



## HPTLC-Bestimmung von Kakaoinhaltsstoffen in den verschiedenen Produktionsstufen der Schokoladeherstellung

Weitere Themen dieser Ausgabe:

- AMD-Trennung von Bioziden
- Identifizierung der Inhaltsstoffe in Ampfer
- Quantifizierung von 18 $\beta$ -Glycyrrhizinsäure in Süssholz
- Stabilitätstests von Cefixim und Azithromycin

## HPTLC-Bestimmung von Kakaoinhaltsstoffen in den verschiedenen Produktionsstufen der Schokoladeherstellung



Carlo Weber, Katrin Jedrys und Dr. Vasilisa Pedan

Das Institut für Lebensmittel- und Getränkeinnovation an der Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften in Wädenswil setzt sich mit genussvollen, gesunden, sicheren und nachhaltigen Lebensmitteln auseinander. Neben der Ausbildung von Ingenieurinnen und Ingenieuren der Lebensmitteltechnologie wird spezifisches Wissen bedarfsgerecht für Industrie und deren Forschungsfragen zur Verfügung gestellt. Einer der Forschungsschwerpunkte stellt die Kakaobohne und deren Verarbeitungsprodukt Schokolade dar. Hierfür werden in der Forschungsgruppe Lebensmittelchemie verschiedene Analysemethoden wie HPLC-MS, FT-IR und HPTLC-MS eingesetzt. Besonders die Verfolgbarkeit von wertgebenden Inhaltsstoffen und ihren Veränderungen über die Wertschöpfungskette stehen hierbei im Vordergrund.

### Einleitung

Polyphenole werden schon länger als antioxidativ wirksame sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe geschätzt, so auch in Kakao und seinem verarbeiteten Endprodukt Schokolade. Speziell die Charakterisierung und quantitative Bestimmung höhermolekularer oligomerer Proanthocyanidine (PA) sind im Gegensatz zu niedermolekularen monomeren Flavan-3-olen wegen ihrer hohen antioxidativen Kapazität in Rohkakaobohnen von Bedeutung [1]. Vor allem die Veränderungen der PA sind massgebend bei der Beurteilung des sensorischen organoleptischen Eindrucks, wobei monomere PA eher für die Bitterkeit und oligomere PA eher für die Adstringenz verantwortlich sind. Ebenso spielen Alkaloide als

bittere Geschmackskomponenten und wegen ihres anregenden, stimulierenden Effekts eine wichtige Rolle. Die Anthocyanine können als Indikator für den Fermentationsgrad der Kakaobohne herangezogen werden.

**Ziel dieser Arbeit war es, eine qualitative und quantitative Bestimmungsmethode von oligomeren PA, Alkaloiden und Anthocyaninen in der Wertschöpfungskette – von der Rohkakaobohne über die Kakaomasse bis hin zur Schokolade – zu entwickeln. Die HPTLC erwies sich hierbei als eine wertvolle Methode, um mehrere Analysen schnell und effizient durchführen zu können. Neben der Erfassung eines charakteristischen Fingerprints von Extrakten der jeweiligen Prozessstufe kann parallel dazu eine bildgebende Datenbank aufgebaut werden.**

### Schicht

HPTLC-Platten Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck), 20 x 10 cm

### Proben

Die Schokoladenherstellung wurde im Labormassstab mit einem Ansatz von 10 kg Rohkakaobohnen durchgeführt [2]. Für die Quantifizierung phenolischer Verbindungen wurden fünf Stichproben aus jedem Prozessschritt gezogen. Dabei handelte es sich um (1) Rohkakaobohnen, (2) fermentierte Kakaobohnen, (3) geröstete Kakaobohnen, (4) 1 h conchierte Kakaomasse und (5) abgetafelte Schokolade.

### Probenvorbereitung

1 g fein vermahlene und entfettete Kakaopulver wird dreimal mit 3 mL Aceton – Wasser 1:1 extrahiert, zentrifugiert, dekantiert und der vereinte Überstand 1:10 ebenfalls mit Aceton – Wasser verdünnt.

### Standardlösungen

Anthocyanin-Standardlösung (je 0,01 mg/mL in Methanol) mit Cyanidin-3-O-arabinsäure (Cn-ara) und Cyanidin-3-O-glucosid (Cn-glc); Alkaloid-Standardlösung (0,2 mg/mL in Aceton – Wasser 1:1)

mit Koffein und Theobromin; PA-Standardlösung (0,1 mg/mL in Methanol) mit (-)-Epicatechin (EC), Proanthocyanidine B2 (PA B2) und C1 (PA C1) sowie Cinnamtannin A2 (Cinn A2)

## Probenauftragen

Bandförmige Auftragung mit DC-Probenautomat (ATS 4), 15 Banden, Bandlänge 8 mm, unterer Randabstand 8 mm, Abstand vom linken Plattenrand 20 mm, Auftragevolumina 5–10 µL für Standardlösungen und 2–10 µL für Probenlösungen

## Chromatographie

In der Automatischen Entwicklungskammer (ADC 2) mit Kammersättigung (mit Filterpapier) für 20 min und Konditionierung der Platte während 10 min bei 33 % relativer Feuchte (mit einer gesättigten Magnesiumchlorid-Lösung) mit Ethylformiat – Ameisensäure – Wasser – Toluol 30:4:3:1,5 bis zu einer Laufstrecke von 70 mm (vom unteren Plattenrand) sowie Trocknung für 5 min

## Postchromatographische Derivatisierung

Erhitzen der Platte auf dem DC-Plattenheizer bei 100 °C für 2 min, Tauchen der noch warmen Platte mit der Chromatogramm-Tauchvorrichtung in Echtblausalz B-Lösung (140 mg in 140 mL Methanol, 50 mL Dichlormethan und 10 mL Wasser), Tauchgeschwindigkeit 5 cm/s, Tauchzeit 0 s, 30 s Trocknen im Luftstrom. Alternativ kann zur Derivatisierung auch der Derivatizer benutzt werden.

## Dokumentation

TLC Visualizer unter UV 254 nm und Weisslicht vor sowie unter Weisslicht nach der Derivatisierung

## Densitometrie

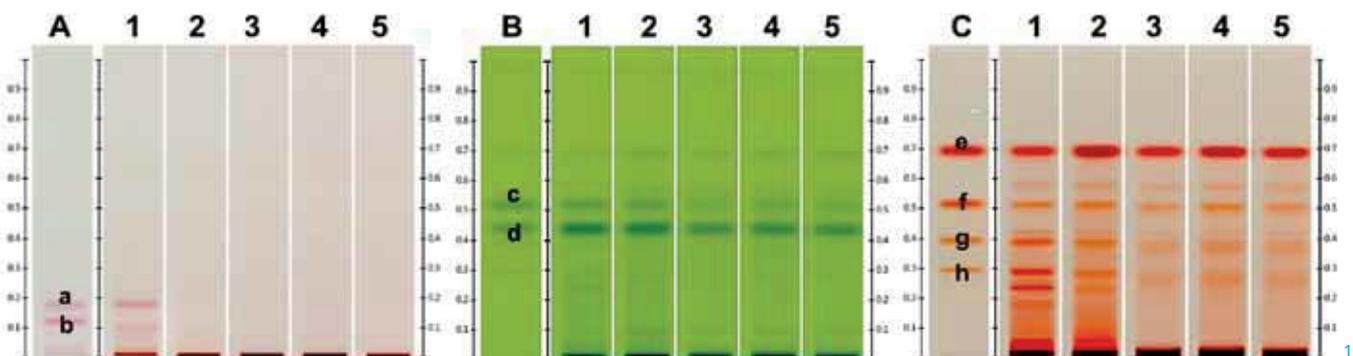
TLC Scanner 4 und *visionCATS*, Absorptionsmessung bei 280 nm für Alkaloide und 510 nm für Anthocyanine sowie oligomere PA nach Derivatisierung, Spalt 5,00 × 0,20 mm, Messgeschwindigkeit 50 mm/s, Polynome Kalibration (Peakfläche), Spektrenmessung zwischen 190–600 nm

## Massenspektrometrie

Die Zielzonen wurden direkt mit dem TLC-MS Interface 2 (mit ovalem Elutionskopf 4 × 2 mm) bei einer Flussrate von 0,1 mL/min mit Aceton – Wasser 1:1 in ein ESI-MS eluiert und im positiven Ionisierungsmodus detektiert.

## Ergebnisse und Diskussion

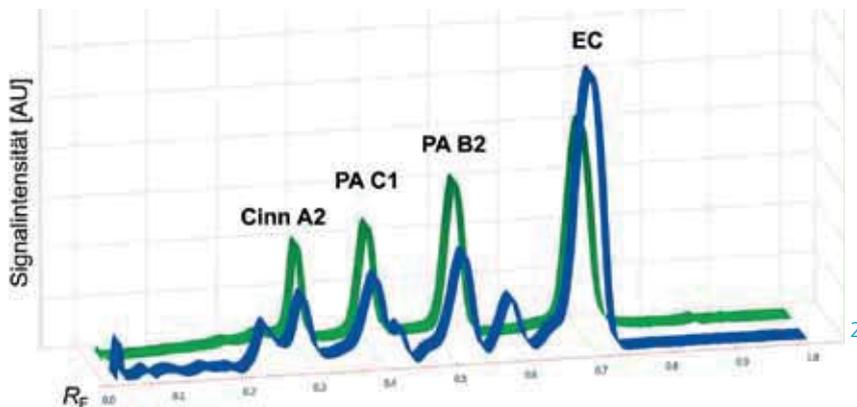
Die entwickelte Methode erlaubt eine gute Trennung und schnelle Quantifizierung von vier oligomeren PA, zwei Alkaloiden und zwei Anthocyaninen. Über den Verarbeitungsprozess wurde eine kontinuierliche Abnahme sowohl der oligomeren PA als auch der Alkaloide beobachtet, vor allem während der Fermentation und der Röstung. Im Speziellen erfahren höhermolekulare oligomere PA im Gegensatz zu niedermolekularen oligomeren PA die stärkste Abnahme. Auch die beiden Alkaloide nehmen im Laufe der Verarbeitung ab, wobei während der Fermentation die Alkaloide aus den Kotyledonen in die Samenschale diffundieren [3] und während der Röstung Alkaloide in das Fett übergehen können. Anthocyane, die für die rote Färbung der Kotyledonen verantwortlich sind (Rohkakaobohnen mit  $0,81 \pm 0,01$  mg/g Cn-ara und  $0,40 \pm 0,01$  mg/g Cn-glc) nehmen während der sechstägigen Fermentation kontinuierlich ab und können in der getrockneten Kakaobohne nicht mehr nachgewiesen werden.



HPTLC-Chromatogramme der Standardgemischlösungen von (A) Anthocyaninen (a: Cn-ara, b: Cn-glc) unter Weisslicht; (B) Alkaloide (c: Koffein und d: Theobromin) unter UV 254 nm und (C) PAs (e: EC, f: PA B2, g: PA C1 und h: Cinn A2) unter Weisslicht nach Derivatisierung sowie Produkte verschiedener Schokoladenverarbeitungsstufen mit 1: Rohkakaobohnen, 2: fermentierte Kakaobohnen, 3: geröstete Kakaobohnen, 4: 1 h conchierte Kakaomasse und 5: abgetafelte Schokolade

Mittelwerte der Polyphenol-, Alkaloid- und Anthocyaningehalte (mg/g fettfreie Trockenmasse, Reproduzierbarkeit inklusive der Probenvorbereitung, n = 3) in Produkten von fünf verschiedenen Schokoladenverarbeitungsstufen

Gehalt [mg/g]	Koffein	Theobromin	EC	PA B2	PA C1	Cinn A2
1	7,79 ± 0,70	16,38 ± 4,20	7,09 ± 1,09	2,98 ± 1,21	4,40 ± 0,08	5,06 ± 0,82
2	4,48 ± 0,64	11,12 ± 0,86	5,63 ± 0,45	2,04 ± 0,22	2,37 ± 0,22	2,01 ± 0,22
3	2,89 ± 0,39	7,42 ± 1,37	4,33 ± 0,36	1,72 ± 0,19	1,66 ± 0,19	1,10 ± 0,13
4	3,36 ± 0,19	9,00 ± 1,02	5,00 ± 0,15	2,23 ± 0,12	2,44 ± 0,26	1,35 ± 0,16
5	2,75 ± 0,17	7,41 ± 0,76	4,37 ± 0,04	1,81 ± 0,03	1,50 ± 0,20	0,92 ± 0,12



Densitogramme von Rohkakaobohnenextrakt (blau) und PA-Standardlösung (grün), Absorptionsmessung bei 510 nm nach Derivatisierung

Diese Bestimmung erlaubt somit die Verfolgung von wertgebenden Inhaltsstoffen über die jeweiligen Verarbeitungsstufen und kann zur Optimierung des Prozesses herangezogen werden.

[1] Pedan, V. et al. S. Food Res. Int. 89 (2016) 890-900

[2] Pedan, V. et al. Food Chem. 214 (2017) 523-532

[3] Timbe, D. et al. Food Sci. 43 (1978) 560-562

Weitere Informationen sind auf Anfrage von den Autoren erhältlich.

Kontakt: Dr. Vasilisa Pedan, Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften, Institut für Lebensmittel- und Getränkeinnovation, 8820 Wädenswil, Schweiz, vasilisa.pedan@zhaw.ch