blieben zwar klar, die bei  $40^{\circ}\text{C}$  sowie die bei

## Ergebnisse und Diskussion

pH 7 bzw. pH 10 und die unter Zusatz von Ethylparaben gelagerten Proben zeigten aber eine zunehmend dunkle Färbung (**Abb. 3–73**).<sup>241</sup> Somit waren genau diejenigen Lösungen verfärbt, die gemäß HPLC-Analyse besonders stark von Abbaureaktionen betroffen waren. Diese Beobachtung deckt sich mit Berichten aus der Literatur, nach denen in Stabilitätstests Braunfärbungen durch Oxidation der Catechine<sup>301</sup>, durch Erhitzen<sup>305</sup> oder durch Abbau von TFs in alkalischer Lösung<sup>142</sup> auftraten.

Eine graphische Zusammenfassung der Ergebnisse ist in **Abb. 3–74** zu sehen. Darin sind die prozentualen Abweichungen der untersuchten Inhaltsstoffe von ihrem Ausgangswert (dieser entspricht 0%) nach 69 Tagen dargestellt. Im Falle des zunehmenden Gehaltes der Gallussäure wurde die höchste Zunahme als 100% definiert. Die Prozentangaben basieren bei EGCG und Gallussäure auf den Konzentrationen, während für die Theaflavine und Thearubigene die Flächen bei 374 resp. 278 nm herangezogen wurden. Dabei stehen die Ecken des Netzes jeweils für einen Probenansatz. Je weiter sich eine Linie vom Mittelpunkt in Richtung einer der Ecken entfernt, desto stärker ist die Abweichung gegenüber der Ausgangslösung.



**Abb. 3–74** Übersicht über die Veränderungen der Gehalte an EGCG, Gallussäure, Theaflavinen und Thearubigenen nach 69-tägiger Lagerung bei unterschiedlichen Bedingungen. 0 = keine Veränderung; 100 = vollständiger Abbau (EGCG, TFs, TRs) bzw. höchste gemessene Konzentration (Gallussäure).

Es ist zu erkennen, dass die Theaflavine (z. T. zusammen mit EGCG) bei allen Lagerbedingungen am stärksten von Abbaureaktionen betroffen sind. Insbesondere gegenüber der Temperatur ist deren Empfindlichkeit größer als die der anderen Inhaltsstoffe. Weiterhin trägt kein





## *Ergebnisse und Diskussion*

Faktor so sehr zu einer Abspaltung von Gallussäure bei wie die Erwärmung auf 40 °C. Die Auswirkungen auf die Fläche des TR-Hügels sind insgesamt gering; lediglich durch eine Lagerung bei 40 °C, pH 10 oder den Zusatz von Ethylparaben kommt es hier zu einer merklichen Abnahme.



## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Vorgänge bei der Teeproduktion untersucht, etablierte Methoden zur Fraktionierung von Thearubigenen (TRs) evaluiert und optimiert sowie die Lagereigenschaften eines Schwarztee-Extraktes betrachtet werden.

Dabei ist es gelungen, durch Modellfermentationen mit endogenen Tee-Enzymen die Bildung charakteristischer Schwarzteebestandteile mit unterschiedlichen Grundstrukturen (di- und trihydroxylierte Benzotropolone sowie Benzotropolon-Derivate; 2',2'-Bisflavanole; verschiedene Dehydrodicatchine) nachzuvollziehen und anhand von HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup>-Daten Vorschläge für das Fragmentierungsverhalten mehrerer Oxidationsprodukte wie Theaflavat B, Theacitrin und Epitheafllagallin-3-gallat zu erstellen. Durch qualitative und quantitative Bestimmungen von Edukten und Produkten wurde gezeigt, dass die Enzyme Polyphenoloxidasen (PPO) und Peroxidase (POD) offenbar dieselben Reaktionen katalysieren, sich dabei jedoch hinsichtlich ihrer Präferenzen deutlich unterscheiden. Mit einem alternativen Oxidationssystem wurde erstmalig eine Art Matrixeffekt durch Teeblätter beschrieben, der sich nicht mit einer enzymatischen Aktivität erklären ließ.

Des Weiteren erfolgte die Optimierung einer Methode zur Fraktionierung und Isolierung von Thearubigenen mittels Gegenstromverteilungschromatographie, wobei auch die Übertragbarkeit auf andere Technologien zur Verringerung des Zeitaufwandes bzw. zur Vergrößerung des Maßstabes demonstriert wurde. Anhand einer dabei erhaltenen thearubigenreichen Fraktion wurde die Lagerstabilität schwarzteehaltiger Lösungen untersucht. Vorbehaltlich etwaiger Matrixunterschiede scheint der Schlüssel zu einer langen Lagerfähigkeit v. a. in der konsequenten Kühlung und dem Einstellen eines sauren pH-Wertes zu liegen.

Die in der Schwarzteemanufaktur ablaufenden Oxidationsreaktionen wurden im ersten Teil der Arbeit betrachtet. Dies geschah mit Hilfe eines literaturbekannten Modellsystems, welches an die vorliegenden Bedingungen angepasst und weiter optimiert wurde. Dabei wurde der Fokus auf die enzymatische Oxidation der im Tee quantitativ bedeutsamsten Flavanole EC, EGC, ECG und EGCG gelegt. Als Enzymquelle wurde ein gefriergetrocknetes Teeblattpulver genutzt, dessen phenolische Bestandteile vorab entfernt worden waren, so dass beliebige Kombinationen von Flavanolen als Substrate eingesetzt werden konnten. Für die Isolierung des benötigten EGC, ECG und EGCG aus Tee-Extrakten stellte sich die Verwendung von HSCCC und Säulenchromatographie mit Sephadex LH-20 als zielführend heraus. Durch Varia-



## Zusammenfassung und Ausblick

tion der Reaktionsbedingungen konnte die Beteiligung der teeigenen Enzyme Polyphenoloxidase und Peroxidase gezielt gesteuert werden.

Die Konzentrationsverläufe relevanter Substanzen zeigten, dass Gallocatechine besonders schnell umgesetzt werden und die Bildung von Theaflavinen sowie eines Thearubigen-Humps zügig erfolgt. Hierbei unterscheidet sich die Abbaukinetik der Flavanole mit den einzelnen Enzymen deutlich, wobei die POD eine höhere Spezifität erkennen ließ. Die Umsetzung mit PPO ergab höhere Theaflavin- und Gallussäurekonzentrationen; umgekehrt scheint die POD die Bildung von Thearubigenen zu begünstigen. Qualitativ wurden hingegen keine Unterschiede festgestellt.

Als wesentlicher Faktor für die Gesamtgeschwindigkeit der Umsetzungen erwies sich erwartungsgemäß die Enzymaktivität, welche durch Anpassung der Temperatur variiert werden konnte. Ferner wurden Anzeichen dafür gefunden, dass die Redoxpotentiale der Polyphenole eine wichtige Rolle in deren Reaktionsverhalten spielen. Insbesondere die Anwesenheit von EC bzw. dessen korrespondierendem *o*-Chinon ECQ begünstigt den Ablauf weiterer Oxidationen, beispielsweise von Theaflavinen. Bei erhöhter Temperatur (30°C) unterliegen die entstandenen Theaflavine weiteren Abbaureaktionen.

Als Alternative zu den endogenen Tee-Enzymen wurde in weiteren Versuchen die Oxidation mit Meerrettich-Peroxidase erprobt. Erwartungsgemäß wies die Umsetzung der Flavanole einige Parallelen zu den Abläufen einer „Fermentation“ mit teeigenen Enzymen auf. Die Unterschiede konnten durch die Zugabe polyphenolfreier und enzymatisch inaktiver Grünteeblätter partiell ausgeglichen werden. Die Ursachen für diesen Matrixeffekt, der sich v. a. in einem Abbau der Theaflavine äußert, sind unklar. Denkbare Gründe wie Adsorptionsreaktionen, eine Freisetzung von katalytisch aktiven Metallkationen sowie eine Restaktivität von PPO und POD konnten experimentell widerlegt werden.

Somit ist es mit beiden Modellsystemen – sowohl unter Verwendung von endogenen Tee-Enzymen als auch von Meerrettich-Peroxidase – gelungen, die Oxidation von Flavanolen zu katalysieren und eine Reihe bekannter Teeinhaltsstoffe zu synthetisieren. Die Abläufe bleiben trotz der vereinfachten Bedingungen komplex und führen neben einigen charakteristischen Primärprodukten zur Bildung einer unübersichtlichen Anzahl gering konzentrierter Verbindungen.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden mit der Roberts'-Fraktionierung, der Coffeinfällung und einer gegenstromverteilungschromatographischen Trennung via HSCCC drei Methoden zur Anreicherung und Fraktionierung von Thearubigenen verglichen. Es folgte eine



## Zusammenfassung und Ausblick

Optimierung des HSCCC-basierten Verfahrens, da dieses hinsichtlich der Reinheit der Thearubigen-Fractionen die vielversprechendsten Ergebnisse geliefert hatte. Durch Veränderungen des Lösungsmittelsystems wurde die Handhabung verbessert. Zusätzliche Aufarbeitungsschritte, die eine Entcoffeinierung und Trennung mit einem weiteren Fließmittelsystem beinhalteten, erhöhten den Reinheitsgrad der Thearubigen-Fractionen. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Methode grundsätzlich auf verwandte Techniken wie HPCCC und SCCC übertragbar ist.

Für die Analyse von TR-Fractionen mittels HPLC-DAD erwies sich die Verwendung einer Diol-Phasen-Säule als sinnvoll, um die Coelution von Thearubigenen mit chemisch verwandten Verbindungen weitgehend zu vermeiden und auf diese Weise genauere Aussagen über die chromatographische Reinheit einer Fraction treffen zu können.

Mit der Frage nach der Stabilität einer thearubigenreichen Lösung über einen Zeitraum von insgesamt 200 Tagen beschäftigt sich der dritte Teil dieser Arbeit. In diesem wurde der Einfluss verschiedener Faktoren wie Temperatur, pH-Wert und die Zugabe potentiell protektiver Additive auf die Bestandteile EGCG, Gallussäure, Theaflavine und Thearubigene untersucht. Zur Verhinderung mikrobiellen Wachstums wurde 20%iges Acetonitril<sub>(aq)</sub> als Lösungsmittel verwendet.

Durch eine Lagerung bei  $-18^{\circ}\text{C}$  und pH 2 wurde eine sehr gute Stabilität erreicht; mit geringfügigen Abstrichen war dies auch bei  $4^{\circ}\text{C}$  der Fall. Höhere Temperaturen von 20 bzw.  $40^{\circ}\text{C}$  und pH-Werte von 7 bzw. 10 hatten hingegen starke Veränderungen in den Probenlösungen zur Folge. Der Einsatz von Additiven ergab keine nennenswerten Verbesserungen der Lagerstabilität. Interessanterweise resultierten die beobachteten Umsetzungsreaktionen von Flavanolen und Theaflavinen nicht in einer Bildung von Thearubigenen; vielmehr zeigten die besonders stark von Abbaureaktionen betroffenen Proben Anzeichen einer abnehmenden Thearubigen-Konzentration.

Für die Zukunft ist eine Durchführung der Modellversuche in größerem Maßstab denkbar, um eine Identifizierung unbekannter oder in den MS-Spektren nur vage zugeordneter Signale, z. B. nach Isolierung mittels Gelchromatographie und anschließender NMR-spektroskopischer Analyse, zu ermöglichen. Durch den Einsatz nicht-flavanolischer Teeinhaltsstoffe in den Modellfermentationen ließe sich eine Beteiligung dieser Verbindungen am Reaktionsgeschehen untersuchen.



### *Zusammenfassung und Ausblick*

Die via Gegenstromverteilungschromatographie erhaltenen Schwarztee-Fractionen bieten eine gute Grundlage für weitere Forschungsarbeiten wie sensorische oder ernährungsphysiologische Studien.



## 5 Material und Methoden

### 5.1 Teematerial

Tees bzw. Tee-Extrakte, die im Rahmen der Modelloxidationsversuche verwendet wurden:

- **Weißer Instanttee:** White Tea Extract, Ref.Nr.: K48066, Charge: 111748E (Hälssen & Lyon GmbH, Hamburg)
- **Sunphenon 80SK:** Polyphenolreicher Tee-Extrakt (Taiyo International, Inc., Minneapolis, MN, USA)
- **Polyphenolfreies Blattpulver:** Mit Wasser und Aceton extrahierte, frische Teeblätter mit aktiven Enzymen, gefriergetrocknet und gemahlen (Unilever Research & Development, Bangalore, Indien). Herstellung s. Abschnitt 5.4.4.1
- **Gunpowder:** Grüner China-Blatttee „Temple of Heaven“ Special Gunpowder
- **China Lung Ching:** Grüner China-Blatttee
- **Darjeeling grün:** Grüner Darjeeling-Blatttee, kbA, FTGFOP 1, Plantagen: Arya und Tindharia, Ernte 2009 (Projektwerkstatt GmbH, Berlin)
- **Assam Fannings:** Assam CTC Fannings für Teebeutel, 31.03.2011 (Meßmer Momentum, Hamburg)

Tees bzw. Tee-Extrakte, die im Rahmen der Fraktionierungs-, Isolierungs- und Lagerversuche verwendet wurden:

- **UL BTE:** Schwarztee-Extrakt aus wässrigem Aufguss (Unilever Research & Development, Bangalore, Indien)
- **UL SII und UL Sla:** SII und Sla-Fractionen nach ROBERTS aus UL BTE (Unilever Research & Development, Bangalore, Indien)
- **UL Assam:** Assam CTC Schwarztee (Unilever Research & Development, Vlaardingen, Niederlande)
- **UL South India:** Südindischer CTC-Schwarztee (Unilever Research & Development, Vlaardingen, Niederlande)
- **Instant-Schwarztee:** Schwarztee-Extrakt, Std. 670, Charge: 111025E, Los K142970 (Hälssen & Lyon GmbH, Hamburg)
- **Sumatra:** Sumatra-Schwarztee, fein, Broken Orange Pekoe Fannings, BAH, BUT, 146028, Charge: RF0000117
- **Ostfriesentee:** Onno Behrends „Schwarzer Friese“, Los: L213610111 (Onno Behrends GmbH & Co. KG, Norden)



## 5.2 Chemikalien und Lösungsmittel

Sofern verfügbar wurden für Trennungen mittels SCCC Lösungsmittel der Reinheit „technisch“ des Zentralen Chemikalienlagers der TU Braunschweig (ZCL) eingesetzt.

Tab. 5-1 Liste der für diese Arbeit verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Reinheit	Hersteller
(-)-Epicatechin	90 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
(+)-Catechin-monohydrat	98 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
2-(N-morpholino)-ethansulfonsäure	-	EGA Chemie, Steinheim
4-Hydroxybenzoesäureethylester	> 99 %	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
4-Hydroxybenzoesäuremethylester	> 98 %	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Aceton	p.a., ≥ 99,5 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Aceton	p.a.	VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Acetonitril	LC-MS grade, ≥ 99,95 %	Carl Roth; Honeywell Burdick & Jackson, Seelze
Acetonitril	HPLC gradient grade, ≥ 99,9 %	VWR International; Honeywell; Sigma-Aldrich
Acetonitril	technisch	ZCL
Amberlite XAD-7	-	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ameisensäure	≥ 99 %	VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Argon, verdichtet	99,999 Vol.-%	Westfalen AG, Münster
Benzamidin-hydrochlorid	≥ 99 %	AppliChem GmbH, Darmstadt
Benzoessäure	p.a.	Merck KGaA, Darmstadt
Chloroform	p.a., ≥ 99,99 %, stabilisiert mit Amylen	Fisher Scientific, Loughborough, UK
Citronensäure	wasserfrei, ≥ 99,5 %	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Coffein	wasserfrei	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dichlormethan	99,5 %, stabilisiert mit 0,2 % Ethanol	VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Diethylether	99,9 %	VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Di-Natriumhydrogenphosphat- dodecahydrat	p.a., > 99 %	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz



## Material und Methoden

Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat	99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Essigsäure	HPLC grade	Fisher Scientific, Loughborough, UK
Essigsäure	LC-MS grade, $\geq 99,7\%$	Fisher Scientific, Loughborough, UK
Essigsäure	p.a., 100%	VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Ethanol	p.a.	VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Ethylacetat	$\geq 99,5\%$	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Dinatriumsalz, Dihydrat, $> 99\%$	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz	-	Merck KGaA, Darmstadt
Helium		Westfalen AG, Münster
<i>iso</i> -Butanol	p.s., $\geq 98\%$	AppliChem GmbH, Darmstadt
<i>iso</i> -Butanol	p.a.	Riedel-de-Haën AG, Seelze
L(+)-Ascorbinsäure	$\geq 99\%$	VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Luft (synthetisch)	20.5 Vol.-% O <sub>2</sub> , 79.5 Vol.-% N <sub>2</sub>	Westfalen AG, Münster
Methanol	HPLC gradient grade, 100,0%	VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Natriumhydroxid	$\geq 99\%$	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Natriumsulfat	wasserfrei, $\geq 99\%$	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
<i>n</i> -Butanol	99,8%	VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, Frankreich
<i>o</i> -Phenylendiamin	p.a.	Merck KGaA, Darmstadt
Peroxidase (POD) aus Meerrettich	52 Einheiten/mg	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Petrolether	technisch	ZCL
Schwefelsäure	$\geq 95\%$	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Sephadex LH-20 (lipophil), 25–100 $\mu\text{m}$	für die Chromatographie	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Sorbinsäure	$> 99\%$	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
<i>tert</i> -Butylmethylether (tBME)	p.s., $\geq 99,5\%$	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Trifluoressigsäure	99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Triton X-100	-	AppliChem GmbH, Darmstadt
Wasser	doppelt deionisiert (Nanopure® Qualität)	Werner Reinstwassersysteme, Leverkusen
Wasserstoffperoxid-Lösung	$\geq 30\%$	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe





## 5.3 Geräte und Parameter

### 5.3.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

#### 5.3.1.1 HPLC-DAD

##### Geräteparameter

##### **HPLC-Anlage I**

Pumpe:	Agilent Series 1100 Bin Pump G1312A (Agilent Technologies, Waldbronn)
Probenaufgabe:	Agilent Series 1100 ALS G1329A (Agilent Technologies, Waldbronn)
Säulenofen:	Agilent Series 1100 COLCOM G1316A (Agilent Technologies, Waldbronn)
Detektor:	Agilent Series 1100 DAD G1315A (Agilent Technologies, Waldbronn)
Datenverarbeitung:	ChemStation for LC 3D systems, Rev.B.03.01 (Agilent Technologies, Waldbronn)

##### **HPLC-Anlage II**

Pumpe:	Agilent Series 1200 Bin Pump G1312A (Agilent Technologies, Waldbronn)
Probenaufgabe:	Agilent Series 1200 ALS G1329A (Agilent Technologies, Waldbronn)
Thermostat:	Agilent Series 1200 FC/ALS Therm G1330B (Agilent Technologies, Waldbronn)
Säulenofen:	Agilent Series 1200 TCC G1316A (Agilent Technologies, Waldbronn)
Detektor:	Agilent Series 1200 DAD G1315D (Agilent Technologies, Waldbronn)
Datenverarbeitung:	ChemStation for LC 3D systems, Rev.B.03.01 (Agilent Technologies, Waldbronn)

##### Fließmittelsysteme

**HPLC\_System 1** (u. a. Analytik von Catechinen und TRs, modifiziert nach ISO 14502-2:2002, große Säule)

Probenvorbereitung:	Mikrofiltration (Rotilabo Mini-Tip Spritzenfilter, PTFE-Membran, 0,45 µm, ø 15 mm; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
Säule:	Phenomenex Luna® 5 µm Phenyl-Hexyl, 250 x 4,6 mm (Phenomenex, Aschaffenburg)
Fließmittel A:	2 % Essigsäure in 9 % Acetonitril <sub>(aq)</sub> , 20 µg/mL EDTA
Fließmittel B:	2 % Essigsäure in 80 % Acetonitril <sub>(aq)</sub> , 20 µg/mL EDTA



## Material und Methoden

Gradient: 0–15 min, 0 % B; 15–30 min, 0→32 % B; 30–35 min, 32 % B; 35–36 min, 32→100 % B; 36–45 min, 100 % B; 45–46 min, 100→0 % B

Equilibrierungszeit: 15 min

Flussrate: 1 mL/min

Säulentemperatur: 35 ± 0,5 °C

Temp. Autosampler: RT (HPLC-Anlage I), 10 °C (HPLC-Anlage II)

Injektionsvolumen: 20 µL

Detektion: 278, 354, 374 nm

Verwendet mit: HPLC-Anlage I + II

**HPLC\_System 2** (u. a. Analytik von Catechinen und TRs, modifiziert nach ISO 14502-2:2002, kleine Säule)

Probenvorbereitung: Mikrofiltration (Rotilabo Mini-Tip Spritzenfilter, PTFE-Membran, 0,45 µm, ø 15 mm; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Säule: Phenomenex Luna® 3 µm Phenyl-Hexyl, 150 x 2 mm (Phenomenex, Aschaffenburg)

Fließmittel A: 2 % Essigsäure in 9 % Acetonitril<sub>(aq)</sub>, 20 µg/mL EDTA

Fließmittel B: 2 % Essigsäure in 80 % Acetonitril<sub>(aq)</sub>, 20 µg/mL EDTA

Gradient: 0–15 min, 0 % B; 15–30 min, 0→32 % B; 30–35 min, 32 % B; 35–36 min, 32→100 % B; 36–45 min, 100 % B; 45–46 min, 100→0 % B

Equilibrierungszeit: 15 min

Flussrate: 0,25 mL/min

Säulentemperatur: 35 ± 0,5 °C

Temp. Autosampler: RT

Injektionsvolumen: 5 µL

Detektion: 278, 354, 374 nm

Verwendet mit: HPLC-Anlage I

**HPLC\_System 3** (Theaflavinanalytik, große Säule)

Probenvorbereitung: Mikrofiltration (Rotilabo Mini-Tip Spritzenfilter, PTFE-Membran, 0,45 µm, ø 15 mm; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Säule: Zorbax Eclipse XDB C-18 3,5 µm, 150 x 4,6 mm (Agilent Technologies, Waldbronn)

Fließmittel A: 2 % Essigsäure<sub>(aq)</sub>, 20 µg/mL EDTA

Fließmittel B: 2 % Essigsäure in Acetonitril, 20 µg/mL EDTA



## Material und Methoden

Gradient: isokratisch, 20 % B, 35 min/Lauf  
Flussrate: 2 mL/min  
Säulentemperatur: 30 ± 0,5 °C  
Temp. Autosampler: 10 °C  
Injektionsvolumen: 10 µL/20 µL  
Detektion: 274 nm  
Verwendet mit: HPLC-Anlage II

### HPLC\_System 4 (Theaflavinanalytik, kleine Säule)

Probenvorbereitung: Mikrofiltration (Rotilabo Mini-Tip Spritzenfilter, PTFE-Membran, 0,45 µm, ø 15 mm; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)  
Säule: Zorbax Eclipse XDB C-18 3,5 µm, 150 x 2,1 mm (Agilent Technologies, Waldbronn)  
Fließmittel A: 2 % Essigsäure<sub>(aq)</sub>, 20 µg/mL EDTA  
Fließmittel B: 2 % Essigsäure in Acetonitril, 20 µg/mL EDTA  
Gradient: isokratisch, 20 % B, 35 min/Lauf  
Flussrate: 0,38 mL/min  
Säulentemperatur: 30 ± 0,5 °C  
Temp. Autosampler: 10 °C  
Injektionsvolumen: 5 µL  
Detektion: 274 nm  
Verwendet mit: HPLC-Anlage II

### HPLC\_System 5 (Thearubigenanalytik mit Diol-Säule)

Probenvorbereitung: Mikrofiltration (Rotilabo Mini-Tip Spritzenfilter, PTFE-Membran, 0,45 µm, ø 15 mm; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)  
Säule: Agilent MonoChrom Diol 3 µm, 150 x 2,0 mm (Agilent Technologies, Waldbronn)  
Fließmittel A: 2 % Essigsäure in Acetonitril  
Fließmittel B: 2 % Essigsäure und 3 % Wasser in Methanol  
Gradient: 0–14 min, 0→16 % B; 14–20 min, 16→100 % B; 20–25 min, 100 % B; 25–35 min, 100→0 % B  
Equilibrierungszeit: 10 min  
Flussrate: 0,2 mL/min  
Säulentemperatur: 25 ± 0,5 °C  
Temp. Autosampler: RT



## Material und Methoden

Injektionsvolumen: 20 µL  
Detektion: 278, 354, 374 nm  
Verwendet mit: HPLC-Anlage I

### 5.3.1.2 Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (UHPLC-DAD)

#### Geräteparameter

Pumpe: Agilent 1290 Infinity Bin Pump G4220A (Agilent Technologies, Waldbronn)  
Probenaufgabe: Agilent 1290 Infinity Sampler G4226A (Agilent Technologies, Waldbronn)  
Säulenofen: Agilent 1290 Infinity TCC G1316C (Agilent Technologies, Waldbronn)  
Thermostat: Agilent 1290 Infinity FC/ALS Therm G1330B (Agilent Technologies, Waldbronn)  
Detektor: Agilent 1290 Infinity DAD G4212A (Agilent Technologies, Waldbronn)  
Datenverarbeitung: OpenLAB CDS ChemStation for LC & LC/MS systems, Rev. C.01.05 [35] (Agilent Technologies, Waldbronn)

#### Fließmittelsysteme

##### **UHPLC\_System 1** (Theaflavinanalytik)

Probenvorbereitung: Mikrofiltration (Rotilabo Mini-Tip Spritzenfilter, PTFE-Membran, 0,2 µm, ø 15 mm; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)  
Säule: Eclipse Plus C-18 1,8 µm, 50 x 2,1 mm (Agilent Technologies, Waldbronn)  
Fließmittel A: 2 % Essigsäure<sub>(aq)</sub>  
Fließmittel B: 2 % Essigsäure in Acetonitril  
Gradient: 0–0,5 min, 23→20 % B; 0,5–3 min, 20→21 % B; 3–4,5 min, 21→23 % B  
Flussrate: 0,8 mL/min  
Säulentemperatur: 30 °C  
Temp. Autosampler: 10 °C  
Injektionsvolumen: 1,5 µL  
Detektion: 274, 375 nm



### 5.3.1.3 Präparative HPLC (PräpHPLC-DAD)

#### Geräteparameter

Pumpe:	Beckman System Gold Programmable Solvent Module 126 (Beckman Coulter GmbH, Krefeld)
Probenaufgabe:	Rheodyne® 7125 5-Wegeventil, 100 µL Probenschleife
Detektor:	Beckman System Gold Diode-Array Detector Module 168 (Beckman Coulter GmbH, Krefeld)
Datenverarbeitung:	Beckman System Gold V810 (Beckman Coulter GmbH, Krefeld)

#### Fließmittelsystem

##### **PräpHPLC\_System 1**

Fließmittel A:	2 % Essigsäure in 9 % Acetonitril <sub>(aq)</sub> , 20 µg/mL EDTA
Fließmittel B:	2 % Essigsäure in 80 % Acetonitril <sub>(aq)</sub> , 20 µg/mL EDTA
Gradient:	0–5 min, 0 % B; 5 min, 0→10 % B; 5–10 min, 10→20 % B; 10–35 min, 20 % B; 35–40 min, 20→50 % B; 40–54 min, 50 % B; 54–55 min, 50→0 % B
Equilibrierungszeit:	10 min
Säule:	Hypersil 120 ODS, 5µ, 250 x 16 mm (M & W Chromatographietechnik GmbH, Berlin)
Flussrate:	4 mL/min
Säulentemperatur:	RT
Injektionsvolumen:	100 µL
Detektion:	278 nm

### 5.3.1.4 Massenspektrometrie (HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup>)

#### Geräteparameter

Pumpe:	Agilent Series 1100 Bin Pump G1312A (Agilent Technologies, Waldbronn)
Probenaufgabe:	Agilent Series 1200 ALS SL G1329B (Agilent Technologies, Waldbronn)
Thermostat:	Agilent Series 1200 FC/ALS Therm G1330B (Agilent Technologies, Waldbronn)
Detektion:	Agilent Series 1100 DAD G1315B (Agilent Technologies, Waldbronn)
Massenspektrometer:	Bruker HCT Ultra PTM Discovery System Electrospray Ionization Ion Trap Mass Spectrometer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen)



## Material und Methoden

Datenverarbeitung: Bruker ESI Compass 1.3 for HCT/Esquire (Bruker Daltonik GmbH, Bremen)

- HyStar Version 3.2
- DataAnalysis Version 4.0 (build 234)

MZMine Version 2.14.2

### **LC-MS-Systeme**

#### **LC-MS\_System 1:**

##### *HPLC-Methode*

Probenvorbereitung: Mikrofiltration (Rotilabo Mini-Tip Spritzenfilter, PTFE-Membran, 0,45  $\mu\text{m}$ ,  $\varnothing$  15 mm; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Säule: Phenomenex Luna<sup>®</sup> 3  $\mu\text{m}$  Phenyl-Hexyl, 150 x 2 mm (Phenomenex, Aschaffenburg)

Fließmittel A: 9 % Acetonitril in 2 % Essigsäure<sub>(aq)</sub>

Fließmittel B: 80 % Acetonitril in 2 % Essigsäure<sub>(aq)</sub>

Gradient: 0–15 min, 0 % B; 15–30 min, 0→32 % B; 30–35 min, 32 % B; 35–36 min, 32→100 % B; 36–45 min, 100 % B; 45–46 min, 100→0 % B

Equilibrierungszeit: 15 min

Flussrate: 0,25 mL/min

Säulentemperatur: RT

Temp. Autosampler: 10 °C

Injektionsvolumen: 5  $\mu\text{L}$

Detektion: 278 nm

##### *MS-Methode*

Ion mode: alternierend

Scan: 100–1000 m/z

Nebulizer: 60,00 psi

Dry gas: 11 L/min, 365 °C

Capillary: –/+ 3500 V



## 5.3.2 Gegenstromverteilungschromatographie

### 5.3.2.1 High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC)

#### Geräteparameter

Kontrolleinheit:	NEC control unit Model PC-8300 (NEC Corporation Microcomputer, Tokyo, Japan)
Pumpe:	Beckman System Gold pump module 116 (Beckman Coulter GmbH, Krefeld)
Probenaufgabe: System:	Rheodyne® 5041 4-Wegeventil (Sigma-Aldrich), 30 mL Probenschleife High-speed Countercurrent Chromatograph model CCC-1000 (Pharma-Tech Research Corp., Baltimore, MD, USA)
Coilvolumen:	ca. 850 mL, verteilt auf 3 Coils
Schlauch:	PTFE; i. D.: 2,5 mm
Detektor:	Beckman System Gold detector module 168 (Beckman Coulter GmbH, Krefeld)
Fraktionensammler:	LKB Bromma 2111 Multirac (Bromma, Schweden)
Datenverarbeitung:	CSW Chromatography Station Beckman 166 (Beckman Coulter GmbH, Krefeld)

#### Trennsysteme

##### **HSCCC\_System 1** (TR-Isolierung in Anlehnung an DEGENHARDT et al., 2000)

Fließmittelsystem:	EtOAc/ <i>n</i> -BuOH/H <sub>2</sub> O (2:3:5, v/v)
Rotation:	800–900 rpm
Fluss:	3,0 mL/min
Modus:	Head-to-Tail
Detektion:	278 nm
Fraktionierung:	4 min/Reagenzglas (= 12 mL)

##### **HSCCC\_System 2** (TR-Isolierung; verändert)

Fließmittelsystem:	EtOAc/ <i>iso</i> -BuOH/H <sub>2</sub> O (2:3:5, v/v)
Rotation:	800–900 rpm
Fluss:	4,0 mL/min
Modus:	Head-to-Tail
Detektion:	278 nm
Fraktionierung:	3 min/Reagenzglas (= 12 mL)



## Material und Methoden

### Wahlweise mit Extrusion nach der Trennung (zum Erhalt einer zweiten TR-Fraktion)

Fließmittel:	stationäre Phase
Rotation:	ohne Rotation
Fluss:	6 mL/min
Detektion:	278 nm
Fraktionierung:	3 min/Reagenzglas (= 18 mL)

### **HSCCC\_System 3**

Fließmittelsystem:	<i>t</i> BME/ACN/H <sub>2</sub> O (2:2:3, v/v)
Rotation:	850 rpm
Fluss:	4,0 mL/min
Richtung:	Head-to-Tail
Detektion:	278 nm
Fraktionierung:	3 min/Reagenzglas (= 12 mL)

### **HSCCC\_System 4** (Catechin-Isolierung 1)

Fließmittelsystem:	<i>t</i> BME/ACN/0,1% TFA <sub>(aq)</sub> (2:2:3, v/v)
Rotation:	800–900 rpm
Fluss:	4,0 mL/min
Modus:	Tail-to-Head
Detektion:	278 nm
Fraktionierung:	3 min/Reagenzglas (= 12 mL)

### **HSCCC\_System 5** (Catechin-Isolierung 2)

Fließmittelsystem:	<i>t</i> BME/ACN/H <sub>2</sub> O (2:2:3, v/v)
Rotation:	800–900 rpm
Fluss:	4,0 mL/min
Modus:	Tail-to-Head
Detektion:	278 nm
Fraktionierung:	3 min/Reagenzglas (= 12 mL)

### **HSCCC\_System 6** (TR-Isolierung Tail-to-Head)

Fließmittelsystem:	EtOAc/ <i>n</i> -BuOH/H <sub>2</sub> O (2:3:5, v/v)
Rotation:	950 rpm
Fluss:	4,0 mL/min
Modus:	Tail-to-Head





## Material und Methoden

Detektion: 278 nm  
Fraktionierung: 3 min/Reagenzglas (= 12 mL)

### HSCCC\_System 7

Fließmittelsystem: *n*-BuOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v)  
Rotation: 840 rpm  
Fluss: 4,0 mL/min  
Richtung: Tail-to-Head  
Detektion: 278 nm  
Fraktionierung: 3 min/Reagenzglas (= 12 mL)

### 5.3.2.2 Spiral-Coil Low Speed Rotary Countercurrent Chromatography (SCCCC)

#### Geräteparameter

Pumpe: System Knauer Mini Star V 1.24 (Knauer GmbH, Berlin)  
Probenaufgabe: manuell via 3-Wegeventil  
System: Spiral-Coil Countercurrent Chromatograph Prototype (Pharma-Tech Research Corp., Baltimore, MD, USA)  
Coilvolumen: ca. 5,6 L, verteilt auf 10 Disks  
Schlauch: PTFE, „convoluted“, mittlerer i. D.: 8,5 mm  
Detektor: Knauer Variable Wavelength detector (Knauer GmbH, Berlin)  
Fraktionensammler: Pharmacia LKB Super Frac (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Schweden)  
Schreiber: ABB Goerz SE 120 (ABB Goerz AG, Wien, Österreich)

#### Trennsysteme

##### SCCCC\_System 1 (TR-Isolierung aus Sumatra Tee)

Fließmittelsystem: EtOAc/*n*-BuOH/H<sub>2</sub>O (2:3:5, v/v)  
Rotation: ca. 172 rpm (43 x 4)  
Fluss: 15,0 mL/min  
Modus: L-I-H  
Detektion: 278 nm  
Fraktionierung: 3 min/Reagenzglas (= 45 mL)

##### SCCCC\_System 2 (Catechinisolierung aus weißem Instanttee)

Fließmittelsystem: *t*BME/ACN/0,1 % TFA<sub>(aq)</sub> (2:2:3, v/v)  
Rotation: ca. 160 rpm (40 x 4)



## Material und Methoden

Fluss:	15,0 mL/min
Modus:	U-I-T
Detektion:	278 nm
Fraktionierung:	3 min/Reagenzglas (= 45 mL)

### 5.3.2.3 High-Performance Countercurrent Chromatography (HPCCC)

#### Geräteparameter

Pumpe:	System Knauer Mini Star V 1.24 (Knauer GmbH, Berlin)
Probenaufgabe:	Injektionsventil, 5 mL Probenschleife
System:	Spectrum High Performance Countercurrent Chromatograph (Dynamic Extractions Ltd, Slough, UK)
Coilvolumen:	125,5 mL
Schlauch:	PTFE, i. D.: 1,6 mm
Detektor:	Knauer Spectralphotometer K-2500 (Knauer GmbH, Berlin)
Fraktionensammler:	Pharmacia LKB Super Frac (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Schweden)
Kühleinheit:	Lauda RCS 6 (Lauda DR. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen)
Datenverarbeitung:	Eurochrom 2000 for Windows, Version 2.05 (Knauer GmbH, Berlin)

#### Trennsysteme

##### **HPCCC\_System 1**

Fließmittelsystem:	tBME/ACN/H <sub>2</sub> O (2:2:3, v/v)
Maßstab:	semi-präparativ
Rotation:	1600 rpm
Fluss:	2,0 mL/min
Modus:	Head-to-Tail
Detektion:	278 nm

##### **HPCCC\_System 2**

Fließmittelsystem:	EtOAc/ACN/H <sub>2</sub> O (6:5:6, v/v)
Maßstab:	semi-präparativ
Rotation:	1600 rpm
Fluss:	2,0 mL/min
Modus:	Head-to-Tail
Detektion:	278 nm



### HPCCC\_System 3

Fließmittelsystem: EtOAc/ACN/1 % AcOH (6:5:6, v/v)  
Maßstab: semi-präparativ  
Rotation: 1600 rpm  
Fluss: 2,0 mL/min  
Modus: Head-to-Tail  
Detektion: 278 nm

### HPCCC\_System 4

Fließmittelsystem: tBME/ACN/EtOH/1 % Ameisensäure (14:14:1:21, v/v)  
Maßstab: semi-präparativ  
Rotation: 1600 rpm  
Fluss: 2,0 mL/min  
Modus: Head-to-Tail  
Detektion: 278 nm

## 5.3.3 Säulenchromatographie

### 5.3.3.1 Amberlite XAD-7

Säulenmaße: i. D.: 5 cm  
Höhe: 80 cm  
Trennmaterial: Amberlite® XAD-7 Adsorberharz  
Füllhöhe: 55 cm  
Fließmittel: Konditionierung: 1. Methanol  
2. Wasser  
Elution: 1. Wasser (Waschen)  
2. Methanol (Elution der Phenole)  
Flussrate: Probenaufgabe und Elution: 1–2 Tropfen/s

### 5.3.3.2 Sephadex LH-20

Säulenmaße: i. D.: 1,7 cm  
Höhe: 50 cm  
Trennmaterial: Sephadex LH-20, 25–100 µm  
Fließmittel: Chloroform/Methanol/Petrolether (1:2:1, v/v)  
Flussrate: 0,2 mL/min  
Detektor: L-4000A UV-Detektor (Merck KGaA, Darmstadt)



## Material und Methoden

Detektion:	278 nm
Schreiber:	LKB 2210 2-Channel Recorder (LKB Produkter AB, Bromma, Schweden)
Papierschub:	0,5 mm/min
Fraktionensammler:	Advantec SF-2120 Super Fraction Collector (Advantec MFS Inc., Dublin, CA, USA)
Fraktionierung:	20 min/Reagenzglas (= 4 mL)

### 5.3.4 Photometrie

Küvetten:	Polystyrol Einwegküvetten, 10x4x45 mm (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)
Photometer:	Jasco UV/VIS/NIR Spectrophotometer V-570 (Jasco Labor und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt)
Datenverarbeitung:	SpectraManager Version 1.27.02

### 5.3.5 Zentrifugation

Zentrifuge 1:	Hermle Z 383, Baujahr 2008 (Hermle Labortechnik GmbH, Langenhagen)
Zentrifuge 2:	Rotilabo Micro Centrifuge, Modell: AL, Geschwindigkeit: 6 000 rpm (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

### 5.3.6 Rotationsverdampfung

Wasserbad:	Büchi 461 Water Bath (Büchi Laboratoriums-Technik AG, Flawil, Schweiz)
Motor:	Büchi Motor KRvrTD (Büchi Laboratoriums-Technik AG, Flawil, Schweiz)
Steuereinheit:	Büchi Rotavapor RE 121 (Büchi Laboratoriums-Technik AG, Flawil, Schweiz)
Vakuumpumpe:	MLT VacuBox PVK 600 (MLT AG Labortechnik, Wangen, Schweiz)
Kühleinheit:	Lauda RCS 6 (Lauda DR. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen)

### 5.3.7 Temperierung

#### 5.3.7.1 Modelloxidationen

Wasserbad:	Julabo 5M Model MP-PA/KÜ (Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach)
------------	---



## *Material und Methoden*

Kühleinheit: Thermo Haake WKL 26, Typ 003-8046 (Thermo Haake GmbH, Karlsruhe)

### **5.3.7.2 Extraktion von Flavanolen**

Wasserbad: Haake W13 (Thermo Haake GmbH, Karlsruhe)

Thermostat: Haake Typ E52 (Thermo Haake GmbH, Karlsruhe)

### **5.3.7.3 Lagerversuche**

Heizblock: Thermo Scientific PIERCE Reacti-Therm 18821 Heating/Stirring Module  
(Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG, Braunschweig)

### **5.3.8 pH-Wert-Bestimmung**

pH-Meter: WTW inoLab pH Level 2 (WTW GmbH & Co. KG, Weilheim)

### **5.3.9 Langzeitextraktion**

Schüttelbad: GFL Typ 1083 (Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel)

Temperatur: Raumtemperatur

### **5.3.10 Magnetrührer**

Magnetrührer mit

Heizfunktion: IKA-Combimag RET Nr. 109335 (Janke & Kunkel GmbH & Co. KG,  
Staufen)

### **5.3.11 Vortexer**

Vortexer: SI-A256 Vortex-Genie 2 Digital (Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY,  
USA)



## 5.4 Methoden

### 5.4.1 Allgemeine Methoden

#### 5.4.1.1 Bestimmung von Catechinen und Gallussäure mittels HPLC-DAD

Die qualitative und quantitative Bestimmung von Catechinen (Flavanolen) und Gallussäure erfolgt anhand der ISO-Methode 14502-2. Zur Identifizierung werden dabei die Retentionszeiten und UV-Spektren herangezogen, während die Quantifizierung mit Hilfe einer externen Kalibrierfunktion mit Coffein und über relative Responsefaktoren (RRF) der Catechine bzw. der Gallussäure vorgenommen wird. Die RRF wurden in internationalen Ringversuchen festgelegt.

##### Benötigte Lösungen

###### *Stabilisierungslösung:*

Je 2,5 mL einer EDTA- und einer Ascorbinsäure-Lösung (jeweils  $c = 10 \text{ g/L}$ ) werden in einen 50 mL-Messkolben überführt und mit 5 mL Acetonitril versetzt. Anschließend wird mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

###### *Stammlösung:*

200,0 mg Coffein werden in einen 100 mL Messkolben eingewogen, welcher dann mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt wird.

###### *Standardlösungen:*

50, 100, 300, 500, 1000 bzw. 1500  $\mu\text{L}$  der Stammlösung werden in jeweils einen 20 mL-Messkolben pipettiert. Anschließend wird mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

##### Durchführung

Nach Mikrofiltration werden die Standardlösungen ( $c = 5,00\text{--}150 \text{ mg/L}$ ) zur Messung mittels HPLC-DAD (HPLC\_Systeme 1 und 2; Abschnitt 5.3.1.1) eingesetzt. Im Falle der Modelloxidationsversuche (Abschnitte 5.4.4–5.4.6) erfolgt eine Analyse der mikrofiltrierten Reaktionslösung, im Rahmen des Lagerversuchs werden die vorab vorbereiteten Proben ( $c = 2,5 \text{ g/L}$  in 20% Acetonitril<sub>(aq)</sub>) direkt gemessen. Bei anderen Versuchen werden die Proben im Fließmittel A oder in Wasser gelöst ( $c = 2 \text{ mg/L}$ ), mikrofiltriert und anschließend analysiert.

##### Auswertung

Zur Ermittlung der Kalibrierfunktion werden die Signalflächen der Coffein-Standardlösungen ( $\lambda = 278 \text{ nm}$ ) gegen deren Konzentrationen aufgetragen. Anhand der Kalibrierfunktion und der RRF (**Tab. 5-2**) können die Konzentrationen der Flavanole und der Gallussäure in den Proben berechnet werden (Gleichung 5–1).



## Material und Methoden

$$c_{\text{Analyt}} = \frac{A_{\text{Analyt}} - y}{m} \cdot RRF \quad (5-1)$$

mit	$c_{\text{Analyt}}$ :	Konzentration des Analyten [mg/L]
	$A_{\text{Analyt}}$ :	Signalfäche des Analyten [mAU]
	y:	y-Achsenabschnitt der Kalibriergeraden
	m:	Steigung der Kalibriergeraden
	RRF:	Relativer Responsefaktor ( <b>Tab. 5-2</b> )

**Tab. 5-2** Relative Responsefaktoren der Flavanole und der Gallussäure.

<b>Verbindung</b>	<b>Rel. Responsefaktor (RRF)</b>
Gallussäure	0,84
(+)-Catechin	3,58
(-)-Epicatechin	3,67
(-)-Epicatechin-3-O-gallat	1,42
(-)-Epigallocatechin	11,24
(-)-Epigallocatechin-3-O-gallat	1,72

### 5.4.1.2 Bestimmung von Theaflavinen mittels HPLC-DAD

Die Bestimmung der Theaflavine TF, TF-3-G, TF-3'-G und TF-DG basiert auf einer vorläufigen Standard Operation Procedure der Firma Unilever und erfolgt mit den HPLC\_Systemen 3 und 4 aus wässriger und mikrofiltrierter Lösung. Zur Qualifizierung werden die Retentionszeiten (**Abb. 3–17**) und UV/Vis-Spektren der Verbindungen herangezogen. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Kalibriergeraden der vier Theaflavine im Konzentrationsbereich von 10–200 mg/L vorgenommen. Für die Messungen mit HPLC\_System 3 werden bestehende Kalibrierreihen verwendet, während für das HPLC\_System 4 externe Kalibrierfunktionen aufgenommen werden. Dies geschieht anhand von Standards für die Theaflavine TF, TF-3-G, TF-3'-G und TF-DG.

#### Auswertung

Die Gehalte werden über Gleichung 5–2 aus den gemessenen Signalfächen und den Parametern der Kalibriergeraden berechnet.

$$c_{\text{Analyt}} = \frac{A_{\text{Analyt}} - y}{m} \quad (5-2)$$

mit	$c_{\text{Analyt}}$ :	Konzentration des Analyten [mg/L]
	$A_{\text{Analyt}}$ :	Signalfäche des Analyten [mAU]
	y:	y-Achsenabschnitt der Kalibriergeraden
	m:	Steigung der Kalibriergeraden



### 5.4.1.3 Bestimmung von Theaflavinen mittels UHPLC-DAD

Die Methode wird zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Theaflavine TF, TF-3-G, TF-3'-G und TF-DG in den Proben der Modellversuche mit HR-POD eingesetzt.

#### Durchführung

Die Proben werden nach Mikrofiltration mittels UHPLC-DAD (UHPLC\_System 1) getrennt. Für jedes der vier Theaflavine wird mit einer Standardsubstanz eine externe Kalibrierfunktion über einen Konzentrationsbereich von 10–200 mg/L aufgestellt (Anhang 7.5).

#### Auswertung

Der Nachweis und die Zuordnung der Theaflavine TF, TF-3-G, TF-3'-G und TF-DG erfolgt anhand der Retentionszeiten und UV/Vis-Spektren (Anhang 7.3 und 7.5). Mit Hilfe von Gleichung 5–2 werden die Gehalte durch Einsetzen der Signalflächen und der Parameter aus den jeweiligen Kalibriergeraden berechnet.

### 5.4.1.4 Abschätzung des Thearubingehaltes mittels HPLC-DAD

#### 5.4.1.4.1 Indirekte Gehaltsbestimmung durch Berechnung

Der Thearubingehalt in der Reaktionslösung eines Modellsystems nach Abschnitt 3.1 wird über die zuvor zu ermittelten Konzentrationen von Flavanolen, Theaflavinen und Gallussäure (Abschnitte 5.4.1.1 und 0) näherungsweise kalkuliert. Dies geschieht nach der Berechnung des Gesamtflavanolgehaltes (Gleichung 5–3) durch Einsetzen der Konzentrationen in Gleichung 5–4:

$$\text{Gesamtflavanole} = EC + ECG + EGC + EGCG \quad (5-3)$$

mit EC, ECG, EGC und EGCG als jeweilige Konzentration in mg/L.

$$TRs = \text{Gesamtflavanole}_{t=0} - (\text{Gesamtflavanole}_{t=x} + \text{Theaflavine}_{t=x} + \text{Gallussäure}_{t=x}) \quad (5-4)$$

mit	TRs:	Thearubingehalt [mg/L]
	Gesamtflavanole <sub>t=0</sub> :	Gesamtflavanolgehalt zu Beginn des Modellversuchs [mg/L]
	Gesamtflavanole <sub>t=x</sub> :	Gesamtflavanolgehalt zum Zeitpunkt der Probenahme [mg/L]
	Theaflavine <sub>t=x</sub> :	Theaflavingehalt zum Zeitpunkt der Probenahme [mg/L]
	Gallussäure <sub>t=x</sub> :	Gallussäuregehalt zum Zeitpunkt der Probenahme [mg/L]





#### 5.4.1.4.1 Abschätzung des Thearubigengehaltes durch Flächenvergleich mittels HPLC-DAD

Um die ungefähre Entwicklung des Thearubigengehaltes während eines Versuches (z. B. einer Modelloxidation oder eines Lagerversuchs) direkt verfolgen zu können, wird die Probe mittels HPLC-DAD (HPLC-System 1 oder 2) analysiert. Im HPLC-Chromatogramm wird die Fläche des Thearubigen-Humps innerhalb festgelegter Integrationsgrenzen ermittelt und die Flächen sämtlicher aufgelöster Signale, die aus dem Hump herausragen, davon abgezogen. Die erhaltene Fläche kann bei gleichbleibenden Messparametern mit den Werten anderer Proben verglichen werden.

#### 5.4.1.5 Analyse von Schwarztee-Extrakten mittels HPLC-DAD an einer Diol-Phase

##### Durchführung

2,5 mg eines Schwarztee-Extraktes werden in 0,5–1,0 mL Wasser gelöst. Anschließend wird mit Acetonitril auf ein Gesamtvolumen von 5 mL aufgefüllt. Nach Mikrofiltration erfolgt die Messung mittels HPLC-DAD (HPLC\_System 5).

##### Auswertung

Die Auswertung erfolgt anhand der Retentionszeit, wobei die TRs nach ca. 24 min eluieren (**Abb. 3–54**). Mit Hilfe des Chromatogramms kann die Reinheit einer Thearubigenfraktion abgeschätzt werden.

#### 5.4.1.6 Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu

Die Messung des Gesamtpolyphenolgehaltes wird kolorimetrisch nach der ISO-Methode 14502-1:2005 vorgenommen.<sup>276</sup>

#### 5.4.1.7 Bestimmung der Farbintensität

##### Durchführung

##### *A – Trockene Extrakte*

Zur Bestimmung der Farbintensität (engl.: *total colour*) eines Tee-Extraktes wird eine wässrige Lösung des Extraktes ( $c = 0,5 \text{ mg/mL}$ ) hergestellt und deren Extinktion gegen Wasser photometrisch bei 460 nm im Fixed-Wavelength-Modus gemessen (s. Abschnitt 5.3.4). Die zu untersuchenden Extrakte werden i. d. R. dreimal, mindestens jedoch zweimal eingewogen und zur Messung eingesetzt.



### *B – Proben aus Modellfermentationen*

Die Farbintensitätsmessung erfolgt im Rahmen der Modelloxidationen mit den bereits via HPLC analysierten Proben. Diese werden aus den HPLC-Vials in Polystyrol-Küvetten überführt und wie unter **A** direkt zur photometrischen Messung bei 460 nm eingesetzt.

#### Auswertung

Die ermittelten Extinktionen geben die Farbintensität bei 460 nm und damit einen Anhaltspunkt bezüglich der sogenannten Gesamtfarbintensität (engl.: *total color*) wieder. Über den Vergleich mit anderen Proben kann die Farbentwicklung nachvollzogen werden.

#### **5.4.1.8 Herstellung von XAD-7-Extrakten**

##### Durchführung

Schwarztee wird in einem Erlenmeyerkolben mit kochendem Wasser aufgegossen (z. B. 100 g Teeblätter mit 2 L Wasser) und nach 10-minütigem Ziehen unter gelegentlichem Rühren mit fließendem Wasser abgekühlt. Nach Filtration (Macherey-Nagel 615  $\frac{1}{4}$  Filter) wird der wässrige Extrakt langsam auf eine mit Amberlite® XAD-7 Adsorberharz gefüllte und mit Wasser konditionierte Säule aufgebracht (Abschnitt 5.3.3.1). Die Säule wird mit ca. 4 L Wasser gespült und anschließend die anhand ihrer dunkelbraunen Farbe gut erkennbare phenolreiche Fraktion mit Methanol eluiert (ca. 1–2 Tropfen/s). Das Eluat wird am Rotationsverdampfer stark eingengt, mit Wasser verdünnt und gefriergetrocknet.

#### **5.4.1.9 Ermittlung geeigneter Lösungsmittelsysteme für die CCC**

##### Durchführung

Unter Berücksichtigung der Polarität der Probe wird eine Auswahl an Lösungsmitteln getroffen. Diese werden in Milliliter-Schritten und verschiedenen Kombinationen in verschließbare Rollrandgefäße pipettiert. Das Verhältnis der Lösungsmittel sollte so gewählt werden, dass die sich ausbildenden Phasen ein etwa gleichgroßes Volumen besitzen. Die Gefäße werden verschlossen, kräftig geschüttelt und anschließend beobachtet, ob es innerhalb von 20 Sekunden zur Ausbildung einer klaren Phasengrenze kommt. Alle Lösungsmittelkombinationen, die diesen Anforderungen entsprechen, werden anschließend mit wenigen mg des Probenmaterials versetzt. Nach erneuter Durchmischung wird geprüft, ob es zu einer Beeinträchtigung der Phasenbildung kommt.

##### Messung und Auswertung

Von beiden Phasen werden je 0,5 mL abgenommen, das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in 1 mL HPLC-Fließmittel A aufgenommen. Die erhaltenen Lö-



## Material und Methoden

sungen werden mikrofiltriert, in HPLC-Vials überführt und mittels HPLC-DAD (HPLC\_System 1 oder 2) analysiert. Im Anschluss wird der Quotient der jeweiligen Peakflächen des Analyten in den einzelnen Phasen, der sog. K-Wert, bestimmt. Die Berechnung des K-Wertes erfolgt gemäß Gleichung 5–5:

$$K = \frac{\text{Peakfläche [mAU]}_{\text{stationäre Phase}}}{\text{Peakfläche [mAU]}_{\text{mobile Phase}}} \quad (5-5)$$

Weitere Erläuterungen zum K-Wert finden sich in Abschnitt 1.4.2.

### 5.4.2 Isolierung von Thearubigenen

#### 5.4.2.1 Roberts'-Fraktionierung

Die ersten Durchführungen der Roberts'-Fraktionierung erfolgten in naher Anlehnung an die Beschreibungen von ROBERTS et al. (1957) bzw. BAILEY et al. (1994) (s. Abschnitt 3.2.1.1).<sup>150, 191</sup> Auf Grundlage der Ergebnisse wurde die nachfolgend dargelegte Vorgehensweise entwickelt.

##### Durchführung

50 g Schwarztee werden in einem Nylon-Netz in einen 2 L-Erlenmeyerkolben gegeben und mit 1 L kochendem Wasser übergossen. Nach 10-minütiger Ziehzeit und gelegentlichem Umrühren wird das Netz mit dem Tee entfernt und der Aufguss durch einen Faltenfilter filtriert (Macherey-Nagel 615 ¼ Filter, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren). Das Filtrat wird unter fließendem Wasser auf Raumtemperatur abgekühlt und 2 x mit je 500 mL Ethylacetat über einen Zeitraum von mindestens 6 Stunden auf einem Schüttelbad bei mittlerer Schüttelintensität extrahiert. Anschließend werden die organische und die wässrige Phase voneinander getrennt. Zum Erhalt der SI-Fraktion wird die organische Phase mit Wasser gewaschen und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wird in ca. 5–10 mL Aceton aufgenommen. Um Coffein zu binden und die Thearubigenfraktion auszufällen, werden langsam 500 mL Chloroform hinzugefügt. Der Niederschlag wird mit einem Büchnertrichter abgetrennt und erneut in Aceton gelöst. Unter kontinuierlichem Rühren wird tropfenweise Diethylether hinzugegeben, wodurch sich ein braun-gelber Niederschlag bildet. Dieser wird abfiltriert, mit Diethylether gewaschen und im Exsikkator getrocknet.

→ SI-Fraktion

Zur Herstellung der SII- und SIa-Fractionen wird die wässrige Phase 2 x mit je 400 mL *iso*-Butanol über einen Zeitraum von mindestens 6 Stunden auf einem Schüttelbad extrahiert. Die organischen Phasen werden von der wässrigen Phase getrennt, mit Wasser gewaschen und vereint. Nach Ansäuerung mit 1 M Schwefelsäure wird die wässrige Phase erneut 2 x mit



## Material und Methoden

je 250 mL *iso*-Butanol in einem Scheidetrichter extrahiert. Die organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen und mit dem bereits erhaltenen *iso*-Butanolextrakt vereinigt. Am Rotationsverdampfer wird das Lösungsmittel der butanolischen Extrakte entfernt und der Rückstand in ca. 5 mL Methanol aufgenommen. Unter Rühren wird nun langsam Diethylether hinzugefügt, bis ein rot-brauner Niederschlag gebildet wird. Dieser wird abfiltriert und im Exsikkator getrocknet.

→ SII-Fraktion

Das Filtrat wird unter vermindertem Druck bis zur Trockene eingengt und der gelbliche Rückstand in wenig Aceton aufgenommen. Es wird erneut Diethylether zugegeben, wobei ein gelber Feststoff ausfällt. Dieser wird abfiltriert und getrocknet.

→ SIa-Fraktion

### Messung

Die erhaltenen Fraktionen werden mittels HPLC-DAD (HPLC\_System 1 und 4) analysiert.

#### **5.4.2.2 Coffein-Fällung**

Die Coffein-Fällung wird gemäß der Beschreibung von KUHNER et al. (2010) durchgeführt.<sup>173</sup>

### Durchführung

15 g Schwarztee werden in einem Erlenmeyerkolben mit 300 mL kochendem Wasser übergossen und 10 min unter gelegentlichem Rühren extrahiert. Der Aufguss wird unter fließendem Wasser auf Raumtemperatur abgekühlt und 40 mM Coffein unter Rühren zugegeben. Der dabei gebildete Niederschlag wird über einen Zeitraum von 2 Stunden bei 7 °C gealtert und anschließend durch Zentrifugation (Zentrifuge 1) abgetrennt. Mit 100 mL kochendem Wasser wird der feste Rückstand gelöst und 5 x mit je 100 mL Ethylacetat im Scheidetrichter extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Unter vermindertem Druck wird das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand bildet die „TF-Fraktion“. Die verbliebene wässrige Phase wird auf 80 °C temperiert und das Coffein durch dreimalige Extraktion mit je 100 mL Chloroform entfernt. Nach Gefrier-trocknung wird die „TR-Fraktion“ erhalten.

### Messung

Die gewonnenen Fraktionen werden mittels HPLC-DAD (HPLC\_System 1 und 5) analysiert.



#### 5.4.2.3 Isolierung mittels XAD-7 und HSCCC

Die im Folgenden beschriebene Vorgehensweise basiert auf der Methode von DEGENHARDT et al. (2000).<sup>196</sup>

##### Durchführung

Der XAD-7-Extrakt wird gemäß Abschnitt 5.4.1.8 hergestellt.

Im nächsten Schritt wird eine Trennung via HSCCC (Abschnitt 5.3.2.1, HSCCC\_System 1) durchgeführt. Pro Lauf werden ca. 1–2 g des XAD-7-Extraktes in je 16 mL stationärer und mobiler Phase gelöst und nach Filtration durch einen Faltenfilter (Macherey-Nagel 615 ¼, ø 150 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) durch die Probenschleife injiziert. Das Eluat wird mit Hilfe eines Fraktionensammlers in Reagenzgläsern aufgefangen und im Anschluss an die Trennung zu Fraktionen vereint. Hierbei entsprechen die ersten Reagenzgläser nach Durchbruch der Fließmittelfront dem Hauptsignal der Trennung und weisen eine besonders intensive Braunfärbung auf. Hieraus wird die Fraktion 1 (*TR-Fraktion*) gebildet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mit Wasser verdünnt und gefriergetrocknet.

##### Messung

Die erhaltenen Fraktionen werden mittels HPLC-DAD (HPLC\_System 1 und 5) analysiert.

#### 5.4.2.4 Erweiterte Methode mittels HSCCC und HPCCC

##### Durchführung

##### *HSCCC*

Als Ausgangsmaterial wird ein XAD-7-Extrakt wie unter 5.4.1.8 beschrieben hergestellt und vor der Gefrierdrying zusätzlich durch dreifaches Ausschütteln mit Dichlormethan entcoffeiniert. Etwa 2 g des so gewonnenen Extraktes werden in je 16 mL stationärer und mobiler Phase von HSCCC\_System 2 gelöst und nach Filtration (Macherey-Nagel 615 ¼, ø 150 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) zur HSCCC-Trennung eingesetzt. Die Hauptfraktion eluiert mit und kurz nach dem Durchbruch der Fließmittelfront. Um eine weitere TR-Fraktion zu erhalten, wird die Trennung beendet, erneut stationäre Phase vom Head-Ende in Richtung Tail-Ende eingepumpt und das Eluat fraktioniert aufgefangen. Nach ca. 390 min wird die zweite TR-Fraktion erhalten. Die Reagenzglasfraktionen werden unter Berücksichtigung des Chromatogramms und ihrer Farbintensität so vereinigt, dass sie zwei Thearubigen-Fraktionen bilden. Diese werden am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit, mit Wasser verdünnt und gefriergetrocknet.



### HPCCC

Bis zu 500 mg der HSCCC-Fraktion 1 werden in 5 mL eines 1:1-Gemisches aus stationärer und mobiler Phase von HPCCC\_System 1 gelöst und nach Mikrofiltration in die HPCCC injiziert. Die Probe eluiert in einem Peak, welcher fraktioniert aufgefangen und in 3–4 Fraktionen eingeteilt wird. Nach Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer und Verdünnung mit Wasser werden diese gefriergetrocknet. Die erste Fraktion stellt die reinste TR-Fraktion dar.

#### Messung

Die erhaltenen Fraktionen werden mittels HPLC-DAD (HPLC\_System 1 und 5) analysiert.

### 5.4.3 Isolierung von Catechinen

#### 5.4.3.1 Isolierung und Anreicherung von Catechinen mittels HSCCC

##### Durchführung

2 g Probe (weißer Instanttee bzw. Sunphenon 80SK) werden in je 16 mL der beiden Phasen des Fließmittelsystems gelöst, durch einen Faltenfilter filtriert (Macherey-Nagel 615 ¼, Ø 150 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) und in die Probenschleife der HSCCC injiziert. Die Trennung erfolgt gemäß HSCCC\_System 5. Das Eluat wird aufgefangen und anhand des HSCCC-Chromatogramms sowie evtl. nach zusätzlicher HPLC-Analyse (HPLC\_System 1) in ECG-, EGCG- und EGC-haltige Fraktionen eingeteilt (Retentionszeiten s. **Abb. 3–2**). Anschließend werden diese Fraktionen unter reduziertem Druck vom Lösungsmittel befreit, mit Wasser verdünnt, gefriergetrocknet und ausgewogen.

##### Messung und Auswertung

Zur Überprüfung der Reinheit werden die Fraktionen mittels HPLC-DAD (HPLC\_System 1) untersucht. Die chromatographische Reinheit wird als prozentualer Anteil der Fläche des Analyten (z.B. EGCG) an der Gesamtfläche aller Signale bei 278 nm angegeben.

#### 5.4.3.2 Aufreinigung von EGC an Sephadex LH-20

##### Durchführung

Das Säulenmaterial Sephadex LH-20 wird im Fließmittel (Chloroform/Methanol/Petrolether, 1:2:1, v/v) aufgeschwemmt und weitgehend luftblasenfrei in die Säule gefüllt (vgl. Abschnitt 5.3.3.2). Etwa 300–400 mg der mit EGC angereicherten HSCCC-Fraktionen werden in einem möglichst kleinen Volumen des Fließmittels gelöst und auf die Säule gegeben. Bei einem Fluss von 0,2 mL/min wird das Eluat nach UV-Detektion mit Hilfe eines Fraktionensammlers in Reagenzgläsern aufgefangen. Das EGC eluiert in einem breiten Peak. Die korrespondie-



renden Reagenzgläser werden, evtl. nach Überprüfung per HPLC-DAD, vereinigt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wird mit Wasser aufgenommen, gefriergetrocknet und ausgewogen.

#### Messung und Auswertung

Zur Überprüfung der Reinheit werden die Fraktionen mittels HPLC-DAD (HPLC\_System 1) untersucht. Die chromatographische Reinheit wird als prozentualer Anteil der Fläche des EGC an der Gesamtfläche aller Signale bei 278 nm angegeben.

### **5.4.4 Modelloxidationen mit PPO und POD aus *C. sinensis***

#### **5.4.4.1 Herstellung des polyphenolfreien Teeblattmaterials**

Frisch geerntete Blätter von *C. sinensis* (400 g) werden über Nacht bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert und anschließend unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff gemahlen. In einem mittels Eisbad gekühlten Stahlbehältnis wird das Teeblattpulver zu 500 mL Aceton gegeben. Die entstandene Suspension wird mit einem Silverson Mixer 15 min durchmischt und sofort bei vermindertem Druck abfiltriert (Whatman Filterpapier No. 40). Der Filtrerrückstand wird mit kaltem Aceton gewaschen und die Extraktion noch drei Mal wiederholt. Daraufhin wird das Blattpulver fünf weitere Male mit Wasser-Aceton-Mischungen (je 500 mL) in der folgenden Reihenfolge extrahiert: 75% Aceton  $\rightarrow$  50% Aceton  $\rightarrow$  25% Aceton  $\rightarrow$  50% Aceton  $\rightarrow$  75% Aceton. Im letzten Schritt wird das Teeblattpulver erneut mit kaltem Aceton gewaschen und gefriergetrocknet.

#### **5.4.4.2 Bestimmung des Restpolyphenolgehaltes**

Die Bestimmung des Restpolyphenolgehaltes erfolgt in Anlehnung an die Methode ISO 14502-2.

#### Benötigte Lösungen

##### *Stabilisierungslösung:*

Je 12,5 mg EDTA und Ascorbinsäure werden in einen 50 mL-Messkolben eingewogen, welcher anschließend mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt wird.

#### Durchführung

Etwa 40 mg des Blattmaterials werden in ein Eppendorfgefäß genau eingewogen, mit 1 mL 70%igem Methanol versetzt und innerhalb von 10 min auf  $70^{\circ}\text{C}$  erhitzt. Nach 5 und nach 10 min wird die Suspension jeweils mit einem Vortexer durchmischt. Es folgt eine Zentrifugation bei 6000 rpm (Zentrifuge 2). Im Anschluss wird der Überstand (*Extrakt*) abgenommen und der Rückstand zwei weitere Male extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden mit 210  $\mu\text{L}$



der Stabilisierungslösung versetzt und nach Mikrofiltration zur Analyse mittels HPLC-DAD (HPLC\_System 1 und 2) eingesetzt.

#### Auswertung

Die extrahierten Bestandteile werden anhand ihrer Retentionszeiten und UV-Spektren identifiziert und gemäß Abschnitt 5.4.1.1 quantifiziert.

#### **5.4.4.3 Bestimmung der Enzymaktivität im Teeblattmaterial**

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte in Anlehnung an die Methode von BONNELLY et al. (2003) und wurde auf die veränderte Enzymquelle (gefriergetrocknetes Teeblattpulver anstelle von frischen und zerkleinerten Teeblätter) angepasst.<sup>143</sup> Zur Sicherstellung einer ausreichenden Enzymaktivität wurde die Messung jeweils kurz nach Erhalt des Blattmaterials aus Indien durchgeführt. Die Aktivitäten von PPO und POD werden jeweils einzeln ermittelt.

#### Benötigte Lösungen

##### *Enzympuffer:*

1,42 g Natriumsulfat, 488 mg 2-(N-morpholino)-Ethansulfonsäure und 7,83 mg Benzamidin-Hydrochlorid werden in einen 50 mL-Messkolben eingewogen und mit 150 µL Triton X-100 versetzt. Der Kolben wird mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt und anschließend mit 2,5 M Natronlauge ein pH-Wert von 2,5 eingestellt.

##### *(+)-Catechin-Lösung:*

37,0 mg (+)-Catechin-monohydrat werden in einen 2 mL-Messkolben eingewogen und dieser mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

##### *Stopplösung:*

In einem 100 mL-Messkolben werden 60 mL Acetonitril und 10 mL Eisessig vorgelegt. Der Kolben wird anschließend mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

##### *Wasserstoffperoxid-Lösung:*

0,5 mL einer 30%igen Wasserstoffperoxid-Lösung werden in einem 10 mL-Messkolben vorgelegt und dieser anschließend mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

##### *Natriumphosphat-Citrat-Puffer:*

In je einen 100 mL-Messkolben werden 3,57 g Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat bzw. 1,93 g Citronensäure eingewogen und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. 50 mL der Natriumphosphat-Lösung sowie 40 mL der Citronensäure-Lösung werden in einen weiteren 100 mL-Messkolben überführt und dieser mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Der pH-Wert





## Material und Methoden

des Natriumphosphat-Citrat-Puffers wird kontrolliert und ggf. mit der Natriumphosphat- bzw. der Citronensäure-Lösung auf einen pH-Wert von 5,50 eingestellt.

### Durchführung

100 mg des Teeblattmaterials werden in ein Zentrifugenglas eingewogen, mit 3 mL Enzym-puffer versetzt und über einen Zeitraum von 30 Minuten unter Kühlung mit Eis gerührt. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation (Zentrifuge 1) für 20 min bei 3500 rpm. Der flüssige Überstand wird entnommen und als Enzymextrakt für die Bestimmung eingesetzt.

### *Bestimmung der PPO-Aktivität:*

1,38 mL des Natriumphosphat-Citrat-Puffers werden zusammen mit 75 µL der Catechin-Lösung in eine Küvette gegeben und 10 min im Trockenofen bei 40 °C temperiert. Direkt im Anschluss werden 50 µL des Enzymextraktes hinzugefügt und die Extinktion in 5-Sekunden-Abständen über einen Zeitraum von 25–30 min photometrisch (Abschnitt 5.3.4) bei 400 nm gegen Wasser gemessen.

### *Bestimmung der POD-Aktivität:*

Zusätzlich zu 1,38 mL Natriumphosphat-Citrat-Puffer und 75 µL Catechin-Lösung werden 25 µL Wasserstoffperoxid-Lösung in die Küvette gegeben. Es folgt eine 10-minütige Temperierung bei 30 °C. Nach Zugabe von 50 µL des Enzymextraktes wird die Messung identisch zur PPO-Aktivitätsbestimmung durchgeführt.

### *Bestimmung des Blindwertes:*

Für beide Enzyme ist die Ermittlung eines Blindwertes notwendig. Hierzu werden die Aktivitätsbestimmungen wie oben beschrieben durchgeführt, wobei jeweils vor Zugabe des Enzymextraktes 100 µL der Stopplösung in die Küvette pipettiert werden.

### *Bestimmung der Trockenmasse:*

Um im nächsten Schritt die Aktivitätsrate berechnen zu können, muss die Trockenmasse des Enzymextraktes mittels Dialyse bestimmt werden. Dazu wird 1 mL des Enzymextraktes in einen Dialysierschlauch mit einer Ausschlussgrenze von 14 kDa (Visking, Cellulose Typ 20/32 Inch, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) gegeben und während 24 Stunden in einem mit ca. 2 L Wasser gefüllten Erlenmeyerkolben extrahiert. Anschließend wird der Inhalt des Dialysierschlauches gefriergetrocknet und ausgewogen.

### Auswertung

Die während der Catechin-Umsetzung mit PPO und POD gemessenen Extinktionen werden nach Subtraktion des jeweiligen Blindwertes graphisch gegen die Zeit aufgetragen. Zur Ermittlung der Umsetzungsrate wird die Steigung des linearen Bereichs bestimmt. Diese wird



## Material und Methoden

zusammen mit der Trockenmasse pro 100  $\mu\text{L}$  Enzymextrakt ( $\cong 1/10$  der gemessenen Auswaage) in Gleichung 5–6 eingesetzt, gemäß der sich die Enzymaktivität EA wie folgt ergibt:

$$EA \left[ \frac{\mu\text{A}}{\text{min} \cdot \text{g}} \right] = \frac{\text{Umsetzungsrate} \left[ \frac{\mu\text{A}}{\text{min}} \right]}{\text{Trockengewicht} \left[ \text{g} \right]} \quad (5-6)$$

### 5.4.4.4 Durchführung der Modelloxidationen

Die Durchführung der Modelloxidationen erfolgt in Anlehnung an die Methode von BONNELY et al. (2003), welche in einigen Punkten verändert wurde.

#### Benötigte Lösungen

##### *Stabilisierungslösung:*

Je 12,5 mg EDTA und Ascorbinsäure werden in einen 50 mL-Messkolben eingewogen und dieser anschließend mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

##### *Stopplösung:*

In einen 100 mL-Messkolben werden 60 mL Acetonitril und 10 mL Eisessig vorgelegt. Danach wird der Kolben mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

##### *Wasserstoffperoxid-Lösung:*

0,5 mL einer 30%igen Wasserstoffperoxid-Lösung werden in einem 10 mL-Messkolben vorgelegt, der anschließend mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt wird.

#### Durchführung

Die jeweils in den Versuchen eingesetzten Mengen und Volumina sowie weitere Parameterdaten wie Temperatur und Substratkombinationen können **Tab. 3-6** entnommen werden. Im Allgemeinen werden die Modelloxidationen wie folgt durchgeführt:

Das enzymhaltige, polyphenolfreie Blattmaterial aus Abschnitt 5.4.4.1 wird in einen 250 mL-Dreihalskolben eingewogen, in 10 mL Wasser suspendiert und mit einem Rührkern versehen. Der Dreihalskolben wird in ein temperaturkontrolliertes Wasserbad oberhalb eines Magnetrührers gehängt und auf die gewünschte Temperatur gebracht. Zur Kontrolle wird ein Thermometer durch einen der Seitenhalse in die Lösung getaucht. Parallel dazu werden die als Substrate vorgesehenen Flavanole in einen Erlenmeyerkolben eingewogen und in der zum gewünschten Gesamtvolumen fehlenden Menge Wasser gelöst. Die Flavanol-Lösung wird ebenfalls temperiert. Währenddessen werden für jeden geplanten Probenahmezeitpunkt zwei Schnapdeckelgläser bereitgestellt, von denen je eines mit 700  $\mu\text{L}$  der Stopplösung und eines mit 158  $\mu\text{L}$  der Stabilisierungslösung versehen wird.



## Material und Methoden

Der nächste Schritt erfolgt in Abhängigkeit von der gewünschten Enzymaktivität:

### *Oxidation mit PPO*

Eine Pasteurpipette, deren Ende mit einem Anschluss für synthetische Luft (20,5 Vol.-% O<sub>2</sub>; 79,5 Vol.-% N<sub>2</sub>) verbunden ist, wird in den noch freien Seitenhals des Kolbens gehängt und dieser mit Parafilm (Parafilm „M“ Laboratory Film, Bemis Company, Inc., Neenah, WI, USA) abgedichtet. Zum Start der Reaktion wird die Flavanol-Lösung in den Kolben gegeben. Gleichzeitig wird ein konstanter Gasfluss so eingestellt, dass die Lösung zwar ausreichend durchspült, eine zu starke Blasenbildung aber vermieden wird.

### *Oxidation mit PPO + POD*

Kurz vor der Zugabe der Flavanol-Lösung in den Reaktionskolben wird diese mit 1,95 mL der Wasserstoffperoxid-Lösung versetzt. Alle anderen Schritte werden entsprechend der Oxidation mit PPO ausgeführt.

### *Oxidation mit POD*

Die Teeblatt-Suspension sowie die in diesem Fall in einem verschließbaren Kolben befindliche Flavanol-Lösung werden mit Inertgas (Stickstoff oder Helium) durchspült, um darin gelösten Sauerstoff auszutreiben. Der Dreihalskolben wird mit einer Membranpumpe evakuiert und daraufhin Argon eingeleitet (in ersten Versuchen wurde Helium verwendet). Auch der Kolben mit der Flavanol-Lösung wird mit Argon befüllt und bis zum Versuchsstart verschlossen. Kurz vor Beginn werden 1,95 mL der Wasserstoffperoxid-Lösung zur Flavanol-Lösung gegeben und diese anschließend in den Reaktionskolben überführt. Um den Sauerstoffeintrag möglichst gering zu halten, wird währenddessen Argon eingeleitet. Der Kolben wird verschlossen und nur zur Probenahme, jeweils begleitet von einer Einleitung des Edelgases, geöffnet.

Zu jedem Probenahmezeitpunkt werden 2 mL der Reaktionslösung mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette entnommen. Die Behandlung der Proben und die weiteren Schritte erfolgen unabhängig von der Enzymwahl für alle Ansätze gleich. Die Proben werden direkt in je eines der mit Stopplösung versehenen Schnappdeckelgefäße überführt und die Lösungen vorsichtig durchmischt. Die Hälfte der so erhaltenen Lösung (1,35 mL) wird in eines der Gefäße mit der Stabilisierungs-Lösung pipettiert. Beide Probelösungen werden zügig in ein HPLC-Vial mikrofiltriert und entweder direkt zur Messung eingesetzt oder tiefgefroren. Proben mit Stabilisierungs-Lösung werden dabei zur Analyse mittels HPLC-DAD (HPLC\_Systeme 1, 2 und 3) eingesetzt, während diejenigen, welche nur mit Stopplösung versetzt wurden, zur Messung per HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup> (LC-MS\_System 1) herangezogen werden.



### Auswertung

Zur Auswertung der Versuche werden die Gehalte an Flavanolen, Gallussäure und Theaflavinen nach den Methoden aus Abschnitt 5.4.1.1 und 0 sowie die Fläche des Thearubigen-Hügels im Chromatogramm bei 278 nm (HPLC\_System 1 oder 2) bestimmt. Darüber hinaus erfolgt die Identifizierung weiterer Oxidationsprodukte mittels HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup> (LC-MS\_System 1).

## **5.4.5 Modellfermentationen mit Meerrettich-Peroxidase**

### **5.4.5.1 Herstellung der Blattmatrix**

Etwa 3 g eines losen Blatttees werden im Mörser fein gemahlen und in einen Erlenmeyerkolben überführt. Zur Extraktion werden 100 mL 70%iges und auf 40 °C temperiertes Methanol<sub>(aq)</sub> zugegeben und der Kolben für 15 min und unter gelegentlichem Schwenken in ein ebenfalls auf 40 °C eingestelltes Wasserbad gehängt. Der flüssige Extrakt wird entfernt und die Extraktion der Teeblätter noch zweimal wiederholt. Die extrahierten Blätter werden gefriergetrocknet und bis zum Einsatz als Blattmatrix trocken und verschlossen aufbewahrt.

### **5.4.5.2 Bestimmung des Restpolyphenolgehaltes in der Blattmatrix**

Die Bestimmung erfolgt wie in Abschnitt 5.4.4.2 beschrieben. Abweichend davon werden 200 mg des nach Abschnitt 5.4.5.1 extrahierten Blattmaterials eingewogen und die Extraktion mit 5 mL des 70%igen Methanols<sub>(aq)</sub> durchgeführt. Die Zentrifugation (Zentrifuge 1) findet über einen Zeitraum von 10 min bei 3500 rpm statt.

### **5.4.5.3 Bestimmung der Enzymaktivität der HR-POD**

Die Bestimmung erfolgt wie in Abschnitt 5.4.4.3 für die endogene POD beschrieben. Da es sich um ein weitgehend reines Enzym handelt, werden nur 0,17 mg der HR-POD eingewogen und in 3 mL des Enzypuffers nach Abschnitt 5.4.4.3 gelöst. Eine Extraktion via Zentrifuge ist nicht notwendig, die Enzymlösung muss jedoch vor Zugabe in die Messküvette 1:10 verdünnt werden.

### **5.4.5.4 Durchführung der Modelloxidation mit HR-POD und/oder Blattmatrix**

#### Benötigte Lösungen

Enzymlösung:	0,50 ± 0,02 mg HR-POD werden in ein Becherglas eingewogen und in 4 mL Wasser gelöst.
Stabilisierungslösung:	Siehe Abschnitt 5.4.4.4
Stopplösung:	Siehe Abschnitt 5.4.4.4



Wasserstoffperoxid-Lösung: Siehe Abschnitt 5.4.4.4

#### Durchführung

Die Einwaagen und weiteren Parameter der einzelnen Versuche sind in Anhang 7.6 aufgeführt.

Die jeweiligen Reaktionsedukte (Flavanole oder Theaflavin-Mischung) werden in einen Erlenmeyerkolben eingewogen und in Wasser gelöst. Das Wasservolumen wird so gewählt, dass nach Zugabe aller anderen Komponenten ein Gesamtvolumen von 100 mL erhalten wird. Die Lösung wird in einen 250 mL-Dreihalskolben überführt und ein Rührkern zugegeben. Über einen Seitenarm des Kolbens erfolgt die Zufuhr von synthetischer Luft, welche durch eine Pasteurpipette in die Lösung geleitet wird. Je nach gewünschter Versuchsanordnung werden 1,55 mL der Wasserstoffperoxid-Lösung, die Teeblattmatrix nach Abschnitt 5.4.5.1 und zuletzt die Enzymlösung zugegeben. Die Reaktion findet bei Raumtemperatur (ca. 20 °C), unter Rühren und konstanter, moderater Luftzufuhr statt und wird nach 300 min beendet. Die Probenahme erfolgt verteilt über die gesamte Versuchsdauer. Dabei wird gemäß der Beschreibung in Abschnitt 5.4.4.4 vorgegangen.

#### Auswertung

Siehe Abschnitt 5.4.4.4

### **5.4.6 Modelloxidationen ohne Enzyme**

#### Benötigte Lösungen

Stabilisierungslösung: Siehe Abschnitt 5.4.4.4

Stopplösung: Siehe Abschnitt 5.4.4.4

Wasserstoffperoxid-Lösung: Siehe Abschnitt 5.4.4.4

#### Durchführung

70 mg EC bzw. EGCG werden in einen Dreihalskolben eingewogen, in dem in **Tab. 3-18** angegebenen Volumen Wasser gelöst und ein Rührkern zugefügt. Der Kolben wird in einem Wasserbad oberhalb eines Magnetrührers positioniert und temperiert. Zum Start der Reaktion wird ein Strom synthetischer Luft in die Lösung geleitet, dann werden 1,95 mL der Wasserstoffperoxid-Lösung hinzupipettiert. Die Probenahme erfolgt stündlich über einen Zeitraum von insgesamt 6 Stunden. Dabei wird gemäß der Beschreibung in Abschnitt 5.4.4.4 vorgegangen.

#### Auswertung

Siehe Abschnitt 5.4.4.4



### 5.4.7 Lagerversuche

Ein Schwarztee-Extrakt wird gelöst und über einen Zeitraum von sechs Monaten bei unterschiedlichen Bedingungen gelagert. Als Ausgangsmaterial findet ein HSCCC-Extrakt entsprechend der Fraktion 3Ex aus **Abb. 3–59** (Abschnitte 3.2.2.2 und 5.4.2.4) Verwendung. Daraus werden insgesamt 2 x 10 Probenlösungen hergestellt, welche den Extrakt mit einer Konzentration von jeweils 2,5 mg/mL enthalten. Durch Analysen werden die Veränderungen im Laufe der Lagerung verfolgt.

#### Durchführung

**Probe:** Vereinigte HSCCC-Fractionen 3Ex gemäß Abschnitt 5.4.2.4., hergestellt aus Sumatra- und Ostfriesentee.

Die Probenlösungen werden wie nachfolgend beschrieben angesetzt. Dabei werden alle Ansätze doppelt hergestellt (A und B) und in je 12 Vials mikrofiltriert (Rotilabo Mini-Tip Spritzenfilter, PTFE, 0,45 µm, ø 15 mm; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe). Die Vials werden verschlossen und bis zu ihrem jeweiligen Messeinsatz unter den angegebenen Bedingungen gelagert. Eine Übersicht über die Ansätze und die genauen Einwaagen kann Anhang 7.7 entnommen werden.

**Vergleich:** 25,0 ± 0,1 mg des Tee-Extraktes werden in einen 10 mL-Messkolben eingewogen und dieser mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Der pH-Wert soll bei 2 liegen und wird mittels pH-Meter (Abschnitt 5.3.8) überprüft. Die Lösung wird in Vials mikrofiltriert und bei Raumtemperatur gelagert.

**pH 7 + pH 10:** 62,5 ± 0,1 mg des Tee-Extraktes werden in einen Erlenmeyerkolben eingewogen und in 15 mL 20%igen Acetonitrils<sub>(aq)</sub> gelöst. Mit 10%iger Natronlauge wird auf pH 7 bzw. pH 10 eingestellt, die Lösung quantitativ in einen 25 mL-Messkolben überführt und dieser mit 20%igem wässrigem Acetonitril bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wird in Vials mikrofiltriert und bei Raumtemperatur gelagert.

Für alle weiteren Ansätze wird zunächst eine Stammlösung hergestellt. Dazu werden 250 mg der HSCCC-Fraktion in einen 100 mL-Messkolben eingewogen, der dann mit 20%igem wässrigem Acetonitril bis zur Marke aufgefüllt wird.

**Tiefkühlung:** Die Stammlösung wird direkt in die Vials mikrofiltriert und bei –18 °C gelagert.

**Kühlung:** Die Stammlösung wird direkt in die Vials mikrofiltriert und bei 4 °C gelagert.



## Material und Methoden

RT/pH 2: Die Stammlösung wird direkt in die Vials mikrofiltriert und bei Raumtemperatur gelagert.

Wärme: Die Stammlösung wird direkt in die Vials mikrofiltriert und bei 40 °C gelagert.

Helium: Die Stammlösung wird direkt in die Vials mikrofiltriert und vor dem Verschließen Helium eingeleitet. Zusätzlich zum Deckel werden die Vials mit Parafilm abgedichtet. Die Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur.

Ascorbinsäure:  $3,0 \pm 0,1$  mg Ascorbinsäure werden in einen 10 mL-Messkolben eingewogen und dieser mit der Stammlösung bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wird in Vials mikrofiltriert und bei Raumtemperatur gelagert.

Ethylparaben:  $6,0 \pm 0,1$  mg Ethylparaben werden in einen 10 mL-Messkolben eingewogen und dieser mit der Stammlösung bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wird in Vials mikrofiltriert und bei Raumtemperatur gelagert.

Die Lagerdauer beträgt insgesamt 200 Tage. Die Entnahme der ersten Proben erfolgt am Tag des Abfüllens (Tag 0), die der weiteren in steigenden Abständen bis zum 69. Tag. Am 200. Tag wird eine letzte Probe genommen. Ausgenommen ist der Ansatz *Wärme*, dessen Lagerung nicht über den 69. Tag hinaus fortgeführt wird.

### Messung

Die Probenvials werden nach der Entnahme optisch auf Trübungen untersucht. Betroffene Probengefäße werden geöffnet und die Lösungen erneut mikrofiltriert. Die Analyse der Proben erfolgt mittels HPLC-DAD (HPLC\_System 1).

### Auswertung

Anhand der erhaltenen HPLC-Chromatogramme werden die Konzentrationen von Gallussäure und EGCG gemäß Abschnitt 5.4.1.1 bestimmt, während die Fläche des Thearubigen-Hügels nach Abschnitt 5.4.1.4 ermittelt wird. Darüber hinaus werden die Flächen der Theaflavin-Peaks, welche aus dem TR-Hump herausragen, festgehalten. Die Identifizierung der Theaflavine erfolgt mit Hilfe der Retentionszeiten (TF: 33,4–34,0 min; TF-3-G: 34,5 min; TF-3'-G: 35,0–35,6 min; TF-DG: 35,0–35,2 min) und UV/Vis-Spektren (Anhang 7.3).

Aus den Einzelwerten der Doppelbestimmungen werden Mittelwerte gebildet und diese graphisch als Funktion der Zeit aufgetragen.



## 6 Literatur

1. Deutsche Lebensmittelbuch-Kommission, Leitsätze für Tee, teeähnliche Erzeugnisse, deren Extrakte und Zubereitungen. Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft und Verbraucherschutz, Hrsg. Bundesanzeiger AT 12.12.2013 B6, 2013.
2. Frembgen, J. W., *Tausend Tassen Tee*. Lambert Schneider (Wissenschaftliche Buchgesellschaft): Darmstadt, 2014.
3. Köhler, H. A., *Köhler's Medizinal-Pflanzen*. Verlag Franz Eugen Köhler: Gera, 1897.
4. Banerjee, B., Botanical classification of tea. In *Tea - Cultivation to consumption*, Willson, K. C.; Clifford, M. N., Hrsg. Chapman & Hall: London, UK, 1992. pp 25-51.
5. Scholz, E.; Bertram, B., *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. Der Teestrauch. *Zeitschrift für Phytotherapie* **1995**, *17*, 235-250.
6. Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO), Current Situation and medium Term Outlook for Tea. Intergovernmental Group on Tea, Committee on Commodity Problems, Colombo, Sri Lanka, 2012.
7. Faget, J. *Tee-Plantagen in der EU*. Köln; [http://www.deutschlandfunk.de/tee-plantagen-in-der-eu.795.de.html?dram:article\\_id=115909](http://www.deutschlandfunk.de/tee-plantagen-in-der-eu.795.de.html?dram:article_id=115909) (aufgerufen am 01.03.2015).
8. Maletzke, E., Englischer Tee - Anbauen und Tee trinken. *Die Zeit* 28.05.2014.
9. Finke, B., Tee aus den Highlands. *Süddeutsche Zeitung* 14.03.2015.
10. Schweizer Radio und Fernsehen (SRF), Südschweiz macht Asien Konkurrenz. In *Schweiz aktuell*, Schweiz, 2008.
11. Rubinstein, A. Oddi(teas): Tea Estates in Unlikely Places *Tea & Coffee Trade Journal*, **2008**, 180 (4). <http://www.teaandcoffee.net/0408/tea.htm> (aufgerufen am 02.03.2015).
12. Waetzel, A., Teeplantage am Tuniberg. In *Landesschau*, Südwestrundfunk Freiburg (SWR4): Deutschland, 2015.
13. Höhl, S., Chinesische Teeplantage am Tuniberg trotz dem Frost. *Badische Zeitung* 08.01.2015.
14. Gupta, J.; Siddique, Y. H.; Beg, T.; Ara, G.; Afzal, M., A review on the beneficial effects of tea polyphenols on human health. *International Journal of Pharmacology* **2008**, *4* (5), 314-338.
15. Wang, J.; Schmeisser, K. (Hrsg.), *LuYu - Cha Ching: Das Klassische Buch vom Tee*. Verlag Styria: Graz, 2002.
16. Ukers, W. H., *All about Tea*. Tea and Coffee Trade Journal Company: New York, 1935.
17. Menninger, A., Die Verbreitung von Schokolade, Kaffee, Tee und Tabak in Europa (16.–19. Jahrhundert). Ein Vergleich. *Berner Zeitschrift für Geschichte und Heimatkunde* **2001**, *63* (1), 28-37.
18. Stichwort: Tee. In *Meyers Großes Konversationslexikon. Ein Nachschlagewerk des allgemeinen Wissens.*, Bibliographisches Institut: Leipzig, Wien, 1905-1909.
19. Rohrsen, P., *Der Tee - Anbau, Sorten, Geschichte*. Verlag C.H.Beck: München, 2013.
20. Weisburger, J. H., Tea and health: a historical perspective. *Cancer Letters* **1997**, *114* (1–2), 315-317.
21. Weatherstone, J., Historical introduction. In *Tea - Cultivation to consumption*, Willson, K. C.; Clifford, M. N., Hrsg. Chapman & Hall: London, UK, 1992. pp 1-23.





## Literatur

22. Soshitsu, S.; Takao, I., *Der Geist des Tees*. Theseus Verlag: Berlin, 2004.
23. Deutscher Teeverband e.V., Tee als Wirtschaftsfaktor. Hamburg, 2015; [http://www.teeverband.de/wirtschaft/pdf/Jahresbericht\\_Tee\\_2015.pdf](http://www.teeverband.de/wirtschaft/pdf/Jahresbericht_Tee_2015.pdf) (aufgerufen am 22.07.2015).
24. Gruschke, A.; Zimmermann, A.; Schörner, A., *Tee - Süßer Tau des Himmels*. Gruzim Verlag: Freiburg, 2007.
25. Engelhardt, U. H., Chemistry of Tea. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, Elsevier: 2013.
26. Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO) *World tea production hit record high in 2003*. <http://www.fao.org/Newsroom/en/news/2004/51815/index.html> (aufgerufen am Feb. 25, 2015).
27. Statista *Erzeugung und Exportvolumen von Tee weltweit in den Jahren 2004 bis 2014 (in Millionen Tonnen)*. <http://de.statista.com/statistik/daten/studie/29841/umfrage/weltproduktion-und-exporte-von-tee-seit-2004/> (aufgerufen am 22.07.2015).
28. Deutscher Teeverband e.V., Tee als Wirtschaftsfaktor. Hamburg, 2014; [http://www.teeverband.de/wirtschaft/pdf/WFT\\_2014\\_DE.pdf](http://www.teeverband.de/wirtschaft/pdf/WFT_2014_DE.pdf) (aufgerufen am 08.10.2014).
29. Wolfram, S.; Wang, Y.; Thielecke, F., Anti-obesity effects of green tea: From bedside to bench. *Molecular Nutrition & Food Research* **2006**, *50* (2), 176-187.
30. Rein, M. J.; Renouf, M.; Cruz-Hernandez, C.; Actis-Goretta, L.; Thakkar, S. K.; da Silva Pinto, M., Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. *British Journal of Clinical Pharmacology* **2013**, *75* (3), 588-602.
31. Chacko, S. M.; Thambi, P. T.; Kuttan, R.; Nishigaki, I., Beneficial effects of green tea: A literature review. *Chinese Medicine* **2010**, *5*, 13-13.
32. Crozier, A.; Jaganath, I. B.; Clifford, M. N., Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports* **2009**, *26* (8), 1001-1043.
33. Sturgeon, J. L.; Williams, M.; Van Servellen, G., Efficacy of green tea in the prevention of cancers. *Nursing & Health Sciences* **2009**, *11* (4), 436-446.
34. Sanikini, H.; Dik, V. K.; Siersema, P. D.; Bhoo-Pathy, N.; Uiterwaal, C. S. P. M.; Peeters, P. H. M.; González, C. A.; Zamora-Ros, R.; Overvad, K.; Tjønneland, A.; Roswall, N.; Boutron-Ruault, M.-C.; Fagherazzi, G.; Racine, A.; Kühn, T.; Katzke, V.; Boeing, H.; Trichopoulou, A.; Trichopoulos, D.; Lagiou, P.; Palli, D.; Grioni, S.; Vineis, P.; Tumino, R.; Panico, S.; Weiderpass, E.; Skeie, G.; Braaten, T.; Huerta, J. M.; Sánchez-Cantalejo, E.; Barricarte, A.; Sonestedt, E.; Wallstrom, P.; Nilsson, L. M.; Johansson, I.; Bradbury, K. E.; Khaw, K.-T.; Wareham, N.; Huybrechts, I.; Freisling, H.; Cross, A. J.; Riboli, E.; Bueno-de-Mesquita, H. B., Total, caffeinated and decaffeinated coffee and tea intake and gastric cancer risk: Results from the EPIC cohort study. *International Journal of Cancer* **2015**, *136* (6), E720-E730.
35. Zamora-Ros, R.; Agudo, A.; Luján-Barroso, L.; Romieu, I.; Ferrari, P.; Knaze, V.; Bueno-de-Mesquita, H. B.; Leenders, M.; Travis, R. C.; Navarro, C.; Sánchez-Cantalejo, E.; Slimani, N.; Scalbert, A.; Fedirko, V.; Hjartaker, A.; Engeset, D.; Skeie, G.; Boeing, H.; Förster, J.; Li, K.; Teucher, B.; Agnoli, C.; Tumino, R.; Mattiello, A.; Saieva, C.; Johansson, I.; Stenling, R.; Redondo, M. L.; Wallström, P.; Ericson, U.; Khaw, K.-T.; Mulligan, A. A.; Trichopoulou, A.; Dilis, V.; Katsoulis, M.; Peeters, P. H.; Igali, L.; Tjønneland, A.; Halkjær, J.; Toullaud, M.; Perquier, F.; Fagherazzi, G.; Amiano, P.; Ardanaz, E.; Bredsdorff, L.; Overvad, K.; Ricceri, F.; Riboli, E.; González, C. A., Dietary flavonoid and lignan intake and gastric adenocarcinoma risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *American Journal of Clinical Nutrition* **2012**, *96* (6), 1398-1408.



## Literatur

36. Huxley, R.; Lee, C.; Barzi, F.; et al., Coffee, decaffeinated coffee, and tea consumption in relation to incident type 2 diabetes mellitus: A systematic review with meta-analysis. *Archives of Internal Medicine* **2009**, *169* (22), 2053-2063.
37. The InterAct, C., Tea Consumption and Incidence of Type 2 Diabetes in Europe: The EPIC-InterAct Case-Cohort Study. *PLoS ONE* **2012**, *7* (5), e36910.
38. Kobayashi, Y.; Suzuki, M.; Satsu, H.; Arai, S.; Hara, Y.; Suzuki, K.; Miyamoto, Y.; Shimizu, M., Green Tea Polyphenols Inhibit the Sodium-Dependent Glucose Transporter of Intestinal Epithelial Cells by a Competitive Mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48* (11), 5618-5623.
39. Williamson, G., Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. *Molecular Nutrition & Food Research* **2013**, *57* (1), 48-57.
40. Shoji, Y.; Nakashima, H., Glucose-lowering effect of powder formulation of African black tea extract in KK-Ay/TaJcl diabetic mouse. *Archives of Pharmacal Research* **2006**, *29* (9), 786-794.
41. Friedman, M., Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Molecular Nutrition & Food Research* **2007**, *51* (1), 116-134.
42. Hatano, T.; Kusuda, M.; Hori, M.; Shiota, S.; Tsuchiya, T.; Yoshida, T., Theasinensin A, a tea polyphenol formed from (-)-epigallocatechin gallate, suppresses antibiotic resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Planta Medica* **2003**, *69* (11), 984-989.
43. Satoh, E.; Ishii, T.; Shimizu, Y.; Sawamura, S.-I.; Nishimura, M., A Mechanism of the Thearubigin Fraction of Black Tea (*Camellia sinensis*) Extract protecting against the Effect of Tetanus Toxin. *Journal of Toxicological Sciences* **2002**, *27* (5), 441-447.
44. Jha, A.; Krithika, R.; Manjeet, D.; Verma, R. J., Protective Effect of Black Tea Infusion on Aflatoxin-Induced Hepatotoxicity in Mice. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology* **2013**, *3* (1), 29-36.
45. Szachowicz-Petelska, B.; Skrzydlewska, E.; Figaszewski, Z., Protective effect of black tea on integral membrane proteins in rat liver. *Experimental and Toxicologic Pathology* **2013**, *65* (1-2), 173-179.
46. Reto, M.; Figueira, M.; Filipe, H.; Almeida, C. M., Chemical Composition of Green Tea (*Camellia sinensis*) Infusions Commercialized in Portugal. *Plant Foods for Human Nutrition* **2007**, *62* (4), 139-144.
47. Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. (DGE) *Richtwerte für die Fluoridgesamtaufuhr (Nahrung, Trinkwasser und Supplemente) sowie der Fluoridsupplemente zur Kariesprävention*. Bonn; <http://www.dge.de/wissenschaft/referenzwerte/fluorid/> (aufgerufen am 27.02.2015).
48. Koblar, A.; Tavčar, G.; Ponikvar-Svet, M., Fluoride in teas of different types and forms and the exposure of humans to fluoride with tea and diet. *Food Chemistry* **2012**, *130* (2), 286-290.
49. Jain, A.; Manghani, C.; Kohli, S.; Nigam, D.; Rani, V., Tea and human health: The dark shadows. *Toxicology Letters* **2013**, *220* (1), 82-87.
50. Mai, V.; Katki, H. A.; Harmsen, H.; Gallaher, D.; Schatzkin, A.; Baer, D. J.; Clevidence, B., Effects of a Controlled Diet and Black Tea Drinking on the Fecal Microflora Composition and the Fecal Bile Acid Profile of Human Volunteers in a Double-Blinded Randomized Feeding Study. *Journal of Nutrition* **2004**, *134* (2), 473-478.
51. Fernández-Cáceres, P. L.; Martín, M. J.; Pablos, F.; González, A. G., Differentiation of Tea (*Camellia sinensis*) Varieties and Their Geographical Origin According to their Metal Content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49* (10), 4775-4779.



## Literatur

52. Takeo, T., Green and semi-fermented teas. In *Tea - Cultivation to consumption*, Willson, K. C.; Clifford, M. N., Hrsg. Chapman & Hall: London, UK, 1992. pp 413-457.
53. Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Aluminiumhaltige Antitranspirantien tragen zur Aufnahme von Aluminium bei. Berlin, 2014; <http://www.bfr.bund.de/cm/343/aluminiumhaltige-antitranspirantien-tragen-zur-aufnahme-von-aluminium-bei.pdf> (aufgerufen am 28.02.2015).
54. Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA), *EU Register of nutrition and health claims made on foods*. 2015; <http://ec.europa.eu/nuhclaims/> (aufgerufen am 26.02.2015).
55. Kuhnert, N., Charakterisierung der Thearubigene des schwarzen Tees mittels ultrahochauflösender MS-Methoden. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **2011**, 107 (8), 388-391.
56. Muthumani, T.; Senthil Kumar, R. S., Studies on freeze-withering in black tea manufacturing. *Food Chemistry* **2007**, 101 (1), 103-106.
57. Tea Research Association *Tea Manufacture*. Kolkata Tocklai; <http://www.tocklai.org/activities/tea-manufacture/> (aufgerufen am 14.04.2015).
58. Hampton, M. G., Production of black tea. In *Tea - Cultivation to consumption*, Willson, K. C.; Clifford, M. N., Hrsg. Chapman & Hall: London, UK, 1992. pp 459-511.
59. Baruah, A. M.; Mahanta, P. K., Fermentation Characteristics of Some Assamica Clones and Process Optimization of Black Tea Manufacturing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, 51 (22), 6578-6588.
60. Mahanta, P. K.; Baruah, H. K., Theaflavin pigment formation and polyphenol oxidase activity as criteria of fermentation in orthodox and CTC teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1992**, 40 (5), 860-863.
61. Suzuki, T.; Yamazaki, N.; Sada, Y.; Oguni, I.; Moriyasu, Y., Tissue Distribution and Intracellular Localization of Catechins in Tea Leaves. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2003**, 67 (12), 2683-2686.
62. Hazarika, M.; Chakravarty, S. K.; Mahanta, P. K., Studies on Thearubigin Pigments in Black Tea Manufacturing Systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1984**, 35 (11), 1208-1218.
63. Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P., *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 6 Aufl.; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, 2008.
64. Selvendran, R. R.; Reynolds, J.; Galliard, T., Production of volatiles by degradation of lipids during manufacture of black tea. *Phytochemistry* **1978**, 17 (2), 233-236.
65. International Organization for Standardization (ISO), Black Tea – Definition and Basic Requirements. ISO 3720:2011, 2011.
66. Mahanta, P. K.; Hazarika, M., Chlorophylls and degradation products in orthodox and CTC black teas and their influence on shade of colour and sensory quality in relation to thearubigins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1985**, 36 (11), 1133-1139.
67. Hilal, Y.; Engelhardt, U., Characterisation of white tea – Comparison to green and black tea. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (Journal of Consumer Protection and Food Safety)* **2007**, 2 (4), 414-421.
68. Alcázar, A.; Ballesteros, O.; Jurado, J. M.; Pablos, F.; Martín, M. J.; Vilches, J. L.; Navalón, A., Differentiation of Green, White, Black, Oolong, and Pu-erh Teas According to Their Free Amino Acids Content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, 55 (15), 5960-5965.



## Literatur

69. Hashimoto, T.; Goto, M.; Sakakibara, H.; Oi, N.; Okamoto, M.; Kanazawa, K., Yellow tea is more potent than other types of tea in suppressing liver toxicity induced by carbon tetrachloride in rats. *Phytotherapy Research* **2007**, *21* (7), 668-670.
70. Qin, J.-H.; Li, N.; Tu, P.-F.; Ma, Z.-Z.; Zhang, L., Change in Tea Polyphenol and Purine Alkaloid Composition during Solid-State Fungal Fermentation of Postfermented Tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60* (5), 1213-1217.
71. Kawakami, M.; Kobayashi, A., Carotenoid-Derived Aroma Compounds in Tea. In *Carotenoid-Derived Aroma Compounds*, Winterhalter, P.; Rouseff, R., Hrsg. American Chemical Society: Washington, DC, 2002. Vol. 802, pp 145-159.
72. Gill, M., Specialty and herbal teas. In *Tea - Cultivation to consumption*, Willson, K. C.; Clifford, M. N., Hrsg. Chapman & Hall: London, UK, 1992. pp 513-534.
73. Trautwein, E.; Erbersdobler, H., *Kaffee, Tee, Kakao, Kräutertee*. 2. Aufl.; Auswertungs- und Informationsdienst für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten e.V. (aid): Bonn, 2000. Vol. 1310,
74. Pitelka, M., Introduction to Japanese tea culture. In *Japanese Tea Culture: Art, History and Practice*, Pitelka, M., Hrsg. Routledge: Abingdon, UK, 2003.
75. Tea Association of the USA Inc. *Tea Fact Sheet 2014*. New York; <http://www.teausa.org/14655/tea-fact-sheet> (aufgerufen am 05.05.2015).
76. Stagg, G. V.; Millin, D. J., The nutritional and therapeutic value of tea—a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1975**, *26* (10), 1439-1459.
77. Sang, S.; Lambert, J. D.; Ho, C.-T.; Yang, C. S., The chemistry and biotransformation of tea constituents. *Pharmacological Research* **2011**, *64* (2), 87-99.
78. Fernández, P. L.; Pablos, F.; Martín, M. J.; González, A. G., Study of Catechin and Xanthine Tea Profiles as Geographical Tracers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50* (7), 1833-1839.
79. Scharbert, S.; Hofmann, T., Molecular Definition of Black Tea Taste by Means of Quantitative Studies, Taste Reconstitution, and Omission Experiments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53* (13), 5377-5384.
80. Finger, A.; Kuhr, S.; Engelhardt, U. H., Chromatography of tea constituents. *Journal of Chromatography A* **1992**, *624* (1-2), 293-315.
81. Horanni, R.; Engelhardt, U. H., Determination of amino acids in white, green, black, oolong, pu-erh teas and tea products. *Journal of Food Composition and Analysis* **2013**, *31* (1), 94-100.
82. Almeida, C. M. M.; Figueira, M. E., Chapter 25 - Vitamin K in Green Tea Leaves. In *Tea in Health and Disease Prevention*, Preedy, V. R., Hrsg. Academic Press: 2013. pp 295-305.
83. Drynan, J. W.; Clifford, M. N.; Obuchowicz, J.; Kuhnert, N., The chemistry of low molecular weight black tea polyphenols. *Natural Product Reports* **2010**, *27* (3), 417-462.
84. Roberts, E. A. H.; Myers, M., Theogallin, a polyphenol occurring in tea. II.—Identification as a galloylquinic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1958**, *9* (11), 701-705.
85. Bravo, L., Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews* **1998**, *56* (11), 317-333.
86. Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L., Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* **2004**, *79* (5), 727-747.
87. Kuhnert, N., Polyphenole: Vielseitige Pflanzeninhaltsstoffe. *Chemie in unserer Zeit* **2013**, *47* (2), 80-91.



## Literatur

88. Haslam, E.; Cai, Y., Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. *Natural Product Reports* **1994**, *11*, 41-66.
89. Quideau, S.; Deffieux, D.; Douat-Casassus, C.; Pouységu, L., Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50* (3), 586-621.
90. Lapczynski, S., Untersuchungen über Theaflavine und Flavanole in grünen und schwarzen Tees. Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Papierflieger: Clausthal-Zellerfeld, 2000.
91. Hashimoto, F.; Nonaka, G.-I.; Nishioka, I., Tannins and Related Compounds. CXIV. Structure of Novel Fermentation Products, Theogallinin, Theaflavinin and Desgalloyl Theaflavinin from Black Tea, and Changes of Tea Leaf Polyphenols during Fermentation. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1992**, *40* (6), 1383-1389.
92. Nonaka, G.-I.; Sakai, R.; Nishioka, I., Hydrolysable tannins and proanthocyanidins from green tea. *Phytochemistry* **1984**, *23* (8), 1753-1755.
93. Mizukami, Y.; Sawai, Y.; Yamaguchi, Y., Simultaneous Analysis of Catechins, Gallic Acid, Strictinin, and Purine Alkaloids in Green Tea by Using Catechol as an Internal Standard. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55* (13), 4957-4964.
94. Cuyckens, F.; Claeys, M., Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry* **2004**, *39* (1), 1-15.
95. Lin, L.-Z.; Chen, P.; Harnly, J. M., New Phenolic Components and Chromatographic Profiles of Green and Fermented Teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56* (17), 8130-8140.
96. Lakenbrink, C., Strukturaufklärung und Bestimmung von Proanthocyanidinen und anderen flavonoiden Inhaltsstoffen des Tees. Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Papierflieger: Clausthal-Zellerfeld, 2000.
97. Engelhardt, U. H.; Finger, A.; Kuhr, S., Determination of flavone C-glycosides in tea. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* **1993**, *197* (3), 239-244.
98. Sakamoto, Y., Flavones in Green Tea. Part I: Isolation and Structures of Flavones Occurring in Green Tea Infusion. *Agricultural and Biological Chemistry* **1967**, *31* (9), 1029-1034.
99. Sakamoto, Y., Flavones Occurring in Green Tea. Part II: Identification of Isovitexin and Saponarin in Green Tea Infusion. *Chagyo Kenkyu Hokoku (Tea Research Journal)* **1969**, *1969* (31), 33-36.
100. Wuttke, W.; Jarry, H.; Seidlová-Wuttke, D., Isoflavones—Safe food additives or dangerous drugs? *Ageing Research Reviews* **2007**, *6* (2), 150-188.
101. Esatbeyoglu, T., Analyse wertgebender Inhaltsstoffe von *Aronia melanocarpa* sowie Charakterisierung und Isolierung von Proanthocyanidinen. Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Cuvillier: Göttingen, 2011.
102. Raab, T.; Barron, D.; Vera, F. A.; Crespy, V.; Oliveira, M.; Williamson, G., Catechin Glucosides: Occurrence, Synthesis, and Stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58* (4), 2138-2149.
103. Ojwang, L. O.; Yang, L.; Dykes, L.; Awika, J., Proanthocyanidin profile of cowpea (*Vigna unguiculata*) reveals catechin-O-glucoside as the dominant compound. *Food Chemistry* **2013**, *139* (1-4), 35-43.



## Literatur

104. Friedman, M.; Kim, S.-Y.; Lee, S.-J.; Han, G.-P.; Han, J.-S.; Lee, K.-R.; Kozukue, N., Distribution of Catechins, Theaflavins, Caffeine, and Theobromine in 77 Teas Consumed in the United States. *Journal of Food Science* **2005**, *70* (9), C550-C559.
105. Wang, H.; Helliwell, K., Epimerisation of catechins in green tea infusions. *Food Chemistry* **2000**, *70* (3), 337-344.
106. Peterson, J.; Dwyer, J.; Bhagwat, S.; Haytowitz, D.; Holden, J.; Eldridge, A. L.; Beecher, G.; Aladesanmi, J., Major flavonoids in dry tea. *Journal of Food Composition and Analysis* **2005**, *18* (6), 487-501.
107. Stodt, U.; Engelhardt, U. H., Progress in the analysis of selected tea constituents over the past 20 years. *Food Research International* **2013**, *53* (2), 636-648.
108. Roberts, E. A. H.; Myers, M., The phenolic substances of manufactured tea. VIII.—Enzymic oxidations of polyphenolic mixtures. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1960**, *11* (3), 158-163.
109. Gregory, R.; Bendall, D., The purification and some properties of the polyphenol oxidase from tea (*Camellia sinensis* L.). *Biochemical Journal* **1966**, *101*, 569-581.
110. Finger, A., In-vitro studies on the effect of polyphenol oxidase and peroxidase on the formation of polyphenolic black tea constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1994**, *66* (3), 293-305.
111. Subramanian, N.; Venkatesh, P.; Ganguli, S.; Sinkar, V. P., Role of Polyphenol Oxidase and Peroxidase in the Generation of Black Tea Theaflavins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, *47* (7), 2571-2578.
112. Kutyrev, A. A.; Moskva, V. V. Nucleophilic reactions of quinones *Russian Chemical Reviews*, **1991**, *60* (1), 72-88. <http://iopscience.iop.org/article/10.1070/RC1991v060n01ABEH001032/pdf> (aufgerufen am 24.02.2014).
113. Mayer, A. M.; Harel, E., Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* **1979**, *18* (2), 193-215.
114. Nakayama, T.; Ichiba, M.; Kuwabara, M.; Kajiya, K.; Kumazawa, S., Mechanisms and Structural Specificity of Hydrogen Peroxide Formation during Oxidation of Catechins. *Food Science and Technology Research* **2002**, *8* (3), 261-267.
115. Dix, M. A.; Fairley, C. J.; Millin, D. J.; Swaine, D., Fermentation of tea in aqueous suspension. Influence of tea peroxidase. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1981**, *32* (9), 920-932.
116. Jiang, Y.; Miles, P. W., Generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during enzymic oxidation of catechin. *Phytochemistry* **1993**, *33* (1), 29-34.
117. Richard-Forget, F. C.; Gauillard, F. A., Oxidation of Chlorogenic Acid, Catechins, and 4-Methylcatechol in Model Solutions by Combinations of Pear (*Pyrus communis* Cv. Williams) Polyphenol Oxidase and Peroxidase: A Possible Involvement of Peroxidase in Enzymatic Browning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, *45* (7), 2472-2476.
118. Berkowitz, J. E.; Coggon, P.; Sanderson, G. W., Formation of epitheflavic acid and its transformation to thearubigins during tea fermentation. *Phytochemistry* **1971**, *10* (10), 2271-2278.
119. Coggon, P.; Moss, G. A.; Sanderson, G. W., Tea catechol oxidase: Isolation, purification and kinetic characterization. *Phytochemistry* **1973**, *12* (8), 1947-1955.
120. Opie, S. C.; Clifford, M. N.; Robertson, A., The role of (-)-epicatechin and polyphenol oxidase in the coupled oxidative breakdown of theaflavins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1993**, *63* (4), 435-438.



## Literatur

121. Cloughley, J. B.; Ellis, R. T., The effect of pH modification during fermentation on the quality parameters of central African black teas. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1980**, *31* (9), 924-934.
122. Yoruk, R.; Marshall, M. R., Physicochemical Properties and Function of Plant Polyphenol Oxidase: A Review. *Journal of Food Biochemistry* **2003**, *27* (5), 361-422.
123. Tanaka, T.; Matsuo, Y.; Kouno, I., Chemistry of Secondary Polyphenols Produced during Processing of Tea and Selected Foods. *International Journal of Molecular Sciences* **2010**, *11* (1), 14-40.
124. Ngunjiri, F. M.; Wanyoko, J. K.; Mahungu, S. M.; Shitandi, A. A., Catechins depletion patterns in relation to theaflavin and thearubigins formation. *Food Chemistry* **2009**, *115* (1), 8-14.
125. Robertson, A., Effects of physical and chemical conditions on the in vitro oxidation of tea leaf catechins. *Phytochemistry* **1983**, *22* (4), 889-896.
126. Tanaka, T.; Mine, C.; Inoue, K.; Matsuda, M.; Kouno, I., Synthesis of Theaflavin from Epicatechin and Epigallocatechin by Plant Homogenates and Role of Epicatechin Quinone in the Synthesis and Degradation of Theaflavin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50* (7), 2142-2148.
127. Kusano, R.; Tanaka, T.; Matsuo, Y.; Kouno, I., Structures of Epicatechin Gallate Trimer and Tetramer Produced by Enzymatic Oxidation. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2007**, *55* (12), 1768-1772.
128. Bajaj, K. L.; Anan, T.; Tsushida, T.; Ikegaya, K., Effects of (-)-Epicatechin on Oxidation of Theaflavins by Polyphenol Oxidase from Tea Leaves. *Agricultural and Biological Chemistry* **1987**, *51* (7), 1767-1772.
129. Bryce, T.; Collier, P. D.; Fowles, I.; Thomas, P. E.; Frost, D.; Wilkins, C. K., The structures of the theaflavins of black tea. *Tetrahedron Letters* **1970**, *11* (32), 2789-2792.
130. Takino, Y.; Imagawa, H., Studies on the Oxidation of Catechins by Tea Oxidase Formation of a Crystalline Reddish Orange Pigment of Benzotropolone Nature. *Agricultural and Biological Chemistry* **1963**, *27* (4), 319-321.
131. Coxon, D. T.; Holmes, A.; Ollis, W. D., Theaflavic and epitheflavic acids. *Tetrahedron Letters* **1970**, *11* (60), 5247-5250.
132. Bailey, R. G.; Nursten, H. E.; McDowell, I., The chemical oxidation of catechins and other phenolics: A study of the formation of black tea pigments. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1993**, *63* (4), 455-464.
133. Wan, X.; Nursten, H. E.; Cai, Y.; Davis, A. L.; Wilkins, J. P. G.; Davies, A. P., A New Type of Tea Pigment—From the Chemical Oxidation of Epicatechin Gallate and Isolated from Tea. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1997**, *74* (3), 401-408.
134. Yassin, G. H.; Koek, J. H.; Kuhnert, N., Model system-based mechanistic studies of black tea thearubigin formation. *Food Chemistry* **2015**, *180*, 272-279.
135. Takino, Y.; Imagawa, H.; Horikawa, H.; Tanaka, A., Studies on the Mechanism of the Oxidation of Tea Leaf Catechins. Part III: Formation of a Reddish Orange Pigment and its Spectral Relationship to Some Benzotropolone Derivatives. *Agricultural and Biological Chemistry* **1964**, *28* (1), 64-71.
136. Millin, D. J.; Swaine, D., Fermentation of tea in aqueous suspension. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1981**, *32* (9), 905-919.



## Literatur

137. Opie, S. C.; Robertson, A.; Clifford, M. N., Black tea thearubigins—their HPLC separation and preparation during in-vitro oxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1990**, *50* (4), 547-561.
138. Kim, Y.; Goodner, K. L.; Park, J.-D.; Choi, J.; Talcott, S. T., Changes in antioxidant phytochemicals and volatile composition of *Camellia sinensis* by oxidation during tea fermentation. *Food Chemistry* **2011**, *129* (4), 1331-1342.
139. Sang, S.; Tian, S.; Meng, X.; Stark, R. E.; Rosen, R. T.; Yang, C. S.; Ho, C.-T., Theadibenzotropolone, a new type pigment from enzymatic oxidation of (-)-epicatechin and (-)-epigallocatechin gallate and characterized from black tea using LC/MS/MS. *Tetrahedron Letters* **2002**, *43* (40), 7129-7133.
140. Sang, S.; Tian, S.; Stark, R. E.; Yang, C. S.; Ho, C.-T., New dibenzotropolone derivatives characterized from black tea using LC/MS/MS. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, *12* (11), 3009-3017.
141. Sang, S.; Lambert, J. D.; Tian, S.; Hong, J.; Hou, Z.; Ryu, J.-H.; Stark, R. E.; Rosen, R. T.; Huang, M.-T.; Yang, C. S.; Ho, C.-T., Enzymatic synthesis of tea theaflavin derivatives and their anti-inflammatory and cytotoxic activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, *12* (2), 459-467.
142. Jhoo, J.-W.; Lo, C.-Y.; Li, S.; Sang, S.; Ang, C. Y. W.; Heinze, T. M.; Ho, C.-T., Stability of Black Tea Polyphenol, Theaflavin, and Identification of Theanaphthoquinone as Its Major Radical Reaction Product. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53* (15), 6146-6150.
143. Bonnely, S.; Davis, A. L.; Lewis, J. R.; Astill, C., A model oxidation system to study oxidised phenolic compounds present in black tea. *Food Chemistry* **2003**, *83* (4), 485-492.
144. Tanaka, T.; Inoue, K.; Betsumiya, Y.; Mine, C.; Kouno, I., Two Types of Oxidative Dimerization of the Black Tea Polyphenol Theaflavin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49* (12), 5785-5789.
145. Tanaka, T.; Matsuo, Y.; Kouno, I., A Novel Black Tea Pigment and Two New Oxidation Products of Epigallocatechin-3-O-gallate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53* (19), 7571-7578.
146. Tanaka, T.; Miyata, Y.; Tamaya, K.; Kusano, R.; Matsuo, Y.; Tamaru, S.; Tanaka, K.; Matsui, T.; Maeda, M.; Kouno, I., Increase of Theaflavin Gallates and Thearubigins by Acceleration of Catechin Oxidation in a New Fermented Tea Product Obtained by the Tea-Rolling Processing of Loquat (*Eriobotrya japonica*) and Green Tea Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57* (13), 5816-5822.
147. Li, Y.; Shibahara, A.; Matsuo, Y.; Tanaka, T.; Kouno, I., Reaction of the Black Tea Pigment Theaflavin during Enzymatic Oxidation of Tea Catechins. *Journal of Natural Products* **2010**, *73* (1), 33-39.
148. Matsuo, Y.; Tanaka, T.; Kouno, I., A new mechanism for oxidation of epigallocatechin and production of benzotropolone pigments. *Tetrahedron* **2006**, *62* (20), 4774-4783.
149. Matsuo, Y.; Li, Y.; Watarumi, S.; Tanaka, T.; Kouno, I., Production and degradation mechanism of theacitrin C, a black tea pigment derived from epigallocatechin-3-O-gallate via a bicyclo[3.2.1]octane-type intermediate. *Tetrahedron* **2011**, *67* (11), 2051-2059.
150. Roberts, E. A. H.; Cartwright, R. A.; Oldschool, M., The phenolic substances of manufactured tea. I.—Fractionation and paper chromatography of water-soluble substances. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1957**, *8* (2), 72-80.





## Literatur

151. Roberts, E. A. H., The phenolic substances of manufactured tea. II. — Their origin as enzymic oxidation products in fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1958**, *9* (4), 212-216.
152. Roberts, E. A. H., The chemistry of tea manufacture. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1958**, *9* (7), 381-390.
153. Roberts, E. A. H.; Smith, R. F., Spectrophotometric measurements of theaflavins and thearubigins in black tea liquors in assessments of quality in teas. *Analyst* **1961**, *86* (1019), 94-98.
154. Hilton, P. J.; Ellis, R. T., Estimation of the market value of Central African tea by theaflavin analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1972**, *23* (2), 227-232.
155. McDowell, I.; Feakes, J.; Gay, C., Phenolic composition of black tea liquors as a means of predicting price and country of origin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1991**, *55* (4), 627-641.
156. McDowell, I.; Taylor, S.; Gay, C., The phenolic pigment composition of black tea liquors—part I: Predicting quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1995**, *69* (4), 467-474.
157. Wright, L. P.; Mphangwe, N. I. K.; Nyirenda, H. E.; Apostolides, Z., Analysis of the theaflavin composition in black tea (*Camellia sinensis*) for predicting the quality of tea produced in Central and Southern Africa. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2002**, *82* (5), 517-525.
158. Bhuyan, L. P.; Hussain, A.; Tamuly, P.; Gogoi, R. C.; Bordoloi, P. K.; Hazarika, M., Chemical characterisation of CTC black tea of northeast India: Correlation of quality parameters with tea tasters' evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2009**, *89* (9), 1498-1507.
159. Takino, Y.; Ferretti, A.; Flanagan, V.; Gianturco, M.; Vogel, M., The structure of theaflavin, A polyphenol of black tea. *Tetrahedron Letters* **1965**, *6* (45), 4019-4025.
160. Brown, A. G.; Falshaw, C. P.; Haslam, E.; Holmes, A.; Ollis, W. D., The constitution of theaflavin. *Tetrahedron Letters* **1966**, *7* (11), 1193-1204.
161. Tanaka, T.; Kouno, I., Oxidation of Tea Catechins: Chemical Structures and Reaction Mechanism. *Food Science and Technology Research* **2003**, *9* (2), 128-133.
162. Yanase, E.; Sawaki, K.; Nakatsuka, S.-i., The Isolation of a Bicyclo[3.2.1] Intermediate During Formation of Benzo-tropolones, a Common Nucleus Found in Black Tea Pigments: Theaflavins. *Synlett* **2005**, *2005* (17), 2661-2663.
163. Matsuo, Y.; Tanaka, T.; Kouno, I., Production mechanism of proepitheafagallin, a precursor of benzotropolone-type black tea pigment, derived from epigallocatechin via a bicyclo[3.2.1]octane-type intermediate. *Tetrahedron Letters* **2009**, *50* (12), 1348-1351.
164. Chen, H.; Shurlknight, K.; Leung, T.; Sang, S., Structural Identification of Theaflavin Trigallate and Tetragallate from Black Tea Using Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60* (43), 10850-10857.
165. Lewis, J. R.; Davis, A. L.; Cai, Y.; Davies, A. P.; Wilkins, J. P. G.; Pennington, M., Theaflavate B, Isotheaflavin-3'-O-gallate and Neotheaflavin-3-O-gallate: three polyphenolic pigments from black tea. *Phytochemistry* **1998**, *49* (8), 2511-2519.
166. Coxon, D. T.; Holmes, A.; Ollis, W. D., Isotheaflavin. A new black tea pigment. *Tetrahedron Letters* **1970**, *11* (60), 5241-5246.



## Literatur

167. Steinhaus, B.; Engelhardt, U., Theaflavins in black tea Comparison of the flavonost and HPLC analysis — preliminary in results. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* **1989**, *188* (6), 509-511.
168. Bryce, T.; Collier, P. D.; Mallows, R.; Thomas, P. E.; Frost, D. J.; Wilkins, C. K., Three new theaflavins from black tea. *Tetrahedron Letters* **1972**, *13* (6), 463-466.
169. Collier, P. D.; Bryce, T.; Mallows, R.; Thomas, P. E.; Frost, D. J.; Korver, O.; Wilkins, C. K., The theaflavins of black tea. *Tetrahedron* **1973**, *29* (1), 125-142.
170. Nonaka, G.-I.; Hashimoto, F.; Nishioka, I., Tannins and Related Compounds. XXXVI.: Isolation and Structures of Theaflagallins, New Red Pigments from Black Tea. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1986**, *34* (1), 61-65.
171. Robertson, A.; Bendall, D. S., Production and HPLC analysis of black tea theaflavins and thearubigins during in vitro oxidation. *Phytochemistry* **1983**, *22* (4), 883-887.
172. Robertson, A., Effects of catechin concentration on the formation of black tea polyphenols during in vitro oxidation. *Phytochemistry* **1983**, *22* (4), 897-903.
173. Kuhnert, N.; Drynan, J. W.; Obuchowicz, J.; Clifford, M. N.; Witt, M., Mass spectrometric characterization of black tea thearubigins leading to an oxidative cascade hypothesis for thearubigin formation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2010**, *24* (23), 3387-3404.
174. Kusano, R.; Matsuo, Y.; Saito, Y.; Tanaka, T., Oxidation mechanism of black tea pigment theaflavin by peroxidase. *Tetrahedron Letters* **2015**, *56* (36), 5099-5102.
175. Tanaka, T.; Mine, C.; Kouno, I., Structures of two new oxidation products of green tea polyphenols generated by model tea fermentation. *Tetrahedron* **2002**, *58* (43), 8851-8856.
176. Ferretti, A.; Flanagan, V. P.; Bondarovich, H. A.; Gianturco, M. A., The chemistry of tea. Structures of compounds A and B of Roberts and reactions of some model compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1968**, *16* (5), 756-761.
177. Nonaka, G.; Kawahara, O.; Nishioka, I., Tannins and Related Compounds. XV. A New Class of Dimeric Flavan-3-ol Gallates, Theasinensins A and B, and Proanthocyanidin Gallates from Green Tea Leaf. (1). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1983**, *31* (11), 3906-3914.
178. Hashimoto, F.; Nonaka, G.-I.; Nishioka, I., Tannins and Related Compounds. LXIX. : Isolation and Structure Elucidation of B, B'-Linked Bisflavanoids, Theasinensins D-G and Oolongtheanin from Oolong Tea. (2). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1988**, *36* (5), 1676-1684.
179. Roberts, E. A. H.; Myers, M., The phenolic substances of manufactured tea. IV.—Enzymic Oxidations of Individual Substrates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1959**, *10* (3), 167-172.
180. Shii, T.; Tanaka, T.; Watarumi, S.; Matsuo, Y.; Miyata, Y.; Tamaya, K.; Tamaru, S.; Tanaka, K.; Matsui, T.; Kouno, I., Polyphenol Composition of a Functional Fermented Tea Obtained by Tea-Rolling Processing of Green Tea and Loquat Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59* (13), 7253-7260.
181. Li, Y.; Tanaka, T.; Kouno, I., Oxidative coupling of the pyrogallol B-ring with a galloyl group during enzymatic oxidation of epigallocatechin 3-O-gallate. *Phytochemistry* **2007**, *68* (7), 1081-1088.
182. Tanaka, T.; Watarumi, S.; Matsuo, Y.; Kamei, M.; Kouno, I., Production of theasinensins A and D, epigallocatechin gallate dimers of black tea, by oxidation–reduction dismutation of dehydrotheasinensin A. *Tetrahedron* **2003**, *59* (40), 7939-7947.



## Literatur

183. Tanaka, T.; Mine, C.; Watarumi, S.; Fujioka, T.; Mihashi, K.; Zhang, Y.-J.; Kouno, I., Accumulation of Epigallocatechin Quinone Dimers during Tea Fermentation and Formation of Theasinensins. *Journal of Natural Products* **2002**, *65* (11), 1582-1587.
184. Davis, A. L.; Lewis, J. R.; Cai, Y.; Powell, C.; Davis, A. P.; Wilkins, J. P. G.; Pudney, P.; Clifford, M. N., A polyphenolic pigment from black tea. *Phytochemistry* **1997**, *46* (8), 1397-1402.
185. Haslam, E., Thoughts on thearubigins. *Phytochemistry* **2003**, *64* (1), 61-73.
186. Menet, M.-C.; Sang, S.; Yang, C. S.; Ho, C.-T.; Rosen, R. T., Analysis of Theaflavins and Thearubigins from Black Tea Extract by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52* (9), 2455-2461.
187. Lakenbrink, C.; Lapczynski, S.; Maiwald, B.; Engelhardt, U. H., Flavonoids and Other Polyphenols in Consumer Brews of Tea and Other Caffeinated Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48* (7), 2848-2852.
188. Owuor, P. O.; Obanda, M., The changes in black tea quality due to variations of plucking standard and fermentation time. *Food Chemistry* **1998**, *61* (4), 435-441.
189. Obanda, M.; Okinda Owuor, P.; Mang'oka, R., Changes in the chemical and sensory quality parameters of black tea due to variations of fermentation time and temperature. *Food Chemistry* **2001**, *75* (4), 395-404.
190. Gardner, E. J.; Ruxton, C. H. S.; Leeds, A. R., Black tea - helpful or harmful? A review of the evidence. *European Journal of Clinical Nutrition* **2006**, *61* (1), 3-18.
191. Bailey, R. G.; Nursten, H. E.; McDowell, I., Isolation and high-performance liquid chromatographic analysis of thearubigin fractions from black tea. *Journal of Chromatography A* **1994**, *662* (1), 101-112.
192. Obanda, M.; Owuor, P. O.; Mang'oka, R.; Kavoi, M. M., Changes in thearubigin fractions and theaflavin levels due to variations in processing conditions and their influence on black tea liquor brightness and total colour. *Food Chemistry* **2004**, *85* (2), 163-173.
193. Yassin, G. H.; Koek, J. H.; Kuhnert, N., Identification of trimeric and tetrameric flavan-3-ol derivatives in the SII black tea thearubigin fraction of black tea using ESI-tandem and MALDI-TOF mass spectrometry. *Food Research International* **2014**, *63*, Part C (0), 317-327.
194. Bailey, R. G.; Nursten, H. E.; McDowell, I., Comparative study of the reversed-phase high-performance liquid chromatography of black tea liquors with special reference to the thearubigins. *Journal of Chromatography* **1991**, *542* (1), 115-128.
195. Powell, C.; Clifford, M. N.; Opie, S. C.; Ford, M. A.; Robertson, A.; Gibson, C. L., Tea cream formation: The contribution of black tea phenolic pigments determined by HPLC. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1992**, *63* (1), 77-86.
196. Degenhardt, A.; Engelhardt, U. H.; Wendt, A.-S.; Winterhalter, P., Isolation of Black Tea Pigments Using High-Speed Countercurrent Chromatography and Studies on Properties of Black Tea Polymers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48* (11), 5200-5205.
197. Ozawa, T.; Kataoka, M.; Morikawa, K.; Negishi, O., Elucidation of the partial structure of polymeric thearubigins from black tea by chemical degradation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **1996**, *60* (12), 2023-2027.
198. Kuhnert, N.; Clifford, M. N.; Muller, A., Oxidative cascade reactions yielding polyhydroxy-theaflavins and theacitrins in the formation of black tea thearubigins: Evidence by tandem LC-MS. *Food & Function* **2010**, *1* (2), 180-199.



## Literatur

199. Drynan, J. W.; Clifford, M. N.; Obuchowicz, J.; Kuhnert, N., MALDI-TOF Mass Spectrometry: Avoidance of Artifacts and Analysis of Caffeine-Precipitated SII Thearubigins from 15 Commercial Black Teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60* (18), 4514-4525.
200. Yassin, G. H.; Koek, J. H.; Jayaraman, S.; Kuhnert, N., Identification of Novel Homologous Series of Polyhydroxylated Theasinensins and Theanaphthoquinones in the SII Fraction of Black Tea Thearubigins Using ESI/HPLC Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, *62* (40), 9848-9859.
201. Roberts, E. A. H.; Smith, R. F., The phenolic substances of manufactured tea. IX.—the spectrophotometric evaluation of tea liquors. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1963**, *14* (10), 689-700.
202. McDowell, I.; Bailey, R. G.; Howard, G., Flavonol glycosides in black tea. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1990**, *53* (3), 411-414.
203. Matsuo, Y.; Hayashi, T.; Saito, Y.; Kouno, I.; Tanaka, T., Structures of enzymatic oxidation products of epigallocatechin. *Tetrahedron* **2013**, *69* (42), 8952-8958.
204. Valcic, S.; Burr, J. A.; Timmermann, B. N.; Liebler, D. C., Antioxidant Chemistry of Green Tea Catechins. New Oxidation Products of (-)-Epigallocatechin Gallate and (-)-Epigallocatechin from Their Reactions with Peroxyl Radicals. *Chemical Research in Toxicology* **2000**, *13* (9), 801-810.
205. Shao, W.; Powell, C.; Clifford, M. N., The analysis by HPLC of green, black and Pu'er teas produced in Yunnan. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1995**, *69* (4), 535-540.
206. Tanaka, T.; Watarumi, S.; Fujieda, M.; Kouno, I., New black tea polyphenol having N-ethyl-2-pyrrolidinone moiety derived from tea amino acid theanine: isolation, characterization and partial synthesis. *Food Chemistry* **2005**, *93* (1), 81-87.
207. Hashimoto, F.; Nonaka, G.-I.; Nishioka, I., Tannins and Related Compounds. XC. : 8-C-Ascorbyl (-)-Epigallocatechin 3-O-Gallate and Novel Dimeric Flavan -3-ols, Oolonghomobisflavans A and B, from Oolong Tea. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1989**, *37* (12), 3255-3263.
208. Ito, Y.; Weinstein, M.; Aoki, I.; Harada, R.; Kimura, E.; Nunogaki, K., The coil planet centrifuge. *Nature* **1966**, *212* (5066), 985-987.
209. Ito, Y.; Bowman, R. L., Countercurrent chromatography: Liquid-liquid partition chromatography without solid support. *Science* **1970**, *167* (3916), 281-283.
210. Cornish, R. E.; Archibald, R. C.; Murphy, E. A.; Evans, H. M., Purification of Vitamins - Fractional Distribution between Immiscible Solvents. *Industrial & Engineering Chemistry* **1934**, *26* (4), 397-406.
211. Berthod, A.; Maryutina, T.; Spivakov, B.; Shpigun, O.; Sutherland, I. A., Countercurrent Chromatography in Analytical Chemistry. *Pure and Applied Chemistry* **2009**, *81* (2), 355-387.
212. Conway, W. D., Counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **1991**, *538* (1), 27-35.
213. Ito, Y.; Goto, T.; Yamada, S.; Ohno, T.; Matsumoto, H.; Oka, H.; Ito, Y., Rapid determination of carbamate pesticides in food using dual counter-current chromatography directly interfaced with mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1187* (1-2), 53-57.
214. McGuire, J. N.; Proefke, M. L.; Conway, W. D.; Rinehart, K. L., On-Line Fast Atom Bombardment Mass Spectrometric Detection in High-Speed Countercurrent Chromatography Through a Moving Belt Interface. In *Modern Countercurrent Chromatography*, American Chemical Society: 1995. Vol. 593, pp 129-142.



## Literatur

215. Ito, Y., Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **2005**, *1065* (2), 145-168.
216. Guan, Y. H.; van den Heuvel, R. N. A. M.; Zhuang, Y.-P., Visualisation of J-type counter-current chromatography: A route to understand hydrodynamic phase distribution and retention. *Journal of Chromatography A* **2012**, *1239*, 10-21.
217. Friesen, J. B.; Pauli, G. F., Rational development of solvent system families in counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1151* (1–2), 51-59.
218. Oka, F.; Oka, H.; Ito, Y., Systematic search for suitable two-phase solvent systems for high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **1991**, *538* (1), 99-108.
219. Foucault, A. P., Countercurrent chromatography. *Analytical Chemistry* **1991**, *63* (10), 569A-579A.
220. Berthod, A.; Ruiz-Angel, M. J.; Carda-Broch, S., Elution–Extrusion Countercurrent Chromatography. Use of the Liquid Nature of the Stationary Phase To Extend the Hydrophobicity Window. *Analytical Chemistry* **2003**, *75* (21), 5886-5894.
221. Ito, Y.; Bowman, R. L., Countercurrent chromatography. *Analytical Chemistry* **1971**, *43* (13), 69A-75a.
222. Conway, W. D., Counter-current chromatography: Simple process and confusing terminology. *Journal of Chromatography A* **2011**, *1218* (36), 6015-6023.
223. Thiébaud, D.; Rosset, R., Hydrodynamic and hydrostatic high-speed countercurrent chromatography and its coupling with various kinds of detectors: Application to biochemical separations. *Journal of Chromatography A* **1992**, *626* (1), 41-52.
224. Ito, Y.; Conway, W. D., Development of countercurrent chromatography. *Analytical Chemistry* **1984**, *56* (4), 534A-554A.
225. Garrard, I. J.; Janaway, L.; Fisher, D., Minimising Solvent Usage in High Speed, High Loading, and High Resolution Isocratic Dynamic Extraction. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2007**, *30* (2), 151-163.
226. Gunawardana, G.; McAlpine, J., Preparative Scale Separations of Natural Products by Countercurrent Chromatography. In *Countercurrent chromatography*, Menet, J.-M.; Thiébaud, D., Hrsg. Marcel Dekker: New York, 1999. Vol. 82, pp 249-271.
227. Conway, W. D., Overview of Countercurrent Chromatography. In *Modern Countercurrent Chromatography*, American Chemical Society: 1995. Vol. 593, pp 1-14.
228. Marston, A.; Slacanin, I.; Hostettmann, K., Centrifugal partition chromatography in the separation of natural products. *Phytochemical Analysis* **1990**, *1* (1), 3-17.
229. Sutherland, I. A.; Brown, L.; Graham, A. S.; Guillon, G. G.; Hawes, D.; Janaway, L.; Whiteside, R.; Wood, P., Industrial Scale-Up of Countercurrent Chromatography: Predictive Scale-Up. *Journal of Chromatographic Science* **2001**, *39* (1), 21-28.
230. Ito, Y., Countercurrent chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **1981**, *5* (2), 105-129.
231. Römpp Online, HSCCC-Apparatur mit einem coil in einer Anlage. 2004; <https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-07-02344> (aufgerufen am 24. Mai 2015).
232. Guzlek, H.; Wood, P. L.; Janaway, L., Performance comparison using the GUESS mixture to evaluate counter-current chromatography instruments. *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216* (19), 4181-4186.



## Literatur

233. Köhler, N.; Chou, E.; Ito, Y.; Winterhalter, P., Development of a New Preparative Spiral-Coil Low-Speed Rotary Countercurrent Chromatographic (Spiral-Coil LSRCCC) Method. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2004**, 27 (16), 2547-2560.
234. Ito, Y.; Yang, F.; Fitze, P.; Powell, J.; Ide, D., Improved spiral disk assembly for high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **2003**, 1017 (1-2), 71-81.
235. Köhler, N., Entwicklung und Anwendung leistungsfähiger präparativer gegenstromverteilungschromatographischer Trenntechniken. Dissertation, TU Braunschweig, Cuvillier: Göttingen, 2006.
236. Ito, Y.; Knight, M.; Finn, T. M., Spiral Countercurrent Chromatography. *Journal of Chromatographic Science* **2013**, 51 (7), 726-738.
237. Yanagida, A.; Shoji, A.; Shibusawa, Y.; Shindo, H.; Tagashira, M.; Ikeda, M.; Ito, Y., Analytical separation of tea catechins and food-related polyphenols by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **2006**, 1112 (1-2), 195-201.
238. Stodt, U. W.; Blauth, N.; Niemann, S.; Engelhardt, U. H., Entwicklung eines Systems zur Durchführung von Modellfermentationen mit Tee (*Camellia sinensis*). 42. *Deutscher Lebensmittelchemikertag*, Braunschweig, 2013. Kurzreferate; Gesellschaft Deutscher Lebensmittelchemiker e.V.: Frankfurt am Main, 2013. p 238 (ISBN 978-3-936028-80-5).
239. Blauth, N., Schwarzer Tee – Durchführung von Modellfermentationen und Analyse der polyphenolischen Oxidationsprodukte. Wissenschaftliche Abschlussarbeit, unveröffentlicht, TU Braunschweig: Braunschweig, 2012.
240. Stark, J., Thearubigene in schwarzem Tee – Aufklärung von Biosynthesewegen mittels Modellfermentation. Wissenschaftliche Abschlussarbeit, unveröffentlicht, TU Braunschweig: Braunschweig, 2012.
241. Niemann, S., Thearubigene in schwarzem Tee – Stabilitätstests, Modellfermentationen und Isolierung mittels Gegenstromverteilungschromatographie. Wissenschaftliche Abschlussarbeit, unveröffentlicht, TU Braunschweig: Braunschweig, 2013.
242. Stodt, U. W.; Blauth, N.; Niemann, S.; Stark, J.; Pawar, V.; Jayaraman, S.; Koek, J.; Engelhardt, U. H., Investigation of Processes in Black Tea Manufacture through Model Fermentation (Oxidation) Experiments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, 62 (31), 7854-7861.
243. Mahanta, P. K.; Boruah, S. K.; Boruah, H. K.; Kalita, J. N., Changes of polyphenol oxidase and peroxidase activities and pigment composition of some manufactured black teas (*Camellia sinensis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1993**, 41 (2), 272-276.
244. Stodt, U. W.; Stark, J.; Engelhardt, U. H., Insights into Black Tea Chemistry through Model Fermentations. *6th World Congress on Polyphenols Applications*, Paris, Frankreich, 2012. International Society of Antioxidants in Nutrition and Health: Paris, 2012. p 87 (ISBN 978-2-35609-062-1).
245. Cloughley, J. B., The effect of temperature on enzyme activity during the fermentation phase of black tea manufacture. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1980**, 31 (9), 920-923.
246. Roberts, E. A. H.; Wood, D. J., A study of the polyphenols in tea leaf by paper chromatography. *Biochemical Journal* **1951**, 49 (4), 414-422.
247. Pandey, A., *Enzyme Technology*. Springer: New York, 2006.
248. Stagg, G. V., Chemical changes occurring during the storage of black tea. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1974**, 25 (8), 1015-1034.



## Literatur

249. Miketova, P.; Schram, K. H.; Whitney, J.; Li, M.; Huang, R.; Kerns, E.; Valcic, S.; Timmermann, B. N.; Rourick, R.; Klohr, S., Tandem mass spectrometry studies of green tea catechins. Identification of three minor components in the polyphenolic extract of green tea. *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *35* (7), 860-869.
250. Gu, L.; Kelm, M. A.; Hammerstone, J. F.; Zhang, Z.; Beecher, G.; Holden, J.; Haytowitz, D.; Prior, R. L., Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric studies of proanthocyanidins in foods. *Journal of Mass Spectrometry* **2003**, *38* (12), 1272-1280.
251. Li, H.-J.; Deinzer, M. L., Tandem Mass Spectrometry for Sequencing Proanthocyanidins. *Analytical Chemistry* **2007**, *79* (4), 1739-1748.
252. Steinegger, E.; Hänsel, R., *Pharmakognosie*. Springer: Berlin Heidelberg, 2013.
253. Kothe, L., Analyse technologisch bedingter Veränderungen phenolischer Verbindungen in Kakao und Kakaoprodukten mit LC-MS und Kapillarelektrophorese. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:hbz:5n-34170:2013>.
254. Sang, S.; Lee, M.-J.; Hou, Z.; Ho, C.-T.; Yang, C. S., Stability of Tea Polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-gallate and Formation of Dimers and Epimers under Common Experimental Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53* (24), 9478-9484.
255. Neilson, A. P.; Song, B. J.; Sapper, T. N.; Bomser, J. A.; Ferruzzi, M. G., Tea catechin auto-oxidation dimers are accumulated and retained by Caco-2 human intestinal cells. *Nutrition Research* **2010**, *30* (5), 327-340.
256. Neilson, A. P.; Hopf, A. S.; Cooper, B. R.; Pereira, M. A.; Bomser, J. A.; Ferruzzi, M. G., Catechin Degradation with Concurrent Formation of Homo- and Heterocatechin Dimers during in Vitro Digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55* (22), 8941-8949.
257. Tanaka, T.; Betsumiya, Y.; Mine, C.; Kouno, I., Theanaphthoquinone, a novel pigment oxidatively derived from theaflavin during tea-fermentation. *Chemical Communications* **2000**, (15), 1365-1366.
258. Stodt, U. W.; Werian, A.; Engelhardt, U. H., Schwarzteeherstellung: Oxidationsreaktionen – Ansätze zur Durchführung von Modelloxidationen mit teeigenen und -fremden Enzymen sowie Beobachtung eines Matrixeffektes. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **2015**, *111* (1), 6–12.
259. Werian, A., Theaflavine und Thearubigene in Tee – Modellfermentationen mit Meerrettichperoxidase. Wissenschaftliche Abschlussarbeit, unveröffentlicht, TU Braunschweig: Braunschweig, 2014.
260. Ravichandran, R.; Parthiban, R., Changes in enzyme activities (polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase) with type of tea leaf and during black tea manufacture and the effect of enzyme supplementation of dhoor on black tea quality. *Food Chemistry* **1998**, *62* (3), 277-281.
261. Takeo, T., Tea Leaf Polyphenol Oxidase. Part III: Studies on the Changes of Polyphenol Oxidase Activity during Black Tea Manufacture. *Agricultural and Biological Chemistry* **1966**, *30* (6), 529-535.
262. Cloughley, J. B., Storage deterioration in Central African tea: Methods of reducing the rate of theaflavin degradation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1981**, *32* (12), 1224-1228.



## Literatur

263. Stodt, U. W.; Werian, A.; Engelhardt, U. H., Untersuchung eines Matrixeffektes von Teeblättern (*Camellia sinensis*) auf Fermentationsvorgänge. 43. *Deutscher Lebensmittelchemikertag*, Gießen, 2014. Kurzreferate; Gesellschaft Deutscher Chemiker e.V.: Frankfurt am Main, 2014. p 228 (ISBN 978-3-936028-87-4).
264. Mayer, A. M., Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry* **2006**, *67* (21), 2318-2331.
265. Pruidze, G. N.; Mchedlishvili, N. I.; Omiadze, N. T.; Gulua, L. K.; Pruidze, N. G., Multiple forms of phenol oxidase from Kolkhida tea leaves (*Camelia Sinensis* L.) and *Mycelia Sterilia* IBR 35219/2 and their role in tea production. *Food Research International* **2003**, *36* (6), 587-595.
266. Zhu, N.; Huang, T.-C.; Yu, Y.; LaVoie, E. J.; Yang, C. S.; Ho, C.-T., Identification of Oxidation Products of (-)-Epigallocatechin Gallate and (-)-Epigallocatechin with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48* (4), 979-981.
267. Guyot, S.; Vercauteren, J.; Cheynier, V., Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from (+)-catechin coupling catalysed by grape polyphenoloxidase. *Phytochemistry* **1996**, *42* (5), 1279-1288.
268. Sun, W.; Miller, J. M., Tandem mass spectrometry of the B-type procyanidins in wine and B-type dehydrodiccatechins in an autoxidation mixture of (+)-catechin and (-)-epicatechin. *Journal of Mass Spectrometry* **2003**, *38* (4), 438-446.
269. Collier, P. D., The alkaline peroxide oxidation of 1',2'-dihydroxy-3,4-benzotropolones. *Journal of the Chemical Society C: Organic* **1969**, (4), 612-621.
270. Castañeda-Ovando, A.; Pacheco-Hernández, M. d. L.; Páez-Hernández, M. E.; Rodríguez, J. A.; Galán-Vidal, C. A., Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* **2009**, *113* (4), 859-871.
271. Cattell, D. J.; Nursten, H. E., Fractionation and chemistry of ethyl acetate-soluble thearubigins from black tea. *Phytochemistry* **1976**, *15* (12), 1967-1970.
272. Montoro, P.; Tuberoso, C. I. G.; Perrone, A.; Piacente, S.; Cabras, P.; Pizza, C., Characterisation by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry of anthocyanins in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1112* (1-2), 232-240.
273. Stodt, U. W.; Stark, J.; Engelhardt, U. H., Comparison of three strategies for the isolation of black tea thearubigins with a focus on countercurrent chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis* **2015**, *43*, 160-168.
274. Smith, R. F., Studies on the formation and composition of 'cream' in tea infusions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1968**, *19* (9), 530-534.
275. Wedzicha, B. L.; Lo, M. F.; Donovan, T. J., Counter-current chromatography of black tea infusions. *Journal of Chromatography* **1990**, *505* (2), 357-364.
276. International Organization for Standardization (ISO), Determination of substances characteristic of green and black tea -- Part 1: Content of total polyphenols in tea -- Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent. ISO 14502-1:2005, 2005.
277. Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R. M., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in Enzymology*, Lester, P., Hrsg. Academic Press: 1999. Vol. Volume 299, pp 152-178.
278. International Organization for Standardization (ISO), Tea - Methods for determination of substances characteristic of green and black tea - Part 2: Determination of catechins in green tea - Method using high performance liquid chromatography. ISO 14502-2:2002, 2002.





## Literatur

279. Kelm, M. A.; Johnson, J. C.; Robbins, R. J.; Hammerstone, J. F.; Schmitz, H. H., High-Performance Liquid Chromatography Separation and Purification of Cacao (*Theobroma cacao* L.) Procyanidins According to Degree of Polymerization Using a Diol Stationary Phase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54* (5), 1571-1576.
280. Kuhnert, S.; Lehmann, L.; Winterhalter, P., Rapid characterisation of grape seed extracts by a novel HPLC method on a diol stationary phase. *Journal of Functional Foods* **2015**, *15*, 225-232.
281. Ghosh, A.; Tudu, B.; Tamuly, P.; Bhattacharyya, N.; Bandyopadhyay, R., Prediction of theaflavin and thearubigin content in black tea using a voltammetric electronic tongue. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2012**, *116*, 57-66.
282. Jöbstl, E.; Fairclough, J. P. A.; Davies, A. P.; Williamson, M. P., Creaming in Black Tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53* (20), 7997-8002.
283. Mishra, B. B.; Gautam, S.; Sharma, A., Microbial Decontamination of Tea (*Camellia sinensis*) by Gamma Radiation. *Journal of Food Science* **2006**, *71* (6), M151-M156.
284. Schmidt, S. J.; Fontana, A. J., Appendix E: Water Activity Values of Select Food Ingredients and Products. In *Water Activity in Foods*, Blackwell Publishing Ltd: 2008. pp 407-420.
285. European Commission - Scientific Committee on Food *Opinion on the potential microbiological risk arising from the presence of moisture in tea.*  
[http://ec.europa.eu/food/fs/sc/oldcomm7/out23\\_en.html](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/oldcomm7/out23_en.html) (aufgerufen am 22.07.2015).
286. Corey, M. E.; Kerr, W. L.; Mulligan, J. H.; Lavelli, V., Phytochemical stability in dried apple and green tea functional products as related to moisture properties. *LWT - Food Science and Technology* **2011**, *44* (1), 67-74.
287. Ortiz, J.; Ferruzzi, M. G.; Taylor, L. S.; Mauer, L. J., Interaction of Environmental Moisture with Powdered Green Tea Formulations: Effect on Catechin Chemical Stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56* (11), 4068-4077.
288. Biesaga, M., Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *Journal of Chromatography A* **2011**, *1218* (18), 2505-2512.
289. Ananingsih, V. K.; Sharma, A.; Zhou, W., Green tea catechins during food processing and storage: A review on stability and detection. *Food Research International* **2013**, *50* (2), 469-479.
290. Chen, Z.-Y.; Zhu, Q. Y.; Tsang, D.; Huang, Y., Degradation of Green Tea Catechins in Tea Drinks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49* (1), 477-482.
291. Friedman, M.; Levin, C. E.; Choi, S.-H.; Lee, S.-U.; Kozukue, N., Changes in the Composition of Raw Tea Leaves from the Korean Yabukida Plant during High-Temperature Processing to Pan-Fried Kamairi-Cha Green Tea. *Journal of Food Science* **2009**, *74* (5), C406-C412.
292. Wang, R.; Zhou, W.; Wen, R.-a. H., Kinetic Study of the Thermal Stability of Tea Catechins in Aqueous Systems Using a Microwave Reactor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54* (16), 5924-5932.
293. Thomas, J.; Senthilkumar, R. S.; Kumar, R. R.; Mandal, A. K. A.; Muraleedharan, N., Induction of  $\gamma$  irradiation for decontamination and to increase the storage stability of black teas. *Food Chemistry* **2008**, *106* (1), 180-184.
294. Li, S.; Lo, C.-Y.; Pan, M.-H.; Lai, C.-S.; Ho, C.-T., Black tea: chemical analysis and stability. *Food & Function* **2013**, *4* (1), 10-18.



## Literatur

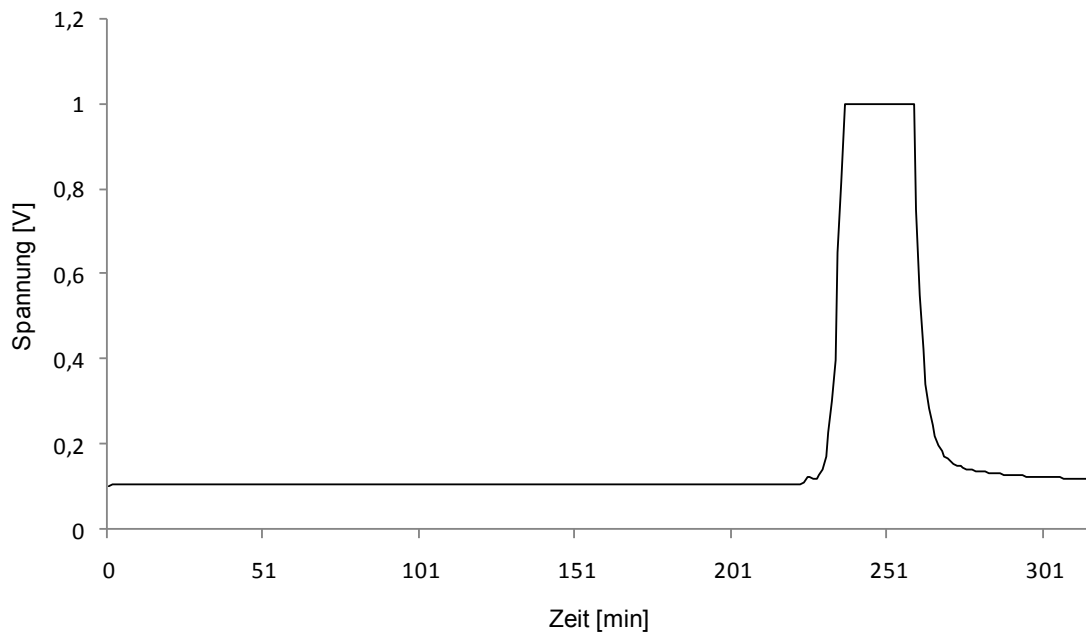
295. Stodt, U. W.; Niemann, S., Stability of Black Tea Thearubigins under various Conditions. 5. *Braunschweiger Jungchemikertagung*, Braunschweig, 2014. JungChemikerForum der Gesellschaft Deutscher Chemiker e.V.: Braunschweig, 2014. p 58.
296. Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über Lebensmittelzusatzstoffe, zuletzt geändert durch Art. 1 ÄndVO (EU) 2015/649 vom 24. 4. 2015 (ABl. Nr. L 107 S. 17).
297. Temple, C. M.; Clifford, M. N., The Stability of Theaflavins During HPLC Analysis of a Decaffeinated Aqueous Tea Extract. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1997**, *74* (4), 536-540.
298. Labbé, D.; Têtu, B.; Trudel, D.; Bazinet, L., Catechin stability of EGC- and EGCG-enriched tea drinks produced by a two-step extraction procedure. *Food Chemistry* **2008**, *111* (1), 139-143.
299. Wang, R.; Zhou, W.; Jiang, X., Reaction Kinetics of Degradation and Epimerization of Epigallocatechin Gallate (EGCG) in Aqueous System over a Wide Temperature Range. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56* (8), 2694-2701.
300. Su, Y. L.; Leung, L. K.; Huang, Y.; Chen, Z.-Y., Stability of tea theaflavins and catechins. *Food Chemistry* **2003**, *83* (2), 189-195.
301. Zhu, Q. Y.; Zhang, A.; Tsang, D.; Huang, Y.; Chen, Z.-Y., Stability of Green Tea Catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, *45* (12), 4624-4628.
302. Hatano, T.; Hori, M.; Kusuda, M.; Ohyabu, T.; Ito, H.; Yoshida, T., Characterization of the Oxidation Products of (-)-Epigallocatechin Gallate, a Bioactive Tea Polyphenol, on Incubation in Neutral Solution. *Heterocycles* **2004**, *63* (7), 1547-1554.
303. Zhu, Q. Y.; Hammerstone, J. F.; Lazarus, S. A.; Schmitz, H. H.; Keen, C. L., Stabilizing Effect of Ascorbic Acid on Flavan-3-ols and Dimeric Procyanidins from Cocoa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51* (3), 828-833.
304. Zimmermann, B. F.; Gleichenhagen, M., The effect of ascorbic acid, citric acid and low pH on the extraction of green tea: How to get most out of it. *Food Chemistry* **2011**, *124* (4), 1543-1548.
305. Kim, E. S.; Liang, Y. R.; Jin, J.; Sun, Q. F.; Lu, J. L.; Du, Y. Y.; Lin, C., Impact of heating on chemical compositions of green tea liquor. *Food Chemistry* **2007**, *103* (4), 1263-1267.



## 7 Anhang

### 7.1 HSCCC-Trennungen zur Isolierung von Thearubigenen

#### 7.1.1 Isolierung mit HSCCC\_System 6 (EtOAc/*n*-BuOH/H<sub>2</sub>O im Tail-to-Head-Modus)

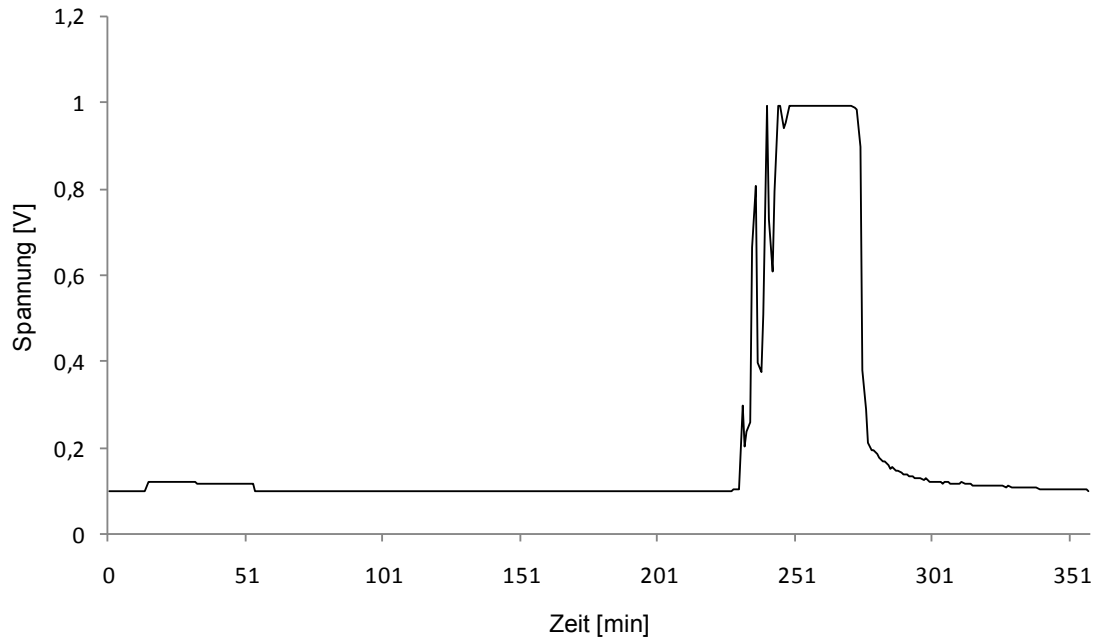


**Abb. 7-1** Chromatogramm ( $\lambda=278$  nm) einer HSCCC-Trennung eines XAD-7-Extraktes aus Assam Schwarztee mit HSCCC\_System 6 zum Zwecke der Isolierung von Thearubigenen.

**Tab. 7-1** Fraktionseinteilung und Auswaagen der in **Abb. 7-1** dargestellten Trennung von 2,54 g XAD-7-Extrakt mit HSCCC\_System 6.

Fraktion	Reagenzgläser	Menge [mg]
1	1-6 org. Phase	95,6
2	1-6 wässr. Phase	156,8
3	7-10	1412,0
4	11-15	299,7
5	16-31	17,1
6	Coil	21,0
$\Sigma$		1902,7

### 7.1.2 Isolierung mit HSCCC\_System 7 (*n*-BuOH/H<sub>2</sub>O im Tail-to-Head-Modus)

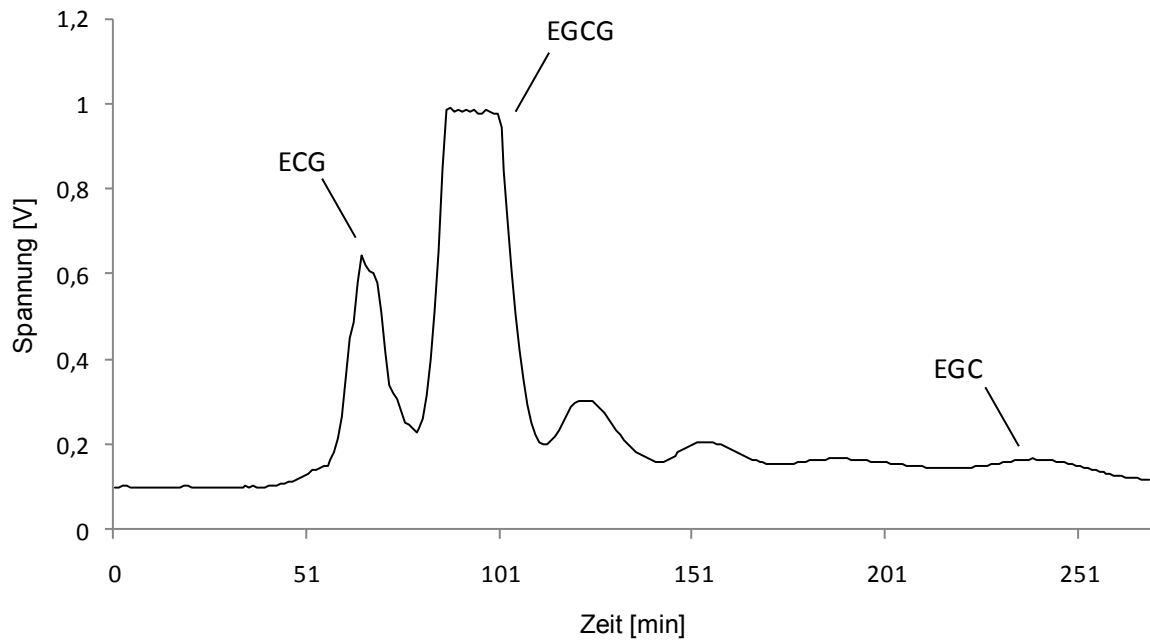


**Abb. 7-2** Chromatogramm ( $\lambda = 278 \text{ nm}$ ) einer HSCCC-Trennung eines bereits mit Ethylacetat extrahierten Tee-Extraktes mit HSCCC\_System 7 zum Zwecke der Isolierung von Thearubigenen.

**Tab. 7-2** Fraktionseinteilung und Auswaagen der in **Abb. 7-2** dargestellten Trennung von 1,10 g Schwarztee-Extrakt mit HSCCC\_System 7.

Fraktion	Reagenzgläser	Menge [mg]
1	1-7	320,1
2	8-15	560,3
3	16-42	41,6
4	Coil	13,8
$\Sigma$		935,8

## 7.2 HSCCC-Trennungen zur Anreicherung von Catechinen



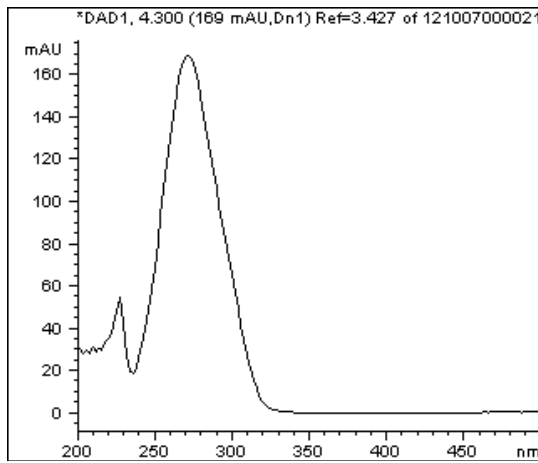
**Abb. 7-3** Beispielchromatogramm ( $\lambda=278$  nm) einer HSCCC-Trennung von Sunphenon 80SK mit HSCCC\_System 5 zum Zwecke der Isolierung bzw. Anreicherung von ECG, EGCG und EGC.

**Tab. 7-3** Fraktionseinteilung, Zusammensetzung und Auswaagen der in **Abb. 7-3** dargestellten Trennung von 2,0 g Sunphenon 80SK mit HSCCC\_System 5.

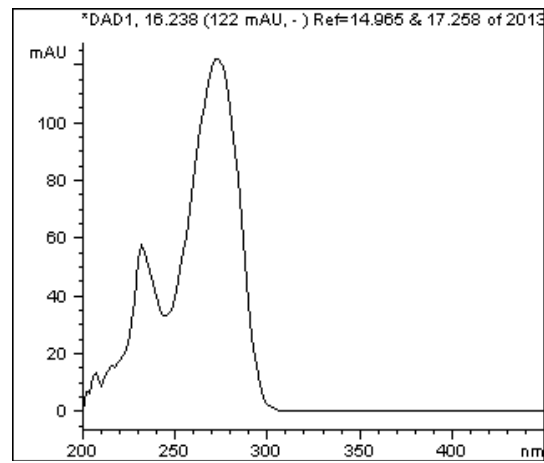
Fraktion	Reagenzgläser	Zusammensetzung ( $\lambda = 278$ nm, HPLC_System 1)	Auswaage [mg]
1	4-6	86,8 % ECG	73,8
2	12-17	95,3 % EGCG	441
3	60-74	68,6 % EGC	148

### 7.3 UV-Spektren charakteristischer Teebestandteile

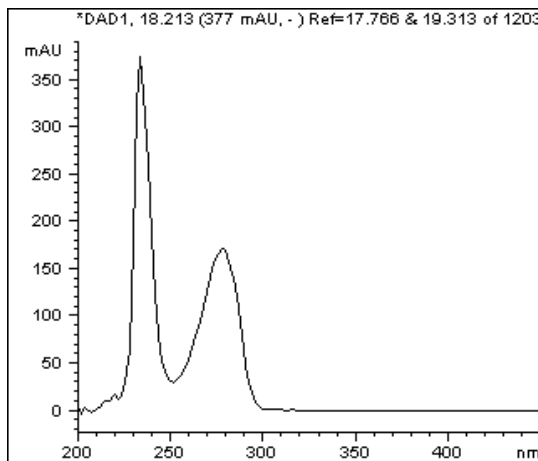
Gallussäure / Theogallin



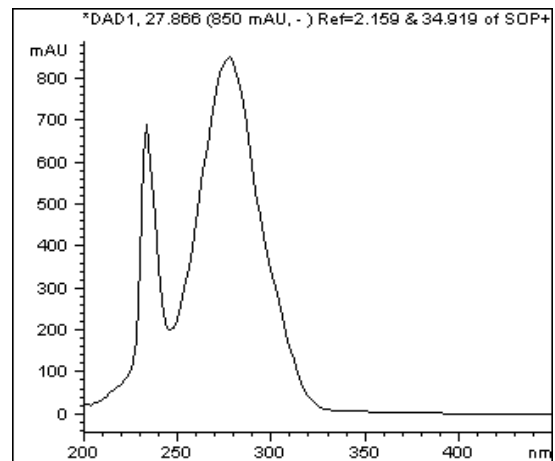
Coffein / Theobromin



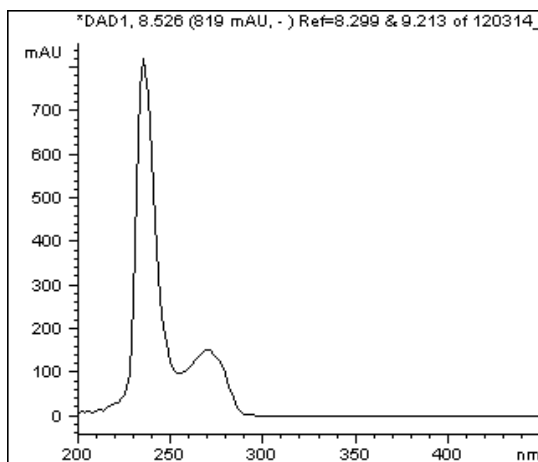
(+)-C / EC



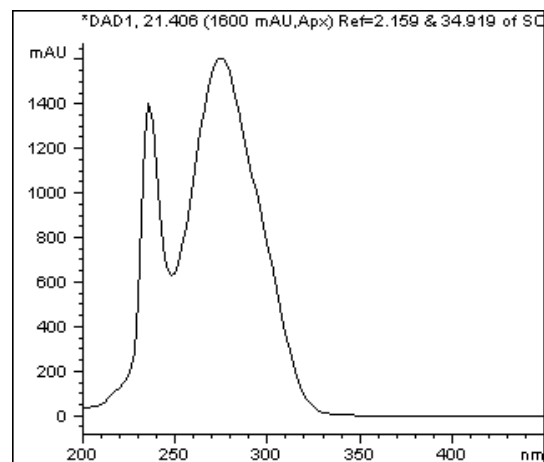
CG / ECG



GC / EGC



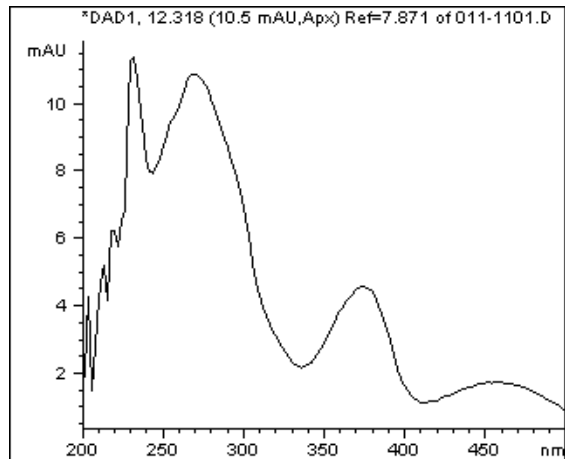
GCG / EGCG



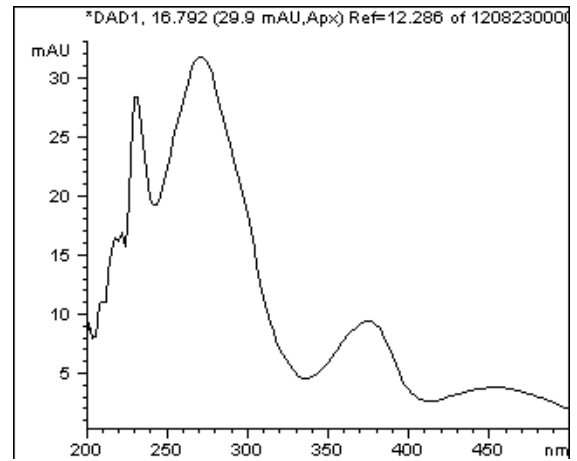


## Anhang

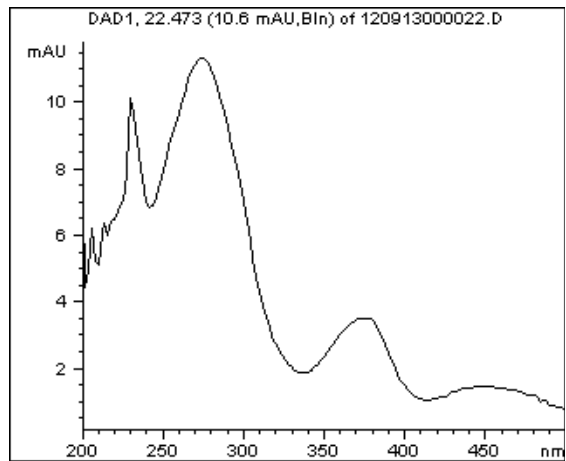
TF



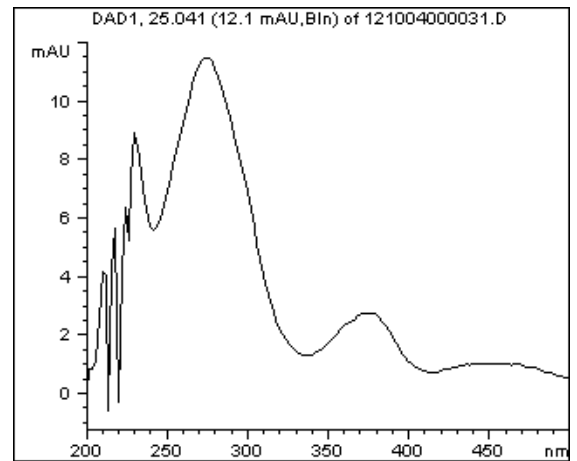
TF-3-G



TF-3'-G



TF-DG





## 7.4 Verwendete Chargen des Teeblattpulvers mit aktiven Enzymen

Tab. 7-4 Übersicht über die als Enzymquelle zur Verfügung gestellten Teeblattpulver.

Nr.	Menge	Lieferdatum
1	1,5 g	Januar 2012
2	11 g	Februar 2012
3	14 g	Juli 2012
4	10 g	Februar 2013

## 7.5 Bestimmung von Theaflavinen mittels UHPLC

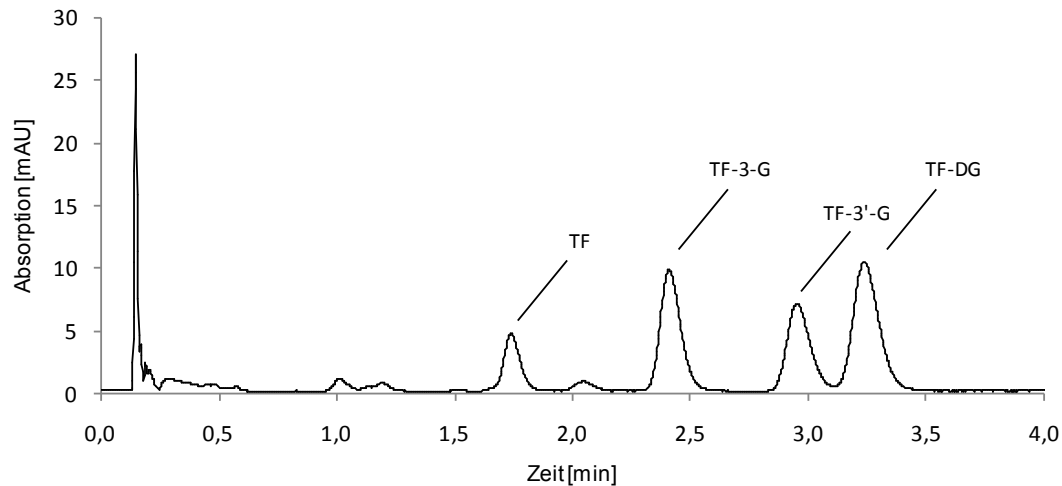
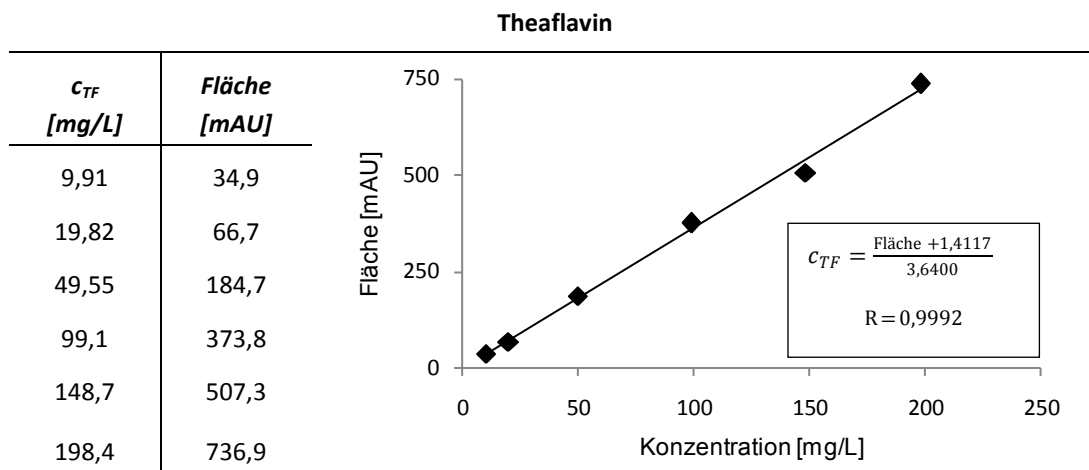


Abb. 7-4 UHPLC-DAD-Chromatogramm ( $\lambda = 274 \text{ nm}$ ) einer Trennung der Theaflavine TF, TF-3-G, TF-3'-G und TF-DG mittels UHPLC\_System 1.

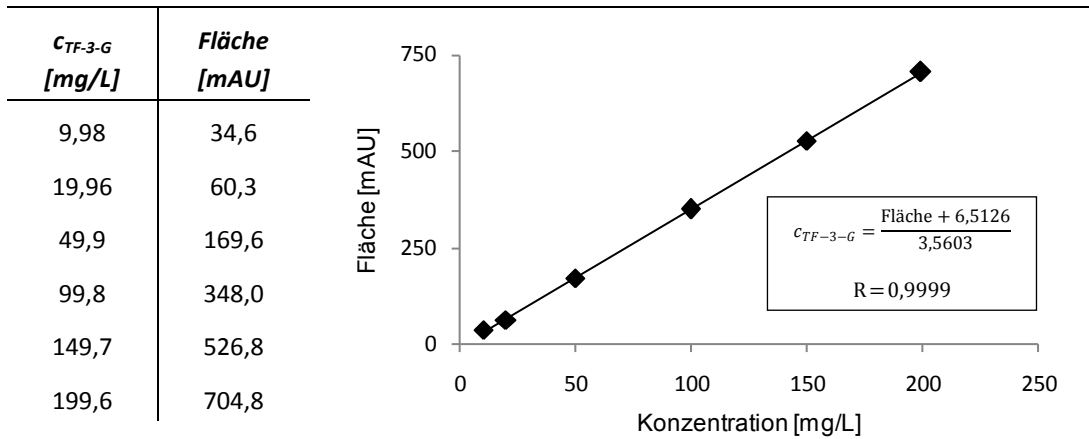
Tab. 7-5 Kalibrierfunktionen von TF, TF-3-G, TF-3'-G und TF-DG über einen Konzentrationsbereich von 10–200 mg/L für die Bestimmung mittels UHPLC\_System 1 (R = Korrelationskoeffizient).



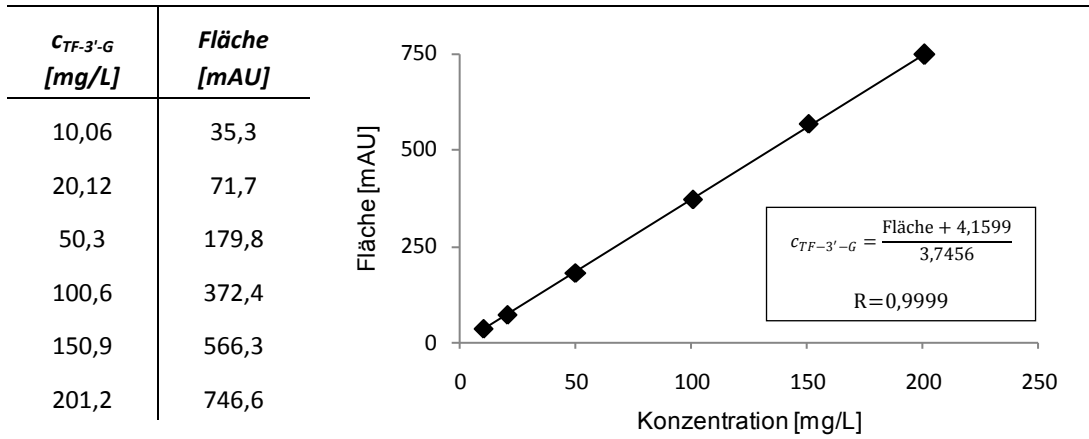


## Anhang

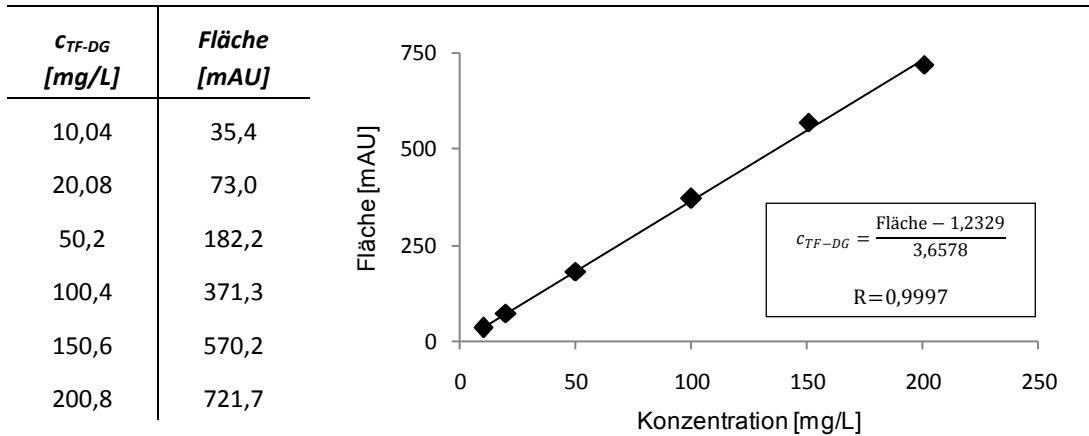
### Theaflavin-3-gallat



### Theaflavin-3'-gallat



### Theaflavin-3,3'-digallat





## 7.6 Versuchsparameter der Oxidationen mit Meerrettich-Peroxidase

Tab. 7-6 Übersicht über die Zusammensetzung der Reaktionslösungen für die Modelloxidationsversuche mit HR-POD.

Nr.	Einwaage EC [mg]	Einwaage EGC [mg]	Einwaage ECG [mg]	Einwaage EGGG [mg]	Einwaage TF-Mix [mg]	Einwaage HR-POD [mg]	Einwaage Teematrix [g]	Teesorte	Volumen [ml]
HR-1	49,4	-	-	50,5	-	0,55	-	-	100
HR-2	50,6	-	-	50,0	-	0,50	-	-	100
HR-3	49,8	-	-	49,8	-	0,52	-	-	100
HR-4	51,4	-	-	53,4	-	0,52	0,51	Gunpowder	100
HR-5	50,7	-	-	50,7	-	0,53	0,50	Gunpowder	100
HR-6	50,9	-	-	52,2	-	0,51	0,50	Gunpowder, Adsorption	100
HR-7	50,2	-	-	50,8	-	0,52	0,51	China Lung Ching	100
HR-8	50,1	-	-	51,0	-	0,52	0,51	Darjeeling grün	100
HR-9	24,7	24,4	24,7	24,6	-	0,52	-	-	100
HR-10	25,5	24,4	24,6	24,5	-	0,50	0,50	Gunpowder	100
HR-11	-	-	-	-	4,10	-	-	-	40
HR-12	-	-	-	-	4,02	-	0,20	Gunpowder	40
HR-13	49,5	-	-	51,0	-	-	-	-	100
HR-14	50,0	-	-	51,2	-	-	0,52	Gunpowder	100
HR-15	50,3	-	-	52,4	-	-	0,50	Gunpowder	100
HR-16	50,5	-	-	50,1	-	-	0,51	Darjeeling grün	100
HR-17	49,3	-	-	49,4	-	-	0,51	Assam	100
HR-18	49,9	-	-	49,7	-	0,55	0,50	Gunpowder, EDTA	100
HR-19	49,7	-	-	50,5	-	0,54	0,50	Assam, Adsorption	100



## 7.7 Lagerversuche

**Tab. 7-7** Übersicht über die Einwaagen und Lagerbedingungen der 10 Schwarzteeextrakt-Lösungen, welche im Lagerversuch verwendet wurden.

Ansatz	Einwaage Tee-Extrakt		Einwaage Zusätze		pH	Lager-temperatur
	A	B	A	B		
Ascorbinsäure	250 mg/100 mL	250 mg/100 mL	3,05 mg/10 mL	3,12 mg/10 mL	2	RT
Ethylparaben	250 mg/100 mL	250 mg/100 mL	5,96 mg/10 mL	6,11 mg/10 mL	2	RT
Helium	250 mg/100 mL	250 mg/100 mL	-	-	2	RT
Tiefkühlung	250 mg/100 mL	250 mg/100 mL	-	-	2	-18 °C
Kühlung	250 mg/100 mL	250 mg/100 mL	-	-	2	+4 °C
Wärme	250 mg/100 mL	250 mg/100 mL	-	-	2	+40 °C
Raumtemperatur/ pH 2	250 mg/100 mL	250 mg/100 mL	-	-	2	RT
pH 7	62,5 mg/25 mL	62,4 mg/25 mL	-	-	7	RT
pH 10	62,6 mg/25 mL	62,6 mg/25 mL	-	-	10	RT
Vergleich <sup>1</sup>	25,1 mg/10 mL	25,0 mg/10 mL	-	-	2	RT

<sup>1</sup> Tee-Extrakt nur in Wasser gelöst.





