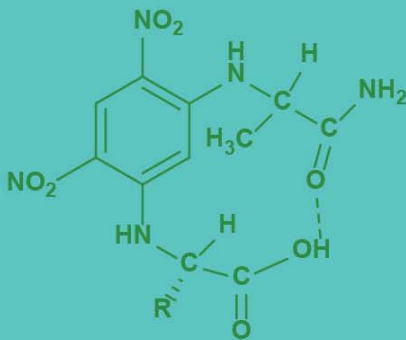




Technische
Universität
Braunschweig



Bestimmung von Aminosäuren und Flavonoiden in Tees



Rouba Horanni



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag



Bestimmung von Aminosäuren und Flavonoiden in Tees





Bestimmung von Aminosäuren und Flavonoiden in Tees

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte

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

von Rouba Horanni
aus Homs, Syrien



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, 2017

Zugl.: (TU) Braunschweig, Univ., Diss., 2016

1. Referent:	apl. Prof. Dr. Ulrich Engelhardt
2. Referent:	Prof. Dr. Peter Winterhalter
eingereicht am:	02.11.2016
mündliche Prüfung (Disputation) am:	14.12.2016

Druckjahr 2017

Dissertation an der Technischen Universität Braunschweig
Fakultät für Lebenswissenschaften

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2017

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

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, 2017

Gedruckt auf umweltfreundlichem, säurefreiem Papier aus nachhaltiger Forstwirtschaft.

ISBN 978-3-7369-9516-1

eISBN 978-3-7369-8516-2



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

Horanni, R. & Engelhardt, U.H. (2014). Enantiomeric analysis of theanine in different teas (*Camellia sinensis*) using Marfey's reagent. *European Food Research and Technology*, 240 (1), 61-70.

Horanni, R., & Engelhardt, U.H. (2013). Determination of amino acids in white, green, black, oolong, pu-erh teas and tea products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 31(1), 94–100.

Tagungsbeiträge

Horanni, R., Scharf, M., & Engelhardt, U.H. Calculating a new response factor for the quantitation of tea proanthocyanidins. 5. Jungchemikertagung, Braunschweig, 2014.

Horanni, R. & Engelhardt, U.H. Methodenentwicklung zur Trennung und Bestimmung von L- und D-Theanin in Teeproben. 42. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Braunschweig, Gesellschaft Deutscher Chemiker e.V., Frankfurt am Main (ISBN 978-3-936028-80-5) Kurzreferate (ATW 058) 2013.



Danksagung

Herzlichen Dank an alle, die mich während meines Promovierens und bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit unterstützt und ermutigt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ulrich Engelhardt, meinem Doktorvater, für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, seine intensive Betreuung, ständige Diskussionsbereitschaft und das Verständnis für meine Lage als Mutter von zwei Kindern. Zudem bin ich ihm sehr dankbar für das Gewinnen an Selbstbewusstsein durch das in mich gesetzte Vertrauen und die vielen Freiheiten.

Herrn Prof. Dr. Peter Winterhalter danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens und sein Mitwirken in der Prüfungskommission. Für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission danke ich Herrn Prof. Dr. Robert Kreuzig.

Großer Dank gebührt Frau Carola Balcke für die Literaturrecherche und das Korrekturlesen dieser Arbeit sowie meiner Veröffentlichungen. Ganz herzlich danke ich Dr. Gerold Jerz und Dr. Maria Ramos-Jerz für ihren wertvollen, unterstützenden Beistand. Allen Mitarbeitern des Teelabors bin ich zu besonderem Dank verpflichtet: Beate Maiwald für ihre Freundschaft und hilfreichen Tipps, Dr. Yumen Hilal für die Erleichterung der Anfangsphase, Dr. Nils Kaiser für seine außerordentliche fachliche Unterstützung, Dr. Ulf Stodt, Dr. Claudia Thräne, Janina Stark und Patricia Staps für die gute Arbeitsatmosphäre. Für die schöne Zusammenarbeit während seiner Diplomarbeit danke ich auch Matthias Scharf. Des Weiteren danke ich Dr. Miriam Adriana Rodriguez-Werner und Dr. Recep Gök für die vielen Ratschläge und die große Hilfestellung im Rahmen dieser Arbeit. Vielen Dank auch an alle Mitarbeiter des Instituts für Lebensmittelchemie für die tolle Zeit zusammen. Ihr seid meine Familie in Deutschland.

Meinem Vater (Du lebst noch in meinem Herzen), meiner Mutter und meinen Brüdern danke ich ganz herzlich für alles. Ihr habt mir jederzeit zur Seite gestanden.

Hussam, Sophia und Anastasia. Ihr seid der Segen meines Lebens. Eure Liebe hat mir immer Mut und Willen gegeben. Euch ist diese Doktorarbeit gewidmet. Ich liebe Euch.



Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungs- und Symbolverzeichnis	IX
1 Einleitung und Zielsetzung.....	1
2 Grundlagen und Kenntnisstand	3
2.1 Tee: <i>Camellia sinensis</i>	3
2.1.1 Anbau und Manufaktur	3
2.1.2 Zusammensetzung von Tee	8
2.2 Polyphenole.....	8
2.2.1 Flavanole (Catechine).....	10
2.2.2 Proanthocyanidine	11
2.2.3 Flavonolglykoside	13
2.3 Purinalkaloide.....	13
2.4 Aminosäuren	14
2.4.1 Aufbau, Nomenklatur und Strukturformeln	15
2.4.2 Stereochemie	17
2.4.3 Theanin	18
2.5 Physiologische Wirkungen von Tee.....	20
2.6 Grundlagen zu einigen verwendeten Methoden und Techniken.....	22
2.6.1 Bestimmung von Tee-Aminosäuren	22
2.6.2 Enantiomerentrennung	24
2.6.3 High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC)	26
2.7 Authentizität des Tees	28
3 Ergebnisse und Diskussion	31
3.1 Methodenentwicklung zur Analyse von Aminosäuren	31
3.2 Methodvalidierung.....	36
3.3 Quantitative Untersuchung der Aminosäuren in Teeproben.....	39



Inhaltsverzeichnis

3.3.1	Aminosäuren in Blatttee	39
3.3.2	Aminosäuren in Teeextrakten	39
3.3.3	Ziehzeitexperimente.....	44
3.3.4	Veränderungen der Aminosäuren im Verlauf des Herstellungsverfahrens	45
3.3.5	Einfluss anderer Faktoren auf den Aminosäuregehalt	48
3.4	<i>Untersuchungen über D-Theanin im Tee</i>	50
3.4.1	Synthese von D-Theanin	51
3.4.2	Methodenentwicklung zur enantioselektiven Trennung von L-/ D-Theanin.....	52
3.4.3	Methodenvalidierung	56
3.4.4	Enantiomerenzusammensetzung von Theanin im Tee	58
3.5	<i>Bestimmung der Gesamtphenole</i>	61
3.6	<i>Bestimmung der Catechine und Alkaloide</i>	62
3.6.1	Bestimmung der Catechine	62
3.6.2	Bestimmung von Koffein, TB, GA und TG.....	66
3.6.3	Catechine und Alkaloide während der Fermentation	68
3.6.4	Ziehzeitexperimente.....	69
3.7	<i>Untersuchungen über Proanthocyanidine</i>	71
3.7.1	Isolierung der Flavan-3-ole aus dem Grünteeextrakt	73
3.7.2	Semisynthese zur Darstellung der galloylierten Proanthocyanidine.....	74
3.7.3	Isolierung der Produkte der Semisynthese mittels HSCCC.....	79
3.7.4	Identifizierung der isolierten Substanzen.....	84
3.7.5	Bestimmung der Response-Faktoren	87
3.7.6	Optimierung der Probenaufarbeitung	88
4	Zusammenfassung	89
5	Material und Methoden	92
5.1	<i>Teematerial</i>	92
5.2	<i>Chemikalien und Lösungsmittel</i>	95
5.3	<i>Geräte und Parameter</i>	97
5.3.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	97
5.3.2	HPLC-ESI-MSn.....	99
5.3.3	High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC)	101
5.3.4	Weitere Geräte und Software	102
5.4	<i>Analytische und präparative Methoden</i>	103
5.4.1	Analytik der Aminosäuren	103
5.4.2	Analytik der Polyphenole.....	104



Inhaltsverzeichnis

5.4.3	Analytik der Catechine.....	106
5.4.4	Analytik der Proanthocyanidine.....	107
5.4.5	Methodenparameter.....	109
6	Literatur	110
7	Anhang.....	124
	<i>Anhang A: Quantitative Untersuchung der Aminosäuren in Teeproben</i>	<i>124</i>
	<i>Anhang B: Untersuchungen über D-Theanin im Tee.....</i>	<i>129</i>
	<i>Anhang C: Bestimmung der Gesamtphenole, Catechine und Alkaloide.....</i>	<i>133</i>
	<i>Anhang D: Physikalisch-Chemische Charakterisierung von EC-ECG</i>	<i>136</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Herstellungsprozesse schwarzer und grüner Tees und einige Beispiele der Kennzeichnungen von Blattgrößen (TRA, 2015)	7
Abbildung 2: Einteilung der Polyphenole nach Manach et al. (2004) und Clifford (2004)	9
Abbildung 3: Grundgerüste der Flavonoide (2-Phenylbenzopyran).....	9
Abbildung 5: Chemische Struktur von zwei dimeren Procyanidinen Typ B	12
Abbildung 6: Chemische Struktur der Flavone und Flavonole.....	13
Abbildung 7: Allgemeine chemische Struktur eines α -Aminosäuremoleküls	15
Abbildung 8: Derivatisierungsreaktion einer Aminosäure mit Fmoc-Cl	23
Abbildung 9: Reaktionsmechanismus von Marfey's Reagenz mit einer Aminosäure (Theanin als Beispiel).....	26
Abbildung 10: Aufbau einer HSCCC-Anlage verändert nach Sutherland (1987)	27
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Rotation und der Verteilung von zwei Phasen im Coil einer J-Typ HSCCC (links) und die Lage der Mischzonen I bis IV im abgewickelten Coil (rechts) (verändert nach Ito, 2005)	28
Abbildung 12: HPLC-DAD Chromatogramm eines Aminosäurenstandards (a) und einer Teeprobe (b). Detektionswellenlänge: 262 nm. 1. Asp, 2. Glu, 3. Asn, 4. Gln, 5. Ser, 6. Arg, 7. Gly, 8. Thr, 9. Ala, 10.Thea, 11.Pro, 12.GABA, 13.Val, 14.Ile, 15.Leu, 16.Phe, 17.Trp, 18.His, 19.Lys (verändert nach Horanni & Engelhardt, 2013)	33
Abbildung 13: Konzentrationen einiger (a) und gesamter (b) Aminosäuren nach verschiedenen Derivatisierungszeiten	34
Abbildung 14: Mittelwert des Gesamtaminosäuregehalts (n = 4) der gleichen Teeprobe in mg/g nach verschiedenen Extraktionsverfahren	35
Abbildung 15: Arbeitsschema zur Vorsäulenderivatisierung der Aminosäuren in Teeproben....	36
Abbildung 16: Vergleich der Theaninkonzentrationen in verschiedenen Tees nach ISO- und Fmoc Methode	39
Abbildung 17: Maximal-, Minimal- und Mittelwerte des gesamten Gehalts der Aminosäuren in verschiedenen Teearten.....	40
Abbildung 18: Vergleich einiger Aminosäuren in verschiedenen Teearten. Angaben in mg/g, für Theanin in mg/100 mg.....	40
Abbildung 19: Maximal-, Minimal- und Mittelwerte des Gesamtgehalts der Aminosäuren in verschiedenen Teeextrakten.....	44
Abbildung 20: Extraktionseffizienz der gesamten (links) und der einzelnen Aminosäuren (rechts) [rel. %] bezogen auf eine vollständige Extraktion in einem Ziehzeitintervall zwischen 30 und 300 Sekunden für den Gesamtgehalt und innerhalb der ersten Minute für die einzelnen Aminosäuren	45



Abbildungsverzeichnis

Abbildung 21: Vergleich der Aminosäuregehalte in mg/g in verschiedenen Blattgraden, die nach zwei unterschiedlichen Verfahren hergestellt wurden. Dryer Mouth ist der nicht-sortierte Tee (direkt aus der Öffnung des Trockners)	48
Abbildung 22: Zusammenhang zwischen der Erntezeit der Teeblätter und dem gesamten Aminosäuregehalt von 7 First Flush-, 2 In-Between-, 5 Second Flush- und 3 End of Season Darjeeling Tees	49
Abbildung 23: Gehalt der Aminosäuren in mg/g in vier japanischen Grüntees mit verschiedenen Beschattungsgraden	49
Abbildung 24: MS und MS ² Spektren des synthetisierten D-Theanins.....	52
Abbildung 25: Pipettierschema der Derivatisierung mit FDAA	52
Abbildung 26: Chromatographische Trennung von L-/ D-Theanin-Standard, die MS/MS ² Spektren der beiden Enantiomere des Theanins und des Reagenzes mit seinem Hydrolyseprodukt	53
Abbildung 27: Chromatographische Trennung von (a) Weißteeprobe-China Buddhist, (b) Grüntee-Chun Mee, (c) Schwarzteeextrakt und (d) Darjeeling Schwarztee sowie die MS/MS ² Spektren der beiden Enantiomere des Theanins.....	55
Abbildung 28: Basispeak-Chromatogramm von derivatisierter Teeprobe (a) und den resultierenden Peaks (1 bis 5) in den Abbildungen (b, c, d, bzw. e). Als Vergleich ist ein derivatisierter L-/D-Theanin-Standard in (f) dargestellt.....	57
Abbildung 29: Anteil an D-Theanin (% bezogen auf den gesamten Theaningehalt) in verschiedenen Blattgraden von Assam- und Darjeeling-Tees.....	60
Abbildung 30: Mittel-, Maximal- und Minimalwerte der Gesamtphenolgehalte (% i. Tr.) von Blatt- und Instanttees.....	62
Abbildung 31: Graphische Darstellung der prozentualen Mittelwerte der einzelnen Catechine sowie ihre Summe in weißen, grünen, Oolong- und schwarzen Tees (i.Tr.)	64
Abbildung 32: Verteilung der Teeproben nach dem 55% Kriterium.....	66
Abbildung 33: Mittelwerte der TG und GA in verschiedenen Tees (% i. Tr.)	68
Abbildung 34: Extraktionsausbeute von TB, TG, GA, Koffein und Catechinen-Summengehalt bezogen auf eine vollständige Extraktion in einem Ziehzeitintervall zwischen 30 und 300 Sekunden	70
Abbildung 35: Abbildung: HSCCC-Chromatogramm ($\lambda = 278$ nm) der Trennung des Grünteeextrakts (1,5 g, Fließmittel: tBME/Acetonitril/Wasser 2:2:3, v/v/v)	74
Abbildung 36: Chemische Struktur eines Chalcan-Flavan-3-ol-Dimeren	75
Abbildung 37: Mechanismus zur semisynthetischen Darstellung der galloylierten Proanthocyanidine. Verändert nach Köhler (2006).....	76
Abbildung 38: HPLC-Chromatogramme des Präzipitats (a), Filtrats (b) des Traubenkernextrakts nach einer Ethanol/ <i>n</i> -Hexan-Ausfällung, Reaktionsgemisch von der Semisynthese mit EGCG (c) und ECG (d) bei einer Wellenlänge von 280 nm.....	77



Abbildungsverzeichnis

Abbildung 39: Optimierung der Reaktionsbedingungen der Semisynthese mit EGCG als Nukleophil.....	78
Abbildung 40: HSCCC-Chromatogramm (CCC6) der Semisynthese mit EGCG bei 280 nm	80
Abbildung 41: HSCCC-Chromatogramm (CCC7) der Semisynthese mit EGCG bei 280 nm	81
Abbildung 42: HSCCC-Chromatogramm (CCC11) der Semisynthese mit EGCG bei 280 nm im Tail-to-Head-Modus.....	82
Abbildung 43: HSCCC-Chromatogramm (CCC13) der Semisynthese mit EC bei 280 nm im Tail-to-Head-Modus.....	84
Abbildung 44: Massenspektrum von Gambiridin im negativen Modus mit den chemischen Strukturen	85
Abbildung 45: Postuliertes Fragmentierungsmuster von EC-ECG (Wu et al., 2003; Köhler, 2006; Lee et al., 2010)	86



Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1: Teeimporte nach Deutschland von 2015 (Deutscher Teeverband e.V., 2016)	1
Tab. 2-1: Namen, Symbole, und Formel der untersuchten Aminosäuren nach IUPAC (1984) ..	15
Tab. 3-1: Kalibrierungsparameter der Aminosäuren nach der FMOC-Methode: Nachweisgrenze (NWG), Bestimmungsgrenze (BG), und Messbereich der jeweiligen Aminosäure.....	37
Tab. 3-2: Aminosäuregehalte in mg/g (i.Tr.) in verschiedenen Teearten	43
Tab. 3-3 Veränderung der Aminosäuregehalte (in mg/100 g i.Tr.) in verschiedenen Herstellungsprozessen und Endprodukten	47
Tab. 3-4: Vergleich des Theaningehalts (in g/100 g) nach der FDAA-, FMOC- und ISO-Methode	58
Tab. 3-5: Enantiomerenzusammensetzung des Theanins in verschiedenen Teeextrakten aus dem gleichen Teematerial	59
Tab. 3-6: Mittelwerte der Catechine in verschiedenen Instant-Tees in g/100 g i.Tr.	65
Tab. 3-7: Mittelwerte von TB, TG, GA und Koffein in g/100 g (i.Tr.) in Weiß- (WT), Grün- (GT), Oolong-(OT) und Schwarzteeextrakt (ST)	68
Tab. 3-8: Verteilungskoeffizienten der untersuchten Fließmittelsysteme für die Trennung der semisynthetisierten Proanthocyanidine.....	79
Tab. 3-9: Pseudomoleküllionen und Fragmentierungsmuster der isolierten Proanthocyanidine im negativen Modus	85
Tab. 3-10: Vergleich der gegen Koffein und Epicatechin berechneten Relativen Response-Faktoren mit den ISO bzw. den theoretischen Werten	87
Tab. 3-11: Gehalte einiger Proanthocyanidine (mg/kg i Tr.) nach der bis jetzt angewandten (M1) und der optimierten (M2) Methode	88
Tab. 5-1: Verwendete Teeproben mit ihrer Herkunft und Trockenmasse.....	92
Tab. 5-2: Verwendete Chemikalien mit Reinheit und Hersteller	95
Tab. 7-1: Kalibrierungsparameter der Aminosäuren nach der FMOC-Methode: Geradengleichungen, Bestimmtheitsmaß (R^2), relative Standardabweichung (r.SA), Variationskoeffizient (VK)	124
Tab. 7-2: Aminosäuregehalte (mg/g i.Tr.) der untersuchten schwarzen Tees.....	124
Tab. 7-3: Aminosäuregehalte (mg/g i.Tr.) der untersuchten schwarzen Tees.....	125
Tab. 7-4: Aminosäuregehalte (mg/g i.Tr.) der untersuchten Oolong- (38 bis 93) und weißen Tees.....	126
Tab. 7-5: Aminosäuregehalte (mg/g i.Tr.) der untersuchten Grüntees	126
Tab. 7-6: Aminosäuregehalte (mg/g i.Tr.) der untersuchten Grüntees	127
Tab. 7-7: Aminosäuregehalte (mg/g i.Tr.) der untersuchten Tee-Extrakte	128
Tab. 7-8: Enantiomere Zusammensetzung des Theanins in verschiedenen Tees	129



Tabellenverzeichnis

Tab. 7-9: Deskriptive Statistik für D-/L-Theanin in verschiedenen Teesorten. Statistik wurde anhand SPSS 20.1 durchgeführt	131
Tab. 7-10: Relative Response-Faktoren (RRF) der einzelnen Catechine, Standardabweichungen (SA in g/100 g) und Variationskoeffizienten (VK in %) für Catechine und Tee-Alkaloide	133
Tab. 7-11: Einzel-, Mittel-, Minimal- und Maximalwerte von Theobromin (TB), Theogallin (TG), Gallussäure (GA), Catechine, Gesamtpolyphenole (GPP) und Ratio (Cat/GPP) in Schwarz-, Pu-Erh-, Grün-, Oolong-, Weiß- und Instanttees. Die Werte sind als Prozent in Bezug auf die Trockenmasse des Tees (außer Ratio) aufgegeben.....	133



Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

(+)-C	(+)-Catechin
ACN	Acetonitril
Ala	Alanin
Arg	Arginin
AS	Aminosäuren
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
CCC	Countercurrent Chromatography (Gegenstromverteilungschromatographie)
CG	(+)-Catechingallat
Dabsyl-Cl	4-(Dimethylamino) azobenzol-4-sulfonylchlorid
Dansyl-Cl	1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfonylchlorid
DNFB	2,4-Dinitrofluorbenzol (2-4-dinitrofluorobenzene)
EC	(-)-Epicatechin
ECG	(-)-Epicatechingallat
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat
EGC	(-)-Epigallocatechin
EGCG	(-)-Epigallocatechingallat
ESI	Elektronen-Spray-Ionisation
EW	Einwaage
Fmoc-Cl	Fluorenylmethoxycarbonyl-Chlorid
GA	Gallussäure
GABA	γ -Aminobuttersäure
Gln	Glutamin