

**Entwicklung neuer HPTLC-Methoden
zur Analyse von Phenol-Protein-Wechselwirkungen**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie
der Universität Hamburg

Institut für Lebensmittelchemie

Vorgelegt von

Kathrin Tscherch

Hamburg, im Juni 2013

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2010 bis Mai 2013 unter der wissenschaftlichen Betreuung von Prof. Dr. Sascha Rohn am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg angefertigt.

1. Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. Sascha Rohn

2. Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. Markus Fischer

Tag der Disputation: 12. Juli 2013

Student: Dr. Einstein, aren't these the same questions as last year's final exam?

Dr. Einstein: Yes; but this year the answers are different.

– Albert Einstein

Mein besonderer Dank gilt

Meiner Mutter Sabine für die uneingeschränkte Unterstützung, die sie mir in allen Lebenslagen gibt.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Sascha Rohn für die Ermöglichung dieser Arbeit, die Unterstützung zu jeder Tages- und Nacht-Zeit und die positive Zusammenarbeit.

Meinen Kolleginnen Frau Valeria Reim und Frau Stefanie Platz für ihr offenes Ohr, ihr Mitgefühl und ihre Unterstützung.

Meinen Bachelorstudentinnen Maike Krambeer und Nadine Thoma, meiner Masterstudentin Katrin Herrmann, meinen Diplomanden Julia Biller, Mareen Lehmann, Eduard Becker und Irina Weigel sowie meinen Forschungspraktikanten Svetlana Lipovceva, Eliska Podlucka, Franziska Kupke, Nathalia Bauer für ihre hervorragende Arbeit.

Publikationen

Meinke MC, Friedrich A, Haag S, Tscherch K, Vollert H, Groth N, Lademann J, Rohn S. 2013. Influence of dietary carotenoids on radical scavenging capacity in the skin and skin lipids. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **84**:365-373.

Ristau O, Tscherch K. „Leinöl – der Alleskönner“. erschienen am 1. Februar 2012 in der Frankfurter Rundschau und Berliner Zeitung.

Tscherch K, Biller J, Lehmann M, Trusch M, Rohn S. 2013. One-dimensional and two-dimensional high performance thin-layer chromatography as alternative tool for the analysis of polyphenol-protein interactions. *Phytochemical Analysis*. *Accepted*.

Tscherch K. Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC). Invited Book Chapter for *Lebensmittelanalytik* to be published by Springer Spektrum and edited by Reinhard Matissek, Gabriele Steiner and Markus Fischer. 2013. *In Press*.

Haag S*, Tscherch K*, Arndt S, Kleemann A, Lademann J, Rohn S, Meinke MC. 2013. Radical scavenging and skin lipids barrier function after application of a hyperforin-rich cream. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. *Accepted*.

Lunau N, Seelhorst K, Kahl S, Tscherch K, Stacke C, Rohn S, Thiem J, Hahn U, Meier, C. 2013. Fluorescently labeled substrates for α 1,3-fucosyltransferases. *Chemistry*. *Under revision*.

Vorträge und Posterpräsentationen

Tscherch K, Rohn S. Kopplungsmöglichkeiten der Dünnschichtchromatographie – Anwendung in der Lebensmittelanalytik. Chrom Forum 2011, 02.-03. März 2011, Hamburg. 10.-11. Mai 2011, Berlin. 27. Oktober 2011, Darmstadt.

Schüssler S, Sarge S, Schädig A, Wegner K, Tscherch K, Faltz A, Haase I, Fischer M. Inhibition lebensmittelpathogener Keime über die Targetenzyme GTP-Cyclohydrolase I und Pyruvatcarboxylase am Beispiel von *Listeria monocytogenes*. Norgenta Studententagung Technische Universität Hamburg-Harburg, 2. Mai 2011, Hamburg.

Tscherch K, Biller J, Rohn S. LC-MS vs. HPTLC-MS – Vergleichende Betrachtung der massenspektrometrischen Identifikation von Peptiden. 40. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 14.-16. September 2011, Halle/Saale.

Tscherch K, Rohn S. Entwicklung neuer bioautographischer Tests für die Hochleistungsdünnschichtchromatographie. 28. Chromatographie-Workshop 2011, 20.-21. September 2011, Steinfurt.

Tscherch K, Platz S, Rohn S. Wieviel Gutes steckt denn nun eigentlich in der Zwiebel? Wissenschaftliches Kolloquium der Staatlichen Gewerbeschule 13 Hamburg, 08. Februar 2012, Hamburg.

Tscherch K, Arndt S, Meinke M, Rohn S. Qualitative und quantitative Zusammensetzung der *Stratum corneum* Lipide der menschlichen Haut. Jahrestagung des Regionalverbandes Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft *Food Science meets Industry*, 19.-20. März 2012, Hannover.

Tscherch K, Biller J, Trusch M, Rohn S. *Proteomics revisited* - Zweidimensionale Hochleistungsdünnschichtchromatographie mit massenspektrometrischer Detektion zur Analyse von Proteinen. Jahrestagung des Regionalverbandes Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft *Food Science meets Industry*, 19.-20. März 2012, Hannover.

Tscherch K, Rohn S. Kopplung von Hochleistungsdünnschichtchromatografie und Massenspektrometrie zur Analyse von Peptidgemischen – *Proteomics revisited*. BRUKER DALTONIK GmbH Anwendertreffen 2012, 22.-23. März 2012, Kassel.

Tscherch K, Reim V, Herrmann K, Biller J, Rohn S. Hochleistungs-dünnschichtchromatographie (HPTLC) zur Analyse von Lebensmittelinhaltsstoffen. Informationsveranstaltung des JungChemikerForums an der Universität Hamburg, 24. Mai 2012, Hamburg.

Tscherch K, Rohn S. One-dimensional and two-dimensional high performance thin-layer chromatography as alternative tool for the analysis of polyphenol-protein interactions. XXIV. *International Conference on Polyphenols*, 22.-26. Juli 2012, Florenz, Italien.

Tscherch K, Reim V, Herrmann K, Biller J, Trusch M, Rohn S. HPTLC-MS und HPTLC-Bioautographie zur schnellen Charakterisierung von Struktur und Funktionalität sekundärer Pflanzenstoffe. Jahrestagung des Forschungskreis der Ernährungsinndustrie e.V. (FEI), 04.-05. September 2012, Hamburg.

Tscherch K, Lehmann M, Biller J, Deckwart M, Fischer M, Paschke-Kratzin A, Rohn S. Hochleistungsdünnschichtchromatographie-Immurfärbung zur Charakterisierung des Einflusses von Phenolverbindungen auf die immunologischen Eigenschaften von Nahrungsproteinen. 41. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 10.-12. September 2012, Münster/Westf.

Tscherch K, Herrmann K, Krambeer M, Biller J, Rohn S. Hochleistungsdünnschichtchromatographie-Bioautographie zur Analyse der antimikrobiellen Eigenschaften von ausgewählten phenolreichen Lebensmitteln. 41. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 10.-12. September 2012, Münster/Westf.

Tscherch K, Arndt S, Meinke M, Rohn S. Qualitative und quantitative Zusammensetzung der *Stratum corneum* Lipide der menschlichen Haut. 41. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 10.-12. September 2012, Münster/Westf.

Sarge S, Schüssler S, Schäding A, Wegner K, Faltz A, Tscherch K, Haase I, Gräwert T, Fischer M. Inhibition lebensmittelpathogener Keime am Beispiel von *Listeria monocytogenes*. 41. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 11. September 2012, Münster/ Westf.

Tscherch K, Platz S, Rohn S. HAMBURG SCHOOL OF FOOD SCIENCE – ein Partner der staatlichen Gewerbeschule 13. Wissenschaftliches Kolloquium der Staatlichen Gewerbeschule 13 Hamburg, 06. Februar 2013, Hamburg.

Tscherch K, Herrmann K, Krambeer M, Rohn S. Einfluss verschiedener Anbau- und Extraktionsbedingungen auf die antioxidative Aktivität ausgewählter Tee-Sorten. BioFach 2013, 13.-16. Februar 2013, Nürnberg.

Tscherch K, Kertesz V, Biller J, Van Berkel G, Trusch M, Rohn S. LESATM und HPTLC-DESI-MS zur Identifikation von posttranslational modifizierten Nahrungsproteinen. Jahrestagung des Regionalverbandes Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft *Food Science meets Industry*, 19.-20. Februar 2013, Hamburg.

Tscherch K, Friedrich A, Haag S, Darwin, ME, Vollert H, Groth N, Lademann J, Meinke M, Rohn S. Quantifizierung der *Stratum corneum* Lipide humaner Haut nach oraler Applikation von carotinreichen Nahrungsergänzungsmitteln. Jahrestagung des Regionalverbandes Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft *Food Science meets Industry*, 19.-20. Februar 2013, Hamburg.

Biller J, Tscherch K, Trusch M, Rohn S. HPTLC-MALDI-TOF-MS – eine Alternative zur Charakterisierung von Protein-Phenol-Derivaten? Jahrestagung des Regionalverbandes Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft „Food Science meets Industry“, 19.-20. Februar 2013, Hamburg.

Meinke MC, Friedrich A, Darwin ME, Tscherch K, Haag SF, Rohn S, Vollert H, Lademann J. Influence of supplementation with a curly kale extract on cutaneous carotenoids, radical scavenging activity and skin lipids. Phytokongress 2013, 08.-10. März 2013, Leipzig.

Reim V, Tscherch K, Rohn S. Analyse von Saponinen in Erbsen (*Pisum sativum* L.) mittels HPTLC-MS und HPTLC-Hämolyse-assay. 50. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung, 20.-22. März 2013, Bonn.

Seelhorst K, Lunau N, Tscherch K, Stacke C, Rohn S, Thiem J, Meier C, Hahn U. Human Fucosyltransferase IX. Production, Characterization & Substrate Variety. 6th International Congress on Biocatalysis, 2.-6. September 2012, Hamburg-Harburg.

Tscherch K, Melles D, Morschheuser L, Kertesz V, Van Berkel G, Karst U, Rohn S. Identification of posttranslational modifications of food proteins by using EC/ESI-MS. 2nd International Workshop on Electrochemistry/Mass Spectrometry, 23. und 24. Mai 2013, Münster/Westf., Germany.

Tscherch K, Melles D, Morschheuser L, Kertesz V, Van Berkel G, Karst U, Rohn S. Identification of posttranslational modifications of food proteins by using EC/ESI-MS. 42. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 16.-18. September, Braunschweig, Germany.

Kurzfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung von HPTLC-Methoden zur Analyse von Phenol-Protein-Wechselwirkungen. Die innerhalb dieser Arbeit entwickelten HPTLC-Methoden sollten dazu dienen, die unverdauten Phenol-Protein-Derivate hinsichtlich ihrer Polarität, UV-Aktivität, ihres Molekulargewichtes, ihrer antimikrobiellen und antigenen Eigenschaften zu untersuchen. Nach einem tryptischen Verdau sollten außerdem die Polarität, UV-Aktivität und die Radikalfängerfängereigenschaften der Peptide in einem 1D- und 2D-HPTLC-System untersucht werden. Das Peptidspektrum der Phenol-Protein-Derivate wurde mittels HPTLC-DESI/MS und HPTLC-MALDI/TOF/MS untersucht.

Grundlage zur Analyse der Phenol-Protein-Derivate stellt eine gute Trennung der Peptide und Proteine im chromatographischen System dar. Daher wurde innerhalb dieser Arbeit zunächst eine Methodenentwicklung zur 1D- und 2D-Trennung von Peptiden/Proteinen durchgeführt. Die speziell zur Peptid-/Protein-Analyse angebotenen HPTLC-ProteoChrom[®]-Kieselgel-Glasplatten zeigten im Vergleich zu den analogen HPTLC Ausführungen eine etwas bessere Trennleistung. Allerdings eignen sich auch die traditionellen HPTLC-Kieselgel-60-Schichten und HPTLC-Cellulose-Schichten sowie RP-Schichten zur Peptid-/Proteintrennung. Als mobile Phase in der 1D-HPTLC erzielte ein Gemisch aus 2-Butanol/Pyridin/Ammoniak (25 %)/Wasser (39/34/10/26, v/v/v/v) gute Ergebnisse. In Kombination mit 2-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (10/8/3/5, v/v/v/v) in der zweiten Dimension wurde eine gesteigerte Trennleistung erreicht. Innerhalb einer Methodenentwicklung zur Verbesserung der Trennleistung in der ersten Dimension haben sich ein Gemisch aus Acetonitril/Wasser/Methanol (5/3/2, v/v/v) und ein Gemisch aus Ethylacetat/Wasser/Ameisensäure (8/1/1, v/v/v) als geeignet erwiesen. Die Auswertung der 1D-Chromatogramme kann vor oder nach einer postchromatographischen Derivatisierung mit Hilfe eines Wellenlängenscans erfolgen. Die 2D-Chromatogramme können softwaregesteuert unter Verwendung der Software Image Master Platinum 2D ausgewertet werden.

Die postchromatographische Analyse der Radikalfängereigenschaften erfolgt traditionell mit dem HPTLC-DPPH-*assay*, aber auch der Einsatz eines HPTLC-ABTS-*assays* ist denkbar. Beide *assays* wurde innerhalb dieser Arbeit für die Detektion von Radikalfängereigenschaften einfacher phenolischer Verbindungen validiert und miteinander verglichen. Der HPTLC-ABTS-*assay* stellte unter den gegebenen Bedingungen die sensitivere Methode dar und wurde daher zur Analyse von Phenol-Protein-Derivaten eingesetzt.

Die postchromatographische Analyse der antimikrobiellen Eigenschaften wird durch die Kombination von der HPTLC und der Bioautographie realisiert. Diese Technik sollte zur Analyse der antimikrobiellen Eigenschaften der Phenol-Protein-Derivate genutzt werden. Dazu wurden zunächst die in der HPTLC traditionell verwendeten stationären und mobilen Phasen auf eine Beeinflussung des Mikroorganismenwachstums untersucht. Eine negative Beeinflussung des Wachstums wurde für

Ameisensäure, Eisessig, Ammoniak (25 %) und n-Hexan sowie für HPTLC-KG-60-NH₂-F₂₅₄S-Glasplatten und TLC-KG-60-RP-8-F₂₅₄S-Glasplatten festgestellt. Außerdem wurde der Einfluss der optischen Dichte (d.h. Bakterienkonzentration) und der Inkubationsdauer auf das Analyseergebnis der HPTLC-Direkte Bioautographie untersucht. Eine optische Dichte von 0.1 bis 1 sowie eine Inkubationsdauer von einer bis vier Stunden führten zu einem guten Ergebnis. Allerdings scheinen sich diverse Parameter (neben optischer Dichte und Inkubationsdauer auch Sauerstoffgehalt und Luftfeuchtigkeit) auf das Ergebnis auszuwirken.

Die postchromatographische Analyse der antigenen Eigenschaften wird mit Hilfe der HPTLC-Immunfärbung (IF) erreicht. Die Untersuchung der Eignung von stationären Phasen ergab, dass Kieselgel-60-Schichten für die HPTLC-IF von Myoglobin gut geeignet sind. Bei der Verwendung von Kieselgel-RP-18-Schichten wurde Myoglobin nicht mittels Immunfärbung detektiert. Daher ist von einer Verwendung dieser zur HPTLC-IF vorerst abzuraten.

Die Kopplungen von der HPTLC zur ESI/MS, DESI/MS und MALDI/TOF/MS wurden im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich für die Analyse von unmodifizierten sowie modifizierten Peptiden eingesetzt. Mit Hilfe der HPTLC-DESI/MS und HPTLC-MALDI/TOF/MS wurden modifizierte Peptide auf der HPTLC-Platte lokalisiert und identifiziert, wobei die Stellung der Modifikation im Peptidmolekül durch eine HPTLC-DESI/MS/MS Analyse bis auf zwei Aminosäureseitenketten eingegrenzt werden konnte. Demnach stellt die Kopplung von HPTLC und Massenspektrometrie (besonders die HPTLC-DESI/MS) eine leistungsstarke Methode zur Identifizierung von mit phenolischen Verbindungen modifizierten Peptiden dar.

Die Reaktion von Modellproteinen und Chinonen sowie Semichinon-Intermediaten phenolischer/verwandter Verbindungen, die in der Literatur beschrieben werden, wurde innerhalb dieser Arbeit bestätigt. Zusätzlich wurden mit Hilfe der in dieser Arbeit entwickelten HPTLC-Methoden Ergebnisse, z.B. in Bezug auf die UV-Aktivität und auf die antigenen Eigenschaften, erhalten, die mit den bisherigen analytischen Methoden nicht erzielt werden konnten. Die Reaktivität der in dieser Arbeit untersuchten phenolischen/verwandten Verbindungen gegenüber den Modellproteinen Myoglobin, Lysozym, Casein und Ovalbumin nimmt in der Reihenfolge Chinasäure, Ferulasäure, *p*-Cumarsäure, Syringasäure, Sinapinsäure, Kaffeesäure, Gallussäure und Tanninsäure zu. Es kann festgestellt werden, dass die kovalente Bindung von Chinonen und Semichinon-Intermediaten phenolischer/verwandter Verbindungen an Proteine entscheidend durch Parameter, wie die Stellung der Hydroxyl- und Methoxygruppen sowie der Aminosäurekomposition der Proteine beeinflusst wird. Diese Beeinflussung wurde vielfach in Studien erwähnt und kann durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt werden. Diese Reaktion führt zu unterschiedlichen Phenol-Protein-Derivaten, die sich in den hier untersuchten Eigenschaften signifikant voneinander unterscheiden (Polarität, UV-Aktivität, Färbung mit Derivatisierungsreagenzien, Radikalfängereigenschaften, Antigenität, Molekulargewicht).

Abstract

This work deals with the development of HPTLC methods for the analysis of phenol-protein interactions. HPTLC methods developed in this work should serve to investigate the undigested phenol-protein derivatives with respect to their polarity, UV activity, their molecular weight, and their antimicrobial and antigenic properties. After tryptic digestion, the peptides are analyzed in a 1D- and 2D-HPTLC system regarding their polarity, their UV-activity and radical scavenging properties. Furthermore, the peptide profile of phenol-protein derivatives was examined by HPTLC-DESI/MS and HPTLC-MALDI/TOF/MS.

A good separation in the chromatographic system represents the basis for the analysis of phenol-protein derivatives. Therefore, a method development for the 1D- and 2D-separation of peptides and proteins was initially performed within this work. ProteoChrom® HPTLC silica gel glass plates showed a better separation efficiency compared to the analog HPTLC plates. However, the traditional HPTLC silica gel 60, HPTLC cellulose layers, and reversed phase layers are also valid for peptide and protein separation. The mobile phase used in the 1D-HPTLC, a mixture of 2-butanol/pyridine/ammonia (25 %)/water (39/34/10/26, v/v/v/v), gave good results. In combination with 2-butanol/pyridine/glacial acetic acid/water (10/8/3/5, v/v/v/v) in the second dimension, an increased separation efficiency was achieved. Within a method development to improve the separation performance in the first dimension, also a mixture of acetonitrile/water/methanol (5/3/2, v/v/v) and a mixture of ethyl acetate/water/formic acid (8/1/1, v/v/v) have been found suitable. The evaluation of 1D-chromatograms may be performed before or after postchromatographic derivatization using a wavelength scan. 2D-chromatograms can be evaluated using the software ImageMaster 2D Platinum.

The postchromatographic analysis of radical scavenging properties is traditionally done using the HPTLC-DPPH-assay, but also the use of HPTLC-ABTS-assays is possible. In this work, both assays were validated regarding the detection of simple phenolic compounds' free radical scavenging properties and results were compared. The HPTLC-ABTS-assay represented the more sensitive method and was thus chosen to analyse phenol-protein-derivatives.

The postchromatographic analysis of antimicrobial properties is provided by the combination of HPTLC and bioautography. This technique was used for analysis of phenol-protein derivatives' antimicrobial properties. For this purpose, the influence of traditionally used stationary and mobile phases was evaluated. A negative effect on the growth of microorganisms was observed for formic acid, glacial acetic acid, ammonia (25 %) and n-hexane as well as HPTLC silica gel NH₂ F₂₅₄S glass plates and TLC silica gel RP-8 F₂₅₄S glass plates. Furthermore, the influence of the optical density and incubation period on the result of the HPTLC-direct bioautography analysis was examined. An optical density of 0.1 to 1 and an incubation period of one to four hours led to a good result. However, several parameters seem to have an impact (including oxygen and humidity) on the result.

The postchromatographic analysis of the antigenic properties is achieved by means of HPTLC-immunostaining (IS). The study of the stationary phase suitability showed that silica gel 60 layers are well suited for the HPTLC-IS analysis of myoglobin. When using silica gel RP-18 layers, myoglobin was not detected by immunostaining. Therefore, this layers should not be used for HPTLC-IS.

The coupling of HPTLC and ESI/MS, DESI/MS and MALDI/TOF/MS have been successfully used in this work for the analysis of unmodified and modified peptides. Using HPTLC-MALDI/TOF/MS and HPTLC-DESI/MS modified peptides were located and identified on the HPTLC plate. The modifications' position within the peptide molecule could be localized to two amino acid side chains by a HPTLC-DESI/MS/MS analysis. Accordingly, the coupling of HPTLC and mass spectrometry (especially HPTLC-DESI/MS) represents a powerful method to identify peptides modified with phenolic compounds.

The reaction of quinones and semiquinone intermediates of phenolic/related compounds with model proteins, which is already described in the literature, was confirmed in this study. In addition, HPTLC methods developed in this work gave additional results, e.g. in terms of UV-activity and antigenic properties. These observations could barely be achieved with the traditional analytical methods. The reactivity of the examined phenolic/related compounds against the model protein myoglobin, lysozyme, casein and ovalbumin increases in the order of quinic acid, ferulic acid, p-coumaric, syringic, sinapic acid, caffeic acid, gallic acid and tannic acid. It can be noted, that the covalent attachment of quinones and semiquinone intermediates of phenolic/related compounds to proteins is influenced by crucial parameters, such as the position of the hydroxyl and methoxy groups, and proteins' amino acid composition. This influence was already mentioned in literature and can be confirmed by the results of this work. This reaction leads to different phenol-protein derivatives, which significantly differ in investigated properties (polarity, UV activity, free radical scavenging properties, antigenicity, molecular weight).

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Ad	Adendum
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethyl-benzthiazolin-6-sulfonat)
APGD	<i>atmospheric pressure glow charge</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Bidest.	Bidestilliert
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CBB-G250	Coomassie Brilliant Blue G250
Da	Dalton
DAC	Diammnumhydrogencitrat
DART	<i>direct analysis in real time</i>
DB	Direkte Bioautographie
DESI	<i>desorption electrospray ionization</i>
Dest.	Destilliert
DHAP	2,5-Dihydroxyacetonphenon
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DONS	Dioclylnatriumsulfosuccinat
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTT	Dithiothreitol
EASI	<i>easy ambient sonic-spray ionization</i>
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EDTA	Ethylendiammintetraacetat
EGCG	Epigallocatechin-gallat
ELDI	<i>electrospray-assisted laser desorption/ionization</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ESI	<i>electrospray ionisation</i>
FA	Ameisensäure (<i>formic acid</i>)
FAB	<i>fast atom bombardment</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GS	Gallussäure
HBA	Hydroxybenzoesäuren (<i>hydroxybenzoic acids</i>)

HCA	Hydoxymzimtsäuren (<i>hydroxycinnamic acids</i>)
HPTLC	High-performance thin-layer chromatography
HRP	Meerrettich Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IF	Immunfärbung
INT	p-Iodonitrotetrazolium Violett
KS	Kaffeesäure
LA-ICPMS	<i>laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
LB	Luria Bertani
LDL	Low Density Lipoprotein
LD-CI	<i>laser desorption-chemical ionization</i>
LIAD	<i>laser-induced acoustic desorption</i>
MALDI	Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation (<i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (Thiazolylblau)
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NMWL	nominales Molekulargewichtslimit
NP	<i>normal phase</i> (Normalphase)
OD _{600nm}	Optische Dichte bei 600 nm
OPLC	<i>over-pressure layer chromatography</i>
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PIBM	Polyisobutylmethacrylat
PPO	Polyphenol-Oxidase, auch Tyrosinase (EC 1.14.18.1)
POD	Peroxidasen (EC 1.11.1.7)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RP	<i>reversed phase</i> (Umkehrphase)
RPC	<i>rotation planar chromatography</i>
SA	Sinapinsäure (<i>sinapinic acid</i>)
SALDI	<i>surface-assisted laser desorption/ionization</i>
SDS	Sodium dodecyl sulfat
SIMS	<i>secondary ion mass spectrometry</i>
STD	Standard
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trolox	6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure

Abkürzung der Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Inhalt

1	Einleitung	1
2	Kenntnisstand / Theoretischer Hintergrund	2
2.1	Sekundäre Pflanzenstoffe.....	2
2.1.1	Phenolische Verbindungen	5
2.2	HPTLC.....	41
2.2.1	Grundlagen.....	41
3	Problemstellung	59
4	Material und Methoden.....	61
4.1	Material	61
4.1.1	Phenolische und verwandte Verbindungen.....	61
4.1.2	Proteine zur Methodenentwicklung	61
4.1.3	Proteine zur Derivatisierung	62
4.1.4	Enzyme für den enzymatischen Abbau.....	64
4.1.5	Primäre und sekundäre Antikörper	64
4.1.6	Bakterienstämme für die HPTLC-Bioautographie.....	64
4.1.7	Chemikalien allgemein	65
4.1.8	HPTLC-Platten und HPLC-Säulen	66
4.2	Herstellung der Derivate sowie Protein-Kontrollen.....	66
4.2.1	Herstellung von Kaffeesäure-Derivaten des Myoglobins sowie Myoglobin-Kontrollen ...	66
4.2.2	Herstellung der restlichen Derivate sowie Protein-Kontrollen	67
4.2.3	Enzymatischer Verdau der Phenol-Protein-Derivate	68
4.3	Charakterisierung der unverdauten Phenol-Protein-Derivate sowie Protein-Kontrollen.....	68
4.3.1	HPTLC der unverdauten Derivate sowie Protein-Kontrollen	68
4.3.2	Charakterisierung der antigenen Eigenschaften mittels HPTLC-Immunfärbung	70
4.3.3	Charakterisierung der antimikrobiellen Eigenschaften mittels HPTLC-Bioautographie....	71
4.3.4	Bestimmung des Molekulargewichts mittels SDS-PAGE	73

4.3.5	Bestimmung des Molekulargewichts mittels MALDI/TOF/MS.....	77
4.3.6	Bestimmung des Molekulargewichts mittels HPTLC-MALDI/TOF/MS.....	78
4.4	Charakterisierung der enzymatisch verdauten Derivate sowie Protein-Kontrollen	80
4.4.1	1D-HPTLC-Analyse der enzymatisch verdauten Derivate sowie Protein-Kontrollen	80
4.4.2	2D-HPTLC-Analyse der enzymatisch verdauten Derivate sowie Protein-Kontrollen	82
4.4.3	Softwaregesteuerte Analyse des zweidimensionalen Peptidprofils von enzymatisch verdauten Derivaten sowie Protein-Kontrollen.....	83
4.4.4	Analyse der enzymatisch verdauten Derivate und Protein-Kontrollen mittels HPTLC-DPPH- <i>assay</i> und HPTLC-ABTS- <i>assay</i>	84
4.4.5	Analyse von Peptiden mittels HPTLC-ESI/MS	87
4.4.6	Analyse von Peptiden mittels HPLC-ESI/MS	88
4.4.7	Analyse der tryptisch verdauten Derivate sowie Protein-Kontrollen mittels HPTLC-DESI/MS	89
4.4.8	Analyse der tryptisch verdauten Derivate und Protein-Kontrollen mittels HPTLC-MALDI/TOF/MS	90
5	Ergebnisse und Diskussion	92
5.1	Methodenentwicklungen zur Charakterisierung der Phenol-Protein-Derivate	92
5.1.1	1D- und 2D-HPTLC-Analyse zur chromatographischen Trennung von Peptiden und Proteinen	92
5.1.2	Softwaregesteuerte Analyse des zweidimensionalen Peptidprofils von enzymatisch verdauten Proteinen.....	101
5.1.3	Bestimmung der Radikalfängereigenschaften mittels HPTLC-ABTS- <i>assay</i>	104
5.1.4	Charakterisierung der antimikrobiellen Eigenschaften mittels HPTLC-Bioautographie..	107
5.1.5	Charakterisierung der antimikrobiellen Eigenschaften mittels HPTLC-DB.....	112
5.1.6	Charakterisierung der antigenen Eigenschaften mittels HPTLC-Immunfärbung	118
5.2	Methodenvergleich von HPLC-ESI/MS und HPTLC-ESI/MS zur Identifikation von Peptiden....	125
5.3	Charakterisierung der unverdauten Phenol-Protein-Derivate	131

5.3.1	Bestimmung des Molekulargewichts mittels SDS-PAGE	131
5.3.2	Bestimmung des Molekulargewichts mittels MALDI/TOF/MS.....	135
5.3.3	Bestimmung des Molekulargewichts mittels HPTLC-MALDI/TOF/MS.....	142
5.3.4	Charakterisierung der antigenen Eigenschaften der Phenol-Protein-Derivate mittels HPTLC-IF	148
5.3.5	Charakterisierung der antimikrobiellen Eigenschaften der Phenol-Protein-Derivate mittels HPTLC-Bioautographie	150
5.4	Charakterisierung der verdauten Phenol-Protein-Derivate	160
5.4.1	Analyse der enzymatisch verdauten Phenol-Protein-Derivate mittels 1D- und 2D-HPTLC ..	160
5.4.2	Softwaregesteuerte Analyse des zweidimensionalen Peptidprofils der enzymatisch verdauten Phenol-Protein-Derivate.....	170
5.4.3	Analyse der tryptisch verdauten Phenol-Protein-Derivate mittels HPTLC-DESI/MS	172
5.4.4	Analyse der tryptisch verdauten Phenol-Protein-Derivate mittels HPTLC-MALDI/TOF/MS	177
6	Schlussfolgerung.....	181
7	Zusammenfassung.....	184
8	Literatur.....	189

1 Einleitung

Neben Lipiden und Kohlenhydraten stellen v.a. Proteine einen essentiellen Bestandteil der menschlichen Nahrung dar. Ernährungsphysiologisch spielen dabei die essentiellen Aminosäuren, wie z.B. Lysin, Tryptophan und Phenylalanin, eine entscheidende Rolle, da ihr Gehalt die biologische Wertigkeit eines Proteins bestimmt. Betrachtet man nun den Herstellungsprozess proteinhaltiger Lebensmittel stellt sich die Frage, in wieweit Proteine und deren biologische Wertigkeit verändert werden. Neben den klassischen analytischen Fragestellungen zur Identifikation von Masse, Aminosäuresequenz und Proteinstruktur, rücken deshalb die Veränderungen der Proteine bei der technologischen Be- und Verarbeitung von Lebensmitteln zunehmend in das Interesse. Solche posttranslationalen Proteinmodifikationen, wie sie durch die Reaktion mit anderen Lebensmittelinhaltsstoffen (z.B. sekundäre Pflanzenstoffe) entstehen können, sind noch nicht hinreichend charakterisiert.

Phenolische Verbindungen einschließlich einfacher Phenole und Phenolsäuren, wie Hydroxyzimtsäure und deren Derivate, sowie Flavonoide sind bioaktive Substanzen, die in Nahrungspflanzen vorkommen. Diese sekundären Pflanzenstoffe, denen eine Vielzahl von positiven Eigenschaften, wie z.B. antikanzerogen, antioxidativ, entzündungshemmend, nachgesagt wird, sind oftmals sehr reaktiv und können während der Be- und Verarbeitung von Lebensmitteln ebenfalls einer Veränderung unterliegen.

Wechselwirkungen zwischen phenolischen Verbindungen und Nahrungsproteinen treten allerdings nicht nur während der Lebensmittelbe- und Verarbeitung auf. Schon in den Rohstoffen zur Lebensmittelherstellung, z.B. in Nahrungspflanzen kann es zu Interaktionen zwischen natürlicherweise vorkommenden Phenolverbindungen und Speicherproteinen kommen. Während der Nahrungsaufnahme und der Verdauung treffen die genannten Verbindungen dann im Gastrointestinaltrakt aufeinander. Zusätzlich zu der Reaktion mit Nahrungsproteinen kann es zu einer Reaktion mit körpereigenen Proteinen, z.B. im Blutplasma oder im Gewebe der Organe des menschlichen Körpers kommen.

Betrachtet man die Reaktion zwischen Proteinen und phenolischen Verbindungen, so konnten bisher verschiedenste Auswirkungen dieser Reaktion auf die Eigenschaften beider Substanzklassen, wie z.B. Verringerung der antioxidativen Aktivität der Phenolverbindungen und Verminderung der Verdaubarkeit der Proteine, festgestellt werden. Dennoch blieben in den meisten Fällen die exakten Reaktionsstellen in der Proteinsequenz und die Struktur der Reaktionsprodukte unaufgeklärt. Um jedoch die ernährungsphysiologischen Auswirkungen der Veränderungen beider Inhaltsstoffe beurteilen zu können, ist es unerlässlich die Reaktion der unterschiedlichen Nahrungsbestandteile im Lebensmittel zu untersuchen und Reaktionsprodukte strukturell aufzuklären.

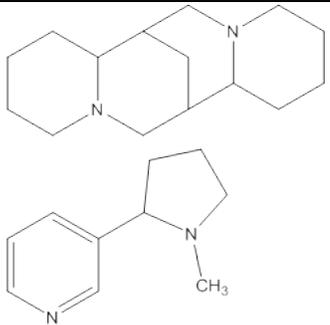
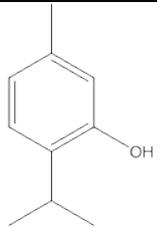
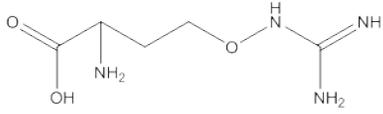
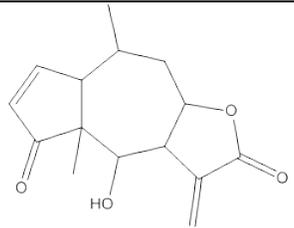
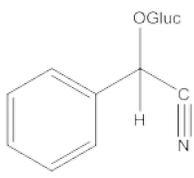
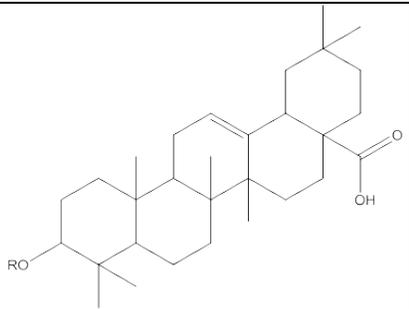
2 Kenntnisstand / Theoretischer Hintergrund

2.1 Sekundäre Pflanzenstoffe

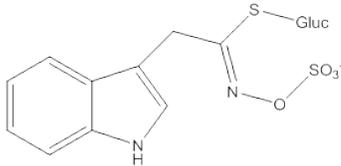
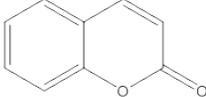
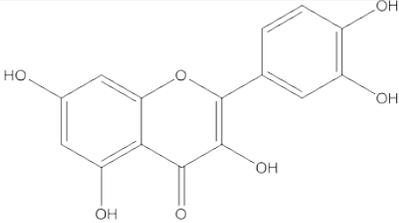
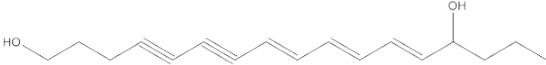
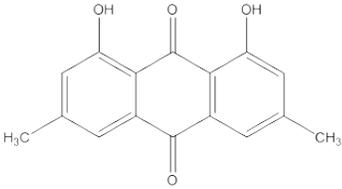
Lebensmittel enthalten neben Wasser und den bekannten Nährstoffen weitere Inhaltsstoffe. Diese früher teilweise als nicht-nutritive Inhaltsstoffe benannten Substanzen werden heute als bioaktive Substanzen bezeichnet. Hierzu zählen vor allem sekundäre Pflanzenstoffe, aber auch Ballaststoffe. Bisher gibt es keine einheitliche Definition des Begriffs „sekundäre Pflanzenstoffe“ (SP). In der englischsprachigen Literatur werden diese Verbindungen als *phytochemicals* bezeichnet. Hierbei handelt es sich um Substanzen, die im Gegensatz zu den primären Pflanzenstoffen (Kohlenhydrate, Proteine und Fette) im pflanzlichen Sekundärstoffwechsel als Abwehrstoffe (gegen Pflanzenfresser, Bakterien, Pilze, Viren und andere konkurrierende Pflanzen), sowie als Lockstoffe (für pollen- oder samenverteilende Tiere) oder Wachstumsregulatoren eine Rolle spielen, in geringen Konzentrationen vorhanden sind und in der Regel pharmakologische Wirkungen ausüben (Watzl und Leitzmann 1995; Wink und Schimmer 1999; Wink 2003). Es wird vermutet, dass mehr als 100.000 SP in der Natur vorkommen. Allerdings wurden bisher nur etwa 5 % der auf der Erde existierenden Pflanzen diesbezüglich untersucht. Generell ist das SP-Muster einer Pflanze komplex und ständigen Veränderungen unterworfen. So können Unterschiede in verschiedenen Geweben und Organen sowie in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Pflanze beobachtet werden. SP können in der Pflanze in ihrer aktiven Form oder als Vorstufe (engl. *precursor*) vorliegen, welche im Falle einer Wunde, Infektion oder innerhalb eines herbivoren Organismus aktiviert werden (Wink 2003). SP stellen bezüglich ihrer chemischen Struktur eine diverse Gruppe an pflanzlichen Inhaltsstoffen dar. **Tabelle 2-1** gibt eine Übersicht über ausgewählte Klassen sekundärer Pflanzenstoffe.

2. Kenntnisstand / Theoretischer Hintergrund

Tabelle 2-1. Übersicht über bekannte Klassen sekundärer Pflanzenstoffe; modifiziert aus Wink (2003).

Stickstoff-haltige SI	Anzahl bekannter Substanzen	Beispielhafte Strukturformel	Nicht-stickstoffhaltige SI	Anzahl bekannter Substanzen	Beispielhafte Strukturformel
Alkaloide	12000		Monoterpene	2500	
Nicht-proteinogene Aminosäuren	700		Sesquiterpene	5000	
Amine	100		Diterpene	2500	
Cyanogene Glycoside	60		Triterpene, Saponine, Steroide	5000	

2. Kenntnisstand / Theoretischer Hintergrund

Stickstoff-haltige SI	Anzahl bekannter Substanzen	Beispielhafte Strukturformel	Nicht-stickstoffhaltige SI	Anzahl bekannter Substanzen	Beispielhafte Strukturformel
Glucosinolate	100		Tertaterepene	500	
Alkylamide	150		Phenylpropanoide, Cumarine, Lignane	2000	
			Flavonoide	4000	
			Polyacetylene, Fettsäuren, Wachse	1000	
			Polyketide	750	
			Kohlenwasserstoffe	>200	

2. Kenntnisstand / Theoretischer Hintergrund

In den Anfängen zur Charakterisierung sekundärer Pflanzenstoffe wurden überwiegend toxische SP (wie Blausäure oder Alkaloide) untersucht, sodass die schädlichen Wirkungen dieser Substanzen zur Bezeichnung „antinutritive Inhaltsstoffe“ führten. Heute besteht vornehmlich ein Interesse an den protektiven Wirkungen, sodass eine Neubewertung der gesundheitlichen Bedeutung erfolgte. Folgerichtig ist die wertfreie Bezeichnung „sekundäre Pflanzenstoffe“ für diese Substanzen angemessen (Watzl und Leitzmann 1995). Die bioaktiven Wirkungen von SP sind vielseitig. **Tabelle 2-2** gibt eine Übersicht über bioaktive Wirkungen ausgewählter sekundärer Pflanzenstoffe.

Tabelle 2-2. Übersicht über bioaktive Wirkungen ausgewählter sekundärer Pflanzenstoffe; modifiziert aus Watzl und Leitzmann (1995).

Klasse	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Polyphenole	+	+	+	+	+	+	+		+	
Glucosinolate	+	+						+		
Terpene	+									
Phytosterine	+							+		
Carotinoide	+		+		+					
Saponine	+	+			+			+		
Protease-Inhibitoren	+		+						+	
Phytoöstrogene	+		+							
Sulfide	+	+	+	+	+	+	+	+		+
Phytinsäure	+		+		+			+	+	

A antikanzerogen, B antimikrobiell, C antioxidativ, D antithrombotisch, E immunmodulierend, F entzündungshemmend, G blutdruckregulierend, H cholesterinspiegelsenkend, I blutglucosespiegelsenkend, J verdauungsfördernd.

Bei den in dieser Arbeit untersuchten sekundären Pflanzenstoffen handelt es sich hauptsächlich um phenolische Verbindungen. Daher wird im Folgenden diese Klasse der sekundären Inhaltsstoffe näher erläutert.

2.1.1 Phenolische Verbindungen

2.1.1.1 Chemische Struktur, Biosynthese und Funktion

Phenolische Verbindungen stellen mit circa 6000 identifizierten Substanzen die größte Gruppe der in pflanzlichen Lebensmitteln enthaltenen sekundären Inhaltsstoffe dar (Kroll et al. 2003). Die Klasse der phenolischen Verbindungen ist strukturell und funktionell sehr divers. Allerdings weisen diese

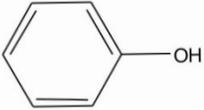
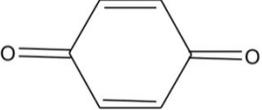
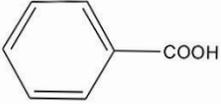
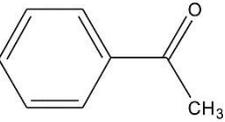
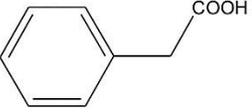
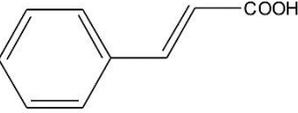
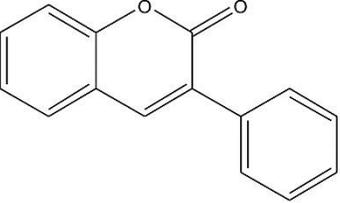
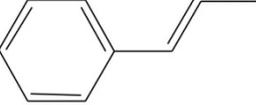
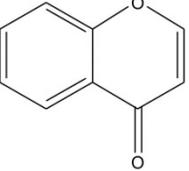
Verbindungen im Allgemeinen einen aromatischen Ring mit einer oder mehreren Hydroxyl-Gruppen auf (Robards et al. 1999). Normalerweise kommen phenolische Verbindungen in Pflanzen in ihrer glycosidischen Form, d.h. gebunden an Zucker, vor (Hollman und Arts 2000). Neben ihrer Rolle als Substrate in oxidativen Bräunungsreaktionen (vgl. **Kapitel 2.1.1.6.1**) und als Antioxidantien (vgl. **Kapitel 2.1.1.3**), spielen phenolische Verbindungen im Pflanzenwachstum und -metabolismus sowie als ernährungsphysiologisch aktive Substanzen im humanen Organismus eine bedeutende Rolle (Friedman 1996; Robards et al. 1999; Hollman und Arts 2000). Grundlegend für diese Eigenschaften ist dabei die Oxidationsreaktion zu betrachten (Robards et al. 1999). Die oxidative Bräunung ist in den meisten Lebensmitteln (z.B. in Früchten und daraus hergestellten Produkten) unerwünscht. Allerdings kann diese Reaktion auch zu dem spezifischen Charakter eines Lebensmittels beitragen (z.B. Kakao, Tee) und somit erwünscht sein (Friedman 1996; Robards et al. 1999). Die Fähigkeit phenolischer Verbindungen als Antioxidantien zu fungieren, ist dabei gleichermaßen im Lebensmittel als auch im menschlichen Körper erwünscht, da andere Lebensmittelinhaltsstoffe bzw. Zellorganellen oder Gewebe durch ihre Anwesenheit vor Oxidation geschützt werden können (Vinson et al. 1995; Hertog et al. 1997; Robards et al. 1999; Miura et al. 2001).

Die Klassifizierung der phenolischen Substanzen richtet sich hauptsächlich nach der Anzahl der an das phenolische Grundgerüst gebundenen Kohlenstoff-Atome. Eine Übersicht über die in der menschlichen Nahrung vorkommenden Klassen von phenolischen Verbindungen gibt **Tabelle 2-3**.

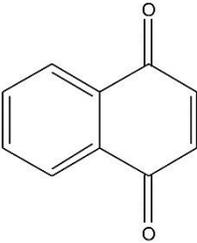
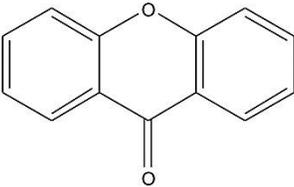
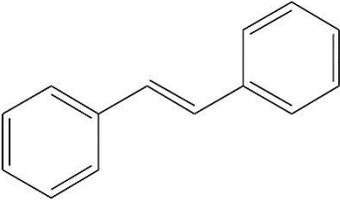
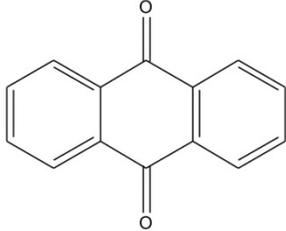
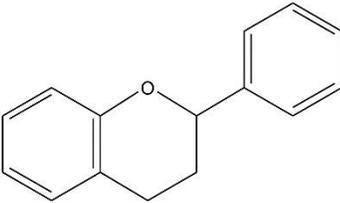
Flavonoide sind polyphenolische Verbindungen, deren Moleküle aus 15 Kohlenstoffen aufgebaut sind. Ihre Grundstruktur besteht aus zwei aromatischen Ringen, die über eine Brücke aus 3 C-Atomen verbunden sind (C₆-C₃-C₆). Flavonoide kommen in den verschiedensten chemischen Strukturvarianten ubiquitär in Pflanzen vor (siehe **Tabelle 2-4**). Variabel sind die Anzahl und die Stellung der Hydroxylgruppen, der Redoxstatus sowie die Struktur, Stellung und Art der Verknüpfung des Zuckerrestes mit dem Flavonoidringgerüst (Crozier et al. 2009).

2. Kenntnisstand / Theoretischer Hintergrund

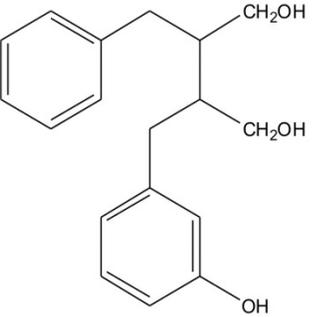
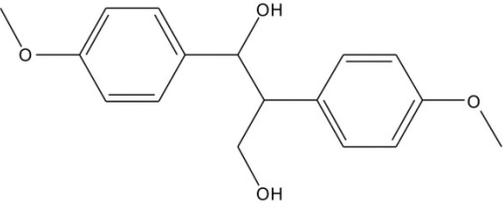
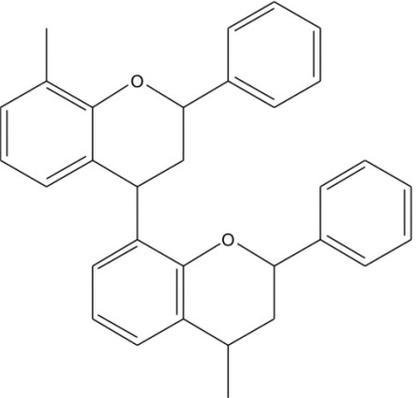
Tabelle 2-3. Übersicht über die wichtigsten, in der menschlichen Nahrung vorkommenden Klassen phenolischer Verbindungen; modifiziert aus O'Connell und Fox (2001) und Crozier et al. (2009).

C ₆	C ₆	Einfache Phenole		Benzochinone	
C ₆ -C _n	C ₆ -C ₁	Phenolsäuren			
	C ₆ -C ₂	Acetophenone		Phenylacetylsäuren	
	C ₆ -C ₃	Hydroxyzimtsäuren		Cumarine	
		Phenylpropene		Chromone	

2. Kenntnisstand / Theoretischer Hintergrund

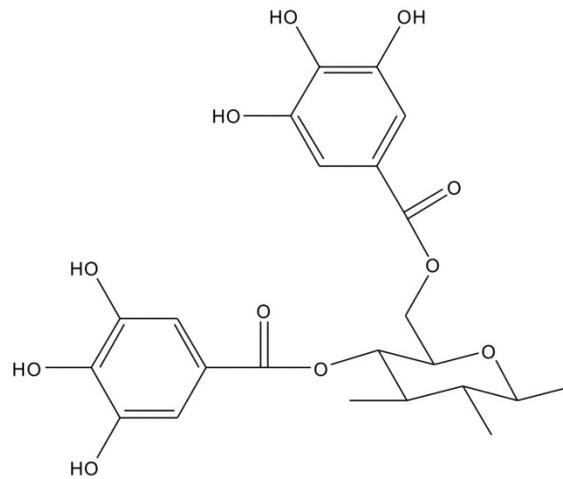
	C_6-C_4	Naphtochinone	
$C_6-C_n-C_6$	$C_6-C_1-C_6$	Xanthone	
	$C_6-C_2-C_6$	Stilbene	
		Anthrachinone	
	$C_6-C_3-C_6$	Flavonoide	

2. Kenntnisstand / Theoretischer Hintergrund

$(C_6-C_3)_n$	$(C_6-C_3)_2$	<p>Lignane</p> 
	$(C_6-C_3)_{2+n}$	<p>Lignine (Polymere aus C_6- C_3 HCA-Derivaten)</p> 
„Tannine“	$(C_6-C_3-C_6)_n$	<p>Kondensierte Tannine</p> 

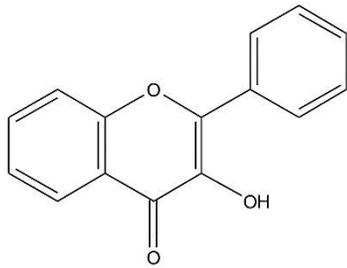
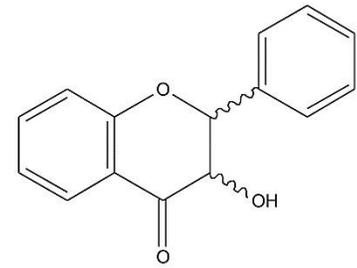
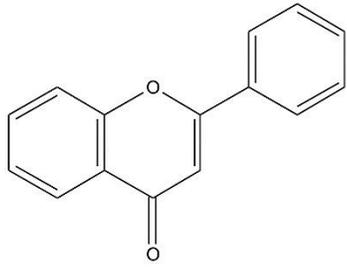
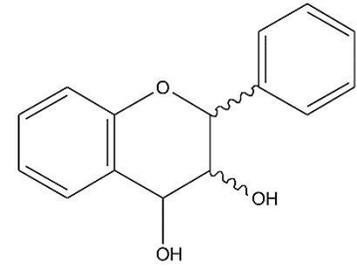
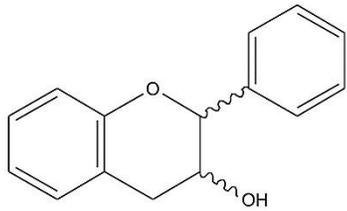
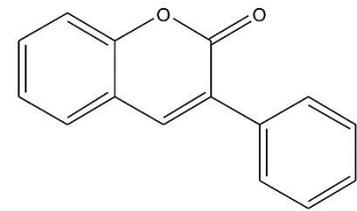
2. Kenntnisstand / Theoretischer Hintergrund

Hydrolysierbare
Tannine



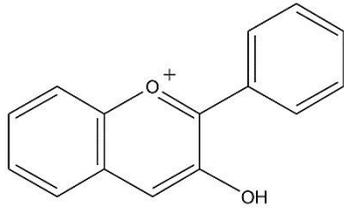
2. Kenntnisstand / Theoretischer Hintergrund

Tabelle 2-4. Übersicht über die wichtigsten, in der menschlichen Nahrung vorkommenden Flavonoide; modifiziert aus Crozier et al. (2009).

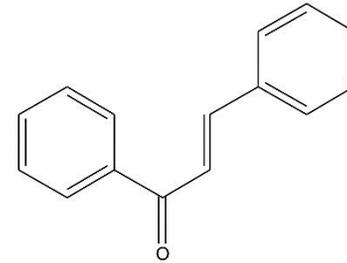
Flavonole		Dihydroflavonole	
Flavone		Flavan-3,4-diole	
Flavan-3-ole		Cumarine	

2. Kenntnisstand / Theoretischer Hintergrund

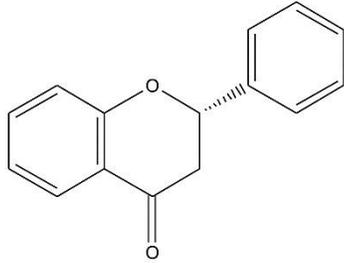
Anthocyane



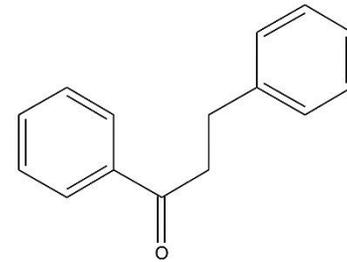
Chalcone



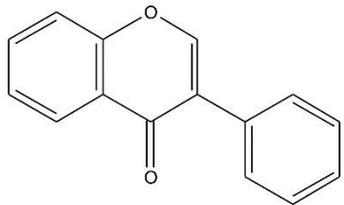
Flavanone



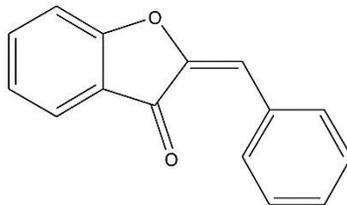
Dihydrochalcone



Isoflavone



Aurone



Phenolische Verbindungen kommen sowohl in tierischen als auch in pflanzlichen Lebensmitteln vor. Ausgangssubstanz für die Biosynthese von phenolischen Verbindungen ist die Aminosäure Phenylalanin, die in pflanzlichen Organismen und in Mikroorganismen über den Shikimisäureweg aus 5-Phosphoryl-D-erythrose und 2-Phosphoenolpyruvat synthetisiert wird (siehe **Abbildung 2-1**). Durch die enzymatisch katalysierte Oxidation des Phenylalanins (Monooxygenasen) baut der tierische Organismus eigene phenolische Verbindungen auf (z. B. Tyrosin, Kaffeesäure, Dopa, Dopamin, Melanin, Gerbstoffe, Lignin). Diese haben eine große physiologische Bedeutung als Komponenten von Proteinen (Tyrosin), als Neurotransmitter (Dopa, Dopamin) und als durch Tyrosinase polymerisierte phenolische Verbindungen (Monomer-Dopamin), die wichtig für die Pigmentierung von Haut und Haaren sind (Ebermann und Elmadfa 2011). Im pflanzlichen Metabolismus wird Phenylalanin durch enzymatisch katalysierte Abspaltung von Ammoniak in Zimtsäure umgewandelt (Phenylalanin-Ammoniak-Lyase). Durch oxidative Einführung von Hydroxylgruppen, katalysiert durch diverse Monooxygenasen, entstehen Hydroxymimtsäuren, wie z. B. die *p*-Cumarsäure (*p*-Hydroxymimtsäure) oder die Kaffeesäure (Crozier et al. 2009; El-Seedi et al. 2012). Zum Teil werden die Hydroxymimtsäuren oder deren Derivate weiter biosynthetisch zu Flavonoiden, Stilbenen oder Auronen usw. modifiziert, aber auch zu Oligomeren oder Polymeren (Lignane, Lignin, Tannine) mit Hilfe von Enzymen oxidativ umgesetzt oder durch Abbau der Seitenkette in Phenyl-C1-Verbindungen (z. B. Vanillin, Gallussäure usw.) umgewandelt (Ebermann und Elmadfa 2011).

2. Kenntnisstand / Theoretischer Hintergrund

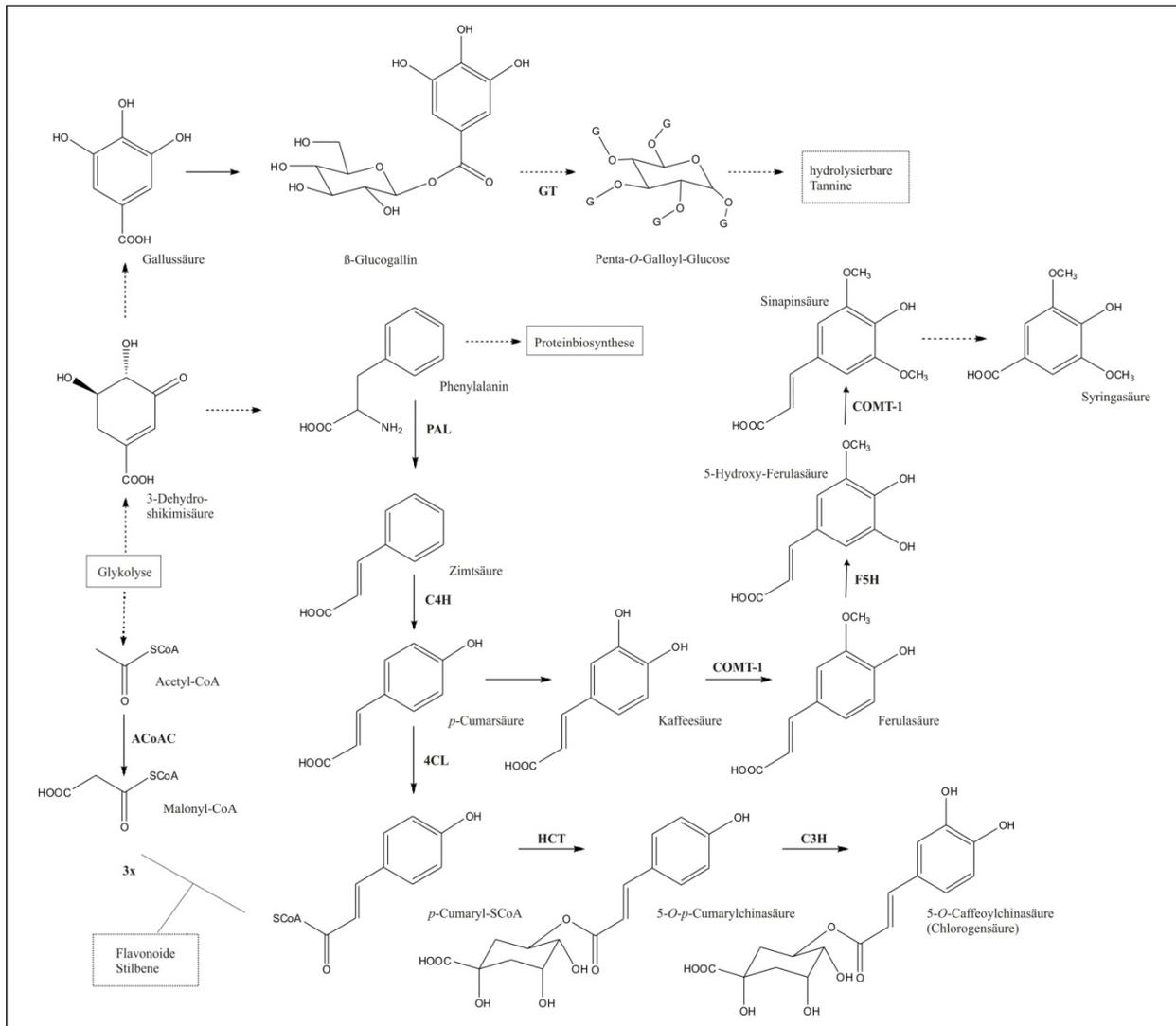


Abbildung 2-1. Schematische Darstellung der Biosynthese-Wege von ausgewählten phenolischen Verbindungen; Abkürzungen: G Galloylester, PAL Phenylalanin-Ammoniak-Lyase, C4H trans-Zimtsäure-4-Monooxygenase, COMT-1 Kaffee-/5-Hydroxy-Ferulasäure-*O*-Methyltransferase, 4CL 4-Cumarsäure-CoA-Ligase, F5H Ferulasäure-5-Hydroxylase, GT Galloyl-Transferase, AcoAC Acetyl-CoA-Carboxylase; modifiziert aus Elbasyouni et al. (1964) und Crozier et al. (2009).

Die Biosynthese der Flavonoide, Aurone und Stilbene hat zur Grundlage: a) Den vom Phenylalanin abgeleiteten Phenolstoffwechsel. b) Den aus dem Fettstoffwechsel, abgeleiteten Polyketidstoffwechsel. Polyketide sind formal Kondensationsprodukte von Coenzym-A-aktivierten Acetatresten. Die durch Coenzym A aktivierte Carboxylgruppe der Zimtsäuren wird durch drei Coenzym-A-aktivierte Malonsäurereste verlängert. Je nach Art des Ringschlusses des entstandenen Polyketon-

2. Kenntnisstand / Theoretischer Hintergrund

Zwischenproduktes entstehen Stilbene (formal analog einer Aldolkondensation) oder Chalkone (formal analog einer Claisen-Kondensation). Je nach der Art des Ringschlusses der Chalkone entstehen daraus Aurone (Derivate des Benzofurans) oder Flavonoide (Derivate des Benzopyrans), wobei die Auronbildung selten und die Flavonoidbildung sehr häufig in der Natur beobachtet wird (Ebermann und Elmadfa 2011).

Phenolische Verbindungen besitzen ein breites Spektrum an Eigenschaften, welche innerhalb der Pflanze sowie im weiteren Verlauf innerhalb des Lebensmittels einen Einfluss ausüben (siehe **Tabelle 2-5**).

Tabelle 2-5. Ausgewählte Eigenschaften phenolischer Verbindungen; modifiziert aus Lule und Xia (2005).

Wirkung	Substanzen
Beitrag zum charakteristischen Aroma	<ul style="list-style-type: none"> – verursachen charakteristisches Aroma vieler verschiedener Lebensmittel, z.B. bei Tee, Kaffee, Wein – unterliegen der Veränderung durch Prozessierung, Lagerung und Zubereitung
Beitrag zur Adstringenz	<p><u>Verbindungen mit mindestens zwei 1,2 Dihydroxy- oder 1,2,3-Trihydroxy-Konfigurationen im Molekül</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – verursachen die Präzipitation von Speichelproteinen
Beitrag zum Off-Flavor	<p><u>freie Phenolsäuren</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – unerwünschter Geschmack (sauer, bitter, adstringierend) <p><u>Flavanon-Glykoside</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – bitterer Geschmack in Zitrusfrüchten <p><u>Alkylphenole</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – Off-Flavor in Schafsfett, in sterilisierter, in Flaschen abgefüllter Milch <p><u>Tannine/Flavan-3-ole</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – unerwünschte Adstringenz in Kaki-Früchten
erwünschte charakteristischen Färbung	<ul style="list-style-type: none"> – Farbigkeit vieler Verbindungen (z.B. Anthocyane) – erwünschte Bräunung (z.B. Kaffee, Tee) durch enzymatische Oxidation
Unerwünschte Farbänderung	<ul style="list-style-type: none"> – meist Braunfärbung enzymatisch durch PPOs und/oder PODs – nicht-enzymatisch, z.B. durch pH-Änderung – durch Interaktionen mit Metallionen

2. Kenntnisstand / Theoretischer Hintergrund

Wirkung	Substanzen
Antimikrobielle Aktivität	Siehe Kapitel 2.1.1.4
Antivirale Aktivität	<u>Tannine, Quercetin</u> <ul style="list-style-type: none"> - binden an die virale Hülle und verhindern so die Anlagerung an Zellmembranen - Inhibition der reversen Transkriptase
Entzündungshemmende Eigenschaften	<u>Anthocyane, EGCG, Magnolol, Honokiol</u> <ul style="list-style-type: none"> - u.a. Inhibition/Reduktion von pro-inflammatorischen Faktoren
Antitumor-Aktivität	<u>EGCG, Resveratrol, Curcumin, Gingerol</u> <ul style="list-style-type: none"> - verringern das Auftreten von Tumoren in u.a. Mäusen durch u.a. die spezifische Inhibition von tumorfördernden Enzymen
Anti-kanzerogene Aktivität	<u>Curcumin, Ellagsäure, trans-Resveratrol, Resveratrol, Flavan-3-ole</u> <ul style="list-style-type: none"> - u.a. Einleiten der Apoptose von Krebszelllinien - aufgrund Protein-bindender und Radikalfänger-Eigenschaften siehe auch Kapitel 2.1.1.5
Kanzerogene Aktivität	<u>Phenolsäuren; Flavan-3-ole</u> <ul style="list-style-type: none"> - sind in der Lage ROS und Phenoxy-Radikale zu bilden, die DNA, Lipide, Protein etc. schädigen können
Antimutagenität	<u>Quercetin, Isorhamnetin</u> <ul style="list-style-type: none"> - inhibieren Leber S9-vermittelte Mutagenität von 2-Amino-1-Methyl-6-Phenylimidazol [4,5-<i>b</i>] pyridin
Antioxidatives Potential	Siehe Kapitel 2.1.1.3
Risikosenkend koronaren Herzgefäßerkrankungen	bei <u>Flavonoide, besonders Resveratrol</u> <ul style="list-style-type: none"> - vermutlich aufgrund des Oxidationsschutzes von LDL und der Fähigkeit zur Thrombozytenaggregations- und -adhäsionshemmung

Wirkung	Substanzen
Antinutritive Eigenschaften	<u>Polyphenole; Phenolsäuren, enzymatische und nicht-enzymatische Oxidationsprodukte; Flavonole</u> <ul style="list-style-type: none">– binden Proteine und Aminosäuren; inhibieren Proteasen und Lipasen (siehe auch Kapitel 2.1.1.6.3)
	<u>Polyphenole; Tannine</u> <ul style="list-style-type: none">– komplexieren Kohlenhydrate, bevorzugt Cyclodextrine– behindern enzymatischen Abbau durch Phenol-Enzym-Interaktionen und Stärke-Phenol-Assoziation
	<u>Tannine; Moleküle mit zwei benachbarten Hydroxylgruppen</u> <ul style="list-style-type: none">– binden Metallionen; behindern deren gastrointestinale Absorption

2.1.1.2 Vorkommen und Bedeutung

2.1.1.2.1 Hydroxyzimtsäuren (HCA)

Hydroxyzimtsäure und ihre Derivate werden fast ausschließlich aus *p*-Cumarsäure, Kaffeesäure und Ferulasäure abgeleitet. Diese Verbindungen bestehen dabei aus der allgemeinen Formel C₆-C₃, deren Unterschiede in der Position und Art der Ring-Substitution liegen (siehe **Abbildung 2-2**) (Kroll et al. 2003). Hydroxyzimtsäuren sind in pflanzlichen Lebensmitteln weit verbreitet (siehe **Tabelle 2-6**) und treten in der Regel in verschiedenen Formen auf, häufig als Ester von Glycosiden (Ho 1992).

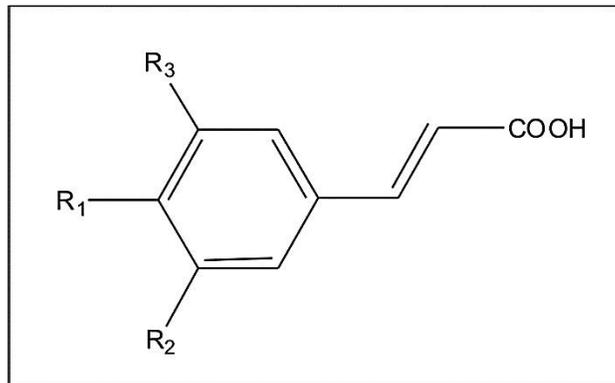


Abbildung 2-2. Grundgerüst der Hydroxyzimtsäure-Derivate.

Name	R1	R2	R3
Zimtsäure	H	H	H
<i>p</i> -Cumarsäure	OH	H	H
Kaffeesäure	OH	OH	H
Ferulasäure	OH	OCH ₃	H
Sinapinsäure	OH	OCH ₃	OCH ₃

Phenolsäuren, wie die Hydroxyzimtsäuren, sind häufig mit Chinasäure (1,3,4,5-Tetrahydroxycyclohexancarbonsäure, siehe **Abbildung 2-3**) verestert. Dabei entstehen Cinnamoylchinasäuren. Die 3-Caffeoylchinasäure wird als Chlorogensäure, die 5-Caffeoylchinasäure als Isochlorogensäure bezeichnet (siehe **Abbildung 2-4**). Auch 3-Feruloylchinasäure (3'-Methyl-3-caffeoylchinasäure) ist ein verbreiteter Naturstoff in Nahrungspflanzen. Chlorogensäure ist in vielen pflanzlichen Lebensmitteln enthalten und wird bei Verletzung des Pflanzengewebes enzymatisch zu braunen Pigmenten oxidiert (enzymatische Bräunungsreaktion, vgl. Kapitel 2.1.1.6.1) (Ebermann und Elmadfa 2011). **Tabelle 2-6** gibt eine Übersicht über den Gehalt ausgewählter HCAs in Lebensmitteln.

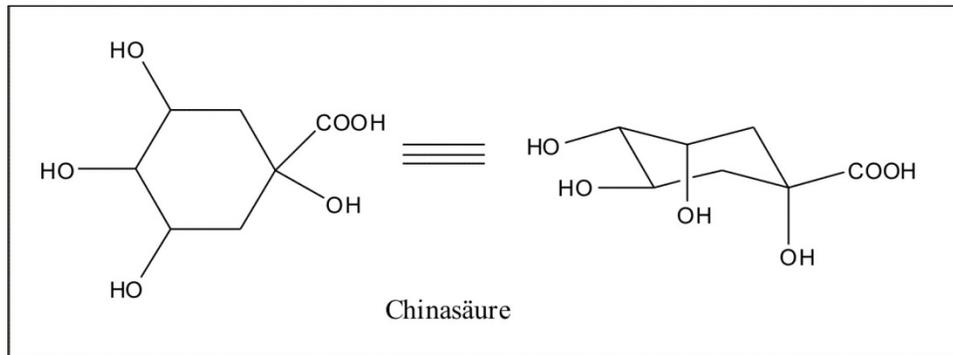


Abbildung 2-3. Struktur der Chinasäure; aus Nuhn (1997).

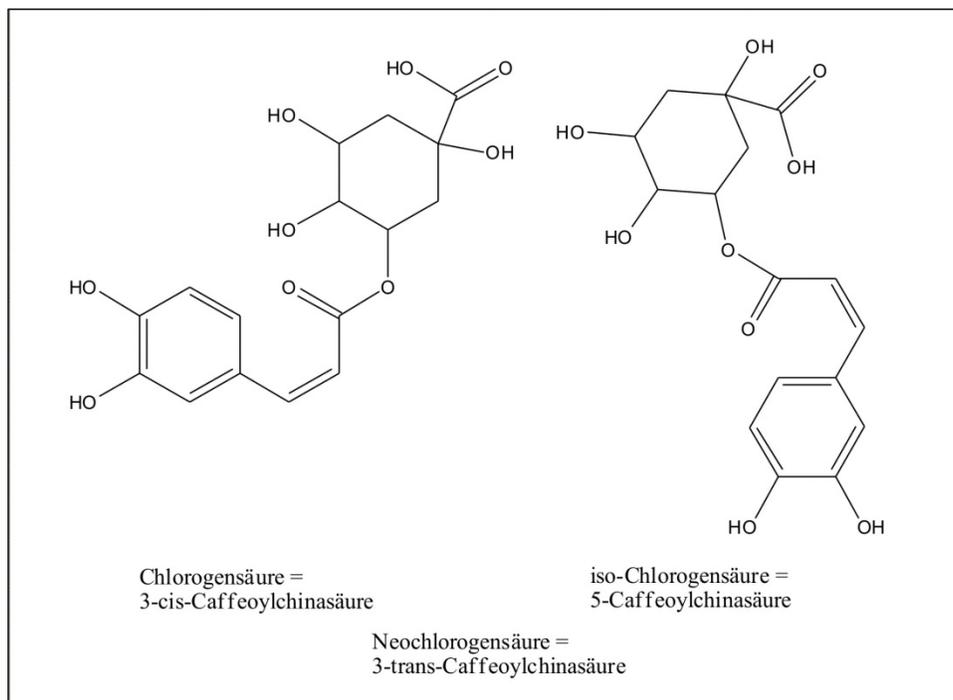


Abbildung 2-4. Chemische Struktur der Chlorogensäuren; modifiziert aus Ebermann und Elmadfa (2011).

Tabelle 2-6. Gehalt ausgewählter HCAs in Lebensmitteln [mg/kg]; modifiziert aus Ebermann und Elmadfa (2011) und El-Seedi et al. (2012).

Lebensmittel	Kaffeensäure	<i>p</i>-Cumarsäure	Ferulasäure	Sinapinsäure	Chlorogensäure
Apfel	85-1270	15-460	4-95	6	
Birne	43-19700			35	
Orange		5-17	10-19	29	
Zitrone	21-35		14-40		
Grapefruit	40-51	0-53	30-34	10	
Kartoffel	280		28	5	22-71
Tomate	6				18
Erdnuss	11	5-17	45	140	12
Weizen		17-25	15-32	63	
Mais		4-46	6-27	57	
Kohl	0-77		4-20	28	
Spinat		133	16		
Rettich	91	91	16	1	
Knoblauch	20	58	27	7	
Karfiol		34	13	18	
Kaffeebohne					50000-100000
Sonnenblume					1900-28000
Erdbeere	15-34				
Heidelbeere					3000

2.1.1.2.2 Hydroxybenzoesäuren (HBA)

Hydroxybenzoesäuren resultieren aus einer zur β -Oxidation der Fettsäuren analogen Reaktionsfolge der entsprechenden Hydroxyzimtsäuren (Eisenbrand und Schreier 1995). So entsteht aus *p*-Cumarsäure 4-

Hydroxybenzoesäure. Entsprechend geht durch Verkürzung der Seitenkette aus Kaffeesäure Protocatechusäure und aus Ferulasäure Vanillinsäure hervor (Heß 1999). HBAs bestehen dabei aus der allgemeinen Formel C_6-C_1 , wobei die Unterschiede auch hier in der Ring-Substitution liegen (siehe **Abbildung 2-5**) (Kroll et al. 2003).

Hydroxybenzoesäuren, wie 4-Hydroxybenzoesäure, Protocatechusäure (3,4-Dihydroxybenzoesäure), Gallussäure (3,4,5-Trihydroxybenzoesäure) und Syringasäure (4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzoesäure), sind als Ester der Glucose in Pflanzen enthalten (siehe **Tabelle 2-7**). Ester der Gallussäure und der Hexahydroxydiphensäure bilden neben den Proanthocyanidinen eine der beiden Hauptklassen der pflanzlichen Gerbstoffe, die hydrolysierbaren Tannine, da die Esterbindungen durch Verseifung gespalten werden können. Dabei können bis zu fünf Gallussäuremoleküle mit einem Glucosemolekül verestert sein. Im Allgemeinen repräsentieren Tannin eine chemisch diverse Gruppe von natürlichen vorkommenden Polyphenolen, welche in vielen Lebensmittel enthalten sind. Die Einteilung der Tannine erfolgt in hydrolysierbare Tannine, kondensierte Tannin und Phlorotannine (Haslam 1989). Als Oxidationsprodukt der Gallussäure oder Digallussäure kommt auch Ellagsäure vor (siehe **Abbildung 2-6**), die *in vitro* die mutagene Wirkung der aktiven Metabolite (Epoxide) polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe, wie z. B. Benzpyren, inhibieren kann. Neben einfachen, z.B. in Teeblättern vorkommenden Estern mit verschiedenen Hydroxykomponenten wie Glucogallin, Theogallin und den Flavan-3-ol-gallaten, sind komplexe Polyester mit d-Glucose bekannt, die Molekulargewichte von M_r 500 – 3 000 aufweisen, im Allgemeinen gut löslich sind und mit ihren adstringierenden Eigenschaften zum Geschmack von Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft beitragen. Die meisten Gerbstoffe dieses Typs enthalten neben Gallussäure als Acylreste intermolekulare Gallussäureester, deren Ether und durch oxidative Kopplung von zwei Gallussäuren gebildete Hexahydroxydiphensäure. Die Salicylsäure (ortho-Hydroxybenzoesäure) ist ubiquitär in Pflanzen, besonders reichlich in Beerenobst (Himbeeren, Heidelbeeren, Weintrauben u. a.), enthalten. Ursprünglich aus Weidenrinde (*Salix sp.*) isoliert, ist ihre pharmakologische Bedeutung heute grundlegend dokumentiert. Man kann ihre fiebersenkende Wirkung und ihre positive Wirkung bei rheumatische und Herz-Kreislauf-Krankheiten auf ihre antioxidative und ihre *scavenger*-Funktion für OH-Radikale zurückführen (Ebermann und Elmadfa 2011).

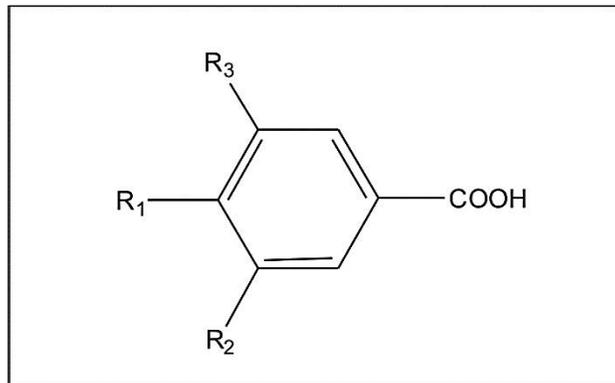


Abbildung 2-5. Grundgerüst der Hydroxybenzoesäure-Derivate.

Name	R1	R2	R3
Benzoessäure	H	H	H
4-Hydroxybenzoesäure	OH	H	H
Syringasäure	OH	OCH ₃	OCH ₃
Gallussäure	OH	OH	OH

2. Kenntnisstand / Theoretischer Hintergrund

Tabelle 2-7. Gehalt ausgewählter HBAs in Lebensmitteln [nach Hydrolyse in mg/kg Frischgewicht]; aus Belitz et al. (2001), Mattila und Kumpulainen (2002) und Colaric et al. (2005).

Lebensmittel	4-Hydroxybenzoesäure	Procatechusäure	Gallussäure	Syringasäure
Brombeere	6-16	68-189	8-67	
Schwarze Johannisbeere	0-6	10-52	30-62	
Himbeere	15-27	25-37	19-38	
Rote Johannisbeere	10-23	3-8		
Erdbeere	10-36		11-44	
Weißer Johannisbeere	5-19		3-38	
Apfel				9
Walnuss				338

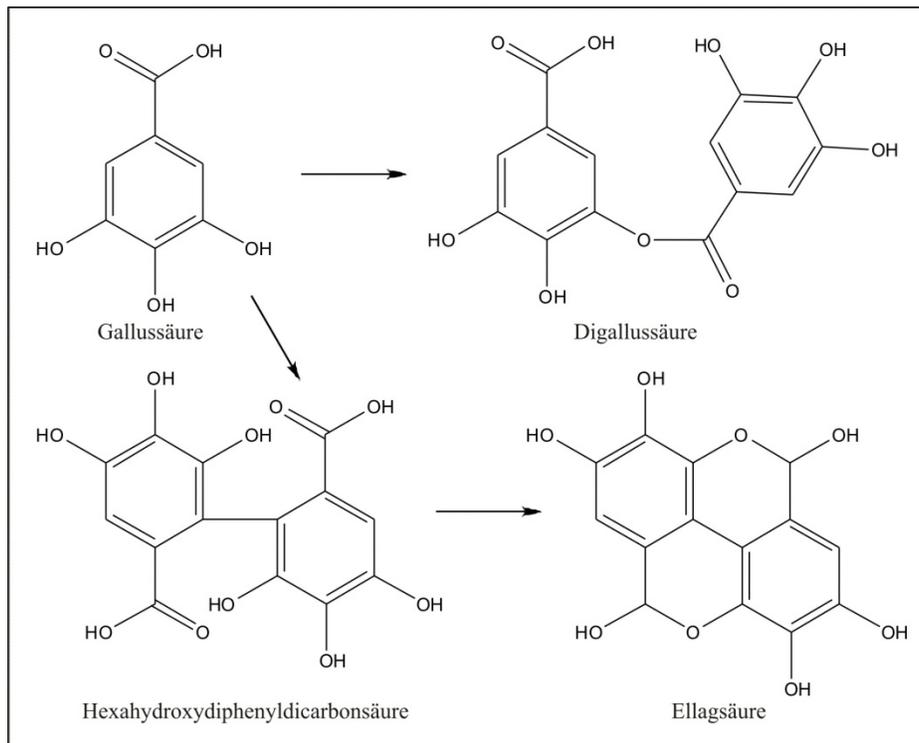


Abbildung 2-6. Chemische Strukturen von (Di)-Gallussäuren und deren oxidierten Formen; modifiziert aus Ebermann und Elmadfa (2011).

2.1.1.3 Antioxidatives Potential und Radikalfängereigenschaften

Antioxidantien sind definiert als Stoffe, die in der Lage sind Körperzellen vor Schädigung durch freie Radikale sowie reaktive Sauerstoffspezies zu schützen (Kroon und Williamson 1999). Während des Alterns sowie der Entstehung von Krankheiten, wie Krebs, Diabetes und Arteriosklerose spielen oxidativer Stress und die Lipidperoxidation eine bedeutende Rolle (Lule und Xia 2005). Mit der Nahrung aufgenommene antioxidativ wirksame Substanzen könnten dazu beitragen, den menschlichen Körper vor oxidativem Stress sowie der Lipidperoxidation und den dadurch entstehende Krankheiten zu schützen. In jüngster Zeit sind früher wenig beachtete Eigenschaften der phenolischen Verbindungen in den Blickpunkt des Interesses gerückt, u.a. ihre antioxidativen Eigenschaften. Phenolische Verbindungen wirken gegenüber Oxidationsmitteln (Sauerstoff, Schwermetallionen) als Reduktionsmittel und werden dabei selbst über die instabile Zwischenstufe der Phenoxyradikale zu chinoiden oder zu polymeren Verbindungen oxidiert (Cheng et al. 2007; Ebermann und Elmadfa 2011). Bei pH 7 weisen phenolische Antioxidantien durchweg ein Redoxpotential von > 0 auf, im Durchschnitt etwa $+ 0.2 - 0.3$ Volt, also ein deutlich geringeres als das des molekularen Sauerstoffs ($+ 0.816$ V) und höher als das der Ascorbinsäure ($+ 0.058$ V) (Ebermann und Elmadfa 2011). Beispielhaft ist der Mechanismus der Inhibition der LDL-Peroxidation durch Kaffeesäure dargestellt (siehe **Abbildung 2-7**).

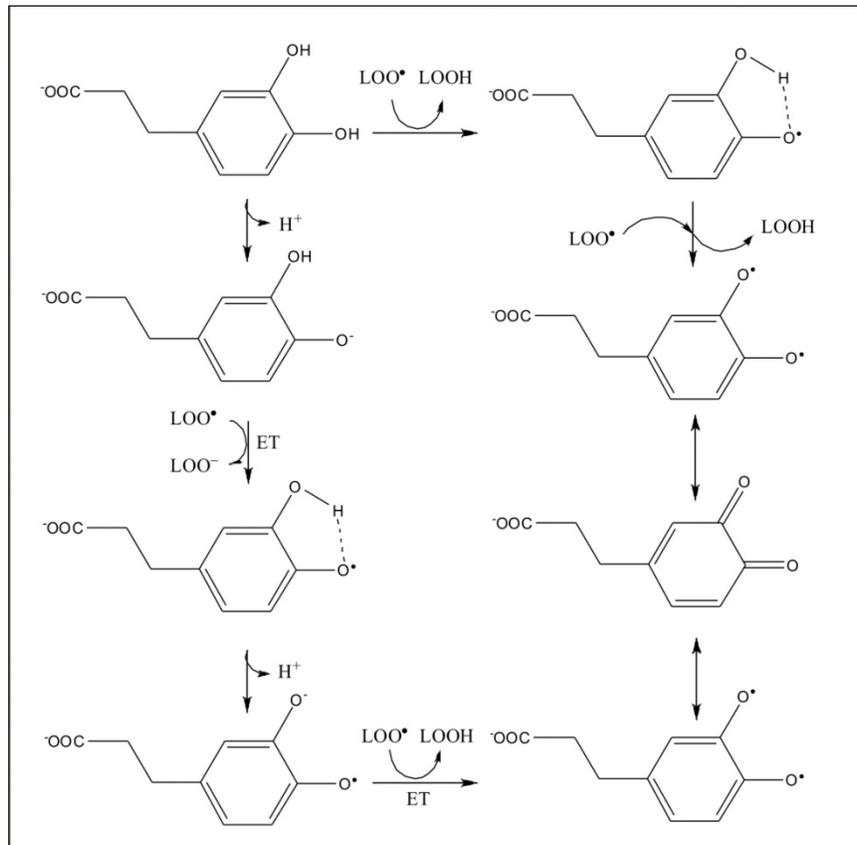


Abbildung 2-7. Mechanismus der Inhibition der LDL-Peroxidation durch Kaffeesäure. ET: Elektronentransfer; aus El-Seedi et al. (2012).

2.1.1.4 Antimikrobielle Eigenschaften

Phenolische Verbindungen sind in der Lage das Wachstum von Mikroorganismen zu hemmen (Lule und Xia 2005). Im Gegensatz zu antimikrobiellen Substanzen mit einem hydrophilen Charakter könnte eine Verminderung der antimikrobiellen Aktivität durch den lipophilen Charakter der phenolischen Verbindungen und der damit verbundenen schlechteren Löslichkeit in einem wässrigen System verursacht werden (Baranowski und Nagel 1984). Generell sind die minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) von phenolischen Verbindungen je nach Indikatororganismus, verwendetem Testsystem und den herrschenden Bedingungen (z.B. Temperatur und pH-Wert) divers. Hydroxybenzoesäuren, wie Gallussäure und *p*-Hydroxybenzoesäure, verlangsamen oder hemmen teilweise das Wachstum sowie die Toxinproduktion von *Clostridium botulinum* Typ A und B. Dabei steigt die inhibitorische Wirkung, wenn die Bakterienzahl sinkt (Pierson und Reddy 1982). Hydroxycimtsäuren, die in vielen Lebensmitteln enthalten

sind (vgl. **Kapitel 2.1.1.2.1**), weisen bei der Verwendung eines geeigneten Test-assays eine erhebliche antimikrobielle Wirkung auf (siehe **Tabelle 2-8**).

Tabelle 2-8. Minimale Hemmkonzentration ausgewählter phenolischer Verbindungen für *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Sporobolomyces roseus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas syringae* und *Listeria monocytogenes*; aus El-Seedi et al. (2012).

Verbindung	Minimale Hemmkonzentration* [mM]						
	Hefen			Bakterien			
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>S. roseus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. syringae</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Kaffeensäure	>8.0 (8)	>8.0 (25)	>8.0 (5)	4.0	8.0	4.0	0.16
Ferulasäure	4.0	8.0	2.0	2.0	2.0	2.0	0.14
Sinapinsäure	>8.0 (51)	>8.0 (0)	>8.0 (15)	2.0	2.0	4.0	
<i>p</i> -Cumarsäure	>8.0 (93)	8.0	8.0	2.0	2.0	2.0	0.13
Chlorogensäure							0.28
Zimtsäure							0.14

* bei einer MHK größer als 8.0 mM ist die prozentuale Inhibition in Klammern angegeben.

In einer weiteren Studie verursachte *p*-Cumarsäure bei einer Konzentration von 100 ppm eine Verlängerung der lag-Phase von *S. cerevisiae*. Bei einer Konzentration von über 250 ppm ist die Hemmung nach 72 h proportional zur Konzentration. Ferulasäure verursachte in der gleichen Studie eine Verlängerung der lag-phase bei nur 50 ppm und eine vollständige Hemmung bei unter 250 ppm (Baranowski et al. 1980). Studien zum Einfluss von phenolischen Verbindungen auf *Lactobacillus plantarum* zeigten eine Wachstumshemmung mit steigenden Konzentrationen an Kaffeensäure. Ferulasäure (1 g/L) zeigte in der gleichen Studie einen geringeren inhibitorischen Effekt als Kaffeensäure (Rozes und Peres 1998). Die antimikrobielle Wirkung von phenolischen Verbindung, insbesondere gegen Lebensmittelpathogene wie *L. monocytogenes*, spielt daher besonders in der Lebensmittelkonservierung eine bedeutende Rolle. Ein potentieller Einsatz dieser Verbindungen als Konservierungsstoffe ist denkbar. Eine Analyse der antimikrobiellen Wirkung sowie eine mögliche Beeinflussung dieser Eigenschaft durch die Reaktion mit anderen Lebensmittelinhaltsstoffen, wie z.B. Proteinen, ist daher sinnvoll.

2.1.1.5 Antikancerogene Wirkung

Nach neuesten Erkenntnissen könnten Chinone, die bei der Oxidation phenolischer Verbindungen entstehen (vgl. **Kapitel 2.1.1.6.1**), eine wichtige Rolle als Krebsbehandlungsmittel spielen (Lu et al. 2013). Dabei beruht die antikancerogene Wirkung auf der Fähigkeit oxidativen Stress zu vermindern

(Srinivas et al. 2004, Lu et al. 2007, El-Najjar, 2010, Seshadri et al. 2011). Leicht zu oxidierende *target*-Moleküle, wie Enzyme mit Thiol-Gruppen, werden dabei bevorzugt von Chinonen angegriffen (Cai et al. 2008, Wang et al. 2001). Es kommen allerdings durchaus weitere *target*-Moleküle in Frage und die Mechanismen hinter der antikanzerogenen Wirkung von Chinonen sind meist noch unklar. Daher sind weitergehende Untersuchungen notwendig um die Mechanismen vollständig aufzuklären (Lu et al 2011, Dudgeon et al. 2010, Youns et al. 2009).

2.1.1.6 *Reaktivität von phenolischen Verbindungen*

Die Eigenschaft sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe, wie z.B. phenolischer Verbindungen, mit *target*-Molekülen, wie Proteinen, Nukleinsäuren und Metaboliten in Wechselwirkung zu treten, beruht auf ihren allelochemischen Eigenschaften. Ziel des pflanzlichen Organismus ist dabei, einen Angriff eines Schädlings oder einer konkurrierenden Pflanze abzuwehren. Es handelt sich demnach um einen Abwehrmechanismus (vgl. **Kapitel 2.1**) (Wink und Schimmer 1999; Wink 2003). Generell kann zwischen spezifischen und unspezifischen Interaktionen unterschieden werden. Einige spezifische Interaktionen zwischen sekundären Pflanzenstoffen und Proteinen (Enzyme, Rezeptoren, Ionen-Kanäle) bzw. anderen zellulären Komponenten wurden bereits aufgeklärt (Harborne 1993; Wink et al. 1998; Wink und Schimmer 1999).

Die genannten Wechselwirkungen zwischen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, wie phenolischen Verbindungen, und Proteinen können auch während der Lebensmittelherstellung und -lagerung auftreten. Normalerweise liegen die genannten Stoffklassen getrennt in den Zellen vor, sodass eine Wechselwirkung (außer z.B. bei einem Angriff durch Fraßfeinde) nicht möglich ist. Während der Lebensmittelherstellung kommt es meist zu einer Zerstörung des Pflanzengewebes, sodass eine Trennung der Stoffe durch die Grenzen der Kompartimente aufgehoben wird. Infolgedessen treten verschiedenste Phänomene auf, wie Adsorption, Oxidation, Solubilisierung und Migration. Während dieser Vorgänge und der auftretenden physikalischen und chemischen Wechselwirkungen kommt es zur Entstehung neuer Strukturen mit neuen biologischen Eigenschaften. Diese können sich auf die organoleptischen und ernährungsphysiologischen Eigenschaften des Lebensmittels auswirken (Le Bourvellec und Renard 2012).

2.1.1.6.1 Oxidation (enzymatische und nicht-enzymatische Bräunung)

Mittlerweile ist die oxidative Bildung von reaktiven Chinonen als einleitender Schritt zur Entstehung von Phenol-Protein-Wechselwirkungen anerkannt (Kroll et al. 2003). Phenolische Verbindungen mit zwei benachbarten Hydroxylgruppen können zu *ortho*-Chinonen oxidiert werden. Diese Chinon-Bildung kann

enzymatisch und nicht-enzymatisch erfolgen. Die nicht-enzymatische Oxidation erfolgt bevorzugt bei alkalischem pH-Wert (Yabuta et al. 2001). Eine nicht-enzymatische Oxidation bei saurem pH-Wert kann z.B. bei einer langen Lagerungsdauer auftreten, wobei diese Untersuchungsergebnisse unter ständigem Schütteln und Sauerstoffzufuhr erzielt wurden und dies nicht den üblichen Lagerungsbedingungen von Lebensmitteln entspricht (Cilliers und Singleton 1989).

Die Bildung von Chinonen erfolgt enzymatisch durch Polyphenoloxidasen (PPO) (EC 1.14.18.1) und Peroxidasen (POD) (EC 1.11.1.7). Peroxidasen bilden Chinone über radikalische Intermediate und benötigen zur Umsetzung Wasserstoffperoxid (Matheis und Whitaker 1984). Daher spielt die enzymatische Oxidation durch Peroxidasen in Lebensmitteln eine eher untergeordnete Rolle.

PPO können in Catecholoxidasen und Laccasen unterteilt werden. Beide Enzyme können phenolische Verbindungen in Anwesenheit von Sauerstoff oxidieren (Mayer und Harel 1979). Catecholoxidasen sind in der Lage mono-Phenole in *o*-Diphenole umzusetzen (sog. Cresolase-Aktivität) (Mayer und Harel 1979; Rodriguez-Lopez et al. 2001). Catecholoxidasen katalysieren weiterhin die Oxidation von *o*-Diphenolen zu *o*-Chinonen (Mayer und Harel 1979) (sog. Catecholase Aktivität, siehe **Abbildung 2-8**). Laccasen sind in der Lage ein breiteres Substratspektrum als Catecholoxidasen umzusetzen, z.B. *p*-Diphenole (Mayer und Harel 1979; Mayer und Staples 2002) und nicht-phenolische Verbindungen (Amitai et al. 1998).

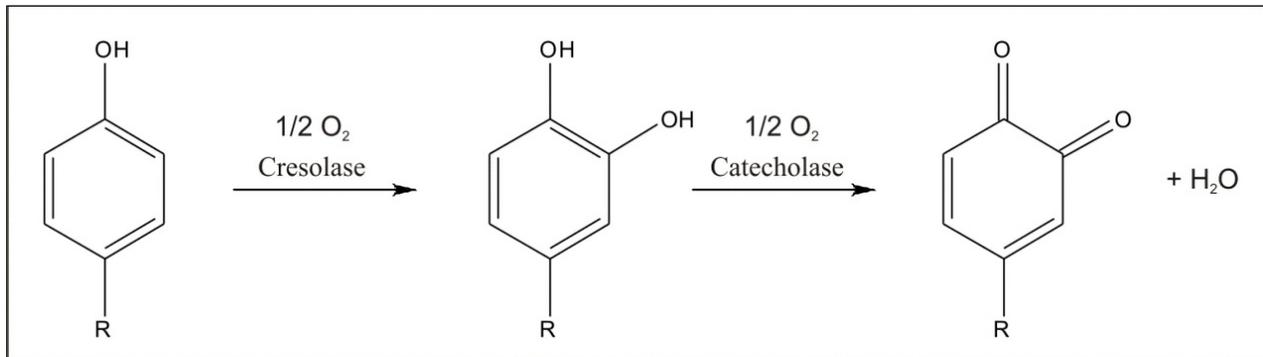


Abbildung 2-8. Reaktionen von Polyphenoloxidasen (Catecholoxidasen); aus Nicolas et al. (1994).

Laccasen katalysieren weiterhin auch andere Reaktionen von phenolischen Verbindungen, wie Demethylierungen und (De)-Polymerisationen (Mayer 1987). Ihre Fähigkeit *para*-Diphenole zu oxidieren, wird zur Unterscheidung der Laccase-Aktivität von der Aktivität anderer Polyphenoloxidasen genutzt (Nicolas et al. 1994) (siehe **Abbildung 2-9**).

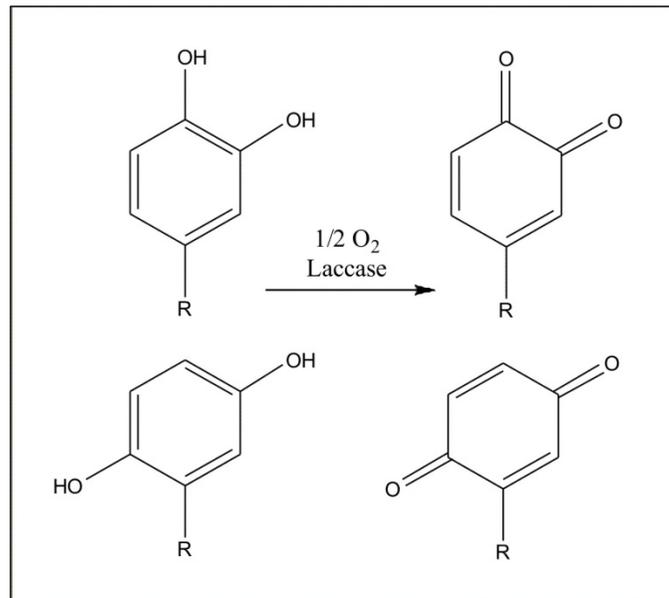


Abbildung 2-9. Reaktionen von Polyphenoloxidasen (Laccasen); aus Nicolas et al. (1994).

Die Bildung von reaktiven Chinonen kann ebenfalls nicht-enzymatisch erfolgen. Ein erhöhter pH-Wert verursacht die Deprotonierung der am Phenol-Grundgerüst gebundenen Hydroxyl-Gruppe, welche eine

Chinonbildung zur Folge haben kann. In der Lebensmittelindustrie wird diese Reaktion genutzt, um Oliven zu schwärzen. Dabei werden die Oliven mit verdünnter Natriumhydroxid-Lösung behandelt um die enthaltene Kaffeesäure und das enthaltene Hydroxytyrosol zu oxidieren (Garcia et al. 1996).

Wie bereits erwähnt sind Chinone reaktive Substanzen, welche daher dazu neigen über eine Redoxreaktion mit anderen Molekülen zu reagieren. Infolgedessen kann es z.B. zu einer Oligomerisation mit anderen Phenolverbindungen oder zur Interaktion mit z.B. Proteinen kommen. Diese Reaktivität soll im Folgenden näher erläutert werden.

2.1.1.6.2 Reaktionen von Chinonen mit anderen Phenolverbindungen

Chinone besitzen die Fähigkeit andere phenolische Verbindungen über eine Redoxreaktion zu oxidieren, wobei diese Reaktion von dem jeweiligen Redoxpotential der verschiedenen Chinon/Phenol-Paare abhängt. Die als Oxidationsmittel fungierenden *ortho*-Chinone oxidieren alle anderen Substanzen mit einem niedrigeren Redoxpotential, wobei sie selbst wieder zu Phenolen reduziert werden (Cheynier et al. 1988; Nicolas et al. 1994). Dieser Redoxreaktionsmechanismus stellt die hauptsächlich auftretende Reaktion bei niedrigem pH-Wert dar. Bei einem höherem pH-Wert neigen Chinone zu einer Bildung von kovalenten Bindungen mit anderen Phenolverbindungen, welche in einer Bildung von Dimeren resultiert (Cheynier et al. 1988; Richardforget et al. 1992). In Folge dieser Reaktion kann es darüber hinaus zur Bildung von höhermolekularen Polymerisaten kommen (Cheynier et al. 1988). Die oxidative Bildung von Dimeren wurde u.a. für Kaffeesäure (Cilliers und Singleton 1991; Fulcrand et al. 1994; Rompel et al. 1999; Tazaki et al. 2001; Yabuta et al. 2001) beobachtet. Dabei ist in die Oxidation nach Cilliers und Singleton (1991) zunächst der dihydroxylierte Phenol-Ring und in der weiteren Reaktion auch die Seitenkette eingebunden. Die Oxidationsrate ist dabei vor allem vom pH-Wert abhängig, wobei auch noch andere Aspekte, wie der Gehalt an phenolischen Verbindungen, das Vorhandensein von Metallionen und die Temperatur relevant sein können (Shahidi und Naczki 1995). Das Phenolat-Ion scheint bei der Oxidation eine besonders wichtige Rolle zu spielen, indem es durch Ladungstransfer unmittelbar mit Triplett-Sauerstoff zum Semichinon reagiert. Der Triplett-Sauerstoff nimmt in diesem Prozess ein Elektron auf und wird dadurch zum Superoxid-Sauerstoff. Das Semichinon kann wiederum weitere Reaktionen eingehen, so dass strukturell unterschiedliche Isomere entstehen (siehe **Abbildung 2-10** und **Abbildung 2-11**) (Cilliers und Singleton 1991).

2. Kenntnisstand / Theoretischer Hintergrund

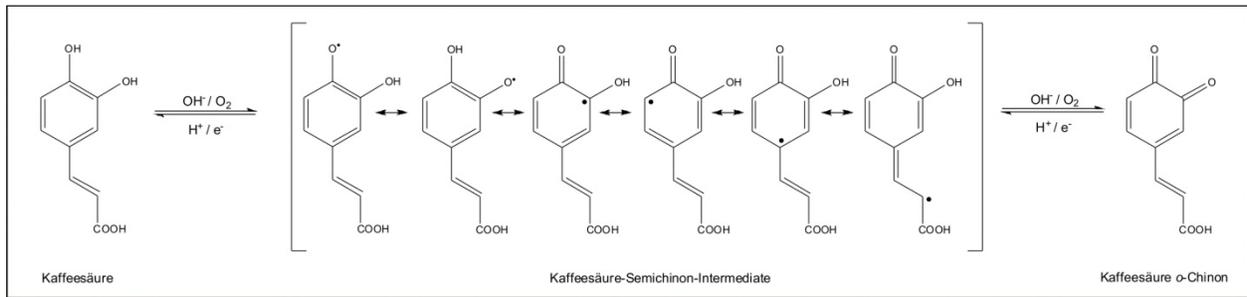


Abbildung 2-10. Mechanismus zur Bildung der Kaffeesäure *o*-Chinone; modifiziert aus Cilliers und Singleton (1991).

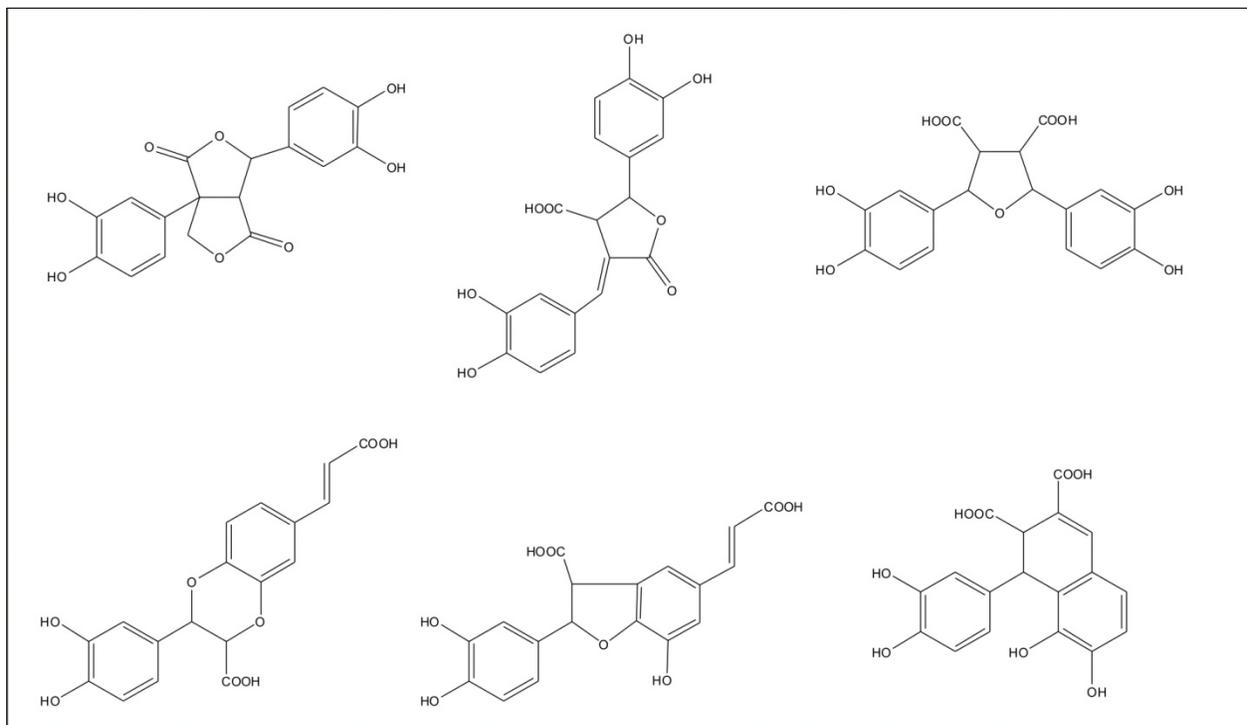


Abbildung 2-11. Verschiedene Dimer-Strukturen der Kaffeesäure; aus Cilliers und Singleton (1991), Fulcrand et al. (1994), Rompel et al. (1999), Tazaki et al. (2001); Yabuta et al. (2001).

Eine Bildung von reaktiven Chinonen durch den Einfluss von Metallionen ist ebenfalls bekannt (Cheng und Crisosto 1997). Beispielhaft soll hier der für Chlorogensäure beschriebene „*after-cooking blackening or darkening*“-Effekt der Kartoffeln genannt werden. Dieser beschreibt eine bläuliche bis graue

2. Kenntnisstand / Theoretischer Hintergrund

Verfärbung, die innerhalb kürzester Zeit bei gekochten Kartoffeln auftritt und auf die Wechselwirkung der Chlorogensäure mit Eisenionen zurückzuführen ist (Friedman 1997).

Weiterhin wird in der Literatur die Bildung von reaktiven Spezies aus phenolischen Verbindungen diskutiert, die kein vollständiges chinoides System ausbilden können. Die Oxidation von Ferulasäure kann, ähnlich wie am Beispiel der Kaffeesäure gezeigt, zu einer Radikalbildung führen. Durch die Übertragung eines Elektrons von der Ferulasäure auf den Sauerstoff entstehen die Semichinon-Radikal-Zwischenprodukte (siehe **Abbildung 2-12**), die weitere gekoppelte Reaktionen zur Bildung von Dimeren und Trimeren eingehen können (vgl. auch **Abbildung 2-10**).

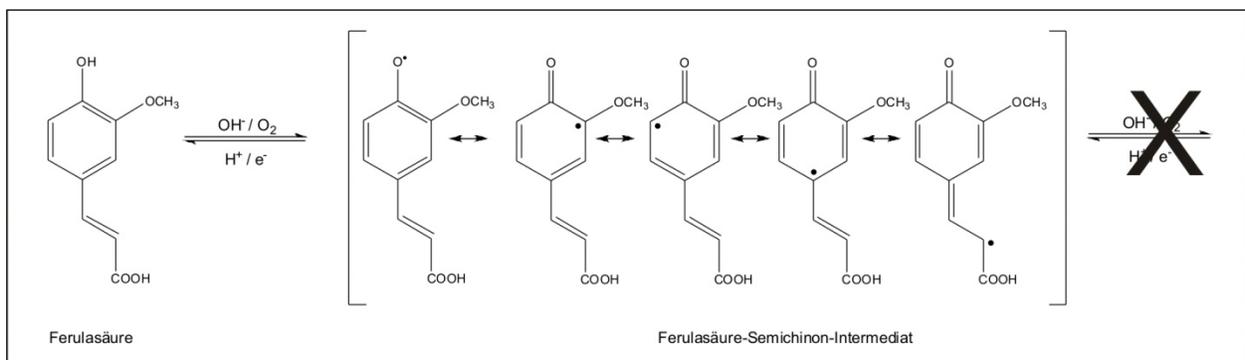


Abbildung 2-12. Reaktionsmechanismus der Ferulasäure zu Semichinon-Radikalen; modifiziert aus Rawel et al. (2001).

Auch Trihydroxy-Verbindungen, wie die Gallussäure, können unter oxidativen Bedingungen reaktive Semichinon-Intermediate bilden (siehe **Abbildung 2-13 B**) (Eslami et al. 2010). Wie bereits in **Kapitel 2.1.1.2.2** beschrieben setzen sich hydrolysierbare Tannine u.a. aus Gallussäure-Einheiten zusammen. Unter alkalischen Bedingungen kann es zu einer Hydrolyse der Tannine in Gallussäure, Digalloyl ester und Glucose kommen (siehe **Abbildung 2-13 B**) (Bozic et al. 2012). Die dabei freigesetzte Gallussäure kann wie bereits beschrieben in reaktive Semichinon-Intermediate umgesetzt werden.

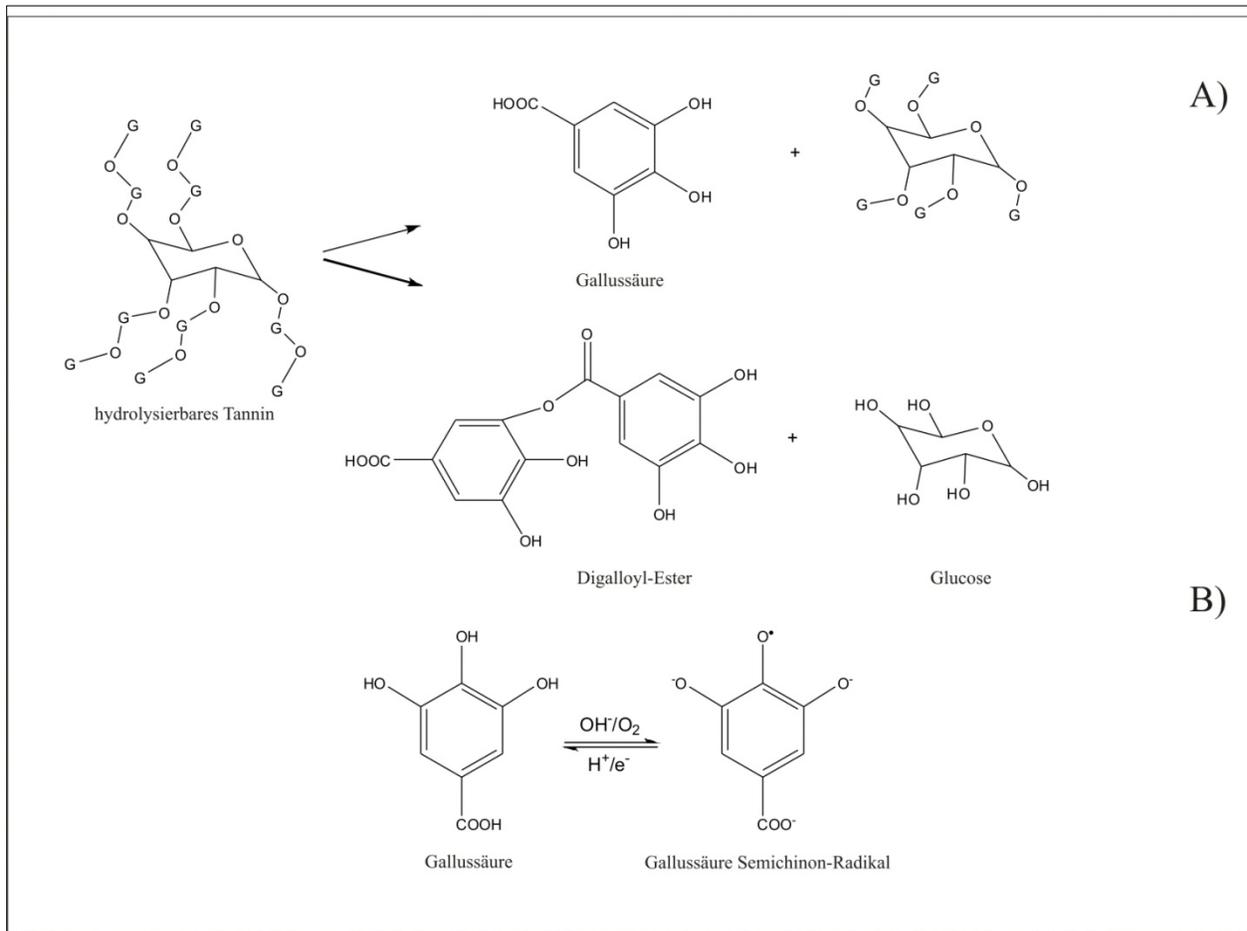


Abbildung 2-13. Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus der nicht-enzymatischen Oxidation von hydrolysierbaren Tanninen und Gallussäure.

A) Hydrolyse des Tannins unter basischen Bedingungen (Bozic et al. 2012); B) Oxidation der Gallussäure zu einem deprotonierten Semichinon-Radikal (Eslami et al. 2010), G: Galloyl-Ester.

Nach Frick et al. (1996) ist das methoxylierte Hydroxybenzoesäure-Derivat Syringasäure ebenfalls in der Lage unter oxidativen Bedingungen chinoiden Strukturen zu bilden. Dabei kommt es zu einer Oxidation an der C4-Position und einer Decarboxylierung an der C1-Position, sodass 2,6-Dimethoxy-*p*-Benzochinon entsteht.

2.1.1.6.3 Interaktionen von phenolischen Verbindungen und Proteinen

Phenolische Verbindungen können mit Proteinen auf unterschiedliche Weise in Wechselwirkung treten: über nicht-kovalente (reversible) und über kovalente (meist nicht-reversible) Wechselwirkungen. Generell

kann in Bezug auf alle Wechselwirkungen zwischen einem monodentaten („einzähnigen“) und multidentaten („mehrzähnigen“) Mechanismus unterschieden werden (Haslam 1989). „Monodentat“ beschreibt eine Wechselwirkung bei der die phenolische Verbindung über eine Stelle des Moleküls mit dem Protein interagiert. In einem Reaktionsgemisch mit einem hohen Gehalt an phenolischen Verbindungen und niedrigem Protein-Gehalt bilden die phenolischen Moleküle eine Schicht um das Protein und bedecken so die Proteinoberfläche. Diese Phenol-Hülle verursacht eine Verminderung der Hydrophilie, welche zu einer Aggregation der Phenol-Protein-Komplexe führen kann. „Multidentat“ beschreibt eine Wechselwirkung bei der die phenolische Verbindung über mehrere Stellen des Moleküls mit dem Protein interagiert. Dabei benötigt die phenolische Verbindung ein ausreichendes Molekulargewicht, um an mehreren Positionen mit dem Protein in Interaktion treten zu können. Multidentate Wechselwirkungen äußern sich in der Ausbildung von Quervernetzungen (sog. *cross-links*) zwischen mehreren Proteinmolekülen und können schon bei niedrigen Gehalten an Phenolverbindungen auftreten. Mono- und multidentate Wechselwirkungen können zur Aggregation und Präzipitation führen (Haslam 1989; Charlton et al. 2002).

Die Ausbildung von nicht-kovalenten und kovalenten Wechselwirkungen beruht demnach auf dem vorliegenden Phenol/Protein-Verhältnis, aber auch auf anderen Faktoren, wie sterischer Hinderung und Polarität beider Substanzen. Auch die Primärstruktur des Proteins ist von entscheidender Bedeutung. Das Auftreten von nicht-kovalenten und kovalenten Assoziationen von phenolischen Verbindungen mit Proteinen kann die Qualität der Lebensmittel beeinflussen. In Abhängigkeit von ihrer Struktur können phenolische Verbindungen schon unter vergleichsweise milden Bedingungen (z.B: bei Raumtemperatur und in kurzer Zeit) mit Proteinen reagieren und deren physikochemische sowie ernährungsphysiologische Eigenschaften verändern (Kroll et al. 2007; Le Bourvellec und Renard 2012). Nicht-kovalente und kovalente Wechselwirkungen zwischen phenolischen Verbindungen und Proteinen werden im Folgenden näher erläutert.

2.1.1.6.3.1 Nicht-kovalente Wechselwirkungen

Die Ausbildung und Art der nicht-kovalenten Wechselwirkung zwischen phenolischen Verbindungen und Proteinen hängt vom Phenol-Protein Verhältnis, dem Lösungsmittel, von der Ionenstärke, der Temperatur und dem pH-Wert ab. Fünf unterschiedliche Typen von nicht-kovalenten Wechselwirkungen können auftreten: elektrostatische Wechselwirkungen, van der Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen und π -Bindungen (Asano et al. 1982). Dabei spielen die hydrophoben Wechselwirkungen, verstärkt durch Wasserstoffbrückenbindungen, vermutlich die größte Rolle (Haslam

1996). Danach interagieren die aromatischen Ringstrukturen der Phenole mit den hydrophoben Bereichen im Protein, während sich Wasserstoffbrücken zwischen H-Akzeptoren im Proteinmolekül und den Hydroxylgruppen der phenolischen Verbindungen ausbilden. Die phenolischen Hydroxylgruppen bilden einen hervorragenden Wasserstoffdonator und führen zu starken Wasserstoffbrücken mit der Amidbindung des Peptid-Rückgrats. Wasserstoffbrückenbindungen können zwischen den Hydroxylgruppen der Phenolverbindungen und den Stickstoff- oder Sauerstoff-Atomen der Seitenketten von Lysin, Arginin, Histidin, Asparagin, Glutamin, Serin, Threonin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Tyrosin und Cystein ausgebildet werden. Hydrophobe Wechselwirkungen können zwischen Phenolverbindungen und Aminosäureresten, wie z.B. Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und Glycin auftreten (Prigent et al. 2003; Richard et al. 2005; Poncet-Legrand et al. 2006). Ionische Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Gruppen von Proteinen (z.B. die Aminogruppe des Lysins) und den negativ geladenen Hydroxylgruppen von phenolischen Verbindungen können eine untergeordnete Rolle spielen (Asano et al. 1982).

2.1.1.6.3.2 Kovalente Wechselwirkungen

Zur Ausbildung von kovalenten Bindungen zwischen phenolischen Verbindungen und Proteinen bedarf es der Oxidation von phenolischen Verbindungen und der Bildung von chinoiden Strukturen sowie semi-chinoiden Intermediaten (vgl. **Kapitel 2.1.1.6.1** und **2.1.1.6.2**). Weiterhin ist auch die Reaktion von Proteinen mit einem, aus einer Spaltung der Interflavanbindung von Proanthocyanidinen hervorgehenden, Carbokation denkbar (Beart et al. 1985).

o-Chinone können durch ihre elektrophile Eigenschaft leicht mit Nucleophilen, wie z.B. Thiolen, Thioethern, primären und sekundären Aminen von Proteinen, unter Ausbildung von kovalenten Bindungen reagieren (siehe **Abbildung 2-14**) (Pierpoint 1969b; Matheis und Whitaker 1984; Jervis und Pierpoint 1989; Peter 1989;). Weiche Elektrophile (delokalisiert und polarisierbar) verbinden sich durch nucleophile Addition schnell mit weichen Nucleophilen (Thiole) und reagieren langsamer mit Aminogruppen (harte Nucleophile) (Peter 1989). Folglich sind phenolische Verbindungen in der Lage mit den reaktiven Seitenketten des Proteins zu reagieren, was zu signifikanten Veränderungen hinsichtlich deren physikochemischen Eigenschaften führen kann.

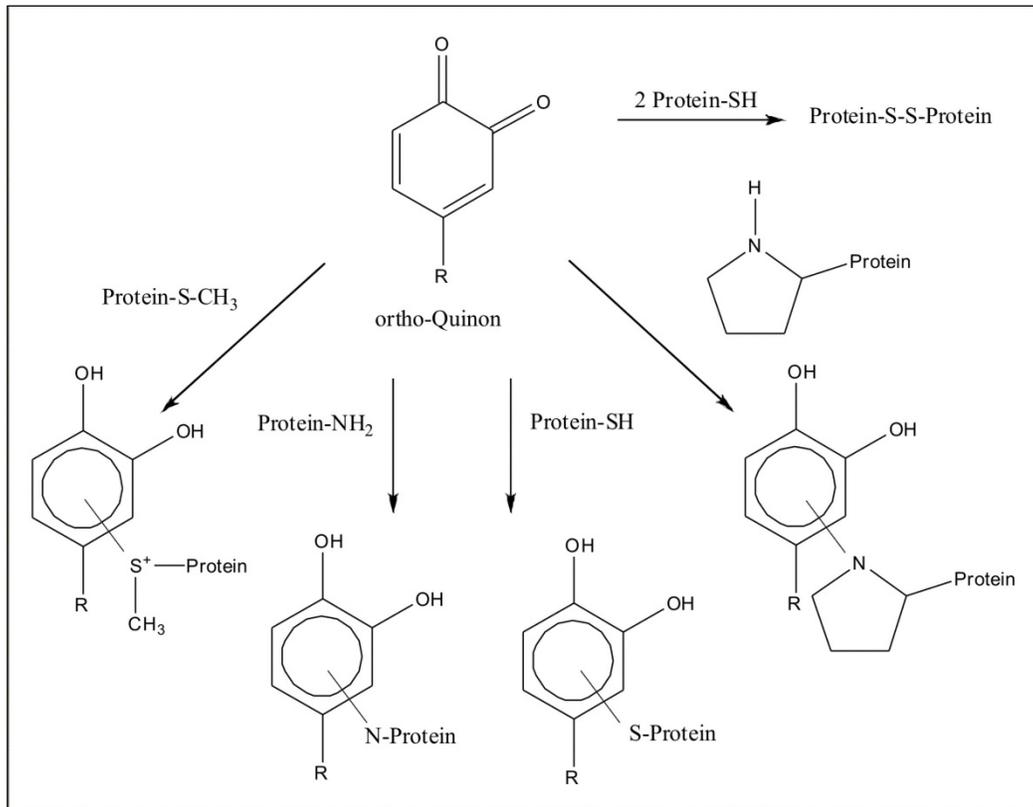


Abbildung 2-14. Reaktionsmechanismus von *o*-Chinonen mit funktionellen Seitenketten von Proteinen; aus Machholz und Lewerenz (1989).

Die weitere Oxidation dieser Additionsprodukte kann zur Ausbildung von intra- und intermolekular quervernetzten Proteinpolymeren führen (siehe **Abbildung 2-15**).

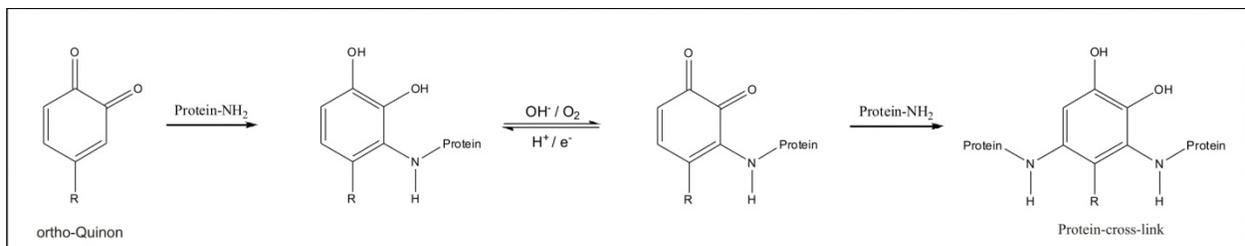


Abbildung 2-15. Reaktion von *o*-Chinonen mit funktionellen Seitenketten unter Ausbildung von Proteinquervernetzungen (*cross-links*); modifiziert aus Rawel und Rohn (2010).

Reaktion mit Aminosäuren/Peptiden

o-Chinone und *o*-Semichinon-Intermediate sind in der Lage mit schwefelhaltigen Aminosäuren in freier Form sowie gebunden innerhalb von Peptiden zu reagieren (Pierpoint 1969b; Matheis und Whitaker 1984; Cheynier et al. 1986). Diese Reaktionen wurden sowohl in Modellansätzen als auch in Lebensmittelmatrices beobachtet und untersucht. Der direkte Nachweis von Reaktionsprodukten wurde in Bezug auf Chlorogensäure und Cystein (Pierpoint WS 1966; Richard et al. 1991), Kaffeesäure und Cystein (Cheynier et al. 1986; Cilliers und Singleton 1991), oxidierte Catechole und Histidin (Xu et al. 1996; Kerwin et al. 1999; Kramer et al. 2001) und oxidierte Catechole mit Methionin (Vithayat PJ und Murthy 1972) bereits erbracht.

Die Reaktion zwischen Chlorogensäure und Cystein führt zu einer Bildung von 2-S-Cysteinyl-Chlorogensäure (Richard et al. 1991). Die C2-Position des aromatischen Rings im oxidierten Chlorogensäure-Molekül besitzt die stärksten elektrophilen Eigenschaften. Eine nucleophile Addition wird daher bevorzugt an dieser Position stattfinden (Cilliers und Singleton 1990). Die Reaktion von Kaffeesäure und Cystein verläuft unter analogen Bedingungen. Zusätzlich kann es an der C5-Position im oxidierten Kaffeesäure-Molekül zu einer Reaktion mit Cystein kommen, wobei 5-S-Cysteinyl-Kaffeesäure entsteht. Aufgrund von den genannten Bindungsstellen kann es des Weiteren zu einer Bildung von 2,5-di-S-Cysteinyl-Kaffeesäure kommen (Cilliers und Singleton 1990) (siehe **Abbildung 2-16**).

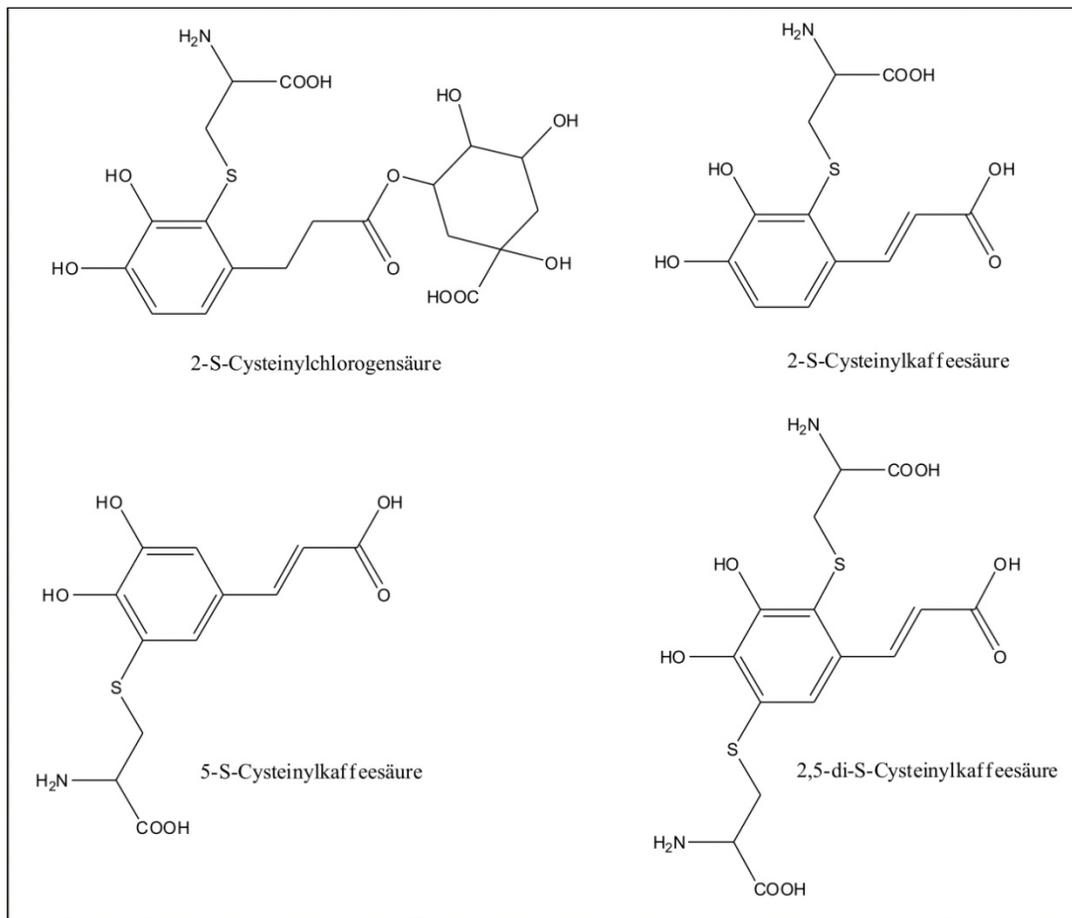


Abbildung 2-16. Darstellung der Reaktionsprodukte von Cystein und oxidierter Chlorogen- sowie Kaffeesäure; aus Cilliers und Singleton (1990) und Richard et al. (1991).

Weiterhin besteht die Möglichkeit einer Reaktion von *o*-Chinonen und *o*-Semichinon-Intermediaten mit Aminogruppen. Analysen des Aminosäuregehalts und der nicht-modifizierten, freien Aminosäuren haben indirekt gezeigt, dass die terminale Aminogruppe von Proteinen (Pierpoint 1969a; Pierpoint 1969b), Lysin- (Pierpoint 1982; Rawel et al. 2000), Tryptophan- (Rawel et al. 2002) und Histidin- (Hurrell et al. 1982) Seitenketten mit Chinonen reagieren. In den Studien von Namiki et al. (2001) und Yabuta et al. (2001) wurde gezeigt, dass sich zwei Kaffeesäure-Ester unter aeroben Bedingungen in alkalischer Lösung zu einem Dimer verbinden, welches mit einem Molekül Butylamin zu einem Benzacridin-Trihydroxy-Derivat reagiert. Der Reaktionsmechanismus wurde von Namiki et al. (2001) beschrieben. Die Kaffeesäure-Ester oxidieren unter alkalischen Bedingungen zu freien semichinoiden Radikalen, welche sich zu Dimeren verbinden. Bei Anwesenheit einer Aminogruppe wird durch eine Michael-Addition und

eine nucleophile Cyclisierung eine Benzacridin-Ringstruktur gebildet. Prigent et al. (2008) und Schilling et al. (2008) wiesen nach, dass sich Tert-Butyloxycarbonyl-L-Lysin (Boc-Lysin) mit enzymatisch generierten Chlorogensäure-Chinonen unter der Bildung einer kovalenten Bindung zu einem Addukt verbinden. Dieses Addukt wurde mittels LC/MSⁿ analysiert und als Benzicrin-Derivat, gebildet aus einem Chlorogensäure-Dimer und Boc-Lysin gemäß dem von Namiki et al. (2001) beschriebenen Mechanismus, identifiziert. Ähnliche Addukte wurden für Boc-Tryptophan, Boc-Histidin und Boc-Tyrosin identifiziert (Prigent et al. 2008). Boc-Methionin, Boc-Serin, Boc-Threonin, Boc-Arginin, Boc-Asparagin und Boc-Glutamin zeigten hingegen keine Reaktion.

Reaktion mit Proteinen

Neben der Reaktion von Chinonen und Semichinonen mit Aminosäuren und Peptiden wurde auch die Reaktionen mit Proteinen untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Bindung von Chinonen bevorzugt an der N-terminalen Aminogruppe und nicht am Stickstoff-Atom der Peptidbindung erfolgt (Pierpoint 1969a; Kalyanaraman et al. 1987). Ist eine Thiolgruppe zugänglich, erfolgt die Reaktion bevorzugt an dieser Position. Die Bildung einer kovalenten Bindung wurde bisher in einigen Modellversuchen beobachtet. Es wurden verschiedene lebensmittelrelevante Proteine, wie BSA, Molkenproteine, Proteine aus Soja und Myoglobin, sowie Enzyme, wie α -Amylase, Trypsin, Lysozym, Bromelain und α -Chymotrypsin, und phenolische/verwandte Verbindungen, wie z.B. China-, Ferula-, Chlorogen-, und Gallussäure, *m*-, *o*- und *p*-Hydroxybenzene, Flavone, Apigenin, Kaempferol, Quercetin, untersucht. Außerdem wurde die Reaktion in Lebensmittelmatrices (Kaffeebohnen und Milchproteine) beobachtet. Innerhalb dieser Studien wurden freie Thiolgruppen des Cysteins, freie Aminogruppen des Lysins, Methioninseitenketten und die Indolringe von Tryptophan als Hauptreaktionstellen der Chinone und Semichinone identifiziert (Le Bourvellec und Renard 2012). Die Bindung von Chinonen und Semichinonen an die Proteinseitenketten verursacht signifikante Änderungen in ausgewählten physikochemischen Eigenschaften, wie z.B. in der Löslichkeit, im elektrophoretischen Verhalten, in der Hydrophobizität, im Molekulargewicht und in der isoelektrischen Fokussierung. Daneben werden auch thermodynamische Parameter, die Sekundär- sowie Tertiärstruktur und desweiteren die Enzymaktivität beeinflusst (Le Bourvellec und Renard 2012). O'Connell und Fox (1999) zeigten, dass Kaffeesäure die Stabilität von Milch bei 140 °C verbessert ohne die Eigenschaften der Milch zu ändern. Die Zugabe von Kaffeesäure führte zu einer Minderung der Zugänglichkeit von reaktiven Lysin- und Cysteinseitenketten und verhinderte die Dissoziation von κ -Casein aus den Caseinmizellen während des Erhitzungsprozesses. O'Connell und Fox (1999) führten diese Beobachtung auf die thermisch induzierte Bildung von

2. Kenntnisstand / Theoretischer Hintergrund

Kaffeesäurechinonen und deren nucleophile Addition an Aminosäureseitenketten zurück. Wie in den meisten durchgeführten Studien erfolgte der Nachweis der kovalenten Bindung von Chinonen und Semichinonen indirekt. Ein direkter Nachweis wurde bisher nicht erbracht und der Reaktionsmechanismus ist noch unklar.

2.1.1.6.4 Analytische Methoden zur Untersuchung von Phenol-Protein-Wechselwirkungen

Kovalente Wechselwirkungen zwischen phenolischen Verbindungen und Proteinen können mit verschiedensten analytischen Methoden untersucht werden. Zur Analyse des Molekulargewichts können Methoden, wie Gelfiltration, Gel- und Kapillarelektrophorese sowie Massenspektrometrie genutzt werden. Die Struktur der Reaktionsprodukte kann ebenfalls mit Massenspektrometrie sowie mittels NMR Spektroskopie analysiert werden. In **Tabelle 2-9** ist eine Auswahl an bisher zur Charakterisierung von Phenol-Protein-Wechselwirkungen genutzten, analytischen Methoden aufgeführt.

Tabelle 2-9. Ausgewählte analytische Methoden zur Analyse von Phenol-Protein-Wechselwirkungen; aus Xiao und Kai (2012).

Methoden	Gemessener Parameter	Referenz
Kapillarelektrophorese	Ka, n, PB	Lu et al. (2008); El-Hady et al. (2010); He et al. (2010)
Equilibrium-Dialyse	Ka, n	Barre et al. (1985)
Ultrafiltration	Ka, n	Barre et al. (1985)
Zentrifugation	Ka, n	Barre et al. (1985); Qian et al. (2008a)
<i>protein-coated magnetic beads</i>	K, PB	Marszall und Bucinski (2010)
ESI-MS	MW	Verge et al. (2002); Chen et al. (2004)
Hochleistungs-Affinitätschromatographie	K, Ka, PB	Chen et al. (2010); Ishii et al. (2010)
NMR Spektroskopie	Bindungsstellen	Kenyon und Hamilton (1994); Simard et al. (2005)
Röntgenkristallstrukturanalyse	Bindungsstellen	Simard et al. (2005)
Raman Spektroskopie	Konformationsänderungen	Fabriciova et al. (2004a); Fabriciova et al. (2004b)
<i>high-performance frontal analysis</i>	Ka, n	Kimura et al. (2005)

Methoden	Gemessener Parameter	Referenz
Quartzkristall-Mikrowaagen-Analyse	Physikalische Eigenschaften	Wang et al. (2007)
Turbidimetrische Methoden	Schaumbildungsaktivität	Siebert et al. (1996)
Mikrodialyse-HPLC-DAD-MS	Bindungsgrad	Qian et al. (2008b)
Fluoreszenz Quenching	Ka, n	Xiao et al. (2007)
Multispektroskopische Methoden	Ka, n, r, Konformationsänderungen	Matei und Hillebrand (2010)

Ka: Bindungskonstante; n: Anzahl der Bindungsstellen pro Proteinmolekül; PB: Anteil in Prozent der an das Protein gebundenen Komponente; K: Assoziationsgleichgewichtskonstante; MW: Molekulargewicht; BD: Bindungsgrad; r: Bindungsabstand; nK: Bindungsaffinität zwischen Komponente und Albumin.

In dieser Arbeit sollten neue Methoden der Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC) entwickelt und zur Analyse von Phenol-Protein-Wechselwirkungen eingesetzt werden. Die HPTLC wird daher im Folgenden näher erläutert.

2.2 HPTLC

2.2.1 Grundlagen

Die Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC, engl. *high-performance thin-layer chromatography*) stellt eine Weiterentwicklung der Dünnschichtchromatographie dar. Die Fortschritte bestehen in der Verbesserung des Schichtmaterials, der Automatisierung von Arbeitsschritten, der Möglichkeit zur Quantifizierung sowie der Kopplung zu *Bioassays* sowie zur Massenspektrometrie. Das Trennprinzip unterscheidet sich dabei nicht von dem der DC. Zu Beginn einer HPTLC-Analyse werden die Proben automatisch auf die HPTLC-Platten aufgetragen. Anschließend wird die Platte in eine Entwicklungseinheit überführt, in der zwischen einer ein- oder mehrstufigen automatischen Entwicklung gewählt werden kann (AMD, engl. *automated multiple development*). Zur Auswertung des sogenannten inneren Chromatogramms wird die Platte in eine Photodokumentationseinheit gelegt. In diesem Gerät erfolgt die visuelle Detektion bei UV- und Weißlicht, welche ggfs. durch Derivatisierungen ergänzt werden kann. Eine Identifikation unbekannter Stoffe kann auf zwei Arten erfolgen. Ein Wellenlängenscanner für HPTLC-Platten ermöglicht die Aufnahme eines Absorptions- oder Emissionsspektrums von der getrennten Probenbande, welches durch den Vergleich zum Spektrum eines

Standards identifiziert werden kann. Zusätzlich können die getrennten Substanzen direkt von der HPTLC-Platte massenspektrometrisch analysiert werden. Bei genauer Kenntnis über die Probeninhaltsstoffe kann eine densitometrische Quantifizierung mittels externer Kalibrierung erfolgen.

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) stellt eine zur HPTLC komplementäre, allerdings weitaus häufiger eingesetzte Methode dar. In **Tabelle 2-10** sind ausgewählte Parameter der HPLC und HPTLC vergleichend aufgeführt.

Tabelle 2-10. Merkmale der HPLC und HPTLC im Vergleich; modifiziert aus Srivastava (2011).

Merkmale	HPLC	HPTLC
stationäre Phase	flüssig oder fest	fest
mobile Phase	flüssig	flüssig
Anforderung an Proben	-	nicht flüchtig
Abhängigkeit der Analyse	druckabhängig	-
Ergebnisse	durch Detektor	Detektor, Augen
Auflösung	sehr hoch	mittel bis hoch
Chromatographie-System	geschlossen	offen
Trennmedium	Säule	planare Schicht (Platte)
Parallelanalysen	nicht möglich	bis zu 100
Zeit pro Probe	2 – 60 min	1- 3 min
Derivatisierung nach der chromatographischen Trennung	begrenzt, mühselig	einfach, für alle Proben anwendbar, liefert Zusatzinformationen
Empfindlichkeit	hoch bis sehr hoch	mittel bis sehr hoch
Detektoren	UV, Fluoreszenz, MS	UV-Vis, Biolumineszenz, MS

2.2.1.1 Stationäre Phase

Die chemische Zusammensetzung des Sorptionsmittels von HPTLC-Platten unterscheidet sich nicht von denen der DC. Allerdings gibt es bezüglich der physikalischen Kenngrößen entscheidende Merkmalsdifferenzen (siehe **Tabelle 2-11**). Typischerweise werden in der HPTLC-Platten mit den Maßen 20x10 cm und 10x10 cm verwendet. Als Trägermaterialien werden vorrangig Glas- oder Aluminiumfolien eingesetzt. Eine Übersicht über Charakteristika von HPTLC-Platten gibt **Tabelle 2-11**.

Tabelle 2-11. Charakteristika von TLC- und HPTLC-Platten; aus Merck (2012).

Messmodus	HPTLC	TLC
Partikelgröße	5 – 6 µm	10 – 12 µm
Partikelgrößenverteilung	4 – 8 µm	5 – 20 µm
Schichtdicke	200 µm (100 µm)	250 µm
Höhe der Platte	12 µm	30 µm
Laufhöhe	3 – 6 cm	10 – 15 cm
Laufzeit	3 – 20 min	20 – 200 min
Proben pro Platte	< 36 (72)	<10
Probenvolumen	0.1 – 0.5 µL	1 – 5 µL
Nachweisgrenzen		
	Absorption 100 – 500 pg	1 – 5 ng
	Fluoreszenz 5 – 10 pg	50 – 100 pg

2.2.1.2 Probenapplikation und Entwicklung

Das Auftragen der Proben erfolgt automatisch. Dabei wird zwischen einer Sprüh- und einer Kontaktauftragung unterschieden. Während der Sprühauftragung werden Banden oder Flächen variabler Breite und Höhe auf die HPTLC-Platten aufgesprüht, wobei die Trocknung der Probenflüssigkeit durch einen Gasstrom unterstützt wird. Je nach Flüchtigkeit des Lösungsmittels kann die Auftraggeschwindigkeit variiert werden. Bei der Kontaktauftragung setzt die Spritzennadel auf die Schicht auf und stellt so eine Verbindung zur Platte her.

Die automatische Entwicklung der HPTLC-Platte kann isokratisch oder als Gradient erfolgen, wobei beliebig viele Schritte gewählt werden können. Es besteht die Möglichkeit mehrere Lösungsmittelflaschen anzuschließen. Das Laufmittel wird vor der Entwicklung zunächst in der Mischkammer gemischt, entlüftet und anschließend in einen Trog gepumpt. Die HPTLC-Platte steht senkrecht in der Entwicklungskammer, wobei sich die untere Kante der Platte im Laufmitteltrog befindet. Bei Erreichen der gewünschten Laufhöhe, welche durch einen Sensor verfolgt wird, wird das Laufmittelreservoir entleert und die Platte unter Vakuum getrocknet. Die Trocknungszeit kann je nach Flüchtigkeit des Elutionsmittels variiert werden. HPTLC-Platten werden üblicherweise in eine Richtung entwickelt, sog. eindimensionale (1D-) HPTLC. Um das Ergebnis der Trennung zu Verbessern kann die

HPTLC-Platte nach der 1D-HPTLC um 90 ° gedreht und erneut entwickelt werden. Die Entwicklung erfolgt in zwei Dimensionen, sog. zweidimensionale (2D-) HPTLC.

2.2.1.3 Dokumentieren und Quantifizieren

Die Dokumentation des Trennergebnisses erfolgt in einer Photodokumentationseinheit. Dabei können die durch Eigenfärbung sichtbaren Banden mit weißem Auf- und Durchlicht detektiert werden. Eigenfluoreszenz bzw. Fluoreszenzlöschung werden unter UV-Licht erkennbar. Im Anschluss kann eine chemische Derivatisierung erfolgen (vgl. **Kapitel 2.2.1.4**). Dafür wird die Platte mit einer automatischen Tauchvorrichtung zur reproduzierbaren Auftragung von Reagenzien in eine Derivatisierungslösung getaucht.

Zur weiteren Identifikation und vor allem zur Quantifizierung kann die Densitometrie verwendet werden. Dabei handelt es sich um ein photometrisches Verfahren zur Detektion dünnschichtchromatographisch getrennter Substanzen. Ein Densitometer setzt sich dabei im Allgemeinen aus einer variablen Lichtquelle, einem Monochromator zur Erzeugung einer definierten Wellenlänge, einem Spiegel zur Weiterleitung des Lichtstrahls, sowie einem beweglichen Plattentisch, der Bahn für Bahn einen präzisen Scan ermöglicht, zusammen. Als Lichtquellen werden dabei Deuterium- (für UV-Licht im Bereich von 190–450 nm), Wolfram- (für den Bereich von 370–800 nm) und Quecksilberdampflampen (für einzelne charakteristische Wellenlängen bei 254 und 366 nm) verwendet.

Bei diesem Prinzip wird die Platte mit einem Strahl monochromatischen Lichts abgetastet, indem der mobile Plattentisch stets in Entwicklungsrichtung bewegt wird. Trifft der Strahl auf die Oberfläche einer HPTLC-Platte, die eine gewisse Unregelmäßigkeit aufweist, kann der Strahl absorbiert, reflektiert oder gestreut werden. Der schmale Lichtstrahl (z.B. 6,00 x 0,45 mm) wird dabei senkrecht auf die Platte gerichtet; der Detektor befindet sich in einem 45 ° Winkel dazu, so dass jegliches Licht, welches von der Plattenoberfläche reflektiert wird, von dem Detektor – einem *Photomultiplier* – erfasst wird (Remission). Trifft der Strahl auf einen Bereich einer Substanz, die in der Lage ist die Wellenlänge des eingestrahlt Lichts zu absorbieren, so wird das Signal, das den Detektor erreicht, vermindert.

Kann die Substanz durch ultraviolettes Licht zur Fluoreszenz angeregt werden, kann ebenso eine Fluoreszenzmessung durchgeführt werden. In einem solchen Fall wird ein Filter zwischen die Platte und den Detektor gebracht. Trifft das monochromatische Licht auf die Plattenoberfläche, so wird das zum Detektor reflektierte Licht durch den Filter vollständig absorbiert. Trifft der Lichtstrahl allerdings auf einen Bereich der Fluoreszenz, so weist das emittierte Licht eine höhere Wellenlänge auf, die den Filter

passieren kann, und so den Detektor erreicht (Reich und Schibli 2007). Die ermittelten Daten werden in Form von Peaks dargestellt.

Bei der Quantifizierung über Absorptionsmessungen im UV-Bereich wird die Oberfläche der Schicht mit monochromatischem Licht bestrahlt und das diffus reflektierte Licht (Remission R) gemessen. Die Remissionsgradänderung, bezogen auf den Leerwert der Schicht ($\beta = 100 \%$), wird softwaregesteuert erfasst und liefert das in Peaks umgesetzte Densitogramm. Als Remission R wird der Quotient des abgestrahlten Strahlungsstromes Φ bezogen auf die eingestrahelte Leistung Φ_0 bezeichnet.

$$R = \frac{\Phi}{\Phi_0} \quad ; \quad \beta = \frac{B}{B_0} \cdot 100 \%$$

Misst man das Strahlungsdichte-Verhältnis und gibt den obigen Quotienten in Prozent an, so resultiert der Remissionsgrad β . Zur direkten Bestimmung der Substanzmengen wird die Remissionsgradänderung bei der Wellenlänge maximaler Absorption in Abhängigkeit vom Ort registriert. Führt man diese Untersuchungen an parallel analysierten Kalibrierungen durch, so ergeben sich nach der graphischen Darstellung von Peakhöhen oder -flächen Kurven, die zur weiteren Auswertung dienen können (Jork 1966).

2.2.1.4 Detektion und Derivatisierung in der HPTLC

Die Detektionsmöglichkeiten der HPTLC sind sehr vielfältig; zusätzlich zur Möglichkeit der prä- und postchromatographischen Derivatisierung bietet sich eine große Auswahl an Reagenzien zur Visualisierung der getrennten Substanzen (siehe **Tabelle 2-12**).

Tabelle 2-12. Übersicht über die verschiedenen Detektionsmöglichkeiten der HPTLC; aus Morlock und Schwack (2010b).

physikalische Detektion	mikrochemische Detektion	effektgerichtete Analyse
<u>Radiometrie</u>	<u>Art der Reagenzien</u>	<u>Biochemische Detektion</u>
<u>Visualisierung</u>	– universelle Reagenzien	– Immunfärbung
– Physisorption	– spezifische Reagenzien	– Enzyminhibition
– Lipophilie	– Verwendung mehrerer Reagenzien	<u>Mikrobiologische Detektion</u>
<u>Photodokumentation</u>	<u>Art der Applikation</u>	– Direkte Bioautographie
– Weißlicht	– Prächromatographisch	– Kontakt-bioautographie
– UV 254 nm	- <i>in situ</i> (Start Zone)	– Immersions-bioautographie
– UV 366 nm	- im Vial	
– Lumineszenz	- in der mobilen Phase	
<u>Wellenlängenscan</u>	– Postchromatographisch	
– Fluoreszenz	- Tauchen	
– Absorption (200-800 nm)	- Drucken	
– UV/VIS Spektrum	- Bedampfen	
	- Sprühen	

Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit im Fokus stehenden Methoden der postchromatographischen Detektion erläutert werden.

2.2.1.4.1 Effektgerichtete Analyse

Die sog. effektgerichtete Analyse stellt eine Kopplung von chemischen Analysenmethoden und biologischer Detektion dar. In Bezug auf die Kopplung von HPTLC und EDA handelt es sich demnach um eine Methode die nach erfolgter chromatographischer Trennung eine *in situ* Detektion von biologischen Aktivitäten erlaubt (Morlock und Schwack 2010b) (vgl. **Tabelle 2-12**).

2.2.1.4.1.1 HPTLC-Bioautographie zur Bestimmung von antimikrobiellen Eigenschaften

Die Bioautographie gehört zu den mikrobiologischen *screening*-Verfahren, die üblicherweise genutzt werden, um antimikrobielle Aktivität nachzuweisen. Sie basiert auf der biologischen Aktivität der

getesteten Substanzen, z.B. ihrer antibakteriellen, antifungalen, antikanzerogenen oder antiprotozoalen Wirkung (Choma 2005). Die erhaltenen Resultate basieren auf einer Ja-/Nein-Entscheidung (Munoz-Olivas 2004), d.h. kann eine Wirkung nachgewiesen werden oder nicht. Zur bioautographischen Analyse von chromatographisch getrennten Substanzen kann die bioautographische Detektion mit der Planar-Chromatographie kombiniert werden. Dabei kommen Kombinationen zur Dünnschicht-, Hochleistungsdünnschicht- und planaren Elektrochromatographie in Frage. Die Vorteile einer solchen Kombination liegen in der einfachen, reproduzierbaren, hochempfindlichen und schnellen Durchführbarkeit sowie in den vielseitigen Einsatzmöglichkeiten (Betina 1973). Nachteilig stellt sich die schlecht Quantifizierbarkeit und schlecht Standardisierbarkeit dar (Betina 1973).

Generell kann die Kombination von HPTLC und Bioautographie als einfache, kostengünstige und schnelle Methode zum chemischen und biologischen *screening* von verschiedensten Extrakten eingeordnet werden. Dabei liegt ein besonderer Vorteil (z.B. im Vergleich zur HPLC) in den Freiheitsgraden der chromatographischen Trennung. Es können polare, mittelpolare und unpolare Substanzen getrennt werden. Dabei können die Trennsysteme (zu verwendende stationäre und mobile Phase) meist aus der Literatur entnommen werden. Die HPTLC-Bioautographie kann für ein Hochdurchsatz-*screening* vieler Proben genutzt werden. Die Proben, die Substanzen antimikrobieller Aktivität enthalten, können ausgewählt und zur weiteren Analyse mittels HPLC- oder GC-MS eingesetzt werden (Hostettmann et al. 1997).

Der zur Bioautographie eingesetzte Indikatororganismus kann frei gewählt werden. In dieser Arbeit wurde neben *Bacillus subtilis* auch ein genetisch modifizierter *Escherichia coli*-Stamm eingesetzt. Durch die Klonierung des GFP-Gens ist dieser Stamm in der Lage das *green fluorescent protein* überzuproduzieren. Die Verwendung dieses Mikroorganismus eröffnet dadurch eine weitere Form der Visualisierung der Testergebnisse (neben der hier verwendeten MTT-Methode). Die Kolonien fluoreszieren durch die Anwesenheit des GFPs hellgrün unter UV-Licht (366 nm). Eine Detektion mit einer Hochleistungs-CCD-Kamera ist nicht erforderlich (wie beim HPTLC-Biolumineszenz-*assay*). Wird das Wachstum durch die Anwesenheit einer antimikrobiellen Substanz gehemmt, erscheinen dunkle Zonen auf einem hell-grün fluoreszierenden Hintergrund. Die Überproduktion des GFPs ist direkt proportional zum Mikroorganismenwachstum. Daher kann die Visualisierung der Ergebnisse direkt im Anschluss an die Inkubation erfolgen. Eine weitere Inkubation, wie bei Verwendung von MTT ist nicht erforderlich. Daher würde die Verwendung des *E. coli* GFP Stammes zu einer Zeitersparnis führen (vgl. **Kapitel 5.1.5.2**).

Generell ist auch die Verwendung von anaeroben Mikroorganismen möglich. Die entwickelte HPTLC-Platte ist dazu in ein anaerobes System einzuschleusen. Die Benetzung/Überschichtung der Platte mit Medium/Agar und die Visualisierung der Testergebnisse können dann in einem anaeroben System erfolgen (z.B. Anaerobiersterilbank).

Es sei zu erwähnen, dass die Inhibition von Mikroorganismen auf einem Unterbrechen von Lebensprozessen beruht. Eine Möglichkeit liegt dabei in der Inhibition von lebenswichtigen Enzymen. Aus diesem Prozess ergibt sich die Möglichkeit, die Fähigkeit der Enzyminhibition von chromatographisch getrennten Substanzen direkt auf der Platte zu testen. Es handelt sich dabei um die Kombination von HPTLC und einem Enzyminhibitions-*assay*. Diese Technik ermöglicht ein Hochdurchsatz-*screening* zur Identifikation von Enzyminhibitoren, z.B. zur Hemmung pathogener Mikroorganismen. Limitiert ist diese Methode durch die Visualisierung der Testergebnisse. In einem Schritt des *assays* sollte demnach eine enzymgekoppelte Reaktion zu einem visualisierbaren (z.B. farbig) Reaktionsprodukt erfolgen.

Betrachtet man die experimentelle Durchführung der HPTLC-Bioautographie, können drei Ansätze unterschieden werden: die direkte Bioautographie, die Kontaktbioautographie und die Immersionsbioautographie (*agar-overlay*) (Choma und Grzelak 2011). Bei der sogenannten HPTLC-direkte Bioautographie (HPTLC-DB), werden chromatographische Trennung und mikrobielle Detektion auf derselben TLC-Platte durchgeführt. Üblicherweise wird diese Methode zum Nachweis von antibakterieller Aktivität getesteter Substanzen eingesetzt, wobei z.B. eine Veränderung im Bakterienwachstum nachgewiesen wird. Die Hemmzonen können durch Verwendung eines Dehydrogenase-Aktivität-Erkennungs-Reagenzes, in der Regel ein Tetrazolium-Salz, visualisiert werden (Hamburger und Cordell 1987). Metabolisch aktive Bakterien wandeln dieses Tetrazolium-Salz in das entsprechende intensiv gefärbte Formazan um (siehe **Abbildung 2-17**). So erscheinen antibakteriell wirkende Verbindungen als klare Flecken vor einem farbigen Hintergrund (Hamburger und Cordell 1987). Ein großer Vorteil dieses Verfahrens beruht auf der Möglichkeit die aktiven Bestandteile in einer komplexen Mischung, nach dünn-schichtchromatographischer Trennung zu lokalisieren und anschließend eine zielgerichtete Isolation durchzuführen (Hamburger und Cordell 1987).

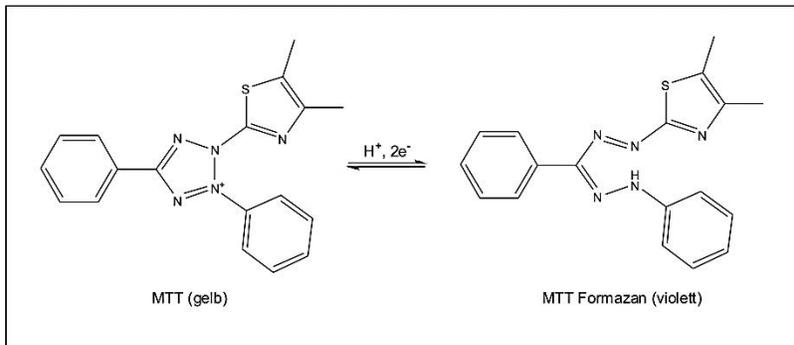


Abbildung 2-17. Umsetzung des Tetrazolium-Salzes in das entsprechende intensiv gefärbte Formazan.

Daneben können aber auch andere Vorgänge zum Nachweis herangezogen werden, wie z.B. die Beeinträchtigung des bakteriellen Stoffwechsels. Als Beispiel sei hier die TLC-Biolumineszenz Methode zu nennen, bei der lumineszente Bakterien (üblicherweise *Vibrio fischeri*; ein nicht-pathogenes Gram-negatives Marinebakterium) zur bioautographischen Detektion eingesetzt werden (Weins und Jork 1996). Dabei wird die TLC-Platte zunächst in eine Bakteriensuspension getaucht. Im direkten Anschluss wird die Biolumineszenz mit einer CCD Kamera oder mit einem Luminographen gemessen (Eberz et al. 1996). Antimikrobiell aktive Substanzen geben einen dunklen *spot* auf lumineszierenden Hintergrund.

Bei der Kontaktbioautographie wird die TLC-Platte für eine bestimmte Zeit mit der Kieselgelschicht auf einer inokulierten Agar-Platte platziert, wobei die chromatographisch getrennten Substanzen in den Agar diffundieren. Nach Entfernung der TLC-Platte und Inkubation der Agar-Platte erscheinen Inhibitionszonen an der Stelle, an der antimikrobielle Substanzen der TLC-Platte mit dem Agar in Kontakt waren (siehe **Abbildung 2-18**).

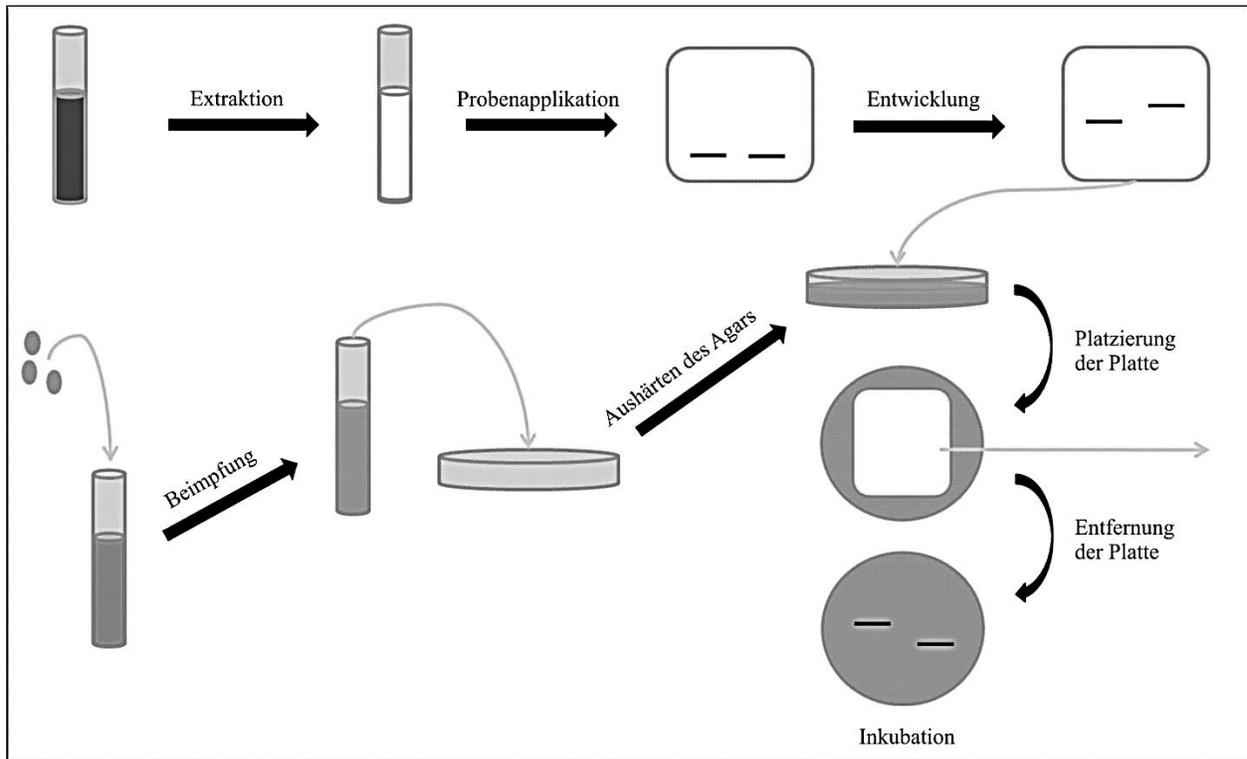


Abbildung 2-18. Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Durchführung der Kontaktbioautographie.

Bei der Immersionsbioautographie (auch als *agar-overlay* bezeichnet) wird eine TLC-Platte mit der Kieselgelschicht oberseitig in einer leeren Petrischale platziert und mit Agar beschichtet. Nach dem Aushärten erfolgt die Beimpfung des Agar mit dem Test-Mikroorganismus und die Bebrütung (Tasdemir et al. 2004; Schmourlo et al. 2005; Zheng et al. 2005). In einer modifizierten Form des *agar-overlays* erfolgt die Beimpfung des flüssigen Agar und eine sich direkt anschließende Bebrütung der überschichteten TLC-Platte (siehe **Abbildung 2-19**). Um eine bessere Diffusion der chromatographisch getrennten Substanzen zu erhalten, kann vor der Bebrütung eine Kühlung der mit Agar überschichteten TLC-Platte erfolgen. Die *agar-overlay* Technik stellt eine Kombination von Kontakt- und direkter Bioautographie dar, da die Substanzen zunächst in den Agar diffundieren, die Platte aber während der Bebrütung und Detektion in Kontakt zum Agar verbleibt.

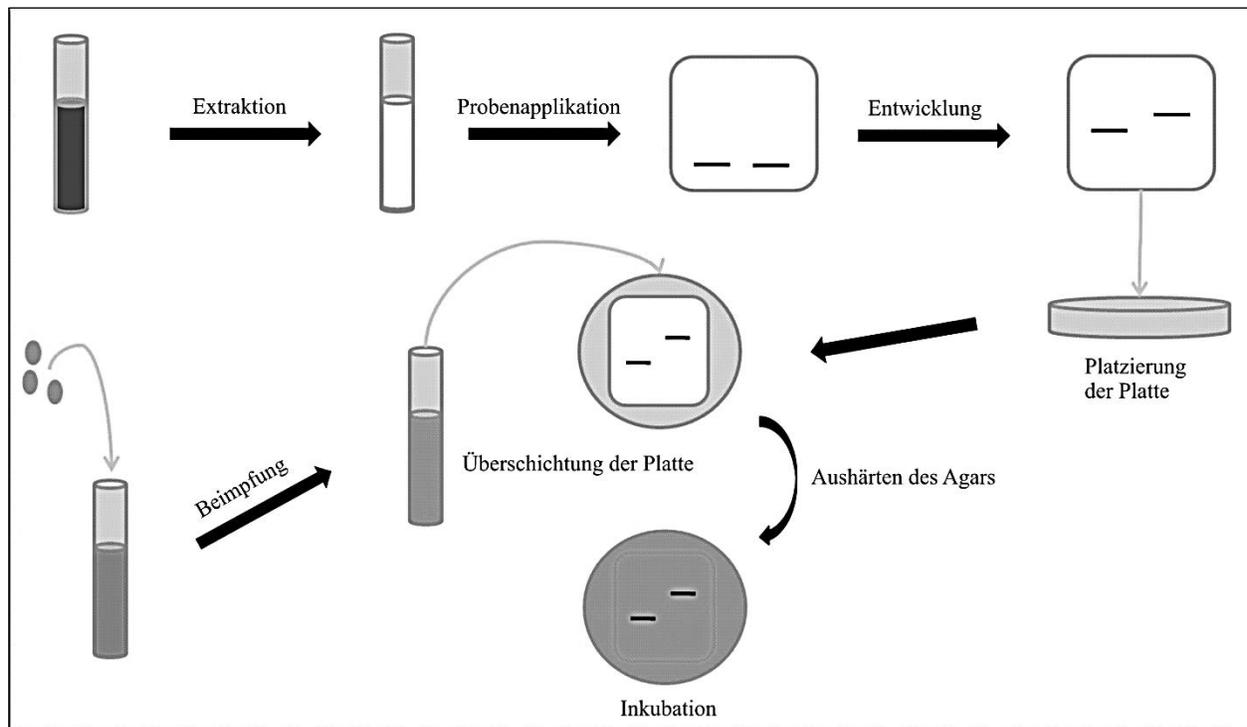


Abbildung 2-19. Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Durchführung der Immersionsbioautographie.

Unter den bioautographischen Verfahren ist die direkte Bioautographie die am weitesten verbreitete (Betina 1973; Choma 2005). Zur Durchführung dieser Methode wird die entwickelte TLC-Platte in eine Mikroorganismen-Suspension getaucht und anschließend in einer Atmosphäre mit hoher Luftfeuchtigkeit inkubiert (siehe **Abbildung 2-20**). Die Mikroorganismen-Suspension besteht aus einem geeigneten Nährmedium, welches das Mikroorganismenwachstum auf der Kieselgelschicht ermöglicht. Inhibitionszonen entstehen dort, wo sich antimikrobielle Substanzen auf der TLC-Platte befinden.

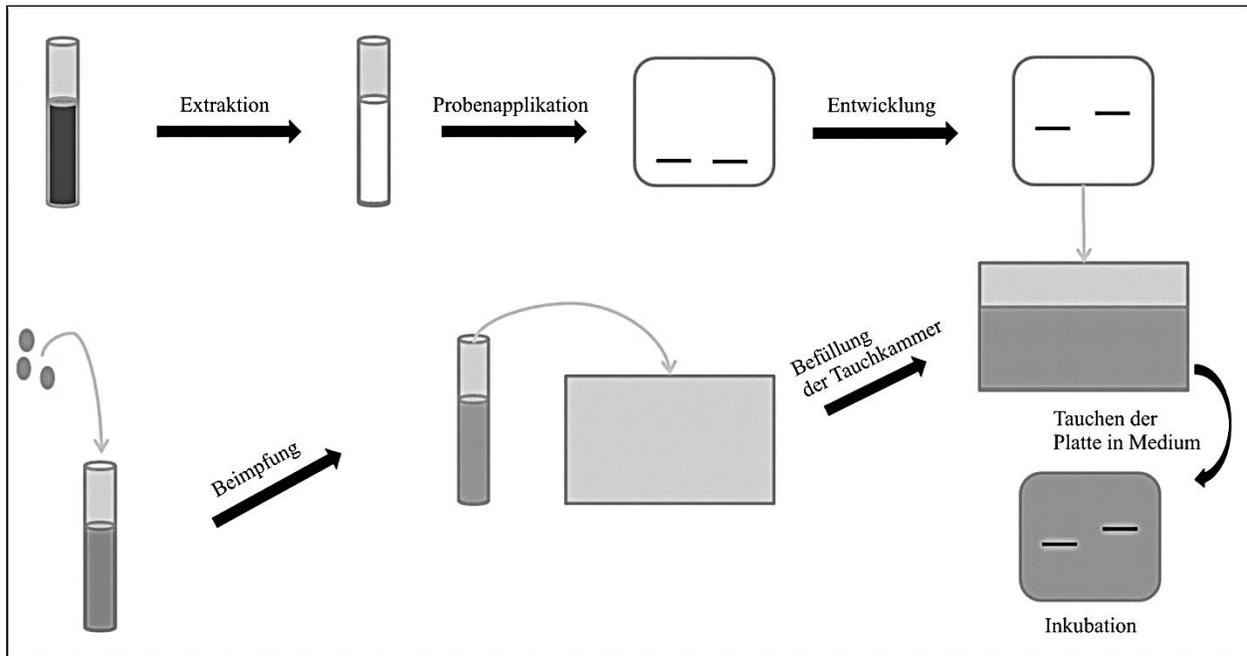


Abbildung 2-20. Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Durchführung der direkten Bioautographie.

Neben der Kopplung zur Bioautographie kann die Planarchromatographie auch mit anderen *Bioassays* gekoppelt werden, wobei die Detektion meist auf der Inhibition/Stimulation des Wachstums oder der Aktivität von Mikroorganismen beruht. Dabei finden neben Bakterien auch Hefen, Schimmelpilze, Zellorganellen (z.B. Chloroplasten) oder Enzyme Einsatz (Poole 2003; Akkad und Schwack 2008).

2.2.1.4.1.2 HPTLC-DPPH- und HPTLC-ABTS-assay zur Bestimmung von Radikalfängereigenschaften

In der HPTLC wird der postchromatographische DPPH-assay üblicherweise zur Bestimmung von Radikalfängereigenschaften eingesetzt (Marston 2010). Nach der chromatographischen Trennung wird die HPTLC-Platte in eine DPPH-Lösung getaucht. Das stabile DPPH-Radikal, welches ein Absorptionsmaximum bei 517 nm besitzt, reagiert dabei mit den sich auf der Plattenoberfläche befindlichen Radikalfängern (siehe **Abbildung 2-21**). In diesem Zuge verändert sich das Absorptionsmaximum, was sich in einem Farbumschlag von violett nach hellgelb äußert. Radikalfänger erscheinen demnach als hellgelbe Banden auf violetterm Hintergrund (Takao et al. 1994).

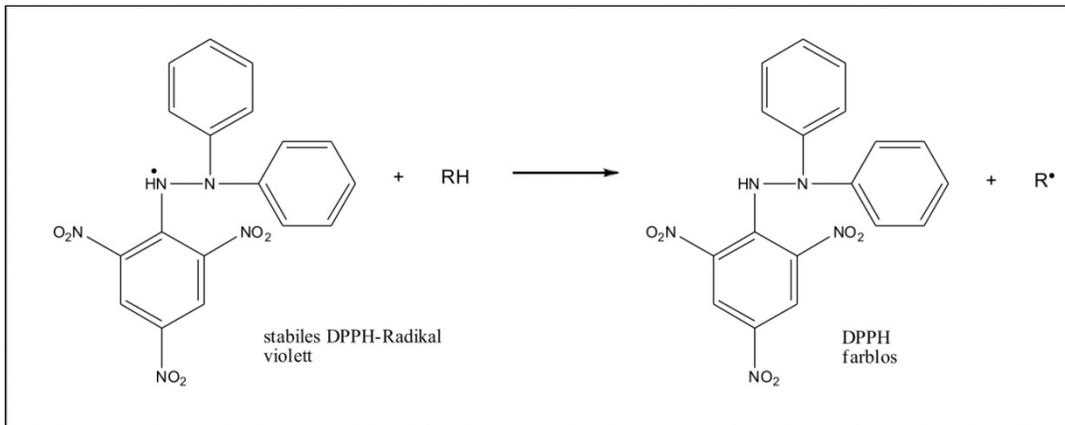


Abbildung 2-21. Reaktion des DPPH-Radikals mit Radikalfängern; aus Marston (2010).

Die Detektion von Radikalfängern ist ebenso möglich, wenn DPPH durch ABTS ersetzt wird (Miller und RiceEvans 1997). Dabei wird durch die Reaktion des stabilen ABTS-Radikalkations mit Radikalfängern ein Farbumschlag von türkis nach farblos oder pink ausgelöst (siehe **Abbildung 2-22**). Das DPPH-Radikal ist im Vergleich zum ABTS-Radikalkation stabiler auf der stationären Phase. Weiterhin wird bei Verwendung von DPPH eine homogenere Färbung der Plattenoberfläche erreicht (Takao et al. 1994).

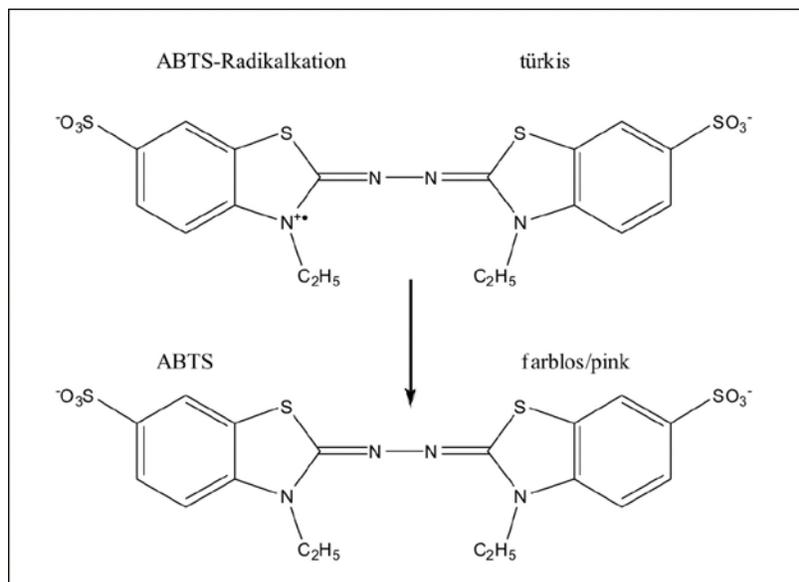


Abbildung 2-22. Reaktion des ABTS-Radikalkations mit Radikalfängern; aus Lee und Yoon (2008).

2.2.1.4.1.3 HPTLC-Immunfärbung zur Bestimmung von antigenen Eigenschaften

Proteine spielen als Allergene in Lebensmitteln eine bedeutende Rolle (Weber et al. 2009). Unklar ist bislang, inwieweit sich die Anwesenheit von phenolischen Verbindungen im Lebensmittel auf die allergenen Eigenschaften der Proteine auswirkt. Zur Analyse von potentiell allergenen Proteinen in Lebensmitteln werden bislang hauptsächlich der ELISA sowie der Western Blot eingesetzt. Grundlage der Detektion ist dabei die spezifische Antigen/Antikörper-Reaktion. Die HPTLC-Immunfärbung stellt eine Kopplung von chromatographischer Trennung und Detektion mittels der spezifischen Antigen /Antikörper-Reaktion dar. Die HPTLC-Immunfärbung wurde erstmals von Brockhaus 1982 erwähnt. Kasai et al 1984 und Saito et al 1985 haben die Methode weiterentwickelt. Bisher wurde die HPTLC-IF hauptsächlich zur Detektion von Glycosphingolipiden eingesetzt (Ishikawa und Taki 2000; Souady et al. 2009). Der experimentelle Ablauf der HPTLC-Immunfärbung ist in **Abbildung 2-23** schematisch dargestellt. In der in dieser Arbeit entwickelten Variante der HPTLC-Immunfärbung erfolgt postchromatographisch zunächst die Inkubation mit dem primären Antikörper. Dieser bindet an das Antigen. In einem zweiten Schritt bindet der sekundäre Antikörper, welcher an ein Enzym gekoppelt ist, an den primären Antikörper. Zur Detektion erfolgt abschließend eine enzymatische Umsetzung eines Substrates in ein farbiges Produkt, welches mit bloßem Auge sichtbar ist.

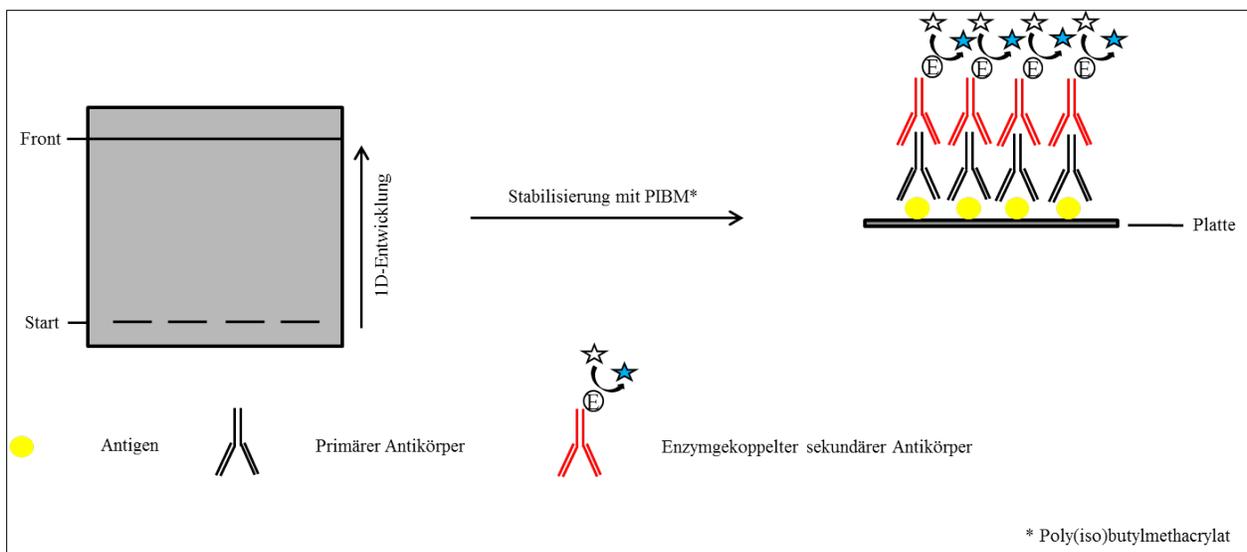


Abbildung 2-23. Schematische Darstellung der HPTLC-Immunfärbung.

2. Kenntnisstand / Theoretischer Hintergrund

2.2.1.4.2 Kopplung zur Massenspektrometrie

2.2.1.4.2.1 Allgemeines

Die Kopplungsmöglichkeiten von HPTLC und Massenspektrometrie können in elutionsbasierte und desorptionsbasierte Techniken eingeteilt werden (siehe **Tabelle 2-13**). Es handelt sich dabei hauptsächlich um *offline*-Methoden. Daher erfolgt die Entwicklung des Chromatogramms vor der massenspektrometrischen Analyse. Aufgrund dessen bestehen keine Einschränkungen in der Wahl der mobilen Phase des chromatographischen Systems, denn diese wird vor der MS-Analyse vollständig evaporiert. Anschließend können ausgewählte Zonen auf der HPTLC-Platte analysiert werden (Morlock und Schwack 2010a).

Tabelle 2-13. Einteilung der Kopplung von HPTLC und Massenspektrometrie; aus Morlock und Schwack 2010a.

Elutionsbasierte Verfahren	Desorptionsbasierte Verfahren
<u>Micro capillary arrow</u>	<u>Atom bombardment</u>
	– FAB
<u>Surface sampling probe</u>	
<u>Overrun-Chromatographie</u>	<u>Ion bombardment</u>
	– SIMS
<u>Forced-Flow-Techniken</u>	<u>Laserlichtstrahl</u>
– OPLC	– LD-CI
– RPC	– MALDI
	– SALDI
<u>Elutionskopf-basiertes Interface</u>	– ELDI
	– LA-ICP
	– LIAD
	<u>flüssiger Sprühstrahl</u>
	– DESI
	– EASI
	<u>angeregter Gasstrahl</u>
	– APGD
	– DART

2. Kenntnisstand / Theoretischer Hintergrund

2.2.1.4.2.2 Kopplung von HPTLC und MALDI/TOF/MS

Bei den desorptionsbasierten Techniken erfolgt die Ablösung (*ablation*) der Probe von der stationären Phase über eine Desorption, welche z.B. mit Hilfe eines Lasers erfolgen kann (*laser ablation*). Diese Technik wurde zuerst von Gusev et al. (1995b) für die Analyse von Proteinen und Peptiden eingesetzt. Seit 2009 ist ein sog. TLC-Adapter (siehe **Abbildung 2-24**) für MALDI/TOF/MS-Geräte inklusive einer TLC MALDI Software kommerziell erhältlich (BRUKER DALTONIK GmbH, Bremen) (Schuereberg et al. 2009). Eine HPTLC-Aluminiumfolie mit den Maßen 7.5x5 cm kann in diesen Adapter eingebaut werden. Anschließend können maximal 4 Bahnen massenspektrometrisch analysiert werden. Dabei werden die Koordinaten über die Eingabe von x- und y-steps definiert. Die Analyse erfolgt voll automatisiert. Weiterhin besteht die Möglichkeit des *imaging*s der Chromatogramme (Gusev et al. 1995a).

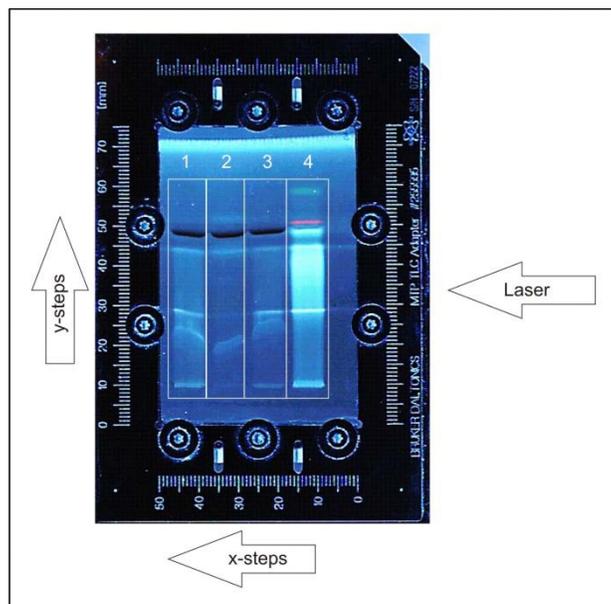


Abbildung 2-24. UV-Licht (366 nm) Detektion einer in den TLC MALDI Adapter eingebauten HPTLC-Aluminiumfolie.

2.2.1.4.2.3 Kopplung von HPTLC und ESI/MS

Die Kopplung der HPTLC und der *electrospray ionization* (ESI)-MS, der *atmospheric pressure chemical ionization* (APCI)-MS oder der *atmospheric pressure photo ionization* (APPI)-MS stellte lange Zeit eine

Herausforderung in Bezug auf die Verbindung von der statischen HPTLC-Oberfläche und dem dynamischen, liquiden Probeneinlass in Massenspektrometer dar. Eine Möglichkeit diese Verbindung zu realisieren wird durch die elutionskopf-basierte Technik realisiert. Diese kann mit dem seit 2009 kommerziell erhältlichen halbautomatischen TLC-ESI/MS-*interface* (CAMAG Chemie-Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG, Muttenz, Schweiz) durchgeführt werden (Rolli und Loppacher 2009). Zur Identifikation eines *spots* platziert man die Platte unter dem Elutionskopf, welcher anschließend mit Druckluft auf die Oberfläche aufgesetzt wird. Die Schneidkante sorgt dabei für ein dichtes Abschließen des Kopfes auf der Platte. Mit einer Hilfspumpe wird Lösungsmittel durch die Einlasskapillare auf die zu analysierende Zone gegeben und durch die Auslasskapillare zum Massenspektrometer abgeführt. Eine Fritte verhindert, dass Partikel des Schichtmaterials in die Auslasskapillare gelangen. Die unbekannte Substanz gelangt schließlich ins Massenspektrometer, in dem das Masse-zu-Ladungsverhältnis bestimmt wird und ein Fragmentspektrum aufgenommen werden kann, um die Substanz zu identifizieren

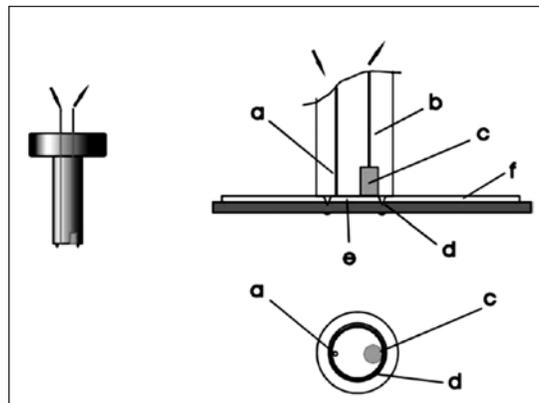


Abbildung 2-25. Darstellung des TLC-ESI/MS-*interface* (CAMAG Chemie-Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG).

Ansicht und Querschnitt des Elutionskopfes. Einlasskapillare (a); Auslasskapillare (b); Fritte (c); Schneidkante (d); zu analysierende Zone (e); HPTLC-Platte (f); aus Luftmann (2004).

2.2.1.4.2.4 Kopplung von HPTLC und DESI/MS

Die Desorption der Probe von der HPTLC-Oberfläche kann auch mit einem flüssigen Sprühstrahl erfolgen, wie z.B. bei der Kopplung von HPTLC und *desorption-electrospray-ionization* (DESI)-MS, welche von Van Berkel et al. (2005) vorgestellt wurde (siehe **Abbildung 2-26**). Die HPTLC-Platte wird auf einem in zwei Dimensionen beweglichen Tisch platziert. Anschließend wird der DESI *Emitter* über der gewünschten Position auf der HPTLC-Platte positioniert (kommerziell erhältliche DESI-Quelle z.B.

2. Kenntnisstand / Theoretischer Hintergrund

von Prosofia, Inc., Indianapolis, IN, USA). Auch hier bietet sich die Möglichkeit der vollautomatischen Analyse einer Bahn und des *imaging* (Pasilis et al. 2008b). Auch 2D-HPTLC-Chromatogramme können über *imaging* veranschaulicht werden (Pasilis et al. 2008a).

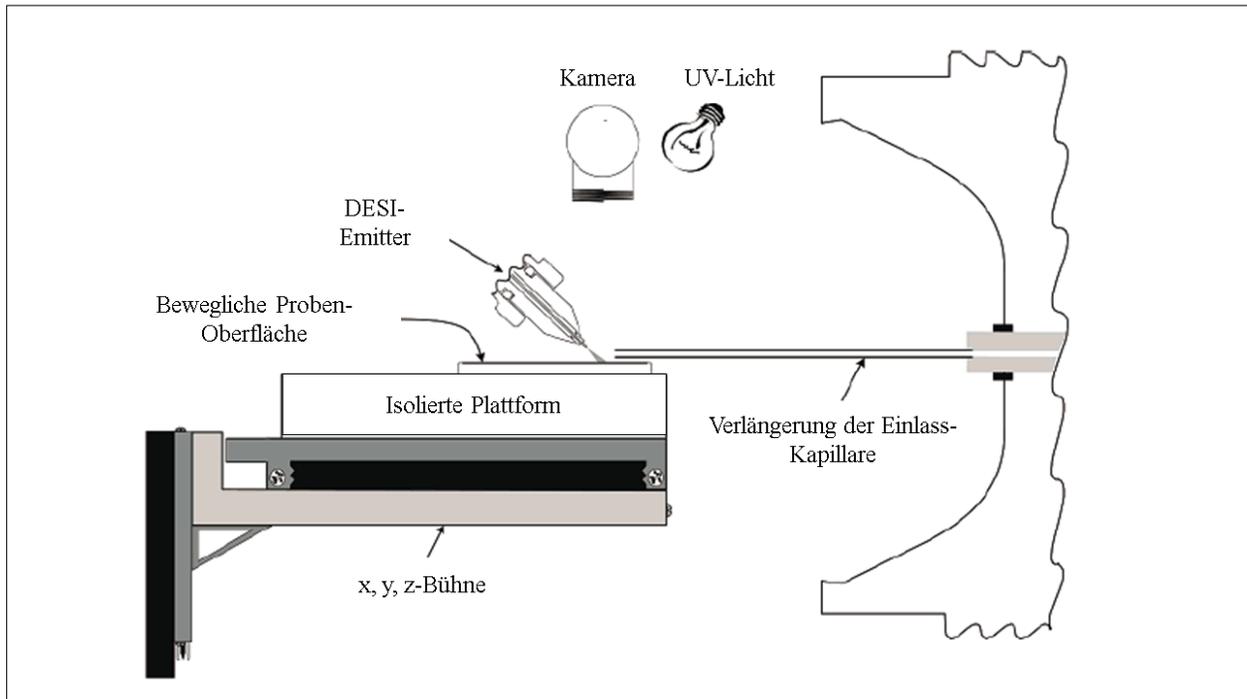


Abbildung 2-26. Schematische Darstellung der DESI-Quelle; modifiziert aus Van Berkel et al. (2005).

3 Problemstellung

Die Ergebnisse zahlreicher wissenschaftlicher Studien haben gezeigt, dass sekundäre Pflanzenstoffe, vor allem phenolische Verbindungen, eine positive ernährungsphysiologische Wirkung auf den humanen Organismus ausüben. Eine Aufnahme sekundärer Pflanzenstoffe mit der Nahrung in Form von pflanzlichen Lebensmitteln, aber auch in Form von Kapseln/Tabletten als Nahrungsergänzungsmittel, kann demnach zu einer Prävention von Krankheiten, wie Krebs, Arteriosklerose oder Diabetes, führen. Die genauen Reaktionsmechanismen, die zu dieser positiven Wirkung führen, wurden trotz einer Vielzahl an Untersuchungen noch nicht abschließend aufgeklärt. Unklar ist außerdem, wie sich die Lebensmittelbe- und -verarbeitung auf den Gehalt an sekundären Pflanzenstoffen im Lebensmittel und deren Bioverfügbarkeit auswirkt.

Als entscheidende Faktoren können die Stabilität von phenolischen Verbindungen sowie deren Reaktivität mit anderen *target*-Molekülen betrachtet werden. Wenig Beachtung findet bisher die Reaktion phenolischer Verbindungen mit Proteinen. Die bisherigen Untersuchungen solcher Interaktionen beschränken sich meist auf den indirekten Nachweis etwaiger Wechselwirkungen und deren Konsequenzen. Die chemischen Reaktionsmechanismen wurden bisher nicht oder nur unzureichend aufgeklärt. Neben den bislang bevorzugt zur Erklärung der Beobachtungen eingesetzten nicht-kovalenten Bindungen, ist die Ausbildung von kovalenten Bindungen nicht auszuschließen. Hinweise auf die Ausbildung einer kovalenten Bindung wurden in einigen detaillierten Untersuchungen auf der Basis von Modellreaktionen bzw. in Lebensmittelsystemen erhalten. Versuche, den chemischen Reaktionsmechanismus aufzuklären, scheitern meist an ungeeigneten, analytischen Methoden.

Ausgehend vom bisherigen Kenntnisstand sollen im Rahmen dieser Arbeit HPTLC-Methoden zur Untersuchung der Reaktion zwischen phenolischen und verwandten Substanzen mit Proteinen entwickelt werden. Dabei sollen die Methoden zur Analyse von unverdauten und verdauten Phenol-Protein-Derivaten dienen.

Zunächst soll eine Methodenentwicklung mit ausgewählten Standardsubstanzen erfolgen. Im Weiteren Verlauf ist vorgesehen, die entwickelten Methoden zunächst auf nicht-modifizierte und im Anschluss auf modifizierte Modellproteine anzuwenden. Auf der Basis von Modellsystemen werden ausgewählte Proteine (Myoglobin, Lysozym, Casein und Ovalbumin) mit phenolischen (Ferulasäure, *p*-Cumarsäure, Sinapinsäure, Syringasäure, Kaffeesäure, Gallussäure und Tanninsäure) und verwandten (Chinasäure) Verbindungen zur Reaktion gebracht (modifiziert), und die Reaktionsprodukte (Derivate) hinsichtlich

3. Problemstellung

ihrer Eigenschaften mit Hilfe von traditionellen sowie im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden charakterisiert und beschrieben. Die Auswahl der Modellsubstanzen (Proteine, phenolische/verwandte Verbindungen) erfolgte aufgrund ihrer Relevanz in Lebensmitteln sowie ihrer Rolle in verwandten Bereichen (z.B. phenolische Verbindungen als *cross-linker* in Biofilmen, Proteine als Trägermoleküle für wertvolle phenolische Verbindungen).

Im Fokus dieser Arbeit steht die Entwicklung von HPTLC-Methoden, welche zur Analyse von Änderung in Polarität, UV-Aktivität und Molekulargewicht der unverdauten und verdauten Phenol-Protein-Derivate genutzt werden kann. Durch die Kombination von der HPTLC und der effektgerichteten Analyse wird die postchromatographische Betrachtung von Änderungen der antimikrobiellen Aktivität, der Radikalfängereigenschaften sowie der antigenen Eigenschaften ermöglicht. Des Weiteren soll die Kopplung der HPTLC zu der Massenspektrometrie zur Aufklärung des chemischen Reaktionsmechanismus zwischen phenolischen/verwandten Verbindungen und Proteinen dienen.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Phenolische und verwandte Verbindungen

Tabelle 4-1. Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten phenolischen/verwandten Verbindungen.

Verbindung	Molekulargewicht [g/mol]	Hersteller
- Ferulasäure	194.19	Acros Organics
- Sinapinsäure	224.21	Acros Organics
- Syringasäure	198.17	Acros Organics
- Gallussäure	170.12	Serva
- Tanninsäure	1701.2	Acros Organics
- <i>p</i> -Cumarsäure	164.16	SIGMA
- Kaffeesäure	180.16	SIGMA
- D-(-)-Chinasäure	192.17	Fluka

4.1.2 Proteine zur Methodenentwicklung

- α -Lactalbumin aus Kuhmilch (SIGMA Chemicals Co., St. Louis, MO, USA)

(CAS Nummer 9051-29-0, Typ 1, Proteingehalt \geq 85 %, M_r ~ 14 200)

- β -Lactoglobulin aus Kuhmilch (SIGMA Chemicals Co., St. Louis, MO, USA)

(CAS Nummer 9045-23-2, Proteingehalt \geq 90 %, M_r ~ 18 300)

- Rinderserumalbumin (SIGMA Chemicals Co., St. Louis, MO, USA)

(CAS Nummer 9048-46-8, Proteingehalt \geq 96 %, M_r ~ 66 000)

- Cytochrom C aus Pferdeherz (SIGMA Chemicals Co., St. Louis, MO, USA)

(CAS Nummer 9007-43-6, Proteingehalt \geq 95 %, M_r ~ 11 700)

4. Material und Methoden

- Insulin, rekombinant aus Hefezellen (SIGMA Chemicals Co., St. Louis, MO, USA)

(CAS Nummer 11061-68-0, $M_r \sim 5\ 800$)

Tabelle 4-2. Anhand der Aminosäuresequenz berechnete Parameter (Molekulargewicht, isoelektrischer Punkt (pI), Ladung bei pH 7.0) (<http://www.uniprot.org/>, <http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>).

Protein	Molekulargewicht	pI	Ladung bei pH 7.0
α -Lactalbumin	14186.03	5.00	-6.6
β -Lactoglobulin	18281.16	4.92	-7.7
Cytochrom C	11701.52	9.57	9.6
Insulin	5808	-	-

4.1.3 Proteine zur Derivatisierung

- Myoglobin aus Pferdeherz (SIGMA Chemicals Co., St. Louis, MO, USA)

(CAS Nummer 100684-32-0, Proteingehalt $\geq 90\%$, $M_r \sim 17\ 000$)

- Lysozym aus Hühnereiklar (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz)

(EC 3.2.1.17, $M_r \sim 14\ 600$, 70 000 Units pro mg Protein, eine Unit entspricht der Enzymmenge, die bei 450 nm eine Extinktionsabnahme von 0.001 pro Minute bei pH 7.00 und 25 °C bewirkt (Substrat: *Micrococcus luteus* ATCC 4698))

- Ovalbumin aus Hühnereiklar (SIGMA Chemicals Co., St. Louis, MO, USA)

(CAS Nummer 9006-59-1, Proteingehalt $\geq 90\%$, $M_r \sim 44\ 300$)

- Casein aus Kuhmilch (SIGMA Chemicals Co., St. Louis, MO, USA)

(CAS Nummer 9000-71-9, Gemisch aus α -s1-Casein, α -s2-Casein, β -Casein und κ -Casein)

4. Material und Methoden

Tabelle 4-3. Aminosäurenverteilung von Myoglobin, Lysozym, Ovalbumin und α s₁-Casein (beispielhaft für die Casein-Fraktion) (<http://www.uniprot.org/>, http://proteome.gs.washington.edu/cgi-bin/aa_calc.pl) sowie anhand der Aminosäuresequenz berechnete Parameter (Molekulargewicht, pI, Ladung bei pH 7.0).

Aminosäure	Myoglobin	Lysozym	Ovalbumin	α s ₁ -Casein
Ala A	15	12	35	9
Arg R	2	11	15	6
Asn N	2	14	17	8
Asp D	8	7	14	7
Cys C		8	6	
Glu E	13	2	33	25
Gln Q	6	3	15	14
Gly G	15	12	19	9
His H	11	1	7	5
Ile I	9	6	25	11
Leu L	17	8	32	17
Lys K	19	6	20	14
Met M	2	2	16	5
Phe F	7	3	20	8
Pro P	4	2	14	17
Ser S	5	10	38	16
Thr T	7	7	15	5
Trp W	2	6	3	2
Tyr Y	2	3	10	10
Val V	7	6	31	11
Molekulargewicht*	16951.43	14313.10	42749.92	22974.81
pI*	7.80	9.04	5.29	4.94
Ladung bei pH 7.0*	2.6	7.9	-10.5	-10.8
Anzahl der Peptide nach tryptischem Verdau**	35	29	43	23

* <http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>

** <http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msdigest>, Molekulargewicht > 300 Da

4. Material und Methoden

4.1.4 Enzyme für den enzymatischen Abbau

- Trypsin aus Schweinepankreas (SIGMA Chemicals Co., St. Louis, MO, USA)
(EC 3.4.21.4, Typ XI, $M_r \sim 23\ 800$, $\geq 6\ 000$ BAEE Units pro mg Protein, eine BAEE Unit entspricht der Enzymmenge, die bei 253 nm eine Extinktionsabnahme von 0.001 pro Minute bei pH 7.60 und 25 °C bewirkt (Substrat: N α -Benzoyl-L-Arginin-Ethyl-Ester)
- Trypsin aus Schweinepankreas (Promega Corporation, Madison, WI, USA)
(EC 3.4.21.4, *sequencing grade modified*, $M_r \sim 23\ 800$)

4.1.5 Primäre und sekundäre Antikörper

- Myoglobin Rabbit Monoclonal Antibody (Epitomics, Burlingame, CA, USA)
($M_r \sim 17\ 000$, Verdünnung 1/2000 v/v, zur Immunisierung wurde ein synthetisches Peptid nahe des N-Terminus von humanem Myoglobin eingesetzt)
- Horse Myoglobin Antibody (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX, USA)
(aus Ziege, Konzentration 1 mg/mL, Verdünnung 1/10 000 v/v)
- Rabbit IgG-heavy and light chain Antibody (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX, USA)
(aus Schaf, HRP-konjugiert, *whole IgG*, Konzentration 1 mg/mL, Verdünnung 1/10 000 v/v)
- Goat IgG-heavy and light chain Antibody (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX, USA)
(aus Kanneinchen, HRP-konjugiert, *whole IgG*, Konzentration 1 mg/mL, Verdünnung 1/10 000 v/v)

4.1.6 Bakterienstämme für die HPTLC-Bioautographie

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme wurden freundlicherweise von Frau Dr. Ilka Haase aus dem Arbeitskreis von Professor Dr. Markus Fischer zur Verfügung gestellt.

- Escherichia coli XL1-pNCO-GFP
(mit Ampicillin-Resistenz; *green fluorescent protein*-Überproduktion; optimale Wachstumstemperatur bei 37 °C)

4. Material und Methoden

- *Bacillus subtilis* BR151

(Genotyp: trpC2 lys-3 metB10 mit Erythromycin [Plasmid pBL1] und Kanamycin-Resistenz [Vektor p602]; optimale Wachstumstemperatur bei 32°C)

4.1.7 Chemikalien allgemein

2-Butanol, 2-Propanol, 25 % Ammoniak, EDTA-Na-Salz, Citronensäure, Eisessig, Formaldehyd, Glutardialdehyd, Kupfer(II)-sulfat (wasserfrei), Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumthiosulfat-Pentahydrat, Natronlauge (32 %-ig), *ortho*-Phosphorsäure (85 %-ig), Phenolrot, SDS, Standard-I-Nähragar, Wasserstoffperoxid

[alle Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland]

Acrylamid, Agar-Agar, Ameisensäure (98 %), Ammoniumhydrogencarbonat, Ampicillin, Ammoniumperoxodisulfat, Caseinhydrolysat, Dichlormethan, Hefeextrakt, Methanol (gradient grade), Thiazolylblau, Natriumchlorid, Ninhydrin, Pyridin, Silbernitrat, Tetramethylethylendiamin

[alle Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland]

Acetonitril (gradient grade), Ciprofloxacin, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, Tris-HCl, Tween 20

[alle SIGMA Chemicals Co., St. Louis, MO, USA]

HPLC Peptid-Mix Standard, Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat, Natriumcarbonat

[alle Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz]

Coomassie Brilliant Blue G 250, Rinderserumalbumin

[alle Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland]

Aceton [Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen]

Cyclohexan, Glycerin [alle Grüssing GmbH Analytica, Filsum]

Ethylacetat, Toluol [alle Honeywell International, Morristown, NJ, USA]

Tris-Base [J.T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, NJ, USA]

4.1.8 HPTLC-Platten und HPLC-Säulen

Tabelle 4-4. Übersicht über alle verwendeten HPTLC-Platten. KG: Kieselgel 60; AF: Aluminiumfolien; GP: Glasplatten.

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
TLC-Cellulose-F ₂₅₄ -AF	Merck KGaA	105574
TLC-Cellulose-AF	Merck KGaA	105552
HPTLC-Cellulose-AF	Merck KGaA	116092
HPTLC-Cellulose-GP	Merck KGaA	105036
TLC-KG-AF	Merck KGaA	105553
HPTLC-KG-AF	Merck KGaA	105547
TLC-KG-GP	Merck KGaA	105626
HPTLC-KG-GP	Merck KGaA	105641
HPTLC-KG-CN-F _{254S} -GP	Merck KGaA	116464
HPTLC-KG-NH ₂ -F _{254S} -GP	Merck KGaA	113192
TLC-KG-RP-8-F _{254S} -GP	Merck KGaA	115388
HPTLC-KG-RP-18-GP	Merck KGaA	105914
TLC-KG-RP-18-F _{254S} -GP	Merck KGaA	115423
TLC-KG-RP-18-AF	Merck KGaA	105559
TLC-KG-SIL-G-F ₂₅₄ -AF	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	818133
HPTLC-KG-Nano-SIL-C ₁₈₋₁₀₀ -F ₂₅₄ -GP	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	811062
HPTLC-KG-Nano-SIL-C ₁₈₋₅₀ -F ₂₅₄ -GP	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	811064
HPTLC-KG-Nano-SIL-C _{18W} -F ₂₅₄ -GP	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	811075

Tabelle 4-5. Übersicht über alle verwendeten HPLC-Säulen.

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
MICRA-NPS C ₁₈ , 1,5 µm, 33 x 4.6 mm	Eichrom Technologies Inc., Paris, Frankreich	#AP06
Nucleodur C ₁₈ HTec, 5 µm, 125 x 2 mm	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	760314.20

4.2 Herstellung der Derivate sowie Protein-Kontrollen

4.2.1 Herstellung von Kaffeesäure-Derivaten des Myoglobins sowie Myoglobin-Kontrollen

Es werden jeweils vier Protein-Lösungen der Konzentrationen 1 mg/mL, 2 mg/mL und 3 mg/mL hergestellt. Dafür wird die entsprechende Proteinmenge in einer 0.09 M Natriumhydroxid-Lösung gelöst. Drei dieser Lösungen jeder Konzentration werden mit der entsprechenden Menge einer Kaffeesäure (KS)-Lösung versetzt; eine Lösung jeder Konzentration bleibt als Kontroll-Lösung undotiert. Die Kaffeesäure-

4. Material und Methoden

Konzentrationen in den jeweiligen Protein-Lösungen betragen 0.25 mM KS/g Protein, 0.5 mM KS/g Protein und 0.75 mM KS/g Protein. Dafür wird eine Kaffeesäure-Stamm-Lösung der Konzentration 5 mg/mL (27.75 mM) hergestellt, von der das entsprechende Volumen zur Protein-Lösung pipettiert wird. Das Endvolumen jeder Lösung beträgt 5 mL. Die Reaktion erfolgt 24 h bei Raumtemperatur (24 °C) in einem offenen Reaktionsgefäß unter kontinuierlichem Schütteln. Anschließend werden die Proben 72 h in einem Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (25 mM) in einen Dialyseschlauch (Carl Roth GmbH & Co. KG, NMWL 3.5 kDa) dialysiert. Hiernach werden die Proben in 50-mL Falcons überführt und 24 h lyophilisiert. Die gefriergetrockneten Proben werden abschließend in 5 mL Puffer aufgenommen, in Anteile von je 500 µL aliquotiert und bei – 20 °C gelagert.

4.2.2 Herstellung der restlichen Derivate sowie Protein-Kontrollen

Die phenolischen/verwandten Verbindungen werden in Konzentrationen von 8, 10 und 12 mg/mL in 0.09 M Natriumhydroxid-Lösung gelöst. Die Proteine Myoglobin, Lysozym, Ovalbumin und Casein werden in einer Konzentration von 3 mg/mL in der Lösung der phenolischen/verwandten Verbindung gelöst. Dabei wird jedes Modellprotein mit jeder phenolischen/verwandten Verbindung zur Reaktion gebracht. Es werden jeweils reine Protein-Lösungen sowie reine Lösungen der phenolischen/verwandten Verbindung als Kontrollen mitgeführt. Die Reaktionsansätze werden 24 h bei Raumtemperatur in einem offenem Reaktionsgefäß geschüttelt. Anschließend wird eine Hälfte des jeweiligen Ansatzes in einen Dialyseschlauch (Carl Roth GmbH & Co. KG, NMWL 3.5 kDa) überführt und 72 h bei Raumtemperatur gegen Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (25 mM) dialysiert. Die andere Hälfte des Ansatzes verbleibt undialysiert. Die undialysierten und dialysierten Lösungen werden bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

Tabelle 4-6. Auflistung der hergestellten Derivate sowie der Protein-Kontrollen mit Konzentration und verwendeten Abkürzungen. Die Abkürzungen der Derivate wird im Zusammenhang zu dem jeweiligen Modellprotein (Myoglobin, Lysozym, Ovalbumin oder Casein) genutzt.

Probe	Konzentration [mM]	Abkürzung	Probe	Konzentration [mM]	Abkürzung
Myoglobin*	0.177	M1	Lysozym*	0.210	L1
Myoglobin**	0.177	M2	Lysozym**	0.210	L2
Ovalbumin*	0.070	O1	Casein*	-	C1
Ovalbumin**	0.070	O2	Casein**	-	C2
D-Chinasäure*	42	Ch1	Syringasäure*	40	Sy1
D-Chinasäure *	52	Ch2	Syringasäure*	50	Sy2
D-Chinasäure *	63	Ch3	Syringasäure*	61	Sy3
D-Chinasäure **	42	Ch4	Syringasäure**	40	Sy4
D-Chinasäure **	52	Ch5	Syringasäure**	50	Sy5

Probe	Konzentration [mM]	Abkürzung	Probe	Konzentration [mM]	Abkürzung
D-Chinasäure **	63	Ch6	Syringasäure**	61	Sy6
<i>p</i> -Cumarsäure*	49	Cu1	Kaffeensäure*	44	K1
<i>p</i> -Cumarsäure*	61	Cu2	Kaffeensäure*	56	K2
<i>p</i> -Cumarsäure*	73	Cu3	Kaffeensäure*	67	K3
<i>p</i> -Cumarsäure**	49	Cu4	Kaffeensäure**	44	K4
<i>p</i> -Cumarsäure**	61	Cu5	Kaffeensäure**	56	K5
<i>p</i> -Cumarsäure**	73	Cu6	Kaffeensäure**	67	K6
Ferulasäure*	41	F1	Gallussäure*	47	G1
Ferulasäure*	51	F2	Gallussäure*	59	G2
Ferulasäure*	62	F3	Gallussäure*	71	G3
Ferulasäure**	41	F4	Gallussäure**	47	G4
Ferulasäure**	51	F5	Gallussäure**	59	G5
Ferulasäure**	62	F6	Gallussäure**	71	G6
Sinapinsäure*	36	Si1	Tanninsäure*	5	T1
Sinapinsäure*	45	Si2	Tanninsäure*	6	T2
Sinapinsäure*	54	Si3	Tanninsäure*	7	T3
Sinapinsäure**	36	Si4	Tanninsäure**	5	T4
Sinapinsäure**	45	Si5	Tanninsäure**	6	T5
Sinapinsäure**	54	Si6	Tanninsäure**	7	T6

* undialysiert, ** dialysiert

4.2.3 Enzymatischer Verdau der Phenol-Protein-Derivate

Für den enzymatischen Verdau der Derivate und Protein-Kontrollen wird das Enzym Trypsin eingesetzt. Dafür wird dieses zu einer Konzentration von 1 mg/mL in 1 mM Salzsäure bzw. in dem für das Enzym vorgesehenen Puffer (Promega Corporation) gelöst. Anschließend wird die Enzym-Lösung in einem Verhältnis von 100/6 (Protein/Enzym) zu der Proteinlösung gegeben. Die Ansätze werden verschlossen und für 15 h bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Die enzymatisch verdauten Derivate sowie Protein-Kontrollen werden bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

4.3 Charakterisierung der unverdauten Phenol-Protein-Derivate sowie Protein-Kontrollen

4.3.1 HPTLC der unverdauten Derivate sowie Protein-Kontrollen

Die Änderungen der Polarität und des Molekulargewichts sowie der UV-Aktivität der unverdauten Phenol-Protein-Derivate (siehe **Kapitel 4.2**) werden mittels HPTLC analysiert. Innerhalb einer Methodenentwicklung wurde das folgende Versuchsprotokoll festgelegt.

4. Material und Methoden

Durchführung:

Messparameter

Stationäre Phase	HPTLC-Kieselgel-60-Aluminiumfolien oder -Glasplatten HPTLC-Kieselgel-60-RP-18-Aluminiumfolien oder -Glasplatten TLC-Kieselgel-60-RP-8-Glasplatten HPTLC-Cellulose-Aluminiumfolien
Plattengröße	10 x 10 cm, 10 x 20 cm oder passend zugeschnitten
Vorkonditionierung	Einmal vorwaschen mit Methanol; 30 min bei 100 °C aktivieren
Mobile Phase	HPTLC-Kieselgel-Aluminiumfolien oder -Glasplatten und HPTLC-Cellulose-Aluminiumfolien: 1) 2-Butanol/Pyridin/Ammoniak (25 %)/Wasser (29/25/8/38, v/v/v/v) TLC-RP-8-Aluminiumfolie: 2) Acetonitril/Wasser, TFA (7.5 %) (6/4, v/v)
Probenapplikation	ATS4 (CAMAG Chemie-Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG) Applikationsvolumen 10 µL Applikationsgeschwindigkeit 60 nL/s Sprühgas Stickstoff Applikationsposition x = 10 cm y = 10 cm Applikationstyp Bande (Länge = 7.5 mm) Spritze Hamilton Spritzenvolumen 25 µL
Entwicklung	AMD2 und Doppeltrogkammer mit Edelstahldeckel (CAMAG Chemie-Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG) Laufmittelfront 75 mm Dauer 1) 80 Minuten, 2) 60 Minuten
Derivatisierung	Mit automatischer Tauchvorrichtung (CAMAG Chemie-Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG), Time: 1, Speed: 5 Digitale Heizplatte (Stuart, Bibby Scientific Ltd., Staffordshire, UK) Temperatur: 50 °C
Detektion	TLC-Visualizer (CAMAG Chemie-Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG) Mit UV-Licht (Wellenlänge 366 nm) Mit Weißlicht (Auf-, Durch-, Auf- und Durchlicht)
Software	winCATS Version 1.4.4.6337

Derivatisierungsreagenzien:

Fluorescamin: Nach der chromatographischen Entwicklung wird die Platte ausreichend getrocknet und anschließend in eine Fluorescamin-Lösung getaucht (0.05 % in Aceton). Nach erneuter Trocknung der Platte erfolgt die Dokumentation mittels TLC-Visualizer mit UV-Licht (Wellenlänge: 366 nm).

Ninhydrin: Nach der chromatographischen Entwicklung wird die Platte ausreichend getrocknet und anschließend in Ninhydrin-Lösung getaucht (1 % in Pyridin/Eisessig, 5/1, v/v). Nach erneuter Trocknung der Platte wird diese bei 50 °C erhitzt bis violette Banden auf hellem Hintergrund deutlich erkennbar sind. Die Dokumentation erfolgt mittels TLC-Visualizer mit Weißlicht.

4.3.2 Charakterisierung der antigenen Eigenschaften mittels HPTLC-Immunfärbung

Die Charakterisierung der antigenen Eigenschaften der Derivate sowie Protein-Kontrollen (siehe **Kapitel 4.2**) erfolgt mittels HPTLC-Immunfärbung (HPTLC-IF). Die chromatographische Entwicklung der Platten/Folien erfolgt gemäß **Kapitel 4.3.1**. Für die HPTLC-IF wurde innerhalb einer Methodenentwicklung das folgende Versuchsprotokoll festgelegt.

Reagenzien:

PIBM-Lösung	0.5 g PIBM in 5 mL Chloroform lösen und mit n-Hexan auf 100 mL auffüllen
Kombi-Puffer	30.3 g Tris-Base 43.85 g NaCl 25 mL Tween 20 Ad 5 L mit bidest. Wasser
Umpufferungslösung	1.212 g Tris-Base in 1 L dest. Wasser, mit HCl auf pH 6.0 einstellen
Färbelösung 1 (frisch)	12 mg TMB 40 mg DONS In 4 mL Ethanol lösen Ad 5 mL Ethanol auffüllen
Färbelösung 2	4.7 g Citronensäure 7.26 g Dinatriumhydrogenphosphat Ad 500 mL bidest. Wasser, pH 5.0
Färbereagenz	5 mL Färbelösung 1 zu 15 mL Färbelösung 2 geben Vorsichtig schwenken bis sich die Trübung löst Kurz vor der Färbung 10 µL Wasserstoffperoxid (30 %) zugeben

4. Material und Methoden

Primäre Antikörper	Anti-Myoglobin (monoclonal aus Kanninchen) 1/2500 in Kombi-Puffer verdünnt
	Anti-Myoglobin (polyclonal aus Ziege) 1/12000 in Kombi-Puffer verdünnt
Sekundäre Antikörper	Anti-Kanninchen/HRP 1/35000 in Kombi-Puffer verdünnt
	Anti-Ziege/HRP 1/35000 in Kombi-Puffer verdünnt

Durchführung:

Nach der chromatographischen Trennung und ausreichender Trocknung der Platte wird die Kieselgelschicht in PIBM-Lösung stabilisiert. Dieser Schritt ist notwendig, um ein Ablösen der Schicht während der Behandlung mit Puffer zu vermeiden. Die Stabilisierung sowie alle weiteren Schritte der Immunfärbung werden auf einem Schüttler bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Platte wird zur Stabilisierung eine Minute in PIBM-Lösung getaucht und anschließend getrocknet. Die Plattenoberfläche wird im Anschluss zweimal je 15 Minuten mit Kombi-Puffer equilibriert. Dazu wird die Platte in ein inertes, flaches Gefäß gelegt und vollständig mit Kombi-Puffer bedeckt. Im nächsten Schritt erfolgt eine zweistündige Inkubation der Plattenoberfläche mit dem primären Antikörper. Danach wird die Platte dreimal je fünf Minuten mit Kombi-Puffer gewaschen. Der sekundäre Antikörper wird im Anschluss innerhalb einer einstündigen Inkubation aufgebracht. Nach drei weiteren fünfminütigen Waschschritten mit Kombi-Puffer wird die Platte eine Minute in Umpufferungslösung umpuffert. Anschließend wird die Platte in Färbelösung bis zur guten Sichtbarkeit der Banden gefärbt.

4.3.3 Charakterisierung der antimikrobiellen Eigenschaften mittels HPTLC-Bioautographie

Zur Betrachtung der antimikrobiellen Wirkung der Derivate sowie Protein-Kontrollen (siehe **Kapitel 4.2**) und der verwendeten phenolischen/verwandten Verbindungen (siehe **Kapitel 4.1.1**) wurde die HPTLC-Bioautographie durchgeführt. Zur Analyse wurde die *agar-overlay* Technik und die direkte Bioautographie gewählt (vgl. **Kapitel 2.2.1.4.1.1**). In einer Methodenentwicklung wurden folgende Parameter für die Durchführung festgelegt.

Reagenzien:

Natriumchlorid-Lösung	2.25 g Natriumchlorid in 250 mL bidest. Wasser lösen und autoklavieren
-----------------------	------------------------------------------------------------------------

4. Material und Methoden

Standard-I-Nähragar	18.5 g Standard-I-Nähragar in 500 mL bidest. Wasser lösen und anschließend autoklavieren Im abgekühlten, aber noch flüssigen Zustand (ca. 60 °C) 170 mg/L Ampicillin zugeben Aliquote von 30 mL in 50 mL-Falcons füllen und nach Aushärten des Agars bei 6-7 °C lagern
Nährmedium	10 g Caseinhydrolysat, 5 g Hefeextrakt und 5 g Natriumchlorid in 1 L bidest. Wasser lösen und anschließend autoklavieren Medium auf eine Temperatur von 60 °C abkühlen 170 mg/L Kanamycin und Erythromycin hinzupipettieren Nach Abkühlung bei 6-7 °C aufbewahren
MTT-Lösung	24 mg MTT in 30 mL bidest. Wasser lösen (Konzentration 0.8 mg/mL)

HPTLC-Agar-overlay

Durchführung:

Der HPTLC-Agar-overlay wurde in Anlehnung an Rahalison et al. (1991) durchgeführt. Die HPTLC-Platte wird, mit der Kieselgelschicht nach oben, möglichst mittig in einer Petrischale positioniert. Es werden etwa 4 mL Natriumchlorid-Lösung mit etwas Zellmaterial beimpft, wobei die einzustellende optische Dichte dieser Lösung zwischen 0.1 und 0.2 liegen sollte. Die Bestimmung der Zelldichte im Nährmedium erfolgt indirekt über die Trübungsmessung mit Hilfe eines Photometers. Dabei wird die optische Dichte (OD) der Suspension als Extinktion bei 600 nm gemessen und bei Bedarf durch Verdünnung oder Aufkonzentrierung der Lösung eingestellt. Parallel hierzu werden 30 mL des ausgehärteten Standard-I-Nähragars bei 100 °C für 30 Minuten in einem Wasserbad erhitzt und dadurch wieder verflüssigt. Danach wird der flüssige Agar auf einem Schüttler (unter Kreisbewegungen) bei einer Temperatur von 6 – 7 °C für 12 Minuten abgekühlt. Der noch flüssige, etwa 37 °C warme Agar wird schließlich mit 300µL der beimpften Natriumchlorid -Lösung versetzt, vorsichtig geschwenkt und die HPTLC-Platte damit überschichtet. Zur gleichmäßigen Verteilung des Agars über die HPTLC-Platte wird die Petrischale leicht geschwenkt, bis eine vollständige Bedeckung der Platte mit dem Agar erreicht ist. Nach Aushärtung des Agars wird dieser für drei Tage bei 37 °C inkubiert.

Zur Detektion des Zellwachstums erfolgt eine Färbung mit MTT-Lösung. Dafür wird die Lösung zunächst über den Agar gegossen und die Petrischale kurz geschwenkt. Anschließend wird dieselbe Lösung aus der einen Petrischale in die nächste überführt und erneut kurz geschwenkt. Der Vorgang wird mit allen vorliegenden Ansätzen wiederholt und die Lösung zum Schluss in ein Abfallgefäß entsorgt. Hiernach erfolgt eine erneute Inkubation von 4 h bei 37 °C.

4. Material und Methoden

Trenngelpuffer	181.771 g Tris-Base (1.5 M), mit HCl auf pH 8.8 einstellen 4 g SDS (0.4 %, w/v) ad 1000 mL dest. Wasser
Sammelgelpuffer	30.285 g Tris-Base (1.5 M), mit HCl auf pH 6.3 einstellen 2 g SDS (0.2 %, w/v) ad 1000 mL dest. Wasser
Laufpuffer	3.029 g Tris-Base (25 mM) pH 8.3 14.413 g Glycin (0.19 M) 1 g SDS (0.1 %, w/v) ad 1000 mL dest. Wasser
Probenpuffer	1.665 g Tris-HCl (0.42 M) 1.705 g Tris-Base (0.56 M) 2.12 g SDS (0.29 M) 0.015 g EDTA (2.05 mM) 10 g Glycerin (4.34 M) 6.25 mg Phenolrot (0.025 %, w/v) 18.75 mg CBB-G250 (0.075 %, w/v) in 25 mL dest. Wasser lösen 25 mL des obigen Puffers znd 0.771 g DTT (0.1 M) ad 50 mL dest. Wasser
Fixierlösung	15 mL Ethanol (96 %) und 5 mL Eisessig ad 50 mL dest. Wasser
Inkubationsstammlösung	68 g Natriumacetat in wenig dest. Wasser lösen, 300 mL Ethanol (96 %) hinzugeben und mit dest. Wasser ad 1 L auffüllen
Inkubationsgebrauchslösung	100 mg Natriumthiosulfat-Pentahydrat in 50 mL Inkubationsstammlösung vorlösen und anschließend 250 Glutardialdehyd (25 %) frisch dazugeben
Silbernitratgebrauchslösung	10 µL Formaldehyd frisch zu 50 mL Silbernitrat-Stammlösung geben
Entwickler-Stammlösung	25 g Natriumcarbonat in 1 L dest. Wasser lösen, mit Natriumhydroxid-Lösung auf pH 11.8 einstellen
Entwicklergebrauchslösung	10 µL Formaldehyd frisch zu 100 mL Entwickler-Stammlösung geben
Stopplösung	18.6 g EDTA in 1 L dest. Wasser lösen

4. Material und Methoden

Durchführung:

Zusammensetzung des Trenngels (12 %)

dest. Wasser	4.5 mL
Trenngelpuffer	2.5 mL
Acrylamid-Lösung	3.0 mL
TEMED-Lösung	5.0 µL
APS-Lösung	50 µL

Die Reagenzien zur Herstellung des Trenngels werden in ein 50-mL Falcon pipettiert und gut durchmischt. Etwa 3.5 mL des Trenngels werden zügig in die Gelgießapparatur gegossen. Das noch flüssige Trenngel wird mit 30 %-igem 2-Propanol überschichtet und bei Raumtemperatur für ca. 30 Minuten zur Polymerisation des Acrylamids stehen gelassen. Anschließend wird das 2-Propanol vollständig vom Trenngel entfernt und der Probenkamm eingesetzt.

Zusammensetzung des Sammelgels (8 %)

dest. Wasser	2.1 mL
Sammelgelpuffer	2.5 mL
Acrylamid-Lösung	0.4 mL
TEMED-Lösung	5.0 µL
APS-Lösung	50 µL

Die Reagenzien zur Herstellung des Sammelgels werden in ein 50-mL Falcon pipettiert und gut durchmischt. Das bereits polymerisierte Trenngel wird dann mit der Sammelgellösung überschichtet, sodass die Gelgießapparatur vollständig befüllt ist. Das Sammelgel wird zur Polymerisation des Acrylamids ungefähr 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. 50 µL Probe werden mit 50 µL Probenpuffer versetzt, gut durchmischt und mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Nach der vollständigen Polymerisation des Sammelgels werden die Gele in die Elektrophoresekammer eingesetzt, die Probenaschen markiert und das obere und untere Pufferreservoir mit Laufpuffer gefüllt. Nach Entfernen der Probenkämme werden die Taschen mit 5µL Probe sowie eine der Taschen mit 8 µL des Protein-Standards gefüllt. Die Elektrophoresekammer wird an die Spannungsquelle angeschlossen, wobei eine Stromstärke von 35 mA pro Gel angelegt wird. Die Elektrophorese ist dann beendet, wenn der Farbmarder des Probenpuffers die Gelunterkante erreicht hat.

Nach Entfernen des Gels aus der Elektrophoresekammer wird dieses aus der Gelgießvorrichtung gelöst und in ein mit Fixierlösung befülltes Reservoir überführt, in der es ungefähr 30 Minuten inkubiert wird. Im Anschluss wird die Fixierlösung vorsichtig verworfen und das Gel für weitere 30 Minuten mit

4. Material und Methoden

Inkubierlösung behandelt. Anschließend wird das Gel fünfmal für jeweils fünf Minuten mit dest. Wasser gewaschen und danach für 20 Minuten in die Silbernitratgebrauchslösung gegeben. Schließlich wird erneut für eine Minute mit dest. Wasser gewaschen. Daraufhin wird das Gel kurz in der Entwicklungsgebrauchslösung geschwenkt und diese Lösung verworfen. Schließlich wird das Gel mit dem Rest der Entwicklungsgebrauchslösung bis zur gewünschten Färbung behandelt. Ist die erforderliche Färbung der Banden erreicht, wird die Entwicklungsgebrauchslösung verworfen und das Gel für zehn Minuten in die Stopplösung gegeben. Bis zur Dokumentation kann das Gel über einen gewissen Zeitraum in dest. Wasser aufbewahrt werden.

Messparameter

Gelgieß-Apparatur	Multiple Gel Casters (Hoefler, Inc., San Francisco, CA, USA)
Spannungsquelle	PowerEase 500 Power Supply (Invitrogen life technologies, Carlsbad CA, USA)
Kammer	SE 250 Migthy SMALL II for 8 x 7 cm Gels, 500 V, 12 W, 45 °C (Hoefler, Inc., San Francisco, CA, USA)
Stromstärke	35 mA pro Gel
Dauer	90-120 Minuten
Sammelgel	8 %
Trenngel	12 %
Standard	INVITROGEN-Proteinstandard
	Insulin A-Kette 2.500 Da
	Insulin B-Kette 3.500 Da
	Aprotinin 6.000 Da
	Lysozym 14.400 Da
	Trypsin-Inhibitor 21.500 Da
	Carboanhydrase 31.000 Da
	Lactatdehydrogenase 36.500 Da
	Glutamindehydrogenase 55.400 Da
	Rinderserumalbumin 66.300 Da
	Phosphorylase B 97.400 Da
	β-Galactosidase 116.300 Da
	Myosin 200.000 Da
Dokumentation	Epson Image Scanner III Model EU-88 (GE Healthcare Bio-Sciences AB Uppsala, Schweden)

4.3.5 Bestimmung des Molekulargewichts mittels MALDI/TOF/MS

Die Bestimmung des Molekulargewichts der gemäß **Kapitel 4.2** hergestellten Derivate erfolgt massenspektrometrisch mittels MALDI/TOF/MS. Die Probenvorbereitung wird gemäß „*Bruker, MALDI preparation protocols - Life science (peptides, proteins, glycans, oligonucleotides)*“ Seite 13 bzw. 14 sowie bei der SA-Matrix gemäß Prigent et al., 2003 durchgeführt.

Reagenzien und Durchführung:

2,5-DHAP-Matrix	7.6 mg 2,5-DHAP in 375 μ L Ethanol lösen und anschließend 125 μ L einer Lösung bestehend aus 18 mg/mL DAC gelöst in Wasser hinzufügen 2 μ L der Probenlösung mit 2 μ L einer 2 %igen TFA -Lösung mischen und mit 2 μ L der Matrix-Lösung versetzen mittels einer Eppendorf-Pipette auf- und abpipettieren, bis zum Einsetzen der Kristallisation 0.5 μ L der Kristallsuspension auf ein Target gegeben und so zur Messung einsetzen
2,5-DHB-Matrix	20 mg 2,5-DHB in 1 mL TA30 (Acetonitril/Wasser 0.1 % TFA 3/7 v/v) lösen 2 μ L der Probenlösung mit 2 μ L Matrix-Lösung mischen 0.5 μ L dieses Gemisches auf das Target geben
SA- Double layer-Matrix	Matrix-Lösung I: gesättigte SA-Lösung in Ethanol Matrix-Lösung II: eine gesättigte SA-Lösung in Acetonitril/TFA 0.1% in Wasser (30/70, v/v) Matrix-Lösung I anschließend als eine dünne Matrixschicht auf das Target geben Matrix-Lösung II in gleichem Verhältnis mit der Probenlösung (je 2 μ L) mischen 0.5 μ L des Gemisches auf die Oberfläche der zuvor vorbereiteten Matrixschicht geben und so zur Messung einsetzen
SA-Matrix	10 mg SA in 1 mL Acetonitril/Wasser 0.3 % TFA (1/1, v/v) lösen 2 μ L der Probenlösung mit 2 μ L Matrix-Lösung mischen 0.5 μ L dieses Gemisches auf das Target geben
TFA	2 μ L der Probenlösung mit 2 μ L einer 2 %-igen TFA-Lösung mischen 0.5 μ L dieses Gemisches auf das Target geben
Ohne Matrix	0.5 μ L der Probe direkt auf das Target geben

4. Material und Methoden

auf eine Größe von 5 x 7.5 cm zugeschnitten werden. Zur Vorbereitung wird eine Glas-Tauchkammer (Maße: Höhe 10 cm, Breite: 10 cm) bis zum Rand mit Matrix-Lösung befüllt. Die Folie wird mit einer Pinzette gehalten und zügig und kurz in die Lösung getaucht und zunächst im Luftstrom des Abzugs getrocknet bis die Oberfläche matt erscheint. Anschließend wird die Folie sofort für 90 Sekunden mit einem Fön (unter Kaltluft) vertikal weitergetrocknet. Hiernach wird die Folie (im Vergleich zum ersten Tauchprozess um 180 °) gedreht und mit dem anderen Ende zügig und kurz in die Matrix getaucht. Zum Trocknen wird die Folie erneut zunächst im Luftstrom des Abzugs getrocknet bis die Oberfläche matt erscheint und danach sofort für 4 Minuten mit einem Fön (unter Kaltluft) vertikal weitergetrocknet. Abschließend wird die Folie in den TLC MALDI Adapter (BRUKER DALTONIK GmbH) eingebaut und zur Analyse eingesetzt.

Messparameter

Massenspektrometer	ultrafleXtreme (BRUKER DALTONIK GmbH)	
Laser	Smartbeam-II™	
Messmodus	Positiver Reflektormodus	
Massenbereich	<i>m/z</i> 10000-100000	
MS-Parameter	Start	5 mm
	Ende	70 mm
	Breite	6 mm
	Laser-	
	Schüsse/Rasterposition	200
	x-step	0.2 mm
	y-step	0.28 mm
aufsummierte <i>y-spots</i>	21	
Spektren pro Bahn	325	
Software	flexControl Version 3.3.108.0	
	flexAnalysis Version 3.3	
	TLC MALDI Version 1.0.49.0	
	Survey Viewer Version 1.1	

4.4 Charakterisierung der enzymatisch verdauten Derivate sowie Protein-Kontrollen

4.4.1 1D-HPTLC-Analyse der enzymatisch verdauten Derivate sowie Protein-Kontrollen

Die Änderung des Peptid-Profiles der verdauten Derivate sowie Protein-Kontrollen hinsichtlich Polarität, UV-Aktivität, Anzahl und Molekulargewicht wird mittels eindimensionaler HPTLC (1D-HPTLC) analysiert. Die Durchführung erfolgt gemäß Pasilis et al. (2008b).

Durchführung:

Messparameter

Stationäre Phase	HPTLC-Kieselgel-60-Aluminiumfolien oder -Glasplatten
Plattengröße	10 x 10 cm, 10 x 20 cm oder passend zugeschnitten
Vorkonditionierung	Einmal vorwaschen mit Methanol; 30 min bei 100 °C aktivieren
Mobile Phase	2-Butanol/Pyridin/Ammoniak (25 %)/Wasser (39/34/10/26, v/v/v/v)
Probenauftragung	ATS4 (CAMAG Chemie-Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG) Applikationsvolumen 10 µL Applikationsgeschwindigkeit 60 nL/s Sprühgas Stickstoff Applikationsposition x = 10 cm y = 10 cm Applikationstyp Bande (Länge = 6-7 mm) Spritze Hamilton Spritzenvolumen 25 µL
Entwicklung	AMD2 und Doppeltrogkammer mit Edelstahldeckel (CAMAG Chemie-Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG) Laufmittelfront 75 mm Dauer 80 Minuten
Derivatisierung	mit automatischer Tauchvorrichtung (CAMAG Chemie-Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG), Time: 1, Speed: 5 Digitale Heizplatte (Stuart, Bibby Scientific Ltd.) Temperatur: 50 °C
Detektion	TLC-Visualizer (CAMAG Chemie-Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG) mit UV-Licht (Wellenlänge 366 nm) mit Weißlicht (Auf-, Durch-, Auf- und Durchlicht)

4. Material und Methoden

Densitometrie TLC Wavelength Scanner 3 (CAMAG Chemie-Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG)

Underivatisiert

Scan Start-Position y	8 mm
Scan End-Position y	75 mm
Spalt-Dimension	6.00 x 0.45 mm, Micro
Scangeschwindigkeit	20 mm/sec
Datenauflösung	100 µm/Schritt
Wellenlänge	220 und 280 nm
Lampe	D ₂ & W
Mess-Typ	Remission
Mess-Modus	Absorption
Optischer Filter	Zweiter Ordnung

Nach Fluorescamin-Derivatisierung

Scan Start-Position y	8 mm
Scan End-Position y	75 mm
Spalt-Dimension	6.00 x 0.45 mm, Micro
Scangeschwindigkeit	20 mm/sec
Datenauflösung	100 µm/Schritt
Wellenlänge	366 nm
Lampe	D ₂ & W
Mess-Typ	Remission
Mess-Modus	Fluoreszenz
Optischer Filter	K400

Nach Ninhydrin-Derivatisierung

Scan Start-Position y	8 mm
Scan End-Position y	75 mm
Spalt-Dimension	6.00 x 0.45 mm, Micro
Scangeschwindigkeit	20 mm/sec
Datenauflösung	100 µm/Schritt
Wellenlänge	530 nm
Lampe	D ₂ & W
Mess-Typ	Remission
Mess-Modus	Absorption
Optischer Filter	Zweiter Ordnung

Software winCATS Version 1.4.4.6337

Derivatisierungsreagenzien:

Fluorescamin: siehe **Kapitel 4.3.1**

Ninhydrin: siehe **Kapitel 4.3.1**

4.4.2 2D-HPTLC-Analyse der enzymatisch verdauten Derivate sowie Protein-Kontrollen

Durch die zweidimensionale Entwicklung der HPTLC-Platten (2D-HPTLC) wird eine höhere Auflösung der Probentrennung erreicht. Um Peptide ähnlicher Polarität und ähnlichem Molekulargewichtes zu trennen, wird daher die zweidimensionale HPTLC-Analyse durchgeführt. Die Entwicklung der Platte in der ersten Dimension erfolgt nach (Pasilis et al. 2008b). Die mobile Phase für die zweite Dimension wurde innerhalb einer Methodenentwicklung festgelegt.

Durchführung:

Messparameter

Stationäre Phase	HPTLC-Kieselgel-60-Aluminiumfolien oder -Glasplatten	
Plattengröße	10 x 10 cm	
Vorkonditionierung	Einmal vorwaschen mit Methanol; 30 min bei 100 °C aktivieren	
Mobile Phase	1. Dimension: 2-Butanol/Pyridin/Ammoniak (25 %)/Wasser (39/34/10/26, v/v/v/v) 2. Dimension: 2-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (10/8/3/5, v/v/v/v)	
Probenauftragung	ATS4 (CAMAG Chemie-Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG)	
	Applikationsvolumen	10 µL
	Applikationsgeschwindigkeit	10 nL/s
	Sprühgas	Stickstoff
	Applikationsposition	x = 15 cm y = 15 cm
	Applikationstyp	Bande (Länge = 0 mm)
	Spritze	Hamilton
	Spritzenvolumen	25 µL
Entwicklung	AMD2 und Doppeltrogkammer mit Edelstahldeckel (CAMAG Chemie-Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG)	
	Laufmittelfront	75 mm
	Dauer	80 Minuten
Derivatisierung	mit automatischer Tauchvorrichtung (CAMAG Chemie-Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG), Time: 1, Speed: 5 Digitale Heizplatte (Stuart, Bibby Scientific ltd.) Temperatur: 50 °C	

4. Material und Methoden

Detektion	TLC-Visualizer (CAMAG Chemie-Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG) mit UV-Licht (Wellenlänge 366 nm) mit Weißlicht (Auf-, Durch-, Auf- und Durchlicht)
Densitometrie	TLC Wavelength Scanner 3 (CAMAG Chemie-Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG)
Software	winCATS Version 1.4.4.6337

Derivatisierungsreagenzien:

Fluorescamin: siehe **Kapitel 4.3.1**

Ninhydrin: siehe **Kapitel 4.3.1**

4.4.3 Softwaregesteuerte Analyse des zweidimensionalen Peptidprofils von enzymatisch verdauten Derivaten sowie Protein-Kontrollen

Wie in **Kapitel 4.4.2** beschrieben können die durch den enzymatischen Verdau entstandenen Peptide mittels 2D-HPTLC chromatographisch getrennt werden. Der Verdau stellt dabei eine komplexe Mischung aus Peptiden unterschiedlicher Polarität und Aminosäureanzahl dar. Die Auswertung dieser 2D-Chromatogramme stellt bisher eine Herausforderung dar, da die üblichen Evaluationsmöglichkeiten auf eine eindimensionale Trennung ausgelegt sind. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit versucht werden, eine üblicherweise für die Auswertung von zweidimensionalen Elektrophoresegelen angewendete Software (Image Master Platinum 2D, GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA, USA) auf die Auswertung von zweidimensionalen HPTLC-Chromatogrammen anzuwenden.

Zur softwaregesteuerten Analyse werden die Abbildungen der 2D-Chromatogramme detektiert mit UV-Licht (366 nm) nach Fluorescamin-Derivatisierung eingesetzt. Diese Abbildungen werden mit der Software GIMP 2 (<http://www.gimp.org/webmasters.html>) in der Farbe umgekehrt und dann in schwarz-weiß invertiert. Danach wird das Format der Bilder von JPEG auf TIFF mit Hilfe der Software ImageConverter (<http://image.online-convert.com/>) geändert. Diese Schritte sind notwendig, um die mit der Software winCATS (TLC Visualizer) erstellte Abbildung der HPTLC-Platte mit der Software Image Master Platinum 2D zu kompatibilisieren. Anschließend kann eine Auswertung der 2D Chromatogramme mit Hilfe der Software Image Master Platinum 2D erfolgen.

4.4.4 Analyse der enzymatisch verdauten Derivate und Protein-Kontrollen mittels HPTLC-DPPH-*assay* und HPTLC-ABTS-*assay*

In der HPTLC besteht die Möglichkeit Radikalfängereigenschaften von Testsubstanzen mit Hilfe einer postchromatographischen Derivatisierung zu detektieren. Üblicherweise wird zu diesem Zweck der HPTLC-DPPH-*assay* eingesetzt. In Anlehnung an den HPLC-ABTS-*assay* wurde innerhalb dieser Arbeit ein weiterer *assay* zu Bestimmung der Radikalfängereigenschaften, der HPTLC-ABTS-*assay*, etabliert (vgl. **Kapitel 2.2.1.4.1.2**). Der HPTLC-DPPH- und der HPTLC-ABTS-*assay* werden im Rahmen dieser Arbeit validiert und ggfs. auf die Analyse von enzymatisch verdauten Derivaten sowie Protein-Kontrollen eingesetzt (HPTLC-Analyse gemäß **Kapitel 4.4.1** und **4.4.2**).

Reagenzien:

ABTS-Lösung	Lösung 1 33 mg Kaliumperoxodisulfat in 50 mL dest. Wasser lösen ($c = 2.45 \text{ mmol/L}$); lichtgeschützt bei $8 \text{ }^\circ\text{C}$ Lösung 2 191.8 mg ABTS in einen 50-mL Messkolben einwiegen und mit dest. Wasser auf 50 mL auffüllen ($c = 7 \text{ mmol/L}$); lichtgeschützt bei $8 \text{ }^\circ\text{C}$ Lösung 1 und 2 in einem Mischungsverhältnis 1/1 mischen, 16 h lichtgeschützt bei Raumtemperatur lagern ($c_{\text{ABTS}} = 3,5 \text{ mmol/L}$) mit Methanol 1/5 auf 200 mL verdünnen und in eine lichtdicht-verschlossene Tauchkammer geben; Haltbarkeit der Lösung: 24 h (Messlösung)
DPPH-Lösung	0.2 g in 200 mL Methanol lösen
Kaffeensäure-Stammlösung	18 mg Kaffeensäure in 100 mL Methanol gelöst und 1/5 (v/v) in Methanol verdünnt ($c = 200 \text{ } \mu\text{mol/L}$)
Kaffeensäure-Messlösung	Kaffeensäure-Stammlösung 1/4 (v/v) in Methanol verdünnt ($c = 50 \text{ } \mu\text{mol/L}$)
Gallussäure-Stammlösung	17 mg Gallussäure in 100 mL Methanol gelöst und 1/5 (v/v) in Methanol verdünnt ($c = 200 \text{ } \mu\text{mol/L}$)
Gallussäure-Messlösung	Gallussäure-Stammlösung 1/4 (v/v) in Methanol verdünnt ($c = 50 \text{ } \mu\text{mol/L}$)
Ferulasäure-Stammlösung	19 mg Ferulasäure in 100 mL Methanol gelöst und 1/5 (v/v) in Methanol verdünnt ($c = 20 \text{ } \mu\text{mol/L}$)
Ferulasäure-Messlösung	Ferulasäure-Stammlösung 1/4 (v/v) in Methanol verdünnt ($c = 50 \text{ } \mu\text{mol/L}$)

4. Material und Methoden

Standard-Mix		komplett	ohne KS	ohne GS	Ohne FS
	KS-Stammlösung	100 µL	0 µL	100 µL	100 µL
	GS-Stammlösung	100 µL	100 µL	0 µL	100 µL
	FS-Stammlösung	100 µL	100 µL	100 µL	0 µL
	Methanol	100 µL	200 µL	200 µL	200 µL

Trolox-Stammlösung 25 mg in 100 mL Methanol (Konzentration = 1 mmol/L)

Trolox-Standardreihe	Standard	Konzentration [µmol/L]	Herstellung
	1	5	10 µL Stammlösung in 1.99 mL Methanol
	2	10	10 µL Stammlösung in 990 µL Methanol
	3	20	20 µL Stammlösung in 980 µL Methanol
	4	30	30 µL Stammlösung in 970 µL Methanol
	5	40	40 µL Stammlösung in 960 µL Methanol
	6	50	50 µL Stammlösung in 950 µL Methanol
	7	60	60 µL Stammlösung in 940 µL Methanol
	8	70	70 µL Stammlösung in 930 µL Methanol
	9	80	80 µL Stammlösung in 920 µL Methanol
	10	90	90 µL Stammlösung in 910 µL Methanol
	11	100	100 µL Stammlösung in 900 µL Methanol
	12	110	110 µL Stammlösung in 890 µL Methanol
	13	120	120 µL Stammlösung in 880 µL Methanol

Durchführung:

Messparameter zur Analyse der phenolischen Verbindungen

Stationäre Phase	HPTLC-Kieselgel-60-Glasplatten	
Plattengröße	10 x 20 cm	
Vorkonditionierung	Einmal vorwaschen mit Methanol; 30 min bei 100 °C aktivieren	
Mobile Phase	Toluol/Ethylacetat/Ameisensäure (5/4/1, v/v/v)	
Probenauftragung	ATS4 (CAMAG Chemie-Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG)	
	Applikationsvolumen	10 µL
	Applikationsgeschwindigkeit	60 nL/s
	Sprühgas	Stickstoff
	Applikationsposition	x = 15 cm y = 15 cm
	Applikationstyp	Bande (Länge = 6 mm)
	Spritze	Hamilton

4. Material und Methoden

	Spritzenvolumen	25 µL
Entwicklung	AMD2 und Doppeltrogkammer mit Edelstahldeckel (CAMAG Chemie-Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG)	
	Laufmittelfront	80 mm
	Dauer	Ca. 15 Minuten
Trocknung	Genau 10 Minuten bei Raumtemperatur	
Derivatisierung	<p>HPTLC-DPPH-<i>assay</i> Platte wird mit einer automatischen Tauchvorrichtung (CAMAG Chemie-Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG) in die DPPH-Lösung getaucht (Time = 1, Speed = 5); anschließende Lagerung genau 1 min im Dunkeln; danach genau 1 min bei 50 °C auf einer digitalen Heizplatte (Stuart, Bibby Scientific ltd.)</p> <p>HPTLC-ABTS-<i>assay</i> Platte wird mit einer automatischen Tauchvorrichtung (CAMAG Chemie-Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG) in die ABTS-Messlösung getaucht (Time = 1, Speed = 5); anschließende Trocknung genau 1 Minute bei 50 °C auf einer digitalen Heizplatte (Stuart)</p>	
Detektion	TLC-Visualizer (CAMAG Chemie-Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG) mit Weißlicht (Auf-, Durch-, Auf- und Durchlicht)	
Densitometrie	TLC Wavelength Scanner 3 (CAMAG Chemie-Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG)	
	Scan Start-Position y	5 mm
	Scan End-Position y	82 mm
	Spalt-Dimension	5.00 x 0.45 mm, Micro
	Scangeschwindigkeit	22 mm/sec
	Datenauflösung	100 µm/Schritt
	Wellenlänge	HPTLC-DPPH- <i>assay</i> 541 nm HPTLC-ABTS- <i>assay</i> 411 nm
	Lampe	D ₂ & W
	Mess-Typ	Remission
	Mess-Modus	Fluoreszenz
	Optischer Filter	K400
Software	winCATS Version 1.4.4.6337	

4.4.5 Analyse von Peptiden mittels HPTLC-ESI/MS

Eine Alternative zur klassischen, massenspektrometrischen Peptid-Analyse, z.B. mittels HPLC-ESI/MS, stellt die Kopplung von HPTLC und ESI/MS dar. Bei der HPTLC-ESI/MS handelt es sich um eine neue Methode, die im Vergleich zur HPLC-ESI/MS bisher nur selten eingesetzt wird. Um zunächst grundlegende Erkenntnisse über diese Analytik und ihre Leistungsfähigkeit im Vergleich zur etablierten HPLC-ESI/MS einzuschätzen wurde ein Methodenvergleich vorgenommen. Die chromatographische Trennung der Peptide erfolgt auf HPTLC-Kieselgel-Aluminiumfolien oder Glasplatten gemäß **Kapitel 4.4.1**. Die massenspektrometrische Analyse der entwickelten Chromatogramme erfolgt mit Hilfe des TLC-ESI/MS-*interface* (CAMAG Chemie-Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG).

Durchführung:

Zur Vorbereitung der HPTLC-Platte werden die zu untersuchenden *spots* auf der HPTLC-Oberfläche markiert. Dazu kann die Platte mit einer UV Hand-Lampe bei 366 nm beleuchtet und die zu erkennenden UV-aktiven *spots* mit einem Bleistift eingekreist werden. Eine weitere Möglichkeit zur *spot*-Markierung besteht darin, zwei identische Chromatogramme anzufertigen und eine Platte zunächst mit einem geeigneten Derivatisierungsreagenz zu derivatisieren. Anhand der Derivatisierung werden die Koordinaten der zu analysierenden *Spots* festgestellt und auf die für die HPTLC-ESI/MS-Analyse vorgesehene Platte übertragen. Ist die *spot*-Markierung erfolgt, wird die Platte mit Hilfe eines Licht-Fadenkreuzes unter dem Stempel des TLC-ESI/MS-*interface* (vgl. **Abbildung 2-25**) positioniert. Der Stempel wird anschließend pneumatisch auf die Oberfläche gesetzt, wobei die entsprechende Fläche der stationären Phase druckstabil abgeschlossen ist. Anschließend erfolgt die Extraktion und massenspektrometrische Detektion.

Messparameter

Pumpe	I-6200A, Intelligent pump (Merck Hitachi, Tokyo, Japan)
Elutionsmittel	Acetonitril/Wasser 0.1 % Ameisensäure (6/4 v/v)
Flussrate	0.25 mL/min
Interface	TLC-ESI/MS- <i>interface</i> , ovaler Stempel Ø 4 mm (CAMAG Chemie-Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG)
Detektion	Massenspektrometrisch

4. Material und Methoden

Applikationsvolumen	10 µL
Massenspektrometer	amaZon (BRUKER DALTONIK GmbH)
Messmodus	Positiv
Massenbereich	<i>m/z</i> 100-1500
Nebulizer Gas	35 psi
Dry gas	8.0 L/min
Dry heater	275 °C
Capillary Voltage	4.5 kV

4.4.6 Analyse von Peptiden mittels HPLC-ESI/MS

Um die Leistungsfähigkeit der HPTLC-ESI/MS Methode zur Analyse von Peptiden zu beurteilen, wurde vergleichend eine HPLC-ESI/MS-Analyse von Peptiden durchgeführt. Dabei wurde ein klassischer binärer Gradient aus Acetonitril und Wasser (jeweils mit 0.1 % FA) sowie eine klassische C₁₈-Phase zur chromatographischen Trennung eingesetzt. Zur massenspektrometrischen Detektion wurden zur HPTLC-ESI/MS Methode analoge Parameter gewählt.

Messparameter

Injektionssystem	WPS-3000TSL UltiMate 3000 Thermostatted Analytical Sampler UltiMate® 3000 Solvent Rack SRD-3200 with chemically-inert degasser with two channels
Pumpe	HPG-3200SD - UltiMate 3000 Binary Analytical Pump
Säulenkompartiment	TCC-3000SD Thermostatted Column Compartment
Detektor	MWD-3000 - UltiMate 3000 Multiple Wavelength Detector
Trennsäule	Nucleodur C ₁₈ HTec, 5 µm, 125 x 2 mm
Elutionsmethode	Binärer Gradient
Eluenten	A: 0.1 % FA in LC/MS-grade Wasser B: LC/MS-grade Acetonitril

4. Material und Methoden

Gradientenelution	Zeit [min]	A [%]	B [%]
	Initial	100	0
	5	100	0
	125	80	20
	127	80	20
	142	40	60
	157	100	0
	167	100	0
Temperatur	25 °C		
Flussrate	0.25 mL/min		
Detektion	mittels UV-Detektor bei 220 nm und massenspektrometrisch		
Injektionsvolumen	10 µL		
Massenspektrometer	amaZon (BRUKER DALTONIK GmbH)		
Messmodus	Positiv		
Massenbereich	<i>m/z</i> 100-1500		
Nebulizer Gas	35 psi		
Dry gas	8.0 L/min		
Dry heater	275 °C		
Capillary Voltage	4.5 kV		

4.4.7 Analyse der tryptisch verdauten Derivate sowie Protein-Kontrollen mittels HPTLC-DESI/MS

Eine weitere Alternative zur klassischen Peptid-Analyse mittels HPLC-MS stellt die Kopplung von HPTLC und DESI/MS dar. Diese Technik wurde bereits erfolgreich zur Identifikation von eindimensional und zweidimensional getrennten Peptiden auf HPTLC-Platten eingesetzt. Die Messungen mittels HPTLC-DESI/MS wurden im Rahmen einer Kooperation mit der *Organic and Biological Mass Spectrometry Group (Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN, USA)* durchgeführt. Die chromatographische Trennung der Peptide erfolgte auf HPTLC-Kieselgel-60-Glasplatten gemäß **Kapitel 4.4.1**. Die Analyse der entwickelten Chromatogramme erfolgt mit Hilfe des DESI/MS-*interface* (Prosolia, Inc., Indianapolis, IN, USA).

Durchführung:

Zunächst wird die HPTLC-Platte auf eine Höhe von 8 mm zugeschnitten (TLC Plate Cutter, CAMAG Chemie-Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG). Anschließend kann die zugeschnittene HPTLC-

4. Material und Methoden

Glasplatte in die dafür vorgesehene Halterung eingebaut werden. Die DESI-Quelle wird etwas unterhalb der Applikationszone positioniert und anschließend mit einer konstanten Geschwindigkeit von 100 $\mu\text{m/s}$ über die Plattenoberfläche in Richtung der Laufmittelfront bewegt (vgl. **Abbildung 2-26**). Während dieser Zeit erfolgt die permanente Aquisition von Massenspektren.

Messparameter

DESI-Quelle	Omni Spray Ion source 2D, Prosolia Inc.
Winkel ESI-Emitter zu Oberfläche	55 °
Abstand ESI-Emitter zu Oberfläche	2 mm
Abstand ESI-Emitter zu MS-Einlass	4 mm
Winkel MS-Einlass zu Oberfläche	10 °
Elutionsmittel	Acetonitril/Wasser 0.1 % Ameisensäure (9/1 v/v)
Flussrate	2 $\mu\text{L/min}$
Massenspektrometer	LTQ XL (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
Messmodus	Positiv
Massenbereich	m/z 100-1500
Nebulizer Gas	170 psi
Dry heater	350 °C
Capillary Voltage	4.5 kV
Bewegung der HPTLC-Platte	Konstante Geschwindigkeit, 100 $\mu\text{m/s}$
Software	Omni Spray 2D™ Version 1.2.4.0 LTQ Tune Plus Version 2.6.0.1032 Thermo Xcalibur 2.1.0.1139

4.4.8 Analyse der tryptisch verdauten Derivate und Protein-Kontrollen mittels HPTLC-MALDI/TOF/MS

Eine weitere Alternative zur klassischen Peptid-Analyse mittels HPLC-ESI/MS stellt die Kopplung von HPTLC und MALDI/TOF/MS dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die HPTLC-MALDI/TOF/MS-Analyse für ausgewählte enzymtisch verdaute Derivate sowie Protein-Kontrollen eingesetzt. Die chromatographische Trennung der Peptide erfolgte auf HPTLC-Kieselgel-Aluminiumfolien gemäß **Kapitel 4.4.1**. Die Vorbereitung der entwickelten Folie für die HPTLC-MALDI/TOF/MS Messung erfolgte gemäß **Kapitel 4.3.6**.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Methodenentwicklungen zur Charakterisierung der Phenol-Protein-Derivate

5.1.1 1D- und 2D-HPTLC-Analyse zur chromatographischen Trennung von Peptiden und Proteinen

Zur Identifikation von Proteinen und eventuell vorhandenen posttranslationalen Modifikationen (PTM) bedarf es einer hochauflösenden Analytik. Zur Vereinfachung erfolgt dazu meist eine Spaltung der Proteinmoleküle in Peptide. Nach enzymatischer oder saurer Hydrolyse kann die Trennung der Peptide mittels RP-HPLC erfolgen. Zur eindeutigen Identifikation erfolgt im Anschluss an die chromatographische Trennung eine massenspektrometrische Detektion. Neben der HPLC eignet sich auch die HPTLC zur Analyse von Peptidprofilen (*peptide mapping*), da hier eine mit der HPLC vergleichbare Trennung von Peptiden erreicht werden kann, die zusätzlich durch eine 2D-Entwicklung unterstützt wird (Pasilis et al. 2008a; Pasilis et al. 2008b). Die Kopplung der HPTLC zur Massenspektrometrie eröffnet ein breites Feld an neuen Peptidinformationen (Morlock und Schwack 2010a).

Die posttranslationale Modifikation von Proteinen mit phenolischen und verwandten Verbindungen führt zu einer Veränderung des hydrophilen/hydrophoben Charakters. Nach einem enzymatischen Verdau wirken sich diese Änderungen folglich auch auf die modifizierten Peptide aus. Um diese Veränderungen zu analysieren, werden sowohl die unverdauten als auch verdauten Phenol-Protein-Derivate mittels HPTLC untersucht. Dabei dient die 1D-HPTLC als *screening* Methode um zu prüfen, inwieweit sich eine gebundene phenolische/verwandte Verbindung auf die hydrophoben/hydrophilen Eigenschaften des Phenol-Protein-Derivates auswirkt. Daneben erlauben unterschiedliche Detektionen (Weißlicht, UV-Licht, Derivatisierungsreagenzien) eine Aussage über Einflüsse auf die Farbigkeit, UV-Aktivität und Art der Aminosäureseitenketten (Reaktionsstellen der Derivatisierungsreagenzien). Der Einsatz der 2D-HPTLC ermöglicht zusätzlich eine höhere Auflösung, welche im Falle der Peptid-Analyse von großer Bedeutung ist.

5.1.1.1 Auswahl der geeigneten mobilen und stationären Phase für die 1D- und 2D-HPTLC Analyse

Die Auswahl einer geeigneten mobilen und stationären Phase ist in der HPTLC von besonderer Bedeutung, da diese das Trennergebnis maßgeblich beeinflussen. Zur Trennung von Peptiden und Proteinen mittels HPTLC haben sich Kieselgel- und Cellulose-Schichten etabliert, aber auch RP-Kieselgel und Sephadex finden Einsatz (Bhushan et al. 1989). Die Verwendung von Sephadex-Schichten bietet sich vor allem zur Analyse von Proteinen hohen Molekulargewichtes an, da diese aufgrund ihrer

Größe und/oder Polarität nur schlecht oder garnicht mit der mobilen Phase in einer Kieselgelschicht transportiert werden. Mittlerweile sind speziell für die Peptid-/Proteintrennung ausgelegte Schichten kommerziell erhältlich (HPTLC ProteoChrom[®], Merck KGaA).

Innerhalb dieser Arbeit wurden vor allem HPTLC-Kieselgel-60-Glasplatten (Merck KGaA) zur Trennung von Peptiden und Proteinen eingesetzt. Im Vergleich zu den genannten Platten zeigten TLC-Kieselgel-60-Glasplatten (Merck KGaA) eine wesentlich geringere Trennleistung. Die hohe Trennleistung der HPTLC-Platten wird im Wesentlichen durch die kleinere Partikelgröße, eine engere Partikelgrößenverteilung sowie eine geringere Schichtdicke (vgl. **Kapitel 2.2.1.1**) erreicht. Vergleichbare Schichten anderer Hersteller zeigten unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen wesentlich schlechtere Trennergebnisse und wurden daher nicht zur Analyse eingesetzt.

HPTLC-Aluminiumfolien enthalten im Vergleich zu HPTLC-Glasplatten einen höheren Anteil an bindenden Substanzen. Auf diese Weise kann die durch die Aluminiumfolie gegebene Flexibilität ohne ein Brechen der Schicht bzw. Ablösen der Schicht von der Aluminiumfolie gewährleistet werden. In ihrer Trennleistung wurden in Bezug auf Peptide und Proteine keine Unterschiede zwischen Aluminiumfolien und Glasplatten festgestellt. Allerdings eigneten sich die Glasplatten aufgrund einer höheren Stabilität und damit verbundenen Robustheit besser in der Handhabung.

Die speziell zur Peptid-/Protein-Analyse angebotenen HPTLC-ProteoChrom[®]-Kieselgel-Glasplatten und Cellulose-Aluminiumfolien zeigten im Vergleich zu den analogen HPTLC Ausführungen eine bessere Trennleistung, welche durch die erhöhte Reinheit, die aufgrund eines verbesserten Herstellungsprozesses sowie einer extra geringen Schichtdicke (100 µm, Merck (2012)), erreicht wird.

Die Verwendung von 2-Butanol/Pyridin/Ammoniak(25 %)/Wasser in einem Mischungsverhältnis von 39/34/10/26 (v/v/v/v) (Pasilis et al. 2008b) erwies sich sowohl für die Peptid- als auch für die Proteintrennung auf HPTLC-Kieselgel-60- und HPTLC-Cellulose-Schichten als geeignet. Zur 1D-Trennung von Peptiden und Proteinen auf HPTLC-RP-Kieselgel (RP-8 und RP-18) erwies sich ein Gemisch aus Acetonitril und Wasser (0.8 % FA) im Verhältnis (4/6) für Peptide und im Verhältnis 6/4 (v/v) und TFA (7.5 %) zur Protein-Analyse als geeignet.

Um eine bessere Auflösung für das *peptide/protein mapping* zu erhalten, bietet es sich an, eine zweidimensionale Trennung durchzuführen (Bhushan et al. 1989). Die in der Literatur beschriebene zweidimensionale Trennung von Peptiden auf einer HPTLC-Cellulose-Schicht (Pasilis et al. 2008a)

wurde innerhalb dieser Arbeit auf eine HPTLC-Kieselgel-Schicht übertragen. Dazu wurde in der ersten Dimension eine mobile Phase bestehend aus 2-Butanol/Pyridin/Ammoniak (25 %)/Wasser (39/34/10/26, v/v/v/v) und in der zweiten Dimension eine mobile Phase bestehend aus 2-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (45/30/9/36, v/v/v/v) verwendet. Da dieses Laufmittelsystem in der zweiten Dimension zu ungenügenden Trennergebnissen führte, wurde die Zusammensetzung variiert und schließlich auf ein Mischungsverhältnis von 10/8/3/5 (v/v/v/v) eingestellt. Generell unterscheidet sich die mobile Phase der ersten und der zweiten Dimension nur in einer Komponente (1D: Ammoniak (25 %), 2D: Eisessig). Aufgrund dessen beruht die Trennung auf den unterschiedlichen pI-Werten der Peptide. Neben dem gewählten Trennsystem ist allerdings durchaus eine vollständig andere Zusammensetzung der mobilen Phase zur zweidimensionalen Trennung denkbar. Daher wurde diesbezüglich eine Methodenentwicklung durchgeführt, die in **Kapitel 5.1.1.4** beschrieben wird.

5.1.1.2 Festlegung der Bedingungen des tryptischen Verdau

Das traditionelle Protokoll zur Durchführung eines tryptischen Verdau beinhaltet die Verwendung von Harnstoff, DTT und Iodacetamid. Es hat sich gezeigt, dass diese Substanzen die chromatographische Trennung mittels HPTLC beeinflussen und nach erfolgter Entwicklung sichtbar bleiben. Die durch diese Substanzen ausgelösten Störungen führen daher zu einer Verschlechterung der Trennleistung. Eine Aufreinigung der Peptide bei der Verwendung von Harnstoff, DTT und Iodacetamid ist daher zwingend notwendig. Mittlerweile hat sich zur Aufreinigung von Peptiden nach dem tryptischen Verdau die Verwendung von sog. „Ziptips“ (Pipettenspitzen mit einem speziellen Filter aus C₁₈ Material) etabliert. Dabei binden die Peptide zunächst an die C₁₈-Phase, werden von Störsubstanzen befreit und anschließend eluiert. Durch diesen Aufreinigungsschritt kommt es allerdings zu einer Konzentrationsverminderung. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass sich die Modifikation der Proteine mit phenolischen und verwandten Verbindungen auf den hydrophilen/hydrophoben Charakter der Peptide auswirken kann. Unklar ist bisher, wie sich modifizierte Peptide bei einer solchen Peptidreinigung verhalten, d.h. ob es zu einer Retention des modifizierten Peptides an die C₁₈-Phase kommt.

Um die Störung der chromatographischen Trennung (z.B. durch Harnstoff etc.) bzw. die Diskriminierung von modifizierten Peptiden durch einen Aufreinigungsschritt zu vermeiden, wurde ein vergleichsweise einfacher Reaktionsansatz für den enzymatischen Verdau gewählt (vgl. **Kapitel 4.2.3**), der sich im Wesentlichen nur aus Protein, Enzym und 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer zusammensetzt.

5. Ergebnisse und Diskussion

Zunächst erfolgte die Optimierung des Trypsin/Protein-Verhältnisses, welche dazu diente eine möglichst hohe Konzentration an Peptiden zu erzeugen ohne dabei die HPTLC-Analyse durch die tryptische Autolyse zu stören. Als Modellprotein wurde Lysozym verwendet. Es stellte sich heraus, dass mit einem Trypsin/Protein-Verhältnis von 100:6 das beste Ergebnis erzielt werden konnte. Daher wurde dieses Trypsin/Protein-Verhältnis im Rahmen dieser Arbeit für den Proteinverdau eingesetzt.

Des Weiteren wurde die Notwendigkeit der Verwendung des Ammoniumhydrogencarbonat-Puffers (25 mM) betrachtet. Dazu wurde die Verdaubarkeit der Proteine unter Verwendung des Puffers und unter Verwendung von bidest. Wasser getestet. In **Tabelle 5-1** sind die Ergebnisse dieser Untersuchung dargestellt.

Tabelle 5-1. Vergleich der Verdaubarkeit verschiedener Proteine in bidest. Wasser und 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer. (+) gute Verdaubarkeit. (-) schlechte Verdaubarkeit.

Protein	Bidest. Wasser	25 mM Ammoniumhydrogencarbonat
Lysozym	-	+
Myoglobin	-	+
Casein (Gemisch)	+	+
BSA	+	+
α -Casein	+	+
β -Casein	+	+
α -Lactalbumin	+	+
β -Lactoglobulin	+	+

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten, dass die Verwendung von Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (25 mM) generell besser für den Proteinverdau geeignet ist. Daher wurde Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (25 mM) im Rahmen dieser Arbeit als Lösungsmittel für die Proteine und deren Derivate eingesetzt.

5.1.1.3 Analyse der Peptide tryptisch verdauter Proteine

Des Weiteren sollte überprüft werden, wie viel Protein zu einem enzymatischen Verdau eingesetzt werden muss, um eine Detektierbarkeit der Peptide mittels UV-Licht sowie Weißlicht nach Ninhydrin-Derivatisierung zu gewährleisten. In **Tabelle 5-2** sind die Ergebnisse dieser Untersuchung aufgeführt.

Tabelle 5-2. Mindestmenge an Protein, die eingesetzt werden muss, um eine Detektion unter den gegebenen Bedingungen (UV- bzw. Weißlicht nach Ninhydrin-Derivatisierung) zu ermöglichen.

Protein	Konzentration [mg/mL]	
	UV-Licht, underivatisiert	Weißlicht, Ninhydrin
Lysozym	0.3	2
Myoglobin	0.5	0.5
Casein (Gemisch)	0.2	0.3
BSA	0.4	0.3
α -Casein	0.2	0.3
β -Casein	0.2	0.2
α -Lactalbumin	0.1	0.2
β -Lactoglobulin	0.2	0.3

5.1.1.4 Optimierung der mobilen Phase im zweidimensionalen Trennsystem

Um eine bessere Auflösung für das *peptide/protein mapping* zu erhalten, bietet es sich an eine zweidimensionale Trennung durchzuführen. Generell wurde in dieser Arbeit ein zweidimensionales Trennsystem bestehend aus 2-Butanol/Pyridin/Ammoniak (25 %)/Wasser (39/34/10/26, v/v/v/v) in der ersten und 2-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (10/8/3/5, v/v/v/v) in der zweiten Dimension eingesetzt. In **Abbildung 5-1** sind die 2D-HPTLC-Ergebnisse der Peptidprofile der in dieser Arbeit verwendeten Modellproteine (Myoglobin, Casein, Ovalbumin, Lysozym) nach einem tryptischen Verdau dargestellt (vgl. **Kapitel 5.1.1.1**). Die Trennung erfolgte auf den speziell für die Peptidtrennung entwickelten HPTLC-ProteoChrom[®]-Kieselgel-Glasplatten und den traditionellen HPTLC-Kieselgel-Glasplatten. Durch diesen Vergleich der stationären Phasen sollte untersucht werden, inwieweit ein Einfluss auf das Ergebnis der 2D-HPTLC ausgeübt wird. Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, dass die HPTLC-ProteoChrom[®]- und die HPTLC-Kieselgel-Glasplatten eine ähnliche chromatografische Trennung der Peptide erzielen. Die Analyse mit der ProteoChrom[®]-Schicht zeigt bei allen Proteinen eine geringere Intensität der Peptid-*spots* nach Fluorescamin-Derivatisierung. Die Trennleistung ist bei beiden Schichten vergleichbar. Insgesamt zeigen die traditionellen HPTLC-Kieselgel-Glasplatten demnach ein zu den HPTLC-ProteoChrom[®]-Glasplatten vergleichbares Ergebnis.

Betrachtet man die Trennung der Peptide in jeder Dimension einzeln, wird deutlich, dass die Trennung in der zweiten Dimension über einen weiteren Bereich der Platte erfolgt als die Trennung in der ersten Dimension. Daher sollte das Laufmittel in der ersten Dimension durch aus der Literatur entnommene, bereits etablierte Laufmittel ersetzt und bezüglich der Trennung beurteilt werden. Ein weiterer, wichtiger Parameter bezüglich der zweidimensionalen Trennung ist die Entwicklungsdauer. Die Entwicklungszeit

5. Ergebnisse und Diskussion

beim bisherigen Laufmittelsystem betrug ca. 102 min. Durch den Einsatz eines anderen Laufmittels in der ersten Dimension sollte diese Entwicklungsdauer verkürzt werden.

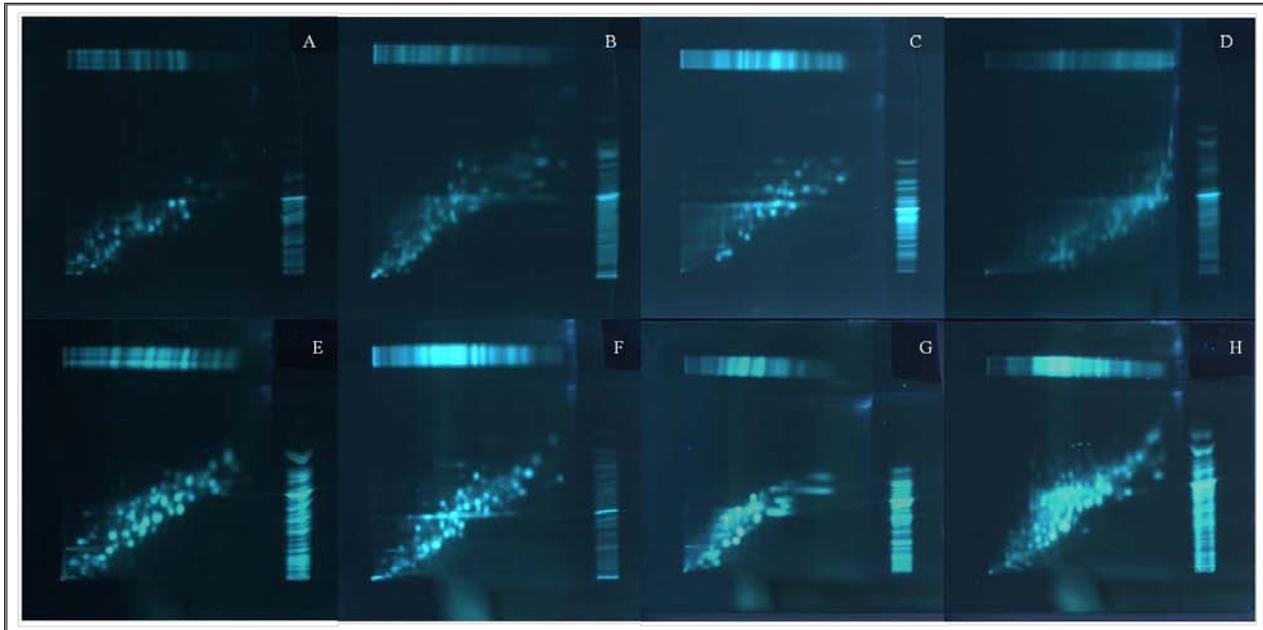


Abbildung 5-1. 2D-HPTLC-Analyse der tryptisch verdauten Modellproteine.

Derivatisierung mit Fluorescamin und Detektion bei UV 366 nm. A, B, C, D: ProteoChrom[®]-Kieselgel-60-Glasplatten. D, E, F, G: HPTLC-Kieselgel-60-Glasplatten. LM 1D: 2-Butanol/Pyridin/Ammoniak (25%)/Wasser (39/34/10/26, v/v/v/v). LM 2D: 2-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (10/8/3/5, v/v/v/v). A, E [Myoglobin]. B, F [Casein]. C, G [Lysozym]. D, H [Ovalbumin].

Tabelle 5-3 gibt eine Übersicht über die für die Optimierung verwendeten Laufmittel (Sherma und Fried 2003). Diese Laufmittel wurden für die Trennung in der ersten Dimension eingesetzt. Als mobile Phase in der zweiten Dimension diente das bereits beschriebene Gemisch aus 2-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (10/8/3/5, v/v/v/v).

Tabelle 5-3. Übersicht über die für die Optimierung verwendeten Laufmittel (Sherma und Fried 2003).

Bezeichnung	Laufmittelsystem in der ersten Dimension	Entwicklungszeit [min]
LM1	2-Butanol, Pyridin, Ammoniak (25 %), Wasser (39/34/10/26)	102
LM2	Chloroform, Methanol (9/1)	39
LM3	Chloroform, Methanol, Wasser (68/25/4)	46
LM4	0.5 M Natriumchloridlösung	32
LM5	Acetonitril, Wasser (3/7)	45
LM6	Acetonitril, Wasser, Methanol (5/3/2)	59
LM7	2-Propanol, 1 M HCl (3/1)	239
LM8	Ethanol (99.8 %), 0.1 M NaCl (1/1)	104
LM9	Acetonitril, Wasser, Methanol (4/1/1)	60
LM10	Ethanol (99.8 %), 0.1 M HCl (1/1)	104
LM11	2-Butanol, Aceton, Eisessig, Ammoniak (5 %), Wasser (9/3/2/2/4)	121
LM12	2-Propanol, Butanon, 1 M HCl (2/3/1)	134
LM13	0.5 M HCl, Ethanol, Aceton (5/3/0.5)	132
LM14	2-Propanol, Wasser, Ammoniak (3/0.5/0.5)	155
LM15	2-Butanol, Butanon, Wasser, Ammoniak (25 %) (80/5/10/10)	66
LM16	Aceton, Methanol, Ammoniak (5 %) (3/1/1)	48
LM17	Ethylacetat, Pyridin, Eisessig, Wasser (20/6/4/4)	49
LM18	Chloroform, Aceton (5/1)	50
LM19	Ethylacetat, Wasser, Ameisensäure (8/1/1)	50
LM20	Ethylacetat, Pyridin, Aceton, Wasser (20/5/11/3)	73

alle Angaben sind in Volumenverhältnissen angegeben

Bei der Untersuchung der in **Tabelle 5-3** aufgeführten Laufmittel zeigten die Laufmittel 6 und 19 eine gute Trennung in der ersten Dimension. In **Abbildung 5-2**, **Abbildung 5-3** und **Abbildung 5-4** sind die Ergebnisse der 2D-HPTLC für die tryptisch verdauten Proteine α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin und Insulin dargestellt. Dabei wurde die HPTLC-Trennung mit dem Laufmittel 1 (siehe **Tabelle 5-3**) als Referenz betrachtet.

Betrachtet man die Ergebnisse für α -Lactalbumin (siehe **Abbildung 5-2**) wird deutlich, dass durch die Verwendung von Laufmittel 6 eine wesentlich bessere Trennung in der ersten Dimension erfolgt ist (siehe **Abbildung 5-2 A** und **D** im Vergleich zu **B** und **E**). Die Trennung mit Laufmittel 6 erfolgte über die gesamte Laufstrecke und lieferte ein gut getrenntes Peptidprofil. Auch innerhalb dieser Untersuchung wurden HPTLC-ProteoChrom[®]- und HPTLC-Kieselgel-Glasplatten eingesetzt. Vergleicht man die Trennung der Peptide mit Laufmittel 6 auf der ProteoChrom[®]-Schicht mit der Trennung auf der traditionellen HPTLC-Schicht zeigt die ProteoChrom[®]-Schicht ein besseres Trennergebnis (siehe **Abbildung 5-2 B** und **E**). Die Peptid-*spots* sind besser getrennt und schärfer voneinander abgegrenzt. Im Gegensatz dazu ist die Trennung der Peptide bei der Verwendung von Laufmittel Nummer 19 (siehe **Abbildung 5-2 C** und **F**) im Vergleich zu der Verwendung des basischen Laufmittels (LM1, siehe **Abbildung 5-2 A** und **D**) und des Laufmittels 6 (siehe **Abbildung 5-2 B** und **E**) wesentlich schlechter.

Die Ergebnisse der Untersuchung von β -Lactoglobulin (siehe **Abbildung 5-3**) zeigen ein anderes Resultat. Die Verwendung des basischen Laufmittels (LM1) liefert in Bezug auf die Trennung der Peptide von β -Lactoglobulin das beste Trennergebnis (siehe **Abbildung 5-3 A** und **D**). Die Verwendung der Laufmittel 6 und Laufmittel 19 in der ersten Dimension hat zu keiner verbesserten Trennung geführt (siehe **Abbildung 5-3 B**, **E**, **C** und **F**). Interessanterweise scheint auch bei der Trennung der Peptide von β -Lactoglobulin mit Laufmittel 6 ein Unterschied in der Trennung zwischen ProteoChrom[®]- und üblichen HPTLC-Schichten zu bestehen (siehe **Abbildung 5-3 B** und **E**).

Ein zu den Ergebnissen der Untersuchung von β -Lactoglobulin ähnliches Ergebnis zeigt die Untersuchung von Insulin (siehe **Abbildung 5-4**). Die Verwendung des basischen Laufmittels (LM1) liefert in Bezug auf die Trennung der Insulinpeptide das beste Trennergebnis (siehe **Abbildung 5-4 A** und **D**). Die Verwendung der Laufmittel 6 und 19 in der ersten Dimension hat zu keiner verbesserten Trennung geführt (siehe **Abbildung 5-4 B**, **E**, **C** und **F**).

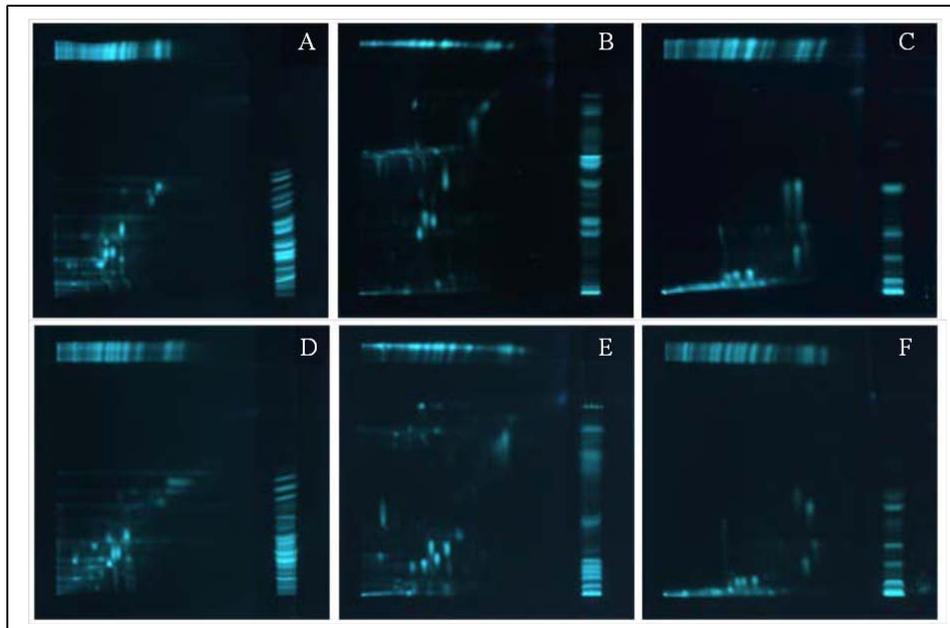


Abbildung 5-2. 2D-HPTLC-Analyse von tryptisch verdautem α -Lactalbumin. Derivatisierung mit Fluorescamin und Detektion bei UV 366 nm. A, B, C: HPTLC-Kieselgel-60-Glasplatten. D, E, F: HPTLC-ProteoChrom[®]-Kieselgel-60-Glasplatten. LM 2D: 2-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (10/8/3/5, v/v/v/v). LM 1D: A und D [LM1], B und E [LM6], C und F [LM19].

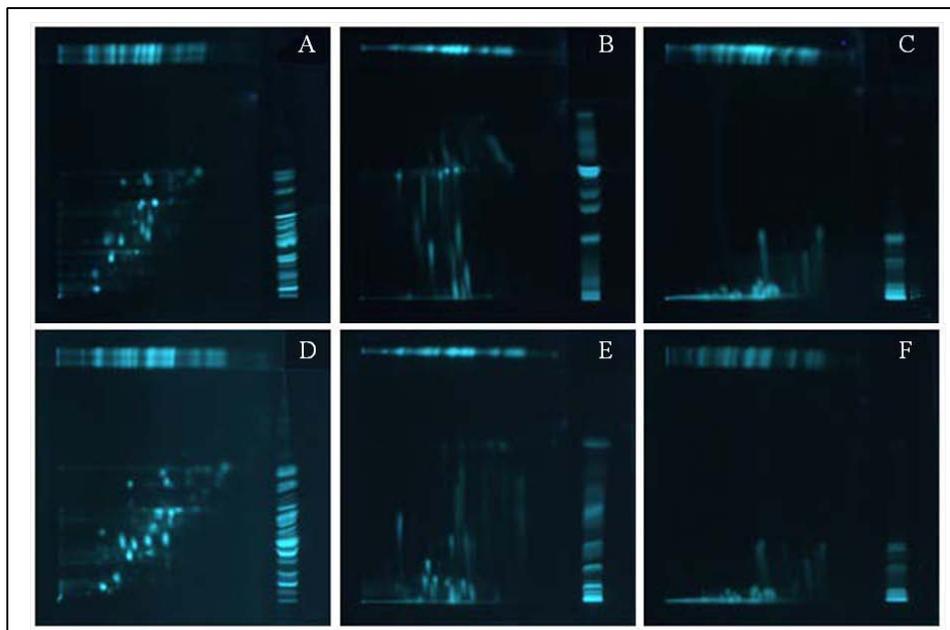


Abbildung 5-3. 2D-HPTLC-Analyse von tryptisch verdautem β -Lactoglobulin. Derivatisierung mit Fluorescamin und Detektion bei UV 366 nm. A, B, C: HPTLC-Kieselgel-60-Glasplatten. D, E, F: HPTLC-ProteoChrom[®]-Kieselgel-60-Glasplatten. LM 2D: 2-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (10/8/3/5, v/v/v/v). LM 1D: A und D [LM1], B und E [LM6], C und F [LM19].

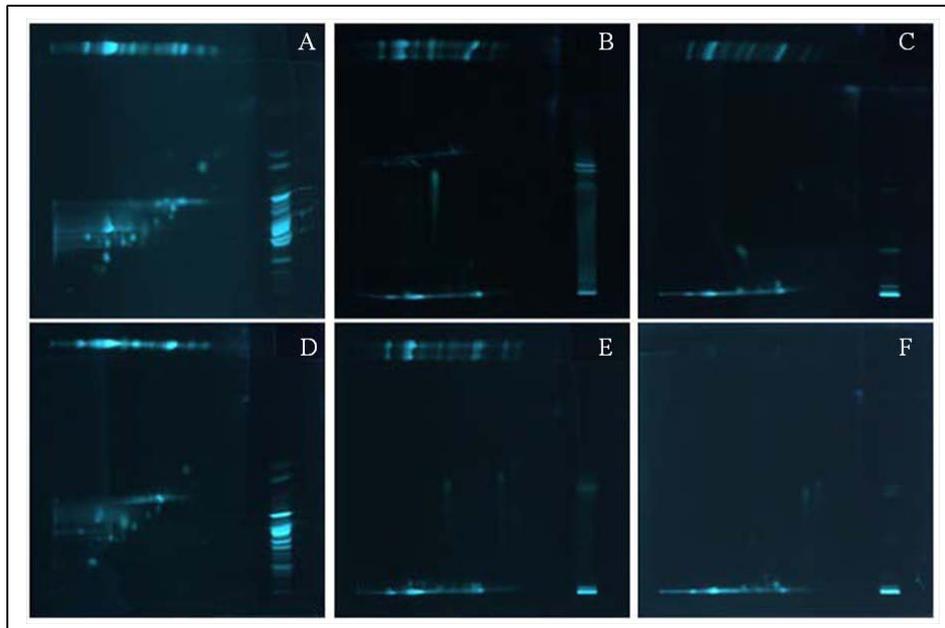


Abbildung 5-4. 2D-HPTLC-Analyse von tryptisch verdautem Insulin.

Derivatisierung mit Fluorescamin und Detektion bei UV 366 nm. A, B, C: HPTLC-Kieselgel-60-Glasplatten. D, E, F: HPTLC-ProteoChrom®-Kieselgel-60-Glasplatten. LM 2D: 2-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (10/8/3/5, v/v/v/v). LM 1D: A und D [LM1], B und E [LM6], C und F [LM19].

Die Ergebnisse der Optimierung der mobilen Phase für das 2D-Trennsystem zeigen, dass es kein auf alle tryptisch verdauten Proteine anwendbares Laufmittelsystem gibt, das für alle Peptide ein gutes Trennergebnis liefert. Peptide sind in ihren Eigenschaften (Molekulargewicht und Polarität u.v.m.) sehr divers. Daher ist es nötig zu untersuchen, welches Laufmittelsystem bei der Analyse eines tryptisch verdauten Proteins am besten geeignet ist. Wie am Beispiel des α -Lactalbumins gezeigt (siehe **Abbildung 5-2 E**), kann auch die stationäre Phase entscheidend zur Verbesserung der Trennleistung beitragen.

5.1.2 Softwaregesteuerte Analyse des zweidimensionalen Peptidprofils von enzymatisch verdauten Proteinen

Wie bereits in **Kapitel 5.1.1.4** gezeigt, kann mit einer zweidimensionalen HPTLC-Trennung eine bessere Auflösung für das *peptide/protein mapping* erreicht werden. Die Auswertung dieser zweidimensionalen Chromatogramme stellt allerdings bisher eine Herausforderung dar, da die üblichen Evaluationsmöglichkeiten für eine eindimensionale Trennung entwickelt wurden. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit versucht werden, eine üblicherweise für die Auswertung von zweidimensionalen

5. Ergebnisse und Diskussion

Elektrophoresegelele angewendete Software (Image Master Platinum 2D, GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA, USA) auf die Auswertung von zweidimensionalen HPTLC-Chromatogrammen anzuwenden (vgl. **Kapitel 4.4.3**).

Abbildung 5-5 zeigt die softwaregesteuerte Analyse eines tryptischen Verdau von Myoglobin. Als Vorlage für die gezeigte Abbildung diente die Detektion bei UV 366 nm nach Derivatisierung mit Fluorescamin (siehe **Abbildung 5-1 E**). Die roten Punkte markieren die von der Software erkannten Peptid-*spots*. Die Ziffern 1, 2, 3, 4 und 5 markieren Referenzpunkte die bei einem *overlay* von zwei Chromatogrammen zur Positionierung herangezogen werden.

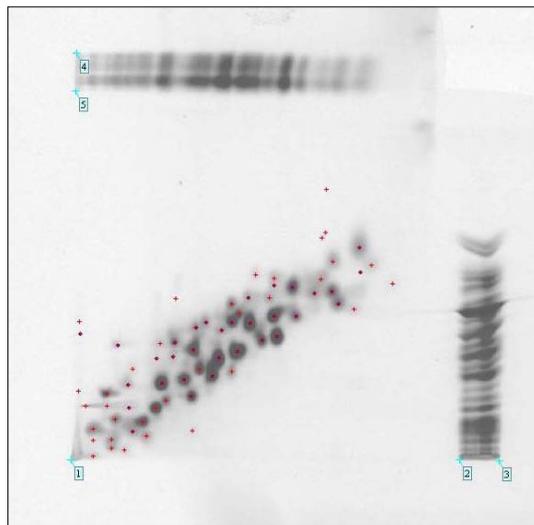


Abbildung 5-5. Auswertung der 2D-HPTLC-Trennung eines tryptischen Verdau von Myoglobin mit der Software Image Master Platinum 2D.

Das Peptidprofil der Derivate des Myoglobins (hier Sinapinsäure und Syringasäure, Detektion bei UV 366 nm nach Derivatisierung mit Fluorescamin) kann nun mit der Vorlage der Myoglobin-Kontrolle verglichen werden. Dabei zeigen blaue Vektoren zur Vorlage identische *spots* an.

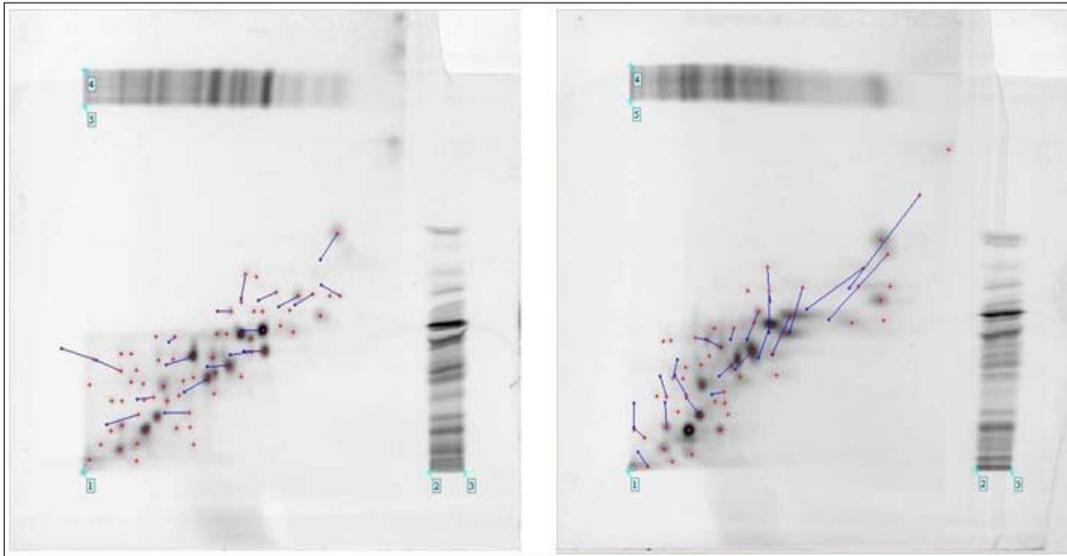


Abbildung 5-6. Auswertung der 2D-HPTLC-Trennung eines tryptischen Verdaus des Sinapinsäure-Derivates (links) und des Syringasäure-Derivates (rechts) von Myoglobin mit der Software Image Master Platinum 2D. Die roten Punkte markieren detektierte *spots*. Blaue Vektoren zeigen zur Vorlage identische *spots* an.

Im Zuge der softwaregesteuerten Analyse ist es möglich eine automatische Auswertung der 2D-HPTLC-Chromatogramme vorzunehmen. Es kann somit eine Aussage über den Einfluss der Reaktion der phenolischen Verbindung auf das Peptidprofil nach einem enzymatischen Verdau getroffen werden. Dabei kann sowohl die generelle Anzahl der Peptide nach dem tryptischen Verdau als auch die Übereinstimmung der Peptidprofile verglichen werden. In **Kapitel 5.4.2** werden die Ergebnisse der softwaregesteuerten Auswertung für die Sinapin- und Syringasäure-Derivate von Myoglobin, Casein, Lysozym und Ovalbumin beschrieben.

Diese Anwendung ist für jedes 2D-HPTLC-Chromatogramm (nicht nur Peptide) anwendbar. Voraussetzung für diese Auswertung stellt dabei die exakt gleiche Versuchsdurchführung (Parameter zur Entwicklung des Chromatogramms) und die gleiche Photodokumentation (in der gleichen Position, mit der gleichen Belichtung usw.) dar. Sind diese Voraussetzungen erfüllt kann mit Hilfe der softwaregesteuerten Auswertung sogar eine Quantifizierung der getrennten Substanzen erfolgen. Werden beispielsweise sekundäre Pflanzenstoffe unterschiedlicher Quellen (z.B. verschiedenen Gemüsesorten) getrennt, kann zunächst ein *mapping* und anschließend eine Quantifizierung des jeweiligen sekundären Pflanzenstoffes erfolgen.

5.1.3 Bestimmung der Radikalfängereigenschaften mittels HPTLC-ABTS-assay

Die Modifikation von Proteinen mit phenolischen und verwandten Verbindungen kann zu einer Veränderung der Radikalfängereigenschaften führen (Rohn et al. 2004). Nach einem enzymatischen Verdau wirken sich diese Änderungen folglich auch auf die Peptide aus. Um diese Veränderungen zu analysieren, können die unverdauten und verdauten Phenol-Protein-Derivate mittels HPTLC-ABTS-*assay* untersucht werden. In der HPTLC wird der postchromatographische DPPH-*assay* üblicherweise zur Bestimmung von Radikalfängereigenschaften eingesetzt (Marston 2010). Die Detektion von Radikalfängern ist ebenso möglich, wenn DPPH durch ABTS ersetzt wird (Miller und RiceEvans 1997) (vgl. **Kapitel 4.4.4**). Innerhalb dieser Arbeit sollte zunächst eine Validierung des HPTLC-DPPH- sowie des HPTLC-ABTS-*assays* durchgeführt werden. Anhand der Validierungsergebnisse wurde der geeigneteren *assay* auf die Analyse der Phenol-Protein-Derivate eingesetzt.

5.1.3.1 Methodvalidierung des HPTLC-DPPH- und HPTLC-ABTS-*assays*

Ziel einer Validierung ist die „Bestätigung durch Untersuchung und Bereitstellung eines Nachweises, dass die besonderen Anforderungen für einen speziellen beabsichtigten Gebrauch erfüllt werden“ (Wellmitz und Gluschke 2005). Sie stellt eine systematische Bewertung eines Analysenverfahrens zum Inkrafttreten desselben dar. Dabei werden Leistungsmerkmale in Bezug auf eine bestimmte Matrix, den Anwendungsbereich oder erwartete Qualitätsanforderungen überprüft (Wellmitz und Gluschke 2005). Bei dem HPTLC-DPPH- und HPTLC-ABTS-*assay* handelt es sich um postchromatographische *assays*, mit denen alle Substanzen detektiert werden, die Radikalfängereigenschaften besitzen. Es wird demnach nicht nur eine spezifische Substanz nachgewiesen, sondern eine größere Gruppe von Substanzen, welche die genannte Eigenschaft besitzen. Zur Beurteilung der Radikalfängereigenschaften wird eine Referenzsubstanz herangezogen. Innerhalb dieser Arbeit wurde Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure), ein wasserlösliches Vitamin E-Derivat, als Referenzsubstanz eingesetzt. Das Ausmaß der Radikalfängereigenschaft wird in Troloxäquivalenten (μM Trolox/L) ausgedrückt. In Anlehnung an die Studie von Raudonis et al. (2010), in der eine Validierung eines postchromatographischen HPLC-ABTS-*assays* durchgeführt wurde, wurden folgende Parameter zur Validierung ausgewählt: Nachweisgrenze, Bestimmungsgrenze, Präzision, Linearität und Spezifität. Alle Berechnungen wurden anhand der Gleichungen, entnommen aus den Leitlinien für Methodvalidierung (Wellmitz und Gluschke 2005), vorgenommen. Die Validierung wurde für die in **Kapitel 2.2.1.4.1.2** beschriebenen Versuchsbedingungen durchgeführt.

Die Nachweisgrenze NG (engl. *limit of detection*, LOD) ist die kleinste qualitativ noch erfassbare Konzentration eines Analyten in einer Probe. Sie ist eine Entscheidungsgrenze für das Vorhandensein eines Analyten. Die kleinste Konzentration eines Analyten in einer Probe, die quantitativ noch erfassbar ist, wird als Bestimmungsgrenze BG (engl. *limit of quantitation*, LOQ) bezeichnet. Die Berechnung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze erfolgte nach der Kalibriergeradenmethode. Dazu wurde zunächst die Varianzenhomogenität überprüft und bei beiden *assays* als gegeben festgestellt. Weiterhin wurde die lineare Regression (im Vergleich zur quadratischen Regression) als geeignetere Kalibrierungsstrategie ermittelt.

Die Präzision ist ein Maß für die Streuung von Analysenwerten aufgrund zufälliger Fehler. Statistisch wird sie durch die Standardabweichung beziehungsweise den Vertrauensbereich beschrieben. Die Präzision kann in Messpräzision und Methodenpräzision unterschieden werden. Die Messpräzision gibt an, wie stark die Analysenwerte aufgrund der Messgeräte schwanken. Dafür wird eine entsprechend der Methode aufgearbeitete Probe an 6-10 verschiedenen Tagen in einer dreifach Bestimmung gemessen. Die Methodenpräzision gibt Aussagen über die zufällige Streuung der Analysenwerte über die gesamte Analyse, da auch zufällige Fehler bei Aufarbeitungs- und Verdünnungsschritten berücksichtigt werden. Zur Bestimmung der Methodenpräzision wird eine mindestens 6-fache Durchführung der gesamten Analyse inklusive der Probenvorbereitung herangezogen. Zur Bestimmung der Mess- und Methodenpräzision wurde Rotwein als Probe eingesetzt. Zur Beurteilung wurden die Gesamtstandardabweichung s_r , die Methodenpräzision s_{Meth} und die Wiederholbarkeit s_r berechnet und evaluiert.

Die Spezifität eines Analysenverfahrens gibt die Anfälligkeit gegenüber Störkomponenten an. Eine Methode ist spezifisch, wenn der zu bestimmende Analyt ohne Verfälschung durch andere Komponenten in der Probe erfasst wird. Ermittelt wird die Spezifität, indem eine Substanz einmal mit und einmal ohne Begleitstoffe analysiert wird. Ist das Messergebnis mit den Begleitstoffen das Gleiche wie ohne die Begleitstoffe, ist eine Methode spezifisch. Die Spezifität wurde mit den Standardsubstanzen Gallussäure, Ferulasäure und Kaffeesäure durchgeführt (vgl. **Kapitel 4.4.4**). Dazu wurden diese Substanzen jeweils als einzelner Standard und als Standardgemisch analysiert. Damit die Spezifität einer Methode gegeben ist, müssen die Vertrauensbereiche der aus der Messung des einzelnen Standards sowie der Messung desselben Standards im Gemisch berechneten Mittelwerte überlappen. Diese Überlappung der Mittelwerte wurde mit beiden Methoden für Gallussäure, Ferulasäure und Kaffeesäure überprüft und als

5. Ergebnisse und Diskussion

gegeben ermittelt. In **Tabelle 5-4** sind die Ergebnisse der Validierung der HPTLC-DPPH- und HPTLC-ABTS-*assays* dargestellt.

Tabelle 5-4. Ergebnisse der Validierung der HPTLC-DPPH- und HPTLC-ABTS-*assays*.

Parameter	HPTLC-DPPH- <i>assay</i>	HPTLC-ABTS- <i>assay</i>
Kalibrierungsstrategie	Lineare Regression	Lineare Regression
Nachweisgrenze [$\mu\text{M Trolox/L}$]	16.8 \pm 4.7	12.9 \pm 5.3
Bestimmungsgrenze [$\mu\text{M Trolox/L}$]	57.4 \pm 17.1	38.8 \pm 15.9
Gesamtstandardabweichung s_r [$\mu\text{M Trolox/L}$]	464.0	236.2
Methodenpräzision s_{Meth} [$\mu\text{M Trolox/L}$]	164.9	139.6
Wiederholbarkeit s_r [$\mu\text{M Trolox/L}$]	434.1	254.3
Spezifität	gegeben	gegeben

Generell können sowohl der HPTLC-DPPH-*assay* als auch der HPTLC-ABTS-*assay* als geeignete Methode zur Bestimmung von Radikalfängereigenschaften eingestuft werden. Anhand der in **Tabelle 5-4** aufgeführten Ergebnisse kann der HPTLC-ABTS-*assay* im Vergleich zu dem HPTLC-DPPH-*assay* als leistungsstärkere Methode eingeordnet werden (geringere Nachweis- und Bestimmungsgrenze, bessere Präzision).

Betrachtet man die experimentelle Durchführung beider *assays* kann festgestellt werden, dass sich der HPTLC-DPPH-*assay* in der experimentellen Durchführung einfacher gestaltet als der HPTLC-ABTS-*assay*. Das DPPH-Radikal ist im Vergleich zu dem ABTS-Radikalkation stabiler in Lösung und auf der stationären Phase der HPTLC-Platte. Die Erfahrungen im Rahmen dieser Arbeit haben gezeigt, dass die ABTS-Radikalkationlösung spätestens nach zwei Tagen erneuert werden muss. Weiterhin wird bei Verwendung von DPPH eine homogenere Färbung der Plattenoberfläche erreicht (Takao et al. 1994).

Der HPTLC-ABTS-*assay* stellt die sensitivere Methode dar und ist somit dazu geeignet geringere Mengen an Radikalfängern postchromatographisch nachzuweisen. Um die Auswirkungen der Phenol-Protein-Reaktion auf die Radikalfängereigenschaften der nach dem tryptischen Verdau entstehenden Peptide zu analysieren wurde daher der HPTLC-ABTS-*assay* gewählt (siehe **Kapitel 5.4.1**).

5.1.4 Charakterisierung der antimikrobiellen Eigenschaften mittels HPTLC-Bioautographie

Generell ist die HPTLC sehr gut für eine bioautographische Detektion geeignet. Eine hohe Probenzahl kann unter identischen chromatographischen Bedingungen analysiert und somit direkt miteinander verglichen werden. Die mobile Phase, die zu einer Störung des Mikroorganismenwachstums führen kann, wird in der HPTLC nahezu vollständig evaporiert. Die chromatographisch getrennten Substanzen sind nach der Analyse auf der HPTLC-Platte immobilisiert und leicht zugänglich, da sie sich in einem offenen System befinden. Dieser Aspekt sorgt allerdings gleichermaßen dafür, dass instabile, flüchtige oder leicht-oxidierbare Substanzen in dem offenen System schlecht oder gar nicht analysiert werden können. Im Falle von stabilen Substanzen sind diese immobilisiert und somit auch für zeitaufwendige postchromatographische Analysen zugänglich (Marston 2010). Die HPTLC-Bioautographie ist sehr komplex. Einen Einfluss auf das Testergebnis üben die Testorganismen, die Zusammensetzung des Mediums/Agars und deren Zusätze sowie der pH-Wert, die Löslichkeit der Probe im Agar/Medium, die Art der stationären Phase, die Vorkonditionierung der Platte, die Wachstumsbedingungen und die postchromatographische Derivatisierung aus (Nagy et al. 2002; Nagy et al. 2003). Im Rahmen dieser Arbeit sollte innerhalb einer Methodenentwicklung geprüft werden, inwieweit die stationäre und mobile Phase der HPTLC Einfluss auf das Analyseergebnis der HPTLC-Bioautographie nehmen.

5.1.4.1 *Analyse der Abhängigkeit der wachstumshemmenden Wirkung von stationären und mobilen Phasen*

In der HPTLC kommen verschiedene stationäre und mobile Phasen zum Einsatz. Bei der HPTLC-Bioautographie kommt es üblicherweise zu einem Kontakt von stationärer Phase und Mikroorganismen. Die stationäre Phase und trotz ausgiebiger Evaporation noch auf der stationären Phase verbliebene Teile der mobilen Phase können das Mikroorganismenwachstum beeinflussen und somit zu einer Fehlinterpretation der Ergebnisse führen. Der Verdacht, dass einige Laufmittel einen negativen Einfluss auf das Stammwachstum auf der HPTLC-Platte haben, wurde schon mehrfach geäußert (Choma 2005; Okusa et al. 2010) und sollte daher im Rahmen dieser Arbeit für den HPTLC-*agar-overlay* und die HPTLC-DB überprüft werden.

5.1.4.1.1 Einfluss der stationären und mobilen Phase auf das Mikroorganismenwachstum

Tabelle 5-5 gibt eine Übersicht der Beeinflussung des Mikroorganismenwachstums der getesteten stationären Phasen bei Verwendung des HPTLC-*agar-overlays*.

Tabelle 5-5. Übersicht der Beeinflussung des Mikroorganismenwachstums der getesteten stationären Phasen bei Verwendung des HPTLC-agar-overlays; KG: Kieselgel.

Nr.	Stationäre Phase	Beeinflussung
1	TLC-Cellulose-F ₂₅₄ -Aluminiumfolie	Nein
2	TLC-Cellulose-Aluminiumfolie	Nein
3	TLC-KG-60-Aluminiumfolie	Nein
4	HPTLC KG 60 Aluminiumfolie	Nein
5	TLC-KG-60-Glasplatte	Nein
6	HPTLC-KG-60-Glasplatte	Nein
7	HPTLC-KG-60-CN-F ₂₅₄ S-Glasplatte	Nein
8	HPTLC-KG-60-NH₂-F₂₅₄S-Glasplatte	<u>Ja, negativ</u>
9	TLC-KG-60-RP-8-F₂₅₄S-Glasplatte	<u>Ja, leicht negativ</u>
10	TLC-KG-60-RP-18-Glasplatte	Nein
11	HPTLC-KG-60-Nano-SIL-C ₁₈₋₅₀ -Glasplatte	Nein
12	HPTLC-KG-60-Nano-SIL-C ₁₈₋₁₀₀ -Glasplatte	Nein
13	HPTLC-KG-60-Nano-SIL-C ₁₈ W-Glasplatte	Nein

Bei der Untersuchung unterschiedlicher stationärer Phasen hinsichtlich der Beeinflussung des Mikroorganismenwachstums wurden die Schichten HPTLC-KG-60-NH₂-F₂₅₄S-Glasplatte (siehe **Tabelle 5-5** Nr. 8) und TLC-KG-60-RP-8-F₂₅₄S-Glasplatte (siehe **Tabelle 5-5** Nr. 9) als tendenziell wachstumsinhibierend eingestuft (vgl. **Abbildung 5-7 D Platte 3** und **4**).

Neben der nachgewiesenen wachstumsinhibierenden Wirkung einiger stationärer Phasen traten weiterhin Probleme bei der Überschichtung der Platten mit dem Agar auf. Diese gestaltete sich dabei vor allem für diejenigen Platten schwierig, die eine unpolare Oberfläche (RP-Phasen, siehe **Tabelle 5-5** Nr. 9-13) aufwiesen. Eine Überschichtung war nur möglich, indem der noch flüssige Agar, nachdem er bereits in die Petrischale überführt wurde, mit Schwung über die Platte geschwenkt wurde. Dafür musste die Petrischale mehrfach hin- und her gekippt und immer wieder geschwenkt werden, da der Agar dabei z.T. an der Kante der Platte wieder abließ. Sobald der Agar allerdings auf die Plattenoberfläche überführt war, gestaltete es sich wiederum schwierig ihn dort gleichmäßig über die gesamte Plattenoberfläche zu

verteilen. Bei Verwendung der TLC-KG-60-RP-18-Glasplatte (siehe **Tabelle 5-5** Nr. 10) bestand die Schwierigkeit, dass sich die Plattenschicht begann zusammen zu ziehen, sobald der Agar über die Plattenoberfläche gegossen wurde; dies erschwerte im Folgenden das vollständige und gleichmäßige Verteilen des Agars über die gesamte Plattenoberfläche. Im Gegensatz dazu ist die Übersichtung bei einer NP-Kieselgel-Schicht (siehe **Tabelle 5-5** Nr. 3-6) deutlich einfacher und gleichmäßiger.

Ein weiteres Problem bei der Verwendung von unpolaren und mittelpolaren Schichten bildete die Detektion mit dem MTT-Reagenz (vgl. **Kapitel 4.3.3**). Bei Verwendung der HPTLC-KG-60-Nano-SIL-C₁₈₋₅₀-Glasplatte (siehe **Tabelle 5-5** Nr. 11) und HPTLC-KG-60-Nano-SIL-C₁₈₋₁₀₀-Glasplatte (siehe **Tabelle 5-5** Nr. 12) entstand eine gleichmäßig intensive Violettfärbung der gesamten Plattenoberfläche einschließlich des Bereichs im Inneren des Hemmhofs. Hier war die Färbung allerdings etwas schwächer ausgeprägt als um den Hemmhof herum. Vermutlich ist hierbei ein Teil der MTT-Lösung unter den Agar und damit direkt auf die Plattenoberfläche gelangt, wodurch die entsprechende Färbung erzeugt wurde. Dies ist vermutlich eine Folge der mangelnden Benetzbarkeit, welche die Platten während des *overlays* aufwiesen. Bei den TLC-KG-60-RP-18-Glasplatten (siehe **Tabelle 5-5** Nr. 10) und den HPTLC-KG-60-Nano-SIL-C₁₈W-Glasplatten (siehe **Tabelle 5-5** Nr. 13) ist hingegen der Kontrast zwischen dem Rand des Hemmhofs und der restlichen Plattenoberfläche sehr gering und erschwert so die Unterscheidung zwischen dem Anfang und Ende des Hemmbereichs. Im Gegensatz dazu ist der Kontrast bei einer NP-Kieselgel-Schicht (siehe **Tabelle 5-5** Nr. 3-6) sehr deutlich ausgeprägt und als klarer, heller Fleck auf violetterem Hintergrund erkennbar.

Weiterhin ist zu erwähnen, dass keine chromatographische Entwicklung der getesteten stationären Phasen erfolgte. Dies entspricht nicht den realen Bedingungen unter denen eine HPTLC-Bioautographie durchgeführt wird. Trotzdem kann der Test der nicht entwickelten stationären Phasen zur generellen Beurteilung der Eignung einer stationären Phase herangezogen werden.

Die chromatographische Entwicklung, bei der die stationäre Phase mit Flüssigkeit benetzt wird, kann einen Einfluss auf das Mikroorganismenwachstum ausüben. Daher wurden im Folgenden in der HPTLC üblicherweise eingesetzte mobile Phasen auf eine mögliche wachstumsinhibierende Wirkung getestet. **Tabelle 5-6** gibt eine Übersicht über die Beeinflussung des Mikroorganismenwachstums der getesteten mobilen Phasen bei Verwendung des HPTLC-*agar-overlays* und der HPTLC-DB.

5. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 5-6. Übersicht über die Beeinflussung des Mikroorganismenwachstums der getesteten mobilen Phasen.

mobile Phase	HPTLC-Agar-overlay	HPTLC-DB	mobile Phase	HPTLC-Agar-overlay	HPTLC-DB
Aceton*	Nein	Nein	Pentan	Nein	ng
Acetonitril	Nein	ng	Pyridin	Nein	ng
1-Butanol	Nein	ng	Toluol*	Nein	Nein*
2-Butanol	Nein	ng	25 % Ammoniak	Ja, negativ	ng
Chloroform	Nein	Nein*	Ameisensäure	Ja, negativ	Ja, negativ
Cyclohexan	Nein	ng	Eisessig	Ja, negativ	Ja, negativ*
Dichlormethan	Nein	Nein*	Aceton/Chloroform/Wasser (8/2/1, v/v/v)	ng	Nein**
Ethanol	Nein	ng	Chloroform/Aceton (9/1, v/v)	ng	Nein**
Ethylacetat	Nein	Nein*	Chloroform/Methanol (8/2, v/v)	ng	Nein**
n-Hexan	Nein	Ja, negativ*	Dichlormethan/Methanol (8/2, v/v)	ng	Nein**
Isopropanol	Nein	ng	Ethylacetat/n-Hexan (6/4, v/v)	ng	Nein**
Methanol	Nein	Nein*			

Evaporationsdauer/optische Dichte/Inkubationsdauer : * 24 h/0.151/3 h; ** 72 h/0.309/3 h
 ng nicht getestet

Als größter Einflussparameter bei der postchromatographischen Anwendung der Bioautographie hat sich die Auswahl der Lösungsmittel erwiesen, die als mobile Phase zur chromatographischen Trennung ausgewählt wurden. Im Rahmen dieser Arbeit inhibierten die konzentrierten Säuren Ameisensäure und Eisessig sowie Ammoniak (25 %) das Mikroorganismenwachstum der HPTLC-DB und des HPTLC-agar-overlays. Weiterhin wurde n-Hexan als wachstumsinhibierend bei der HPTLC-DB identifiziert. In einer Mischung von Ethylacetat/n-Hexan (6/4, v/v) tritt diese Wirkung allerdings nicht auf.

Die Auswirkungen der Lösungsmittel auf das Mikroorganismenwachstum sind in der Literatur bisher unzureichend beschrieben. In den Publikationen wird die HPTLC-Bioautographie überwiegend ohne eine chromatographische Entwicklung der Platte durchgeführt. Die Dünnschichtplatte dient dabei lediglich als Trägermaterial für die zu testenden Substanzen und als Nährboden für die Bakterien, da die Nährstoffe an die Kieselgelschicht adsorbieren (Nagy et al. 2002; Okusa et al. 2010; Grzelak et al. 2011). In den Publikationen zur postchromatographischen, direkten Bioautographie wird erwähnt, dass der pH-Wert des Laufmittels einen Einfluss ausübt. Starke Säuren, wie Ameisensäure und Eisessig, sollten nach Möglichkeit vermieden werden (Hamburger und Cordell 1987). Die eingesetzten Lösungsmittel und Säuren können sich negativ auf die direkte bioautographische Detektion auswirken, da sie aufgrund ihrer unzureichenden Evaporation auch nach einer längeren Trocknungszeit das Wachstum auf der Platte inhibieren können. Dieser Aspekt wurde durch die Versuche dieser Arbeit bestätigt (vgl. **Tabelle 5-6** und **Abbildung 5-7**). Choma et al. (2002) konnten den negativen Einfluss von Säure auf die Bildung von Hemmhöfen beobachten. Dabei vermuteten sie nicht nur den niedrigen pH-Wert als Ursache, sondern auch die Komplexbildung der verwendeten Säure mit den Mikroelementen des Nährmediums, die für das Bakterienwachstum auf der Platte notwendig sind (Choma et al. 2002).

Im Idealfall sollte das Laufmittel vollständig von der Platte entfernt werden, bevor die direkte Bioautographie angewendet wird (Spangenberg et al. 2011). Wie sich bei den Versuchen in dieser Arbeit herausgestellt hat, ist dieses nur durch eine Evaporation der Lösungsmittel möglich. Die Trocknung der Platte in der automatischen Entwicklungskammer (AMD2, CAMAG Chemie-Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG) unter Vakuum scheint eine gute Alternative zur Trocknung der Platte an der Luft zu sein. Die Trocknung der Platte an der Luft und anschließend in einem Vakuum-Exsikkator konnte auch in der Studie von Choma erfolgreich angewandt werden (Choma 2006). Horvath et al. (2010) haben die Platte nach der Entwicklung im Ofen für fünf Minuten bei 90 °C getrocknet. Diese Maßnahme zur Trocknung der Platte und zum Entfernen der Lösungsmittel würde sich nicht für empfindliche Testsubstanzen wie phenolische Verbindungen eignen.

5. Ergebnisse und Diskussion

In **Abbildung 5-7** sind beispielhaft die Ergebnisse der Versuche mit Dichlormethan und Ameisensäure sowie verschiedener stationärer Phasen dargestellt.

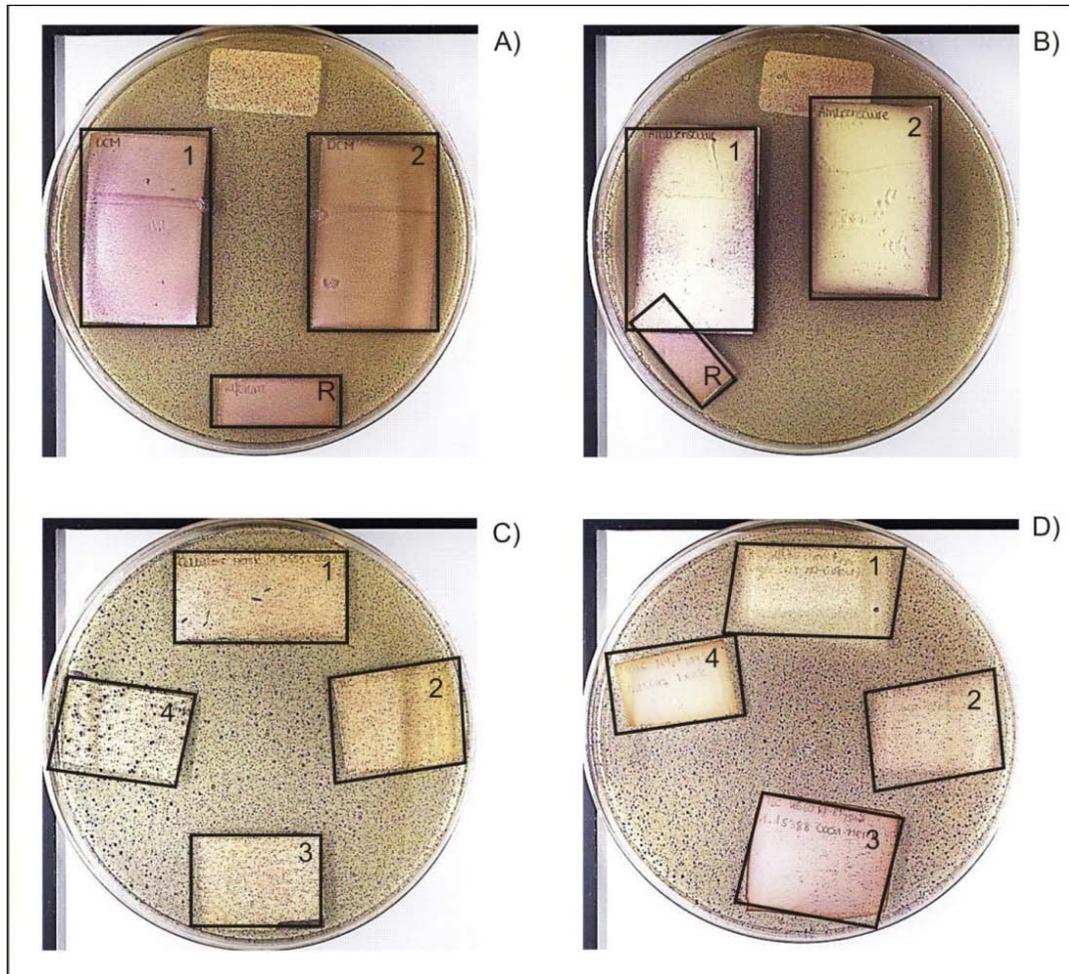


Abbildung 5-7. Analyse von mobilen und stationären Phasen hinsichtlich der Beeinflussung des Mikroorganismenwachstums.

Detektion bei Weißlicht nach MTT Färbung. **A** [Test Dichlormethan] 1 = Platte 1; 2 = Platte 2; R = Referenzplatte; **B** [Test Ameisensäure] 1 = Platte 1; 2 = Platte 2; R = Referenzplatte; **C** [Test Aluminiumfolien] 1 = TLC-Cellulose; 2 = TLC-Kieselgel-60; 3 = HPTLC-Kieselgel-60; 4 = TLC-Cellulose-F₂₅₄; **D** [Test Glasplatten] 1 = TLC-Kieselgel-60; 2 = HPTLC-CN-F₂₅₄; 3 = TLC-RP-8-F₂₅₄S; 4 = HPTLC-NH₂-F₂₅₄S.

5.1.5 Charakterisierung der antimikrobiellen Eigenschaften mittels HPTLC-DB

Der in der HPTLC-DB am häufigsten eingesetzte Mikroorganismus ist *B. subtilis* (Choma und Grzelak 2011), welcher auch in dieser Arbeit als Indikatorstamm für die HPTLC-DB eingesetzt wurde. Der Erfolg

der HPTLC-DB-Analyse hängt von verschiedenen Parametern ab. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst eine Optimierung von verschiedenen experimentellen Parametern vorgenommen, die im Folgenden beschrieben wird.

5.1.5.1.1 Einfluss der Inkubationszeit und der optischen Dichte auf das Mikroorganismenwachstum

Die Inkubationszeit und die optische Dichte der Mikroorganismen üben einen entscheidenden Einfluss auf das Testergebnis der HPTLC-DB aus. Vor ungefähr einem Jahrzehnt hat die Firma Merck KGaA einen kommerziell erhältlichen TLC-DB-assay entwickelt (*Chrom Biodip® antibiotics*), mit dem dünn-schichtchromatographisch separierte Antibiotika nachgewiesen werden können. Als Indikatorkeim wurde dabei *B. subtilis* verwendet. Die Visualisierung der Ergebnisse erfolgt mittels MTT-Färbung. Die in dem Versuchsprotokoll angegebene Inkubationsdauer und Temperatur von 4 h bei 25 ± 3 °C sowie 2 h bei 35 °C wurde von Botz et al. (2001) als zu kurz eingeordnet, da die log-Phase des Testorganismus unter diesen Bedingungen nicht erreicht wird. Daraus resultiert eine schwache Violett-färbung der Platte nach der MTT-Färbung. Durch eine Verlängerung der Inkubationsdauer auf 2-4 h bei 35 °C konnten bessere Ergebnisse erzielt werden. Choma et al. (2004) erhöhten die Inkubationszeit auf 4 h bei 37 °C und legten besonderen Wert auf das vollständige Abdampfen der mobilen Phase, z.B. in einer Vakuumkammer. Es wurde ein LOD-Wert von 0.01 ppm für Enrofloxacin und Ciprofloxacin bei einem Applikationsvolumen von 50 µL bestimmt. Innerhalb dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Größe der Inhibitionszone von dem Applikationsvolumen abhängt (je größer das Applikationsvolumen, desto größer die Inhibitionszone). Es wurde außerdem gezeigt, dass das Verhältnis von Größe der Inhibitionszone zum Logarithmus der Substanzkonzentration nur in einem engen Bereich von ein oder zwei Zehnerpotenzen linear ist. Dies widerspricht der allgemein angenommenen „Bioautographie-Theorie“ (Betina 1973; Pauncz und Harsanyi 1980; Botz et al. 2001; Ramirez et al. 2003). In einem breiteren Konzentrationsbereich von etwa vier Zehnerpotenzen ist das Verhältnis exponentiell. Nagy et al. (2002) beschäftigten sich ebenfalls mit den optimalen Lebensbedingungen von *B. subtilis* in einem bioautographischen System. Sie stellten fest, dass die bisher berichtete Inkubationszeit von 18 h (Eymann et al. 2001) zu lang ist und fanden 4.8 h bei 37 °C als besser geeignet. Ähnliche Studien wurden auch für *E. coli* durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass mit einer Inkubationszeit von 3 h bessere Ergebnisse als mit einer Inkubation über Nacht erzielt werden konnten.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche zur HPTLC-DB wurde zunächst eine Inkubationsdauer für ca. 15 h (über Nacht) gewählt. Dabei konnte zwar ein Bakterienwachstum auf der Platte erzielt, aber keine Bildung von Hemmhöfen beobachtet werden. Die Inkubationszeit beeinflusst das

5. Ergebnisse und Diskussion

Testergebnis maßgeblich. Dabei stellt sich häufig eine zu lang andauernde Inkubation als problematisch dar. Wird das inokulierte Medium bei der direkten Bioautographie zu lang inkubiert, kann es zu einem „Überwachsen“ der Substanzzonen kommen, obwohl zunächst die gewünschte Wachstumshemmung durch die Testsubstanz auftritt. Im weiteren Verlauf wurde aus diesem Grund und zur Verkürzung der Versuchszeit die Inkubationsdauer auf wenige Stunden reduziert. Zudem wird in der Literatur eine Inkubationszeit von einigen Stunden empfohlen, weil dadurch eine bessere Bildung von Hemmhöfen beobachtet werden konnte (Hamburger und Cordell 1987; Grzelak et al. 2011). Zur Analyse der optimalen Inkubationszeit wurden mehrere Versuchsreihen mit dem Konservierungsstoff Sorbinsäure durchgeführt. Dabei wurde lediglich die Inkubationszeit variiert. Alle anderen Parameter, wie die optische Dichte und die Inkubationszeit nach dem Tauchen ins MTT-Reagenz, wurden nicht verändert. Zwei dieser Versuchsreihen sind in **Abbildung 5-8** dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass bereits nach einer einstündigen Inkubationszeit Hemmhöfe zu erkennen sind. Deren Durchmesser wird mit abnehmender Konzentration kleiner und der Kontrast zum violetten Hintergrund schwächer. Die Hemmhöfe sind bei jedem Streifen bis zu einer Konzentration von $1.97 \mu\text{g/spot}$ zu erkennen. Mit steigender Inkubationsdauer wird eine intensivere und gleichmäßigere Violett-färbung erreicht. Der Kontrast zwischen Hemmhof und Hintergrund wird dadurch verbessert.

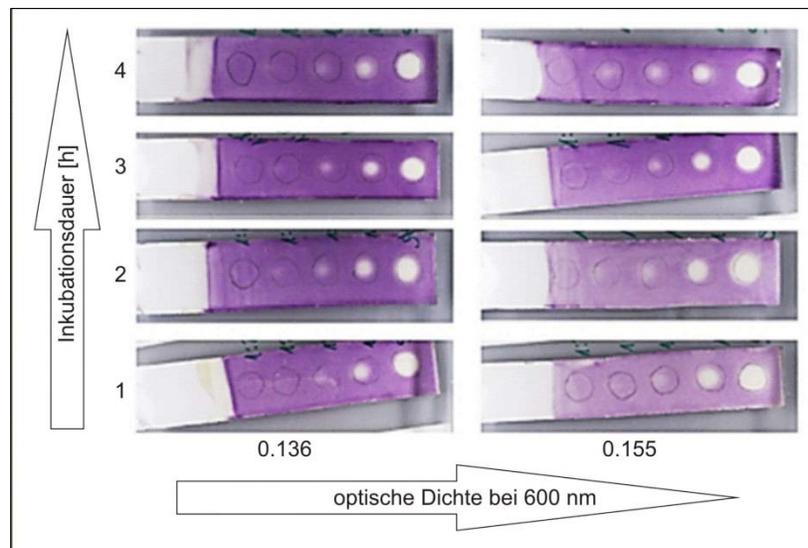


Abbildung 5-8. HPTLC-DB von Sorbinsäure bei unterschiedlicher Inkubationsdauer und optischer Dichte.

Sorbinsäuremenge [$\mu\text{g}/5\mu\text{L}$] von links nach rechts: $0.39 \mu\text{L}$, $0.98 \mu\text{L}$, $1.97 \mu\text{L}$, $4.92 \mu\text{L}$, $9.85 \mu\text{L}$

5. Ergebnisse und Diskussion

Anschließend wurde der Einfluss der optischen Dichte auf das Mikroorganismenwachstum geprüft. Die Analyse der optischen Dichte sollte Hinweise darauf geben, ob die Bakteriendichte einen Einfluss auf das weitere Bakterienwachstum direkt auf der Platte haben könnte. Um die optimale optische Dichte für eine erfolgreiche Durchführung der direkten Bioautographie auf der Platte zu ermitteln, wurde zunächst eine Wachstumskurve von *B. subtilis* erstellt. In der Literatur wird beschrieben, dass sich für eine Detektion der antibakteriellen Wirkung der Testsubstanzen die Bakterienzellen in der exponentiellen Wachstumsphase befinden sollten, um das weitere Wachstum des Indikatorstammes auf der Platte zu ermöglichen und somit die Bildung von Hemmhöfen zu erkennen (Nagy et al. 2002; Moricz et al. 2008; Spangenberg et al. 2011). Zudem kann dadurch die Inkubationszeit der Platte auf wenige Stunden reduziert werden, da die Bakterien sich anschließend schneller auf der Platte vermehren. In **Abbildung 5-9** ist die Wachstumskurve von *B. subtilis* dargestellt, die bei einer Wachstumstemperatur von 32°C erhalten wurde.

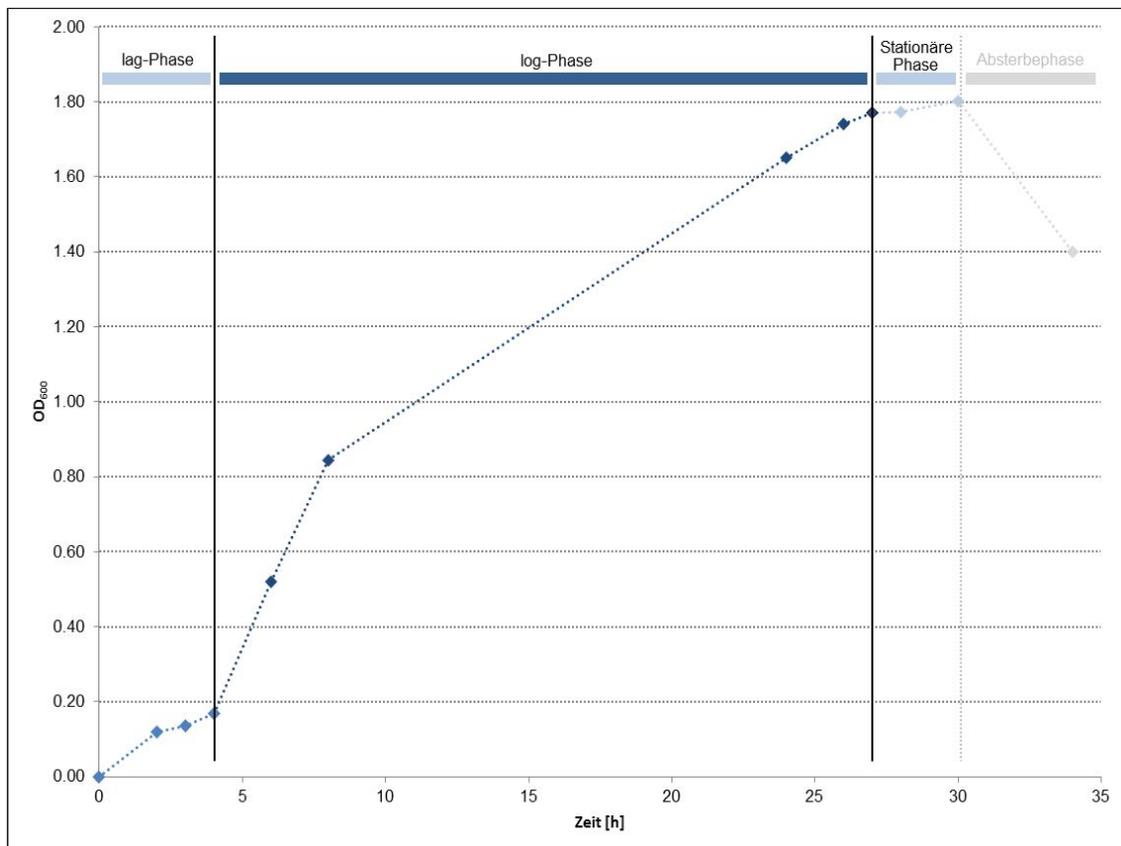


Abbildung 5-9. Wachstumskurve von *B. subtilis* erstellt bei einer Wachstumstemperatur von 32°C.

5. Ergebnisse und Diskussion

Anhand der Wachstumskurve ist zu erkennen, dass sich die exponentielle Wachstumsphase bei einer optimalen Wachstumstemperatur von 32°C bei einem OD_{600nm} -Wert zwischen 0.1 und 1.0 einstellt. Die Zeit für das Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase im Nährmedium kann variieren, da sie vom Volumen des Nährmediums sowie der Geschwindigkeit des Inkubationsschüttlers abhängig ist. Die erstellte Wachstumskurve gibt wertvolle Hinweise darauf, wann die Platte in die Bakteriensuspension getaucht werden sollte und wann das Wachstum der Bakterienzellen in die stationäre Phase übergeht. Wird die stationäre Phase erreicht, ist ein weiteres Wachstum auf der Platte erschwert und somit die Bildung von Hemmhöfen umso unwahrscheinlicher. Bei den Versuchen zur Analyse der optimalen optischen Dichte wurde diese mit Bezug zur Wachstumskurve daher zwischen den Werten 0.1 und 1.0 gewählt. In **Abbildung 5-10** sind die Ergebnisse zu der Untersuchung der optischen Dichte mit dem Konservierungsstoff Sorbinsäure dargestellt.

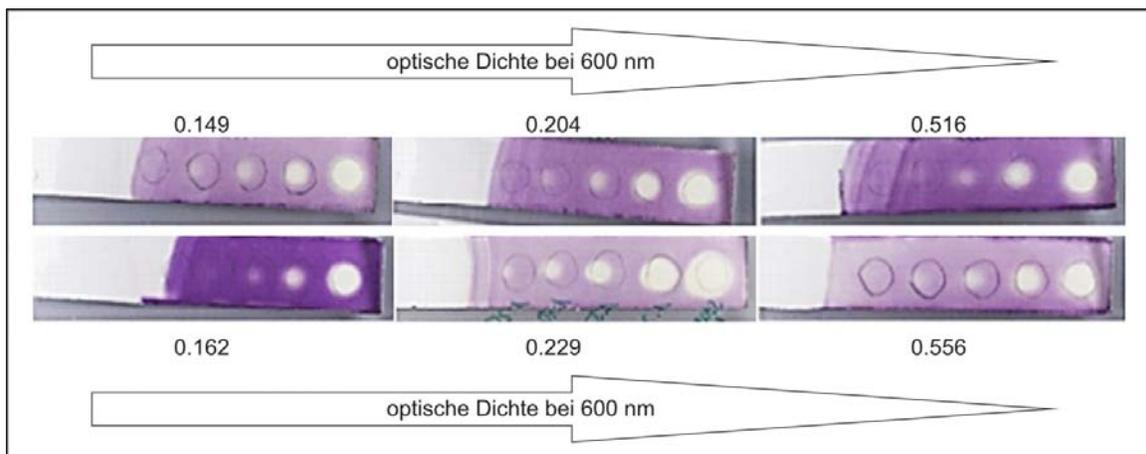


Abbildung 5-10. HPTLC-DB von Sorbinsäure bei unterschiedlicher Inkubationsdauer und optischer Dichte.

Sorbinsäuremenge [$\mu\text{g}/5\mu\text{L}$] von links nach rechts: 0.39 μL , 0.98 μL , 1.97 μL , 4.92 μL , 9.85 μL .

Zur Analyse der Inkubationszeit (vgl. **Abbildung 5-8**) wurde dieselbe Verdünnungsreihe von Sorbinsäure mit demselben Applikationsvolumen aufgetragen. Dabei wurde die optische Dichte bei einer gleich bleibenden Inkubationszeit (zwei Stunden) variiert. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass eine Bildung von Hemmhöfen bis zu einem OD_{600nm} -Wert von 0.6 erzielt werden konnte. Allerdings ist auch erkennbar, dass die Intensität und die Gleichmäßigkeit der Violettfärbung mit der optischen Dichte variiert. Dabei kann aus den Ergebnissen kein klarer Zusammenhang zwischen optischer Dichte und Intensität der Färbung erkannt werden. Weiterhin scheint sich die optische Dichte auf den

Hemmhofdurchmesser auszuwirken. Dies wird besonders bei der Betrachtung des Ergebnisses der HPTLC-DB bei einer OD_{600nm} von 0.162 und 0.229 deutlich. Der Hemmhofdurchmesser bei gleichen Sorbinsäurekonzentrationen ist bei einer OD_{600nm} von 0.229 größer als bei einer OD_{600nm} von 0.162.

Generell wurde gezeigt, dass eine Inkubationsdauer von einer bis zu vier Stunden und eine optische Dichte von OD_{600nm} 0.1-1.0 zu einem Wachstum von *B. subtilis* führt. Weiterhin wurden bei der Verwendung von Sorbinsäure Hemmhöfe detektiert. Die Ergebnisse zeigten aber auch, dass nicht nur die Inkubationsdauer und die optische Dichte, d.h. die Bakterienkonzentration, einen Einfluss auf das Ergebnis haben. Wahrscheinlich üben weitere *assay*-Parameter, wie z.B. die Luftfeuchtigkeit und der Sauerstoffgehalt der Luft, einen signifikanten Einfluss auf das Wachstum aus. Diese Parameter konnten innerhalb dieser Arbeit nicht optimiert werden. Daher sind weitere Untersuchungen notwendig, z.B. mit der Verwendung eines Inkubationsschranks mit Luftfeuchtigkeitsregulation, um die Auswirkungen dieser Parameter festzustellen.

5.1.5.2 Aspekte zur alternativen Detektion mit Hilfe des *Escherichia coli* XLI-pNCO-GFP-Stammes

Bei dem in dieser Arbeit entwickelten HPTLC-agar-overlay-assay wurde ein genetisch modifizierter *E. coli*-Stamm eingesetzt. Durch die Klonierung des GFP-Gens ist dieser Stamm in der Lage das *green fluorescent protein* überzuproduzieren. Die Verwendung dieses Mikroorganismus eröffnet dadurch eine weitere Form der Visualisierung der Testergebnisse (neben der hier beschriebenen MTT-Methode). Beispielhaft ist in **Abbildung 5-11** der HPTLC-agar-overlay von verschiedenen stationären Phasen (Aluminiumfolien) bei einer Detektion mit UV-Licht (366 nm) ohne MTT-Färbung dargestellt (vgl. **Abbildung 5-7 C**).

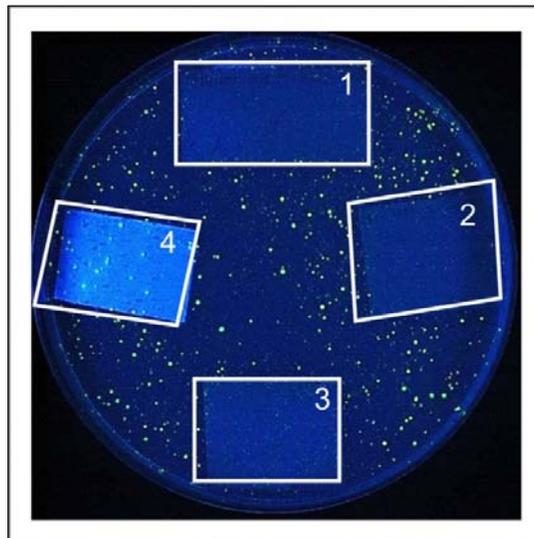


Abbildung 5-11. Analyse verschiedener stationärer Phasen (Aluminiumfolien) hinsichtlich der Beeinflussung des Mikroorganismenwachstums (vgl. **Abbildung 5-7 C**).

Detektion mit UV 366 nm ohne MTT Färbung. 1 = TLC-Cellulose; 2 = TLC-Kieselgel-60; 3 = HPTLC-Kieselgel-60; 4 = TLC-Cellulose-F₂₅₄.

Gut zu erkennen sind die grün-fluoreszierenden Kolonien unter UV-Licht (366 nm). Weiterhin wird anhand dieser Abbildung deutlich, dass die Wahl der stationären Phase bei Verwendung des modifizierten *E. coli*-Stammes einen wesentlichen Einfluss auf das Testergebnis ausübt. Denn betrachtet man die Aluminiumfolien 1, 2 und 3 im Vergleich zur Folie 4 wird deutlich, dass nur auf Folie 4 (TLC Cellulose F₂₅₄) eine Überproduktion des GFPs erfolgt ist. Demnach scheint die stationäre den *E. coli*-Stamm insofern negativ zu beeinflussen, dass eine Überproduktion des GFPs nicht erfolgt. Die Ursachen dafür können vielfältig sein. Vermutlich üben weitere Inhaltsstoffe des Kieselgels (z.B. Bindemittel) einen negativen Einfluss auf die GFP-Überproduktion aus.

Das positive Ergebnis für die TLC Cellulose F₂₅₄ zeigt, dass der Einsatz des modifizierten *E. coli*-Stammes zur Visualisierung in der HPTLC-Bioautographie geeignet ist. Dies wäre besonders in Bezug auf eine Zeitersparnis sinnvoll. Zukünftig sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Verwendung des modifizierten *E. coli*-Stammes zu untersuchen und die Detektion mittels GFP in der HPTLC-Bioautographie zu etablieren.

5.1.6 Charakterisierung der antigenen Eigenschaften mittels HPTLC-Immunfärbung

Das allergenauslösende Potential einiger Lebensmittelbestandteile spielt heutzutage für die Nahrungsmittelproduktion und den Verbraucher eine gleichermaßen große Rolle. Die immunologische Wirkung von Nahrungsproteinen steht daher im Fokus der Forschung. Fraglich ist u.a. in wie weit die

allergenen Eigenschaften von Proteinen durch Lebensmittelbe- und -verarbeitung beeinflusst werden. Während des Herstellungsprozesses und der Lagerung von Lebensmitteln kann es zur Reaktion verschiedener Inhaltsstoffe (z.B. sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe) mit Nahrungsproteinen kommen. Die Allergenität dieser Reaktionsprodukte, die z.B. beim Einsatz von Schönungsmitteln im Wein oder bei der Herstellung leguminosen- oder milchhaltiger Produkte entstehen, ist bisher weitestgehend unerforscht.

Die Hochleistungsdünnschichtchromatographie-Immunfärbung (*high performance thin-layer chromatography-immunostaining*, HPTLC-IF) stellt eine ergänzende Methode zu den bereits bestehenden Vorgehensweisen (u.a. ELISA, Western Blot) dar und besitzt das Potential Reaktions- bzw. Abbauprodukte, die während der Be- und Verarbeitung von Lebensmitteln entstehen können, im Hinblick auf immunologische Eigenschaften zu charakterisieren. Weiterhin ermöglicht die Kombination der HPTLC mit der Massenspektrometrie eine selektive strukturelle Aufklärung relevanter Verbindungen (Morlock und Schwack 2010a). Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst eine Methode zur HPTLC-IF entwickelt. Anschließend wurde der Einfluss der Reaktion von verschiedenen phenolischen Verbindungen (u.a. Kaffeesäure, Sinapinsäure und Syringasäure) mit Modellproteinen mittels HPTLC-Immunfärbung untersucht (siehe **Kapitel 5.3.4**).

Die Methodenentwicklung zur HPTLC-IF erfolgte in Anlehnung an die in der AG Allergie unter der Leitung von Frau Dr. Paschke-Kratzin des AK Fischer unter der Leitung von Prof. Dr. Markus Fischer durchgeführte Methode der Immunfärbung (modifiziert nach Vieths et al. (1992) und Schütte et al. (2005)). Weiterhin wurde sich bezüglich des methodischen Vorgehens an der Studie von Ishikawa und Taki (2000) orientiert. Als Modellprotein wurde Myoglobin eingesetzt. Die primären und sekundären Antikörper wurden nach Herstellerangaben verdünnt (vgl. **Kapitel 4.3.2**).

Um eine Immunfärbung auf der HPTLC-Platte durchzuführen muss diese zwangsläufig mit Flüssigkeit (mit hohem Wasseranteil) benetzt und in dieser geschwenkt werden. Die HPTLC-Platte (in diesem Fall HPTLC-Kieselgel-Glasplatte) ist nicht für die Benetzung mit Flüssigkeit und eine Aufbewahrung in dieser über mehrere Stunden ausgelegt. Dies äußerte sich in einer Ablösung der Kieselgelschicht von der Glasplatte. HPTLC-Kieselgel-Aluminiumfolien sollten sich generell etwas besser eignen, da diese einen höheren Bindemittelanteil aufweisen. Aber auch bei der Verwendung dieser kam es zu einem Ablösen der Schicht. Daher wurde in Anlehnung an Souady et al. (2009) Polyisobutylmethacrylat (PIBM) zur Stabilisierung der HPTLC-Kieselgel-Glasplatte sowie -Aluminiumfolie eingesetzt. Dieses sollte in n-Hexan gelöst werden. Das Polymer löste sich jedoch sehr schlecht, so dass in Anlehnung an Ishikawa und Taki (2000) Chloroform als zweite Lösungsmittelkomponente eingesetzt wurde. Das Verhältnis der

Lösungsmittel zueinander wurde so gewählt, dass sich das PIBM noch gerade in Chloroform löst. Weiterhin gibt die Literatur unterschiedliche Angaben zur PIBM-Konzentration (0.1-0.5 %). Daher wurden mehrere Konzentrationen getestet und eine Konzentration von 0.5 % als am besten geeignet ausgewählt.

Eine Stabilisierung der TLC-Platte ist unbedingt notwendig, da die Kieselgelschicht, wie bereits erwähnt, während des ständigen Inkubierens stetig mit Flüssigkeit in Kontakt kommt. Dies führt zu einer Instabilisierung der Schicht. Während der Immunfärbung musste deshalb zu jeder Zeit auf eine vorsichtige Handhabung der Platte geachtet werden.

Unter Verwendung des modifizierten Versuchsprotokolls wurde die HPTLC-IF für das Modellprotein Myoglobin auf unterschiedlichen stationären Phasen durchgeführt. Ziel war es zu prüfen, inwieweit sich die Wahl der stationären Phase auf das Analyseergebnis auswirkt. Zur Untersuchung wurden HPTLC-Kieselgel-Aluminiumfolien (siehe **Abbildung 5-12**), HPTLC-Kieselgel-Glasplatten (siehe **Abbildung 5-13**), TLC Kieselgel RP-18 Aluminiumfolien (siehe **Abbildung 5-14**) und HPTLC-Kieselgel-RP-18-Glasplatten (siehe **Abbildung 5-15**) eingesetzt.

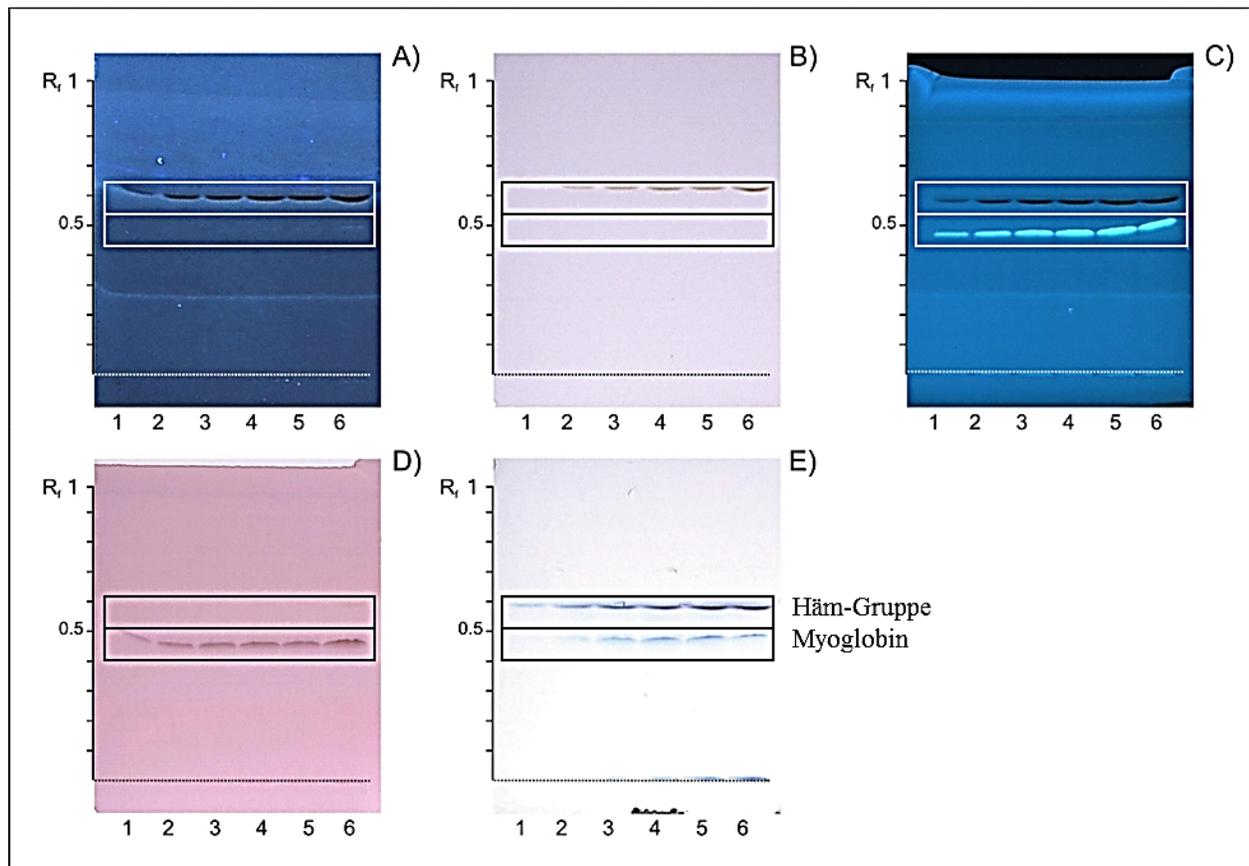


Abbildung 5-12. HPTLC-IF-Analyse von Myoglobin in Abhängigkeit vom Auftragevolumen (HPTLC-Kieselgel-Aluminiumfolien).

A [UV-Licht]; B [Weißlicht]; C [UV-Licht, Fluorescamin]; D [Weißlicht, Ninhydrin]; E [Weißlicht, IF].
 1 = Myoglobin (3 µg/Bande); 2 = Myoglobin (6 µg/Bande); 3 = Myoglobin (9 µg/Bande); 4 = Myoglobin (12 µg/Bande); 5 = Myoglobin (15 µg/Bande); 6 = Myoglobin (21 µg/Bande).

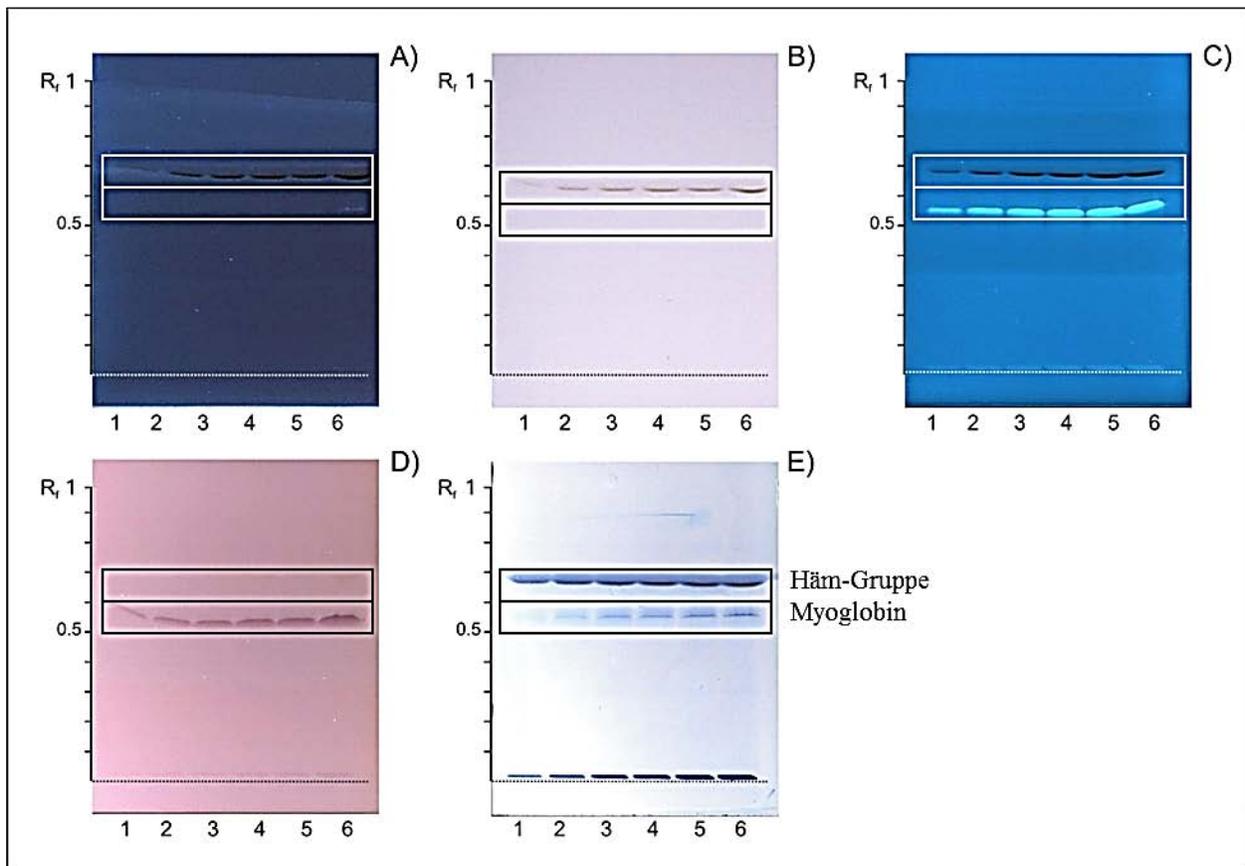


Abbildung 5-13. HPTLC-IF-Analyse von Myoglobin in Abhängigkeit vom Auftragevolumen (HPTLC-Kieselgel-Glasplatten).

A [UV-Licht], B [Weißlicht], C [UV-Licht, Fluorescamin], D [Weißlicht, Ninhydrin], E [Weißlicht, IF]. 1 = Myoglobin (3 µg/Bande); 2 = Myoglobin (6 µg/Bande); 3 = Myoglobin (9 µg/Bande); 4 = Myoglobin (12 µg/Bande); 5 = Myoglobin (15 µg/Bande); 6 = Myoglobin (21 µg/Bande).

Die Ergebnisse beider HPTLC-Schichten (Aluminiumfolie und Glasplatte) zeigen, dass die HPTLC-IF für Myoglobin auf beiden erfolgreich durchgeführt werden kann. Myoglobin zeigte unter Verwendung der chromatographischen Bedingungen eine hohe Bandenschärfe. Der R_f -Wert des Myoglobins beträgt ca. 0.60 auf HPTLC-Kieselgel-Aluminiumfolien und 0.70 auf HPTLC-Kieselgel-Glasplatten. Die kleinste, eingesetzte Menge an Myoglobin von 3 µg/Bande ist mit Fluorescamin- und Ninhydrin-Detektion gut zu erkennen. Auch die Detektion mittels Immunfärbung ist für eine Menge von 3 µg Myoglobin/Bande noch gegeben. Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass neben der Immunfärbung des Proteins auch eine Färbung der Hämgruppe stattfindet, welche schneller und intensiver als die Färbung von Myoglobin erfolgt. Der R_f -Wert der Häm-Gruppe beträgt ca. 0.45 auf HPTLC-Kieselgel-

Aluminiumfolien und 0.55 auf HPTLC-Kieselgel-Glasplatten. Betrachtet man die Immunfärbung der Myoglobin-Bande etwas genauer, ist zu erkennen, dass die Färbung hauptsächlich am oberen Rand der Bande erfolgt. Dies wird besonders deutlich, wenn man sich dazu im Vergleich die mit Fluorescamin- und Ninhydrin-gefärbten Banden anschaut. Ursache für diese Erscheinung könnte die Verteilung der Myoglobinmoleküle in der Kieselgelschicht sein. Die genaue Anordnung der Myoglobinmoleküle in der Kieselgelschicht wurde bisher nicht untersucht. Offenbar ist das Protein allerdings nicht gleichmäßig in der gesamten Bande für den primären Antikörper zugänglich, wodurch eine ungleichmäßige Detektion in der Bande zustande kommt. Diesbezüglich sind weitergehende Untersuchungen notwendig.

Die HPTLC-IF auf den hier verwendeten Kieselgel-RP-18-Phasen konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden, da Myoglobin nicht nachgewiesen wurden. Wie die Detektion mit Ninhydrin auf TLC-Kieselgel-RP-18-Aluminiumfolien zeigt (siehe **Abbildung 5-14 D**), erfolgte auf dieser Schicht eine gute Entwicklung des Proteins mit einer zufriedenstellenden Bandenschärfe. Bei Verwendung der HPTLC-Kieselgel-RP-18-Glasplatten (siehe **Abbildung 5-15 D**) wurde diese Bandenschärfe nicht erreicht. Wie schon bei den HPTLC-Kieselgel-Schichten wurde auch bei den RP-18-Schichten die Häm-Gruppe mittels IF angefärbt.

Somit sind die Kieselgel-RP-18-Schichten nicht für die HTPLC-IF geeignet. Die Ursache für dieses Ergebnis könnte in der unpolaren Beschaffenheit der stationären Phase liegen, die eine Bindung des primären Antikörpers an das Protein verhindert. Wie bereits erwähnt ist die Anordnung der Myoglobin-Moleküle in der stationären Phase nicht bekannt. Möglicherweise kommt es in der RP-18-Schicht zu einer Konformationsänderung, so dass eine Bindung des Antikörpers verhindert wird.

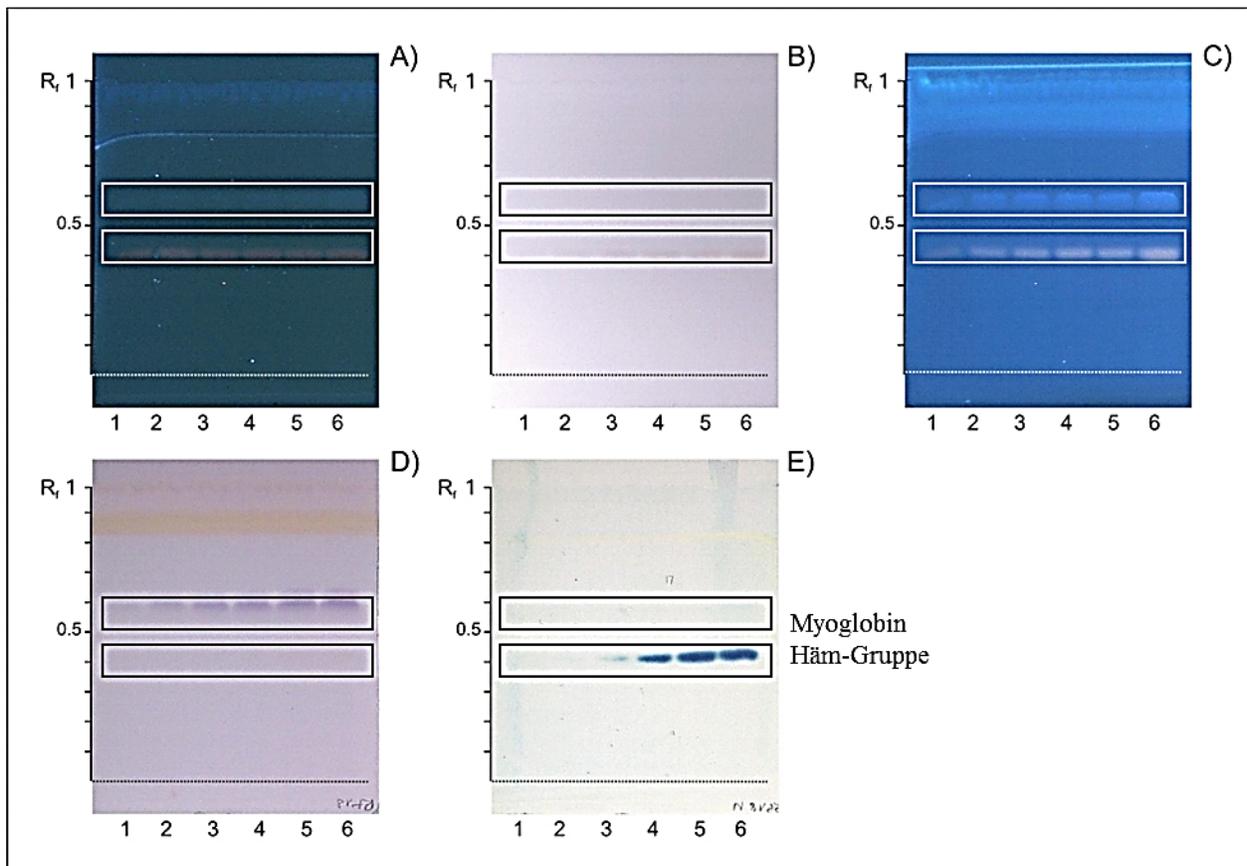


Abbildung 5-14. HPTLC-IF-Analyse von Myoglobin in Abhängigkeit vom Auftragevolumen (TLC-Kieselgel-RP-18-Aluminiumfolien).

A [UV-Licht], B [Weißlicht], C [UV-Licht, Fluorescamin], D [Weißlicht, Ninhydrin], E [Weißlicht, IF]. 1 = Myoglobin (3 µg/Bande); 2 = Myoglobin (6 µg/Bande); 3 = Myoglobin (9 µg/Bande); 4 = Myoglobin (12 µg/Bande); 5 = Myoglobin (15 µg/Bande); 6 = Myoglobin (21 µg/Bande).

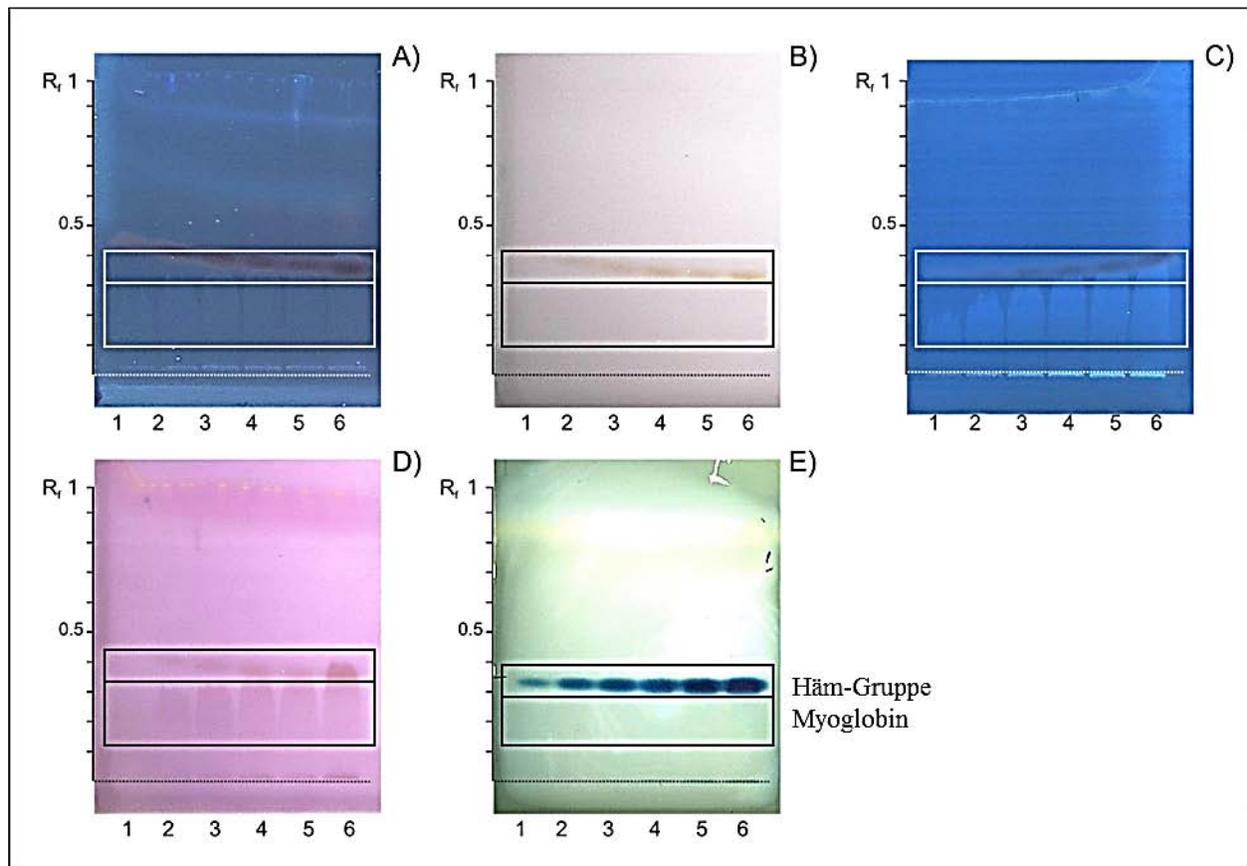


Abbildung 5-15. HPTLC-IF-Analyse von Myoglobin in Abhängigkeit vom Auftragevolumen (HPTLC-Kieselgel-RP-18-Glasplatten).

A [UV-Licht], B [Weißlicht], C [UV-Licht, Fluorescamin], D [Weißlicht, Ninhydrin], E [Weißlicht, IF]. 1 = Myoglobin (3 µg/Bande); 2 = Myoglobin (6 µg/Bande); 3 = Myoglobin (9 µg/Bande); 4 = Myoglobin (12 µg/Bande); 5 = Myoglobin (15 µg/Bande); 6 = Myoglobin (21 µg/Bande).

5.2 Methodenvergleich von HPLC-ESI/MS und HPTLC-ESI/MS zur Identifikation von Peptiden

Die Kopplung von HPTLC und ESI/MS ist noch eine recht junge Methode, die im Vergleich zur HPLC-ESI/MS nur selten in Publikationen oder Lehrbüchern auftaucht. Es gibt daher wenig Literatur, die Auskunft über experimentelle Rahmenbedingungen bezüglich der HPTLC-ESI/MS-Analyse geben kann. Um zunächst grundlegende Erkenntnisse über diese Analytik und ihre Leistungsfähigkeit im Vergleich zur etablierten HPLC-ESI/MS einzuschätzen, wurde ein Methodenvergleich vorgenommen. Dazu wurden Standardpeptide (Gly-Tyr, Val-Tyr-Val, Leucin Enkephalin, Methionin Enkephalin, Angiotensin II) mittels HPLC-ESI/MS und HPTLC-ESI/MS untersucht. Die Kopplung der HPTLC mit der MS wurde

5. Ergebnisse und Diskussion

dabei durch das kommerziell erhältliche TLC-ESI/MS-*interface* (CAMAG Chemie-Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG) realisiert.

Mittels HPTLC-ESI/MS konnten Gly-Tyr, Val-Tyr-Val und Angiotensin II erfolgreich im verwendeten chromatographischen System getrennt und massenspektrometrisch identifiziert werden. Methionin-Enkephalin und Leucin-Enkephalin wurden unter den gegebenen Bedingungen chromatographisch nicht voneinander getrennt, konnten allerdings massenspektrometrisch nachgewiesen werden. In **Tabelle 5-7** sind die Ergebnisse der chromatographischen Trennung sowie der massenspektrometrischen Identifikation der Peptide mittels HPTLC-ESI/MS aufgeführt.

Tabelle 5-7. HPTLC-ESI/MS-Analyse der Standardpeptide.

R _f -Wert	Sequenz	Peptid	m/z
0.35	DRVYIHPF	Angiotensin II	1046
0.38	GY	Glycin-Tyrosin	239
0.53	YGGFM/YGGFL	Methionin Enkephalin/Leucin Enkephalin	574/ 556
0.62	VYV	Valin-Tyrosin-Valin	380

Mittels HPLC-ESI/MS konnten Gly-Tyr, Val-Tyr-Val, Methionin-Enkephalin, Leucin-Enkephalin und Angiotensin II erfolgreich im verwendeten chromatographischen System getrennt und massenspektrometrisch identifiziert werden. In **Tabelle 5-8** sind die Ergebnisse der chromatographischen Trennung sowie der massenspektrometrischen Identifikation der Peptide mittels HPLC-ESI/MS aufgeführt.

Tabelle 5-8. HPLC-ESI/MS-Analyse der Standardpeptide.

Retentionszeit [min.]	Peptid	m/z
6	Glycin-Tyrosin	239
32	Valin-Tyrosin-Valin	380
70	Angiotensin II	1046
74	Methionin Enkephalin	574
85	Leucin Enkephalin	556

5. Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden wurde ein Methodenvergleich der Quantifizierung der Peptide Glycin-Tyrosin, Valin-Tyrosin-Valin, Methionin Enkephalin, Leucin Enkephalin und Angiotensin II vorgenommen. Der Vergleich der HPLC-Methode mit der HPTLC-Methode erfolgte hinsichtlich der Empfindlichkeit, Präzision und Reproduzierbarkeit, sowie der damit verbundenen Eignung zur Quantifizierung. Des Weiteren wurde für jedes dieser fünf Peptide die Nachweis- und Bestimmungsgrenze ermittelt und bei der Beurteilung der Leistungsfähigkeit der jeweiligen Methode herangezogen. In der **Tabelle 5-9** und der **Tabelle 5-10** sind die ermittelten Verfahrenskenndaten zur Quantifizierung der Standardpeptide mittels HPLC und HPTLC aufgeführt. Die Quantifizierung wurde bei beiden Methoden mittels UV-Detektion bei 220 nm durchgeführt.

Tabelle 5-9. Verfahrenskenndaten zur HPTLC-Methode.

Peptid	Gly-Tyr		Val-Tyr-Val		Angiotensin II	
Konzentrationsbereich [mg/mL]	0.01- 0.07	0.1-0.7	0.01- 0.07	0.1-0.7	0.01- 0.07	0.1-0.7
Normalverteilung (95 %)	ja	ja	ja	ja	ja	nein
Ausreißertest	Dixon	Dixon	Dixon	Dixon	Dixon	visuell
Ausreißer	nein	nein	nein	nein	nein	ja (bei 0.7 mg/mL)
Varianzenhomogenität (95 %)	ja	ja	ja	ja	ja	ja
Steigung [mL/mg Skt]	20070-37669					
Regressionskoeffizient	0.89-1.00					
Reststandardabweichung [Skt]	27-134 (0.01-0.07 mg/mL)					
	274-2235 (0.1-0.7 mg/mL)					
Verfahrensvariationskoeffizient	2-10 (0.01-0.07 mg/mL)					
[%]	2-35 (0.1-0.7 mg/mL)					

Tabelle 5-10. Verfahrenskennndaten zur HPLC-Methode.

Peptid	Gly-Tyr		Val-Tyr-Val		Angiotensin II	
Konzentrationsbereich [mg/mL]	0.01- 0.07	0.1- 0.7	0.01- 0.07	0.1-0.7	0.01- 0.07	0.1-0.7
Normalverteilung (95 %)	ja	ja	ja	ja	ja	ja
Ausreißertest	Dixon	Dixon	Dixon	Dixon	Dixon	Dixon
Ausreißer (99 %)	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Varianzenhomogenität (95 %)	nein	nein	ja	ja	ja	ja
Steigung [mL/mg Skt]	34330 – 68095					
Regressionskoeffizient	0.97-1.00					
Reststandardabweichung [Skt]	32-134 (0.01-0.07 mg/mL)					
	168-983 (0.1-0.8 mg/mL)					
Verfahrensvariationskoeffizient [%]	1.8-8.7 (0.01-0.07 mg/mL)					
	0.8-3.6 (0.1-0.8 mg/mL)					
Peptid	Met-Enk		Leu-Enk			
Konzentrationsbereich [mg/mL]	0.01- 0.07	0.1- 0.7	0.01- 0.07	0.1-0.7		
Normalverteilung (95 %)	ja	ja	ja	ja		
Ausreißertest	Dixon	Dixon	Dixon	Dixon		
Ausreißer	nein	nein	nein	nein		
Varianzenhomogenität (95 %)	ja	ja	ja	ja		
Steigung [mL/mg Skt]	34330 – 68095					
Regressionskoeffizient	0.97-1.00					
Reststandardabweichung [Skt]	32-134 (0.01-0.07 mg/mL)					
	168-983 (0.1-0.8 mg/mL)					
Verfahrensvariationskoeffizient [%]	1.8-8.7 (0.01-0.07 mg/mL)					
	0.8-3.6 (0.1-0.8 mg/mL)					

Der Grund für die Begrenzung auf nur einen Konzentrationsbereich ist, dass der zweite Konzentrationsbereich von 0.1 bis 0.7 mg/mL für die HPTLC-Methode zum einen nicht äquidistant ist, wie es bei der Kalibrierung erforderlich ist. Zum anderen weist dieser Bereich nicht die gleichen

Konzentrationen auf, wie der Bereich der HPLC-Methode. Dadurch liegt für beide Methoden in diesem Bereich eine unterschiedliche Anzahl an Messdaten vor, wodurch die Ergebnisse nicht mehr vergleichbar sind. Die Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen in diesem Bereich begründet sich auf einem Vorversuch, der mit einem vergleichbaren HPLC-Peptid-Standard-Mix durchgeführt wurde. Dabei konnte bereits beobachtet werden, dass für die Konzentrationen oberhalb von 0.2 mg/mL mittels der verwendeten HPTLC-Methode keine ausreichende Trennung der Banden erzielt wird. Grund dafür ist die stark zunehmende Bandenbreite in Abhängigkeit von der zunehmenden Peptid-Konzentration. Als Folge tritt eine Überlappung der Banden im Chromatogramm auf, die schließlich auch in dem Wellenlängenscan zu einem gemeinsamen stark verbreiteten Peak führt, so dass eine Kalibrierung in diesem Bereich nicht möglich ist. Insgesamt zeigt die Kalibrierung, dass für die HPTLC gleichermaßen wie für die HPLC lineare Kalibrierfunktionen erhalten wurde. Dabei waren die Messwerte für beide Methoden normalverteilt und wiesen keine Ausreißer auf.

In **Tabelle 5-11** sind die ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen beider Methoden aufgeführt.

Tabelle 5-11. Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der HPTLC und HPLC.

	Nachweisgrenze [mg/mL]		Bestimmungsgrenze [mg/mL]	
	HPTLC	HPLC	HPTLC	HPLC
Gly-Tyr	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.08 ± 0.01	0.03 ± 0.02
Val-Tyr-Val	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.11 ± 0.03	0.03 ± 0.01
Methionin Enk.	-	0.01 ± 0.00	-	0.03 ± 0.00
Leucin Enk.	-	0.01 ± 0.00	-	0.02 ± 0.01
Angiotensin II	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.13 ± 0.02	0.03 ± 0.01

Ein Vergleich der Varianzen ergab für das Peptid Valin-Tyrosin-Valin im Fall der HPTLC-Methode eine inhomogene Verteilung der Varianzen, was für eine geringe Präzision des Arbeitsbereichs spricht. Durch Verkleinerung des Arbeitsbereichs auf 0.01 - 0.06 mg/mL konnte auch für die HPTLC-Analyse Varianzenhomogenität erreicht werden.

Andererseits wies auch die HPLC-Methode für das Peptid Glycin-Tyrosin eine heterogene Varianzen-Verteilung auf, dem ebenfalls durch Verkleinerung des Arbeitsbereichs auf 0.01 - 0.05 mg/mL entgegengewirkt werden konnte. Als Fazit lässt sich somit sagen, dass beide Methoden abhängig vom Analyten ihre Grenzen bezüglich des jeweiligen Arbeitsbereichs haben. Dieser muss entsprechend für

beide Methoden vor der Durchführung einer Quantifizierung ermittelt werden. Ist der geeignete Arbeitsbereich gegeben, kann für beide Methoden von Varianzenhomogenität und somit einer vorliegenden Präzision der Messsignale ausgegangen werden. Weiterhin wurde ein Vergleich der Reststandardabweichungen der Peptid-Quantifizierung der HPLC und HPTLC vorgenommen. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 5-12** aufgeführt.

Tabelle 5-12. Vergleich der Reststandardabweichungen (s_R) der Peptid-Quantifizierung der HPLC und HPTLC.

Peptid	s_R der HPLC [Skt.]	s_R der HPTLC [Skt.]
Glycin-Tyrosin	82.18	49.20
Valin-Tyrosin-Valin	64.13	94.13
Angiotensin II	86.33	48.20

Um die Reststandardabweichung besser vergleichen zu können, wurde die Verfahrensstandardabweichung berechnet, die bei ähnlicher Reststandardabweichung die geringere Verfahrensstandardabweichung für dasjenige Verfahren liefert, dessen Empfindlichkeit höher ist. Dabei ergab sich eine Verfahrensstandardabweichung für die HPLC sowie die HPTLC von durchschnittlich 0.002 mg/mL. Folglich weisen beide Verfahren eine vergleichbare Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit für die lineare Regression auf. Zur weiteren Bewertung wurde die Verfahrensstandardabweichung auf die Mitte des Konzentrationsbereichs bezogen, wodurch ein dimensionsloses relatives Streuungsmaß erhalten wurde, welches zur besseren Bewertung der Streuung der Messwerte geeignet ist. Der daraus erhaltene Verfahrensvariationskoeffizient wies dabei für die HPTLC-Methode (5.6 %) im Durchschnitt höhere Werte auf als für die HPLC-Methode (4.1 %). Folglich wäre die HPLC das Robustere der beiden Verfahren, welches eine geringere Streuung der Messwerte aufweist und folglich durch evtl. variierende Bedingung in geringerem Maße zu verfälschten Ergebnissen führen würde. Des Weiteren lieferte die HPLC-Analyse sowohl niedrigere Nachweis- als auch Bestimmungsgrenzen gegenüber der HPTLC-Analyse, womit die HPLC-Methode in der Lage ist niedrigere Konzentrationen nachzuweisen und zu quantifizieren.

Zusammenfassend kann den statistischen Kenndaten der Kalibrierung entnommen werden, dass auch mittels der HPTLC-Analytik eine Quantifizierung von Peptiden möglich ist. Die Linearität der Kalibrierfunktion ist für bestimmte Konzentrationsbereiche gegeben. Dabei ist allerdings abhängig vom

Analyten stets ein entsprechender Arbeitsbereich einzustellen, um eine ausreichende Präzision des Verfahrens zu gewährleisten. Dies gilt gleichermaßen für die HPLC wie auch für die HPTLC. Die Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit für die lineare Regression liefern dabei vergleichbare Ergebnisse. Allerdings stellt die HPLC ein robusteres Verfahren dar, das bei variierenden Bedingungen geringeren Schwankungen unterliegt. Des Weiteren bietet die HPLC den Vorteil der niedrigeren Nachweis- und Bestimmungsgrenze gegenüber der HPTLC. Nichtsdestotrotz kann auch die HPTLC als eine ausreichend leistungsstarke Methode bewertet werden.

5.3 Charakterisierung der unverdauten Phenol-Protein-Derivate

5.3.1 Bestimmung des Molekulargewichts mittels SDS-PAGE

Die SDS-PAGE ist ein traditionelles, analytisches Verfahren zur Bestimmung der Molmasse von Proteinen. Folglich lassen sich damit auch durch die Reaktion von phenolischen Verbindungen und Proteinen verursachte Veränderungen der Molmassen analysieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode angewendet, um zunächst eine generelle Aussage zur Veränderung der Proteine durch die eingesetzten phenolischen und verwandten Verbindungen treffen zu können.

Dazu wurden zunächst die reinen, einer Oxidation unterzogenen phenolischen und verwandten Verbindungen (ohne Proteinzusatz) analysiert (siehe **Abbildung 5-16**). Es ist zu erkennen, dass Kaffeesäure, Gallussäure und Tanninsäure unter oxidativen Bedingungen zur Polymerisation neigen. Dieser Aspekt wurde bereits in **Kapitel 2.1.1.6.2** beschrieben. Die im basischen Milieu gebildeten reaktiven quinoiden und semiquinoiden Spezies verbinden sich zu höhermolekularen Polymerisationsprodukten, welche mittels SDS-PAGE detektiert wurden (Cilliers und Singleton 1991; Rawel und Rohn 2010). Wie in **Abbildung 5-16** zu erkennen, liegen ihre Molekulargewicht zwischen 2.5 und 10 KDa.

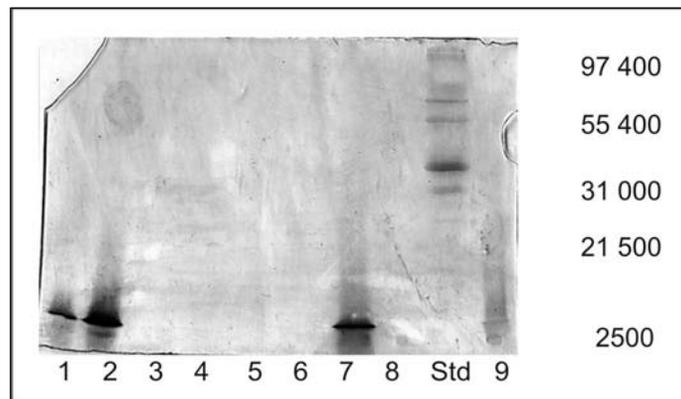


Abbildung 5-16. SDS-PAGE-Analyse der phenolischen Verbindungen ohne Proteinzusatz.

1 = Tanninsäure; 2 = Gallussäure; 3 = Sinapinsäure; 4 = *p*-Cumarsäure; 5 = Syringasäure; 6 = Chinasäure; 7 = Kaffeesäure; 8 = Ferulasäure; 9 = Kontrolle.

Die SDS-PAGE-Analyse der Myoglobin-Derivate (siehe **Abbildung 5-17**), Lysozym-Derivate (siehe **Abbildung 5-18**), Ovalbumin-Derivate (siehe **Abbildung 5-19**) und Casein-Derivate (siehe **Abbildung 5-20**) zeigt, dass die Reaktionen mit Kaffeesäure, Gallussäure und Tanninsäure zu höhermolekularen Reaktionsprodukten führt. Dabei scheint Myoglobin in Verbindung mit den genannten Phenolsäuren zu einer besonders intensiven Polymerisation zu neigen. Die Ergebnisse zeigen eine über den gesamten Massenbereich (bis 100 KDa) gezogene intensiv dunkelgefärbte Bande. Die Identifikation einzelner, scharfer Banden ist nicht möglich. Lysozym zeigt im Vergleich zu Myoglobin eine weniger ausgeprägte Reaktion mit Kaffeesäure, Gallussäure und Tanninsäure, wobei die Reaktionsprodukte in einer intensiven, breiten Bande im Massenbereich von ca. 20 bis 30 KDa zu sehen sind. Schwächere Banden im Massenbereich von 30 bis 50 KDa sind ebenfalls erkennbar. Gallussäure scheint weniger stark mit Lysozym zu reagieren als Kaffee- und Tanninsäure. Die Reaktion der genannten phenolischen Verbindungen und Ovalbumin führt zur Entstehung von höhermolekularen Reaktionsprodukten im Bereich von ca. 50 bis 60 KDa und im Bereich von 90 bis 100 KDa. Gallussäure scheint dabei zu einer ausgeprägteren Polymerisation zu neigen als Kaffee- und Tanninsäure. Betrachtet man die Ergebnisse der Casein-Derivate zeigt die Reaktion mit Kaffeesäure Reaktionsprodukte im Bereich von 30 bis 100 KDa, ohne dass einzelne Banden erkennbar sind. Die Reaktionsprodukte von Gallus- und Tanninsäure mit Casein zeigen differenziertere Banden im Bereich von 30 bis 40 KDa und 60 bis 100 KDa.

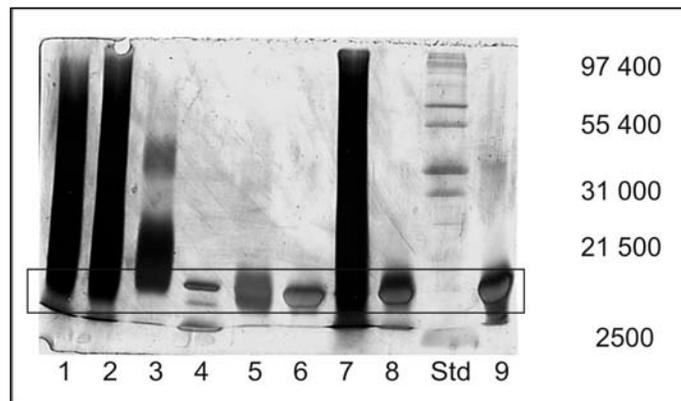


Abbildung 5-17. SDS-PAGE-Analyse von Myoglobin-Derivaten in Abhängigkeit von den eingesetzten phenolischen und verwandten Verbindungen.

1 = Tanninsäure; 2 = Gallussäure; 3 = Sinapinsäure; 4 = *p*-Cumarsäure; 5 = Syringasäure; 6 = Chinasäure; 7 = Kaffeesäure; 8 = Ferulasäure; 9 = Myoglobin-Kontrolle

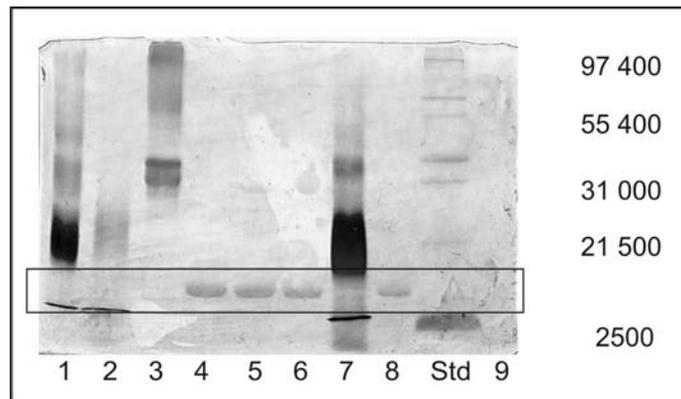


Abbildung 5-18. SDS-PAGE-Analyse von Lysozym-Derivaten in Abhängigkeit von den eingesetzten phenolischen und verwandten Verbindungen.

1 = Tanninsäure; 2 = Gallussäure; 3 = Sinapinsäure; 4 = *p*-Cumarsäure; 5 = Syringasäure; 6 = Chinasäure; 7 = Kaffeesäure; 8 = Ferulasäure; 9 = Lysozym-Kontrolle.

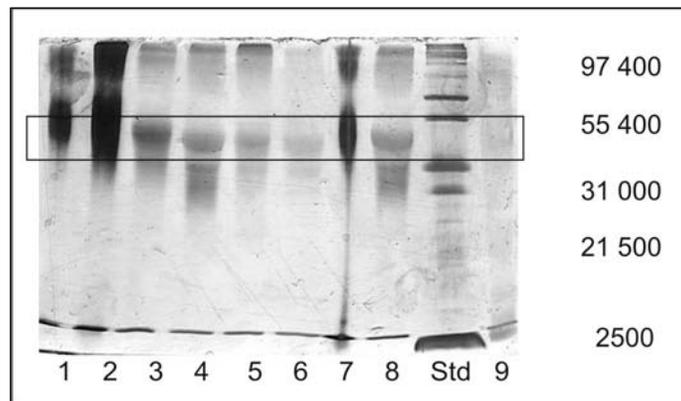


Abbildung 5-19. SDS-PAGE-Analyse von Ovalbumin-Derivaten in Abhängigkeit von den eingesetzten phenolischen und verwandten Verbindungen. 1 = Tanninsäure; 2 = Gallussäure; 3 = Sinapinsäure; 4 = *p*-Cumarsäure; 5 = Syringasäure; 6 = Chinasäure; 7 = Kaffeesäure; 8 = Ferulasäure; 9 = Ovalbumin-Kontrolle

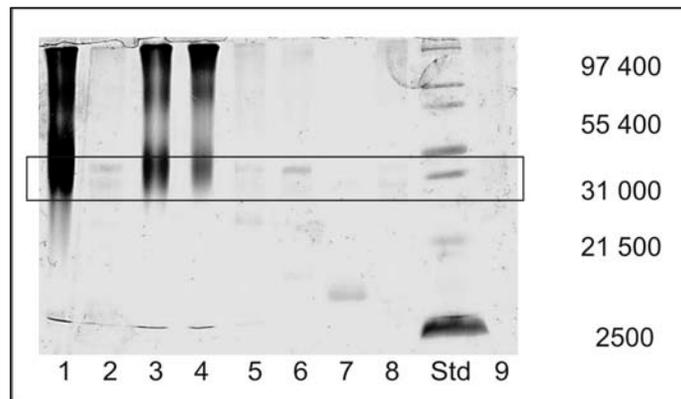


Abbildung 5-20. SDS-PAGE-Analyse (Elektropherogramme) von Casein-Derivaten in Abhängigkeit von den eingesetzten phenolischen und verwandten Verbindungen. 1 = Kaffeesäure; 2 = Ferulasäure; 3 = Gallussäure; 4 = Tanninsäure; 5 = Syringasäure; 6 = Chinasäure; 7 = Sinapinsäure; 8 = *p*-Cumarsäure; 9 = Casein-Kontrolle

Die Ergebnisse der SDS-PAGE für die Reaktion der Modellproteine mit Kaffee-, Gallus- und Tanninsäure zeigen, dass diese Verbindungen zu einer Bildung von höhermolekularen Phenol-Protein-Reaktionsprodukten führen. Ursache für diese höhermolekularen Verbindungen ist vermutlich die Ausbildung von Proteinquervernetzungen (vgl. **Kapitel 2.1.1.6.3.2**) (Rawel und Rohn 2010). Dabei kann die unterschiedliche Aminosäuresequenz der Proteine einen Einfluss auf die Intensität der Produktbildung ausüben (Myoglobin zeigt eine stärkere Reaktion als Lysozym, vgl. **Tabelle 4-2**). Dennoch ist keine spezifische Aussage über das Molekulargewicht dieser Reaktionsprodukte möglich. Denn die SDS-PAGE

führt zu einer schlechten Trennung der Reaktionsprodukte in differenzierte Banden. Die SDS-PAGE ist demnach nur bedingt zur Analyse dieser hochmolekularen Reaktionsprodukte geeignet.

Die Reaktion der Modellproteine mit Sinapinsäure zeigt ebenfalls eine Tendenz zur Bildung höhermolekularer Reaktionsprodukte. Allerdings ist die Reaktivität nicht so stark ausgeprägt wie bei Kaffee-, Gallus- und Tanninsäure. Die Reaktion von Myoglobin und Sinapinsäure führte zu der Entstehung von Reaktionsprodukten im Bereich 20-30 KDa sowie 40-50 KDa. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Derivatisierung durch Kaffee-, Gallus- und Tanninsäure sind bei den Ergebnissen von Sinapinsäure zwei klar voneinander abgetrennte Bereiche erkennbar.

Die Ergebnisse der restlichen Verbindungen (China-, Ferula-, *p*-Cumar- und Syringasäure) lassen vermuten, dass diese Verbindungen zu keiner oder nur geringen Veränderung der Modellproteine führen. Hier sei nur die Reaktion von Myoglobin und *p*-Cumarsäure zu nennen, die zu drei klar voneinander abgegrenzten Reaktionsprodukten im Bereich von 5 bis 20 KDa führt.

Anhand der Ergebnisse der SDS-PAGE-Analyse kann die Reihenfolge der Reaktivität der hier verwendeten phenolischen/verwandten Verbindungen gegenüber den Modellproteinen wie folgt festgelegt werden: Tanninsäure \approx Gallussäure \approx Kaffeensäure $>$ Sinapinsäure $>$ *p*-Cumarsäure \approx Syringasäure $>$ Ferulasäure $>$ Chinasäure. Die Reihenfolge ist dabei auf die Fähigkeit zur Bildung chinoider bzw. semichinoider Spezies zurück zu führen. Eine ausführliche Diskussion dazu erfolgt in **Kapitel 6**.

5.3.2 Bestimmung des Molekulargewichts mittels MALDI/TOF/MS

Bei der Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen mittels MALDI/TOF/MS handelt es sich ebenfalls um eine traditionelle Methode zur Proteinanalytik. Im Gegensatz zur SDS-PAGE lässt die MALDI/TOF/MS-Analyse eine genauere Bestimmung des Molekulargewichtes zu, wobei die Auswahl der Matrix, in der die Probe vor der Messung eingebettet wird, einen entscheidenden Einfluss auf das Analyseergebnis hat. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst untersucht, welche Matrix für die Analyse von Phenol-Protein-Derivaten am besten geeignet ist.

Tabelle 5-13. Ergebnisse zur Untersuchung der Messbarkeit der analysierten Phenol-Protein-Derivate bei der Verwendung unterschiedlicher MALDI-Matrices (vgl. **Kapitel 4.3.5**).

Probe	2,5-DHAP	2,5-DHB	SA	SADL	HCCA	TFA	Ohne Matrix
Myoglobin	++	+	-	+/-	+/-	-	-
Myoglobin-Derivate	++	+	-	+/-	+/-	-	-
Lysozym	++	+	-	+	ng	-	-
Lysozym-Derivate	++	+	-	+	ng	-	-
Ovalbumin	-	+	-	ng	ng	-	-
Ovalbumin-Derivate	+	+	-	ng	ng	-	-
Casein	+	+	+	+	ng	-	-
Casein-Derivate	++	+	+	+	ng	-	-
Andere Proteine	+	+	+	+	ng	-	-
Andere Protein-Derivate	+	+	+	+	ng	-	-

ng: nicht getestet; ++: sehr gut; +: gut; +/-: mittel; -: schlecht

Die in **Tabelle 5-13** gegebenen Beschreibungen beruhen auf der Betrachtung der aus der Messung hervorgegangenen Massenspektren. Eine sehr gute Messbarkeit (++) steht dabei für scharfe Peaks hoher Intensität, eine gute Messbarkeit (+) bedeutet den Erhalt von Peaks mittlerer Intensität (im Vergleich zu einer sehr guten Messbarkeit), eine mittlere Messbarkeit (+/-) steht für den Erhalt von Peaks geringer Intensität (im Vergleich zu einer sehr guten und guten Messbarkeit) und eine schlechte Messbarkeit (-) für keine auswertbaren Massenspektren (keine Signale erkennbar). Beispielhaft sind die Ergebnisse der Messung von Myoglobin mit den Matrices SA, 2,5-DHB und 2,5 DHAP in **Abbildung 5-21** dargestellt. Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass die Matrix einen Einfluss auf die Signalintensität und die Genauigkeit des m/z -Signals ausübt. Die Verwendung von 2,5-DHAP zeigte für die Messung von Myoglobin das intensivste Signal sowie die beste Übereinstimmung des m/z -Signals (beobachtet: 16 982 Da; berechnet: 16951 Da vgl. **Tabelle 4-3**). Daher wurde die Matrix 2,5-DHAP für die weiteren Messungen eingesetzt.

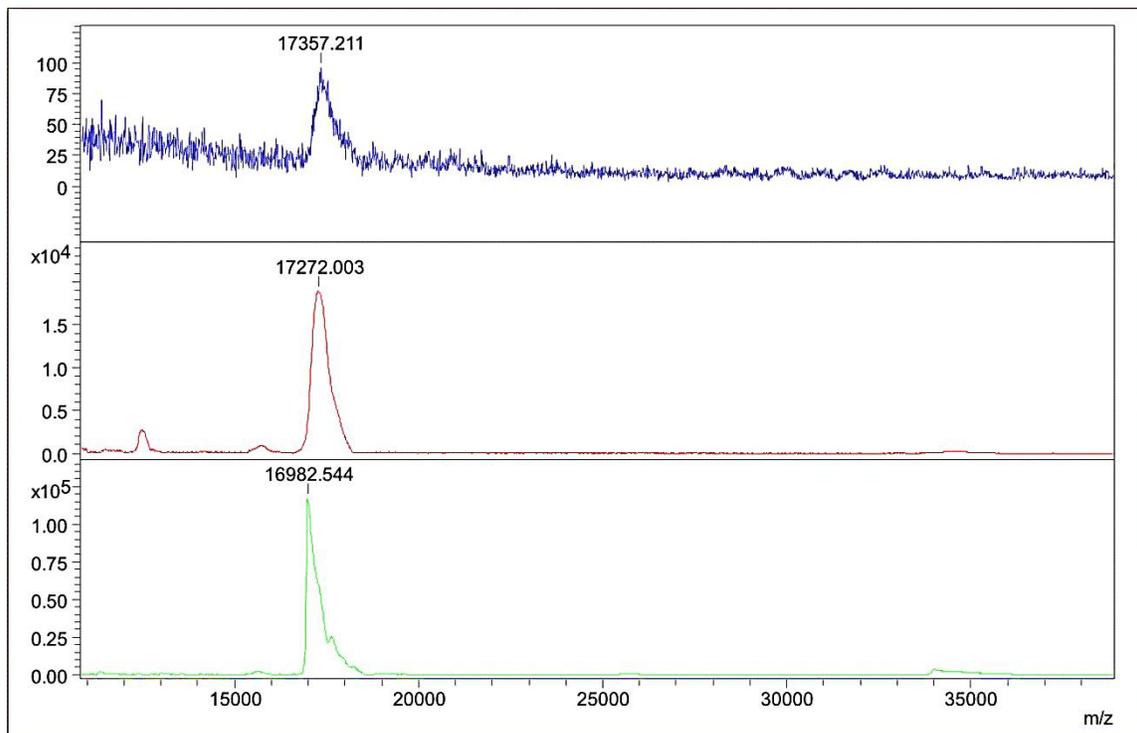


Abbildung 5-21. Ergebnisse der MALDI/TOF/MS-Analyse von Myoglobin unter Verwendung verschiedener Matrices. (■) = SA; (■) = 2,5-DHB; (■) = 2,5-DHAP.

In **Abbildung 5-22** sind die Ergebnisse der MALDI/TOF/MS-Analyse der Kaffeesäure-Myoglobin-Derivate dargestellt (vgl. **Kapitel 4.2.1** und **4.3.5**). Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, dass mit steigender Myoglobin- und Kaffeesäurekonzentration eine Massenverschiebung um bis zu 1.2 KDa auftritt. Das Ausmaß der Reaktion scheint somit konzentrationsabhängig zu sein. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Reaktion von Myoglobin mit Kaffeesäure zu einer Peakverbreiterung und zu einer Intensitätsminderung des m/z -Signals führt, welche eine genaue Bestimmung des Molekulargewichts der Reaktionsprodukte erschwert. Höhermolekulare Reaktionsprodukte, welche bei der SDS-PAGE-Analyse beobachtet wurden (vgl. **Kapitel 5.3.1**), traten innerhalb der MALDI/TOF/MS-Analyse nicht in Erscheinung.

Betrachtet man die Ergebnisse der MALDI/TOF/MS-Analyse der Myoglobin-Derivate (siehe **Abbildung 5-24**) wird deutlich, dass die Reaktionen mit Tannin-, Gallus-, Kaffee-, Sinapin-, Syringa- und Ferulasäure zu einer Intensitätsminderung als auch Peakverbreiterung führen. Wie schon bei der Betrachtung der Kaffeesäure-Myoglobin-Derivate kann auch hier aufgrund der schlechten Auflösung keine genaue

Aussage über das Molekulargewicht getroffen werden. Betrachtet man die Reaktivität der unterschiedlichen phenolischen und verwandten Verbindungen gegenüber Myoglobin scheinen die Ergebnisse der MALDI/TOF/MS-Analyse die Ergebnisse aus der SDS-PAGE-Analyse zu bestätigen.

Hinsichtlich der Ergebnisse der MALDI/TOF/MS-Analyse der Lysozym-Derivate (siehe **Abbildung 5-24**) wird deutlich, dass die Reaktion mit Tannin-, Gallus-, Kaffeesäure, ähnlich zu den Ergebnissen von Myoglobin, zu einer Intensitätsminderung führen. Die geringe Signalintensität und die geringe Auflösung lassen nur schwer eine genaue Aussage über das Molekulargewicht zu. Im Unterschied dazu kann bei der Betrachtung der Ergebnisse für China-, p-Cumar-, Ferula- und Sinapinsäure eine steigende Signalintensität sowie bei Syringasäure eine gleichbleibende Signalintensität beobachtet werden. Weiterhin zeichnen sich differenzierte Signale der entstandenen Reaktionprodukte ab. In **Tabelle 5-14** sind die gemessenen m/z -Signale für die Reaktion von Lysozym und den verwendeten phenolischen/verwandten Verbindungen aufgeführt. Betrachtet man die Reaktivität der unterschiedlichen phenolischen und verwandten Verbindungen gegenüber Lysozym scheinen die Ergebnisse der MALDI/TOF/MS-Analyse die Ergebnisse aus der SDS-PAGE-Analyse zu bestätigen.

5. Ergebnisse und Diskussion

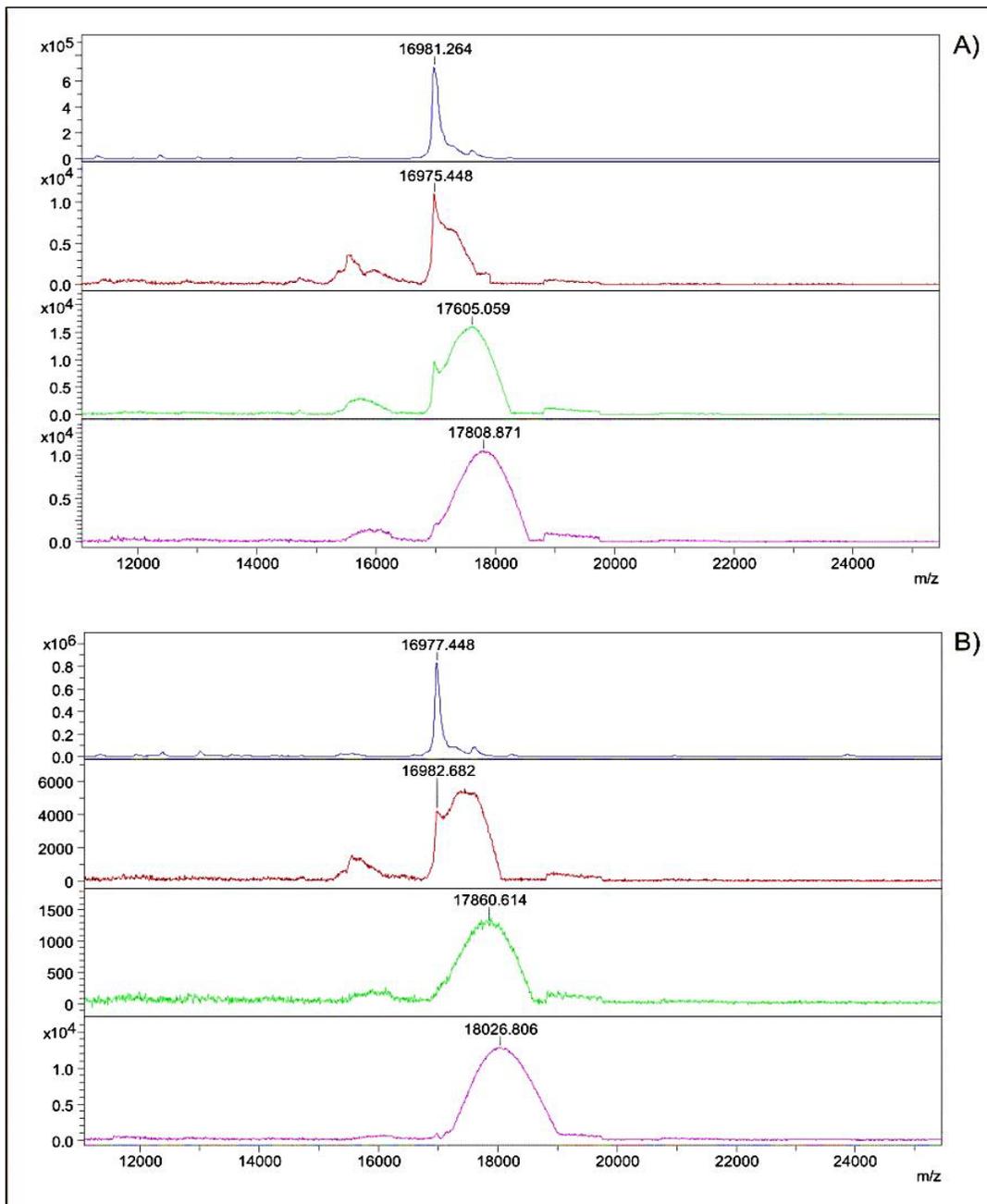


Abbildung 5-22. MALDI/TOF/MS-Analyse der Myoglobin-Kaffeensäure-Derivate.

Matrix: 2,5-DHAP. A [c_{Myoglobin} = 1 mg/mL], B [c_{Myoglobin} = 2 mg/mL]. (■) = Kontrolle (behandelt); (■) = 0.25 mM Kaffeensäure; (■) = 0.50 mM Kaffeensäure; (■) = 0.75 mM Kaffeensäure.

5. Ergebnisse und Diskussion

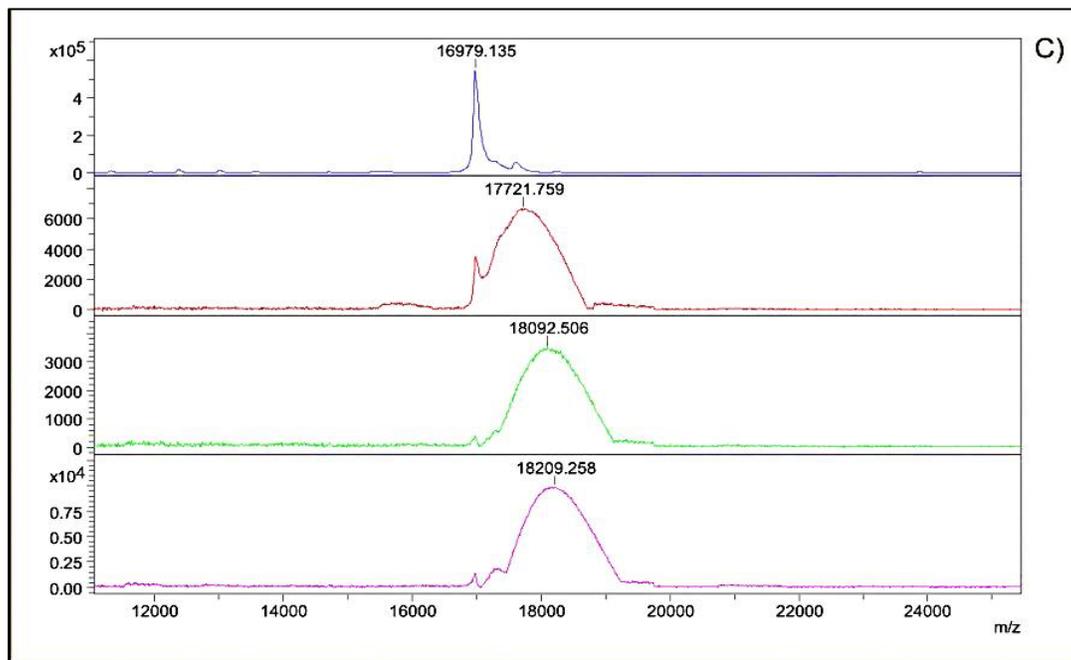


Abbildung 5-23. MALDI/TOF/MS-Analyse der Myoglobin-Kaffeensäure-Derivate. Matrix: 2,5-DHAP. C [$c_{\text{Myoglobin}} = 3 \text{ mg/mL}$]. (■) = Kontrolle (behandelt); (■) = 0.25 mM Kaffeensäure; (■) = 0.50 mM Kaffeensäure; (■) = 0.75 mM Kaffeensäure.

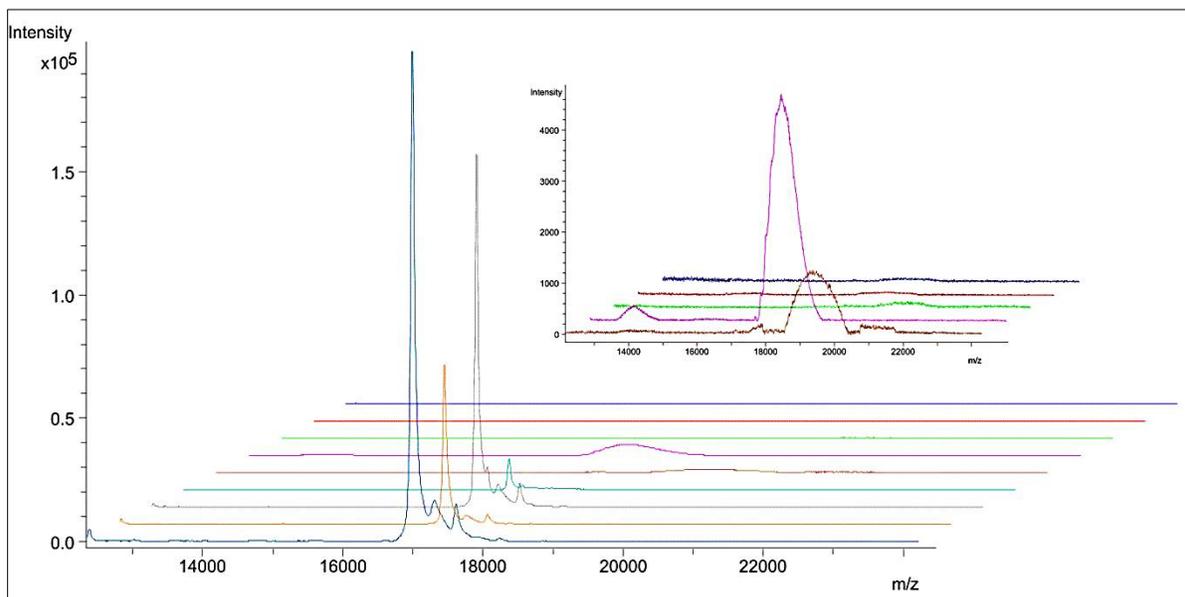


Abbildung 5-24. MALDI/TOF/MS-Analyse der Myoglobin-Derivate. (■) = Kontrolle (behandelt); (■) = D-Chinasäure; (■) = p -Cumarsäure; (■) = Ferulasäure; (■) = Sinapinsäure; (■) = Syringensäure; (■) = Kaffeensäure; (■) = Gallussäure; (■) = Tanninsäure.

5. Ergebnisse und Diskussion

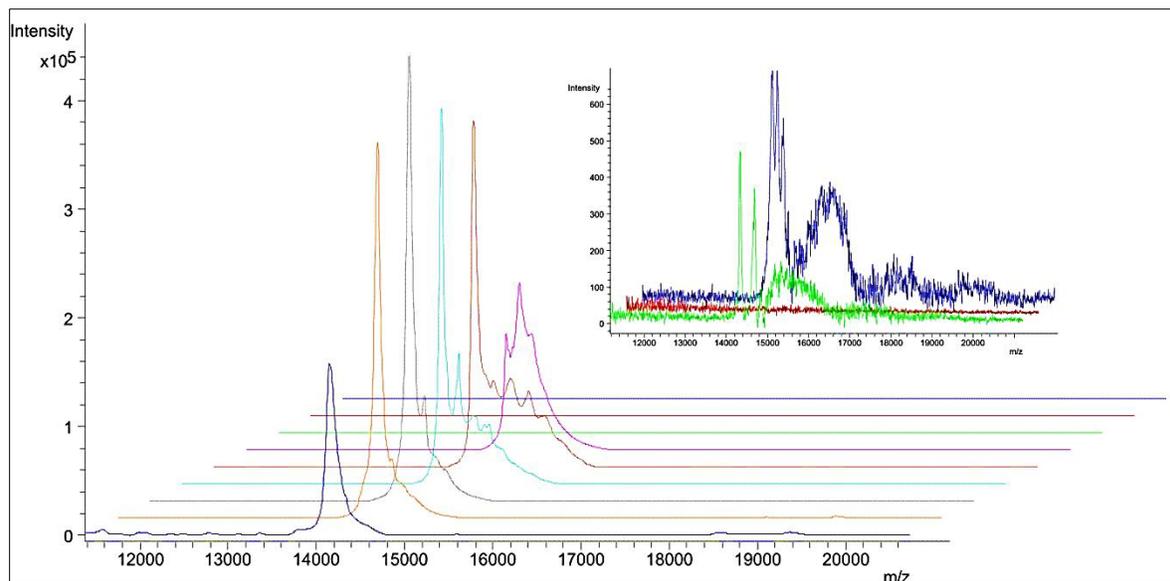


Abbildung 5-25. MALDI/TOF/MS-Analyse der Lysozym-Derivate.

(■) = Kontrolle (behandelt); (■) = D-Chinasäure; (■) = *p*-Cumarsäure; (■) = Ferulasäure; (■) = Sinapinsäure; (■) = Syringasäure; (■) = Kaffeesäure; (■) = Gallussäure; (■) = Tanninsäure.

Tabelle 5-14. MALDI/TOF/MS-Analyse der Lysozym-Derivate.

Protein	Modifiziert mit	gemessen MH+	Intensität [a.u.]	S/N ratio	Differenz [Da]
Lysozym		14148.347	157595.00	303.9	
D-Chinasäure		14333.300	345846.25	792.7	184.953
		14494.129	54574.25	125.1	345.782
<i>p</i> -Cumarsäure		14330.458	409357.25	1343.7	182.111
		14502.628	97202.25	319.1	354.281
		14623.188	41194.25	136.6	474.841
		14688.958	31678.25	105.0	540.611
		14737.184	29154.25	96.7	588.837
Ferulasäure		14333.016	346583.00	969.2	184.669
		14530.779	119974.00	335.5	382.432
		14695.055	63482.00	179.6	546.708
		14724.129	62622.00	177.1	575.782
		14821.720	54749.00	154.9	673.373
		14871.427	55397.00	156.7	723.08
		14994.568	33548.00	95.6	846.221
Sinapinsäure		15021.331	32712.00	93.5	872.984
		14337.874	318922.00	914.0	189.527
		14470.394	85506.00	245.0	322.047
		14559.538	8+899.00	228.7	411.191
		14751.217	82120.00	238.7	602.87
	14963.883	70014.00	205.7	815.536	

Protein	Modifiziert mit	gemessen MH+	Intensität [a.u.]	S/N ratio	Differenz [Da]
		15140.685	47346.00	139.1	992.338
		15350.065	22904.00	67.9	1201.718
	Syringasäure	14331.901	107075.00	607.2	183.554
		14358.628	92874.00	526.7	210.281
		14403.237	95040.00	539.0	254.89
		14482.907	153890.00	872.7	334.56
		14619.435	107232.00	613.4	471.088
	Kaffeesäure	14336.396	463.00	7.9	188.049
		14682.832	370.50	6.4	534.485
		14859.560	99.75	1.7	711.213
	Gallussäure	-	-	-	-
	Tanninsäure	14322.701	575.75	10.8	174.354
		14465.339	666.00	12.5	316.992
		14607.995	515.50	9.8	459.648
		14727.748	255.00	4.9	579.401

Die Ergebnisse der MALDI/TOF/MS-Analyse der Casein- und der Ovalbumin-Derivate stimmen im Wesentlichen mit denen der Myoglobin-Derivate überein. Allerdings erwiesen sich Casein und Ovalbumin als nicht gut für die MALDI/TOF/MS-Analyse geeignet. Die Messung der Protein-Kontrollen und der Proteinderivate führte zu unbefriedigenden Massenspektren. Die Ursache dafür lag vermutlich in der Wahl der Matrix und in der Probenpräparation. Diesbezüglich sind weitere Versuche erforderlich um die Messbarkeit dieser Proteine unter den gegebenen Bedingungen zu verbessern.

5.3.3 Bestimmung des Molekulargewichts mittels HPTLC-MALDI/TOF/MS

Bei der HPTLC-MALDI/TOF/MS handelt es sich um die Kopplung der HPTLC und der MALDI/TOF/MS (vgl. **Kapitel 2.2.1.4.2.2**). Dabei erfolgt vor der MALDI/TOF/MS-Analyse, die im Wesentlichen mit der üblichen MALDI/TOF/MS-Analyse übereinstimmt, eine chromatographische Trennung mittels HPTLC. Komplexe Probengemische werden demnach zunächst in ihre Bestandteile getrennt und anschließend massenspektrometrisch analysiert. Durch diese experimentelle Anordnung ergeben sich Vorteile gegenüber der üblichen MALDI/TOF/MS-Analyse, die besonders im Falle der Analyse der hier behandelten Phenol-Protein-Derivate von großem Nutzen sein können. Wie in **Kapitel 5.3.2** beschrieben führte die Reaktion der phenolischen/verwandten Verbindungen in manchen Fällen zu einer Signalverminderung sowie Peakverbreiterung im Massenspektrum. Der Einsatz unterschiedlichster Matrices führte zu keiner Verbesserung. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit geprüft werden, ob eine chromatographische Trennung der Reaktionsprodukte die Messbarkeit verbessert. Weiterhin bestand die Vermutung, dass sich die Kieselschicht, die hier als *target* genutzt wird, positiv auf die Ionisierung der

Probenmoleküle auswirken könnte. Daher wurde diese Technik auf ausgewählte Myoglobin-Derivate angewendet.

In **Abbildung 5-26** sind die Ergebnisse der HPTLC-Analyse der *p*-Cumarsäure-, Ferulasäure- und Syringasäure-Derivate sowie der Kontrolle von Myoglobin dargestellt (vgl. **Kapitel 4.3.1**). Die Ergebnisse der HPTLC wurden mittels UV 366 nm unterivatisiert (siehe **Abbildung 5-26 A**), mittels Weißlicht (siehe **Abbildung 5-26 B**), mittels UV 366 nm nach Derivatisierung mit Fluorescamin (**Abbildung 5-26 C**) und mittels Weißlicht nach Derivatisierung mit Ninhydrin (siehe **Abbildung 5-26 D**) detektiert. Bei der Detektion der Kontrolle sowie des *p*-Cumarsäure- und des Ferulasäure-Derivats mittels UV Licht unterivatisiert sowie nach den Derivatisierungen mit Fluorescamin und Ninhydrin ist Myoglobins als Bande mit einem R_f -Wert von ca. 0.25 erkennbar. Weiterhin zeigt sich bei einem R_f -Wert von ca. 0.60 die braungefärbte Bande der Hämgruppe, die im Myoglobin-Molekül für die Sauerstoffbindung verantwortlich ist. Bei der Detektion mittels UV 366 nm nach Fluorescamin-Derivatisierung zeigen sich neben der Bande des Myoglobins Banden, bei denen es sich vermutlich um niedermolekulare Peptid-Bruchstücke handelt, welche durch die Probenbehandlung bzw. durch die Reaktion mit Ferula- und *p*-Cumarsäure entstanden sind. Das Syringasäure-Derivat zeigt weder bei der UV-Detektion unterivatisiert noch nach Fluorescamin- und Ninhydrinderivatisierung eine Myoglobin-Bande. Auch die Bande der Häm-Gruppe ist nicht erkennbar. Bei der Detektion mittels UV 366 nm unterivatisiert ist eine langgezogene, UV-aktive Bande im R_f -Bereich von 0-0.60 erkennbar, welche ebenfalls im R_f -Bereich von 0.30-0.50 mittels Ninhydrin detektiert wurde.

Generell lässt sich anhand der HPTLC-Ergebnisse feststellen, dass Syringasäure im Vergleich zu *p*-Cumar- und Ferulasäure eine stärkere Reaktivität gegenüber Myoglobin zeigt. Diese Tendenz wurde schon in der SDS-PAGE-(vgl. **Kapitel 4.3.4**) und in der MALDI/TOF/MS-Analyse (vgl. **Kapitel 4.3.5**) beobachtet und wird hiermit nochmals bestätigt. In Ergänzung zu diesen Ergebnissen kann weiterhin festgestellt werden, dass die Reaktion mit Syringasäure zu einer Beeinflussung der Aminogruppen geführt hat, die normalerweise zu einer Detektion mit Fluorescamin und Ninhydrin führen. Daher können die Reaktionsprodukte nicht bzw. nur mäßig mit Fluorescamin und Ninhydrin detektiert werden. Zudem hat die Reaktion mit Syringasäure zu einer Veränderung der Polarität geführt. Diese Veränderung hat eine Verschiebung des R_f -Wertes zur Folge. Weiterhin kam es bedingt durch die Reaktion mit Syringasäure zu einer Beeinflussung der UV-Aktivität, zu erkennen anhand der breiten UV aktiven Bande (siehe **Abbildung 5-26 A Bahn 4**).

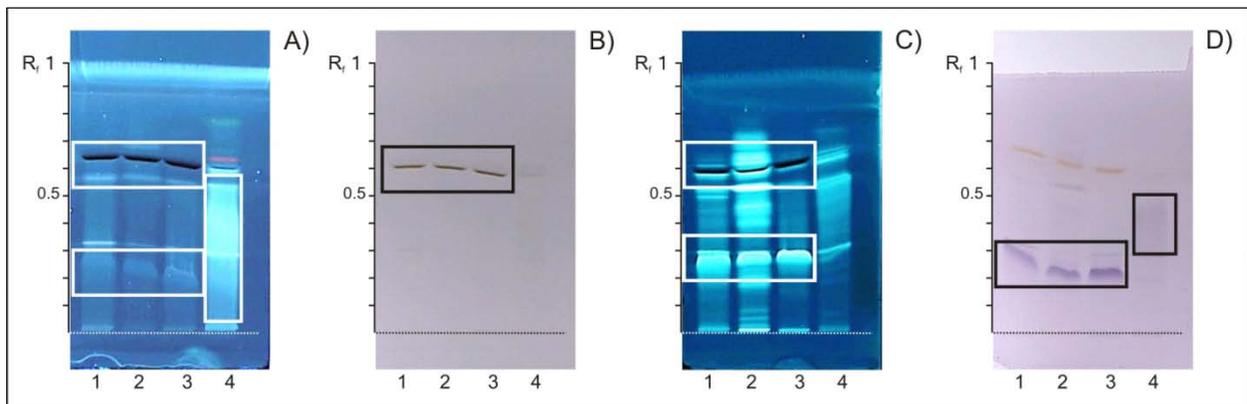


Abbildung 5-26. HPTLC-Analyse der Myoglobin-Derivate in Abhängigkeit von den eingesetzten phenolischen Verbindungen. A [UV-Licht], B [Weißlicht], C [UV-Licht, Fluorescamin], D [Weißlicht, Ninhydrin]. 1 = Kontrolle (behandelt); 2 = *p*-Cumarsäure; 3 = Ferulasäure; 4 = Syringasäure.

Die HPTLC-Platte wurde postchromatographisch und underivatisiert zur MALDI/TOF/MS-Analyse eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in **Abbildung 5-27** dargestellt. Die Software SurveyViewer (BRUKER DALTONIK GmbH) erlaubt die Darstellung der Ergebnisse in einem sog. 2D-*density plot*. In dieser Darstellung werden auf der x-Achse die *m/z*-Werte angezeigt. Die linke y-Achse kann als R_f-Wert Skala angesehen werden. Allerdings wird die Plattenhöhe, d.h. die Distanz vom unteren Plattenrand bis zum gemessenen *m/z*-Signal nicht als R_f-Wert sondern als Höhe in mm angegeben. Die rechte y-Achse stellt die Intensität des *m/z*-Signals auf einer Farbskala dar.

In **Abbildung 5-28** sind die detektierten *m/z*-Signale mit den dazugehörigen Banden auf der HPTLC-Platte dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Messung von Myoglobin mittels HPTLC-MALDI/TOF/MS erfolgreich durchgeführt werden konnte. Es wurden *m/z*-Signale für das Myoglobin-Monomer und für das Myoglobin-Dimer erhalten. Wie schon bei der Betrachtung der Ergebnisse der HPTLC vermutet, hat die Reaktion mit *p*-Cumar- und mit Ferulasäure zu keiner bzw. nur zu einer geringen Modifikation des Proteins geführt. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der Analyse des Syringasäure-Derivats. Die Analyse der bereits erwähnten, breiten UV-aktiven Bande (siehe **Abbildung 5-26 A Bahn 4**), die bei der Detektion mittels UV 366 nm der underivatisierten HPTLC-Platte beobachtet wurde, ergab *m/z*-Signale im Bereich von 17 bis 19 KDa (siehe **Abbildung 5-28 D**). Bei diesen handelt es sich vermutlich um Reaktionsprodukte des Myoglobin und Syringasäure, welche wie bereits erwähnt nicht mit den üblichen Protein-Derivatisierungsreagenzien detektiert werden konnten. Weiterhin zeigt

Abbildung 5-28 D, dass die Reaktionsprodukte mit steigendem R_f -Wert ein höheres Molekulargewicht aufweisen.

Die Peakverbreiterung sowie die Minderung der Signalintensität, die schon bei den MALDI/TOF/MS-Experimenten beobachtet wurde, trat hier ebenfalls auf. Daher sind fortführende Untersuchungen nötig, z.B. durch den Einsatz verschiedener Matrices, um herauszufinden inwieweit diese einen Einfluss auf die Messbarkeit ausüben.

Die Kopplung der HPTLC und der MALDI/TOF/MS stellt eine Erweiterung der traditionellen MALDI/TOF/MS-Analyse dar. Durch die chromatographische Trennung der Proteine und die vielfältigen Möglichkeiten der Detektion in der HPTLC können zusätzlich zum Molekulargewicht wichtige Informationen gewonnen werden. Diese tragen besonders bei unbekanntem Proben zu Charakterisierung und somit zum Verständnis von Reaktionsmechanismen bei. Weiterhin ist zu erwähnen, dass die HPTLC-MALDI/TOF/MS-Analyse im Vergleich zu anderen HPTLC-MS-Kopplungen die wohl am weitesten automatisierte und somit zeitsparendste Methode darstellt.

Üblicherweise werden komplexe Proteingemische mittels 2D-Gelelektrophorese getrennt. Anschließend werden interessante *spots* aus dem Gel geschnitten und durch einen tryptischen Verdau aus dem Gel gelöst. Anschließend erfolgt eine massenspektrometrische Analyse. Innerhalb dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die chromatographische Trennung eines einfachen Modellproteins und dessen massenspektrometrische Detektion ohne die Notwendigkeit eines tryptischen Verdau möglich ist. Daher ist es potentiell möglich, dass die HPTLC-MALDI/TOF/MS alternativ zur traditionellen 2D-Gelelektrophorese mit anschließender MALDI/TOF/MS eingesetzt wird.

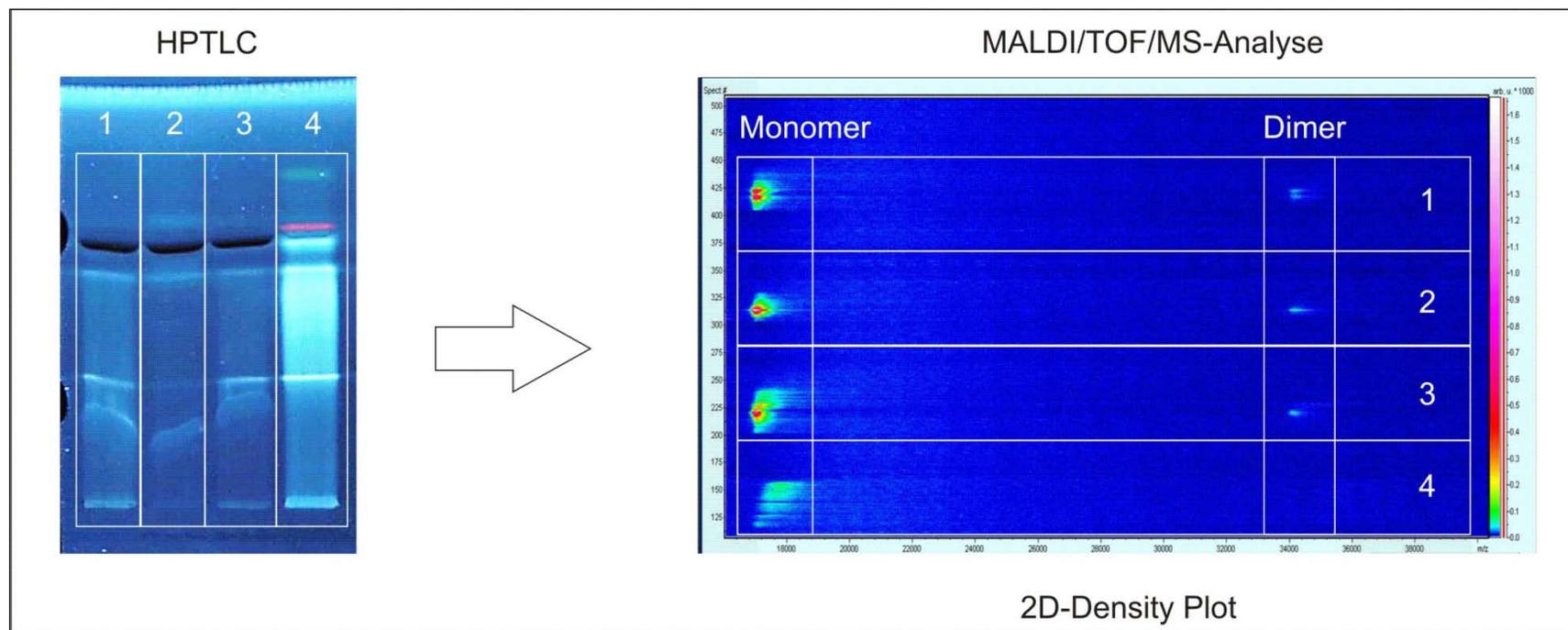


Abbildung 5-27. HPTLC-MALDI/TOF/MS-Analyse der Myoglobin-Derivate in Abhängigkeit von den eingesetzten phenolischen Verbindungen. Rechts: Darstellung des HPTLC-Chromatogramms bei einer Detektion mit UV 366 nm (underivatisiert). 1 = Kontrolle (behandelt); 2 = *p*-Cumarsäure; 3 = Ferulasäure; 4 = Syringasäure. Links: 2D-density plot der MALDI/TOF/MS-Ergebnisse.

5. Ergebnisse und Diskussion

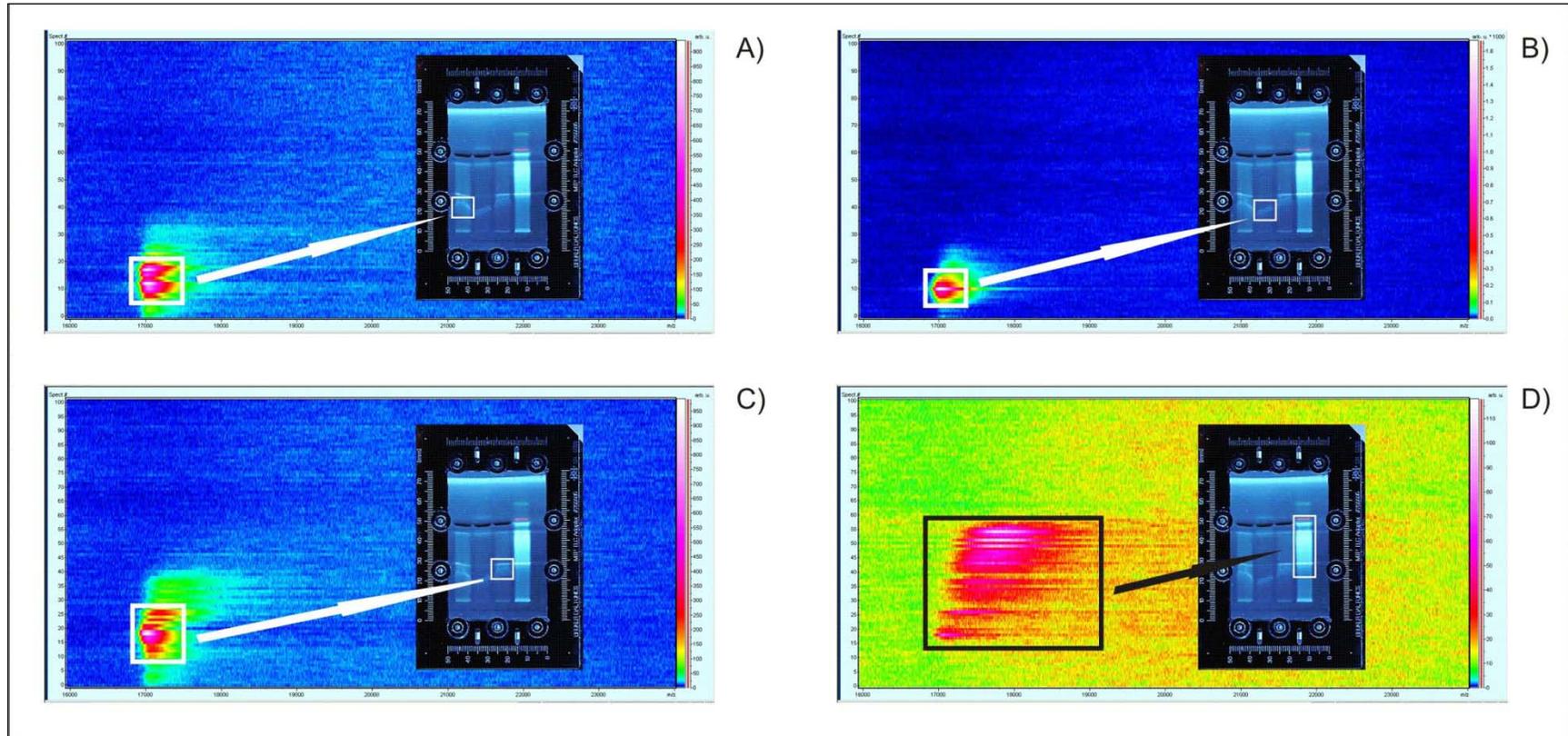


Abbildung 5-28. Darstellung der MALDI/TOF/MS-Ergebnisse der einzelnen Bahnen. Markiert sind die detektierten m/z -Signale mit den dazugehörigen Banden auf der HPTLC-Platte.

A = Kontrolle (behandelt); B = *p*-Cumarsäure; C = Ferulasäure; D = Syringasäure.

5.3.4 Charakterisierung der antigenen Eigenschaften der Phenol-Protein-Derivate mittels HPTLC-IF

Die Modifikation der Proteine mit phenolischen und verwandten Verbindungen kann zu einer Veränderung der antigenen Eigenschaften des Proteins führen. Die HPTLC-Immunfärbung dient dazu zu prüfen, inwieweit sich welche phenolische/verwandte Verbindung auf die antigenen Eigenschaften des Phenol-Protein-Derivates auswirken (vgl. **Kapitel 2.2.1.4.1.3**). Daneben erlauben unterschiedliche Detektionen (Weißlicht, UV-Licht, Derivatisierungsreagenzien) eine Aussage über Einflüsse auf die Farbigkeit, UV-Aktivität und Art der Aminosäureseitenketten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methodenentwicklung zur HPTLC-IF durchgeführt (vgl. **Kapitel 2.2.1.4.1.3**). Die entwickelte Methode wurde anschließend zur Analyse der antigenen Eigenschaften ausgewählter Phenol-Protein-Derivate eingesetzt. In **Abbildung 5-27** sind die Ergebnisse der HPTLC-IF der *p*-Cumarsäure-, Ferulasäure-, Syringasäure- und Sinapinsäure-Derivate des Myoglobins dargestellt. Betrachtet man zunächst die Detektion mittels UV-Licht (366 nm, underivatisiert) und nach Fluorescamin-Derivatisierung sowie mittels Weißlicht nach Ninhydrin-Derivatisierung ist zu erkennen, dass Myoglobin einen R_f -Wert von 0.60 aufweist (siehe **Abbildung 5-27 A, C, D**). Dabei ist die Bande des Myoglobins bei der unbehandelten und behandelten Myoglobin-Kontrolle sowie bei den *p*-Cumarsäure- und Ferulasäure-Derivaten zu erkennen. Die Häm-Gruppe zeigt eine Bande bei einem R_f -Wert von 0.70 und ist bei den genannten Proben zu erkennen. Weder das Syringasäure- noch das Sinapinsäure-Derivat weisen eine detektierbare Proteinbande auf. Bei der anschließenden Immunfärbung wurden bei den Myoglobin-Kontrollen sowie bei den *p*-Cumarsäure- und Ferulasäure-Derivaten Proteinbanden mittels Immunfärbung detektiert. Weder das Syringasäure- noch das Sinapinsäure-Derivat weisen eine mittels Immunfärbung detektierbare Proteinbande auf (siehe **Abbildung 5-27 E und F**). Wie bereits in der Methodenentwicklung erwähnt (vgl. **Kapitel 5.1.6**), kommt es während der IF auch zu einer Detektion der Häm-Gruppe. Interessanterweise scheint die Häm-Gruppe durch die Modifikation von Myoglobin durch Syringasäure und Sinapinsäure beeinflusst worden zu sein, da diese beim Syringasäure-Derivat nur noch schwach und beim Sinapinsäure-Derivat gar nicht mehr detektiert werden konnte. Eventuell geht die Häm-Gruppe schon bei der Reaktion verloren, da das Protein und somit die Häm-Bindung verändert wurde.

Vergleicht man die Ergebnisse der IF zwischen monoclonalem Antikörper (siehe **Abbildung 5-27 E**) mit denen des polyclonalen Antikörpers (siehe **Abbildung 5-27 F**), zeigten Erstere eine generell intensivere Färbung. Die Detektion des Myoglobins scheint bei beiden Antikörpern vergleichbar zu sein.

Interessanterweise zeigt die IF mit dem monoclonalen Antikörper eine langgezogene Bande im unteren bis mittleren R_f -Bereich des Syringasäure- und Sinapinsäure-Derivats. Der monoclonale Antikörper ist im Gegensatz zum polyclonalen auf eine spezifische Aminosäuresequenz im Proteinmolekül ausgelegt. Aufgrund der Modifikation mit Syringa- und Sinapinsäure scheint das Myoglobinmolekül insoweit verändert worden zu sein, dass eine Bindung zum monoclonalen nicht aber zum polyclonalen Antikörper möglich ist. Vermutlich hat die Modifikation von Syringa- und Sinapinsäure im Wesentlichen zu einer Beeinflussung der polyclonalen Bindungsstelle im Myoglobin geführt.

Weiterhin unterscheiden sich die Phenol-Protein-Derivate in ihrem Verhalten im chromatographischen System. Die Beeinflussung der Aminogruppen, die zur Detektion mit Fluorescamin und Ninhydrin genutzt werden, scheinen darüber hinaus beeinflusst worden zu sein (keine Detektion mit Fluorescamin und Ninhydrin möglich).

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass die in dieser Arbeit entwickelte Methode zur HPTLC-IF dazu geeignet ist, Phenol-Protein-Derivate hinsichtlich ihrer antigenen Eigenschaften zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass die Modifikation von Myoglobin mit Syringa- und Sinapinsäure zu einer Veränderung der antigenen Eigenschaften geführt hat. Diesbezüglich sind weitergehende Untersuchungen notwendig, um insbesondere herauszufinden was diese Erkenntnis für die Allergenität bestimmter Proteine in phenolreichen Lebensmitteln bedeutet (z.B. Schönungsmittel in Wein).

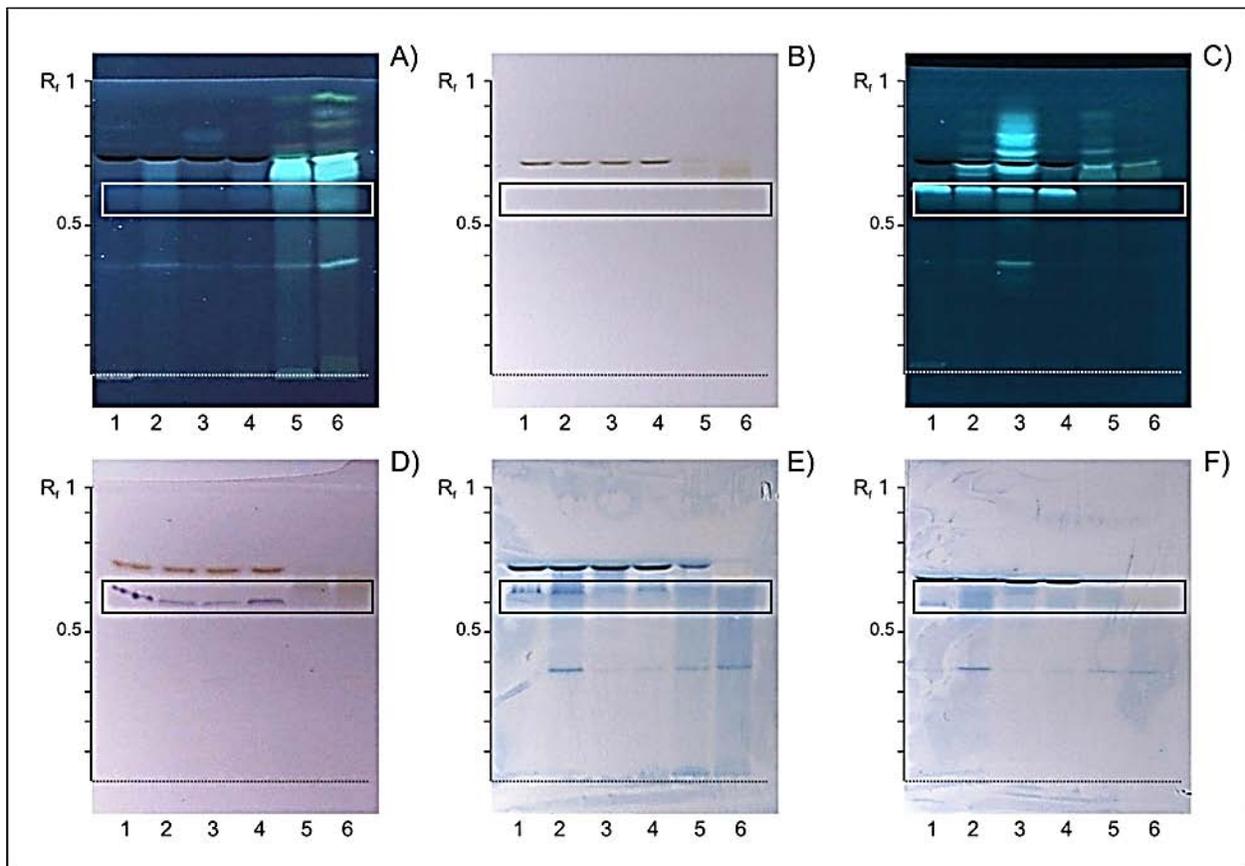


Abbildung 5-29. HPTLC-IF-Analyse der Myoglobin-Derivate in Abhängigkeit von den eingesetzten phenolischen Verbindungen (HPTLC-Kieselgel-Aluminiumfolien).

A [UV-Licht], B [Weißlicht], C [UV-Licht, Fluorescamin], D [Weißlicht, Ninhydrin], E [Weißlicht, IF, monoklonaler primärer Antikörper], F [Weißlicht, IF, polyklonaler primärer Antikörper]. 1 = Kontrolle (frisch); 2 = Kontrolle (behandelt); 3 = *p*-Cumarsäure; 4 = Ferulasäure; 5 = Syringasäure; 6 = Sinapinsäure.

5.3.5 Charakterisierung der antimikrobiellen Eigenschaften der Phenol-Protein-Derivate mittels HPTLC-Bioautographie

Phenolischen Verbindungen werden zahlreiche positive wie negative Eigenschaften zugesprochen; eine der positiven Eigenschaften ist die antimikrobielle Wirkung dieser Substanzen (Kroll et al. 2003; El-Seedi et al. 2012). Zur Untersuchung, ob und in welchem Ausmaß bei einer Reaktion von phenolischen/verwandten Verbindungen mit Proteinen eine Übertragung der antimikrobiellen Wirkung auf die entstehenden Phenol-Protein-Derivate stattfindet, wurden ausgewählte Phenol-Protein-Derivate einer HPTLC-Bioautographie-Analyse unterzogen.

5.3.5.1 HPTLC-Agar-overlay zur Analyse der antimikrobiellen Eigenschaften ausgewählter phenolischer/verwandter Verbindungen

Zunächst wurde geprüft, welche phenolischen Substanzen eine antimikrobielle Aktivität unter Verwendung des in dieser Arbeit entwickelten HPTLC-Bioautographie-assays (*agar-overlay*) aufweisen. Hierfür wurden die phenolischen/verwandten Substanzen D-Chinasäure, Gallussäure, *p*-Cumarsäure, Ferulasäure, Kaffeesäure, Sinapinsäure und Syringasäure eingesetzt. Diese wurden in Methanol gelöst, in unterschiedlichen Volumina auf die TLC-Platten aufgetragen, sodass unterschiedliche Konzentrationen pro Applikationszone erhalten wurden, und die Platte, nach Abdampfen des Lösungsmittels, zur Bioautographie eingesetzt. Es wurden anschließend die Hemmhöfe, bezogen auf die Konzentrationen pro Auftragungszone, durch Ausmessen bestimmt. Ebenso wurde durch visuellen Vergleich die niedrigste Menge pro *spot* bestimmt, die erforderlich ist, um noch eine hemmende Wirkung hervorzurufen. In **Tabelle 5-15** sind die Ergebnisse dieser Untersuchung dargestellt.

Tabelle 5-15. HPTLC-*agar-overlay* von ausgewählten phenolischen/verwandten Verbindungen.

Substanz	Applikationsvolumen												c (Ø) [mM]
	5 µL		10 µL		15 µL		25 µL		50 µL		100 µL		
	HH	m	HH	m	HH	m	HH	m	HH	m	HH	m	
	[cm]	[mg]	[cm]	[mg]	[cm]	[mg]	[cm]	[mg]	[cm]	[mg]	[cm]	[mg]	
<i>p</i> -Cumarsäure	nb	0.25	nb	0.51	0.8	0.76*	1.1	1.3	1.4	2.50		5.00	310
Ferulasäure	nb	0.25	nb	0.51	0.9	0.76*	1.1	1.3	1.8	2.50		5.00	260
Sinapinsäure	nb	0.25	nb	0.51	nb	0.76	1.0	1.3*	1.1	2.50		5.00	230
Syringasäure	nb	0.25	nb	0.51	0.7	0.76*	0.7	1.3	1.4	2.50		5.00	260
Kaffeesäure	nb	0.25	0.8	0.51*	1.0	0.76	1.2	1.3	1.4	2.50	1.6	5.00	280
Gallussäure	-	-	-	-	-	-	-	-	0.8	1.07	-	-	130
Chinasäure	-	-	-	-	-	-	-	-	1.7	2.20	-	-	230

* minimale Hemm-Konzentration (MHK)

nb Hemmhof nicht beobachtet

Die Verbindungen D-Chinasäure und Gallussäure wurden aufgrund einer entstehenden Braunfärbung durch Bildung von Oxidationsprodukten und der dadurch beschränkten Detektierbarkeit bei der Bestimmung der erforderlichen Mindestkonzentration nicht berücksichtigt. Für diese Phenolverbindungen wurde ausschließlich der Hemmhof bei gegebener Konzentration bestimmt.

Für die übrigen phenolischen Substanzen wurde hingegen auch eine erforderliche Mindestkonzentration pro *spot* bestimmt (siehe **Tabelle 5-15**). Auffällig war hierbei vor allem die starke antimikrobielle Wirkung der Kaffeesäure, bis zu einer Menge von 0.51 mg/*spot*, ebenso wie die recht schwache

antimikrobielle Wirkung der Sinapinsäure, für die lediglich bis zu einer Menge von 1.3 mg/*spot* noch eine hemmende Wirkung nachgewiesen werden konnte. Die übrigen phenolischen Verbindungen wiesen eine antimikrobielle Wirkung bis zu einer Menge von 0.76 mg/ Applikationszone auf. Die Größe des Hemmhofs, die für die einzelnen Phenolsäuren bei dieser Konzentration noch ermittelt werden konnte, war dabei recht ähnlich.

Die Konzentration der verwendeten Substanzen (in **Tabelle 5-15** angegeben als durchschnittliche Konzentration in mM) wurde bei den Versuchen konstant gehalten. Durch die schrittweise Erhöhung des Applikationsvolumens wurde die Menge der jeweiligen Substanz auf der Platte erhöht. Aufgrund der nicht standardisierten Durchführung der HPTLC-Bioautographie ist es generell problematisch, die hier ermittelten MHK der phenolischen Verbindungen mit Ergebnissen anderer Studien zu vergleichen. In **Kapitel 2.1.1.4** in **Tabelle 2-8** werden aus der Literatur entnommene MHK für ausgewählte phenolische Verbindungen aufgeführt. Diese befinden sich im einstelligen mM-Bereich. Vergleicht man die in dieser Arbeit ermittelten Werte, die sich im dreistelligen mM-Bereich befinden, mit den aus der Literatur entnommenen, wird deutlich, dass der hier entwickelte HPTLC-*agar-overlay* um zwei Zehnerpotenzen nachweisunempfindlicher ist. Dennoch eignet sich der hier verwendete *assay*, um eine antimikrobielle Wirkung zu detektieren. In Zukunft sind weitere Untersuchungen notwendig, um insbesondere die Nachweisempfindlichkeit zu verbessern.

5.3.5.2 HPTLC-*agar-overlay* zur Analyse der antimikrobiellen Eigenschaften oxidiertes Kaffeesäure

Aufgrund der Eigenschaft der Phenolsäuren leicht zu oxidieren (vgl. **Kapitel 2.1.1.6.1**), ist es fraglich, ob sie hiernach noch ihre antimikrobielle Wirkung beibehalten, evtl. einbüßen oder, ob diese Wirkung durch die Reaktion nicht sogar noch verstärkt wird. Für diesen Zweck wurde die Kaffeesäure in alkalischer Lösung unter Kontakt mit Sauerstoff zu entsprechenden Reaktionsprodukten umgesetzt. Diese wurden auf unterschiedliche Konzentrationen (1.8 – 35 mg/mL) verdünnt, auf TLC-Platten aufgetragen und zur Bioautographie eingesetzt.

Zur Verdünnung der Kaffeesäure-Polymerisationsprodukte wurden unterschiedliche Lösungen eingesetzt, um fest zu stellen, inwieweit sich die Lösungsmittel auf das Ergebnis auswirken. Natriumhydroxid-Lösung wurde als Lösungsmittel zur Herstellung der Reaktionsprodukte und daher zur Verdünnung eingesetzt. Dabei wurde vermutet, dass der basische pH-Wert der eingesetzten Natriumhydroxid-Lösung eine antimikrobielle Wirkung verursacht. Daher wurde diese Lösung (ohne enthaltene Kaffeesäure) diesbezüglich getestet und ein Hemmhof mit einem Durchmesser von 1.3 mm bestimmt. Die

Hemmhofgröße der in Natriumhydroxid-Lösung verdünnten Kaffeesäure wurde daher um diesen Blindwert bereinigt.

Als weiteres Lösungsmittel diente ein Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (25 mM), welcher auf einen pH-Wert von 7 eingestellt wurde. Ein weiterer Ansatz wurde einer Dialyse unterzogen, um das enthaltene Natriumhydroxid zu entfernen. Nach der Dialyse wurde auch dieser Ansatz auf verschiedene Konzentrationen mit dem Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer verdünnt. Weiterhin wurden nicht-oxidierte Kaffeesäurekontroll-Lösungen der Konzentrationen von 1.8 – 35 mg/mL in Methanol hergestellt und ebenfalls zur Bioautographie eingesetzt. Dadurch war eine Vergleichbarkeit der erhaltenen Hemmhöfe zwischen oxidiert und nicht-oxidiert Kaffeesäure gegeben. Der Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (25 mM) und Methanol zeigten ohne Kaffeesäurezusatz keine antimikrobielle Wirkung.

Für die nicht-oxidierte Kaffeesäure in Methanol konnte hierbei eine antimikrobielle Wirkung bis zu einer Konzentration von 5.4 mg/mL (entspricht 0.78 mg/spot) mit einem Hemmhof von 0.4 cm bestimmt werden (siehe **Abbildung 5-30**). Für die oxidierte Kaffeesäure beider Ansätze in Puffer konnte ebenfalls eine antimikrobielle Wirkung festgestellt werden. Die in Natriumhydroxidlösung verdünnte, oxidierte Kaffeesäure zeigte einen Hemmhof mit 0.2 cm Durchmesser bei der gleichen Konzentration. Für den in Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer verdünnten Ansatz konnte noch bis zu einer Konzentration von 9 mg/mL (dies entspricht 1.31 mg/spot) eine hemmende Eigenschaft mit einem Hemmhof von 0.7 cm festgestellt werden. Bei dem dialysierten Ansatz konnte nur noch bis zur Verdünnung der Konzentration 18 mg/mL (dies entspricht 2.61 mg/spot) eine hemmende Wirkung mit einem Hemmhof von 0.9 cm ermittelt werden.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die antimikrobielle Wirkung der Kaffeesäure durch die Oxidation vermindert wird. Wie in **Kapitel 2.1.1.6.1** beschrieben, führt die Oxidation von *ortho*-Dihydroxyverbindungen (wie Kaffeesäure) zu einer Bildung von reaktiven Chinonen, welche in der Lage sind *target*-Moleküle, wie Proteine, Peptide und Aminosäuren, anzugreifen und dadurch lebensnotwendige Vorgänge in einem Mikroorganismus zu unterbrechen (z.B. Enzyminhibition). Haben die reaktiven Chinone allerdings dimerisiert oder polymerisiert (Melanine, vgl. **Kapitel 2.1.1.6.1**), ist die Reaktivität gegenüber Molekülen und daher die antimikrobielle Wirkung vermutlich vermindert.

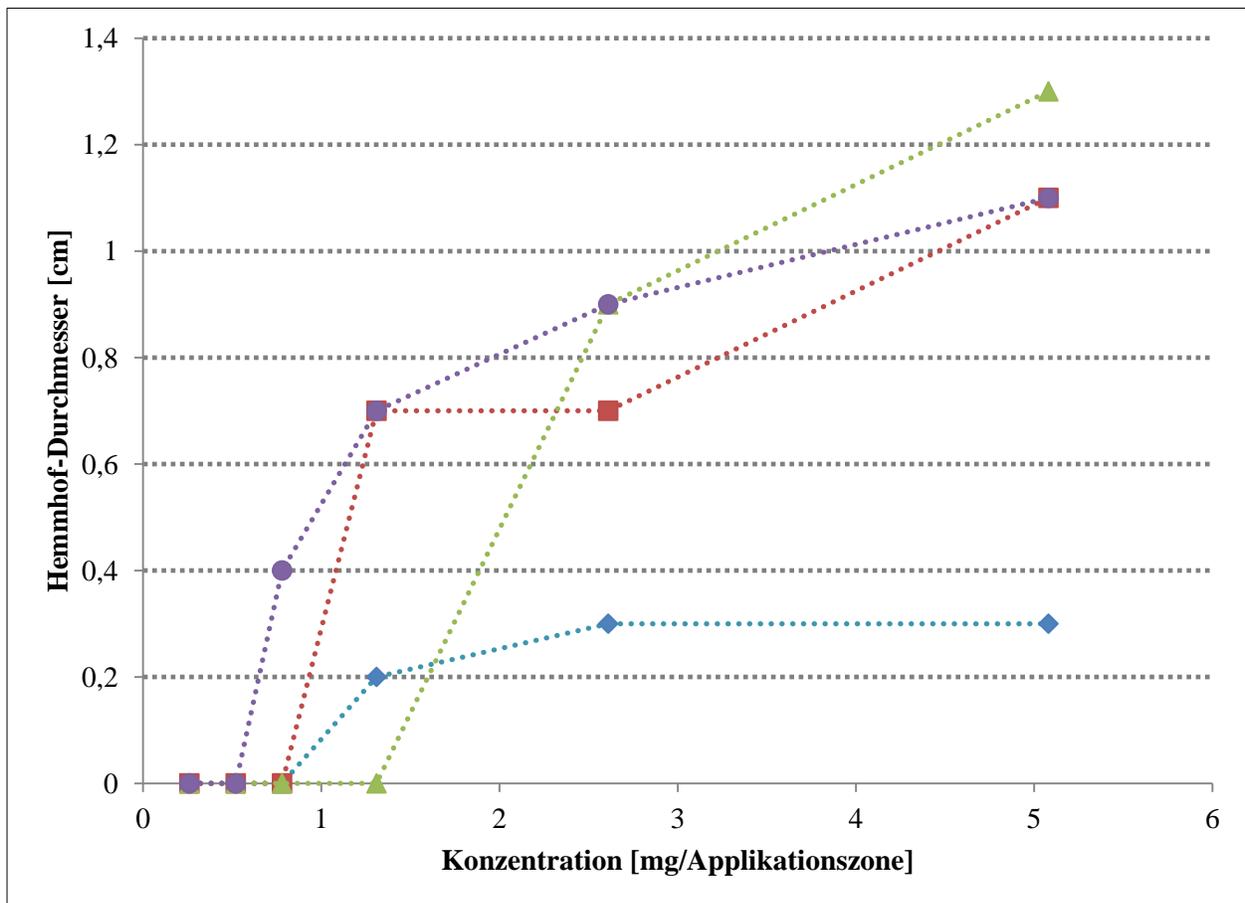


Abbildung 5-30. Antimikrobielle Aktivität von nicht-oxidierte und oxidierte Kaffeesäure bei Verwendung des HPTLC-agar-overlay-assays.

(●) = in Methanol; (■) = in Ammoniumhydrogencarbonat; (▲) = in Ammoniumhydrogencarbonat, dialysiert; (◆) in Natriumhydroxid-Lösung, korrigiert.

5.3.5.3 Anwendung der HPTLC-DB- und -agar-overlay-assays auf die Analyse phenolreicher Lebensmittel am Beispiel Tee

Um die Eignung der innerhalb dieser Arbeit entwickelten HPTLC-agar-overlay- und HPTLC-DB-assays auf Lebensmittelmatrices zu überprüfen, sollten diese auf ein phenolreiches Lebensmittel angewendet werden. Daher wurde das Lebensmittel Tee ausgewählt und hinsichtlich der antimikrobiellen Eigenschaften analysiert.

In **Abbildung 5-31** ist die Analyse ausgewählter Tee-Extrakte mittels der entwickelten HPTLC-DB Methode dargestellt. Auf den ersten drei Bahnen wurden die Standards Gallussäure (GA), Koffein und

Epicatechin (EC) mit einer Konzentration von 0.25 mg/mL und einem Auftragevolumen von 10 μ L aufgetragen. In **Abbildung 5-31 A, B und C** ist die Detektion bei Weißlicht, underivatisiert, die Detektion bei UV-Licht (366) nm nach Derivatisierung mit Naturstoffreagenz A und die Detektion bei Weißlicht nach Derivatisierung mit Fast-Blue-B-Salz dargestellt. Diese Detektionen wurden eingesetzt, um sich zunächst einen Überblick über das Inhaltsstoffspektrum der Tee-Extrakte zu verschaffen. Bei den in dieser Analyse eingesetzten Tee-Proben handelt es sich um grünen Tee. Dieser weist bekanntermaßen hohe Gehalte an Catechinen auf (Graham 1992). Dies konnte anhand der gewählten Detektionen bestätigt werden. Weiterhin wurden die für die grüne Farbe verantwortlichen, nach der Naturstoffreagenz A-Derivatisierung rot-farbenen Chlorophylle nachgewiesen.

Die optische Dichte der hier verwendeten Bakteriensuspension betrug bei der HPTLC-DB 0.670 (innerhalb der exponentiellen Phase, vgl. **Kapitel 5.1.5.1.1**) und die Inkubationszeit sechs Stunden. Die Platte wurde nach Tauchen ins MTT-Reagenz über Nacht inkubiert. Die MTT-Färbung auf der Platte ist sehr gleichmäßig und deutet auf ein gutes Bakterienwachstum hin. Bei einem R_f -Wert von 0.52 zeichnen sich helle Hemmzonen auf dem violetten Hintergrund ab. Ergebnisse anderer Studien (Daten nicht aufgeführt) haben gezeigt, dass es sich bei der Substanz mit diesem R_f -Wert vermutlich um EGCG handelt. Diese Vermutung wird durch Erkenntnisse anderer Studien unterstützt, bei denen insbesondere EGCG, aber auch EGC antimikrobielle Aktivität gegen gram-negative und gram-positive Mikroorganismen zeigten (Guo et al. 2005; Bancirova 2010).

Anschließend wurde vergleichend zur direkten Bioautographie der *agar-overlay-assay* durchgeführt. Ziel war es, mit dieser Methode ebenfalls eine Detektion der antibakteriellen Wirkung phenolischer Verbindungen der Tee-Extrakte zu detektieren und die Ergebnisse mit denen der HPTLC-DB zu vergleichen. Innerhalb dieser Analyse wurden zusätzlich Extrakte von Schwarz-Tee, Oolong-Tee und weißem Tee aufgetragen. Da die Nachweisempfindlichkeit des HPTLC-*agar-overlay-assay* geringer einzustufen ist als die der HPTLC-DB, wurden die Tee-Extrakte unverdünnt appliziert. In **Abbildung 5-32** sind die Ergebnisse des HPTLC-*agar-overlay-assays* dargestellt. Das Einfärben mit MTT zeigt das gleichmäßig verteilte Wachstum von *E. coli* auf der Agar-Oberfläche. Dieses ist insbesondere auch am Kontrast des Hemmhofes der zur Kontrolle mitgeführten Sorbinsäure deutlich zu erkennen (siehe **Abbildung 5-32 C**). Aufgrund der Applikation von unverdünnten Proben und der dadurch entstehenden „Überladung“ der Schicht ist die Trennung der Inhaltsstoffe schlechter als bei der HPTLC-DB. Bei den Grün-Tee- und Schwarz-Tee-Extrakten sind nur an der Applikationsposition der Extrakte Hemmzonen zu

erkennen. Die antimikrobielle Wirkung von EGCG und EGC (wie in der HPTLC-DB gezeigt) wurde innerhalb dieser Analyse nicht bestätigt.

Generell ist es als positiv zu bewerten, dass überhaupt eine antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden konnte. Problematisch ist bei diesem Ergebnis allerdings, dass nicht festgestellt werden kann, welche Stoffe diese antimikrobielle Aktivität hervorrufen. Denn Stoffe, die sich nach der chromatographischen Trennung noch innerhalb der Auftragungszone befinden, wurden nicht getrennt. Hier sollte eine Adaption des chromatographischen Systems und eine erneute Analyse der antimikrobiellen Aktivität erfolgen.

5. Ergebnisse und Diskussion

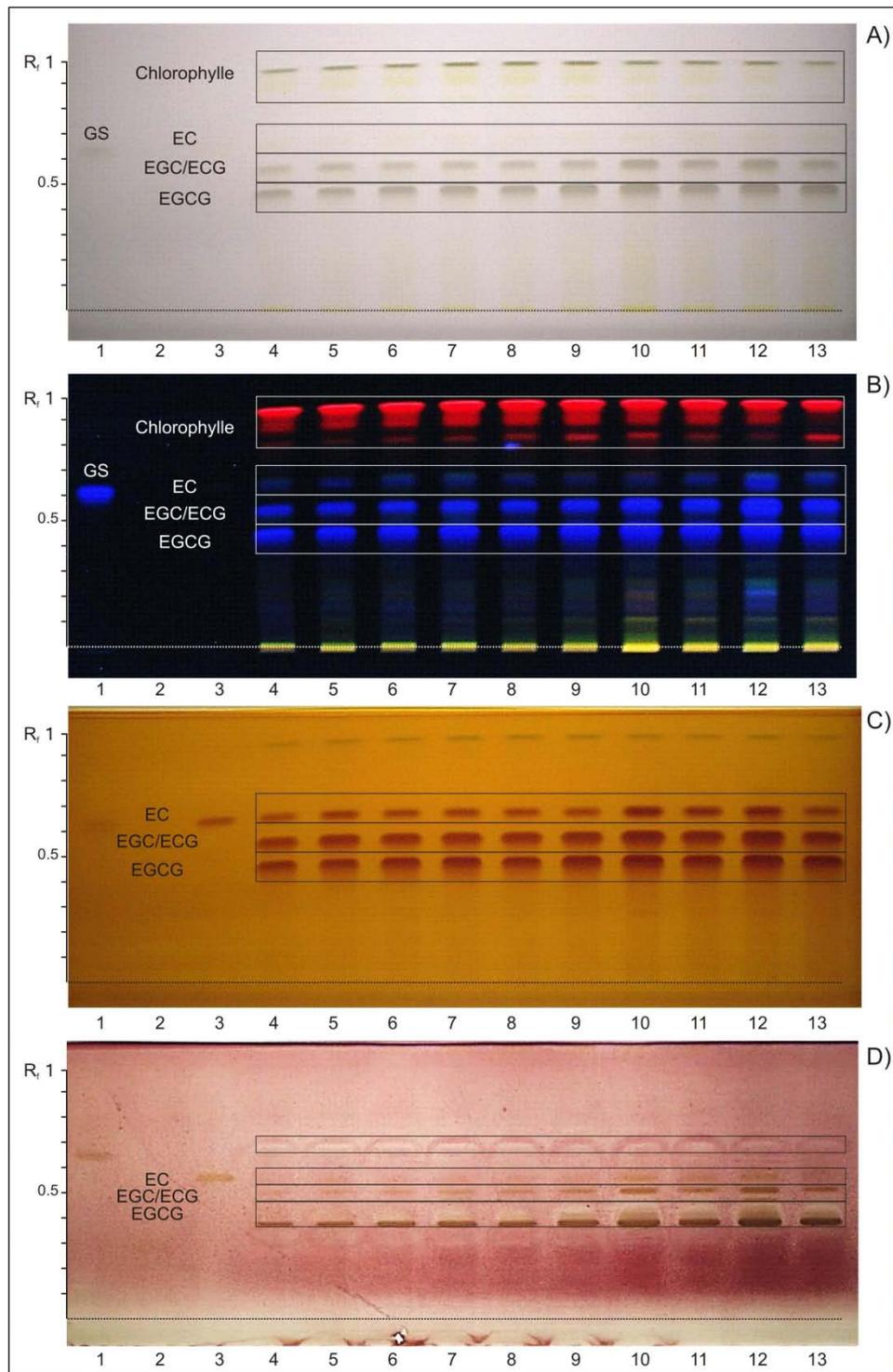


Abbildung 5-31. HPTLC-DB ausgewählter Standardverbindungen und Tee-Extrakte. A [Weißlicht], B [UV-Licht, Derivatisierung mit Naturstoff-Reagenz], C [Weißlicht, Derivatisierung mit Fast-Blue-B Salz], D [Weißlicht, direkte Bioautographie]. 1 = Gallussäure; 2 = Koffein; 3 = Epicatechin; 4-13 = Grün-Tee-Extrakte verschiedener Proben, ethanolisch, 1/5 verdünnt.

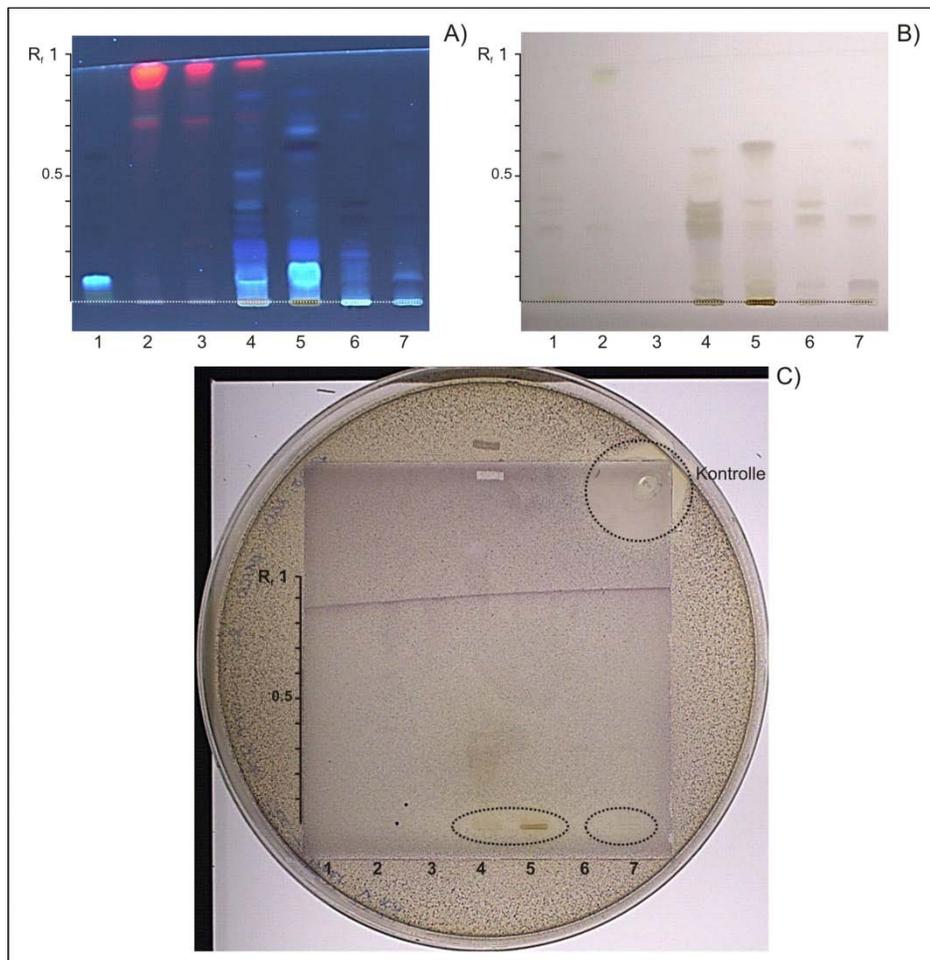


Abbildung 5-32. HPTLC-agar-overlay ausgewählter Standardverbindungen und Tee-Extrakte. A [UV-Licht], B [Weißlicht], C [agar-overlay-Analyse]. 1 = Standard-Mix; 2 = Grün-Tee-Extrakt, ethanolisch; 3 = Oolong-Tee-Extrakt, ethanolisch; 4 = Grün-Tee-Extrakt; 5 = Schwarz-Tee-Extrakt; 6 = Oolong-Tee-Extrakt, 7 = Weiß-Tee-Extrakt.

Das aus der HPTLC-DB-Analyse erhaltene Ergebnis der antimikrobiellen Aktivität von EGCG konnte mittels HPTLC-agar-overlay im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass sich die beiden assays in ihrer Vorgehensweise signifikant voneinander unterscheiden. Betrachtet man die Kontaktbioautographie- und die in dieser Arbeit verwendete agar-overlay-Technik ist zu erwähnen, dass die Diffusionsfähigkeit der Testsubstanzen in den Agar einen limitierenden Faktor darstellt. Die Diffusionseffektivität der Testsubstanzen hängt hauptsächlich von deren Polarität ab, die bestimmt wie stark die Wechselwirkungen mit der stationären Phase der HPTLC-Platte sind und inwieweit die Substanz im Agar löslich ist. Demnach hängt die MHK einer Testsubstanz

nicht nur von der Fähigkeit ab, Mikroorganismen zu hemmen, sondern auch inwieweit eine Diffusion in den Agar stattfindet. Weiterhin weisen beide *assays* auch nach eingehender Methodenentwicklung Schwächen, v.a. in der Nachweisempfindlichkeit und Reproduzierbarkeit auf. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die Kombination der HPTLC und der Bioautographie geeignet ist, um antimikrobielle Aktivitäten von Teeinhaltsstoffen nach chromatographischer Trennung nachzuweisen. Im Vergleich zu den üblichen bioautographischen Methoden, bei denen meist ein kompletter Probenextrakt analysiert wird, stellt diese Methode eine notwendige und sinnvolle Weiterentwicklung dar. Denn nur durch eine Separation der Probenbestandteile kann eine Identifikation des für die antimikrobielle Aktivität verantwortlichen Stoffes erfolgen. Es bedarf einer weiterführenden Methodenentwicklung um die Nachweisempfindlichkeit und v.a. die Reproduzierbarkeit dieser Methode zu verbessern.

5.3.5.4 HPTLC-Bioautographie-Analyse der Kaffeesäure-Derivate des Myoglobins

Im Rahmen dieser Arbeit wurde insbesondere eine antimikrobielle Wirkung von Kaffeesäure festgestellt (vgl. **Kapitel 5.3.5.1** und **5.3.5.2**). Daher sollte anschließend geprüft werden, ob eine Übertragung der antimikrobiellen Wirkung der Kaffeesäure auf ein Modellprotein (hier Myoglobin) stattfindet. Dazu wurden die Kaffeesäure- Myoglobin-Derivate mittels HPTLC-*agar-overlay-assay* analysiert, wobei im Speziellen die Derivate der Myoglobin-Konzentration 3 mg/mL mit einem Kaffeesäuregehalt von 0.75 mM eingesetzt wurden (vgl. **Kapitel 4.2.1**). Hierbei wurde angenommen, dass aufgrund der höheren Konzentration an Protein und Phenolsäure, es am wahrscheinlichsten zu einem positiven Ergebnis (nachgewiesene antimikrobielle Aktivität) kommen kann. Aufgrund der vorangegangenen Untersuchung verschiedener phenolischer Verbindungen (vgl. **Kapitel 5.3.5.1** und **5.3.5.2**) wäre bei unbehandelter Kaffeesäure ein positives Ergebnis ab einer Mindestkonzentration von 0.5–0.8 mg/*spot* zu erwarten, während die erforderliche Mindestkonzentration bei oxidierten Kaffeesäure bei 1.3–2.6 mg/*spot* liegt. Diese Konzentration war bei einem Kaffeesäuregehalt von 0.75 mM (entspricht ca. 0.14 mg/mL bzw. 0.02 mg pro *spot*) nicht gegeben. Dennoch war damit nicht auszuschließen, dass durch eine Derivatisierung des Proteins Myoglobin nicht eine Verstärkung oder eine Schwächung des antimikrobiellen Effekts hervorgerufen wird.

Aus den Ergebnissen dieser Untersuchung geht hervor, dass für keine der Proben eine antimikrobielle Wirkung durch Hemmhofbildung beobachtet werden kann (Daten nicht aufgeführt). Ob dieses Ergebnis tatsächlich auf die zu geringe Konzentration an Kaffeesäure oder auf die Bildung von Myoglobin-Kaffeesäure-Derivaten zurückzuführen ist, kann in diesem Fall nicht eindeutig beurteilt werden. Daher

sind weiterführende Untersuchungen notwendig, um die Auswirkung der Reaktion mit Proteinen auf die antimikrobiellen Eigenschaften phenolischer/verwandter Verbindungen zu verstehen.

5.4 Charakterisierung der verdauten Phenol-Protein-Derivate

5.4.1 Analyse der enzymatisch verdauten Phenol-Protein-Derivate mittels 1D- und 2D-HPTLC

Die Modifikation der Proteine mit phenolischen und verwandten Verbindungen führt zu einer Veränderung des hydrophilen/hydrophoben Charakters. Nach einem enzymatischen Verdau wirken sich diese Änderungen folglich auch auf die Peptide aus. Um diese Veränderungen zu analysieren wurden die verdauten Phenol-Protein-Derivate mittels HPTLC untersucht. Dabei diente die 1D-HPTLC als *screening* Methode um zu prüfen, inwieweit sich die phenolische/verwandte Verbindungen auf das Peptid-Profil auswirken. Daneben erlauben unterschiedliche Detektionen (Weißlicht, UV-Licht, Derivatisierungsreagenzien) eine Aussage über die Einflüsse auf die Farbigekeit, UV-Aktivität und Aminosäureseitenketten (Reaktionsstellen der Derivatisierungsreagenzien). Der Einsatz 2D-HPTLC ermöglicht zusätzlich eine höhere Auflösung, welche im Falle der Peptid-Analyse von großer Bedeutung ist.

Für die Detektion der Peptide bieten sich verschiedene Möglichkeiten der postchromatographischen Derivatisierung an. Änderungen in der Farbigekeit und in der UV-Aktivität können mit einer Betrachtung unter Weißlicht sowie UV-Licht (366 nm) erfasst werden. Als Derivatisierungsreagenzien werden üblicherweise Fluorescamin und Ninhydrin genutzt (vgl. **Kapitel 4.3.1**). Die Detektion von Radikalfängereigenschaften kann mit Hilfe des postchromatographischen ABTS-*assays* erfolgen (vgl. **Kapitel 4.4.4**).

In **Abbildung 5-33** sind die genannten Detektionen nach Photodokumentation sowie nach einem Wellenlängenscan dargestellt. Das mit dem TLC-Scanner aufgenommene Densitogramm kann zur Quantifizierung der Peptide genutzt werden. Wird der Wellenlängenscan bei 220 nm durchgeführt, werden ausschließlich UV-aktive Peptide erfasst (siehe **Abbildung 5-33 A**). Das gesamte Peptidprofil wird bei einem Wellenlängenscan bei 366 nm nach Derivatisierung mit Fluorescamin erfasst (siehe **Abbildung 5-33 B**). Ähnlich zur Derivatisierung mit Fluorescamin wird auch bei einem Wellenlängenscan bei 530 nm nach Ninhydrinderivatisierung das gesamte Peptidprofil erfasst (siehe **Abbildung 5-33 C**). Vergleicht man die Detektion mit Fluorescamin und Ninhydrin wird deutlich, dass die Fluorescaminderivatisierung die sensitivere Methode darstellt. Peptide mit

5. Ergebnisse und Diskussion

Radikalfängereigenschaften erscheinen bei der Verwendung des HPTLC-ABTS-*assays* als helle bzw. pinkfarbene Banden auf einem türkisfarbenen Hintergrund (siehe **Abbildung 5-33 D**).

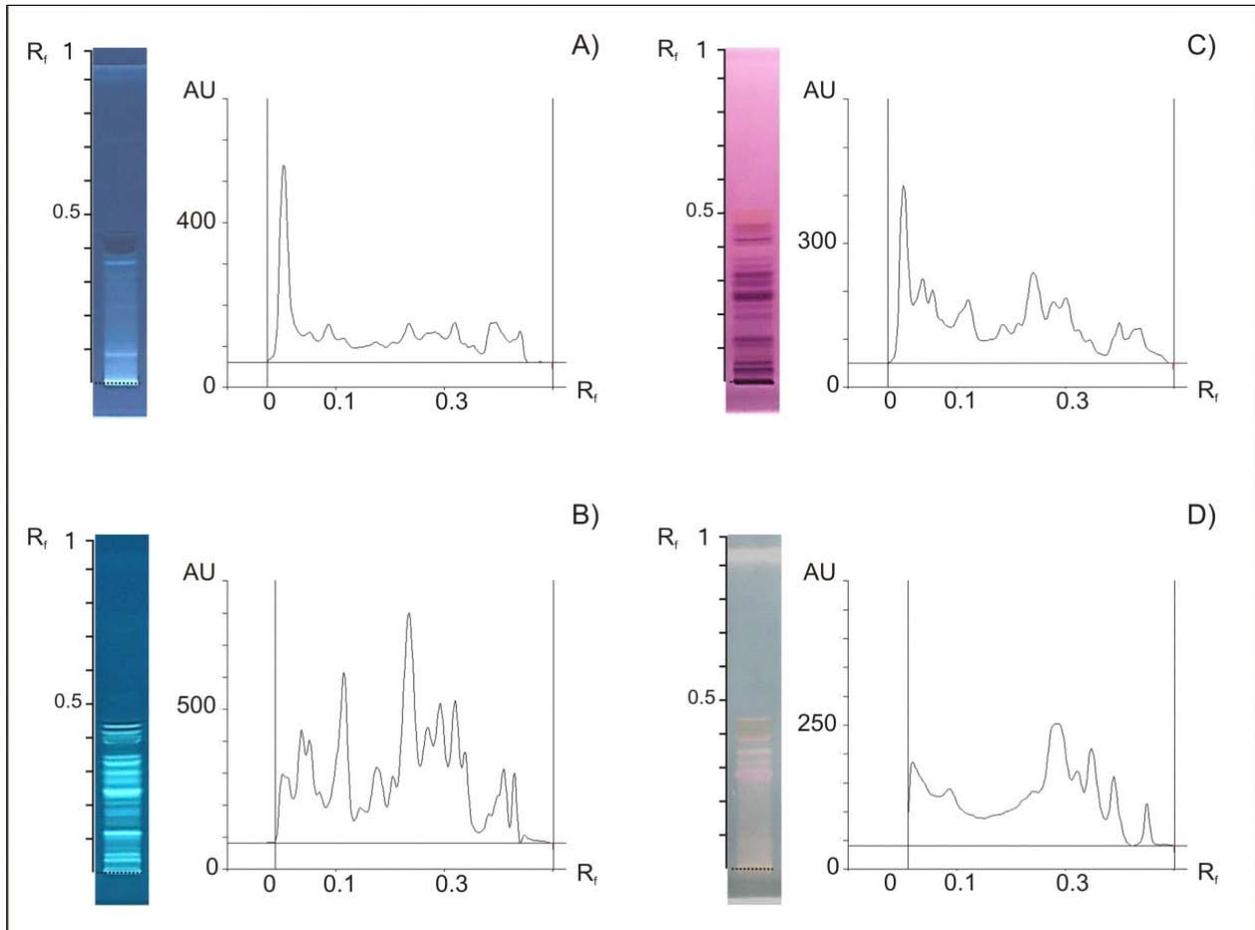


Abbildung 5-33. Eindimensionale HPTLC-Analyse eines tryptischen Myoglobin-Verdaus.

A [Detektion bei UV 366 nm, underivatisiert]; B [Detektion bei UV 366 nm, Derivatisierung mit Fluorescamin]; C [Detektion bei Weißlicht, Derivatisierung mit Ninhydrin]; D [Detektion bei Weißlicht, Derivatisierung mit ABTS].

Die verschiedenen Detektionsmöglichkeiten können zur Analyse der im Rahmen dieser Arbeit analysierten Phenol-Protein-Derivate angewendet werden (vgl. **Kapitel 4.2.2**). In **Abbildung 5-35** sind die Ergebnisse der 1D-HPTLC der Myoglobin-Derivate und in **Abbildung 5-35** die Ergebnisse der 1D-HPTLC der Casein-Derivate dargestellt. Zunächst wurden die Veränderungen in Farbigkeit und UV-Aktivität betrachtet. Dabei wurde festgestellt, dass die behandelte Myoglobin-Kontrolle zwei UV-aktive Banden aufweist, wohingegen die unbehandelte Kontrolle keine UV-aktiven Banden zeigt (siehe

Abbildung 5-35 A, Bahnen M1 und M2). Die Betrachtung der UV-Aktivität der Ferula- und *p*-Cumarsäure-Derivate (siehe **Abbildung 5-35 A, Bahnen F4-F6 und Cu4-Cu6**) zeigt nur wenige Unterschiede zu der behandelten Myoglobin-Kontrolle. Die Ferulasäure-Derivate zeigen eine zusätzliche, UV-aktive Bande im oberen R_f -Bereich. Die *p*-Cumarsäure-Derivate zeigen insgesamt einen Verlust an UV-Aktivität und ebenfalls eine zusätzliche, UV-aktive Bande im oberen R_f -Bereich. Die Sinapinsäure- und Syringasäure-Derivate (siehe **Abbildung 5-35 A, Bahnen Si4-Si6 und Sy4-Sy6**) zeigen in Bezug auf die UV-Aktivität ein stark verändertes Bild. Die Reaktion hat zu einer Erhöhung der UV-Aktivität der Peptide geführt. Die Tannin- und Gallussäure-Derivate zeigen eine stark UV-aktive, langgezogene Bande im unteren R_f -Bereich sowie braun-gefärbte Polymerisationsprodukte im Bereich der Applikationszone (siehe **Abbildung 5-35 A, Bahnen T4-T6 und G4-G6**), welche teilweise bereits in der SDS-PAGE-Analyse detektiert wurden (vgl. **Kapitel 5.3.1**).

Im Gegensatz zu den Myoglobin-Kontrollproben zeigen die Casein-Kontrollproben keine UV-aktiven Banden (**Abbildung 5-35 A, Bahnen C1 und C2**) bis auf eine Bande im oberen R_f -Bereich bei der unbehandelten Casein-Kontrolle. Auch bei Casein zeigten die Ferulasäure- und *p*-Cumarsäure-Derivate wenig Unterschiede bezüglich der UV-Aktivität im Vergleich zur behandelten Casein-Kontrolle (**Abbildung 5-35 A, Bahnen F4-F6 und Cu4-Cu6**). Interessanterweise zeigten sich auch bei den Sinapin- und Syringasäure-Derivaten des Casein, wie schon bei denen des Myoglobins beobachtet, intensive UV-aktive Banden (**Abbildung 5-35 A, Bahnen Si4-Si6 und Sy4-Sy6**). Auch die Ergebnisse der Tannin- und Gallussäure-Derivate (**Abbildung 5-35 A, Bahnen T4-F6 und G4-G6**) des Caseins stimmen mit denen des Myoglobins überein.

Die 1D-HPTLC mit anschließender Fluorescaminderivatisierung (siehe **Abbildung 5-35 B und Abbildung 5-35 B**) kann zu einer Analyse des gesamten Peptidprofils und somit zu einer Aussage über den Einfluss auf die Verdaubarkeit, welche bereits in der Literatur beschrieben wurde (Rawel und Rohn 2010), herangezogen werden. Zunächst wurde die unbehandelten und behandelten Protein-Kontrollen (M1, M2, C1, C2) miteinander verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass die behandelten Protein-Kontrollen im Vergleich zu den unbehandelten Protein-Kontrollen zusätzliche Peptide aufwiesen. Die behandelten Protein-Kontrollen wurden analog zu den Phenol-Protein-Derivaten in Natriumhydroxid-Lösung gelöst und 24 h offen geschüttelt. Diese Behandlung hat demnach zu einer verbesserten Verdaubarkeit bzw. zu einer partiellen Hydrolyse der Proteine geführt. Anschließend wurden die Ergebnisse der Protein-Kontrollen mit denen der Phenol-Protein-Derivate verglichen. Der stärkste Einfluss auf die Verdaubarkeit konnte bei der Reaktion von Gallussäure oder Tanninsäure mit Myoglobin

beobachtet werden (siehe **Abbildung 5-35 B, Bahnen T4-T6 und G4-G6**). Der Verdau dieser Derivate führte zu wesentlich weniger Peptiden. Dieser Effekt zeigte sich nicht so stark bei dem Modellprotein Casein (**Abbildung 5-35 A, Bahnen T4-F6 und G4-G6**).

Im Vergleich zu den Ergebnisse der Fluorescaminderivatisierung zeigt die Ninhydrinderivatisierung generell ähnliche Ergebnisse (siehe **Abbildung 5-35 C und Abbildung 5-35 C**). Allerdings ist aus den Abbildungen ersichtlich, dass bei der Derivatisierung mit Fluorescamin, wie bereits erwähnt, eine höhere Empfindlichkeit erreicht wird.

In **Abbildung 5-35 D** und **Abbildung 5-35 D** sind die Ergebnisse der ABTS-Derivatisierung dargestellt. Die unbehandelte Myoglobin-Kontrolle wies fast keine Peptide mit Radikalfängereigenschaften auf, bis auf schwache, pink-farbene Banden im unteren R_f -Bereich (siehe **Abbildung 5-35 D, M1**). Offensichtlich hat die bereits beschriebene Behandlung von Myoglobin zu einer Freisetzung von mehreren Peptide mit Radikalfängereigenschaften geführt, da zahlreiche Banden zu erkennen sind (siehe **Abbildung 5-35 D, M2**). Ähnliche Ergebnisse wurden für die unbehandelte und behandelte Casein-Kontrolle beobachtet (siehe **Abbildung 5-35 D, C1 und C2**).

Betrachtet man die Ergebnisse der Ferulasäure-, Sinapinsäure- und Syringasäure-Derivate des Myoglobins und des Caseins zeigt sich ein zu der behandelten Myoglobin- und Casein-Kontrolle ähnliches Peptidprofil (siehe **Abbildung 5-35 D** und **Abbildung 5-35 D, F4-F6, Si4-Si6, Sy4-Sy6**). Mit steigender Konzentration tritt bei den Derivaten des Myoglobins eine Bandeverbreiterung auf. Demnach verursacht die Konzentrationserhöhung der drei phenolischen Verbindungen eine Erhöhung der Radikalfängereigenschaften.

Das Sinapinsäure-Casein-Derivat der höchsten Konzentration zeigt ein verändertes Peptidprofil (siehe **Abbildung 5-35 D, Si6**). Anscheinend hat die Reaktion von Casein und Sinapinsäure zu zusätzlichen Peptiden mit Radikalfängereigenschaften geführt, die sich durch das Erscheinen zusätzlicher, heller Banden im unteren bis mittleren R_f -Bereich äußern. Das veränderte Peptidprofil ist auch nach der Fluorescaminderivatisierung erkennbar (siehe **Abbildung 5-35 B, Si6**).

Die Reaktion von Myoglobin und *p*-Cumarsäure führt neben dem bereits beschriebenen Verlust von UV-aktiven Peptiden auch zu einem Verlust von Radikalfängereigenschaften (siehe **Abbildung 5-35 D, Cu4-Cu6**). Die bereits beobachteten zusätzlichen, UV-aktiven Banden im oberen R_f -Bereich scheinen zusätzlich Radikalfängereigenschaften aufzuweisen.

Das *p*-Cumarsäure-Casein-Derivat der niedrigsten Konzentration zeigt ein verändertes Peptidprofil (siehe **Abbildung 5-35 D, Cu4**). Anscheinend hat die Reaktion von Casein und *p*-Cumarsäure zu zusätzlichen Peptiden mit Radikalfängereigenschaften geführt, die sich durch das Erscheinen zusätzlicher, heller Banden im unteren bis mittleren R_f -Bereich äußern. Das veränderte Peptidprofil ist auch nach der Fluorescamin-Derivatisierung erkennbar (siehe **Abbildung 5-35 B, Cu4**).

Die Ergebnisse der Tannin- und Gallussäure-Derivate des Myoglobins und des Caseins sind vergleichbar (siehe **Abbildung 5-35 D** und **Abbildung 5-35 D, T4-T6, G4-G6**). Da es durch die Reaktion, wie bereits beschrieben, zu einer Verschlechterung der Verdaubarkeit gekommen ist, wurde demnach auch ein Verlust an Radikalfängereigenschaften beobachtet. Die bereits beschriebenen, langgezogenen UV-aktiven Banden im unteren R_f -Bereich zeigen ebenfalls Radikalfängereigenschaften.

Mit Hilfe der zweidimensionalen Entwicklung von HPTLC-Platten kann eine hohe Auflösung in der Peptidtrennung erreicht werden. Die zweidimensionale Entwicklung von Peptiden wurden bereits erfolgreich von Pasilis et al. (2008a) auf HPTLC-Cellulose-Schichten eingesetzt. In der genannten Studie wurde ein saures Laufmittelsystem für die erste Dimension und ein basisches Laufmittelsystem für die zweite Dimension eingesetzt. Zunächst wurde versucht dieses System auf HPTLC-Kieselgel-Schichten zu übertragen. Dabei wurde nur ein unbefriedigendes Trennergebnis erreicht. Daher wurde innerhalb einer Methodenentwicklung das folgende Laufmittelsystem für die zweidimensionale Trennung etabliert: 2-Butanol/Pyridin/Ammoniak (25 %)/Wasser (39/34/10/26, v/v/v/v) in der ersten Dimension und 2-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (10/8/3/5, v/v/v/v) in der zweiten Dimension. Dieses System führte zu einer sehr guten Trennung der Peptide. Die Peptid-Detektionen in der zweidimensionalen HPTLC entsprechen denen der eindimensionalen HPTLC.

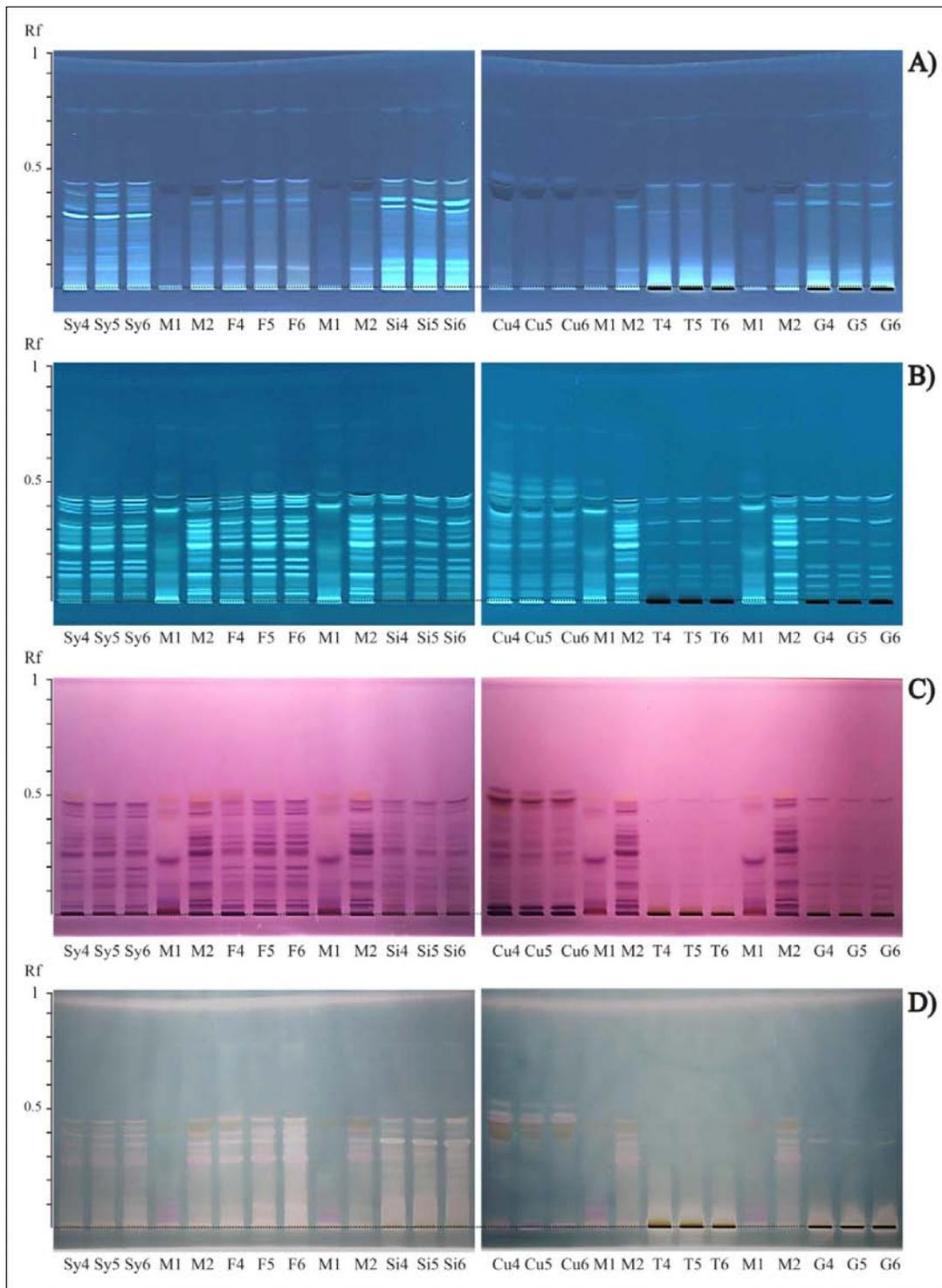


Abbildung 5-34. 1D-HPTLC der Myoglobin-Derivate. Legende siehe **Tabelle 4-6**.

A [Detektion bei UV 366 nm, underivatisiert], B [Detektion bei UV 366 nm, Derivatisierung mit Fluorescamin], C [Detektion bei Weißlicht, Derivatisierung mit Ninhydrin], D [Detektion bei Weißlicht, Derivatisierung mit ABTS]

5. Ergebnisse und Diskussion

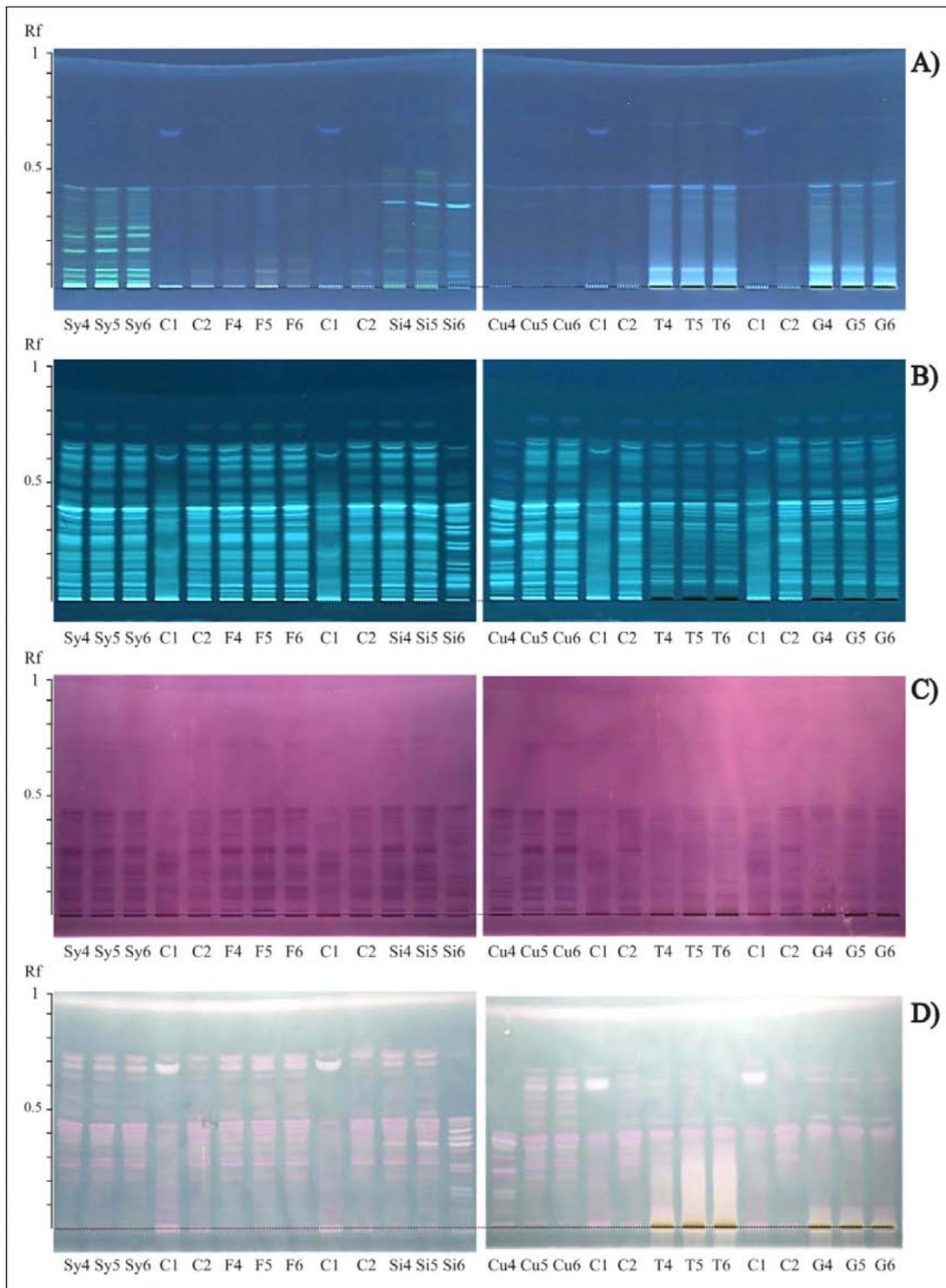


Abbildung 5-35. 1D-HPTLC der Casein-Derivate. Legende siehe **Tabelle 4-6**.

A [Detektion bei UV 366 nm, underivatisiert], B [Detektion bei UV 366 nm, Derivatisierung mit Fluorescamin], C [Detektion bei Weißlicht, Derivatisierung mit Ninhydrin], D [Detektion bei Weißlicht, Derivatisierung mit ABTS].

Die Ergebnisse der eindimensionalen HPTLC-Analyse haben gezeigt, dass die Reaktion von Sinapin- und Syringasäure mit Myoglobin als auch mit Casein zu einer Entstehung UV-aktiver Peptide führt. Zu einer genaueren Untersuchung dieser Derivate wurde daher das Sinapinsäure-Derivat des Myoglobins (höchste Konzentration Si6, vgl. **Tabelle 4-6**) und das Syringasäure-Derivat des Casein (höchste Konzentration Sy6, vgl. **Tabelle 4-6**) zur zweidimensionalen HPTLC-Analyse eingesetzt. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 5-36** und **Abbildung 5-37** dargestellt.

Die Unterschiede im Peptidprofil, die mit Hilfe der verschiedenen Detektion beobachtet werden konnten, sind als Zonen markiert. **Zone 1** in **Abbildung 5-36 D** und **F** zeigt eine langgezogene Aneinanderreihung von UV-aktiven *spots* an der unteren Kante der HPTLC-Platte, welche sich als Ergebnis der Reaktion von Sinapinsäure und Myoglobin zeigt. Diese Peptide wurden nur schlecht mit dem basischen Laufmittel der ersten Dimension, dafür aber besser mit dem sauren Laufmittel der zweiten Dimension separiert. Diese *spots* weisen des Weiteren Radikalfängereigenschaften auf.

Zone 2 in **Abbildung 5-36 D** und **F** zeigt grün-farbene, UV-aktive *spots*, welche durch Reaktion von Sinapinsäure und Myoglobin entstanden sind. Diese *spots* scheinen nicht mit Fluorescamin detektiert worden zu sein. Dies deutet darauf hin, dass die Aminogruppe, die normalerweise durch Fluorescamin detektiert wird, beeinflusst ist und daher nicht mehr zu einer Reaktion mit Fluorescamin zur Verfügung steht. Die *spots* in Zone 2 weisen des Weiteren keine Radikalfängereigenschaften auf.

Der *spot* in **Zone 3** in **Abbildung 5-36 D** und **F** befindet sich am rechten Rand der HPTLC-Platte und wurde daher mit dem sauren Laufmittel der zweiten Dimension bis in den oberen R_f -Wert-Bereich transportiert. Dieser für das Sinapinsäure-Derivat charakteristische *spot* zeigt sowohl UV-Aktivität als auch Radikalfängereigenschaften.

Zone 1 in **Abbildung 5-37 D** zeigt eine Ansammlung von grünfarbene, UV-aktive *spots* (ähnlich zu denen des Sinapinsäure-Derivats in **Zone 2** in **Abbildung 5-36 D**). Neben diesen *spots* wurden ebenfalls zusätzliche, mit Fluorescamin detektierte Peptide mit Radikalfängereigenschaften in **Zone 2** in **Abbildung 5-37 E** und **F** beobachtet.

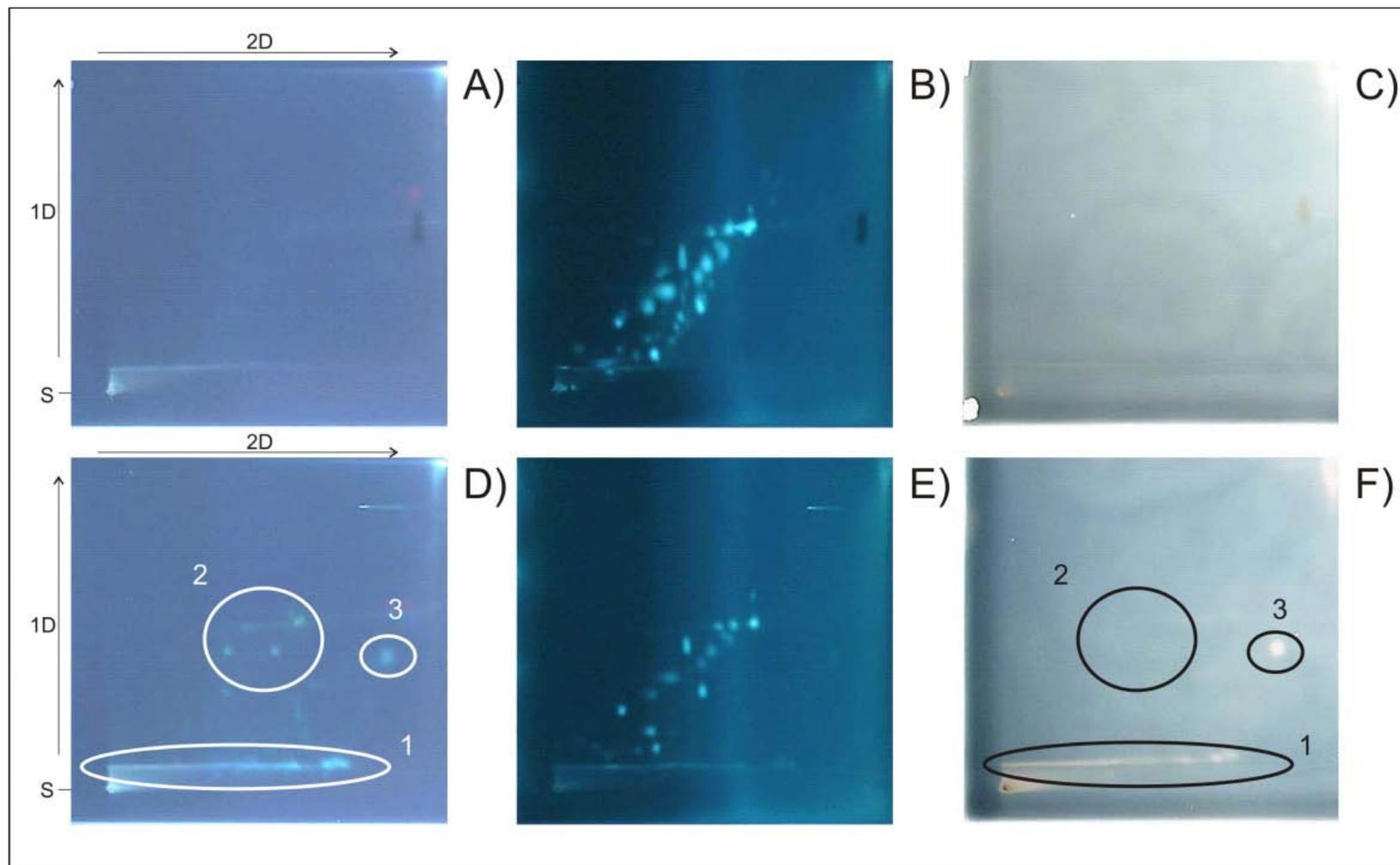


Abbildung 5-36. 2D-HPTLC der behandelten Myoglobin-Kontrolle (A, B, C) und des Sinapinsäure-Derivats (D, E, F) der höchsten Konzentration (Si6, vgl. **Tabelle 4-6**).

A, D [Detektion bei UV 366 nm, underivatisiert], B, E [Detektion bei UV 366 nm, Derivatisierung mit Fluorescamin], C, F [Detektion bei Weißlicht, Derivatisierung mit ABTS].

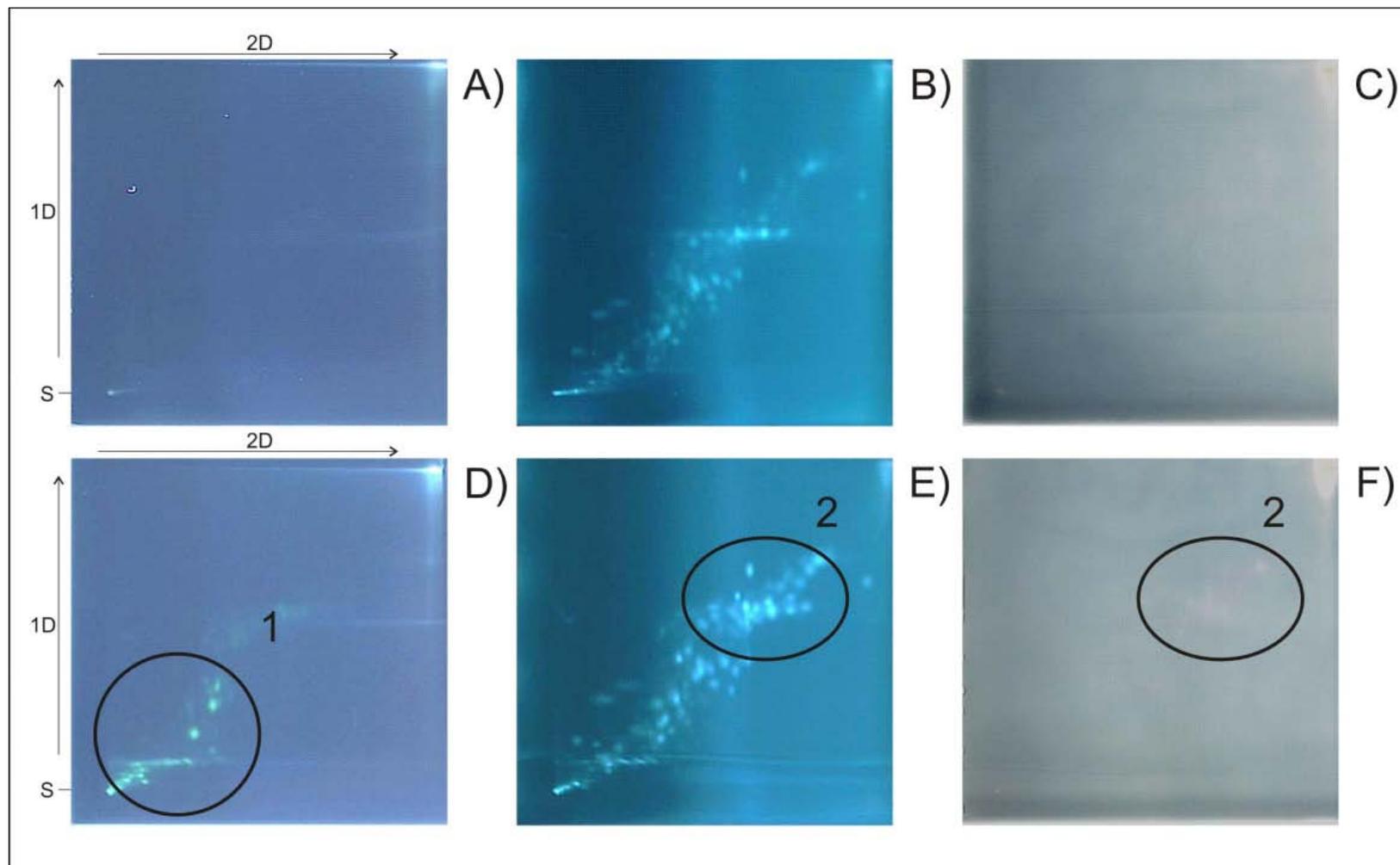


Abbildung 5-37. 2D-HPTLC der behandelten Casein-Kontrolle (A, B, C) und des Syringasäure-Derivats (D, E, F) der höchsten Konzentration (Sy6, vgl. **Tabelle 4-6**). A, D [Detektion bei UV 366 nm, underivatisiert], B, E [Detektion bei UV 366 nm, Derivatisierung mit Fluorescamin], C, F [Detektion bei Weißlicht, Derivatisierung mit ABTS].

Generell kann anhand der Ergebnisse der 1D-HPTLC- und 2D-HPTLC-Analyse festgestellt werden, dass die Reaktion von phenolischen Verbindungen zu Reaktionsprodukten führt, die sich in den hier untersuchten Eigenschaften (Polarität, UV-Aktivität und Radikalfängereigenschaften) unterscheiden. Die aus dem enzymatischen Verdau resultierenden modifizierten Peptide sind in ihren Eigenschaften divers (z.B. detektierbar/nicht-detektierbar mit Fluorescamin, UV-aktiv/nicht UV-aktiv, besitzen Radikalfängereigenschaften/besitzen keine Radikalfängereigenschaften). Zukünftig sind weitere, eingehende Untersuchungen notwendig, um die Ursachen dieser geänderten Eigenschaften herauszufinden. Es wurde außerdem gezeigt, dass die 1D-HPTLC eine schnelle und kostengünstige Methode repräsentiert, die eine Hochdurchsatzanalytik ermöglicht. Ein hochaufgelöstes Peptidprofil wird mittels 2D-HPTLC erreicht.

5.4.2 Softwaregesteuerte Analyse des zweidimensionalen Peptidprofils der enzymatisch verdauten Phenol-Protein-Derivate

Im Zuge der softwaregesteuerten Analyse ist es möglich eine automatische Auswertung der zweidimensionalen HPTLC-Chromatogramme vorzunehmen (vgl. **Kapitel 5.1.2**). Es kann somit eine Aussage über den Einfluss der Reaktion der phenolischen/verwandten Verbindung auf das Peptidprofil nach einem enzymatischen Verdau getroffen werden. Dabei kann sowohl die generelle Anzahl der Peptide nach dem tryptischen Verdau als auch die Übereinstimmung des Peptidprofils nach eine Modifikation verglichen werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse der softwaregesteuerten Auswertung für die Sinapin- und Syringasäure-Derivate von Myoglobin, Casein, Lysozym und Ovalbumin beschrieben.

In **Abbildung 5-38** sind die Ergebnisse der softwaregesteuerte Analyse der 2D-HPTLC der Sinapin- und Syringasäure-Derivate von Myoglobin, Casein, Lysozym und Ovalbumin dargestellt. Betrachtet man zunächst die Anzahl der detektierten Peptide der behandelten Protein-Kontrollen wird deutlich, dass wesentlich mehr Peptide detektiert als theoretisch berechnet wurden (vgl. **Tabelle 4-2**). Dies bestätigt die bereits beschriebene Vermutung (vgl. **Kapitel 5.4.1**), dass die Behandlung der Proteine (Lösen in Natriumhydroxid und offenes Schütteln für 24 h) zu einer partiellen Hydrolyse und verbesserten Verdaubarkeit geführt hat.

Die Sinapinsäure-Derivate stimmen bezüglich der Anzahl der detektierten Peptide ungefähr mit den behandelten Protein-Kontrollen überein. Eine Ausnahme stellt hier das Sinapinsäure-Derivat des Caseins dar, bei welchem eine wesentlich geringere Anzahl von Peptiden detektiert wurde. Weiterhin zeigt das

5. Ergebnisse und Diskussion

Sinapinsäure-Derivat des Lysozyms eine erhöhte Peptid-Anzahl. Die Syringasäure-Derivate weisen eine geringere Anzahl an detektierten Peptiden im Vergleich zur unbehandelten Protein-Kontrolle auf, mit Ausnahme des Syringasäure-Derivates des Caseins, welches eine ungefähr gleiche Anzahl zeigt.

Die Sinapin- und Syringasäure-Derivate weichen bezüglich ihres Peptidprofils stark von dem der unbehandelten Protein-Kontrolle ab. Dies wird durch die hohe Anzahl der für das Derivat spezifischen, detektierten Peptide deutlich. Eine Ausnahme bildet das Syringasäure-Derivat des Caseins und des Ovalbumins, bei dem sich die Anzahl der mit der Kontrolle übereinstimmenden Peptide ungefähr gleich bzw. größer der nicht-übereinstimmenden ist.

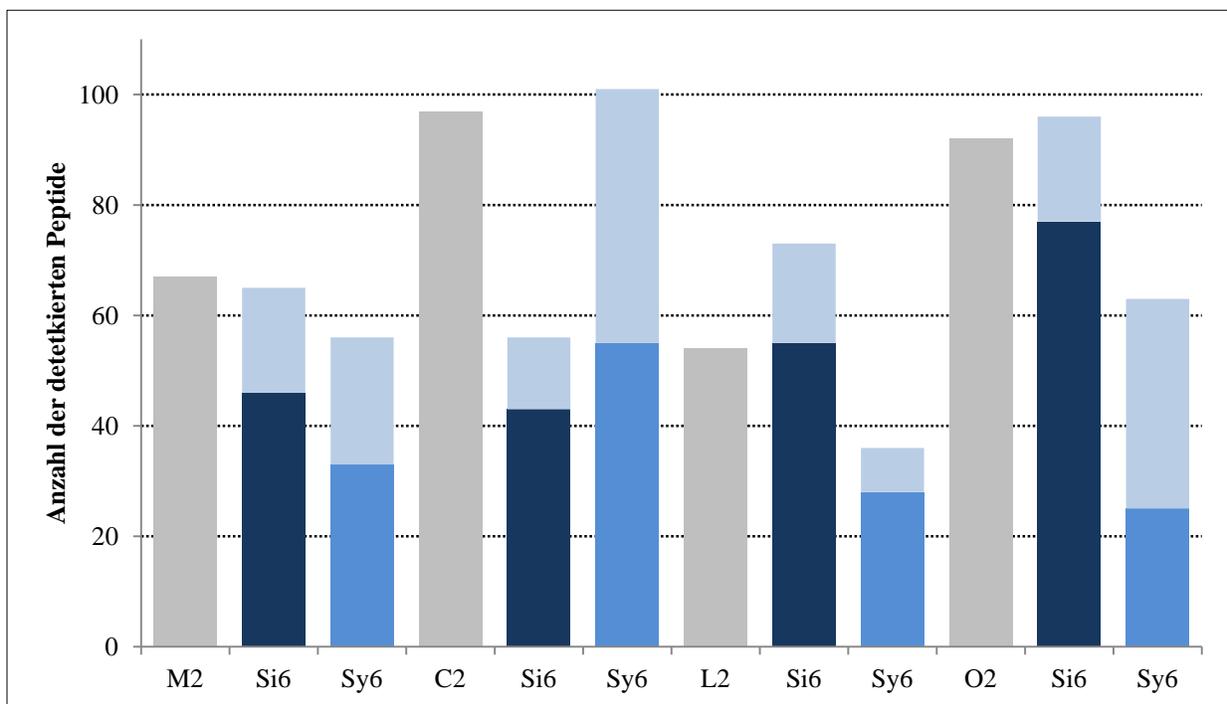


Abbildung 5-38. Softwaregesteuerte Analyse der 2D-HPTLC-Ergebnisse der Sinapin- und Syringasäure-Derivate von Myoglobin, Casein, Lysozym und Ovalbumin.

Legende siehe **Tabelle 4-6**. (■) Anzahl der detektierten Peptid-*spots* der behandelten Protein-Kontrollen. (■) Anzahl der ausschließlich für das Sinapinsäure-Derivat detektierten Peptid-*spots*. (■) Anzahl der ausschließlich für das Syringasäure-Derivat detektierten Peptid-*spots*. (■) Anzahl der mit der behandelten Protein-Kontrolle übereinstimmenden Peptid-*spots*.

Mit Hilfe der softwaregesteuerten Analyse der 2D-HPTLC-Ergebnisse kann eine Aussage über den Einfluss der Phenol-Protein-Reaktion auf das Peptidprofil der gebildeten Derivate getroffen werden. Dabei kann sowohl die generelle Anzahl der Peptide nach dem tryptischen Verdau als auch die

Übereinstimmung der Peptidprofile verglichen werden. Aus den hier gezeigten Ergebnissen wird deutlich, dass sowohl Sinapinsäure als auch Syringasäure einen intensiven Einfluss auf die Anzahl der Peptide nach tryptischem Verdau und das Peptidprofil der verwendeten Modellproteine ausüben. Dabei scheinen sich die Auswirkungen auf das jeweilige Modellprotein, vermutlich aufgrund der spezifischen Aminosäuresequenz, zu unterscheiden.

Generell stellt die Adaption einer Software zur digitalen Auswertung von zweidimensionalen Elektrophoresegelelen auf die Auswertung von zweidimensionalen HPTLC-Chromatogrammen eine hervorragende Möglichkeit zur reproduzierbaren, standardisierten Analyse dar. Diese wurde im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich auf die Analyse der Peptidprofile von Phenol-Protein-Derivaten angewendet. Die Ergebnisse dieser Auswertung können dazu genutzt werden *peptide maps* unterschiedlichster Phenol-Protein-Derivate (auch aus komplexen Lebensmittel-Matrices) zu erstellen und miteinander zu vergleichen. Weiterhin können die Ergebnisse von z.B. ABTS- oder Antigenitäts-*assays* (vgl. **Kapitel 2.2.1.4.1.2** und **2.2.1.4.1.3**) in die Auswertung mit einbezogen werden, sodass die Erstellung einer aktivitätsbezogenen *peptide map* ermöglicht wird.

5.4.3 Analyse der tryptisch verdauten Phenol-Protein-Derivate mittels HPTLC-DESI/MS

Eine Möglichkeit zur HPTLC-MS-Kopplung stellt die HPTLC-DESI-MS (*HPTLC-desorption electrospray ionization*) -Analyse dar. Diese Technik wurde bereits erfolgreich zur Identifikation von eindimensional und zweidimensional getrennten Peptiden auf HPTLC-Platten eingesetzt. Im Rahmen einer Kooperation mit der *Organic and Biological Mass Spectrometry Group (Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN, USA)* wurden ausgewählte tryptisch verdaute Myoglobin-Derivate mittels HPTLC-DESI/MS analysiert.

In **Abbildung 5-39** sind die Ergebnisse der HPTLC-DESI/MS-Analyse dargestellt. Um möglichst viele modifizierte Peptide zu identifizieren, wurde die Derivate mit der höchsten Konzentration an phenolischer/verwandter Verbindung eingesetzt (vgl. **Tabelle 4-5**). Weiterhin wurden nur die Derivate gewählt, die anhand vorheriger Ergebnisse ein umfangreiches, verändertes Peptidprofil zeigten (vgl. **Kapitel 5.4.1**). Mittels HPTLC-DESI/MS-Analyse wurden 28 *m/z*-Signale für die behandelte Myoglobin-Kontrolle erfasst. Diese Anzahl an Peptiden stimmt gut mit der theoretisch berechneten Anzahl der Peptide von 35 überein (vgl. **Tabelle 4-2**), wobei die Peptiddetektion durch die Nachweisempfindlichkeit des verwendeten Systems aber auch durch sog. *missed cleavage sites* (Spaltstellen im Proteinmolekül, an denen es nicht zu einer Spaltung gekommen ist) begrenzt ist. Das *p*-Cumarsäure-Derivat zeigte die

höchste Anzahl an modifizierten Peptiden, gefolgt vom Ferulasäure-Derivat, dem Chinasäure-Derivat und dem Syringasäure-Derivat.

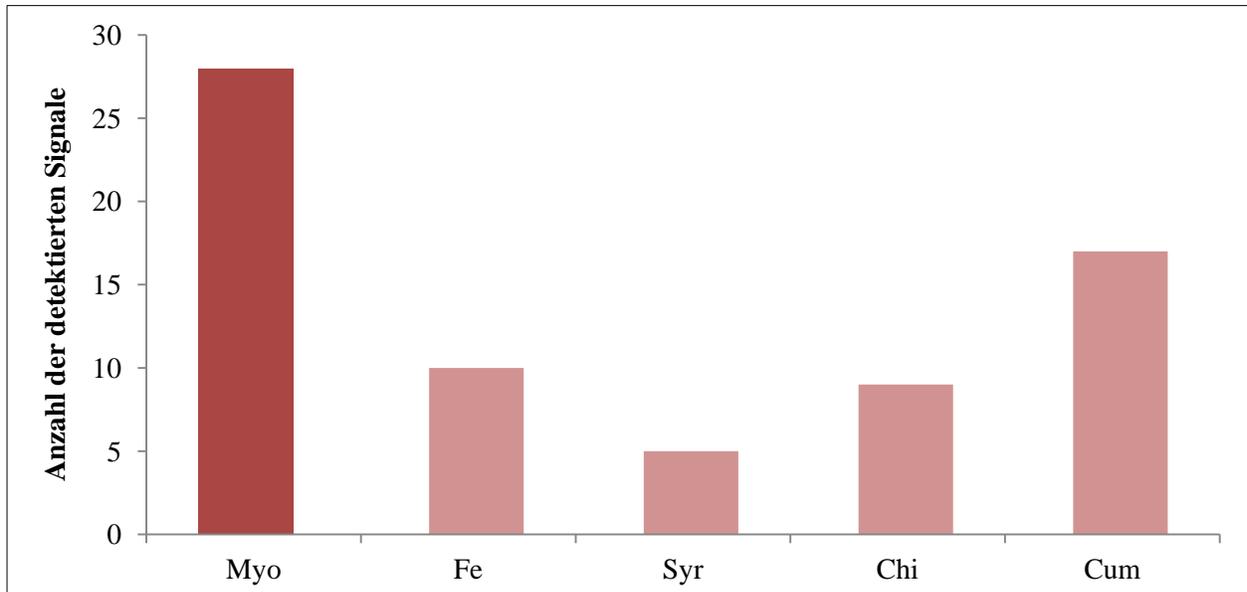


Abbildung 5-39. Vergleich der Anzahl der mittels HPTLC-DESI/MS detektierten m/z -Signale.

(■) Anzahl der detektierten Signale für die behandelte Myoglobin-Kontrolle insgesamt. (■) Anzahl der detektierten Signale der Derivate, die sich von der Kontrollprobe unterscheiden. Fe: Ferulasäure-Derivat F6. Syr: Syringasäure-Derivat Sy6. Chi: Chinasäure-Derivat Ch6. Cum: *p*-Cumarsäure-Derivat Cu6 (vgl. **Tabelle 4-6**).

Durch eine MS/MS-Analyse der erhaltenen Signale wurde ein modifiziertes Peptid mit einem Masse/Ladungsverhältnis von 671 identifiziert. In **Abbildung 5-40** ist das MS/MS Spektrum des dazugehörigen unmodifizierten Peptids dargestellt (m/z 470, Aminosäuresequenz: IPIK). Zu erkennen sind die bei einer MS/MS-Fragmentierung von Peptiden entstehenden b- und y-Ionenserien. In **Tabelle 5-16** sind die m/z -Signale für die zu erwartenden b- und y-Ionen des Peptids der Sequenz IPIK aufgeführt.

5. Ergebnisse und Diskussion

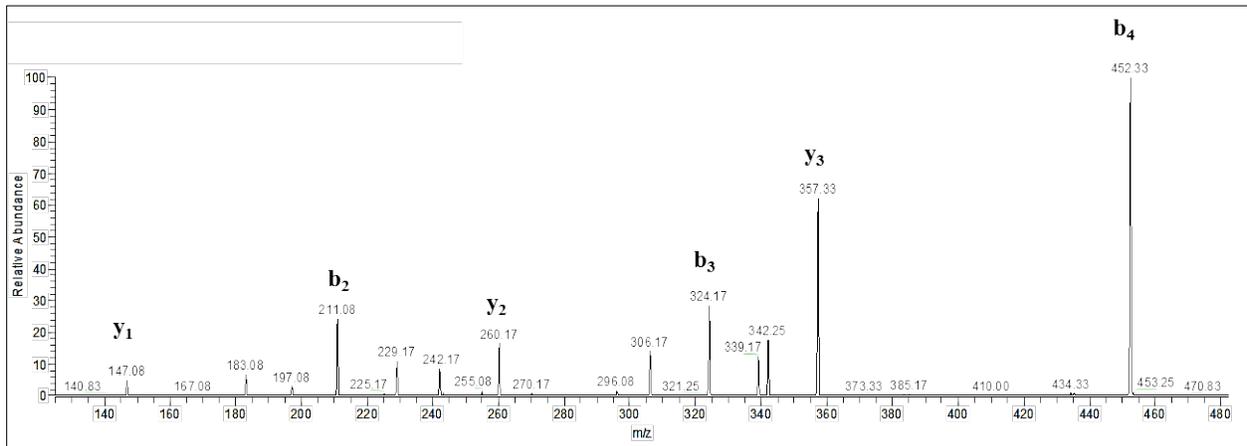


Abbildung 5-40. MS/MS-Spektrum des unmodifizierten Peptids der Sequenz IPIK. *precursor*-Ion: m/z 470

Tabelle 5-16. m/z -Signale der jeweiligen b- und y-Ionen Serie (berechnet mit: <http://db.systemsbiology.net/proteomicsToolkit/FragIonServlet.html>). Detektierte Signale sind fettgedruckt und unterstrichen dargestellt.

Sequenz #	b-Ion	y-Ion	#
I 1	114	470	4
P 2	<u>211</u>	<u>357</u>	3
I 3	<u>324</u>	<u>260</u>	2
K 4	<u>452</u>	<u>147</u>	1

Das MS/MS-Fragment-Spektrum des modifizierten Peptids ist in **Abbildung 5-41** dargestellt. In **Tabelle 5-17** sind die für das modifizierte Peptid detektierten m/z -Signale aufgeführt.

5. Ergebnisse und Diskussion

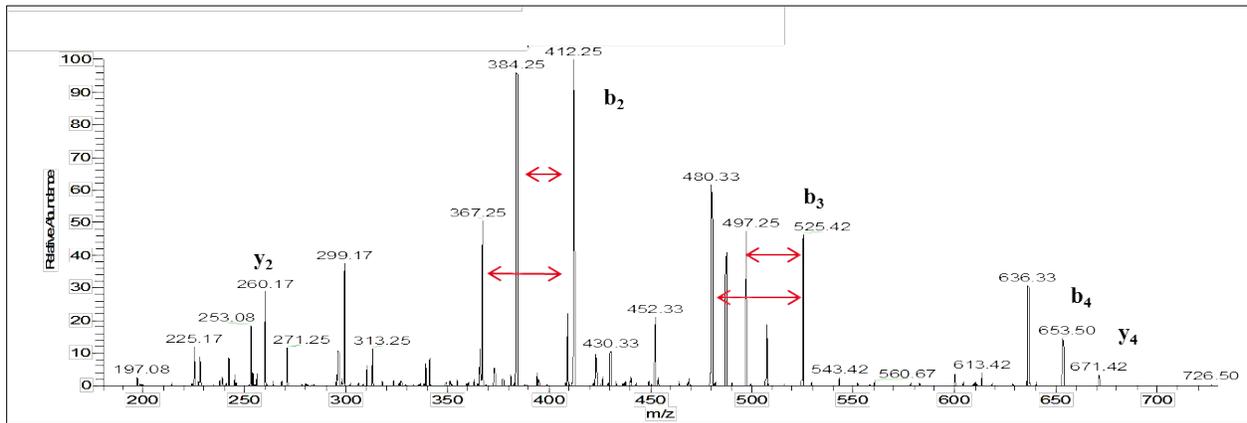


Abbildung 5-41. MS/MS-Spektrum des modifizierten Peptids der Sequenz IPIK. *precursor*-Ion: m/z 671. Massenverschiebung m/z 201.

Tabelle 5-17. Detektierte m/z -Signale der jeweiligen b- und y-Ionen des modifizierten Peptids.

#	b-Ion	y-Ion	#
1	-	671	4
2	412 384 (412-CO) 367 (412-COOH)	-	3
3	525 497 (525-CO) 480 (524-COOH)	260	2
4	653	-	1

Anhand der MS/MS-Fragmentspektren kann das detektierte, modifizierte Peptid mit einem Masse/Ladungsverhältnis von 671 auf das unmodifizierte Peptid mit der Sequenz IPIK und einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von 470 zurück geführt werden. Die m/z -Signale der b- und y-Ionen des modifizierten Peptids entsprechen denen des unmodifizierten Peptids mit einer Massenverschiebung von m/z 201. Weiterhin kann anhand der m/z -Signale der b- und y-Ionen die Position der Modifikation ermittelt werden. Aus den Ergebnissen für das modifizierte Peptid geht hervor, dass sich die Modifikation entweder an der ersten Isoleucin-Seitenkette oder an der Prolin-Seitenkette befinden kann. In **Tabelle 5-18** sind die theoretischen m/z -Signale der jeweiligen b- und y-Ionen des Peptids mit der Sequenz IPIK

5. Ergebnisse und Diskussion

mit einer Modifikation von m/z 201 lokalisiert an der ersten Isoleucin-Seitenkette **IPIK** aufgeführt. In **Tabelle 5-19** sind die theoretischen m/z -Signale der jeweiligen b- und y-Ionen Serie des Peptids mit der Sequenz **IPIK** mit einer Modifikation von m/z 201 lokalisiert an der ersten Prolin-Seitenkette **IPIK** aufgeführt.

Tabelle 5-18. Theoretische m/z -Signale der jeweiligen b- und y-Ionen des Peptids mit der Sequenz **IPIK** mit einer Modifikation von m/z 201 lokalisiert an der ersten Isoleucin-Seitenkette **IPIK**. Detektierte Signale sind fettgedruckt und unterstrichen dargestellt.

Sequenz	#	b-Ion	y-Ion	#
I	1	315	<u>671</u>	4
P	2	<u>412</u>	357	3
I	3	<u>525</u>	<u>260</u>	2
K	4	<u>653</u>	147	1

Tabelle 5-19. Theoretische m/z -Signale der jeweiligen b- und y-Ionen des Peptids mit der Sequenz **IPIK** mit einer Modifikation von m/z 201 lokalisiert an der Prolin-Seitenkette **IPIK**. Detektierte Signale sind fettgedruckt und unterstrichen dargestellt.

Sequenz	#	b-Ion	y-Ion	#
I	1	114	<u>671</u>	4
P	2	<u>412</u>	558	3
I	3	<u>525</u>	<u>260</u>	2
K	4	<u>653</u>	147	1

Keines der m/z -Signale, dass zur Unterscheidung zwischen der Position an der ersten Isoleucin-Seitenkette oder an der Prolin-Seitenkette herangezogen werden könnte (b₁-Ion, y₃-Ion; in der **Tabelle 5-18** und **Tabelle 5-19** kursiv markiert), wurde im MS/MS-Fragment-Spektrum des modifizierten Peptids detektiert. Demnach konnte die Position der Modifikation zwar eingegrenzt, nicht aber genau bestimmt werden. Hinzu kommt, dass die Massenverschiebung von 201 Da keinem Addukt der hier verwendeten

Verbindungen (Chinasäure, Ferulasäure, *p*-Cumarsäure, Syringasäure) zugeordnet werden kann. Hier bedarf es weiterführender Untersuchungen, um die genaue Position dieser Modifikation sowie deren Identität festzustellen.

Die Ergebnisse der HPTLC-DESI/MS zeigen, dass die Methode sehr gut zur Analyse von tryptisch verdauten Phenol-Protein-Molekülen geeignet ist. Besonders hervorzuheben ist hier die Möglichkeit, eine Bahn auf der HTPLC-Platte von der Applikationszone bis zur Laufmittelfront automatisch massenspektrometrisch zu analysieren. Dadurch gestaltet diese Methode sich im Vergleich zur HPTLC-ESI/MS mit dem kommerziellen TLC-ESI/MS-*interface* (CAMAG Chemie-Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG) einfacher in der Handhabung und ermöglicht kürzere Analysenzeiten. Allerdings kann eine Reproduzierbarkeit der Analysenergebnisse aufgrund der manuellen Positionierung der DESI-Quelle über der HPTLC-Platte und der damit verbundenen Ungenauigkeit nicht immer gewährleistet werden.

5.4.4 Analyse der tryptisch verdauten Phenol-Protein-Derivate mittels HPTLC-MALDI/TOF/MS

Wie bereits beschrieben handelt es sich bei der HPTLC-MALDI/TOF/MS um eine Kopplung von HPTLC und MALDI/TOF/MS (vgl. **Kapitel 2.2.1.4.2.2**). Dabei erfolgt vor der MALDI/TOF/MS-Analyse, die im Wesentlichen mit der üblichen MALDI/TOF/MS-Analyse übereinstimmt, eine chromatographische Trennung mittels HPTLC. Neben der Anwendung dieser Technik auf die unverdauten Phenol-Protein-Derivate wurde diese Technik im Rahmen dieser Arbeit auf ausgewählte tryptisch verdaute Derivate und Protein-Kontrollen angewendet. Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse des Syringasäure-Derivats des Casein (vgl. **Kapitel 5.4.1**) wurde der tryptische Verdau dieses Derivats mittels 1D-HPTLC-MALDI/TOF/MS-Analyse untersucht.

In **Abbildung 5-42** ist der vorgeschlagene Mechanismus der Bindung von 2,6-Dimethoxy-*p*-Benzochinon (Oxidationsprodukt von Syringasäure nach Frick et al. (1996)) an eine Aminogruppe im Proteinmolekül (basierend auf Rawel und Rohn (2010)) abgebildet. Zunächst erfolgt ein nucleophiler Angriff der Aminogruppe auf das C-Atom in C3- oder in C5-Position. Diese Ausbildung einer kovalenten Bindung hätte eine Massenverschiebung von m/z 169.16 zur Folge. Erfolgt eine erneute Oxidation dieses Adduktes kann es zu einer Ausbildung einer zweiten kovalenten Bindung zu einer Aminogruppe und somit zu einer Quervernetzung kommen (*cross-link*, vgl. **Kapitel 2.1.1.6.3.2**). Dabei kann die Quervernetzung zwischen zwei Proteinmolekülen oder innerhalb eines Proteinmoleküls erfolgen. Inwieweit sich diese Quervernetzung auf den tryptischen Verdau der Derivate auswirkt, ist noch unklar.

5. Ergebnisse und Diskussion

Die Berechnung einer Massenverschiebung, wie hier anhand der Bindung zu einem 2,6-Dimethoxy-*p*-Benzochinon-Molekül, wird dabei sehr komplex.

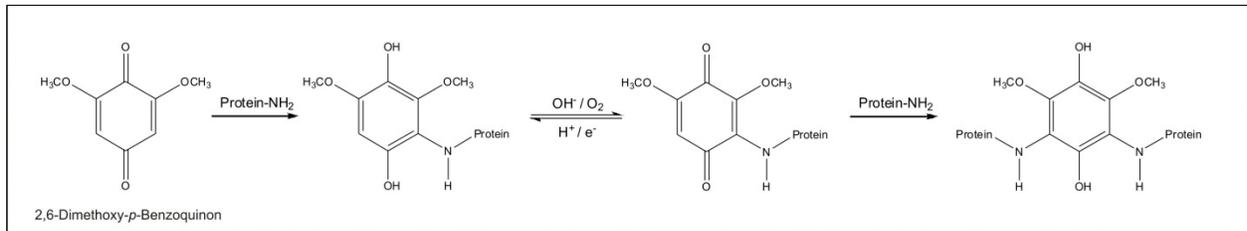


Abbildung 5-42. Vorgeschlagener Mechanismus der Bindung von 2,6-Dimethoxy-*p*-Benzochinon an ein Proteinmolekül; basierend auf Rawel und Rohn (2010).

In **Tabelle 5-20** sind die Ergebnisse der HPTLC-MALDI/TOF/MS-Analyse aufgeführt. Insgesamt wurden 41 *m/z*-Signale ausschließlich für die Syringasäure-Derivate des Caseins (nicht für die behandelte Casein-Kontrolle) beobachtet. Dabei konnten acht *m/z*-Signale zu Peptiden des Caseins mit einer Massenverschiebung eines 2,6-Dimethoxy-*p*-Benzochinon Moleküls mit einer maximalen Abweichung von 1.2 Da zugeordnet werden. Die detektierten Peptide stammen aus β -Casein (Nummer 2a, 4 und 8), α s1-Casein (Nummer 5 und 7), α s2-Casein (Nummer 1, 2b und 6) und κ -Casein (Nummer 3). Drei dieser Signale (siehe Tabelle 5-20, Nummer 2a, 2b, 4, 7) wurden innerhalb des Bereiches der grünfarbenen, UV-aktiven Banden beobachtet (vgl. **Kapitel 5.4.1, Abbildung 5-35 A, Bahnen Sy4-Sy6**). Ein Zusammenhang zwischen der Bindung des 2,6-Dimethoxy-*p*-Benzochinon Moleküls und dem Erscheinen der grünfarbenen, UV-aktiven Banden ist daher anzunehmen. Betrachtet man die Beschaffenheit der Peptide kann festgestellt werden, dass sich diese in ihrer Aminosäureanzahl sowie Aminosäuresequenz unterscheiden. Auffällig ist, dass fast alle Peptide Lysinseinheiten besitzen. Dieser Aspekt scheint die schon geäußerte Vermutung, dass Lysin als bevorzugte Reaktionsstelle in Frage kommt (Kroll et al. 2000; Rawel et al. 2001b), zu bekräftigen. Neben Lysin wurde weiterhin eine erhöhte Anzahl von Glutamin-Seitenketten festgestellt. Im Gegensatz zur ϵ -Aminogruppe von Lysin weist Glutamin eine Amidfunktion auf, die als potentielle Bindungsstelle für das 2,6-Dimethoxy-*p*-Benzochinon Molekül dienen kann.

5. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 5-20. HPTLC-MALDI/TOF/MS-Ergebnisse der Casein-Syringasäure Derivate. Fett: Signale wurden innerhalb der grünfarbenen, UV-aktiven Banden (vgl. **Kapitel 5.4.1, Abbildung 5-35 A, Bahnen Sy4-Sy6**) beobachtet.

Nr.	Höhe [mm]	gemessen MH+	berechnet MH+	Intensität [a.u.]	S/N ratio	Abweich- ung [Da]	Peptide Sequence	Peptide Herkunft
1	196	2033.897	2033.167	167.0*	19.3*	0.730	(K)FALPQYLKTVYQHQA(A)	α 2-casein
2a	234	671.979	671.490	917.1	202.8	0.489	(R)INKK(I)	β-casein
2b	234	671.979	671.453	917.1	202.8	0.526	(K)EVVR(N)	α2-casein
3	256	1378.709	1378.690	194.0*	40.2*	0.019	(K)SCQAQPTTMAR(H)**	κ -casein
4	346	1761.471	1761.087	12063.7	2269.4	0.384	(K)VLPVPQKAVPYPQR(D)	β-casein
5	354	1079.317	1079.629	1410.0	108.5	0.312	(K)EGIHAQQK(E)	α 1-casein
6	354	1496.239	1496.911	4377.6	625.5	0.672	(K)AMKPWIQPKTK(V)	α 2-casein
7	406	2137.512	2138.362	932.0	61.9	0.850	(-)MKLLILTCLVAVALARPK(H)	α1-casein
8	428	2152.150	2151.017	30217.0*	1593.7*	1.133	(K)FQSEEQQTDELQDK(I)	β -casein

* Natrium-Addukt

** oxidiertes Peptid

5. Ergebnisse und Diskussion

Generell kann festgestellt werden, dass die Kopplung der HPTLC und der MALDI/TOF/MS innerhalb dieser Arbeit erfolgreich zur Analyse von tryptisch verdauten Syringasäure-Derivaten des Caseins eingesetzt werden konnte. Die chromatographische Trennung der Peptide in einer sowie in zwei Dimensionen unterstützt von einer MALDI/TOF/MS-Detektion stellt eine neue Art der Peptidanalyse dar. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Peptide der Phenol-Protein-Derivate nicht nur in ihren Eigenschaften, wie Polarität, UV-Aktivität und Radikalfängereigenschaften, sondern auch in ihrem m/z -Verhältnis ändern.

6 Schlussfolgerung

Betrachtet man die Ergebnisse in Bezug auf die Reaktion der Hydroxyzimtsäuren mit den verwendeten Modellproteinen kann die Reihenfolge hinsichtlich ihrer Reaktivität wie folgt festgelegt werden: Ferulasäure < Sinapinsäure < *p*-Cumarsäure < Kaffeesäure (vgl. **Kapitel 5.3.1**, **Kapitel 5.3.2** und **Kapitel 5.4.1**). Die Reaktion mit Sinapinsäure hat zu einer Erhöhung der UV-Aktivität geführt. Diese Erscheinung wurde von Veränderungen der Polarität und erhöhten Radikalfängereigenschaften begleitet. Ferulasäure, der diese Methoxygruppe fehlt, verursacht keine der beschriebenen Änderungen. Daher spielt die zusätzliche Methoxygruppe an C5-Position im Sinapinsäuremolekül eine entscheidende Rolle. Die Reaktion mit *p*-Cumarsäure führt zu einer Verminderung der UV-Aktivität und der Radikalfängereigenschaften, besonders in der Reaktion mit Myoglobin. Zusätzlich können neue UV-aktive Banden mit Radikalfängereigenschaften im oberen R_f-Bereich beobachtet werden. Diese Beobachtungen unterscheiden sich von denen der Ferulasäure und Sinapinsäure. Das Fehlen der beiden Methoxygruppen in C3- und C5-Position im *p*-Cumarsäuremolekül scheint daher eine entscheidende Rolle für diese Auswirkungen zu spielen. Wie bereits in der Literatur erwähnt sind vicinale Dihydroxyverbindungen in der Lage unter oxidativen Bedingungen zu *o*-Chinonen zu reagieren (vgl. **Kapitel 2.1.1.6**). In der Reihe der in dieser Arbeit untersuchten Hydroxyzimtsäuren kommt diese Fähigkeit nur der Kaffeesäure zu. Die dadurch bedingte erhöhte Reaktivität im Vergleich zu Verbindungen, die „nur“ in der Lage sind Semichinon-Intermediate zu bilden (z.B. Ferulasäure), wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Hydroxybenzoesäure unterscheiden sich signifikant in ihren Reaktivitäten (vgl. **Kapitel 5.3.1**, **Kapitel 5.3.2** und **Kapitel 5.4.1**). Die Reaktion von Syringasäure führte bei allen untersuchten Modellproteinen zu einer Steigerung der UV-Aktivität in Form von grünfarbenen, UV-aktiven Banden nach dem tryptischen Verdau. Vermutlich führt die Bindung des bei der Oxidation von Syringasäure entstehenden 2,6-Dimethoxy-*p*-Benzochinons an Aminosäureseitenketten zu dieser Erscheinung. In abgeschwächter Form wurde diese gesteigerte UV-Aktivität auch bei Sinapinsäure beobachtet. Die Anordnung der Hydroxylgruppe an C4-Position und der beiden Methoxygruppen an C3 und C5 Position, wie sie bei Syringasäure und Sinapinsäure zu beobachten ist, könnte Bedingung für eine erhöhte UV-Aktivität sein. Die Ergebnisse bezüglich der Reaktion von Gallus- und Tanninsäure mit den ausgewählten Modellproteinen zeigen, dass die Reaktivität beider Verbindungen vergleichbar ist (vgl. **Kapitel 5.3.1**, **Kapitel 5.3.2** und **Kapitel 5.4.1**). Tannine sind komplexe Mischungen von Molekülen mit einer hohen Anzahl von Hydroxyl-Gruppen. Unter alkalischen Bedingungen kann eine Hydrolyse in

6. Schlussfolgerung

Kohlenhydrate (Glucose) und Phenolsäuren oder deren Di-Ester erfolgen (vgl. **Abbildung 2-13**). Gallussäure, ein Hydrolyse-Produkt von hydrolysierbaren Tanninen, wird unter oxidativen Bedingungen zu einem Semichinon-Radikal umgesetzt (Eslami et al. 2010), welches vermutlich bei der Reaktion von sowohl Gallussäure als auch Tanninsäure als reaktive Struktur fungiert. Dies scheint die Ursache für die in dieser Arbeit beobachtete vergleichbare Reaktivität zu sein. Interessanterweise scheint die Reaktivität des Semichinon-Radikals der Gallussäure mit der Reaktivität des *o*-Chinons der Kaffeesäure analog zu sein. Weiterhin scheinen sich Gallussäure und Tanninsäure unterschiedlich auf die Verdaubarkeit von Proteinen auszuwirken. Innerhalb dieser Arbeit wurde eine starke Minderung der Verdaubarkeit für das Modellprotein Myoglobin und eine schwache Minderung für das Modellprotein Casein beobachtet (vgl. **Kapitel 5.4.1**). Betrachtet man die Aminosäurekomposition der beiden Proteine (vgl. **Tabelle 4-2**) liegen die Unterschiede vor allem im hohen Gehalt an Prolin- und Phosphoserinseitenketten der Caseine (Mercier et al. 1971). Myoglobin hingegen zeigt eine leicht höhere Anzahl an Lysin-, Histidin-, Glycin- und Alaninseitenketten. Generell können dem Grad der Phosphorylierung und den Unterschieden in der Aminosäuresequenz eine entscheidende Bedeutung im Falle der Reaktion mit Gallus- und Tanninsäure zugesprochen werden.

Chinasäure zeigte im Gegensatz zu allen anderen verwendeten phenolischen Verbindungen eine geringere Reaktivität. Chinasäure besitzt kein benzoides System und kann somit nicht zu reaktiven Intermediaten oxidiert werden. Daher erfolgt vermutlich keine Modifikation von den in dieser Arbeit untersuchten Modellproteinen.

Myoglobin zeigt im Vergleich zu allen anderen Modellproteinen eine erhöhte Reaktivität (vgl. **Kapitel 5.3.1** und **5.3.2**). In der Literatur werden freie Thiolgruppen des Cysteins, freie Aminogruppen des Lysins, Methioninseitenketten sowie die Indolringe von Tryptophan als Hauptreaktionstellen der Chinone und Semichinon-Intermediate identifiziert (Le Bourvellec und Renard 2012). Keines der Modellproteine besitzt eine freie Thiolgruppe. In Bezug auf die Anzahl der Lysinseitenketten besitzen Myoglobin und Ovalbumin etwa gleich viele, wobei die Anzahl in Lysozym und Casein geringer ist. Ovalbumin enthält besonders viele Methioninseitenketten. Tryptophan kommt in allen Modellproteinen in vergleichsweise geringer Anzahl vor. Ein direkter Zusammenhang der in der Literatur erwähnten Aminosäureseitenketten mit der in dieser Arbeit beobachteten Reaktivität wird daher nicht deutlich.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die kovalente Bindung von Chinonen und Semichinon-Intermediaten phenolischer Verbindung an Proteine entscheidend durch Parameter, wie die Stellung der Hydroxyl- und Methoxygruppen sowie der Aminosäurekomposition der Proteine beeinflusst wird. Diese

6. Schlussfolgerung

Beeinflussung wurde vielfach in Studien erwähnt und kann durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt werden. Die Reaktion führt zu unterschiedlichen Protein-Phenol-Derivaten, die sich in den hier untersuchten Eigenschaften signifikant voneinander unterscheiden (Polarität, UV-Aktivität, Färbung mit Derivatisierungsreagenzien, Radikalfängereigenschaften, Antigenität, Molekulargewicht).

7 Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung von HPTLC-Methoden zur Analyse von Phenol-Protein-Wechselwirkungen. Die innerhalb dieser Arbeit entwickelten HPTLC-Methoden sollten dazu dienen, die unverdauten Phenol-Protein-Derivate hinsichtlich ihrer Polarität, UV-Aktivität, ihres Molekulargewichtes, ihrer antimikrobiellen und antigenen Eigenschaften zu untersuchen. Nach einem tryptischen Verdau sollten außerdem die Polarität, UV-Aktivität und die Radikalfängerfängereigenschaften der Peptide in einem 1D- und 2D-HPTLC-System untersucht werden. Das Peptidspektrum der Phenol-Protein-Derivate wurde mittels HPTLC-DESI/MS und HPTLC-MALDI/TOF/MS untersucht.

Die HPTLC stellt aufgrund der vielfältigen Möglichkeiten in der Wahl der mobilen und stationären Phase eine hervorragende Methode für die Protein- und Peptidanalytik dar (Bhushan et al. 1989). Im Vergleich zur HPLC kann durch eine Optimierung des chromatographischen Systems eine vergleichbare, u.U. sogar bessere Trennung erreicht werden. Wie aus den Ergebnissen dieser Arbeit ersichtlich hat die 2D-HPTLC zu einer Verbesserung der Auflösung der Peptidtrennung geführt (vgl. **Kapitel 5.1.1.4**). Die erhöhte Trennleistung ermöglicht eine tiefergehende Analyse des Peptidprofils, welche gerade bei noch wenig erforschten Reaktionen, wie der hier betrachteten Reaktion von phenolischen Verbindungen und Proteinen, viele, wertvolle Informationen in einer kurzen Analysenzeit liefern kann. Dabei bietet es sich an die 1D-HPTLC zunächst als kostengünstige, robuste und schnelle Hochdurchsatz-*screening*-Methode einzusetzen und anschließend besonders vielversprechende Proben genauer mit der 2D-HPTLC zu analysieren. Die Anwendung einer Software zur digitalen Auswertung von 2D-HPTLC-Chromatogrammen stellt eine hervorragende Möglichkeit zur reproduzierbaren, standardisierten Analyse dar (vgl. **Kapitel 5.1.2**). Daher wurde innerhalb dieser Arbeit zunächst eine Methodenentwicklung zur 1D- und 2D-Trennung von Peptiden/Proteinen durchgeführt. Die speziell zur Peptid-/Protein-Analyse angebotenen HPTLC-ProteoChrom[®]-Kieselgel-Glasplatten zeigten im Vergleich zu den analogen HPTLC-Ausführungen eine etwas bessere Trennleistung. Allerdings eignen sich auch die traditionellen HPTLC-Kieselgel-60-Schichten und HPTLC-Cellulose-Schichten sowie RP-Schichten zur Peptid-/Proteintrennung. Als mobile Phase in der 1D-HPTLC erzielte ein Gemisch aus 2-Butanol/Pyridin/Ammoniak (25 %)/Wasser (39/34/10/26, v/v/v/v) gute Ergebnisse. In Kombination mit 2-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (10/8/3/5, v/v/v/v) in der zweiten Dimension wurde eine gesteigerte Trennleistung erreicht. Innerhalb einer Methodenentwicklung zur Verbesserung der Trennleistung in der ersten Dimension haben sich ein Gemisch aus Acetonitril/Wasser/Methanol (5/3/2, v/v/v) und ein

Gemisch aus Ethylacetat/Wasser/Ameisensäure (8/1/1, v/v/v) als geeignet erwiesen. Die Auswertung der 1D-Chromatogramme kann vor oder nach einer postchromatographischen Derivatisierung mit Hilfe eines Wellenlängenscans erfolgen. Die 2D-Chromatogramme wurden softwaregesteuert unter Verwendung der Software Image Master Platinum 2D ausgewertet.

Des Weiteren wurden im Rahmen dieser Arbeit unterschiedliche Kombinationen von der HPTLC und der effektgerichteten Analyse untersucht. Eine Art diese Kombination wird durch die postchromatographische Analyse von Radikalfängereigenschaften realisiert. Der üblicherweise eingesetzte HPTLC-DPPH- sowie der entwickelte HPTLC-ABTS-*assay* wurde innerhalb dieser Arbeit für die Detektion von Radikalfängereigenschaften einfacher phenolischer Verbindungen validiert und miteinander verglichen. Der HPTLC-ABTS-*assay* stellte unter den gegebenen Bedingungen die sensitivere Methode dar und wurde daher zur Analyse von Phenol-Protein-Derivaten eingesetzt. Bisher werden für den Nachweis von Radikalfängereigenschaften photometrische *assays* genutzt. Dabei wird die gesamte Probe mit einer Reaktionslösung gemischt und anschließend in Bezug auf die Radikalfängereigenschaften analysiert. Der Nachteil dieser photometrischen *assays* liegt darin, dass die Substanzen der Probe, die als Radikalfänger fungieren, nicht identifiziert werden können. Daher bietet sich eine Kombination von chromatographischer Trennung und *assay* an, die eine Lokalisierung von Substanzen mit Radikalfängereigenschaften auf der HPTLC-Platte ermöglicht. Die Beeinflussung der Radikalfängereigenschaften von phenolischen/verwandten Verbindungen durch eine Reaktion mit Proteinen ist bisher noch weitestgehend unerforscht. Analytische Methoden, wie der HPTLC-ABTS-*assay*, sind daher unbedingt notwendig, um diesen Aspekt genauer zu betrachten.

Die postchromatographische Analyse der antimikrobiellen Eigenschaften wird durch die Kombination von der HPTLC und der Bioautographie realisiert. Diese Technik sollte zur Analyse der antimikrobiellen Eigenschaften der Phenol-Protein-Derivate genutzt werden. Dazu wurden zunächst die in der HPTLC traditionell verwendeten stationären und mobilen Phasen auf eine Beeinflussung des Mikroorganismenwachstums untersucht. Eine negative Beeinflussung des Wachstums wurde für Ameisensäure, Eisessig, Ammoniak (25 %) und n-Hexan sowie für HPTLC-KG-60-NH₂-F₂₅₄S-Glasplatten und TLC-KG-60-RP-8-F₂₅₄S-Glasplatten festgestellt. Außerdem wurde der Einfluss der optischen Dichte (d.h. Bakterienkonzentration) und der Inkubationsdauer auf das Analyseergebnis der HPTLC-Direkte Bioautographie untersucht. Eine optische Dichte von 0.1 bis 1 sowie eine Inkubationsdauer von einer bis vier Stunden führten zu einem guten Ergebnis. Allerdings scheinen sich diverse Parameter (neben optischer Dichte und Inkubationsdauer auch Sauerstoffgehalt und

Luftfeuchtigkeit) auf das Ergebnis auszuwirken. Der HPTLC-*agar-overlay* und die HPTLC-DB wurden erfolgreich auf die Analyse der antimikrobiellen Aktivität von phenolischen/verwandten Verbindungen sowie eines phenolreichen Lebensmittels angewendet. Die Analyse der antimikrobiellen Aktivität von Phenol-Protein-Derivaten führte hingegen nicht zum Erfolg. Vermutlich sind die innerhalb dieser Arbeit entwickelten HPTLC-Bioautographie-Methoden nicht nachweisempfindlich genug, um die antimikrobielle Aktivität der Derivate zu erfassen. Die antimikrobielle Aktivität von phenolischen/verwandten Verbindungen könnte zukünftig, z.B. zu Konservierung von Lebensmitteln, von Bedeutung sein. Daher ist es notwendig, diese Eigenschaft genauer zu untersuchen und festzustellen, ob eine Beeinflussung durch andere Lebensmittelinhaltsstoffe, wie z.B. Proteine, stattfindet.

Die antigenen Eigenschaften von einem Modellprotein (Myoglobin) wurden mit der HPTLC-IF erfolgreich analysiert. Die Untersuchung der Eignung von stationären Phasen ergab, dass Kieselgel-60-Schichten für die HPTLC-IF von Myoglobin gut geeignet sind. Bei der Verwendung von Kieselgel-RP-18-Schichten wurde Myoglobin nicht mittels Immunfärbung detektiert. Daher ist von einer Verwendung dieser zur HPTLC-IF vorerst abzuraten. Die HPTLC-IF ermöglicht im Vergleich zu den traditionellen Methoden, wie ELSIA und Western Blot, eine postchromatographische Detektion von antigenen Eigenschaften. Es wird demnach festgestellt, welche Substanz als Antigen fungiert. Im Gegensatz zum Western Blot werden nicht nur Proteine, sondern alle Probeninhaltsstoffe erfasst, was besonders zur Analyse von unerwünschten Kreuzreaktionen genutzt werden kann. Die HPTLC-IF bietet vergleichbar zum HPTLC-ABTS-*assay* eine umfassendere, ganzheitliche Analyse der Probe und trägt somit zum Verständnis der antigenen Wirkung von Lebensmittelinhaltsstoffen bei. Die Beeinflussung der Allergene, in diesem Fall der Proteine, durch eine Reaktion mit phenolischen/verwandten Verbindungen ist bisher noch unerforscht. Analytische Methoden, wie die HPTLC-IF, sind daher von Nöten, um diesen Aspekt genauer zu untersuchen.

Durch die Kopplung von der HPTLC zu der Massenspektrometrie wird eine *in situ*-Identifizierung der Proteine/Peptide ermöglicht. Es handelt sich bei dieser Kopplung um eine *offline*-Methode. Der Arbeitsaufwand ist demnach höher als bei den traditionellen *online*-Methoden (vgl. HPLC-MS). Dem gegenüber steht der Vorteil der von der mobilen Phase entkoppelten, massenspektrometrischen Detektion. Diese Entkopplung führt zu einer massiven Erhöhung der Freiheitsgrade in der Wahl der mobilen Phase. Demnach können Proteine/Peptide durch die Wahl unterschiedlicher mobiler Phasen und einer ein- oder mehrdimensionalen Trennung in einer bisher nicht erreichten Auflösung chromatographisch getrennt werden. Neben der mobilen Phase kann auch die stationäre Phase frei gewählt werden, was zu einer

weiteren Erhöhung der Trennleistung führen kann. Die Kompatibilität der verschiedenen stationären Phasen mit der Massenspektrometrie ist bisher noch nicht ausreichend untersucht. Zusätze, wie Bindemittel, könnten zu einer Störung der massenspektrometrischen Detektion führen. Dennoch zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die HPTLC-MS dazu geeignet ist Proteine/Peptide nach chromatographischer Trennung zu identifizieren. Daher ist die HPTLC-MS durchaus als Ergänzung zu den traditionellen *proteomics*-Methoden in Betracht zu ziehen. Besonders im Hinblick auf die Identifizierung von intakten Proteinen ist diese Methode vielversprechend. Der Arbeitsaufwand, im Vergleich zu traditionellen Methoden die der 2D-Gelelektrophorese mit anschließendem in-Gel-Verdau, könnte entscheidend verringert werden.

Innerhalb dieser Arbeit wurden die Kopplungen von der HPTLC zur ESI/MS, DESI/MS und MALDI/TOF/MS untersucht. Dabei liegt der Vorteil der DESI/MS und MALDI/TOF/MS hauptsächlich in der automatisierten, ununterbrochenen Aquisition von Massenspektren entlang der gesamten Trennstrecke. Bei der HPTLC-ESI/MS hingegen kann durch die Verwendung des TLC-ESI/MS-*interface* nur ein *spot* zur Zeit analysiert werden. Um eine vermehrte Anwendung der HPTLC-MS-Methoden zu erreichen, ist eine automatisierte MS-Analyse unbedingt erforderlich. Nur dadurch wird eine robuste, reproduzierbare Analytik erreicht. Ein weiterer, bedeutender Parameter bei der HPTLC-MS-Kopplung ist die Vorbereitung der HPTLC-Aluminiumfolie bzw. -Glasplatte. Die HPTLC-DESI/MS-Analyse erfordert außer der Markierung der Applikationszone und der Laufmittelfront keine Vorbereitung. Die HPTLC-ESI/MS erfordert eine exakte Lokalisierung der zu untersuchenden *spots*. Denn nur durch eine genaue Positionierung der HPTLC-Schicht unter dem Stempel des *interface* kann eine erfolgreiche massenspektrometrische Detektion erfolgen. Die aufwendigste Vorbereitung wird bei der HPTLC-MALDI/TOF/MS benötigt. Vor der Analyse ist eine Beschichtung der Oberfläche mit Matrix notwendig. Diese Matrix verursacht im weiteren Verlauf der Analyse Hintergrundsignale im unteren Massenbereich. Peptide mit einem Molekulargewicht von unter 1 kDa sind daher schwierig zu analysieren. Nicht außer Acht zu lassen ist auch die Verschmutzung der MALDI-Quelle durch die hohe Matrixkonzentration (200 g/L 2,5-DHB).

Die Kopplungen von der HPTLC zur ESI/MS, DESI/MS und MALDI/TOF/MS wurden im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich für die Analyse von unmodifizierten sowie modifizierten Peptiden eingesetzt. Mit Hilfe der HPTLC-DESI/MS und HPTLC-MALDI/TOF/MS wurden modifizierte Peptide auf der HPTLC-Platte lokalisiert und identifiziert, wobei die Stellung der Modifikation im Peptidmolekül durch eine HPTLC-DESI/MS/MS Analyse bis auf zwei Aminosäureseitenketten eingegrenzt werden konnte.

Demnach stellt die Kopplung von HPTLC und Massenspektrometrie (besonders die HPTLC-DESI/MS) eine leistungsstarke Methode zur Identifizierung von mit phenolischen Verbindungen modifizierten Peptiden dar.

Die Reaktion von Modellproteinen und Chinonen sowie Semichinon-Intermediaten phenolischer/verwandter Verbindungen, die in der Literatur beschrieben werden, wurde innerhalb dieser Arbeit bestätigt. Zusätzlich wurden mit Hilfe der in dieser Arbeit entwickelten HPTLC-Methoden Ergebnisse, z.B. in Bezug auf die UV-Aktivität und auf die antigenen Eigenschaften, erhalten, die mit den bisherigen analytischen Methoden nicht erzielt werden konnten. Die Reaktivität der in dieser Arbeit untersuchten phenolischen/verwandten Verbindungen gegenüber den Modellproteinen Myoglobin, Lysozym, Casein und Ovalbumin nimmt in der Reihenfolge Chinasäure, Ferulasäure, *p*-Cumarsäure, Syringasäure, Sinapinsäure, Kaffeesäure, Gallussäure und Tanninsäure zu. Es kann festgestellt werden, dass die kovalente Bindung von Chinonen und Semichinon-Intermediaten phenolischer/verwandter Verbindungen an Proteine entscheidend durch Parameter, wie die Stellung der Hydroxyl- und Methoxygruppen sowie der Aminosäurekomposition der Proteine beeinflusst wird. Diese Beeinflussung wurde vielfach in Studien erwähnt und kann durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt werden. Diese Reaktion führt zu unterschiedlichen Phenol-Protein-Derivaten, die sich in den hier untersuchten Eigenschaften signifikant voneinander unterscheiden (Polarität, UV-Aktivität, Färbung mit Derivatisierungsreagenzien, Radikalfängereigenschaften, Antigenität, Molekulargewicht).

8 Literatur

- Akkad R, Schwack W. 2008. Multi-enzyme inhibition assay for detection of insecticidal organophosphates and carbamates by high-performance thin-layer chromatography. 1. Basics of method development. *JPC-J Planar Chromat* **21**:411-415.
- Amitai G, Adani R, Sod-Moriah G, Rabinovitz I, Vincze A, Leader H, Chefetz B, Leibovitz-Persky L, Friesem D, Hadar Y. 1998. Oxidative biodegradation of phosphorothiolates by fungal laccase. *FEBS Lett* **438**:195-200.
- Asano K, Shinagawa K, Hashimoto N. 1982. Characterization of haze-forming proteins of beer and their roles in chill haze formation. *J Am Soc Brew Chem* **40**:147-154.
- Bancirova M. 2010. Comparison of the antioxidant capacity and the antimicrobial activity of black and green tea. *Food Res Int* **43**:1379-1382.
- Baranowski JD, Davidson PM, Nagel CW, Branen AL. 1980. Inhibition of *saccharomyces-cerevisiae* by naturally-occurring hydroxycinnamates. *J Food Sci* **45**:592-594.
- Baranowski JD, Nagel CW. 1984. Antimicrobial and antioxidant activities of alkyl hydroxycinnamates (alkacins) in model systems and food-products. *Can J Food Sc Tech J* **17**:79-85.
- Barre J, Chamouard JM, Houin G, Tillement JP. 1985. Equilibrium dialysis, ultrafiltration, and ultracentrifugation compared for determining the plasma-protein-binding characteristics of valproic acid. *Clin Chem* **31**:60-64.
- Beart JE, Lilley TH, Haslam E. 1985. Polyphenol interactions .2. Covalent binding of procyanidins to proteins during acid-catalyzed decomposition - observations on some polymeric proanthocyanidins. *J Chem Soc Perk T 2*:1439-1443.
- Belitz HD, Grosch W, Schieberle P. 2001. Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Springer Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokio, Hongkong, Barcelona, Budapest.
- Betina V. 1973. Bioautography in paper and thin-layer chromatography and its scope in the antibiotic field. *J Chromatogr* **78**:41-51.
- Bhushan R, Mahesh VK, Mallikharjun PV. 1989. Thin-layer chromatography of peptides and proteins - a review. *Biomed Chromatogr* **3**:95-104.
- Botz L, Nagy J, Kocsis B. 2001. Detection of microbiologically active compounds. *JPC-J Planar Chromat* 489-516.
- Bozic M, Gorgieva S, Kokol V. 2012. Homogeneous and heterogeneous methods for laccase-mediated functionalization of chitosan by tannic acid and quercetin. *Carbohydr Polym* **89**:854-864.
- Charlton AJ, Baxter NJ, Khan ML, Moir AJG, Haslam E, Davies AP, Williamson MP. 2002. Polyphenol/peptide binding and precipitation. *J Agr Food Chem* **50**:1593-1601.
- Chen S, Sobansky MR, Hage DS. 2010. Analysis of drug interactions with high-density lipoprotein by high-performance affinity chromatography. *Anal Biochem* **397**:107-114.

- Chen XL, Zhang T, Liu HX, Qu LB, Yu YZ, Zhao YF. 2004. Direct observation of non-covalent complexes for phosphorylated flavor noidprotein interaction by ESI. *Chinese Chem Lett* **15**:343-346.
- Cheng GWW, Crisosto CH. 1997. Iron-polyphenol complex formation and skin discoloration in peaches and nectarines. *J Am Soc Hortic Sci* **122**:95-99.
- Cheng KW, Wu Q, Zheng ZP, Peng X, Simon JE, Chen F, Wang M. 2007. Inhibitory effect of fruit extracts on the formation of heterocyclic amines. *J Agr Food Chem* **55**:10359-10365.
- Cheynier VF, Trousdale EK, Singleton VL, Salgues MJ, Wylde R. 1986. Characterization of 2-s-glutathionylcaftaric acid and its hydrolysis in relation to grape wines. *J Agr Food Chem* **34**:217-221.
- Cheynier VF, Osse C, Rigaud J. 1988. Oxidation of grape juice phenolic-compounds in model solutions. *J Food Sci* **53**:1729-1732.
- Choma IM, Choma A, Staszczuk K. 2002. Direct bioautography-thin-layer chromatography of flumequine and doxycycline in milk. *JPC-J Planar Chromat* **15**:187-191.
- Choma IM, Choma A, Komaniecka I, Pilorz K, Staszczuk K. 2004. Semiquantitative estimation of enrofloxacin and ciprofloxacin by thin-layer chromatography - direct bioautography. *J Liq Chromatogr R T* **27**:2071-2085.
- Choma IM. 2005. The use of thin-layer chromatography with direct bioautography for antimicrobial analysis. *LC GC Eur* **18**:482-488.
- Choma IM. 2006. Thin-layer chromatography-direct bioautography of flumequine residues in milk. *J Liq Chromatogr R T* **29**:2083-2093.
- Choma IM, Grzelak EM. 2011. Bioautography detection in thin-layer chromatography. *J Chromatogr A* **19**:2684-2691.
- Cilliers JLL, Singleton VL. 1989. Nonenzymic autoxidative phenolic browning reactions in a caffeic acid model system. *J Agr Food Chem* **37**:890-896.
- Cilliers JLL, Singleton VL. 1990. Caffeic acid autoxidation and the effects of thiols. *J Agr Food Chem* **38**:1789-1796.
- Cilliers JLL, Singleton VL. 1991. Characterization of the products of nonenzymic autoxidative phenolic reactions in a caffeic acid model system. *J Agr Food Chem* **39**:1298-1303.
- Colaric M, Veberic R, Solar A, Hudina M, Stampar F. 2005. Phenolic acids, syringaldehyde, and juglone in fruits of different cultivars of *Juglans regia* l. *J Agr Food Chem* **53**:6390-6396.
- Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. 2009. Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep* **26**:1001-1043.
- Ebermann R, Elmadfa I. 2011. *Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung*. Springer: Wien New York.

- Eberz G, Rast HG, Burger K, Kreiss W, Weisemann C. 1996. Bioactivity screening by chromatography-bioluminescence coupling. *Chromatographia* **43**:5-9.
- Eisenbrand G, Schreier P. 1995. Römpp Lexikon Lebensmittelchemie. Thieme Verlag: Stuttgart, New York.
- El-Hady D, Kuhne S, El-Maali N, Watzig H. 2010. Precision in affinity capillary electrophoresis for drug-protein binding studies. *J Pharmaceut Biomed* **52**:232-241.
- El-Seedi HR, El-Said AMA, Khalifa SAM, Goransson U, Bohlin L, Borg-Karlson AK, Verpoorte R. 2012. Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. *J Agr Food Chem* **60**:10877-10895.
- Elbasyouni SZ, Chen D, Ibrahim RK, Neish AC, Towers GHN. 1964. The biosynthesis of hydroxybenzoic acids in higher plants. *Phytochemistry* **3**:485-&.
- Eslami AC, Pasanphan W, Wagner BA, Buettner GR. 2010. Free radicals produced by the oxidation of gallic acid: An electron paramagnetic resonance study. *Chem Cent J* **4**.
- Eymann R, Fischer W, Hauck HE, Weins C. 2001. Detection of antibiotics in feed by bioactivity based analysis. *Fleischwirtschaft* **81**:95-96.
- Fabriciova G, Sanchez-Cortes S, Garcia-Ramos JV, Miskovsky P. 2004a. Surface-enhanced raman spectroscopy study of the interaction of the antitumoral drug emodin with human serum albumin. *Biopolymers* **74**:125-130.
- Fabriciova G, Sanchez-Cortes S, Garcia-Ramos JV, Miskovsky P. 2004b. Joint application of micro-raman and surface-enhanced raman spectroscopy to the interaction study of the antitumoral anthraquinone drugs danthron and quinizarin with albumins. *J Raman Spectrosc* **35**:384-389.
- Frick E, Frahne D, Wegmann K. 1996. Biochemical synthesis of 2,6-dimethoxy-para-benzoquinone - a haustorial stimulant of striga asiatica (l) kuntze. *Nat Prod Lett* **9**:153-159.
- Friedman M. 1996. Food browning and its prevention: An overview. *J Agr Food Chem* **44**:631-653.
- Friedman M. 1997. Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A review. *J Agr Food Chem* **45**:1523-1540.
- Fulcrand H, Cheminat A, Brouillard R, Cheynier V. 1994. Characterization of compounds obtained by chemical oxidation of caffeic acid in acidic conditions. *Phytochemistry* **35**:499-505.
- Garcia P, Romero C, Brenes M, Garrido A. 1996. Effect of metal cations on the chemical oxidation of olive o-diphenols in model systems. *J Agr Food Chem* **44**:2101-2105.
- Graham HN. 1992. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med* **21**:334-350.
- Grzelak EM, Majer-Dziedzic B, Choma IM. 2011. Development of a novel direct bioautography thin-layer chromatography test: Optimization of growth conditions for gram-negative bacteria, escherichia coli. *J AOAC Int* **94**:1567-1572.

- Guo SQ, Yang SW, Taylor C, Sonenshein GE. 2005. Green tea polyphenol epigallocatechin-3 gallate (egcg) affects gene expression of breast cancer cells transformed by the carcinogen 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *J Nutr* **135**:2978-2986.
- Gusev AI, Vasseur OJ, Proctor A, Sharkey AG, Hercules DM. 1995a. Imaging of thin-layer chromatograms using matrix/assisted laser desorption/ionization mass-spectrometry. *Anal Chem* **67**:4565-4570.
- Gusev AI, Proctor A, Rabinovich YI, Hercules DM. 1995b. Thin-layer chromatography combined with matrix-assisted laser-desorption ionization mass-spectrometry. *Anal Chem* **67**:1805-1814.
- Hamburger MO, Cordell GA. 1987. A direct bioautographic tlc assay for compounds possessing antibacterial activity. *J Nat Prod* **50**:19-22.
- Harborne JB. 1993. Advances in chemical ecology. *Nat Prod Rep* **10**:327-348.
- Haslam E. 1989. Plant polyphenols: Vegetable tannins revisited. In: Phillipson JD, Ayres DC, Baxter H, editors. Cambridge University Press: Cambirdge.
- Haslam E. 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. *J Nat Prod* **59**:205-215.
- He TX, Liang QL, Wang YM, Luo GA. 2010. Characterization of the interactions between natural flavonoid compounds and bovine serum albumin by capillary electrophoresis and fluorescence method. *J Liq Chromatogr R T* **33**:548-562.
- Hertog MGL, deVries A, Ocke MC, Schouten A, BuenodeMesquita HB, Verhagen H. 1997. Oxidative DNA damage in humans: Comparison between high and low habitual fruit and vegetable consumption. *Biomarkers* **2**:259-262.
- Heß D. 1999. Phenole. Pflanzenphysiologie: Grundlagen von Stoffwechsel und Entwicklung der Pflanze. Ulmer Verlag: Stuttgart. p 242-272.
- Ho CT. 1992. Phenolic-compounds in food - an overview. *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health Ii* **507**:2-7.
- Hollman PCH, Arts ICW. 2000. Flavonols, flavones and flavanols - nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agr* **80**:1081-1093.
- Hostettmann K, Terreaux C, Marston A, Potterat O. 1997. The role of planar chromatography in the rapid screening and isolation of bioactive compounds from medicinal plants. *JPC-J Planar Chromat* **10**:251-257.
- Hurrell RF, Finot PA, Cuq JL. 1982. Protein-polyphenol reactions .1. Nutritional and metabolic consequences of the reaction between oxidized caffeic acid and the lysine residues of casein. *Brit J Nutr* **47**:191-211.
- Ishii T, Minoda K, Bae MJ, Mori T, Uekusa Y, Ichikawa T, Aihara Y, Furuta T, Wakimoto T, Kan T et al. 2010. Binding affinity of tea catechins for hsa: Characterization by high-performance affinity chromatography with immobilized albumin column. *Mol Nutr Food Res* **54**:816-822.

- Ishikawa D, Taki T. 2000. Thin-layer chromatography immunostaining. *Methods Enzymol* **312**:157-159.
- Jervis L, Pierpoint WS. 1989. Purification technologies for plant-proteins. *J Biotechnol* **11**:161-198.
- Jork H. 1966. Direkte spektralphotometrische auswertung von dunnschicht-chromatogrammen im uv-bereich. *Z Anal Chem Freseniu* **221**:17-33.
- Kalyanaraman B, Premovic PI, Sealy RC. 1987. Semiquinone anion radicals from addition of amino-acids, peptides, and proteins to quinones derived from oxidation of catechols and catecholamines - an electron-spin-resonance spin stabilization study. *J Biol Chem* **262**:11080-11087.
- Kenyon MA, Hamilton JA. 1994. C-13 nmr-studies of the binding of medium-chain fatty-acids to human serum-albumin. *J Lipid Res* **35**:458-467.
- Kerwin JL, Turecek F, Xu RD, Kramer KJ, Hopkins TL, Gatlin CL, Yates JR. 1999. Mass spectrometric analysis of catechol-histidine adducts from insect cuticle. *Anal Biochem* **268**:229-237.
- Kimura T, Nakanishi K, Nakagawa T, Shibukawa A, Matsuzaki K. 2005. High-performance frontal analysis of the binding of thyroxine enantiomers to human serum albumin. *Pharm Res-Dord* **22**:667-675.
- Kramer KJ, Kanost MR, Hopkins TL, Jiang HB, Zhu YC, Xu RD, Kerwin JL, Turecek F. 2001. Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal systems. *Tetrahedron* **57**:385-392.
- Kroll J, Rawel HM, Rohn S. 2003. Reactions of plant phenolics with food proteins and enzymes under special consideration of covalent bonds. *Food Sci Technol Res* **9**:205-218.
- Kroll J, Krause JP, Rawel HM. 2007. Native secondary plant metabolites in rape seeds - properties and interactions with proteins. *Deut Lebensm-Rundsch* **103**:149-153.
- Kroon PA, Williamson G. 1999. Hydroxycinnamates in plants and food: Current and future perspectives. *J Sci Food Agr* **79**:355-361.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-t4. *Nature* **227**:680-685.
- Le Bourvellec C, Renard CM. 2012. Interactions between polyphenols and macromolecules: Quantification methods and mechanisms. *Crit Rev Food Sci Nutr* **52**:213-248.
- Lee C, Yoon J. 2008. Uv direct photolysis of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (abts) in aqueous solution: Kinetics and mechanism. *J Photoch Photobio A* **197**:232-238.
- Lu JJ, Bao JL, Wu GS, Xu WS, Huang MQ, Chen XP, Wang YT. 2013. Quinones derived from plant secondary metabolites as anti-cancer agents. *Anti-Cancer Agent Me* **13**:456-463.
- Lu QH, Ba CD, Chen DY. 2008. Investigating noncovalent interactions of rutin - serum albumin by capillary electrophoresis - frontal analysis. *J Pharmaceut Biomed* **47**:888-891.

- Luftmann H. 2004. A simple device for the extraction of tlc spots: Direct coupling with an electrospray mass spectrometer. *Anal Bioanal Chem* **378**:964-968.
- Lule SU, Xia WS. 2005. Food phenolics, pros and cons: A review. *Food Rev Int* **21**:367-388.
- Machholz R, Lewerenz HJ. 1989. Lebensmitteltoxikologie. Springer Verlag: Berlin 226-231.
- Marston A. 2010. Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. *J Chromatogr A* **19**:2676-83.
- Marszall MP, Bucinski A. 2010. A protein-coated magnetic beads as a tool for the rapid drug-protein binding study. *J Pharmaceut Biomed* **52**:420-424.
- Matei I, Hillebrand M. 2010. Interaction of kaempferol with human serum albumin: A fluorescence and circular dichroism study. *J Pharmaceut Biomed* **51**:768-773.
- Matheis G, Whitaker JR. 1984. Modification of proteins by polyphenol oxidase and peroxidase and their products. *J Food Biochem* **8**:137-162.
- Mattila P, Kumpulainen J. 2002. Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by hplc with diode-array detection. *J Agr Food Chem* **50**:3660-3667.
- Mayer AM, Harel E. 1979. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* **18**:193-215.
- Mayer AM. 1987. Polyphenol oxidases in plants - 2. recent progress. *Phytochemistry* **26**:11-20.
- Mayer AM, Staples RC. 2002. Laccase: New functions for an old enzyme. *Phytochemistry* **60**:551-565.
- Mercier JC, Grosclau.F, Ribadeau.B. 1971. Primary structure of bovine alphas1 casein - complete sequence. *European Journal of Biochemistry* **23**:41-51.
- Merck KGaA. 2012. ChromBook 75.
- Miller NJ, RiceEvans CA. 1997. Factors influencing the antioxidant activity determined by the abts(center dot+) radical cation assay. *Free Radical Res* **26**:195-199.
- Miura Y, Chiba T, Tomita I, Koizumi H, Miura S, Umegaki K, Hara Y, Ikeda M, Tomita T. 2001. Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apoprotein e-deficient mice. *J Nutr* **131**:27-32.
- Moricz AM, Adanyi N, Horvath E, Ott PG, Tyihak E. 2008. Applicability of the bioarena system to investigation of the mechanisms of biological effects. *JPC-J Planar Chromat* **21**:417-422.
- Morlock G, Schwack W. 2010a. Coupling of planar chromatography to mass spectrometry. *TRAC-Trend Anal Chem* **29**:1157-1171.
- Morlock G, Schwack W. 2010b. Hyphenations in planar chromatography. *J Chromatogr A* **1217**:6600-6609.
- Munoz-Olivas R. 2004. Screening analysis: An overview of methods applied to environmental, clinical and food analyses. *TRAC-Trend Anal Chem* **23**:203-216.

- Nagy S, Kocsis B, Koszegi T, Botz L. 2002. Optimization of conditions for culture of the test bacteria used for direct bioautographic detection. 1. The gram-positive test bacterium *Bacillus subtilis*. *JPC-J Planar Chromat* **15**:132-137.
- Nagy S, Koszegi T, Botz L, Kocsis B. 2003. Optimization of conditions for culture of test bacteria used for direct bioautographic tlc detection. 2. Gram-negative test bacterium: *Escherichia coli*. *JPC-J Planar Chromat* **16**:121-126.
- Namiki M, Yabuta G, Koizumi Y, Yano M. 2001. Development of free radical products during the greening reaction of caffeic acid esters (or chlorogenic acid) and a primary amino compound. *Biosci Biotech Bioch* **65**:2131-2136.
- Nicolas JJ, Richardforget FC, Goupy PM, Amiot MJ, Aubert SY. 1994. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Crit Rev Food Sci* **34**:109-157.
- Nuhn P. 1997. Flavanoide. *Naturstoffchemie - mikrobielle, pflanzliche und tierische Naturstoffe*. S. Hirzel Verlag: Stuttgart, Leipzig. p 602-608.
- O'Connell JE, Fox PF. 1999. Proposed mechanism for the effect of polyphenols on the heat stability of milk. *Int Dairy J* **9**:523-536.
- O'Connell JE, Fox PF. 2001. Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products: A review. *Int Dairy J* **11**:103-120.
- Okusa PN, Stevigny C, Devleeschouwer M, Duez P. 2010. Optimization of the culture medium used for direct tlc-bioautography. Application to the detection of antimicrobial compounds from *Cordia gilletii* de wild (boraginaceae). *JPC-J Planar Chromat* **23**:245-249.
- Pasilis SP, Kertesz V, Van Berkel GJ, Schulz M, Schorcht S. 2008a. HPTLC/DESI-MS imaging of tryptic protein digests separated in two dimensions. *J Mass Spectrom* **43**:1627-1635.
- Pasilis SP, Kertesz V, Van Berkel GJ, Schulz M, Schorcht S. 2008b. Using hptlc/desi-ms for peptide identification in 1d separations of tryptic protein digests. *Anal Bioanal Chem* **391**:317-324.
- Pauncz JK, Harsanyi I. 1980. Aminoglycoside antibiotics - thin-layer chromatography, bioautographic detection and quantitative assay. *J Chromatogr* **195**:251-256.
- Peter MG. 1989. Chemical modifications of bio-polymers by quinones and quinone methides. *Angewandte Chemie-International Edition* **28**:555-570.
- Pierpoint WS. 1966. Enzymatic oxidation of chlorogenic acid and some reactions of quinone produced. *Biochem J* **98**:567-588.
- Pierpoint WS. 1969a. O-quinones formed in plant extracts. Their reaction with bovine serum albumin. *Biochem J* **112**:619-629.
- Pierpoint WS. 1969b. O-quinones formed in plant extracts. Their reactions with amino acids and peptides. *Biochem J* **112**:609-616.

- Pierpoint WS. 1982. A class of blue quinone-protein coupling products - the allagochromes. *Phytochemistry* **21**:91-95.
- Pierson MD, Reddy NR. 1982. Inhibition of clostridium-botulinum by antioxidants and related phenolic-compounds in comminuted pork. *J Food Sci* **47**:1926-1929.
- Poncet-Legrand C, Edelmann A, Putaux JL, Cartalade D, Sarni-Manchado P, Vernhet A. 2006. Poly(l-proline) interactions with flavan-3-ols units: Influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio. *Food Hydrocolloid* **20**:687-697.
- Poole CF. 2003. Thin-layer chromatography: Challenges and opportunities. *J Chromatogr A* **1000**:963-984.
- Prigent SVE, Gruppen H, Visser AJWG, van Koningsveld GA, de Jong GAH, Voragen AGJ. 2003. Effects of non-covalent interactions with 5-o-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) on the heat denaturation and solubility of globular proteins. *J Agr Food Chem* **51**:5088-5095.
- Prigent SVE, Voragen AGJ, Li F, Visser AJWG, van Koningsveld GA, Gruppen H. 2008. Covalent interactions between amino acid side chains and oxidation products of caffeoylquinic acid (chlorogenic acid). *J Sci Food Agric* **88**:1748-1754.
- Qian ZM, Qin SJ, Yi L, Li HJ, Li P, Wen XD. 2008a. Binding study of flos lonicerae japonicae with bovine serum albumin using centrifugal ultrafiltration and liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* **22**:202-206.
- Qian ZM, Wen XD, Li HJ, Liu Y, Qin SJ, Li P. 2008b. Analysis of interaction property of bioactive components in flos lonicerae japonicae with protein by microdialysis coupled with HPLC-DAD-MS. *Biol Pharm Bull* **31**:126-130.
- Rahalison L, Hamburger M, Hostettmann K, Monod M, Frenk E. 1991. A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher-plants. *Phytochem Anal* **2**:199-203.
- Ramirez A, Gutierrez R, Diaz G, Gonzalez C, Perez N, Vega S, Noa M. 2003. High-performance thin-layer chromatography-bioautography for multiple antibiotic residues in cow's milk. *J Chromatogr B* **784**:315-322.
- Raudonis R, Bumblauskienė L, Jakstas V, Pukalskas A, Janulis V. 2010. Optimization and validation of post-column assay for screening of radical scavengers in herbal raw materials and herbal preparations. *J Chromatogr A* **1217**:7690-7698.
- Rawel HM, Kroll J, Riese B. 2000. Reactions of chlorogenic acid with lysozyme: Physicochemical characterization and proteolytic digestion of the derivatives. *J Food Sci* **65**:1091-1098.
- Rawel HM, Kroll J, Rohn S. 2001. Reactions of phenolic substances with lysozyme - physicochemical characterisation and proteolytic digestion of the derivatives. *Food Chem* **72**:59-71.
- Rawel HM, Rohn S, Kruse HP, Kroll J. 2002. Structural changes induced in bovine serum albumin by covalent attachment of chlorogenic acid. *Food Chem* **78**:443-455.

- Rawel HM, Rohn S. 2010. Nature of hydroxycinnamate-protein interactions. *Phytochem Rev* **9**:93-109.
- Reich E, Schibli A. 2007. High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants. Thieme Verlag: New York.
- Richard FC, Goupy PM, Nicolas JJ, Lacombe JM, Pavia AA. 1991. Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning .1. Isolation and characterization of addition-compounds formed during oxidation of phenolics by apple polyphenol oxidase. *J Agr Food Chem* **39**:841-847.
- Richard T, Vitrac X, Merillon JM, Monti JP. 2005. Role of peptide primary sequence in polyphenol-protein recognition: An example with neurotensin. *Biochim Biophys Acta* **1726**:238-243.
- Richardforget FC, Rouetmayer MA, Goupy PM, Philippon J, Nicolas JJ. 1992. Oxidation of chlorogenic acid, catechins, and 4-methylcatechol in model solutions by apple polyphenol oxidase. *J Agr Food Chem* **40**:2114-2122.
- Robards K, Prenzler PD, Tucker G, Swatsitang P, Glover W. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem* **66**:401-436.
- Rodriguez-Lopez JN, Fenoll LG, Penalver MJ, Garcia-Ruiz PA, Varon R, Martinez-Ortiz F, Garcia-Canovas F, Tudela J. 2001. Tyrosinase action on monophenols: Evidence for direct enzymatic release of o-diphenol. *Biochim Biophys Acta* **1548**:238-256.
- Rohn S, Rawel HM, Kroll J. 2004. Antioxidant activity of protein-bound quercetin. *J Agr Food Chem* **52**:4725-4729.
- Rolli R, Loppacher M. 2009. The new TLC-ESI MS interface. *CAMAG Bibliography Service* **102**:2-3.
- Rompel A, Fischer H, Meiwes D, Buldt-Karentzopoulos K, Magrini A, Eichen C, Gerdemann C, Krebs B. 1999. Substrate specificity of catechol oxidase from *lycopus europaeus* and characterization of the bioproducts of enzymic caffeic acid oxidation. *FEBS Lett* **445**:103-110.
- Rozes N, Peres C. 1998. Effects of phenolic compounds on the growth and the fatty acid composition of *Lactobacillus plantarum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **49**:108-111.
- Schilling S, Sigolotto CI, Carle R, Schieber A. 2008. Characterization of covalent addition products of chlorogenic acid quinone with amino acid derivatives in model systems and apple juice by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **22**:441-448.
- Schmourlo G, Mendonca-Filho RR, Alviano CS, Costa SS. 2005. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. *J Ethnopharmacol* **96**:563-568.
- Schuerenberg M, Suckau D, Fuchs B, Schiller J. 2009. Application note # mt-94. *Baker Daltonics*.
- Shahidi F, Naczki M. 1995. Food phenolics: Sources, chemistry, effects, applications. Technomic Publishing Company: Lancaster, USA.
- Sherma J, Fried B. 2003. Handbbok of thin layer chromatography. MerceL Dekker, Incorporated.

- Siebert KJ, Carrasco A, Lynn PY. 1996. Formation of protein-polyphenol haze in beverages. *J Agr Food Chem* **44**:1997-2005.
- Simard JR, Zunszain PA, Ha CE, Yang JS, Bhagavan NV, Petitpas I, Curry S, Hamilton JA. 2005. Locating high-affinity fatty acid-binding sites on albumin by x-ray crystallography and nmr spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**:17958-17963.
- Souady J, Soltwisch J, Dreisewerd K, Haier J, Peter-Katalinic J, Muthing J. 2009. Structural profiling of individual glycosphingolipids in a single thin-layer chromatogram by multiple sequential immunodetection matched with direct IR-MALDI-O-TOF mass spectrometry. *Anal Chem* **81**:9481-9492.
- Spangenberg B, Poole CF, Weins C. 2011. Quantitative thin-layer chromatography: A practical survey. Springer Verlag: Berlin Heidelberg.
- Srivastava MM. 2011. High-performance thin-layer chromatography (HPTLC). Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg.
- Takao T, Kitatani F, Watanabe N, Yagi A, Sakata K. 1994. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine-bacteria from fish and shellfish. *Biosci Biotech Bioch* **58**:1780-1783.
- Tasdemir D, Donmez AA, Calis I, Ruedi P. 2004. Evaluation of biological activity of turkish plants. Rapid screening for the antimicrobial, antioxidant, and acetylcholinesterase inhibitory potential by tlc bioautographic methods. *Pharm Biol* **42**:374-383.
- Tazaki H, Taguchi D, Hayashida T, Nabeta K. 2001. Stable isotope-labeling studies on the oxidative coupling of caffeic acid via o-quinone. *Biosci Biotech Bioch* **65**:2613-2621.
- Van Berkel GJ, Ford MJ, Deibel MA. 2005. Thin-layer chromatography and mass spectrometry coupled using desorption electrospray ionization. *Anal Chem* **77**:1207-1215.
- Verge S, Richard T, Moreau S, Richelme-David S, Vercauteren J, Prome JC, Monti JP. 2002. First observation of non-covalent complexes for a tannin-protein interaction model investigated by electrospray ionisation mass spectroscopy. *Tetrahedron Lett* **43**:2363-2366.
- Vieths S, Schoning B, Brockmann S, Aulepp H. 1992. Allergy to fruits and vegetables - a low-temperature method for the extraction of plant-tissues - characterization of the allergenic preparations. *Deut Lebensm-Rundsch* **88**:273-279.
- Vinson JA, Dabbagh YA, Yang J, Serry MM. 1995. Pure polyphenols and beverages with an emphasis on tea as antioxidants (aox) for the prevention of heart-disease - in-vitro and in-vivo studies. *Abstr Pap Am Chem Soc* **210**:242-AGFD.
- Vithayat.PJ, Murthy GS. 1972. New reaction of o-benzoquinone at thioether group of methionine. *Nature-New Biol* **236**:101-103.
- Wang XY, Ho CT, Huang QR. 2007. Investigation of adsorption behavior of (-)-epigallocatechin gallate on bovine serum albumin surface using quartz crystal microbalance with dissipation monitoring. *J Agr Food Chem* **55**:4987-4992.

- Watzl B, Leitzmann C. 1995. Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln. Hippokrates-Verlag: Stuttgart.
- Weber P, Kratzin H, Brockow K, Ring J, Steinhart H, Paschke A. 2009. Lysozyme in wine: A risk evaluation for consumers allergic to hen's egg. *Mol Nutr Food Res* **53**:1469-1477.
- Weins C, Jork H. 1996. Toxicological evaluation of harmful substances by in situ enzymatic and biological detection in high-performance thin-layer chromatography. *J Chromatogr A* **750**:403-407.
- Wellnitz J, Gluschke M. 2005. Leitlinien zur Methodvalidierung. Umweltbundesamt Berlin.
- Wink M, Schmeller T, Latz-Bruning B. 1998. Modes of action of allelochemical alkaloids: Interaction with neuroreceptors, DNA, and other molecular targets. *J Chem Ecol* **24**:1881-1937.
- Wink M, Schimmer O. 1999. Modes of action of defensive secondary plant metabolites. *Annual Plant Reviews* **3**:17-133.
- Wink M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* **64**:3-19.
- Xiao JB, Chen JW, Cao H, Ren FL, Yang CS, Chen Y, Xu M. 2007. Study of the interaction between baicalin and bovine serum albumin by multi-spectroscopic method. *J Photochem Photobiol A* **191**:222-227.
- Xiao JB, Kai G. 2012. A review of dietary polyphenol-plasma protein interactions: Characterization, influence on the bioactivity, and structure-affinity relationship. *Crit Rev Food Sci Nutr* **52**:85-101.
- Xu RD, Huang X, Morgan TD, Prakash O, Kramer KJ, Hawley MD. 1996. Characterization of products from the reactions of n-acetyldopamine quinone with n-acetylhistidine. *Arch Biochem Biophys* **329**:56-64.
- Yabuta G, Koizumi Y, Namiki K, Hida M, Namiki M. 2001. Structure of green pigment formed by the reaction of caffeic acid esters (or chlorogenic acid) with a primary amino compound. *Biosci Biotech Bioch* **65**:2121-2130.
- Zheng L, Chen HM, Han XT, Lin W, Yan XJ. 2005. Antimicrobial screening and active compound isolation from marine bacterium nj6-3-1 associated with the sponge hymeniacion perleve. *World J Microb Biot* **21**:201-206.

GHS-Gefahrstoffkennzeichnung

Tabelle 8-1. GHS-Gefahrstoffkennzeichnung der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.

Substanz	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
1-Butanol	 02, 05, 07	226, 302, 318, 315, 335, 336	280, 302 + 352, 305 + 351 + 338, 313
2-Butanol	 02, 07	226, 319, 335 + 336	201, 304 + 340, 305 + 351 + 338
2-Propanol	 02, 07	225, 319, 336	210, 233, 305 + 351 + 338
Acetonitril	 02, 07	225, 302 + 312 + 332, 319	210, 305 + 351 + 338, 403 + 235
Acrylamid	 06, 08	350, 340, 361f, 301, 372, 332, 312, 319, 315, 317	201, 280, 302 + 352, 305 + 351 + 338
Ameisensäure	 02, 05	226, 314	260, 280, 301 + 330 + 331, 305 + 351 + 338
Ammoniaklösung 25%	 05, 07, 09	314, 335, 400	273, 280, 301 + 330 + 331, 304 + 340, 305 + 351 + 338

Substanz	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
Ammoniumhydrogencarbonat	 07	302	-
Ampicillin	 08	334-317	261, 280, 342 + 331
APS	 03, 08, 07	272, 302, 315, 319, 335, 334, 317	280, 305 + 351 + 338, 302 + 352, 304 + 341, 342 + 311
Citronensäure	 07	315, 319	305, 391
DAC	 07	319	301 + 351 + 338
D-Chinasäure	 05	314	280, 305 + 351 + 338 + 310
DTT	 07	302, 319, 315	302 + 350, 305 + 351 + 338
DPPH	 08	317, 334	261, 280, 342 + 331
EDTA-Na-Salz	 07	319	305 + 351 + 338

Substanz	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
Ethanol (96 %)		225	210, 233, 241, 243
	02		
Eisessig	 	226, 314	280, 301 + 330 + 331, 305 + 351 + 338
	02, 05		
Ferulasäure		315, 319, 335	261, 305 + 351 + 338
	07		
Formaldehyd	 	301, 311, 331, 314, 317, 351	202, 281, 303 + 361 + 353, 305 + 351 + 338, 312, 333 + 313
			
	06, 05, 08		
Gallussäure		315, 319, 335	361, 205 + 351 + 338
	07		
Glutardialdehyd	 	301, 314, 317, 331, 334, 335, 400	273, 280, 301 + 330 + 331, 302 + 352, 304 + 340, 305 + 351 + 338
	 		
	06, 05, 08, 09		
Kaffeesäure		351	281, 308 + 313
	08		
Methanol	 	225, 301 + 311 + 331, 370	210, 280, 302 + 352, 403 + 235
			
	02, 06, 08		

Substanz	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
n-Hexan		225, 361, 304, 373, 315, 336, 411	210, 240, 273, 301 + 310, 331, 302 + 352, 403 + 235
	02, 08, 07, 09		
Natriumcarbonat		319	260, 305 + 351 + 338
	07		
Natronlauge (32 %)		290, 314	280, 301 + 330 + 331, 305 + 351 + 338
	05		
Ninhydrin		302, 315, 319	302 + 352, 305 + 351 + 338
	07		
ortho-Phosphorsäure		314, 290	280, 301 + 330 + 331, 309, 305 + 351 + 338
	05		
p-Cumarsäure		315, 319, 335	302 + 352, 304 + 340, 305 + 351 + 338
	07		
Pyridin		225, 302 + 312 + 332	210, 233, 302 + 352
	02, 07		
Salzsäure (32 %)		314, 335, 290	280, 301 + 330 + 331, 305 + 351 + 338
	05, 07		
SDS		228, 302, 311, 315, 319, 335	210, 280, 302 + 352, 304 + 340, 305 + 351 + 338
	02, 06		

Substanz	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
Silbernitrat	 	272, 314, 410	273, 280, 301 + 330 + 331, 305 + 351 + 338
	03, 05, 09		
Sinapinsäure		315, 319, 335	261, 305 + 351 + 338
	07		
Syringasäure		315, 319, 335	261, 305 + 351 + 338
	07		
TEMED	 	225, 302, 314, 332	210, 280, 305 + 351 + 338, 310
	02, 05, 07		
TFA		332, 314, 412	271, 273, 301 + 330 + 331, 305 + 351 + 338
	05, 07		
Trichlormethan		302, 315, 351, 373	302 + 352, 314
	08, 07		
Tris-Base		350, 319, 335	261, 305 + 351 + 338
	07		
Trypsin		319, 335, 315, 334	302, 352, 305 + 351 + 338, 304 + 341, 342 + 331
	08, 07		

Substanz	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
Wasserstoffperoxid 30 %	 03, 07, 05	271, 302, 332, 314	220, 261, 280, 303 + 361 + 353, 305 + 351 + 338, 312

Kathrin Tscherch

Staatlich geprüfte Lebensmittelchemikerin
Diplom in Lebensmittelchemie
Kranichweg 19, 22305 Hamburg
Tel.: +(49) 40 180 632 81
Mobil: +(49) 174 79 50 640
Email: tscherch@gmail.com

Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

Eidstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation „Entwicklung neuer HPTLC-Methoden zur Analyse von Phenol-Protein-Wechselwirkungen“ selbstständig angefertigt und nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat. Es handelt sich hierbei um meinen ersten Promotionsversuch.

Hamburg, im Juni 2013