

# Entwicklung von LC-MS-basierten *Metabolomics*-Applikationen für den Kakaoschalen- nachweis

---

## Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

**Doctor rerum naturalium**

*Dr. rer. Nat.*

Aus dem Fachbereich Chemie der Universität Hamburg,

Hamburg School of Food Science

vorgelegt von

Nicolas Cain

Hamburg

17.07.2020

Hamburg, 17.07.2020

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juli 2016 bis Juni 2019 an der Hamburg School of Food Science des Fachbereichs Chemie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Markus Fischer angefertigt.

1. Gutachter der Dissertation: Herr Prof. Dr. Markus Fischer

2. Gutachter der Dissertation: Herr Prof. Dr. Bernward Bisping

Tag der Disputation: 05.06.2020

Tag der Druckfreigabe: 13.07.2020

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben:

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Markus Fischer für die stetige wissenschaftliche sowie organisatorische Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Im Besonderen möchte ich mich für den gewährten Freiraum zur eigenen wissenschaftlichen Entwicklung und das Vertrauen bei der Übertragung der Projektleitung des Forschungsprojektes AiF 18475 N mit dem gleichnamigen Titel meiner Dissertation bedanken.

Meinem Diplombetreuer Philipp Werner für die tiefgehende Einarbeitung in dieses komplexe Thema und die Weitergabe der Begeisterungsfähigkeit an der wissenschaftlichen Arbeit.

Meinen Diplomanden Torben Segelke, Kristian von Wuthenau und Christian Marji für die großartige Unterstützung und ausgezeichnete Mitarbeit in vielen Teilen dieser Arbeit. Ich hätte mir keine besseren Diplomanden wünschen können.

Meinen Kolleginnen und Kollegen für eine abwechslungsreiche und inspirierende Arbeitsatmosphäre. Im Besonderen möchte ich mich bei Sven Klockmann, Alexandra Scharf, Torben Segelke und Kristian von Wuthenau für die fortwährende Unterstützung über den gesamten Zeitraum meiner Promotion bedanken.

Zum Abschluss möchte ich mich bei allen bedanken, die mich auf dem Weg der Promotion und auch darüber hinaus unentwegt unterstützt haben und mir bei allen Entscheidungen zur Seite standen:

Meinen Eltern und meinem Bruder ohne deren Unterstützung dies alles nicht möglich gewesen wäre.

Meiner Verlobten Jil, die mir mit Liebe, Kraft und Antrieb unentwegt zur Seite stand und auf die ich mich immer verlassen kann.



## I Publikationsliste

Cain, N.; Alka, O.; Segelke, T.; von Wuthenau, K.; Kohlbacher, O.; Fischer, M. *Food Fingerprinting: Mass spectrometric determination of the cocoa shell content (Theobroma cacao L.) in cocoa products by HPLC-QTOF-MS*. Food Chemistry. **2019**. 125013.

Cain, N.; Marji, C.; von Wuthenau, K.; Segelke, T.; Fischer, M. *Food Targeting: Determination of the Cocoa Shell Content (Theobroma cacao L.) in Cocoa Products by LC-QqQ-MS/MS*. Metabolites **2020**, *10*, 91.

Cain, N.; Segelke, T.; Stahl, A.; Frerichs, H.; Fischer, M. *Metabolic Fingerprinting: Kakaoschalennachweis in Kakaoprodukten*. FOOD-LAB. **2017**. *2*, 18-22.

Cain, N.; Alka, O.; Segelke, T.; von Wuthenau, K.; Marji, C.; Kohlbacher, O.; Fischer, M. *Food Metabolomics: Kakaoschalennachweis*“ Cereal Technology. **2019**. CT1/19.

Klockmann, S.; Reiner, E.; Cain, N.; Fischer, M. *Food targeting: Geographical origin determination of hazelnuts (Corylus avellana) by LC-QqQ-MS/MS-based targeted metabolomics application*. Journal of agricultural and food chemistry. **2017**. *65*, 1456-1465.

## II Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	III
I Publikationsliste.....	IV
II Inhaltsverzeichnis .....	V
1 Zusammenfassung.....	1
2 Abstract .....	3
3 Einleitung.....	5
3.1 Kakao .....	5
3.2 Kakaoschalennachweis.....	9
3.2.1 Motiv .....	9
3.2.2 Grenzwert .....	10
3.2.3 Historie .....	11
3.3 <i>Metabolomics</i> .....	14
3.3.1 Definitionen und Begriffsbestimmungen .....	14
3.3.2 <i>Metabolomics</i> Disziplinen.....	15
3.3.3 Einflussfaktoren auf das Metabolom.....	18
3.3.4 Arbeitsabfolge bei <i>Metabolomics</i> -Experimenten.....	19
3.3.5 Apparative Applikationen bei <i>Metabolomics</i> Experimenten.....	21
3.3.6 Kakao <i>Metabolomics</i> Experimente .....	22
3.4 Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie .....	23
3.4.1 Flüssigkeitschromatographie.....	23
3.4.1.1 Grundlagen der Flüssigkeitschromatographie.....	23
3.4.1.2 Umkehrphasenchromatographie .....	25
3.4.1.3 Wässrige Normalphasenchromatographie.....	26
3.4.1.4 Optimierung eines flüssigchromatographischen Systems.....	26
3.4.2 Massenspektrometrie.....	27
3.4.2.1 Grundlagen der Massenspektrometrie.....	27
3.4.2.2 Elektrospray Ionisation (ESI) .....	27

3.4.2.3	Massenanalysatoren .....	29
3.4.2.3.1	<i>Tripl- Quadrupol</i> Massenspektrometer .....	29
3.4.2.3.2	<i>Quadrupol-Time-of-Flight</i> Massenspektrometer .....	32
3.5	LC-MS Kopplungen .....	35
3.6	Multivariate Datenanalyse.....	37
3.6.1	Datenvorbehandlung .....	37
3.6.2	Hauptkomponentenanalyse (PCA, <i>principal component analysis</i> ) .....	39
3.6.3	PLS-R (Partial Least Squares Regression).....	42
4	Zielsetzung der Arbeit .....	45
5	Ergebnisse und Diskussion .....	47
5.1	Methodenentwicklung.....	47
5.1.1	<i>Non-targeted</i> LC-MS Methoden.....	47
5.1.1.1	Schälprozess.....	47
5.1.1.2	Ermittlung der minimalen Probenmenge für reproduzierbare Ergebnisse.....	48
5.1.1.3	Extraktion .....	52
5.1.1.3.1	Extraktionsmittel .....	52
5.1.1.3.1.1	NTP Extraktionsmittelzusammensetzung .....	52
5.1.1.3.1.2	NTNP Extraktionsmittelzusammensetzung.....	57
5.1.1.3.2	Extraktionsmitteladditiv.....	59
5.1.1.3.2.1	Optimierung des Extraktionsmittels der NTP Methode.....	59
5.1.1.3.2.2	Optimierung des Extraktionsmitteladditivs der NTNP Methode.....	62
5.1.1.4	LC Methode.....	63
5.1.1.4.1	NTNP Methode .....	64
5.1.1.4.1.1	Laufmittel .....	64
5.1.1.4.1.2	Laufmitteladditiv .....	65
5.1.1.4.1.3	Gradient.....	68
5.1.1.4.1.4	Temperatur und Fließgeschwindigkeit.....	70
5.1.1.4.2	NTP Methode .....	70
5.1.1.4.2.1	Laufmittel.....	70
5.1.1.4.2.2	Gradient.....	71
5.1.1.4.2.3	Laufmitteladditiv.....	74
5.1.1.4.2.4	Temperatur .....	75
5.1.1.4.2.5	Fließgeschwindigkeit.....	77
5.1.1.5	MS Methode .....	78
5.1.1.5.1	Zusammenfassung der non-targeted Methodenoptimierung .....	80

5.1.2	<i>Targeted</i> LC-MS Method.....	80
5.1.2.1	Extraktion .....	80
5.1.2.2	LC System.....	83
5.1.2.2.1	Optimierung der stationären Phase .....	83
5.1.2.2.2	Gradient.....	86
5.1.2.3	MS System.....	88
5.1.2.4	Validierung.....	88
5.2	Bestimmung der Schlüsselmetaboliten .....	95
5.2.1	Überprüfung der Temperaturstabilität (Röstungskriterium).....	99
5.2.2	Überprüfung der Fermentationsstabilität (Fermentationskriterium) .....	102
5.2.3	Überprüfung der Konzentrationsunabhängigkeit bei unterschiedlichen Herkünften oder Erntejahren (Gleichmäßigkeitskriterium) .....	104
5.2.4	Überprüfung des Konzentrationsunterschieds zwischen der Kakaoschale und dem Kakaokern (Exklusivkriterium) .....	107
5.2.5	Überprüfung der Konzentration in der Kakaoschale (Konzentrationskriterium) ....	107
5.2.6	Zusammenfassung der Bewertungskriterien der Schlüsselmetaboliten.....	108
5.2.7	Strukturaufklärung der Schlüsselmetaboliten.....	110
5.2.8	Überprüfung der Linearität im relevanten Arbeitsbereich .....	118
5.3	Kakaoschalennachweis mittels <i>targeted</i> LC-MS.....	122
5.3.1	Vorhersagemodelle für den Kakaoschalengehalt .....	122
5.3.1.1	Vorhersagemodell der Kakaoschalen-Verdünnungsreihe nach Variante 1 .....	127
5.3.1.2	Vorhersagemodell der Kakaoschalen-Verdünnungsreihe nach Variante 2.....	129
5.3.1.3	Bestimmung des Kakaoschalengehaltes in unterschiedlichen Schokoladen .....	133
5.3.1.4	Überprüfung der Reichweite des linearen Arbeitsbereichs der TNP Methode.....	138
5.4	Methodenvergleich .....	140
5.5	Fazit.....	145
5.6	Ausblick .....	147
6	Material und Methoden .....	149
6.1	Probenmaterial .....	149
6.1.1	Kakaoproben.....	149

6.1.2	Kennzeichnung der Kakaoproben .....	150
6.2	Probenvorbereitung.....	150
6.2.1	Lagerung.....	151
6.2.2	Röstung.....	151
6.2.3	Schälen.....	151
6.2.4	Homogenisierung.....	151
6.2.5	Gefriertrocknung.....	152
6.2.6	Herstellung der Kakaoschalen Kalibrierungsreihe.....	152
6.2.7	Extraktion .....	152
6.2.7.1	NTP Extraktion.....	152
6.2.7.2	NTNP Extraktion.....	153
6.2.7.3	TNP Extraktion.....	153
6.3	Röstreihe.....	153
6.4	Qualitätskontrolle .....	154
6.5	Stammlösungen und Multistandards.....	154
6.6	<i>Non-Targeted</i> LC-MS Methoden; HPLC-ESI-QToF-MS .....	155
6.6.1	NTNP Methode.....	155
6.6.2	NTP Methode .....	157
6.6.3	Kalibration.....	159
6.6.4	Analyse der Probenextrakte.....	159
6.6.5	Auswertung.....	159
6.6.6	Identifizierung von Schlüsselmetaboliten .....	160
6.6.6.1	Bewertungskriterien.....	160
6.6.7	Strukturaufklärung der Schlüsselmetaboliten .....	161
6.7	<i>Targeted</i> LC-MS Methode; HPLC-ESI-QqQ-MS/MS.....	162
6.7.1	Validierung.....	164
7	Literaturliste .....	166
8	Anhang.....	178

8.1 SOP zur Durchführung der <i>targeted</i> Methode für den Kakaoschalennachweis.....	178
8.2 Verbrauchsmaterialien, Geräte, Softwares, Chemikalien und akquirierte Kakaoproben.	183
8.3 Informationen zur Probenvorbereitung und Extraktion.....	196
8.4 Software Einstellungen.....	198
8.5 Optimierung der <i>non-targeted</i> Methoden.....	202
8.5.1 Optimierung der LC-Methode.....	202
8.5.1.1 NTNP Methode.....	202
8.5.1.1.1 Laufmittel.....	202
8.5.1.1.2 Laufmitteladditiv.....	205
8.5.1.1.3 Gradient.....	207
8.5.1.2 NTP Methoden.....	209
8.5.1.2.1 Laufmittel.....	209
8.5.1.2.2 Gradient.....	213
8.5.1.2.3 Laufmitteladditiv.....	217
8.5.1.2.4 Temperatur.....	220
8.5.1.2.5 Fließgeschwindigkeit.....	223
8.6 Optimierung der TNP Methode.....	225
8.7 Potenzielle Schlüsselmetaboliten.....	227
8.8 Potenzielle Schlüsselmetaboliten für die Methodenoptimierung.....	231
8.9 Temperaturstabile Schlüsselmetaboliten.....	232
8.10 Bewertungskriterien der potenziellen Schlüsselmetaboliten.....	233
8.11 Detektionsparameter der TNP-Methode.....	237
8.12 Stammlösungen und Validierungsparameter.....	239
8.13 Kakaoschalen-Kalibrierreihen.....	242
8.14 PLS-R Modelle.....	245
8.15 Formelsammlung.....	246
9 Eidesstattliche Versicherung.....	257

## Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
AF	Ammoniumformiat
AAc	Ammoniumacetat
ANP	Wässrige Normalphase (engl. <i>Aqueous normal phase</i> )
APCI	chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (engl. <i>atmospheric pressure chemical ionization</i> )
API	Ionisationstechnik bei Atmosphärendruck (engl. <i>atmospheric pressure ionization</i> )
APPI	Laserionisation bei Atmosphärendruck (engl. <i>atmospheric pressure photo ionization</i> )
BAT	Behensäuretryptamid (engl. <i>behenic acid tryptamide</i> )
BPC	Base-Peak-Chromatogramm
bspw.	Beispielsweise
bzw.	Beziehungsweise
C	Kohlenstoff
ca.	Ungefähr (lat. <i>Circa</i> )
CAS	chemische Registrierungsnummer (engl. <i>chemical abstracts service</i> )
CE	Kollisionsenergie (engl. <i>collision energy</i> )
CEP	<i>Collision Cell Entrance Potential</i>
CID	kollisionsinduzierte Dissoziation (engl. <i>collision induced dissociation</i> )
Cl	Chlor
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRM	Modell des geladenen Rückstands (engl. <i>charge residue model</i> )
CV	Variationskoeffizient
CXP	<i>Collision Cell Exit Potential</i>
DAD	Diodenarraydetektor
DNA	Desoxyribonucleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleid acid</i> )
DIN	Deutsches Institut für Normung
DP	<i>declustering potential</i>
EG	Europäische Gemeinschaft
EIC	engl. <i>extracted ion chromatogramm</i>
EP	<i>Entrance Potential</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
FA	Ameisensäure (engl. <i>formic acid</i> )
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FP	<i>Focussing Potential</i>
FT-ICR	Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz (engl. <i>fourier transformation cyclotron resonance</i> )
FT-NIR	Fourier-Transformation-Nahinfrarot-Spektroskopie
GefStoffVO	Gefahrstoffverordnung
GHS	Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien (engl. <i>globally harmonized system of classification, labelling and packaging of chemicals</i> )
GmbH	Gemeinschaft mit beschränkter Haftung
H	Wasserstoff
HILIC	<i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i>
HMDB	<i>Human Metabolome Database</i>
H <sub>2</sub> O	Wasser
HPC	Hochleistungsrechnen (engl. <i>high performance computing</i> )
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (engl. <i>high performance liquid chromatography</i> )
IEM	Modell der Ionenverdampfung (engl. <i>ion evaporation model</i> )
IQR	<i>Interquartile Range</i>
IR	Infrarot(-spektroskopie)

IT	Ionenfalle (engl. <i>ion trap</i> )
K	Kalium
k-NN	Nächste-Nachbarn-Klassifikation (engl. <i>k-nearest neighbor</i> )
LA	Linearer Arbeitsbereich
LAT	Lignocerin säuretryptamid (engl. <i>lignoceric acid tryptamide</i> )
LC	Flüssigchromatographie (engl. <i>liquid chromatography</i> )
LLOQ	<i>Lower Limit of Quantification</i> (Bestimmungsgrenze)
LOD	Nachweisgrenze (engl. <i>limit of detection</i> , LOD)
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (engl. <i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i> )
MLR	<i>Multiple Linear Regression</i>
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MS	Massenspektrometrie
N	Stickstoff
neg	negativer Ionenmodus
NH <sub>4</sub>	Ammonium
NIPALS	<i>Nonlinear Iterative Partial Least Squares</i>
NIR	Nahinfrarot(-spektroskopie)
NMR	Kernresonanzspektroskopie (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i> )
NP	Normalphase
NTNP	nicht zielgerichtete, unpolare Analyse (engl. <i>non-targeted-non-polar</i> )
NTP	nicht zielgerichtete, polare Analyse (engl. <i>non-targeted-polar</i> )
NWG	Nachweisgrenze
O	Sauerstoff
P	Phosphor
PC1	erste Hauptkomponente (engl. <i>principal component 1</i> )
PC2	zweite Hauptkomponente (engl. <i>principal component 2</i> )
PCA	Hauptkomponentenanalyse (engl. <i>principal component analysis</i> )
PG	Prüfgröße
PLS	Regression der partiellen kleinsten Quadrate (engl. <i>partial least square</i> )
PLS-DA	<i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i>
PLS-R	<i>Partial Least Squares Regression</i>
pos	positiver Ionenmodus
Q	Quadrupol
Qal	<i>Qualifier</i>
Qnt	<i>Quantifier</i>
QC	Kontrollprobe (engl. <i>quality control</i> )
QqQ	Triple Quadrupol
qTOF	Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometer (engl. <i>time of flight</i> )
R	PEARSON'scher Korrelationskoeffizient
R2	Bestimmtheitsmaß
Rt	Retentionszeit
RF	<i>Radio Frequency</i>
RMSE	<i>Root-Mean-Square Error</i>
RL	Richtlinie
RNA	Ribonucleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i> )
RP	Umkehrphase (engl. <i>reversed phase</i> )
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
SR	Reststandardabweichung der linearen Regression
SRQ	Reststandardabweichung der quadratischen Regression
SV	Verfahrensstandardabweichung
sog.	sogenannt
SPSPC	oberflächenporöse Silicagelpartikel (engl. <i>superficially porous silica particle columns</i> )
SRM	engl. <i>selected reaction monitoring</i>



TG	Triacylglycerol
TNP	zielgerichtete, unpolare Analyse (engl. <i>targeted-non-polar</i> )
ToF	Flugzeit:massenspektrometer (engl. <i>time of flight</i> )
UV	Ultraviolett
UPLC	Ultra-Hochleistungsflüssigchromatographie (engl. <i>ultra high performance liquid chromatography</i> )
vgl.	vergleiche
vis	visueller Bereich im elektromagnetischen Spektrum
VK <sub>v</sub>	Verfahrensvariationskoeffizient
VO	Verordnung
vs.	Im Gegensatz zu, gegenüber (lat. <i>Versus</i> )
z.B.	zum Beispiel

## MASSEINHEITEN UND GRÖSSEN

%	Prozent
A	Signalfläche (engl. <i>area</i> )
<i>a</i>	thermodynamische Konstante
atm	Atmosphäre
bar	Bar
°C	Grad Celcius
<i>c</i>	Konzentration
Da	Masseneinheit
<i>E<sub>e</sub></i>	elektrische Energie
<i>E<sub>kin</sub></i>	kinetische Energie
eV	Elektronenvolt
g	Gramm
h	Stunde
<i>I</i>	Intensität
<i>I<sub>skal</sub></i>	skalierte Intensität
<i>k</i>	Retentionsfaktor
<i>K<sub>v</sub></i>	Verteilungskoeffizient
K	Kelvin
<i>L</i>	Driftlänge
L	Liter
<i>m</i>	Masse
<i>M</i>	Molare Masse
<i>M</i>	Molarität
m	Meter
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
min	Minute
mm	Niederschlagsmenge
n	Anzahl
ppm	Millionsteile (engl. <i>parts per million</i> )
<i>q</i>	Ladung
<i>r</i>	radiale Distanz
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rounds per minute</i> )
<i>R<sub>t</sub></i>	Retentionszeit
<i>s</i>	<i>score</i> -Wert auf der PC1
s	Sekunde
Sk <sub>t</sub>	Skalenteile
<i>S/N</i>	Signal-zu-Rausch-Verhältnis (engl. <i>signal to noise</i> )
<i>t</i>	Driftzeit

<i>t</i>	Zeit
t	Tonne
Torr	Torr (= 1,33 bar)
<i>U</i>	<i>Elektrisches Potential</i>
<i>U</i>	elektrische Spannung
<i>U</i>	Strömungsgeschwindigkeit
V	Volt
V	Volumen
v	Geschwindigkeit
v	Variationskoeffizient
x	Variable
z	Ladungszahl
$\alpha$	Signalflächen-Verhältnis
$\beta$	Konzentration
$\delta$	Polarität

### Präfixe für Maßeinheiten

<u>Symbol</u>	<u>Präfix</u>	<u>Wert</u>
k	kilo	$10^3$
c	centi	$10^{-2}$
m	milli	$10^{-3}$
$\mu$	micro	$10^{-6}$
$\eta$	nano	$10^{-9}$

## Glossar

<i>Alignment</i>	Ausgleich von einer Verschiebung der Retentionszeit oder des Masse-zu-Ladungsverhältnis während einer Messreihe
<i>Blank</i>	Blindwert für die Qualitätskontrolle analytischer Applikationen
<i>Bucket</i>	Eine detektierte Verbindung, die durch das Masse-zu-Ladungsverhältnis, Retentionszeit und Intensität beschrieben wird (siehe <i>Molecular Feature</i> )
<i>Bucket table</i>	Übersicht über die detektierten <i>Buckets</i> in einer Messreihe mit Informationen zum Masse-zu-Ladungsverhältnis, der Retentionszeit und der Intensität
<i>Cluster</i>	Gruppe von Analysen oder Substanzen mit ähnlichen Eigenschaften
<i>Carry over</i> Effekt	Verschleppung von Probenmaterial zwischen zwei aufeinander folgenden Injektionen
<i>Data fusion</i>	Zusammenführen von Analyseergebnissen unterschiedlicher Nachweisverfahren
Exogene Perturbation	Einflussfaktoren der Umwelt
<i>Feature Finding</i>	Algorithmusbasierte Analyse von Datensätzen zur Identifizierung von Features
Hauptkomponentenanalyse	Nicht supervisiertes Verfahren der multivariaten Datenanalyse
<i>Hotelling T<sup>2</sup> Test</i>	Erweiterung des <i>t</i> -Tests zur Identifizierung von Ausreißern
<i>Loadings</i>	Siehe <i>Bucket</i> oder <i>Molecular Feature</i>
Metaboliten	Zwischen- und Endprodukte biochemischer Reaktionen
Metabolom	Gesamtheit aller Metaboliten
<i>Metabolomics</i>	Wissenschaftliche Disziplin zur Erforschung des Metaboloms
<i>Molecular Feature</i>	Eine detektierte Verbindung, die durch das Masse-zu-Ladungsverhältnis, Retentionszeit und Intensität beschrieben wird (siehe <i>Bucket</i> )
Multivariate Datenanalyse	Statistisches Verfahren zur Analyse von großen unübersichtlichen Datenmengen
Normalisierung	Ausgleich systematischer Veränderung in den Chromatogrammen über eine Messreihe
<i>Partial Least Squares Regression</i>	Supervisiertes Verfahren der multivariaten Datenanalyse
Schlüsselmetabolit	Metabolit der zur Beantwortung einer definierten Hypothese herangezogen werden kann
<i>Scores</i>	Analysierte Probe innerhalb einer Messreihe
<i>Survey View</i>	Darstellungsform eines Chromatogramms mit Informationen zur Retentionszeit, dem Masse-zu-Ladungsverhältnis der Intensität der detektierten Verbindungen
Verteilungskoeffizient	Quotient aus der Konzentration der Analyten in der mobilen und stationären Phase eines chromatographischen Systems
Vulcano Plot	Graphische Darstellungsform der Ergebnisse eines <i>t</i> -Tests

## 1 Zusammenfassung

Im Jahr 2015 produzierte die deutsche Schokoladenindustrie ca. 1,02 Mio. t Schokoladenwaren mit einem Marktwert von 6,71 Mrd. €. <sup>1</sup> Bei der industriellen Weiterverarbeitung der Kakaobohnen zu Halb- oder Fertigerzeugnissen muss die Kakaoschale nach der Fermentation und Röstung vom Kakaokern abgetrennt werden. Die vollständige Abtrennung ist allerdings aus technologischen Gründen nicht immer möglich. Rückstände der Kakaoschale sind jedoch in vielerlei Hinsicht als qualitätsmindernd einzustufen, insbesondere wegen der Gefahr des Eintrags von gesundheitsgefährdenden Substanzen (z. B. Mykotoxine, Schwermetallen). In Anlehnung an vergangene Gesetzgebungen sowie den international vorgegebenen Lebensmittelstandards für Kakaomasse durch die Codex-Alimentarius-Kommission hat sich in der kakaoverarbeitenden Branche ein Grenzwert von 5 % Schalenanteil etabliert, welcher technologisch als nicht zu vermeiden gilt. Für die Herstellung qualitativ hochwertiger Endprodukte bei Verwendung ausgesuchter Rohstoffe und Halbfabrikate sind leistungsfähige Analysemethoden zur Wareneingangskontrolle und zur Qualitätssicherung notwendig. Der Kakaoschalengehalt zählt zu diesen Qualitätsparametern. <sup>2</sup> Bisher besteht keine Nachweismethode, welche die globale Wertschöpfungskette zu überwachen und robuste und valide Ergebnisse für den Kakaoschalengehalt zu generieren vermag. Im Zuge dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, welche den Kakaoschalengehalt auf der Ebene des Metaboloms erfasst. Neben der ausgehenden Gesundheitsgefahr durch den Eintrag von Mykotoxinen und Schwermetallen soll die Methode eingesetzt werden, um kriminell motivierte Streckungen von Kakaoprodukten mit Kakaoschale zur Gewinnmaximierung aufzudecken.

Für die Identifizierung der Schlüsselmetaboliten, welche in der Kakaoschale mit einer hohen und im Kakaokern mit einer möglichst kleinen Intensität nachweisbar sind, wurden *non-targeted* LC-ESI-QTOF Analysemethoden entwickelt und umfangreich optimiert. Die Methoden wurden für die getrennte Analyse des polaren und unpolaren Metaboloms der Kakaoschale und des Kakaokerns eingesetzt. Die Eignung der identifizierten potenziellen Schlüsselmetaboliten für einen validen Kakaoschalennachweis wurde anhand unterschiedlicher Bewertungskriterien überprüft und beurteilt. Die besten Ergebnisse wurden bei der Analyse des unpolaren Metaboloms im positiven Ionenmodus erzielt. Insgesamt konnten 17 Schlüsselmetaboliten aus fünf unterschiedlichen Stoffklassen identifiziert werden: Fettsäuretryptamide, Fettsäure-5-Hydroxy-tryptamide (Serotonin Derivate),  $\alpha$ -Tocopherol-Derivate, Triacylglycerole und Ceramide. Die Verbindungen

weisen einen linearen Zusammenhang zwischen den detektierten Signalen und dem Kakaoschalengehalt im gesamten möglichen Konzentrationsbereich von 0-100 % Kakaoschalengehalt auf.

Anhand der identifizierten Metaboliten wurde eine *targeted* LC-ESI-QqQ-MS/MS Methode entwickelt und nach anerkannten Richtlinien der FDA und DIN 32645 validiert, sodass die Anforderungen für Prüfverfahren nach der DIN EN ISO/IEC 17025 erfüllt sind und somit die Anwendbarkeit der Methode für akkreditierte Laboratorien in der Routineanalytik bewiesen werden konnte.<sup>3</sup> Durch die Analyse einer Kakaoschalen-Kalibrierreihe und die Berechnung unterschiedlicher PLS-R Modelle konnten die Anwendbarkeit und Leistungsfähigkeit der entwickelten *targeted* Methode gezeigt werden.

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte Methode zeichnet sich aufgrund des multiparametrischen Ansatzes durch eine sehr gute Vorhersagegüte, durch die Anwendbarkeit auf unterschiedliche Kakaoprodukte, die kurze Analysendauer von unter 45 min (inklusive Probenvorbereitung) und der geringen Menge an benötigten Chemikalien aus.

## 2 Abstract

In 2015, the German chocolate industry produced approximately 1.02 million tonnes of chocolate products with a market value of 6.71 billion €. During the further processing of cacao beans into semi-finished or finished products, the cocoa shell must be separated from the cocoa beans. However, absolute separation is not always possible for technological reasons. Residues of the cocoa shell can, after all, be classified as quality degrading in many respects. The most important reason for this is the introduction of hazardous substances into cocoa products via the cocoa shell (e.g. mycotoxins, heavy metals). In line with past legislation and the international food standards for cocoa mass set by the Codex Alimentarius Commission, the cocoa industry has established a limit value of 5 % shell content, which is technologically unavoidable. High-performance analytical methods for incoming goods inspection and quality assurance are essential for the production of high-quality products using selected raw materials and semi-finished products. The cocoa shell content is one of these quality parameters. Up to the present, no detection method has been available to monitor the global value chain and generate robust and valid results for the cocoa shell content. In this work, a method was developed which determines the cocoa shell content on the level of the metabolome. In addition to the health hazards posed by mycotoxins and heavy metals, the method can be used to detect criminally motivated stretching of cocoa products with cocoa shells in order to maximise profits.

Non-targeted LC-ESI-QTOF analysis methods were developed and extensively optimised for the identification of key metabolites. The key metabolites can be found in the cocoa shell at a high and in the cocoa nibs at a low concentration. These methods were used for the separate analysis of the polar and non-polar metabolome of the cocoa shell and cocoa nibs. The suitability of the identified potential key metabolites for a valid cocoa shell detection was examined and rated according to different evaluation criteria. The best results were obtained in the analysis of the nonpolar metabolome in positive ion mode. A total of 17 key metabolites from five different substance classes were identified: Fattyacidtryptamide, Fattyacid-5-hydroxy-tryptamide (Serotonin Derivative),  $\alpha$ -Tocopherol derivatives, Triacylglycerole and Ceramides. The compounds show a linear relationship in the entire concentration range (cocoa shell content 0-100 %).

Based on the identified metabolites, a targeted LC-ESI-QqQ-MS/MS method was developed and validated according to approved guidelines of the FDA and DIN 32645, so that the requirements for bioanalytical methods according to DIN EN ISO/IEC 17025 are fulfilled and the applicability of the method for accredited laboratories in routine analysis could be proven.<sup>3</sup> The practicability

and performance of the developed targeted-method could be demonstrated by analysing a cocoa shell calibration series and calculating different PLS-R models.

The developed method impresses not only by the very good predictive quality but also by the applicability for different cocoa products, and the short analysis time of less than 45 min including sample preparation and the low amount of chemicals required.

## 3 Einleitung

### 3.1 Kakao

Die Bezeichnung „Kakao“ umfasst den Kakaokern (Keimblätter), der aus dem Samen des Kakaobaumes *Theobroma cacao* L. gewonnen wird, sowie die daraus hergestellten und weiterverarbeiteten Produkte wie bspw. Kakaobutter, Kakaopulver oder Kakaomasse. Der Kakaobaum, der zu der Familie der Malvengewächse (*Malvaceae*) gehört, bekam von CARL VON LINNÉ seinen Namen *Theobroma*, was als „Götterspeise“ übersetzt werden kann.<sup>4</sup> Die im internationalen Sprachgebrauch verwendeten Bezeichnungen „Kakao“ und „Schokolade“ sind auf die Sprache der Azteken zurückzuführen.<sup>4</sup> Im Aztekischen wurde „Kakao“ als „kakautl“ und Schokolade auf „xocoatl“ bezeichnet. Der Kakaobaum ist in den Tropen Südamerikas heimisch und wurde bereits vor mehr als 3000 Jahren kultiviert. Neben der Bedeutung als Konsumgut wurden Kakaobohnen in der Kultur der Maya als Zahlungsmittel verwendet. Exportiert durch die europäischen Entdecker wurde Kakao im 16. Jahrhundert im europäischen Raum etabliert.<sup>5</sup> Kakaoerzeugnisse waren zuerst lediglich den besonders Vermögenden vorbehalten, wurden jedoch im 19. Jahrhundert durch technischen und wirtschaftlichen Fortschritt und die damit verbundene Preisreduzierung für alle Bevölkerungsschichten zugänglich.<sup>6</sup> Heute werden weltweit ca. 4.500.000 t Kakaobohnen produziert.<sup>7</sup> Die Hauptanbauländer im Erntejahr 2017/18 für Kakaobohnen waren mit absteigenden

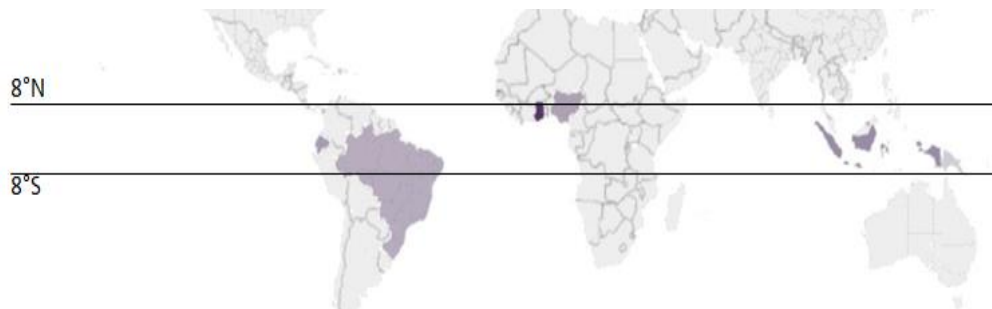


Abbildung 1: Hauptanbauländer von Kakaobohnen des Erntejahres 2017/18. Anbaumenge durch farbliche Vertiefung gekennzeichnet (Prognose).

Erntemengen: Elfenbeinküste, Ghana, Indonesien, Ecuador, Kamerun, Nigeria und Brasilien.<sup>8</sup> Der Kakaobaum benötigt tropisches, regenreiches und warmes Klima mit einer Niederschlagsmenge von 1500-2800 mm im Jahr und einer Durchschnittstemperatur von 23-27 °C. Die Temperatur sollte allerdings für eine erfolgreiche Kultivierung nicht unter 20 °C sinken. Diese Bedingungen bestehen zwischen dem 8. Breitengrad nördlich und südlich des Äquators, wo die Haupterzeuger der Kakaobohnen zu finden sind.



Wirtschaftlich relevant sind vornehmlich drei Kakaosorten; die beiden Edelkakaosorten Criollo und Trinitario sowie der Konsumkakao Forastero. Die Sorten sind visuell nur schwer zu unterscheiden, lassen sich jedoch anhand des Aromaprofils differenzieren. Durch fortwährende Kreuzungen und den Anbau von unterschiedlichen Kakaosorten auf den gleichen Plantagen werden Kakaobohnen heute vor allem nach ihrer Herkunft und nicht nach den Sorten benannt.<sup>9</sup> Die Kakaobäume werden auf Plantagen als Mischkulturen zusammen mit Bananenstauden ange-



Abbildung 3: Reife Kakaofrucht.<sup>13</sup>

baut, die auch als Schattenspender fungieren, da der Kakaobaum keine direkte Sonnenexposition verträgt.<sup>10</sup> Die normalerweise bis zu 15 Meter hohen Kakaobäume werden zur besseren Nutzbarkeit gestutzt und auf einer Höhe von 2-4 Meter gehalten.<sup>11</sup> Während des ganzen Jahres bilden sich Blüten direkt am blattlosen Baumstamm oder an Seitenästen. Dies wird auch als Kauliflorie bezeichnet.<sup>12</sup> Daher ist es möglich, dass an dem gleichen Baum sowohl Blüten, als auch unreife und reife Früchte zu finden sind. Pro Jahr entwickelt ein Baum ca. 50.000-100.000 Blüten von denen jedoch nur 0,1-6 % befruchtet werden. Aus der Summe der Blüten entwickeln sich durchschnittlich nur 20-50 Kakaofrüchte. Diese sind 15-20 cm lang, gehören botanisch zu den Beeren und enthalten bis zu 50 der 2 cm großen Kakaosamen (siehe Abbildung 3).<sup>13</sup> Die Kakaosamen sind im Fruchtfleisch (lat. Pulpa) eingeschlossen. Unter der Samenschale (lat. Testa) befindet sich der Embryo mit zwei Keimblättern (lat. Kotyledonen) sowie die Keimwurzel (lat. Radicula). In der vorliegenden Arbeit werden einheitlich die technologischen Begriffe Kakaoschale für die Testa, Kakaokern für die Kotyledonen und Keimwurzel für die Radicula verwendet.



Abbildung 2: Fermentierte und getrocknete Kakaobohne (1. Kakaokern, 2. Keimwurzel, 3. Kakaoschale).

Die Verarbeitung von Kakao umfasst mehrere Arbeitsschritte, beginnend mit der Ernte der reifen Kakaofrüchte. Die reifen Kakaofrüchte werden für die Fermentation geöffnet und die Kakaosamen werden zusammen mit dem Fruchtfleisch in Kästen oder auf Bananenblättern aufgeschichtet und zugedeckt. Die Fermentation läuft je nach Sorte und Fermentationsmethode über einen Zeitraum von 2-8 Tagen ab.<sup>14,15</sup> Das saure Milieu des Fruchtfleisches, bedingt durch die enthaltene Citronensäure, begünstigt das Wachstum von Hefen, die im Zuge der alkoholischen Gärung den Zucker des Fruchtfleisches zu Kohlenstoffdioxid und Ethanol metabolisieren. Weiterhin setzen Milchsäurebakterien den Zucker des Fruchtfleisches

zu Milchsäure um. Durch die mikrobiologischen Prozesse kommt es innerhalb des Fermentationsansatzes zu einem Temperaturanstieg auf ca. 50 °C.<sup>16</sup> Das Fruchtfleisch wird durch die pektinolytischen Enzyme der Hefen verflüssigt und läuft ab, sodass im Zusammenspiel mit einem Umwälzen der Kakaosamen ein aerobes Milieu geschaffen wird. In diesem Milieu wachsen Essigsäurebakterien, die das gebildete Ethanol zu Essigsäure oxidieren.<sup>17</sup> Die gebildete Essigsäure dringt durch die Mikropyle in den Samen ein, wodurch der Samen die Keimfähigkeit verliert und diverse enzymatische Reaktionen eingeleitet werden.<sup>18</sup> Die angeregten enzymatischen Reaktionen tragen zur Bildung des charakteristischen Aromas bei, reduzieren den Anthocyanengehalt und damit den adstringierenden Charakter und verbraunen die zuvor lilafarbenen Keimblätter.<sup>19</sup> Die Kakaosamen werden nach der Fermentation und dem damit einhergehenden Verlust der Keimfähigkeit als Kakaobohnen bezeichnet. Um Fehlgärungen zu vermeiden, können Starterkulturen eingesetzt werden. Durch vorheriges Sortieren der Kakaobohnen nach Größe kann eine gleichmäßige Fermentation erreicht und dadurch die Qualität verbessert werden. Ein weiterer Sortierungsschritt kann nach der Fermentation vorgenommen werden, wobei unzureichend fermentierte Bohnen, sog. Violetas, aussortiert werden, die aufgrund des hohen Anthocyanengehaltes das Aroma des Kakaos nachteilig beeinflussen können.<sup>20</sup>

Die Kakaobohnen werden zur Entfernung von Pulparesten und Anhaftungen nach der Fermentation einem Wasch- und Reinigungsschritt unterzogen. Der Wassergehalt der Kakaobohnen muss anschließend wieder reduziert werden. Zur Reduktion des Wassergehaltes auf 5-8 %, bei dem stabile Transportbedingungen vorliegen und ein Verschimmeln der Bohnen unterbunden wird, werden die Kakaobohnen unter mehrmaligem Wenden in der Sonne oder in Trocknungslagern getrocknet.<sup>21</sup>

In Tabelle 1 sind die Zusammensetzungen der Kakaoschale und des Kakaokerns der getrockneten und fermentierten Kakaobohne aufgeführt.

Tabelle 1: Auszug aus der Zusammensetzung von fermentierten, luftgetrockneten Kakaokernen, Kakaoschalen und Kakaokeimlingen.<sup>20</sup>

Bestandteil	Kakaokern [%]	Kakaoschale [%]	Kakaokeimling [%]
Wasser	5,0	4,5	8,5
Fett	54,0	1,5	3,5
Rohprotein	11,5	10,9	25,1
Mono- und Oligosaccharide	1,0	0,1	2,3
Stärke	6,0	-	-
Pentosane	1,5	7,0	-
Cellulose	9,0	26,5	4,3

Bestandteil	Kakaokern [%]	Kakaoschale [%]	Kakaokeimling [%]
Carbonsäuren	1,5	-	-
Asche	2,6	8,0	6,3

Für die Verarbeitung der getrockneten Bohnen zu Halbfabrikaten werden diese von Fremdstoffen getrennt und bei Temperaturen von 130-150 °C für 15-45 min geröstet.<sup>22</sup> Die genaue Temperatur sowie die Zeit der Röstung hängen von der Kakaosorte, der Größe und dem erwünschten Ergebnis ab. Üblicherweise werden die Bohnen zur Herstellung von Schokolade niedrigeren Temperaturen ausgesetzt als zur Herstellung von Kakaopulver. Die Röstapparaturen können chargenweise oder kontinuierlich betrieben werden. Durch den Temperatureinfluss verflüchtigen sich die bei der Fermentation entstandenen Säuren und sensorisch aktive Verbindungen werden aus ihren molekularen Vorstufen gebildet. Das zuvor bittere Aroma der Kakaobohnen verändert sich während des Röstprozesses und die Bohnen erhalten das charakteristische Kakaoaroma. Als weitere Effekte der Röstung sind das Abtöten von Mikroorganismen und die durch MAILLARD-Reaktionen hervorgerufene Bräunung der Kakaobohnen zu nennen.

Dem Röstprozess schließt sich die Abtrennung der Samenschale an. Die Kakaobohnen können auf unterschiedliche Arten gebrochen werden. Zum einen kommen Walzenbrecher zum Einsatz, bei dem die Kakaobohnen durch zwei gegenläufige gerippte Walzen zerkleinert werden oder die Kakaobohnen werden gegen einen Prallring beschleunigt und so gebrochen.<sup>4</sup> Der Kakaobruch wird Rüttelmaschinen zugeführt, wobei sich die leichteren Schalen aufgrund des Dichteunterschieds abtrennen lassen. In einem eingeführten Luftstrom findet eine weitere Sichtung des Kakaobruchs statt.<sup>23</sup> Neben der beschriebenen Röstung ganzer Kakaobohnen (engl. *whole bean roasting*) kann auch ein sog. *nib roasting* oder *liquor roasting* durchgeführt werden.<sup>24</sup> Das Manko des Röstens ganzer Bohnen liegt in der Diversität der Form von Kakaobohnen begründet. Durch die unterschiedliche Größe der Bohnen kann es bei kleinen oder flachen Kakaobohnen zu einer Überröstung und bei sehr großen Kakaobohnen zu einer unzureichenden Röstung kommen. In beiden Fällen entstehen s.g. *Off-Flavour*-Verbindungen, die einen negativen Einfluss auf das Aroma haben. In zunehmenden Maße wird daher das *nib roasting* oder *liquor roasting* angewendet, um die Entstehung dieser *Off-Flavour*-Verbindungen zu verhindern.<sup>25</sup> Bei diesen Verfahren werden nicht die ganzen Kakaobohnen, sondern der Kakaobruch (engl. *nib*) oder die Kakaorohmassen (engl. *liquor*) dem Röstprozess unterzogen. Durch die einheitliche Größe der Kakaonibs und die Homogenität der Kakaorohmasse werden bei diesen Arten der Röstung weniger *Off-Flavour*-Verbindungen gebildet. Bei beiden alternativen Methoden ist eine vorherige Entfernung

der Samenschalen notwendig. Die Entfernung der Samenschale wird durch eine kurzzeitige Erhitzung oder Bestrahlung mit Rotlicht erheblich verbessert, sodass auch bei diesen Verfahren eine kurze thermische Vorbehandlung durchgeführt wird, bevor die noch ungerösteten Bohnen gebrochen und gesichtet werden. Das geröstete Kakaogut, das bei einer kontrollierten Prozessführung nur noch einen technologisch nicht vermeidbaren Anteil an Samenschale enthält, wird zur Herstellung von diversen Kakaoprodukten wie Schokoladen verwendet. Die abgetrennte Samenschale, welche als Nebenstrom der Kakaoverarbeitung angesehen werden kann, findet Anwendung als Futtermittel oder Ausgangsmaterial für die Extraktion von Theobromin.<sup>26</sup>

Sofern nicht bereits vor der Röstung geschehen, wird der Kakaobruch durch einen Mahlprozess, bei dem die Kakaobutter austritt, zur Kakaomasse weiterverarbeitet. Ausgehend von der Kakaomasse wird zwischen der Herstellung von Kakaopulver und Schokolade differenziert. Um Kakaopulver zu erhalten, muss die Kakaomasse zunächst alkalisiert werden. Hierfür werden Alkalisalze, z.B. Kalium- oder Natriumcarbonat, verwendet. Durch das Alkalisieren werden der Geschmack und die Farbe an die gewünschten Produkteigenschaften angepasst sowie das Abpressen der Kakaobutter durch hydraulische Pressen erleichtert. Die Kakaobutter findet Anwendung bei der Herstellung von Schokoladen oder in der Kosmetikindustrie. Der erhaltene Presskuchen wird instantisiert und zum Kakaopulver verarbeitet.

Für die Herstellung von Schokolade wird die Kakaomasse mit den entsprechenden Zutaten, wie z.B. Milchpulver und Zucker, vermischt. Anschließend wird die Masse durch mehrere Walzen geführt, um eine weiche Konsistenz zu erhalten. Für die Endveredelung wird die Kakaomasse in Conchiermaschinen behandelt und geformt.<sup>27</sup> So wird als Produkt eine Schokolade erhalten, welche je nach Kakaoanteil und Zusatz von anderen Zutaten in verschiedene Sorten unterschieden werden kann.

## 3.2 Kakaoschalennachweis

### 3.2.1 Motiv

Bei der industriellen Weiterverarbeitung der Kakaobohnen zu Halb- oder Fertigerzeugnissen wird die Samenschale nach der Fermentation und je nach Röstverfahren auch nach der Röstung vom Kern abgetrennt. Die vollständige Abtrennung ist allerdings aus technologischen Gründen nicht immer möglich. Dies wird vor allem durch die hohe Diversität der eingesetzten Kakaobohnen begründet, welche sich charakteristisch in Größe, Form und Volumen unterscheiden

können.<sup>28</sup> Je nach Anbaugebiet, Sorte und Güte der Verarbeitung der Bohnen können daraus hergestellte Kakaomassen einen Schalenanteil von über 10 % aufweisen.<sup>6</sup> Kakaobohnen werden immer häufiger direkt in den Anbauländern oder von Zwischenhändlern zu Halbfabrikaten, wie Kakaomasse, Kakaopulver und Kakaobutter, verarbeitet. Im Erntejahr 2015/16 wurden bereits ca. 45 % der geernteten Bohnen direkt in den Erzeugerländern verarbeitet.<sup>8</sup> Dem volkswirtschaftlichen Vorteil der Anbauländer durch einen größeren Anteil an der Wertschöpfungskette und ein vermindertes Transportvolumen steht der Nachteil der weiterverarbeitenden Industrie gegenüber, welche die Produktionsschritte zum Halbfabrikat nicht beeinflussen und überwachen kann.

Hohe Kakaoschalenanteile sind in vielerlei Hinsicht als qualitätsmindernd einzustufen. Durch den Eintrag der Kakaoschale können anhaftende gesundheitsgefährdende Substanzen (z.B. Mykotoxine<sup>29-31</sup> oder Schwermetalle<sup>32</sup>) in das verarbeitete Produkt übergehen. Manda et al. konnten zeigen, dass durch eine manuelle Entfernung der Kakaoschale der Ochratoxin-A Gehalt um bis zu 100 % reduziert werden konnte. Somit konnte gezeigt werden, dass sich das Toxin in oder an der Schale akkumuliert und darüber in die Schokoladenprodukte eingebracht wird.<sup>31</sup> Durch die Röstung der Kakaobohnen können lediglich bis zu 17 % der Ochratoxin-A Konzentration abgebaut werden.<sup>30</sup> Als weitere Gründe können ein erhöhter Verschleiß von Maschinenteilen durch Abrieb<sup>33</sup> sowie nachteilige Produkteigenschaften (z.B. Veränderung der Viskosität und Fließeigenschaften) angeführt werden.<sup>34-36</sup>

Hersteller bzw. Inverkehrbringer von Kakaoprodukten müssen in der Lage sein, die Spezifikationen der erworbenen Halbfabrikate bzw. der hergestellten Produkte überprüfen zu können. Hierfür sind Methoden zur Qualitätssicherung und zur Überwachung der Verarbeitungsprozesse erforderlich. Die vorliegende Arbeit präsentiert einen Lösungsansatz für diese Problematik.

### 3.2.2 Grenzwert

Bereits 1918 wurde in Großbritannien in Form der *Cocoa Powder Order* ein Grenzwert von 5 % für den Kakaoschalenanteil in Kakaopulver etabliert.<sup>37</sup> Dieser Grenzwert und weitere Definitionen für unterschiedliche Kakaoprodukte wurden 1973 in der Richtlinie 73/241/EWG zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten für zur Ernährung bestimmte Kakao- und Schokoladenerzeugnisse definiert.<sup>38</sup> Bis Ende des Jahres 2003 wurde der Begriff Kakaokern in dieser Richtlinie als gereinigte, geschälte und von den Keimwurzeln befreite Kakaobohnen im gerösteten oder ungerösteten Zustand definiert. Der Gehalt an Kakaoschale und Keimwurzeln darf hierbei nicht mehr als 5 % bezogen auf die fettfreie Trockenmasse betragen. Mit der europaweiten

Harmonisierung des Lebensmittelrechts wurde diese Richtlinie überarbeitet und durch die Richtlinie 2000/36/EG<sup>39</sup> ersetzt, in welcher der gesetzlich bindende Grenzwert weggefallen ist und auch von dem nationalen Gesetzgeber in Deutschland nicht wieder aufgenommen wurde. In Anlehnung an die frühere Gesetzgebung sowie den international vorgegebenen Lebensmittelstandards für Kakaomasse durch die Codex-Alimentarius-Kommission hat sich jedoch in der kakao-verarbeitenden Branche ein Grenzwert von max. 5 % an Schalenanteilen und Keimlingen etabliert, welcher als technologisch nicht zu vermeiden gilt und davon abgeleitet der allgemeinen Verkehrsauffassung entspricht.<sup>40</sup> Bei Kakaoprodukten mit höheren Kakaoschalengehalten kann von einer Streckung, Verarbeitung minderwertiger Ware oder einer unzureichend kontrollierten Prozessführung ausgegangen werden.

### 3.2.3 Historie

Bis heute wurden bereits diverse analytische Ansätze zur Bestimmung des Kakaoschalengehaltes in Kakaoprodukten entwickelt. Zu den frühesten angewendeten Verfahren zählt die mikroskopische Untersuchung von Kakaoproben bspw. anhand von Gefäßbündeln, Stein- oder Schleimzellen, über welche eine Abschätzung des Gehalts an Kakaoschalen jedoch nur bedingt möglich war, da insbesondere in verarbeiteten Produkten die einzelnen Gewebeelemente nicht zweifelsfrei erkennbar sind. Hanausek et al. zeigten als erster die diagnostische Bedeutung der Schleimzellen in der Kakaoschale auf, die sich mikroskopisch nachweisen lassen und Rückschluss auf den Kakaoschalengehalt zulassen.<sup>41</sup> Das beschriebene Nachweisverfahren wurde von Beythien und Pannwitz ergänzt, um einen besseren Anhaltspunkt zur Beurteilung von Kakaoprodukten zu erlangen.<sup>42</sup> Plücker und Kollegen zeigten, dass die Steinzellen, Sklereiden, ebenfalls für den mikroskopischen Nachweis der Kakaoschale herangezogen werden können und robustere Ergebnisse liefern.<sup>43, 44</sup> Durch den heutigen Einsatz von modernen Walzen und Feinwalzen sind die Strukturmerkmale der Kakaoschale nur noch bedingt in den Kakaomassen nachzuweisen bzw. ist bei Produkten mit einem identischen Schalengehalt, aber unterschiedlichem Zerkleinerungsgrad, die Zahl der Sklereiden nicht analog.<sup>45</sup> Weitere frühe, analytische Verfahren basieren auf den physikalischen Unterschieden des Schalen- und Kakaoanteils. Filsinger beschreibt in diesem Zusammenhang die Schlämmmethode.<sup>46</sup> Durch mehrmaliges Aufschlännen des entfetteten Kakaos und Dekantieren kann der Kakaoschalenanteil als Bodensatz erhalten werden und gravimetrisch bestimmt werden. Goske schlug aufbauend auf diesem Verfahren die Abtrennung von Kakaoschalenanteilen durch Einbringen in eine Chlorcalcium- bzw. Eisenchloridlösung und anschließende Zentrifugation vor. Für die Bestimmung des Kakaoschalenanteils anhand dieser

Methoden werden jedoch empirisch bestimmte Umrechnungsfaktoren im Sinne einer Konventionmethode benötigt. Weiterhin kann es bei diesem Verfahren zur Verwechslung von Schalen mit grob gemahlene Kakaokernen kommen, wodurch das gravimetrisch ermittelte Ergebnis verfälscht werden kann.<sup>47</sup>

Versuche, den Kakaoschalenanteil aufgrund von abweichenden Konzentrationen von Inhaltsstoffen insbesondere des höheren Ascheanteils (vgl. Tabelle 1, Abschnitt 3.1) zu bestimmen, brachten ebenfalls unbefriedigende Ergebnisse, da die Konzentration durch die Herkunft und Prozessierungsstufen der Kakaoproben beeinflusst wird.<sup>48</sup> Den Einfluss unterschiedlicher Herkünfte auf die Inhaltsstoffe von Kakaobohnen zeigte Knapp bereits 1919.<sup>49</sup>

Vielfache Anwendung findet bis heute die „Blauwertmethode“. Bereits 1963 haben Fincke und Sacher gezeigt, dass in der Kakaoschale zwei Stoffe enthalten sind, die in stark salzsaurer Lösung mit *p*-Dimethylaminobenzaldehyd und anschließender Behandlung mit Wasserstoffperoxid zu einem blauen Farbstoff reagieren, welcher photometrisch quantifiziert werden kann.<sup>50</sup> Zwei Jahre später konnte Sacher eine dieser Verbindungen als Behensäuretryptamid identifizieren.<sup>51</sup> Die zweite Verbindung konnte später als Lignocerinsäuretryptamid charakterisiert werden. Obwohl die Methode vom *International Office of Cocoa, Chocolate and Sugar Confectionary*<sup>52</sup> offiziell anerkannt wird, konnte gezeigt werden, dass die Methode zwar selektiv ist, der Tryptamidgehalt jedoch sehr stark biologischer Varianz unterliegt, die abhängig von Herkunft, Erntejahr, Sorte oder Düngung der Kakaoproben ist.<sup>2</sup> Weiterhin lässt sich dieses Verfahren lediglich auf Kakaobutter anwenden. Andere Kakaoprodukte wie Kakaopulver oder Kakaomassen lassen sich aufgrund der intensiven Eigenfärbung anhand dieser Methode nicht photometrisch bestimmen. Neben der photometrischen Bestimmung der Fettsäuretryptamide als Indikatorsubstanzen für die Kakaoschale, stellte Münch 1999 eine Methode basierend auf der hochdruckflüssigchromatographischen Trennung und Detektion mittels Fluoreszenzdetektor vor.<sup>45</sup> Anhand weiterer Analysen konnte gezeigt werden, dass die analysierten Fettsäuretryptamide nicht ausschließlich in der Kakaoschale, sondern auch im Kakaokern zu finden sind und zum anderen, dass der Gehalt an Fettsäuretryptamiden stark von der Herkunft des Kakaos abhängig ist.<sup>2</sup>

Ein neuer Lösungsansatz für den Kakaoschalennachweis basiert auf der Detektion eines schalenspezifischen DNA-Fragments mittels Polymerase-Kettenreaktion. Es hat sich herausgestellt, dass die „schalenspezifische“ DNA-Sequenz jedoch durch ein in die Schale eingedrungenes Essigsäurebakterium eingebracht wird. Daher ist die quantitative Bestimmung des Kakaoschalengehaltes stark abhängig vom Fermentationsgrad und der bei der Fermentation vorliegenden Mikroflora der Proben.<sup>53</sup>

Der neueste Ansatz wurde mittels Nahinfrarotspektroskopie (NIR) durchgeführt.<sup>54</sup> Für die Auswertung wurden fünf unterschiedliche Wellenzahlen ausgewählt und für die Erstellung eines Vorhersagemodells verwendet. In der vorgestellten Arbeit wurde die Methode lediglich dazu verwendet zu entscheiden, ob der Grenzwert von 5 % Kakaoschalengehalt eingehalten wird oder nicht. Eine genaue Bestimmung des Kakaoschalengehaltes anhand dieser Methode wurde nicht durchgeführt. Weiterhin wurde die Methode lediglich für Kakaopulver entwickelt und der Einfluss auf Proben unterschiedlicher Herkünfte, Erntejahre oder Prozessierungsstufen wurde nicht berücksichtigt. Es wurden die gleichen Proben für die Kalibrierung und Validierung der Methode verwendet. Demnach kann keine Aussage über die Eignung der Methode für Kakaoproben unterschiedlicher Herkunft, Prozessierung, Sorten oder Erntejahre getroffen werden.

Die bis heute angewandten Techniken sind somit bisher nicht in der Lage, weder über die DNA noch über bestimmte Metaboliten robuste und reproduzierbare Ergebnisse für Proben unterschiedlicher Herkunft, Erntejahre und Verarbeitungsstufen zu liefern. Der hier verfolgte *Metabolomics* Ansatz unterscheidet sich von den bisherigen Methoden durch einen multiparametrischen Ansatz. Bei dieser Methode soll eine Vielzahl verschiedener Schlüsselmetaboliten aus unterschiedlichen Substanzklassen für den Kakaoschalengehalt herangezogen werden. Durch die große Anzahl an Schlüsselmetaboliten soll der Einfluss der exogenen Perturbation, welcher die Konzentration der Metaboliten eines biologischen Systems beeinflussen kann, minimiert werden und somit eine valide Aussage über den Kakaoschalengehalt in Proben unterschiedlicher Herkünfte, Erntejahre und Verarbeitungsstufen getroffen werden können. Basierend auf diesen Schlüsselmetaboliten soll ein hochauflösender molekularer Fingerabdruck generiert werden, der zur Bestimmung des Schalengehaltes herangezogen werden kann.



### 3.3 *Metabolomics*

#### 3.3.1 Definitionen und Begriffsbestimmungen

Metaboliten treten auf Zellebene als Zwischen- und Endprodukte biochemischer Reaktionen auf.<sup>55</sup> Hierbei handelt es sich um Verbindungen mit einer Molekülmasse von <1 kDa, die unterschiedlichen Stoffklassen wie Kohlenhydraten, Aminosäuren und Lipiden, aber auch Hormonen, sekundären Stoffwechselprodukten und Signalmolekülen zuzuordnen sind.<sup>56, 57</sup> Die Gesamtheit der Metaboliten eines biologischen Systems oder einer einzelnen Probe wird als Metabolom bezeichnet. Neben der Differenzierung nach Stoffklassen kann das Metabolom auch nach dem Aufenthaltsort der Metaboliten im biologischen System gegliedert werden. Hierbei wird zwischen dem Endo- und Exometabolom differenziert. Das Endometabolom umfasst alle Metaboliten innerhalb der Zellen, also das intrazelluläre Metabolom, während das Exometabolom aus allen Metaboliten außerhalb der Zellen gebildet wird und daher als extrazelluläres Metabolom betitelt wird. Im extrazellulären Raum liegt eine geringere metabolische Aktivität vor, was auf die deutlich niedrigere Konzentration an Enzymen im intrazellulären Raum zurückzuführen ist.<sup>58</sup>

Unter den Begriffen *Metabonomics* und *Metabolomics* werden Disziplinen verstanden, die sich mit der Analyse des Metaboloms beschäftigen.<sup>59</sup> Der Begriff *Metabonomics* wurde 1999 als Teilbereich der Systembiologie durch Nicholson eingeführt. Der Begriff ist definiert als eine quantitative Analyse der dynamischen, multiparametrischen und metabolischen Reaktionen lebender Systeme zu bestimmter Zeit in Bezug auf pathophysiologischen Stimuli oder genetischer Modifikationen.<sup>60</sup> Zwei Jahre später wurde der Begriff *Metabolomics* von Fiehn et al. als Nachweis und Quantifizierung aller Stoffwechselprodukte eines biologischen Systems in einer definierten Umwelt charakterisiert.<sup>61</sup> Beide Begriffe sind in der Literatur etabliert, werden jedoch als Synonyme angesehen.<sup>62</sup> In der vorliegenden Arbeit wird einheitlich der Begriff *Metabolomics* verwendet.

Als Teil der Systembiologie nehmen die unterschiedlichen „-omics“-Disziplinen eine zentrale Rolle ein, um die Gesamtheit eines biologischen Systems zu verstehen.<sup>63</sup> *Metabolomics* gehört neben *Genomics*, *Transcriptomics* und *Proteomics* zu den vier Hauptgruppen der „-omics“-Disziplinen und stellt den jüngsten Forschungsansatz der „-omics“-Disziplinen dar.<sup>64</sup>

Der Zusammenhang dieser Disziplinen ausgehend von *Genomics* ist in der „-omics“-Kaskade in Abbildung 4 dargestellt.

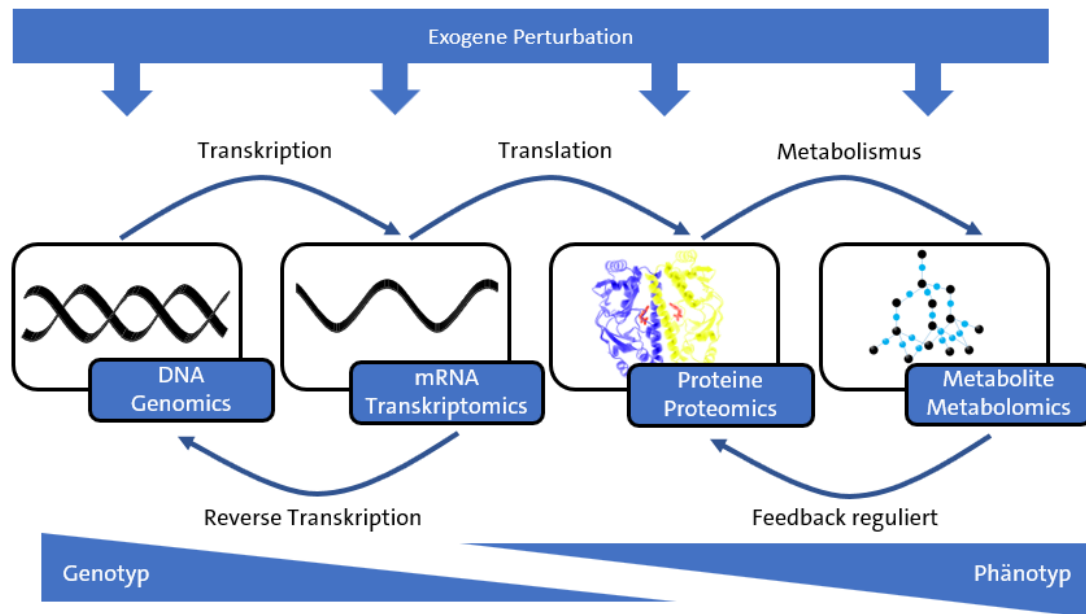


Abbildung 4: „-omics“-Kaskade nach Patti.<sup>65</sup>

Die Kaskade visualisiert den Informationsaustausch zwischen den Disziplinen ausgehend vom Genom bis zum Metabolom, um ein besseres Verständnis der biologischen Abläufe zu schaffen.<sup>56</sup> Das Metabolom eines biologischen Systems repräsentiert die letzte Stufe der Interaktionen zwischen dem Genom, Transkriptom, Proteom und unterliegt somit den Einflüssen aller vorangegangenen Stufen und auch den exogenen Perturbationen auf allen Ebenen. Da sich alle Perturbationen auf die Zusammensetzung des Metaboloms auswirken, wird der Phänotyp eines biologischen Systems am konkretesten durch das Metabolom dargestellt.

### 3.3.2 *Metabolomics* Disziplinen

Zu den *Metabolomics* Disziplinen gehören das *metabolic profiling*, *metabolic fingerprinting* und *metabolic footprinting*. Die einzelnen Disziplinen ergänzen sich gegenseitig, um in der Summe eine vollständige Darstellung abzugeben.<sup>66</sup> Sie lassen sich in zielgerichtete (engl. *targeted*) und nicht-zielgerichtete (engl. *non-targeted*) Methoden gliedern (vgl. Abbildung 5).

Bei der *non-targeted* Analyse der intrazellulären Metaboliten handelt es sich um eine qualitative und semiquantitative Detektion möglichst vieler Metaboliten unterschiedlicher Substanzklassen. Die Analyse gilt als hypothesenfrei. Das generierte Spektrum an detektierten Verbindungen ist charakteristisch für das analysierte biologische System und wird auch als *Fingerprint*

bezeichnet. Demnach wird diese Disziplin als *metabolic fingerprinting* bezeichnet.<sup>67</sup> Die gewonnenen Erkenntnisse geben einen Überblick über die metabolische Zusammensetzung des Organismus, worauf aufbauend Hypothesen generiert werden können. Anwendung findet dies zum Beispiel beim Vergleich der Analyse von unterschiedlichen Proben, um Veränderungen des Metaboloms nach exogener Perturbation zu beschreiben, die Einteilung nach kontext-abhängige Gruppen vorzunehmen oder einen charakteristischen, metabolischen Fingerabdruck zu erstellen.<sup>68</sup> Eine Gruppierung kann beispielsweise anhand von unterschiedlicher Herkunft, Sorte oder Kultivierungsbedingungen erfolgen.<sup>59, 69</sup>

Ergänzend zum *metabolic fingerprinting* liegt dem *metabolic footprinting* die Analyse des extrazellulären Metaboloms zugrunde. Als Anwendungsbeispiel für das *metabolic footprinting* kann die Analyse von Kultur- und Nährmedien genannt werden, die sich in Folge der Kultivierung von unterschiedlichen Organismen einer Veränderung unterziehen kann. Hierbei kann es sowohl zur Veränderung der Metabolit-Konzentration im Medium kommen, als auch zur Bildung von neuen Metaboliten, die von den Organismen an das Medium abgegeben wurden.<sup>70</sup> Anhand des *metabolic footprinting* kann beispielhaft die Auswirkung von Genveränderungen auf das Kulturmedium überprüft werden.<sup>71</sup>

Aufgrund der chemischen Diversität der Metaboliten ist es nicht möglich das gesamte Spektrum in einem einzigen Extraktionsdurchlauf zu erfassen. Sofern ein vollständig hypothesenfreier Ansatz vorliegt, wird die *non-targeted* Analyse in einen polaren und unpolaren Ansatz unterteilt, um das gesamte Polaritätsspektrum der Metaboliten zu erfassen und somit keine Substanzklassen zu diskriminieren.<sup>72</sup> Als Ziel der *non-targeted* Analyse gilt die Identifizierung von sogenannten Schlüsselmetaboliten, die charakteristisch für das vorliegende biologische System oder eine Gruppe an Systemen sind und relevant für die entstandene Hypothese sind.

Sofern nicht bereits durch Literaturdaten Informationen zu potenziellen Schlüsselmetaboliten vorliegen, schließt sich der *non-targeted* Analyse die *targeted* Analyse der identifizierten Schlüsselmetaboliten an. Die definierten Hypothesen gilt es beim *metabolic profiling* zu überprüfen. Hierfür wird eine kleine Anzahl an Metaboliten, die zuvor als Schlüsselmetaboliten charakterisiert wurden, anhand einer gerichteten Analyse quantifiziert. Die Quantifizierung kann anhand des Standardadditionsverfahrens oder durch Dotierung mit internen Standards erfolgen. Um Matrix- und Suppressionseffekte zu nivellieren, sollten nach Verfügbarkeit isotope markierte Analoga der Schlüsselmetaboliten verwendet werden.<sup>73, 74</sup>

Neben der Gliederung nach *non-targeted* und *targeted* Disziplinen kann eine Einteilung auch anhand der Datenauswertung und Verarbeitung erfolgen. Hier wird zwischen einer informativen, diskriminativen und vorhersagenden Analyse differenziert. Bei der informativen Methode steht die Identifizierung und Quantifizierung der Metaboliten im Mittelpunkt, um Informationen über den Organismus zu erhalten.<sup>75</sup> Diese Technik wird z.B. bei der Entwicklung von Metabolit-Datenbanken, wie der menschlichen Metabolom-Datenbank, verwendet.<sup>76</sup>

Die diskriminative Technik beschäftigt sich hingegen mit der Identifizierung von Unterschieden zwischen Probenpopulationen, ohne statische Modelle zu erstellen oder die Differenzen genauer zu erläutern. Dies kann mithilfe von multivariaten Datenanalysen (MVDA) durchgeführt werden. Die Hauptkomponentenanalyse (PCA, engl. *principal component analysis*) ist dabei die meistgenutzte Methode.<sup>77</sup>

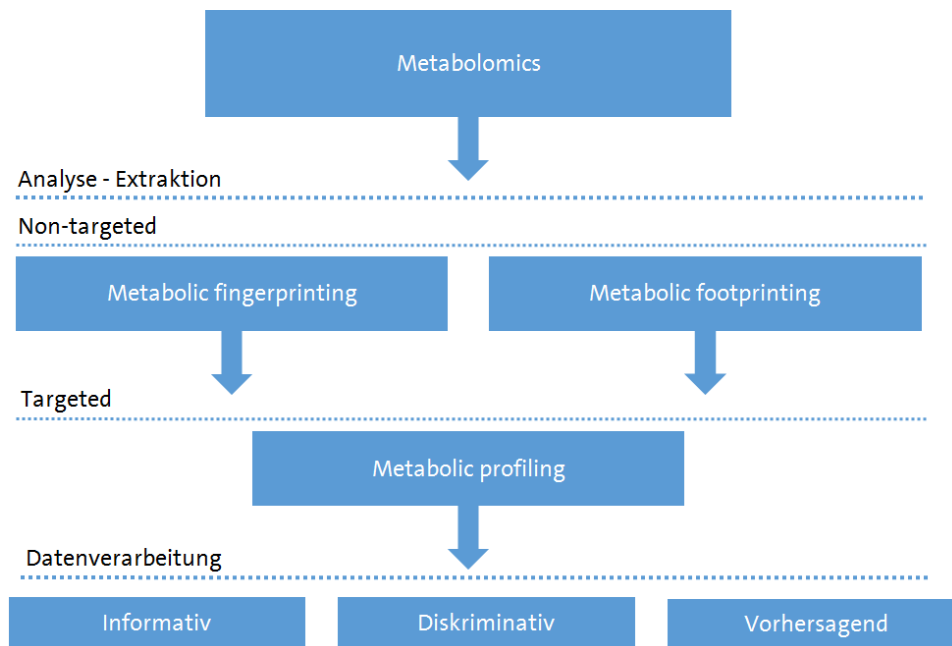


Abbildung 5: Allgemeine Einteilung der Metabolomics-Disziplin nach Cevallos-Cevallos.<sup>75</sup>

Das Ziel der vorhersagenden *Metabolomics* Disziplin ist es, statische Modelle basierend auf dem Metabolitprofil zu erstellen, um Variablen voraussagen zu können. Für die Vorhersage werden unter anderem PLS-R Modelle (engl. *partial least square regression*) erstellt, welche ebenfalls zu den MVDA gehören und anhand derer eine Vorhersage von unbekannt Variablen möglich ist.<sup>78</sup>

Bei der vorliegenden Arbeit erfolgt die Identifizierung der Schlüsselmetaboliten für den Kakaochalennachweis anhand des *metabolic fingerprintings* gekoppelt mit einer diskriminativen Datenverarbeitung. Die Vorhersage des Kakaoschalengehaltes von unbekannt Proben erfolgt anhand des *metabolic profilings* und einer vorhersagenden Datenauswertung.

### 3.3.3 Einflussfaktoren auf das Metabolom

Die Einflussfaktoren der Umwelt, in Abbildung 6 als exogene Perturbationen bezeichnet, können eine große Auswirkung auf den Metabolismus und somit auf das Metabolom eines Organismus haben.<sup>79</sup> Betrachtet man zur Vereinfachung eine Pflanze, die ortsgebunden wächst, gibt es dennoch viele Einflussfaktoren, die natürlichen oder anthropogenen Ursprungs sein können. Der Standort der Pflanze ist hierbei als erster Einflussfaktor zu nennen und setzt sich wiederum unter anderem aus der Beschaffenheit des Bodens, der Sonnenexposition, dem Alter der Pflanze, der Wasser- und Nährstoffverfügbarkeit und des Klimas zusammen.<sup>80</sup> Als anthropogene Einflussfaktoren sind der Zusatz von Düngemitteln und Pflanzenschutzmitteln und die Bewirtschaftung und Pflege zu nennen.<sup>81</sup>

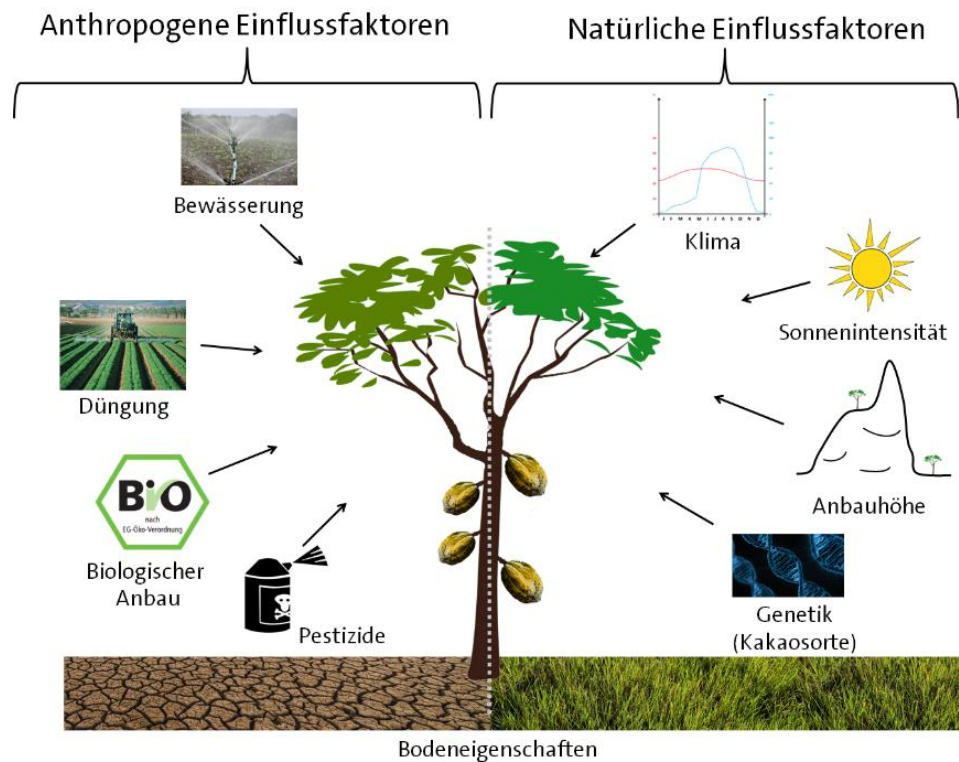


Abbildung 6: Schematische Darstellung unterschiedlicher Einflussfaktoren auf das Metabolom eines Kakaobaums.

Zudem treten Unterschiede im Metabolismus einer Pflanze auf, wenn die Pflanze auf einem Feld oder in einem Gewächshaus wächst, da wechselhafte abiotischen Einflussfaktoren in einem Gewächshaus zu vernachlässigen sind, während Pflanzen auf Feldern diesen Schwankungen ausgesetzt sind. Auch die biotischen Einflussfaktoren können in einem Gewächshaus besser kontrolliert werden.<sup>82</sup> Zu diesen Faktoren zählen die Infektionen durch Mikroorganismen, Prädatoren und die Konkurrenzsituation mit anderen Lebewesen um Wasser und Nährstoffquellen.<sup>83</sup> Einige natürliche und anthropogene Einflussfaktoren auf einen Kakaobaum sind in Abbildung 6

dargestellt. Neben den bereits aufgeführten Faktoren spielt zudem der Erntezeitpunkt eine entscheidende Rolle in Bezug auf das Metabolom einer Pflanze. Dieses kann sich erheblich zwischen den unterschiedlichen Reifestadien unterscheiden. Hierbei ist vor allem auf die Umsetzung der Stärkespeicher einer Frucht zu Zuckern zu verweisen.<sup>20</sup> Nach der Ernte kommt es zu einer Reduzierung der metabolischen Aktivität. Um jedoch das Metabolom direkt nach der Ernte vergleichen zu können, muss eine standardisierte Behandlung der Pflanzen nach der Ernte erfolgen.<sup>84</sup> Die metabolische Aktivität kann unter anderem durch Einfrieren oder Gefriertrocknung auf ein Minimum reduziert werden. Bei vielen Lebensmitteln, wie auch dem Kakao, finden nach der Ernte weitere Prozessierungen bis zum genussfertigen Produkt statt, die wiederum einen Einfluss auf das Metabolom haben.<sup>16</sup> Hierbei ist auf Abschnitt 3.1 zu verweisen, wo ausführlich der Einfluss der Fermentation, Trocknung und Röstung auf das Metabolom des Kakaos dargestellt wird.

Die Einflussfaktoren auf das Metabolom können je nach verfolgter Fragestellung zielführend oder hinderlich sein. Gilt es, die Herkunft von unterschiedlichen Probenpopulationen zu überprüfen, basiert der Erfolg des Nachweises auf den Einflussfaktoren, die auf die Proben an verschiedenen Orten gewirkt haben.<sup>85, 86</sup> Soll allerdings ein Nachweis erfolgen, der unabhängig der Herkunft für alle Proben durchzuführen ist, sind die Einflussfaktoren auf das Metabolom als hinderlich zu interpretieren.<sup>87</sup>

### 3.3.4 Arbeitsabfolge bei *Metabolomics*-Experimenten

Der Workflow eines *Metabolomics*-Experimentes setzt sich aus mehreren aufeinander aufbauenden Schritten zusammen. Aufgrund der sensiblen Eigenschaften des Metaboloms ist grundsätzlich auf stabile und standardisierte Temperaturen zu achten, damit es zu keiner ungewollten Veränderung in der Metabolitzusammensetzung kommt.

Als erster Schritt gilt die Probenakquise, bei der authentisches Probenmaterial akquiriert wird. Je mehr Informationen über die Proben zu erhalten sind, desto besser können die erhaltenen Ergebnisse interpretiert und gegeneinander abgeglichen werden. Die Authentizität des Probenmaterials ist entscheidend für die Güte der erstellten Regressionsmodelle, anhand derer anschließend unbekannte Proben vorhergesagt werden. Neben der Authentizität stellt der Probenumfang den zweiten fundamentalen Pfeiler für die Erstellung robuster Regressionsmodelle dar. Je mehr Proben für die Erstellung des Modells berücksichtigt werden, desto robuster und statistisch valider kann das Modell anschließend nicht authentische Proben vorhersagen.

Der Probenakquise schließt sich der Transport des Probenmaterials an. Wie in Abschnitt 3.3.3 beschrieben wird, kann sich das Metabolom nach der Ernte weiterhin verändern. Demnach ist bei dem Transport darauf zu achten, dass die Proben einer ständigen Kühlung und ggf. standardisierte Atmosphäre ausgesetzt sind. Hierbei kann zwischen Proben mit einem hohen und niedrigen Wassergehalt differenziert werden. Je höher der Wassergehalt der Proben ist, desto größer ist die Gefahr einer Veränderung des Metaboloms beim Transport. Hingegen bedarf es bei getrockneten Proben, wie z.B. Kakaobohnen oder Haselnüssen, eines geringeren Aufwands zur Reduktion der Einflussfaktoren.

Wie beim Transport gilt es bei der gesamten Probenvorbereitung die metabolische Aktivität zu unterbinden, um Änderungen in der Konzentration sowie der Struktur der Metaboliten zu hemmen. Sofern die Probenaufarbeitung nicht direkt nach dem Transport erfolgt, sollte eine Lagerung der Proben bei mindestens  $-80^{\circ}\text{C}$  erfolgen.<sup>88, 89</sup> Die Proben sollten während der gesamten Probenvorbereitung unter  $4^{\circ}\text{C}$  gekühlt werden, da sich das Metabolom oberhalb dieser Temperatur deutlich schneller verändern kann.<sup>90</sup> Die Probenvorbereitung umfasst eine Homogenisierung und eine Extraktion des Probenmaterials. Bei der Homogenisierung ist es besonders wichtig, das Probenmaterial zu kühlen, da durch die mechanische Einwirkung thermische Energie entsteht und Zellen zerstört werden können, wodurch Substrate und Enzyme, die bei intakten Zellen separat voneinander vorliegen, miteinander interagieren können. Eine Zugabe von Trockeneis bei der Homogenisierung bewirkt neben der Kühlung bei fettreichen Matrices wie Kakaobohnen ein Unterbinden des Fettaustritts aus den Zellen, sodass ein feines, homogenes Pulver erhalten werden kann. Eine Gefriertrocknung des Probenmaterials gilt als fakultativ und ist auch vom Wassergehalt der Probenmatrix abhängig.<sup>91</sup> Neben der verbesserten Haltbarkeit durch die Gefriertrocknung ist auch eine Standardisierung des Wassergehaltes der Proben als weiterer positiver Effekt anzusehen.

Je nach analytischem Ansatz kann eine gerichtete Extraktion bestimmter Substanzen und Substanzklassen (vgl. *metabolic profiling*<sup>92, 93</sup>) oder eine ungerichtete Extraktion, bei der eine möglichst weite Bandbreite an unterschiedlichen Substanzklassen ohne Diskriminierung extrahiert werden soll (vgl. *metabolic fingerprinting*<sup>94, 95</sup>), erfolgen. Ziel jeden Ansatzes ist es, eine Methode zu entwickeln, die eine hohe Reproduzierbarkeit aufweist, kostengünstig und schnell durchzuführen ist und auf human- und umweltfreundlichen Chemikalien basiert. Die Extraktion stellt einen Schlüsselbereich der Probenaufarbeitung dar. Hier können die Ergebnisse durch unzureichende Extraktion von potenziellen Schlüsselmetaboliten maßgeblich beeinflusst werden.

Für die Extraktion werden oftmals klassische Lösungsmittel wie Wasser, Alkohole und halogenierte Kohlenwasserstoffe oder Mischungen aus diesen eingesetzt, um das Extraktionsvermögen zu maximieren. Weiterhin zählen auch Zweiphasen- und Festphasen-Extraktionen zu den etablierten Verfahren. Bei allen Verfahren werden unterschiedliche Zellaufschlussverfahren, wie der Einsatz von Kugelmøhlen oder Ultraschallbädern verwendet, um die Zellen aufzuschließen und die Metaboliten in das Extraktionsmittel zu überführen.

Bei der Zweiphasen-Extraktion wird eine Mischung aus zwei oder mehreren Lösungsmitteln verwendet, die sich aufgrund des großen Polaritätsunterschiedes nicht miteinander mischen lassen. So werden bei der Extraktion zwei Phasen erhalten und die Metaboliten trennen sich ausgehend von der Polarität in eine polare und eine unpolare Fraktion auf. Anschließend können jeweils die polare und unpolare Phase für die Analyse des jeweiligen Polaritätsspektrums eingesetzt werden. Zu den verbreitetsten Verfahren zählen die Extraktionen nach Folch und nach Bligh und Dyer.<sup>96, 97</sup>

Die Festphasenextraktion (SPE; engl. *solid phase extraction*) basiert auf einem chromatographischen Trennmechanismus, der die Analyten von Verunreinigungen und Matrixbestandteilen abtrennt. Hierbei kommen unterschiedliche, zum Teil sehr spezifische, SPE-Kartuschen zum Einsatz, die spezifisch Substanzklassen retardieren und somit von der Matrix separieren können. Bei dieser Extraktion werden einzelne Substanzklassen isoliert, um den Nachweis dieser Verbindungen zu verbessern, weshalb die Technik vor allem bei *targeted* Ansätzen zum Einsatz kommt.<sup>98, 99</sup>

Weiterhin können Extraktionsansätze durch Variationen des pH-Wertes oder der Extraktionstemperatur verbessert und optimiert werden.<sup>100-102</sup> Mushtaq et al. zeigte, dass die Extraktionseffizienz durch die Absenkung des pH-Wertes deutlich verbessert werden kann.<sup>103</sup>

### 3.3.5 Apparative Applikationen bei *Metabolomics* Experimenten

Aufgrund der chemischen Diversität, der hohen Anzahl und den großen Konzentrationsunterschieden der Metaboliten eines biologischen Systems, ist bisher keine analytische Plattform in der Lage, alle Metaboliten in der Gänze zu erfassen. Daher wird eine Vielzahl unterschiedlicher spektroskopischer Methoden verwendet, um ein möglichst großes Spektrum des Metaboloms zu erfassen. Zu den etablierten Methoden im Bereich *Metabolomics* gehören die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR, engl. *nuclear magnetic resonance*), die Massenspektroskopie (MS, engl. *mass spectrometry*) und die Infrarotspektroskopie (IR).



Zur weiteren Erhöhung des Detektionsvermögens können die Methoden zusätzlich mit chromatographischen Systemen gekoppelt werden. Dies wird vornehmlich bei der MS, aber auch in Einzelfällen bei der NMR gemacht.<sup>104-107</sup> Zur Kopplung werden kapillarelektrophoretische (CE), flüssig- (LC) oder gaschromatographische (GC) Systeme eingesetzt.<sup>108-110</sup>

Die MS bietet neben der einfachen Kopplungsmöglichkeit mit chromatographischen Systemen weitere Vorteile gegenüber den anderen Methoden. Hierzu zählen die Möglichkeiten einer sowohl selektiven, als auch sensitiven Quantifizierung der Analyten sowie die Strukturaufklärung von Metaboliten durch MS/MS-Experimente. Den Vorteil der Strukturaufklärung teilt sich die MS mit der NMR, die sich zusätzlich durch eine nicht-destruktive Detektion und einen hohen Probendurchsatz auszeichnet. Die Vorteile der IR sind die kostengünstige und schnelle Analyse. Der Anschaffungspreis und auch der Zeitaufwand der Probenvorbereitung und Analyse sind im Verhältnis zu den anderen Methoden sehr niedrig. Mittels IR können sowohl flüssige als auch feste und puderförmige Proben analysiert werden.

Als Nachteile der MS sind der hohe Zeitaufwand bei der Probenvorbereitung und der Analyse, vor allem bei einer Kopplung mit einem chromatographischen Systemen, sowie die destruktive Detektion zu nennen. Bei der NMR liegen die Nachteile bei einer deutlich niedrigeren Anzahl an detektierbaren Metaboliten im Vergleich zur MS und der Schwierigkeit einzelne Metabolitsignale zu isolieren. Der durch Suppressionseffekte bei der Analyse begrenzten Anzahl an detektierbaren Verbindungen kann durch die Kopplung mit chromatographischen Systemen entgegengewirkt werden. Während dies bei der MS ohne größeren apparativen Aufwand durchführbar ist, ist dieser bei der NMR ungleich größer. Und während bei der NMR lediglich wenige hundert Metaboliten detektiert werden können, können bei der LC-MS Kopplung mehr als tausend Metaboliten erfasst werden. Die Nachteile der IR liegen in der fehlenden Identifizierbarkeit von einzelnen Metaboliten und der Notwendigkeit einer Trocknung von Proben mit hohem Wassergehalt.<sup>56, 58</sup>

### 3.3.6 Kakao *Metabolomics* Experimente

Ausgelöst vom hohen Wert der Handelsware Kakao und der damit verbundenen Gefahr von Fälschungen und gezielten Verunreinigungen, wurden bereits viele unterschiedliche *Metabolomics* Experimente für die Probenmatrix Kakao durchgeführt. Neben unterschiedlichen Veröffentlichungen zur geographischen Herkunftsbestimmung von Kakaobohnen, wurden auch Experimente zur Bewertung der Fermentation und Sortendifferenzierung durchgeführt.

Der Fragestellung zur geographischen Herkunftsbestimmung wurde bereits mit allen in Abschnitt 3.3.5 vorgestellten analytischen Plattformen begegnet.<sup>86, 111, 112</sup> Weiterhin wurde ein *Metabolomics* Experiment für den Nachweis von resistenten Kakaobaumsorten auf Basis der NMR durchgeführt, um die Kakaobohnenerzeuger in Brasilien gezielt vor Krankheitserregern wie *Moniliophthora perniciosa* (Erreger der „Hexenbesen-Krankheit“) zu schützen.<sup>113, 114</sup> Auch die biochemischen Abläufe der Fermentation wurden bereits mit Hilfe eines *non-targeted* Ansatzes näher analysiert.<sup>115</sup>

### 3.4 Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie

#### 3.4.1 Flüssigkeitschromatographie

##### 3.4.1.1 Grundlagen der Flüssigkeitschromatographie

Die Flüssigkeitschromatographie basiert, wie alle chromatographischen Systeme, auf Wechselwirkung der Analyten zwischen einer mobilen (flüssigen) und einer stationären Phase. Durch die ausgebildeten Wechselwirkungen zwischen den Analyten und den beiden Phasen resultiert eine Trennung von Stoffgemischen.<sup>116</sup> Die stoffspezifische Retardierung eines chromatographischen Systems kann durch den Verteilungskoeffizienten beschrieben werden. Der Verteilungskoeffizient ist als der Quotient aus der Konzentration des Analyten in der mobilen und in der stationären Phase definiert. Er resultiert aus der Oberflächenbeschaffenheit der stationären Phase und den chemophysikalischen Eigenschaften des Analyten. Ein Maß zur Bewertung der Trennleistung eines chromatographischen Systems stellt die VAN-DEEMTER-Gleichung dar.<sup>117</sup> Hierbei wird die stationäre Phase in Trennböden unterteilt, in welchen sich jeweils ein Gleichgewichtszustand der Analytkonzentration zwischen der mobilen und stationären Phase einstellt. Je mehr Trennböden eine stationäre Phase stoffspezifisch ausbilden kann, umso häufiger kann sich der Gleichgewichtszustand einstellen und desto größer ist die Trennleistung des chromatographischen Systems. Die Gleichung ist definiert als Funktion aus der Fließgeschwindigkeit unter Berücksichtigung der EDDY-Diffusion, Longitudinaldiffusion und dem Term des Massentransfers, welche jeweils zu einer Peakverbreiterung und somit zu einer Reduktion der chromatographischen Auflösung beitragen. Mit Hilfe der VAN-DEEMTER-Gleichung lässt sich für jedes chromatographische System die theoretisch optimale Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase berechnen.

Nach 1965 wurde die klassische Flüssigchromatographie durch die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC, engl. *high performance liquid chromatography*) ersetzt. Hier werden kürzere Säulen mit Säulenmaterialien mit einer Partikelgröße im unteren  $\mu\text{m}$ -Bereich verwendet, wobei der Laufmittelfluss durch leistungsfähige Pumpen auch bei höherem Rückdruck von bis zu

400 bar aufrechterhalten werden kann. In Abbildung 7 ist eine schematische Darstellung einer HPLC-Apparatur dargestellt.

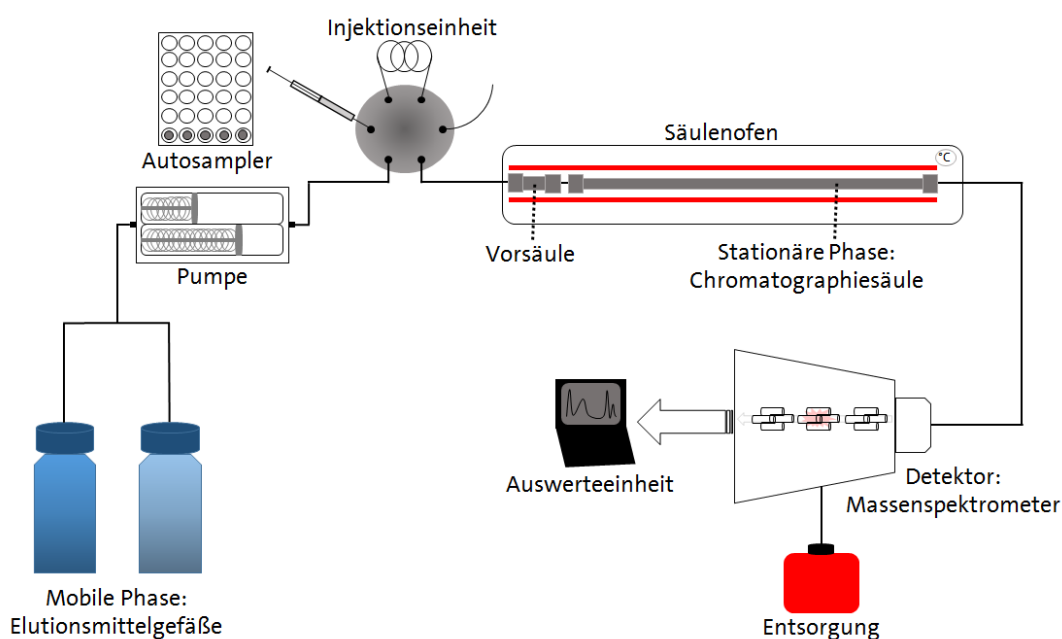


Abbildung 7: Schematische Darstellung einer HPLC mit MS-Detektor.

Die mobile Phase wird aus den Elutionsmittelgefäßen durch Kurzhub-Doppelkolbenpumpen über die Injektionseinheit zur stationären Phase gefördert. Durch eine gezielte Steuerung der Pumpe kann die Elutionsmittelzusammensetzung variiert werden. Die Veränderung der Zusammensetzung während einer Analyse wird als Gradientenelution bezeichnet.<sup>116</sup> Wird über den gesamten Zeitraum mit einer unveränderten Zusammensetzung gearbeitet, wird von einer isokratischen Elution gesprochen. Bevor das Elutionsmittel die Pumpe erreicht, findet eine Entgasung des Elutionsmittels an teilporösen Teflonschläuchen im Vakuum statt. Durch das Austreiben der enthaltenen Gase wird ein konstanter Elutionsmittelfluss gewährleistet. Die Injektion der Probenlösung erfolgt über ein Mehr-Wege-Ventil direkt in den Hochdruckbereich des Systems. Durch das Ventil werden Druckschwankungen im System verhindert. Zum Schutz vor Verschmutzungen ist der Chromatographiesäule eine Vorsäule vorgeschaltet, die aus der gleichen stationären Phase besteht, jedoch deutlich kürzer ist und bei irreversibler Verschmutzung leicht ersetzt werden kann. Die gängigen Dimensionen einer Trennsäule belaufen sich auf eine Länge von 5 cm bis 30 cm und einen Durchmesser von bis zu 5 mm. Die Partikelgröße der stationären Phase kann zwischen 10  $\mu\text{m}$  bis unter 2  $\mu\text{m}$  liegen.<sup>118</sup> Nach der Trennung von Substanzgemischen

in der Trennsäule erfolgt die Detektion der Analyten. Für die Detektion können universelle Detektoren wie der Brechungsindex- und massenspektrometrische-Detektor oder selektive Detektoren wie der UV/VIS-, Fluoreszenz- oder elektrochemische Detektor verwendet werden.<sup>119</sup>

Durch die stetige Weiterentwicklung von immer kleineren Partikelgrößen und leistungsfähigeren Pumpen werden heute Systeme kommerziell angeboten, die bei einem Druck von bis zu 1500 bar arbeiten können.<sup>120</sup> Diese Systeme werden auch als Ultrahochleistungs-Flüssigchromatographie (UPLC, engl. *ultra performance liquid chromatography*) bezeichnet.<sup>121</sup> Neben der Entwicklung von Partikeln immer kleinerer Größe werden vermehrt teilporöse Partikel verwendet, um den Gegendruck, aber auch die Diffusionswege bei der chromatographischen Trennung zu reduzieren. Bei diesen Partikeln wird die stationäre Phase auf einen inerten, unporösen Kern aufgebracht.<sup>122, 123</sup>

### 3.4.1.2 Umkehrphasenchromatographie

Die Umkehrphasenchromatographie (RP, engl. *reversed phase*) findet aufgrund ihrer hohen Diversität und dem daraus resultierenden breiten Anwendungsspektrum vielfach Anwendung in der Flüssigkeitschromatographie.<sup>124</sup> Bei der RP wird mit einer unpolaren stationären Phase und polaren mobilen Phase gearbeitet. Als stationäre Phase werden modifizierte Silicagele verwendet, die eine lipophile Oberfläche aufweisen. Abhängig vom vorliegenden Trennproblem werden für die Modifizierung unterschiedlich lange Kohlenwasserstoffketten eingesetzt, wobei meistens unverzweigte C<sub>18</sub>- oder C<sub>8</sub>-Alkylreste verwendet werden.<sup>125</sup> Aus sterischen Gründen können nicht alle Silanolgruppen des Silicagels derivatisiert werden, weshalb ein „endcapping“ durchgeführt werden kann, bei dem die freien Silanolgruppen mit dem sterisch anspruchsloseren Trimethylchlorsilan umgesetzt werden.

Die Umkehrphasenchromatographie zeichnet sich durch das Potential unpolare bis mittelpolare Substanzgemische auftrennen zu können aus. Als Elutionsmittel werden wässrige Systeme mit einem Anteil an polaren organischen Lösungsmitteln wie Methanol oder Acetonitril verwendet.<sup>116</sup> Die Trennleistung basiert vorwiegend auf dem Verteilungsgleichgewicht der Analyten zwischen der mobilen und der stationären Phase, wohingegen die Ausbildung von VAN-DER-WAALS-Kräften und die daraus resultierende Adsorption der Analyten durch die stationäre Phase eine untergeordnete Rolle einnimmt.

### 3.4.1.3 Wässrige Normalphasenchromatographie

Die wässrige Normalphasenchromatographie (ANP, engl. *aqueous normal-phase*) wurde erst zu Beginn der neunziger Jahre entwickelt und stellt eine Alternative zur klassischen Normalphasenchromatographie und der *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC) dar.<sup>126, 127</sup> Bei diesen Verfahren der herkömmlichen Normalphasenchromatographie werden eine polare stationäre Phase aus Silicagel und unpolare mobile Phasen, wie Hexan oder Petrolether, zur Trennung von polaren Substanzgemischen verwendet. Diese verwendeten Elutionsmittel sind jedoch nicht kompatibel mit einem massenselektiven Detektor.

Bei der ANP wird die Kiesegeloberfläche der stationären Phase durch das Einbringen von Hydrid-Gruppen und vereinzelt langkettigen Alkylresten modifiziert. Durch die Modifizierung der stationären Phase wird der polare Charakter der stationären Phase reduziert, aber soweit beibehalten, sodass polare Substanzgemische an dieser stationären Phase getrennt werden. Weiterhin ist der Einsatz von wässrigen Elutionsmitteln analog zur RP aufgrund der Derivatisierung möglich und somit auch die Kopplung mit einem massenspektrometrischen System.<sup>128, 129</sup> Aufgrund der eingebrachten Kohlenwasserstoffketten können durch die stationäre Phase nicht nur polare, sondern auch unpolare Wechselwirkungen ausgebildet und somit Verbindungen des gesamten Polaritätsspektrums retardiert werden.<sup>130, 131</sup>

### 3.4.1.4 Optimierung eines flüssigchromatographischen Systems

Die Optimierung eines flüssigchromatographischen Systems umfasst neben der Auswahl der stationären und mobilen Phase auch die Einstellungen des Gradienten, Fließgeschwindigkeit, Temperatur des Säulenofens und das Injektionsvolumen.<sup>132</sup> Ziel der Optimierung ist eine möglichst kurze Analysendauer bei maximaler Trennleistung. Die Optimierung der LC ist weiterhin abhängig von dem verwendeten Detektor und der Fragestellung. Bei der Verwendung eines massenselektiven Detektors ist eine Basislinientrennung von Verbindungen mit unterschiedlichen Molekülmassen für eine quantitative Auswertung nicht nötig, während dies bei der Verwendung eines UV/VIS-Detektors essentiell wäre.

Während das Ziel der LC-Optimierung einer *targeted* Analyse mit einer möglichst guten Trennung der ausgewählten Analyten klar definiert ist, stellt sich die Zielsetzung einer LC-Optimierung bei einer *non-targeted* Analyse als schwieriger heraus. Als übergeordnetes Ziel kann die Trennung möglichst aller detektierbarer Verbindungen bei einer *non-targeted* Analyse definiert werden. Durch die getrennte Analyse aller Verbindungen werden Suppressionseffekte minimiert

und somit höhere Signalintensitäten detektiert. Eine kurze Analysendauer bewirkt einen höheren Probendurchsatz und reduziert somit die Kosten der Analyse. Da jedoch eine angestrebte Trennung aller Verbindungen die Analysedauer einer Probe drastisch erhöhen würde, gilt es, eine möglichst kurze Analysendauer gegen eine möglichst gute chromatographische Auflösung des Systems abzuwägen und einen Kompromiss zwischen beiden Zielsetzungen einzugehen.

### 3.4.2 Massenspektrometrie

#### 3.4.2.1 Grundlagen der Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie basiert auf der massenabhängigen Beschleunigung von Ionen im elektrischen Feld. Hierfür werden die zu analysierenden Substanzen zunächst durch verschiedene Ionisierungsverfahren in einen geladenen Zustand und in die Gasphase überführt. Diese flüchtigen Ionen lassen sich durch das Anlegen eines elektrischen Feldes in ihrer Geschwindigkeit und Position beeinflussen. Die Ausprägung der Beeinflussung durch das elektrische Feld hängt zum einen von der Wertigkeit der Ladung und zum anderen von der Masse der Ionen ab, dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (engl. *mass-to-charge-ratio*,  $m/z$ ).<sup>116</sup> Ein Massenspektrometer setzt sich aus einer Ionenquelle, einem oder mehreren Analysatoren und einem Detektor zusammen.<sup>133</sup>

#### 3.4.2.2 Elektrospray Ionisation (ESI)

Die ESI stellt heute die bedeutendste Ionisationstechnik bei Atmosphärendruck (API, engl. *atmospheric pressure ionization*) für chemische und biochemische Analysen dar und ermöglicht es, ein flüssigchromatographisches System mit einem MS zu koppeln.<sup>134</sup> Bei der ESI werden die Analyten unter Atmosphärendruck ionisiert und erst anschließend in ein Hochvakuum überführt, um dort analysiert zu werden. Die Kopplung einer Atmosphärendruck-Ionisationstechnik mit einem Massenanalysator ist mit einem hohen Druckunterschied zwischen der Ionisationseinheit unter Atmosphärendruck (ca. 101 kPa) und dem Analysator unter Hochvakuum (ca. 1,33 mPa) verbunden. Dieser Druckunterschied wird mit Hilfe von zwei Druckübergängen, in denen das Hochvakuum schrittweise aufgebaut wird, überwunden. Die Übergänge sind durch ionenoptische Linsen voneinander getrennt, sodass das Hochvakuum schrittweise aufgebaut werden kann.<sup>135</sup>

Bei der ESI wird die mobile Phase der LC mit Hilfe einer Kapillare (*sprayer needle/capillary*) in das elektrische Feld der Ionisationsquelle versprüht. Die Kapillare stellt eine Elektrode dar, wodurch die Analyten in der mobilen Phase bereits beim Versprühen in die Quelle ionisiert werden. Zur Ionisierung der Analyten wird ein Gleichspannungsfeld an der Elektrode von 3-6 kV angelegt. Die entstandenen Ionen werden zur zylindrischen Gegenelektrode beschleunigt (siehe Abbildung 8).

Abhängig vom Ionenmodus können sowohl die Kapillare als auch die zylindrische Elektrode als Kathode oder Anode fungieren.<sup>116</sup> Im negativen Ionenmodus werden Anionen gebildet und im positiven Modus Kationen. Die Ionisierung der Moleküle erfolgt je nach Ionenmodus vorwiegend durch Protonierung  $[M+nH]^{n+}$  oder Deprotonierung  $[M-nH]^{n-}$  von funktionellen Gruppen innerhalb der Analyten. Die entstandenen Ionen werden als Pseudo-Molekülionen bezeichnet. Neben den Protonierungsreaktionen kann es bei der Ionisierung auch zur Bildung von unterschiedlichen Addukten kommen. Aufgrund des ubiquitären Vorhandenseins von Natrium- und Kaliumionen werden im positiven Ionenmodus beispielweise  $[M+nNa]^{n+}$  oder  $[M+nK]^{n+}$  gebildet. Der Einsatz von Laufmitteladditiven wie Ammoniumformiat (AF) oder -acetat (AAC) kann ebenfalls die Ionisierung beeinflussen und die Entstehung von Ammonium-Addukten  $[M+nNH_4]^{n+}$  bewirken.<sup>136</sup> In Abbildung 8 ist eine schematische Darstellung von einer ESI-Quelle im negativen Ionenmodus dargestellt.

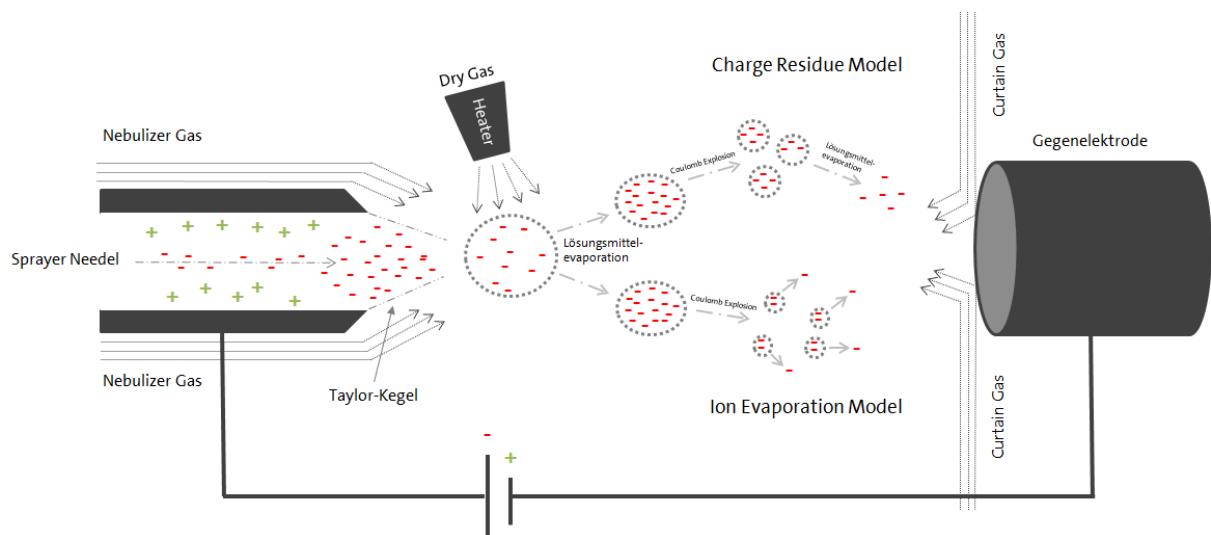


Abbildung 8: Schematische Darstellung einer ESI-Quelle im negativen Ionenmodus.

Bei der Kopplung eines flüssigchromatographischen Systems mit einem Massenspektrometer muss die mobile Phase vor der Analyse abgetrennt werden, damit die Ionen in der Gasphase analysiert werden können. Die Abtrennung der mobilen Phase erfolgt in der ESI durch das Versprühen der Lösung an der Kapillare. Beim Austritt der Analytlösung aus der Kapillare bildet sich ein sogenannter Taylor Kegel (engl. *taylor cone*). An der Spitze dieses Kegels lösen sich einzelne Tröpfchen ab, die einen Durchmesser von etwa 1,5  $\mu\text{m}$  aufweisen und ca. 50.000 Ladungen enthalten. Aus den gebildeten Tröpfchen und dem eingeleiteten Zerstäubungsgas (engl. *nebulizer gas*) entsteht ein Aerosol.<sup>137</sup> Die Evaporation des Lösungsmittel in den Tropfen wird durch das Einleiten eines Trocknungsgases (*heater gas* o. *dry gas*) in die Quelle beschleunigt, sodass sich die Ladungsdichte innerhalb der Tropfen erhöht.<sup>138</sup> Als Trocknungsgas wird für gewöhnlich Stickstoff

mit Temperaturen von bis zu 600 °C eingesetzt.<sup>133</sup> Wird durch die Evaporation des Lösungsmittels das RAYLEIGH-Limit erreicht, welches als die maximale Anzahl gleichnamiger Ladungen in einem Flüssigkeitstropfen definiert ist, kommt es durch die Abstoßungskräfte zu einer schlagartigen Entladung in Form einer Explosion, wobei eine Vielzahl neuer Tropfen mit deutlich geringem Durchmesser entstehen. Dieser Vorgang wird als COULOMB-Explosion bezeichnet.<sup>139</sup> Der Übergang der Ionen in die Gasphase ist heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Es werden zwei unterschiedliche Modelle als Erklärung für den Übergang diskutiert: Bei dem *Ion Evaporation Model* (IEM) diffundieren die Ionen nach einer Coulomb Explosion direkt in die Gasphase, während das *Charge Residue Model* (CRM) davon ausgeht, dass die Ionen in die Gasphase durch eine vollständige Entfernung der Lösungsmittel übergehen.<sup>140,141</sup> Sowohl für die CRM-Theorie als auch für das IEM-Modell sind experimentelle Befunde vorhanden, die für die jeweilige Theorie sprechen, sodass noch beide Modelle parallel bestehen.<sup>142</sup>

Die ESI kann sowohl für kleine als auch für sehr große Moleküle in einem breiten Polaritätsspektrum eingesetzt werden, weshalb diese Technik sowohl bei *Proteomics*- als auch für *Metabolomics*-Experimenten eingesetzt wird.<sup>143</sup>

### 3.4.2.3 Massenanalysatoren

In der Ionenquelle werden die Ionen gebildet und gehen in die Gasphase über. Die gebildeten Ionen werden durch ein elektrisches Feld in das Hochvakuum des Massenanalysators des Massenspektrometers weitergeleitet, um nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis getrennt zu werden. Für die Analyse der Ionen werden unterschiedliche Massenanalysatoren eingesetzt, die auf Grundlage von verschiedenen Mechanismen wirken.<sup>144</sup> Im Zuge dieser Arbeit wurde mit einem *Triple-Quadrupol*(QqQ)- und einem *Quadrupol-Time-of-Flight*(QToF)-Analytator gearbeitet. Hierbei handelt es sich um „Tandem in Space“-Analytoren, die sich aus mehreren, unterschiedlichen oder auch gleichen, Massenanalysatoren zusammensetzen. Die Mechanismen der verwendeten Massenanalysatoren sind in den Abschnitten 3.4.2.3.1 und 3.4.2.3.2 beschrieben.

#### 3.4.2.3.1 Tripl- Quadrupol Massenspektrometer

*Triple-Quadrupol*-Massenspektrometer zählen zu den verbreitetsten Applikationen im Bereich der Massenspektrometrie. Sowohl in der Forschung als auch in der Routine-Analytik werden QqQ für unterschiedliche Anwendungen, aber hauptsächlich zur Quantifizierung von Analyten verwendet.<sup>145</sup> Auch im *Metabolomics*-Bereich gilt die *Triple-Quadrupol*-Massenspektrometrie als etabliertes Verfahren für *targeted* Ansätze.<sup>146</sup>



Ein Quadrupol besteht aus vier achsenparallelen Stabelektroden. Die jeweils gegenüberliegenden Metallstäbe werden an eine entgegengesetzt gepolte variable Gleichspannungsquelle angeschlossen, welche zusätzlich von einem hochfrequenten Wechselfeld überlagert wird. So erhalten die gegenüberliegenden Elektroden jeweils die gleiche Polarität. In dem so entstehenden elektrischen Feld werden nur Ionen mit einem bestimmten zuvor definierten  $m/z$ -Verhältnis auf einer stabilen Flugbahn durch die Mittelachse zwischen den Elektroden geleitet, um anschließend detektiert zu werden.<sup>147</sup> Die Flugbahn von Ionen mit einem anderen  $m/z$ -Verhältnis ist instabil, sodass die Ionen mit den Stabelektroden kollidieren, sich entladen und so aus dem System entfernt werden. Neben der Möglichkeit gezielt einzelne  $m/z$ -Verhältnisse zu detektieren, können Quadrupole auch als ionenführendes Element (*quadrupol ion guide*) verwendet werden, wie es auch im *scan*-Modus der Fall ist. Die Gleichspannung des Quadrupolfelds wird hier gleich null gesetzt. Dieser Zustand wird auch als Radiofrequenz Quadrupol bezeichnet (*RF-only*).<sup>148</sup>

Bei einem QqQ werden die Ionen über mehrere ionenoptische Linsen aus dem Atmosphärendruckbereich der Ionenquelle in das Massenspektrometer geleitet. Beim Passieren der Linsen findet eine weitere Fokussierung des Ionenstrahls statt. Angeschlossen an die Ionenfokussierung findet im ersten Quadrupol (Q1) die erste massenselektive Trennung der eingefallenen Precursor-Ionen statt. Sofern eine Fragmentierung vorgesehen ist, findet diese im zweiten Quadrupol (q2) statt. Als Reaktandgas für die Fragmentierung wird meistens Stickstoff verwendet. Die gezielte Fragmentierung im zweiten Quadrupol wird als *collision induced dissociation* (CID) bezeichnet. Durch das Einleiten des Stickstoffs ist der Druck im q2 mit 0,13 PA deutlich höher als im Q1 und Q3. Die Fragmentierungsstärke kann maßgeblich durch die angelegte Spannung, aber auch durch den Gasfluss des Reaktandgases gesteuert werden. Die entstandenen Produkt-Ionen werden im Q3, der ebenfalls eine massenselektive Trennung vornimmt, analysiert.<sup>137</sup> Die schematische Darstellung eines QqQ-Massenspektrometers sowie des Detektionsablaufs sind in der Abbildung 9 dargestellt.

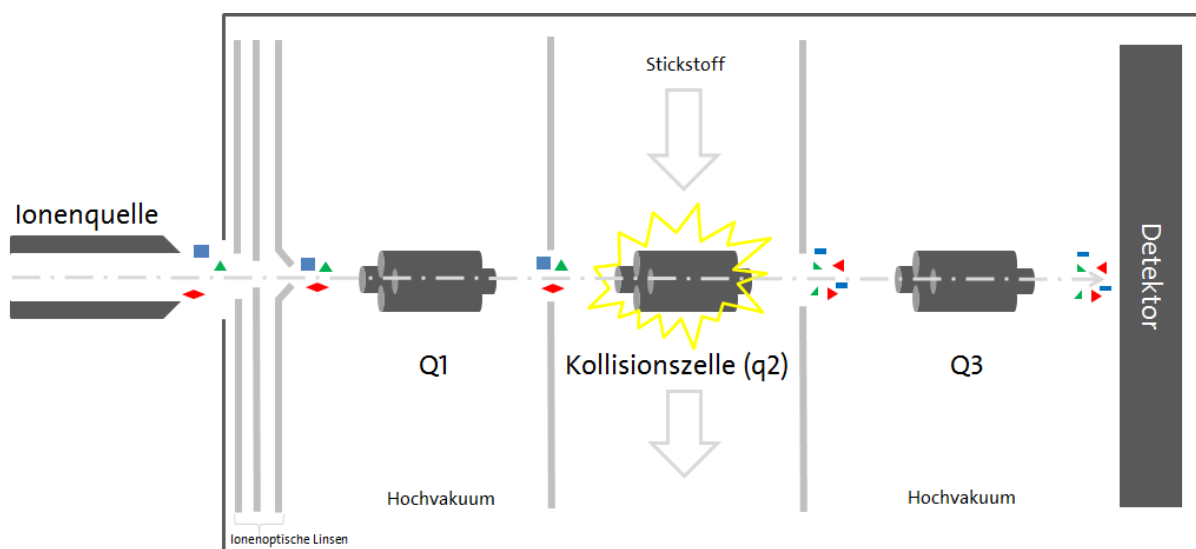


Abbildung 9: Schematische Darstellung eines *Triple-Quadrupol*-Massenspektrometers.

Die Fragmentierung des Precursor-Ions findet häufig nicht quantitativ statt, sodass neben den Produktionen auch ein Anteil des Precursor-Ions im Q3 detektiert werden kann. Im Gegensatz zu den „Tandem in Time“ Massenspektrometern mit lediglich zeitlich getrennter Analyse und Fragmentierung im gleichen Massenanalysator, findet bei den „Tandem in Space“ Massenspektrometern jeder Analyseschritt in einem räumlich abgetrennten Massenanalysator statt.<sup>149</sup> Die Aneinanderreihung von mehreren Masseanalysatoren mit zwischenzeitlicher Fragmentierung wird auch als MS/MS, bei zweifacher Analyse und MS<sup>n</sup> bei mehrfacher Analyse bezeichnet. MS<sup>n</sup> Versuche werden meist nur bei „Tandem in Time“ Applikationen durchgeführt.

Als Detektoren wird neben dem meist verwendeten Sekundärelektronenvervielfacher auch der Faraday-Becher eingesetzt. Bei einem Sekundärelektronenvervielfacher treffen die zu analysierenden Ionen auf eine Dynode, wo durch den Aufprall Elektronen herausgeschlagen werden. Die gebildeten Elektronen sind mengenmäßig proportional zu den aufgetroffenen Ionen, werden zu einer weiteren Dynode beschleunigt und lösen hier ebenfalls weitere Elektronen heraus. Durch Wiederholungen dieses Vorgangs entsteht eine Elektronenkaskade und dadurch ein messbares elektronisches Signal, welches proportional zu der aufgetroffenen Ionenkonzentration ist.<sup>116</sup> Bei dem Faraday-Becher treffen die erzeugten Ionen auf eine Oberfläche mit konstantem Potential. Durch den Aufprall der Ionen kommt es zu einem Ab- oder Zufluss von Elektronen über einen Widerstand. Die erzeugten Spannungsschwankungen sind proportional zu der eintreffenden Ionenkonzentration an der Oberfläche des Detektors.<sup>133</sup>

Der Einsatz eines Tandem-Massenspektrometers ermöglicht die Anwendung unterschiedlicher Analysetechniken. Neben der Aufnahme von Produkt-Ionen-Spektren können durch Inaktivierung der Kollisionszelle auch Precursor-Ionen-Scans aufgenommen werden. Die *multiple reaction monitoring* Technik (MRM) ist ein etabliertes Verfahren zur Quantifizierung von unterschiedlichen Substanzen. Vor der Analyse werden die spezifischen  $m/z$ -Verhältnisse der Analyten und auch der daraus entstehenden Produkt-Ionen in der Software implementiert. Durch dieses Verfahren können anschließend die Verbindungen mit einer erhöhten Sensitivität und Selektivität detektiert werden.<sup>150</sup>

Die Vorteile einer *Triple-Quadrupol*-Applikation liegen in der hohen Sensitivität, Selektivität und einem großen linearen Arbeitsbereich.<sup>151</sup> Weiterhin können mit QqQ Verbindungen mit sehr geringem Molekulargewicht analysiert werden und zeigen eine geringe Störanfälligkeit und robuste Handhabung. Durch die robuste Arbeitsweise des Systems ist es möglich, reproduzierbare Ergebnisse zu generieren und Datenbanken mit Vergleichsspektren aufzubauen. Eine stärkere Limitierung zeigt diese Applikation jedoch im höheren Massenbereich (bis zu 4000  $m/z$ ) und in einer deutlich geringeren Auflösung im Vergleich zu anderen Tandem Massenspektrometern.<sup>152</sup> Die *targeted* Methode in der vorliegenden Arbeit wurde basierend auf einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer entwickelt, da sowohl die Limitierung des höheren Massenbereichs als auch die geringe Auflösung der Applikation für die Anwendung keine Rolle spielt. Durch die Verwendung des MRM-Modus konnten die Analyten trotz der geringen Auflösung mit einer sehr hohen Selektivität nachgewiesen werden.

#### 3.4.2.3.2 *Quadrupol-Time-of-Flight* Massenspektrometer

Die Funktionsweise eines *Time-of-Flight* Massenanalysators beruht auf der Messung der Zeit, welche ein Ion benötigt, um eine bestimmte Strecke in einem feldfreien Raum zurückzulegen. Hierfür werden Ionenpakete mit einem bekannten und konstanten Potential beschleunigt. Die elektrische Energie entspricht hier der kinetischen Energie.

Ein Ion mit der Masse ( $m$ ) und der Ladung ( $q$ ) wird durch ein elektrisches Feld der Spannung ( $U$ ) beschleunigt, sodass durch die Beschleunigung die elektrische Energie ( $E_e$ ) der kinetischen Energie ( $E_k$ ) entspricht. Die Ladung des Ions kann weiterhin durch die Ladungszahl ( $z$ ) und die elektrische Elementarladung ( $e$ ) substituiert werden. Diese Zusammenhänge sind in Gleichung 1 dargestellt.

$$E_k = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 = q \cdot U = z \cdot e \cdot U = E_e \quad 1$$

Beim Umstellen der Gleichung 1 nach  $m/z$  wird Gleichung 2 erhalten.

$$\frac{m}{z} = 2 \cdot e \cdot \frac{U}{v^2} \quad 2$$

Die Geschwindigkeit ( $v$ ) lässt sich durch den Quotienten der Drift-Zeit ( $t$ ) und der Länge der Driftstrecke ( $L$ ) beschreiben, sodass Gleichung 3 erhalten wird.

$$\frac{m}{z} = t^2 \cdot \left( 2 \cdot e \cdot \frac{U}{L^2} \right) \quad 3$$

Nach der Gleichung 3 kann das  $m/z$  eines Ions durch die analysierte Drift-Zeit berechnet werden, da alle in der Klammer beschriebenen Variablen konstant sind.<sup>153</sup>

Ionen einer größeren Masse erfahren eine geringere Beschleunigung als Ionen einer kleineren Masse (vgl. Gleichung 1). Die abweichende Beschleunigung resultiert anschließend in unterschiedlich langen Flugzeiten der Ionen. Im Flugrohr herrscht Hochvakuum, sodass die Flugzeit und -bahn der Ionen nicht beeinflusst wird.

Durch ein Reflekttron kann die Drift-Strecke, welche die Ionen vor der Detektion zurücklegen, verlängert werden. Im Reflekttron ist eine Hochspannung angelegt, welche die eintretenden Ionen abbremst und in die entgegengesetzte Richtung beschleunigt. Die Verlängerung der Drift-Strecke steigert die Massenauflösung des Systems und kann entweder durch eine Verlängerung des Flugrohrs oder durch Verwendung eines Reflektrons erreicht werden.<sup>133</sup>

Die in der Ionenquelle erzeugten Ionen werden, je nach Bauart und Hersteller, durch mehrere Ionenrichter und einen Hexapol (oder andere Multipole) fokussiert, um sie anschließend zu analysieren. Hexa- oder Octapole gelten als Weiterentwicklung der Quadrupole, die eine analoge Arbeitsweise zeigen und aus jeweils sechs oder acht Stabelektroden aufgebaut sind. Bewegt sich ein Ion abweichend von der Mittelachse zu einem Pol der entgegengesetzten Ladung, steigt das elektrische Potential. Das elektrische Potential  $U$  in Abhängigkeit von der Distanz  $r$  zur zentralen Achse ändert sich je nach Art des Multipols unterschiedlich stark. Der Quotient  $dU/dr$  nimmt bei kleinen  $r$  umso schneller zu, je weniger Pole den Multipol bilden. Das Potentialfeld eines Quadrupols nimmt demnach ausgehend von der Mittelachse schneller zu als bei einem Hexapol. Aufgrund des stärkeren Potentialgradienten sind Quadrupole den Multipolen, in der Fähigkeit selektiv Ionen auf einer stabilen Kreisbahn zu leiten, überlegen. In Hinsicht einer Vorfokussierung eines Ionenstrahls oder des Ionentransportes wirkt sich der kleinere Potentialgradient der

Multipole positiv auf die Leistungsfähigkeit aus, sodass hier die Multipole dem Quadrupol im Leistungsvermögen überlegen sind. Demnach werden Quadrupole vermehrt als massenselektive Bauteile und Multipole zum Transport und zur Fokussierung von Ionen verwendet.<sup>133</sup>

In Abbildung 10 ist eine schematische Darstellung eines QToF-Massenspektrometers dargestellt. Die fokussierten Ionen werden im ersten Quadrupol (Q1) analysiert und nach ihrem  $m/z$ -Verhältnis getrennt. Je nach Arbeitsweise gelangen die isolierten Ionen in die Kollisionszelle, die eine analoge Funktionsweise wie der q2 in Abschnitt 3.4.2.3.1 zeigt. Durch den Einsatz der Kollisionskammer besteht die Möglichkeit, MS/MS-Experimente durchzuführen. Die entstandenen Fragmente werden im *Ion-Cooler*, der meist ein Multipol ist, gebündelt und als Ionenpakete an den ToF-Analysator transferiert. Beim Übergang vom *Ion-Cooler* zum orthogonalen Beschleuniger im ToF-Analysator erfahren die Ionen einen Richtungswechsel. Durch die rechtwinklige Anordnung des ToF zum *Ion-Cooler* können longitudinale Diffusionseffekte unterbunden und die Auflösung verbessert werden. Die Ionenpakete werden im ToF beschleunigt, ggf. reflektiert und anschließend die Zeit und Ionenkonzentration detektiert. Als Detektor kommen ebenfalls Sekundärelektronenvervielfacher und Faraday-Becher, deren Funktionsweise bereits in Abschnitt 3.4.2.3.1 beschrieben wurde, zum Einsatz.

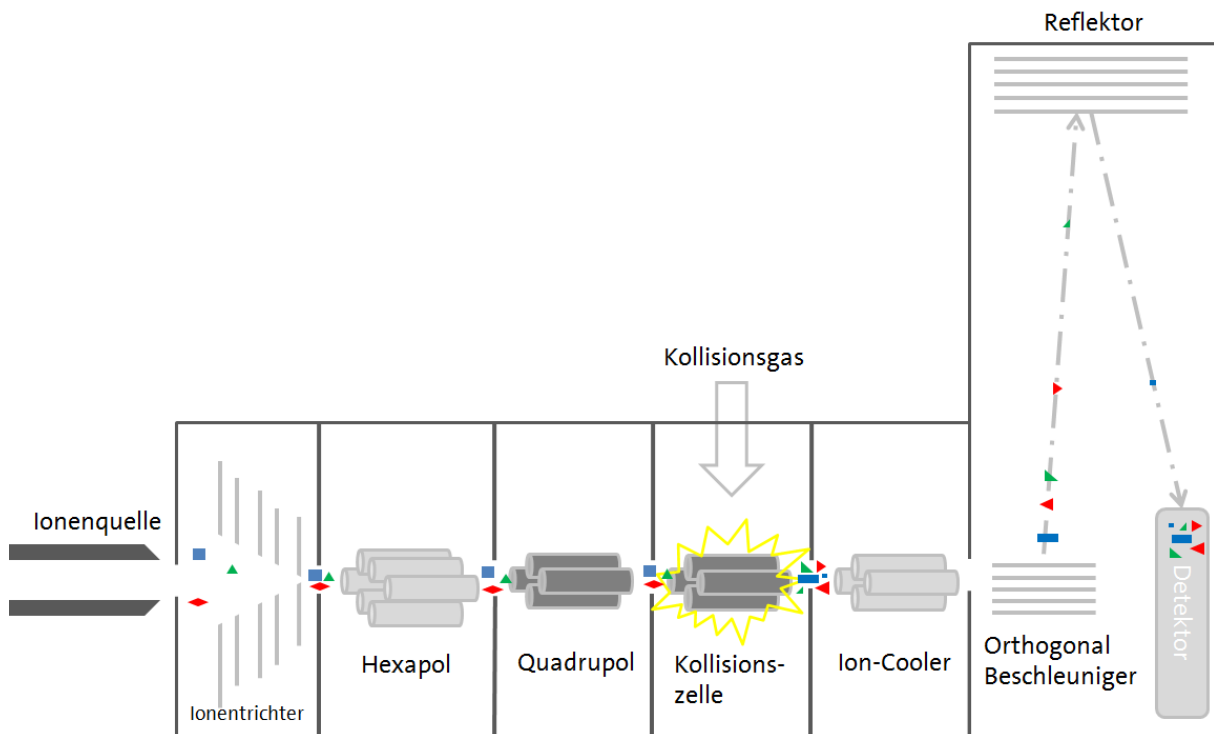


Abbildung 10: Schematische Darstellung eines QToF-Massenspektrometers.

Das Hybridsystem eines Quadrupol-Time-of-Flight-Massenanalysators wird hauptsächlich aufgrund der sehr hohen Massengenauigkeit von bis zu 1-2 ppm, der schnellen Scanzeit im ms-Bereich und dem theoretisch nach oben unbegrenztem Massenbereich verwendet.<sup>153, 154</sup> Aufgrund dieser Eigenschaften eignet sich die Applikation besonders für *non-targeted* Ansätze, da mit Hilfe der Informationen aus der hohen Massengenauigkeit und dem detektierten Isotopenmuster die wahrscheinlichste Summenformel berechnet werden kann und durch die Aufnahme von Produkt-Ionen auch Informationen auf die Struktur der Verbindung gewonnen werden können.

Als negative Attribute sind der sehr hohe Anschaffungspreis und ein hoher Kalibrierungsaufwand aufgrund der Sensibilität gegenüber Umwelteinflüssen, wie der Temperatur oder dem Luftdruck, zu nennen.

### 3.5 LC-MS Kopplungen

Die Kopplung der Massenspektrometrie mit einem chromatographischen Verfahren wird zur Analyse von komplexen Stoffgemischen genutzt und stellt heute die Methode der Wahl für den quantitativen Nachweis von Metaboliten oder Arzneimitteln dar.<sup>155</sup> Bei der Analyse eines komplexen Stoffgemisches via Direkteinlass in das Massenspektrometer kommt es zu starken Suppressionseffekten und dadurch zu einem Verlust von Signalen und Signalintensitäten.<sup>156</sup> Konkurrierende Einflüsse der Probenmatrix und des Lösungsmittels haben einen Einfluss auf die Ionisation der Analyten in der Ionenquelle, sodass die Signalintensität reduziert wird oder Verbindungen nicht mehr nachgewiesen werden können. Quantitative Messungen werden dadurch teilweise erheblich beeinträchtigt. Durch den Einsatz eines chromatographischen Systems wird das Stoffgemisch vor der Analyse aufgetrennt, sodass im optimalen Fall die Analyten getrennt voneinander in die Ionenquelle des Massenspektrometers gelangen und dadurch die Suppressioneffekte reduziert werden.<sup>157</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde die Trennung anhand unterschiedlicher flüssigchromatographischer Systeme durchgeführt. Weiterhin wird durch die Kopplung ein weiteres qualitatives Merkmal in Form der Retentionszeit gewonnen, was die Identifizierung unbekannter Verbindungen erleichtern kann.

Neben den herausgestellten Vorteilen stellt die Abtrennung der mobilen Phase und die damit verbundene Überführung der Ionen in die Gasphase eine technische Herausforderung dar. Das zuvor beschriebene Ionisationsverfahren, ESI, ist darauf ausgelegt, dass Laufmittel zu entfernen. Bei einer Überschreitung der Flussrate von ca. 0,6 mL/min kann das Lösungsmittel der mobilen

Phase nicht mehr vollständig entfernt werden, sodass es zu nicht reproduzierbaren Intensitätsverlusten kommen kann. Bei höheren Flussraten wird daher ein *post-column-splitting* durchgeführt. Hierbei wird im Anschluss an die chromatographische Trennung ein konstanter Teil der mobilen Phase abgetrennt und nicht zum Massenspektrometer weitergeleitet, sodass nur noch ein kleiner, repräsentativer Anteil des Eluats in die Ionenquelle geleitet wird.<sup>158</sup> Gangl et al. konnten zeigen, dass bei der Verwendung eines *split* kein negativer Einfluss auf die Sensitivität der Analyse besteht, obwohl weniger Ionen für die Detektion vorlagen.<sup>159</sup> Dies wird durch Reduzierung lösungsmittelbedingter Suppressionseffekte erklärt.

Bei der Kopplung der Massenspektrometrie mit einem chromatographischen Verfahren kann neben der massenselektiven Detektion der Analyten auch ein UV/VIS-Detektor verwendet werden.<sup>160</sup> Durch die Analyse mittels UV/VIS-Detektor können weitere Informationen über die Analyten, wie dem Vorhandensein konjugierter Doppelbindungssysteme, gewonnen werden. Zu beachten ist allerdings, dass die massenselektive Analyse destruktiv ist, weshalb der UV/VIS-Detektor vor dem Massenspektrometer geschaltet werden muss. In vielen HPLC und UPLC Systemen ist bereits standardmäßig ein UV/VIS-Detektor verbaut. Bei den durchgeführten *non-targeted* Analysen wurde sowohl eine Massenspektrometer als auch ein UV/VIS-Detektor verwendet.

### 3.6 Multivariate Datenanalyse

Für die Extraktion von relevanten Informationen aus großen unübersichtlichen Datenmengen werden in der Regel multivariate Datenanalyseverfahren angewandt.<sup>161</sup> Mit Hilfe solcher Analysemethoden können umfangreiche Datenmengen reduziert, die Informationsdichte erhöht, relevante Schlüsselinformationen extrahiert und Informationen, welche zum Beispiel durch das Grundrauschen hervorgerufen werden, eliminiert werden.<sup>161</sup>

Multivariate Datenanalysemodelle verringern mathematisch die Anzahl der Variablen, um die Auswertung der Daten zu erleichtern und die Zusammenhänge in einem zwei- bzw. dreidimensionalen Raum darzustellen. Hierbei wird zwischen nicht supervisierten Analysenmodellen wie beispielsweise der Hauptkomponentenanalyse und supervisierten Modellen wie der *partial least square-diskriminanzanalyse* (PLS-DA) unterschieden.<sup>162</sup> Der Unterschied der beiden Methoden liegt in den im Vorwege der Berechnung definierten Merkmalen. Bei nicht supervisierten Informationen werden im Vorfeld keine Informationen über die analysierten Proben preisgegeben, sodass die Differenzierung der Proben ungerichtet erfolgt. Bei den supervisierten Methoden erfolgt bereits vor der Analyse ein Informationsinput, z.B. in Form von einer Klassifizierung nach bekannter Sorte oder Herkunft.<sup>163</sup> Durch die vorliegenden Informationen kann gerichtet nach Unterschieden zwischen den definierten Probenpopulationen gesucht werden. Im Zuge dieser Arbeit wurden sowohl supervisierte als auch nicht supervisierte Modelle verwendet: Für die Identifizierung der Schlüsselmetaboliten wurden nicht supervisierte Modelle und für die Vorhersage des Kakaoschalengehaltes anhand der zuvor identifizierten Schlüsselmetaboliten wurden supervisierte Modelle eingesetzt.

Die Analyse der Rohdaten von *Metabolomics* Experimenten gliedert sich unabhängig von der Analyseplattform in zwei Teile: die Datenvorbehandlung und die Analyse anhand einer multivariaten Datenanalysetechnik.

#### 3.6.1 Datenvorbehandlung

Eine Datenvorbehandlung wird durchgeführt, um Abweichungen und Unterschiede zwischen den analysierten Proben, die bei der Analyse oder Probenvorbereitung entstehen können, auszugleichen, um die Ergebnisse für eine statistische Auswertung vergleichbar zu machen.<sup>164</sup> Durch den Einsatz eines chromatographischen Systems bei der Analyse kann es zu Abweichungen der Retentionszeiten und durch eine fehlerhafte Kalibrierung des massenspektrometrischen Systems zu Abweichungen bei den detektierten  $m/z$  kommen, die durch eine Datenvorbehandlung



ausgeglichen werden können.<sup>165</sup> Im Folgenden sind einige Beispiele für unterschiedliche Techniken der Datenvorbehandlung aufgeführt, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden.

### *Alignment*

Wird die Probe vor der Analyse anhand eines flüssigchromatographischen Systems getrennt, kann es zu einer zeitlichen Verschiebung der Elution kommen. Bei einem HPLC-System sind vor allem Druckschwankungen, Temperaturunterschiede und die Alterung der stationären Phase für die Veränderung der Retentionszeiten verantwortlich. Aus den beschriebenen Gründen ist die Retentionszeit der Analyten nicht bei allen Messungen, vor allem nicht über einen längeren Zeitraum, gleich definiert und muss vor der statistischen Auswertung korrigiert werden. Dieser Prozess wird als *time alignment* bezeichnet. Als Grenzwert für eine maximal akzeptierte Abweichung kann ein Retentionszeitunterschied von bis zu 0,5 Minuten definiert werden. Schwankungen innerhalb von diesen Grenzen werden durch das *time alignment* angepasst. Neben der Retentionszeit kann auch ein Alignment der detektierten  $m/z$  vorgenommen werden.<sup>166</sup>

### *Feature Finding*

Für die statistische Analyse der Datensätze wird algorithmusbasiert entschieden, ob die detektierten Signale von einem Analyten hervorgerufen wurden oder ob es sich hierbei um eine Kontamination oder um Grundrauschen handelt.<sup>167</sup> Dieser Prozess wird als *feature finding* oder Peakdetektion bezeichnet. Die detektierten *features* setzen sich aus dem  $m/z$ , der Retentionszeit und der Intensität der Ionen zusammen. Anhand von unterschiedlichen Parametern wie dem Signal-Rausch-Verhältnis (S/N, engl. *signal-noise-ratio*) und einer minimalen Anzahl an Spektren, in denen das Feature detektiert werden muss, kann der Algorithmus gerichtet beeinflusst werden.<sup>168</sup>

### *Basislinienkorrektur*

Bedingt durch eine lineare oder nichtlineare Addition im Spektrum, hervorgerufen durch Säulenbluten, Nicht-Linearitäten im Detektor oder Akkumulation von Komponenten, können Rohdaten oft eine Erhöhung der Basislinie zeigen. Diese systematischen Abweichungen von der Basislinie werden nicht durch stoffbezogene Informationen hervorgerufen, können jedoch die Quantifizierung beeinflussen. Die systematischen Abweichungen können durch ein Glätten (engl. *smoothing*) ausgeglichen werden, wobei das Rauschen reduziert wird, während die Intensität der Peaks so groß wie möglich bleibt.<sup>169</sup>

### *Normalisierung*

Eine Normalisierung der Datensätze gleicht systematische Veränderungen im Spektrum aus. Die Unterschiede in den Intensitäten bei zwei analysierten Proben, bei denen die Intensität der Peaks das gleiche Verhältnis zueinander aufweist, aber für jede Probe eine unterschiedliche, maximale Intensität der Peaks vorliegt, werden durch die Normalisierung ausgeglichen. Zu diesen Abweichungen gehört beispielsweise ein unterschiedlicher Wassergehalt. Da durch die Normalisierung das Intensitätsverhältnis der Peaks innerhalb einer Probe nicht verändert wird, verändert sich das Aussehen der Spektren bei einer durchgeführten Normalisierung nicht. Die Normalisierung kann anhand von unterschiedlichen Berechnungen erfolgen. Zu den verbreitetsten Anwendungen zählen die Normalisierung anhand des Mittelwertes oder des Medians. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Normalisierung der Messdaten vor der Berechnung multivariater Datenanalysen durchgeführt, um Abweichungen in den Datensätzen durch die Aufarbeitung und bei der Analyse auszugleichen.<sup>170</sup>

### *Standardisieren (engl. scaling)*

Bei den meisten Verfahren der multivariaten Datenanalyse wird nach der größten Varianz innerhalb der Messdaten gesucht. Hierbei haben vornehmlich die Messwerte mit den größten absoluten Unterschieden den größten Einfluss auf das Modell. Messwerte, die absolut kleinere Unterschiede aufweisen, jedoch relativ einen größeren Einfluss auf die Auftrennung der Messdaten haben, werden entsprechend mit einer geringeren Varianz und Gewichtung berücksichtigt. Damit auch diese Unterschiede einen direkten Einfluss auf das Modell haben, kann eine Standardisierung der Messdaten durchgeführt werden.<sup>165</sup> Bei der Autoskalierung wird von jedem analysierten Wert der Mittelwert aller Messungen abgezogen und durch die Standardabweichung dividiert. Anhand dieses Verfahrens werden die Messwerte aller Variablen vereinheitlicht.<sup>171</sup> Neben der Autoskalierung sind noch weitere Verfahren zur Standardisierung etabliert.

### 3.6.2 Hauptkomponentenanalyse (PCA, *principal component analysis*)

Die PCA zählt zu den am häufigsten genutzten multivariaten Datenanalyseverfahren und dient der Datenreduktion und Interpretation von komplexen Datensätzen.<sup>161</sup> Die Interpretation wird durch die Umformung der oftmals multidimensionalen Datensätze in einen niederdimensionalen Raum erleichtert. In der umgeformten Darstellungsform ist die größte Varianz des Datensatzes dargestellt. Die PCA zählt zu den nicht supervisierten Methoden.

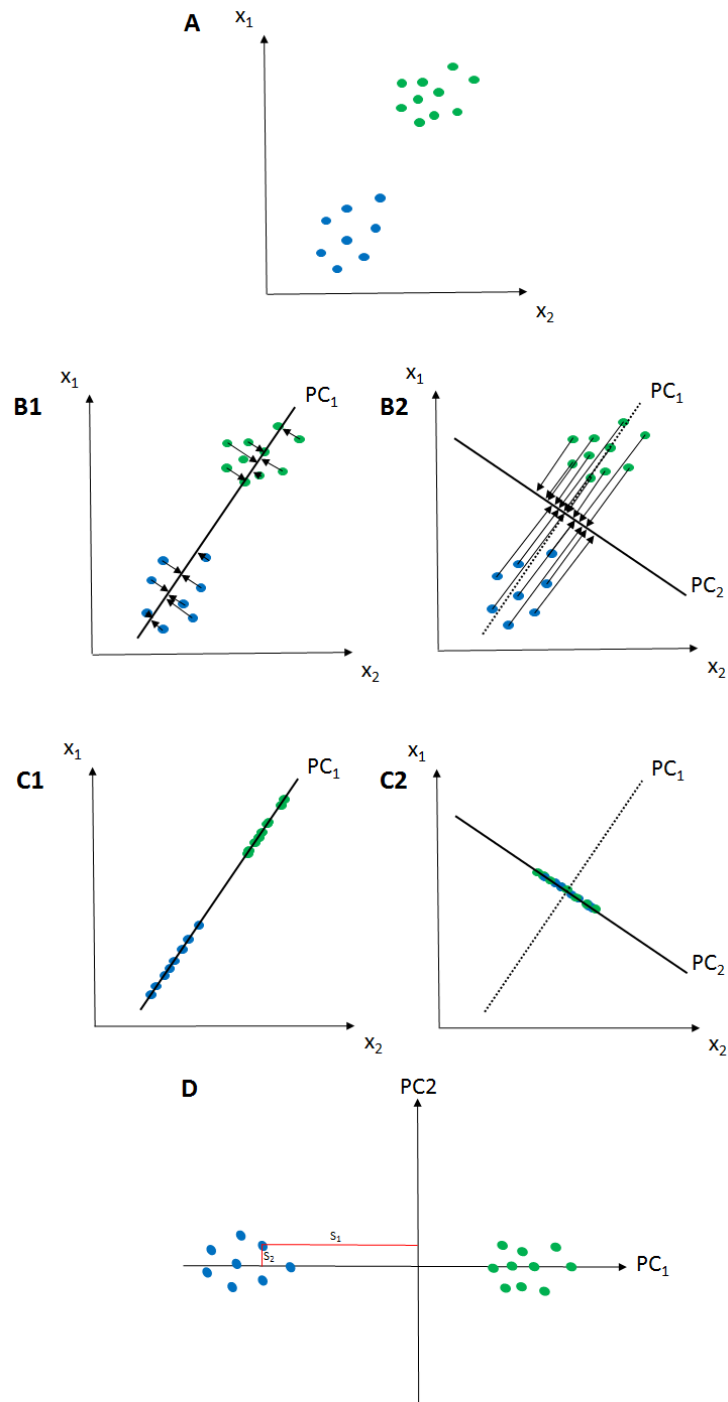


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Erstellung einer Hauptkomponentenanalyse nach Kessler.<sup>162</sup>

Die Merkmale der Datensätze werden durch eine Linearkombination in neue, sogenannte latente Variablen (Hauptkomponenten) transformiert.<sup>162</sup> Diese Hauptkomponenten werden mathematisch generiert und entsprechen keinen realen Variablen. Für die Bestimmung der ersten Hauptkomponente werden diejenigen Merkmale gesucht, bei denen die Varianz zwischen den analysierten Proben maximal ist (siehe Abbildung 11, Diagramm B1). Die zweite Hauptkomponente beschreibt die Linearkombination, bei der die Varianz am zweitgrößten ist

(siehe Abbildung 11, Diagramm B2). Mathematisch gesehen steht der Vektor, den die Linearkombination beschreibt, orthogonal auf dem Vektor der ersten Hauptkomponente. Die weiteren Hauptkomponenten bilden analog diejenigen Linearkombinationen, welche die drittgrößte etc. Varianz aufweisen.<sup>172</sup> Im beschriebenen Beispiel enthält die PC1 (erste Hauptkomponente) somit die Informationen, die für die Auftrennung der Proben in zwei Gruppen entscheidend sind, während PC2 (zweite Hauptkomponente) die Informationen der Streuung innerhalb dieser Gruppen enthält. Dadurch liegen die Proben in einem neuen Koordinatensystem, welches durch die beiden Hauptkomponenten bestimmt wird, wie in (D) gezeigt ist. Die orthogonale Projektion der Originaldaten auf eine Hauptkomponentenachse (B1 und B2) wird als *score*-Wert bezeichnet. Jedes Objekt in (D) ist nun durch zwei *score*-Werte beschrieben:  $s_1$  ist der *score*-Wert der PC1 bzw.  $s_2$  von der PC2. Das beschriebene Koordinatensystem wird daher als *scores-plot* bezeichnet. Der Koordinatenursprung entspricht dem Schwerpunkt aller Daten. Aus der relativen Lage der *scores* lassen sich Rückschlüsse hinsichtlich der Eigenschaften der Proben ziehen. Der Unterschied zweier Proben ist umso größer, je weiter sie im *scores-Plot* auseinanderliegen, während ähnliche Proben Cluster bilden.<sup>173</sup>

Die Ausgangsmatrix bei der Hauptkomponentenanalyse ist die Datenmatrix  $X$  ( $N \times M$ ), bei der  $M$  die Variablen (Metabolite) und  $N$  die Objekte (Proben) darstellt. Die Datenmatrix wird vor der statistischen Analyse mittenzentriert. Hierfür wird der Mittelwert einer jeden Variablen gebildet und von den Originaldaten abgezogen. Diese Datenmatrix wird anschließend in die Matrix  $T$  und  $P$  zerlegt. Die Matrix  $T$  ( $N \times A$ ) wird auch als *scores*-Matrix bezeichnet, wobei  $N$  für die Objekte und  $A$  für die gebildeten Hauptkomponenten stehen. In dem neuen Koordinatensystem wird für jedes Objekt die entsprechende Hauptkomponente angegeben. Die Matrix  $P^T$  ( $M \times A$ ) ist die Hauptkomponentenmatrix, welche die Umformung der Objekte vom alten ins neue Koordinatensystem beschreibt. Daher wird die Matrix  $P$  auch als transponierte Matrix  $P^T$  bezeichnet. Zusätzlich zu den Matrices  $T$  und  $P^T$  entsteht bei der Umformung die Residuenmatrix  $E$ . In dieser Matrix ist die Restvarianz, die nicht durch die anderen beiden Matrices beschrieben wird, angegeben.

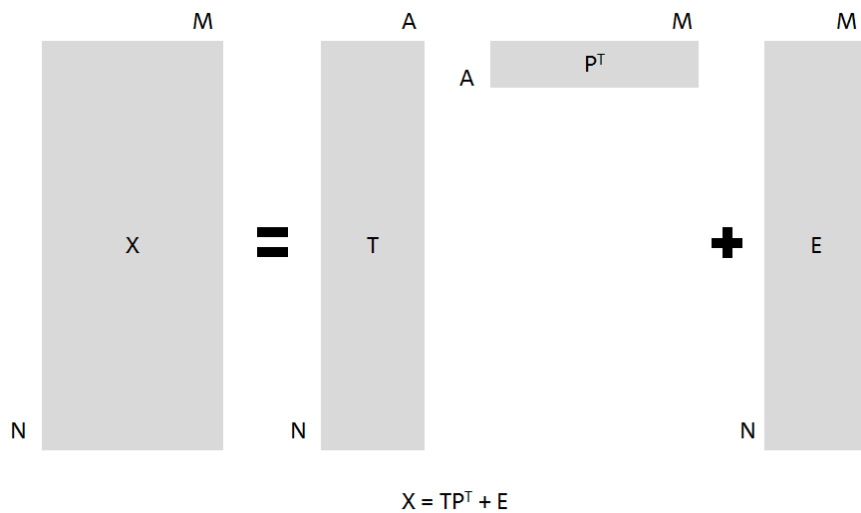


Abbildung 12: Berechnungsgrundlage des PCA Modells anhand von Matrizen.

Während der gebildete *scores plot* die Position der Objekte im neu berechneten Koordinatensystem darstellt, stellt der *loadings plot* die Einflussnahme der einzelnen Variablen anhand der jeweiligen Positionierung dar. Diese Informationen sind in der Datenmatrix  $P$  enthalten. Je stärker die *loadings* Werte einer Variablen bei unterschiedlichen Objekten abweichen, desto größer ist der Einfluss dieser Variablen auf den *scores plot* und desto größer ist die Varianz dieser Variablen in der Datenmatrix  $X$ , also im Originaldatensatz. *Loadings*, die sich im Mittelpunkt des *loadings plots* befinden stehen für Variablen, die mit einer ähnlichen Intensität in allen Objekten identifiziert werden konnten. Demnach stehen die *loadings*, die weit entfernt vom Mittelpunkt lokalisiert sind für die Variablen, die eine unterschiedliche Konzentration in den Objekten aufweisen und somit als potente Schlüsselmetaboliten für eine Differenzierung der betrachteten Objekte angesehen werden können. <sup>162, 174</sup>

### 3.6.3 PLS-R (Partial Least Squares Regression)

Die PLS-R gilt als Modifizierung der PCA. Das Hauptunterscheidungsmerkmal zwischen den beiden Modellen liegt darin, dass die PLS-R zu den supervisierten Modellen zählt. Die PLS-R zählt zu den Regressionsmethoden, welche zur Vorhersage von Variablen verwendet werden können. Der Zusammenhang zwischen bekannten, detektierbaren Variablen (hier Schlüsselmetaboliten; X-Variablen) und unbekannt Variablen (hier Kakaoschalenengehalt; Y-Variablen) kann durch die PLS-R beschrieben werden. Anhand des Regressionsmodells können also unter Verwendung der X-Variablen die Y-Variablen vorhergesagt werden. Die Berechnung und Vorhersage können auch reziprok erfolgen. Das Ziel der Regression ist die Berechnung einer mathematischen Formel, mit der bei Angabe von beliebigen X-Werten die zugehörigen Y-Werte berechnet und vorhergesagt

werden können. Neben der PLS-R können auch weitere Regressionsmethoden, wie z.B. die Multiple Lineare Regression (MLR, *multiple linear regression*) oder Hauptkomponenten-Regression (PCR, *principal component regression*) für eine Vorhersage verwendet werden.

Die PLS-R wurde von Herman Wold in den frühen 70er Jahren zur Bewertung von wirtschaftswissenschaftlichen Fragen entwickelt.<sup>175</sup> Seitdem hat sich die PLS-R zu einer der verbreitetsten Regressionstechniken der multivariaten Datenanalyse entfaltet. Die PLS-R wird heute neben wissenschaftlichen Monitoring und Controlling wirtschaftlicher Entwicklungen zur Kalibrierung und Vorhersage von chemischen oder physikalischen Eigenschaften eingesetzt.<sup>162</sup>

Es gibt zwei Berechnungsansätze der PLS: die PLS1 und PLS2. Bei der PLS1 wird der Zusammenhang zwischen einem Y-Wert (unbekannte Variable) und mehreren X-Werten (bekannte Variablen) ermittelt, wohingegen bei der PLS2 nicht nur ein Y-Wert, sondern mehrere vorhergesagt werden können.<sup>176</sup>

Analog zur PCA gilt es, bei der PLS-R ebenfalls die größte Varianz in den Messdaten zu bestimmen. Bei der PLS-R werden dazu sogenannte PLS-Komponenten, die den Hauptkomponenten bei der PCA entsprechen, definiert. Als Unterschied zur PCA werden hier jedoch nicht nur die X-Variablen, sondern auch die Y-Variablen für die Berechnung der Komponenten einbezogen, sodass die Analyse der Varianz gerichtet anhand bestimmter Fragestellungen erfolgt. Für die Erstellung des Regressionsmodells werden die Komponenten der Matrices X und Y unter der Tatsache berechnet, dass ein Zusammenhang zwischen den beiden Matrices besteht.<sup>162</sup>

Die Berechnung der Hauptkomponenten erfolgt analog zur PCA. Die Datenmatrices X und Y werden jeweils in eine score-, loadings- und Fehlermatrix umgeformt.<sup>177</sup>

$$X = T \cdot P^T + E \quad 4$$

$$Y = U \cdot Q^T + F \quad 5$$

Der Zusammenhang der Datenmatrices, Komponenten und erstellten Gleichungen ist in der Abbildung 13 dargestellt.

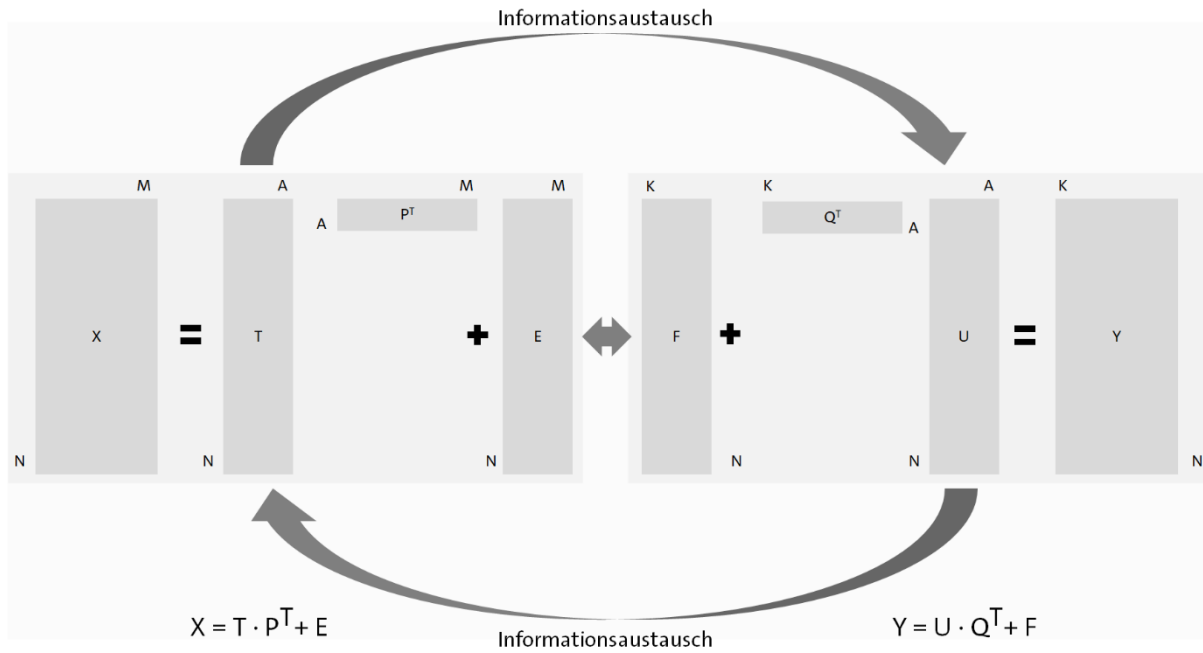


Abbildung 13: Berechnungsgrundlage der PLS-R modifiziert nach Kessler.<sup>162</sup>

Die Datenmatrix X wird für die Berechnung der PLS-R unter Einbeziehung der Informationen aus den Y-Variablen in eine score-Matrix T, eine loadings-Matrix  $P^T$  und eine Fehlermatrix E umgeformt (vgl. Abbildung 13 und Formel 4). Es wird analog mit der Matrix-Y verfahren. Hier werden die Matrizen U,  $Q^T$  und F erhalten (vgl. Abbildung 13 und Formel 5). Die beiden erstellten Gleichungen werden als äußere Beziehung definiert. Die Beziehung zwischen den Matrizen U und T wird als innere Beziehung bezeichnet und dient der Minimierung der Matrix F. Weiterhin stellt diese Beziehung die Korrelation zwischen den Variablen X und Y dar. Basierend auf den definierten Beziehungen und den umgeformten Matrizen erfolgt die Berechnung des PLS-Modells.

Als Variation der PLS-R kann die PLS-DA angesehen werden. Hier werden die Y-Variablen durch Gruppeninformationen wie Herkunft, Sorte oder Erntejahr ersetzt. Bei der Berechnung der PLS-DA werden die Y-Variablen durch Platzhalter ersetzt und somit die Zugehörigkeit der Proben definiert.

## 4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung von Schlüsselmetaboliten oder Schlüsselmetabolit-Gruppen für den Kakaoschalennachweis in Kakaoprodukten und die Entwicklung einer *targeted* Methode für den schnellen und kostengünstigen Nachweis des Kakaoschalengehaltes in unterschiedlichen Kakaoprodukten. Bisherige analytische Ansätze konnten keine robusten und sensitiven Ergebnisse für den Kakaoschalenanteil in Kakaoprodukten unterschiedlicher Herkünfte, Erntejahre und Prozessierungsstufen liefern.

Der große Unterschied zwischen Kakaoschale und -kern ist bereits auf morphologischer Ebene sichtbar und sollte auch auf der Ebene des Metaboloms nachgewiesen werden. Es sollten Schlüsselmetaboliten identifiziert werden, welche sich durch Abwesenheit oder geringere Konzentration im Kakaokern auszeichnen und weiterhin eine in Grenzen konstante sorten-, fermentations- und herkunftsübergreifende Konzentration aufweisen.

Durch die getrennte Analyse von Kakaokernen und -schalen verschiedener Anbauggebiete, unterschiedlicher Sorten, Erntezeitpunkte und Verarbeitungsstufen mittels hochauflösender *non-targeted* LC-ESI-QToF-MS Applikationen sollten Schlüsselmetaboliten unter Anwendung bioinformatischer Auswertungsverfahren identifiziert, die Strukturen aufgeklärt und die Eignung anhand von unterschiedlichen Bewertungskriterien überprüft werden. Die Vorhersage für den Kakaoschalengehalt wird genauer und reproduzierbarer, je multiparametrischer die Nachweismethode aufgebaut ist.

Ausgehend von den identifizierten Schlüsselmetaboliten sollte eine *targeted* Methode an einem HPLC-ESI-QqQ-MS/MS System entwickelt werden, sodass die Methode direkt in der Routineanalytik von Dienstleistungslaboren oder Lebensmittelüberwachung implementiert werden kann. Zum Beweis der Eignung der entwickelten Methode sollte eine Methodvalidierung anhand anerkannter Richtlinien durchgeführt werden.

Die entwickelte *targeted* Methode sollte zuerst auf Proben mit bekanntem Kakaoschalengehalt, zur Überprüfung der Vorhersagegüte, und anschließend auf unterschiedliche handelsübliche Kakaoprodukte angewendet werden. Die Vorhersage sollte auf Basis von PLS-R Modellen erfolgen.



Der gewählte *Metabolomics* Ansatz unterscheidet sich von den bisherigen Methoden der Kakaoschale durch einen multiparametrischen Ansatz. Bei dieser Methode soll eine Vielzahl verschiedener Schlüsselmetaboliten aus unterschiedlichen Substanzklassen für den Kakaoschalenengehalt herangezogen werden. Durch die große Anzahl an Schlüsselmetaboliten soll der Einfluss der exogenen Perturbation, welcher die Konzentration der Metaboliten eines biologischen Systems beeinflussen kann, minimiert werden. Durch die Minimierung des Einflusses von exogenen Perturbationen kann eine valide Aussage über den Kakaoschalenengehalt in Proben unterschiedlicher Herkünfte, Erntejahre und Verarbeitungsstufen getroffen werden. Basierend auf diesen Schlüsselmetaboliten soll ein hochauflösender molekularer Fingerabdruck generiert werden, der zur Bestimmung des Schalenengehaltes herangezogen werden kann.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Methodenentwicklung

Der Ablauf eines *Metabolomics* Experiments wurde bereits in Abschnitt 3.3.4 beschrieben. Durch eine Optimierung der einzelnen Abschnitte Probenvorbereitung, Extraktion und apparativer Analytik kann entscheidender Einfluss auf die Ergebnisse und das Resultat des Experimentes genommen werden. Als grundlegendes Ziel der Methodenoptimierung der *non-targeted* Methode kann der Nachweis einer maximalen Anzahl an Metaboliten mit möglichst hohen Intensitäten und in möglichst kurzer Analysendauer definiert werden. Weiterhin gilt es, eine Diskriminierung oder eine selektive Bevorzugung bestimmter Stoffklassen zu vermeiden, da hierdurch direkt Einfluss auf die Ergebnisse und die Aussage des Experimentes genommen werden kann.<sup>101</sup>

#### 5.1.1 *Non-targeted* LC-MS Methoden

##### 5.1.1.1 Schälprozess

Nach Artikel 1 in Verbindung mit Anhang 1 Nummer 1.2 der aufgehobenen Richtlinie 73/241/EWG wurden Kakaokerne (Kakaobruch engl. *nibs*) durch vorangegangene Entfernung der Schale sowie der Keimwurzel definiert. Nach dieser Definition handelt es sich sowohl bei der Kakaoschale als auch bei der Keimwurzel um Kontaminanten, die aus diesem Grunde im Rahmen dieser Arbeit zusammen analysiert wurden. Wird im Folgenden von der Kakaoschale gesprochen, bezieht dieser Begriff die Keimwurzeln mit ein.

Um die Unterschiede des Metaboloms der Kakaoschale und des -kerns definieren zu können, müssen diese quantitativ getrennt voneinander analysiert werden. Demnach muss der Analyse eine vollständige Separierung der Kakaoschale vom -kern vorangehen, um unverfälschte und aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Bei der Optimierung des Schälprozesses hat sich herausgestellt, dass eine vollständige Separierung der Kakaoschale vom -kern nur gewährleistet werden kann, wenn die Kakaoschale manuell mit Hilfe eines Skalpell entfernt wird.

Alternativ wurden Versuche, die Kakaoschale vom -kern mit Hilfe eines Hammers oder einer Nussknackmaschine abzutrennen, durchgeführt. Aufgrund der starken Fragmentierung der Bohlen konnte allerdings nicht die benötigte, vollständige Trennung gewährleistet werden. Versuche, die Trennung anhand einer speziell für die Halbierung von Kakaobohnen entwickelten Guillotine (MAGRA 14) zu erleichtern und zu beschleunigen, schlugen ebenfalls fehl, da es bei der

Halbierung der Kakaobohnen zu einer Zersplitterung der Kakaoschale und somit zu einer Kontamination des Kakaokerns mit Schalenbruchstücken gekommen war, sodass nicht von einer quantitativen Trennung der ausgegangen werden konnte.<sup>178</sup>

Alle Kakaobohnen wurden im Zuge dieser Arbeit daher manuell unter Zuhilfenahme eines Skalpell geschält.

### 5.1.1.2 Ermittlung der minimalen Probenmenge für reproduzierbare Ergebnisse

Die quantitative Separierung des Kakaokerns und der -schale stellt einen erheblichen Zeitaufwand dar, weshalb für die Probenaufarbeitung eine möglichst geringe Probenmenge eingesetzt werden soll, die dennoch repräsentativ für die Probencharge ist und reproduzierbare Ergebnisse garantiert.

Zur Definierung der minimalen benötigten Probemenge, wurden unterschiedliche Mengen an Kakaobohnen getrennt voneinander geschält, homogenisiert, extrahiert und analysiert. Hierfür wurden bereits bestehende Extraktions- und Analyseprotokolle des Instituts verwendet.<sup>85</sup> Es wurden jeweils drei Ansätze mit 30, 50, 100 und zwei Ansätze mit 250 Kakaobohnen analysiert. Hierbei wurde der Kakaokern jeweils getrennt von der Kakaoschale analysiert. Für alle Ansätze wurde eine polare und unpolare Extraktion durchgeführt und die Extrakte im positiven und negativen Ionenmodus analysiert. Für die Analysen wurden die NTP (*non-targeted-polar*) und NTNP (*non-targeted-non-polar*) Methoden in beiden Ionenmodi verwendet (vgl. Abschnitt 6.6). Bei den NTP und NTNP Methoden handelt es sich um Analysen mittels HPLC-ESI-QToF-MS, bei denen im Sinne des *Metabolic Fingerprinting* ungerichtet möglichst viele Metaboliten der vorliegenden Kakaomatrices detektiert werden, um anschließend Unterschiede zwischen dem detektierten Metabolom der Kakaoschale und des Kakaokerns nachweisen zu können.

In Tabelle 2 sind die Anzahlen an detektierten Verbindungen in der Kakaoschale und dem Kakaokern anhand der unterschiedlichen Methoden aufgeführt. Bei der NTNP Methode im negativen Ionenmodus konnten lediglich 267 Verbindungen für die Kakaoschale und 121 für den -kern detektiert werden. Bei allen anderen Methoden konnten mindestens 550 Verbindungen detektiert werden. Zur Veranschaulichung der geringen Informationsdichte der NTNP Methode im negativen Ionenmodus sind im Anhang in Abbildung 67 und Abbildung 68 Chromatogramme und *density views* von Kakaokernproben und -schalenproben aufgeführt. Aufgrund der niedrigen Anzahl an detektierten Verbindungen und der damit verbundenen geringen Wahrscheinlichkeit

geeignete Schlüsselmetaboliten identifizieren zu können, wurde aus Zeit- und Messkapazitätsgründen darauf verzichtet, weitere Proben mit der NTNP Methode im negativen Ionenmodus zu analysieren.

Tabelle 2: Detektierte Verbindungen in den einzelnen *non-targeted* Methoden für Kakaokern und -schale.

Methode		Detektierte Verbindungen
Kakaokern	NTNP pos	2175
	NTNP neg	121
	NTP pos	1737
	NTP neg	753
Kakaoschale	NTNP pos	2239
	NTNP neg	267
	NTP pos	1613
	NTP neg	579

In Abbildung 14 bis Abbildung 16 sind die PCA-Modelle der unterschiedlichen Probenmengen, analysiert mittels NTNP Methode im positiven Ionenmodus, beispielhaft dargestellt. Je näher zwei analysierte Proben im *scores-plot* des PCA-Modells beieinanderliegen, desto größer sind die Ähnlichkeiten der beiden Proben. Liegen Proben eines Ansatzes im gleichen Bereich des PCA-Modells in unmittelbarer Nähe zueinander, wird dies als *Cluster* bezeichnet. Clustern die Proben eines Ansatzes im gleichen Bereich des PCA-Modells, ist davon auszugehen, dass anhand einer definierten Probenmenge des Ansatzes reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden können. Im *loadings plot* sind die *loadings*, auch als *buckets* bezeichnet, gezeigt. Es handelt sich hierbei um jeweils eine detektierte Verbindung, die durch das *m/z*, die Retentionszeit und einer Intensität in den analysierten Proben definiert wird.

In Abbildung 14 sind die Ergebnisse der NTNP Methode der analysierten Kernproben dargestellt. Die *scores* aller analysierten Probenmengen zeigen vergleichbare Abstände zueinander, unabhängig von der analysierten Probenmenge. Demnach eignen sich alle Ansätze gleich gut, um das Kakaokernmetabolom zu repräsentieren.

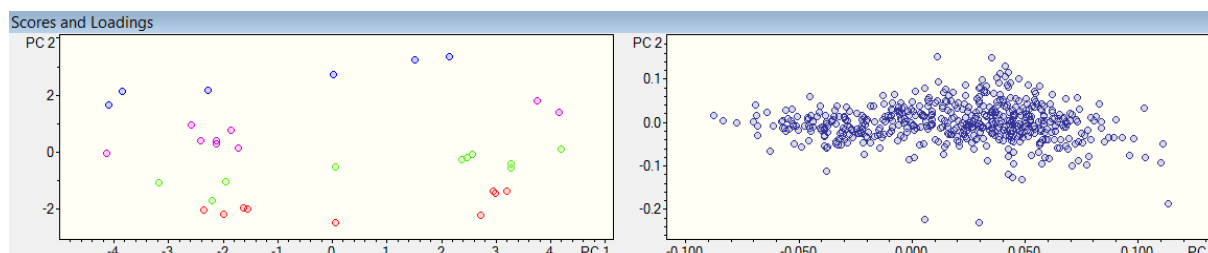


Abbildung 14: PCA-Modell der unterschiedlichen Probenmenge (Kakaokern) analysiert mittels NTNP Methode (Rot: 30 Bohnen, Grün: 50 Bohnen, Lila: 100 Bohnen, Blau: 250 Bohnen) (80//70).

In Abbildung 15 sind die Ergebnisse der dazugehörigen Kakaoschalen dargestellt. Die Proben, bei denen jeweils nur 30 Kakaobohnen analysiert wurden, liegen bei diesem Modell sehr weit auseinander. Daher ist eine Probenmenge von 30 Kakaobohnen nicht geeignet, reproduzierbare Ergebnisse für eine Probencharge zu generieren. Dies wird auch durch den *Hotelling T<sup>2</sup>* Plot in Abbildung 17 bestätigt. Der *Hotelling T<sup>2</sup>* Test ist eine Erweiterung des *t*-Tests und wird auf die *scores* eines PCA-Modells angewendet.<sup>179</sup> Während im *Hotelling T<sup>2</sup>* Diagramm auf der Abszisse die Proben gelistet sind, wird auf der Ordinate die Distanz eines *scores* zum Datenschwerpunkt eingetragen. Die gestrichelte Linie markiert hier die obere Grenze des Toleranzbereichs, die für die berechneten PCA-Modelle 95 % beträgt.<sup>180</sup> In dem *Hotelling T<sup>2</sup>* Diagramm ist erkennbar, dass drei der analysierten Proben mit einem Kakaobohnenumfang von 30 Bohnen oberhalb des Toleranzbereichs liegen. Damit handelt es sich mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % bei diesen Proben um Ausreißer. In Abbildung 16 wurde dasselbe PCA-Modell ohne die Proben, denen die Analyse von 30 Kakaobohnen zugrunde lag, neu berechnet. Dem PCA-Modell ist zu entnehmen, dass die Ansätze mit 50 und 100 Kakaobohnenschalen nahezu identische Ergebnisse liefern. Die Probenansätze clustern im gleichen Bereich des *scores plots*. Daher lässt sich die minimale Probenmenge auf eine Kakaobohnenanzahl von 50 Stück definieren.

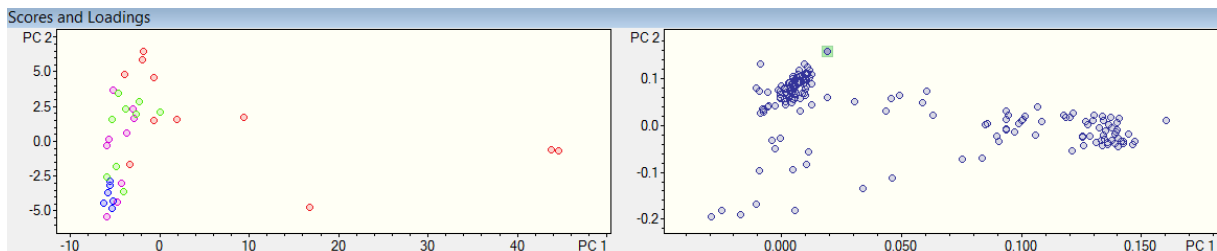


Abbildung 15: PCA-Modell der unterschiedlichen Probenmenge (Kakaoschalen) analysiert mittels NTNP Methode (Rot: 30 Bohnen, Grün: 50 Bohnen, Lila: 100 Bohnen, Blau: 250 Bohnen) (80//70).

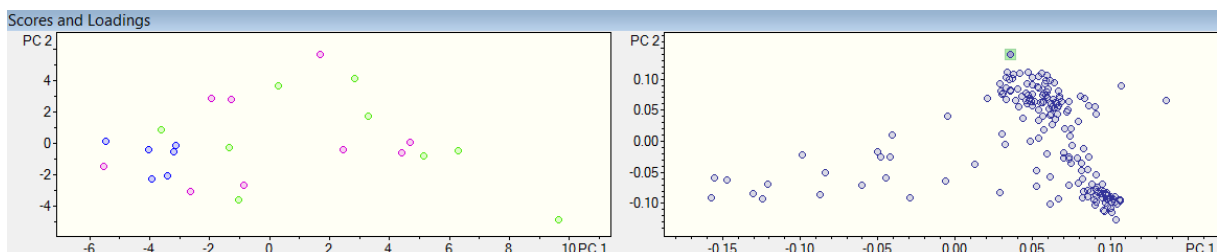


Abbildung 16: PCA-Modell der unterschiedlichen Probenmenge (Kakaoschalen) analysiert mittels NTNP Methode (Grün: 50 Bohnen, Lila: 100 Bohnen, Blau: 250 Bohnen) (80//70).

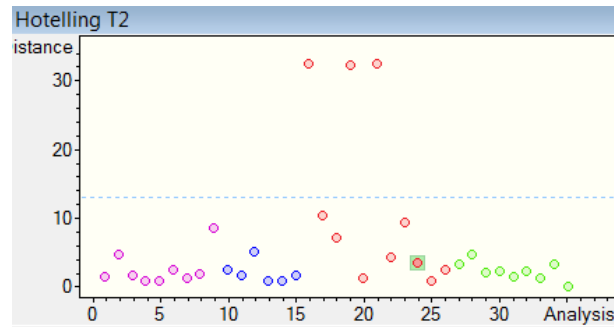


Abbildung 17: Hotelling T2-Plot des PCA-Modells von den analysierten Kakaoschalen Proben (Rot: 30 Bohnen, Grün: 50 Bohnen, Pink: 100 Bohnen, Lila: 250 Bohnen).

Bei der Bestimmung der minimalen benötigten Probenmenge wurde lediglich eine Kakaoscharge analysiert. Auch wenn die Analyse dieser Kakaoscharge gezeigt hatte, dass bereits mit 50 Kakaobohnen reproduzierbare Ergebnisse generiert werden konnten und die Analyse mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % keine Ausreißer beinhaltet, wurde sich dafür entschieden, aufgrund potenziell größeren Inhomogenitäten anderer Kakaoscharges, immer 100 Kakaobohnen für die Analyse einzusetzen, um eine schwankungsunauffällige und robuste Probenahme zu gewährleisten.

### 5.1.1.3 Extraktion

Für *non-targeted* Ansätze wird das allgemeine Ziel verfolgt, möglichst viele Metaboliten eines biologischen Systems zu erfassen. Als Voraussetzung für die Detektion eines möglichst großen Anteils des Metaboloms gilt es, möglichst viele Metaboliten aus der Probenmatrix zu extrahieren. Durch die Wahl des Extraktionsmittels wird der Erfolg der Extraktion maßgeblich beeinflusst.

#### 5.1.1.3.1 Extraktionsmittel

Im Folgenden werden die Ergebnisse der unterschiedlichen geprüften Extraktionsmittelzusammensetzungen für die NTP und NTNP Methode diskutiert.

Bei der Auswertung und Bewertung der Extraktionsgüte der unterschiedlichen Extraktionsmittel wurde die Liste der potenziellen Schlüsselmetaboliten (Identifizierung potenzieller Schlüsselmetaboliten s. Abschnitt 5.2) verwendet, da es sich hierbei um die potenziell am besten geeigneten Verbindungen für den Kakaoschalennachweis handelt. Die Verbindungen konnten mit einer hohen Konzentration in der Kakaoschale und nicht bzw. mit einer deutlich niedrigeren Intensität im Kakaokern nachgewiesen werden.

Für die folgende Auswertung wurden jeweils 30 potenzielle Schlüsselmetaboliten ausgewählt, die den gesamten Retentions- und Massebereich abdecken. Somit werden alle potenziell extrahierbaren Stoffklassen erfasst und mögliche Diskriminierungen ausgeschlossen. Die verwendeten, potenziellen Schlüsselmetaboliten zur Bewertung der Extraktionsgüte sind im Anhang in Tabelle 66 und Tabelle 67 aufgeführt.

Durch ein Skalieren nach dem interquartilen Verhältnis nach Gleichung 11 (s. Formelsammlung) wird sichergestellt, dass nur die relativen Intensitätsänderungen betrachtet werden, die durch die Variation des Extraktionsmittels hervorgerufen wurden. Werden die gemittelten skalierten Intensitäten der ausgewählten Metaboliten gegen das Extraktionsmittel aufgetragen, lassen sich die Effekte der verschiedenen Extraktionsmittelzusammensetzungen erkennen.

#### 5.1.1.3.1.1 NTP Extraktionsmittelzusammensetzung

Für alle Extraktionsmittelzusammensetzungen aus Tabelle 3 wurden drei Proben Kakaoschale und -kern eingewogen und gemäß dem Extraktionsprotokoll in Abschnitt 6.2.7 extrahiert. Nach der Spritzenfiltration konnten lediglich bei den in der Tabelle markierten Extraktionsmittelzusammensetzungen klare, schwebstofffreie und analysierbare Extrakte nach einer Lagerung von 10 Tagen bei ca. -20 °C erhalten werden. Bei allen anderen Zusammensetzungen konnten keine

Extrakte erhalten werden, die für eine Analyse eingesetzt werden konnten, und die Ansätze wurden daher verworfen.

Tabelle 3: Untersuchte Extraktionsmittelzusammensetzungen für den NTP Ansatz.

Bezeichnung	Methanol [%]	Ethanol [%]	Acetonitril [%]	Isopropanol [%]	Wasser [%]
Methanol 1*	67	-	-	-	33
Methanol 2	50	-	-	-	50
Methanol 3	33	-	-	-	67
Ethanol 1*	-	67	-	-	33
Ethanol 2	-	50	-	-	50
Ethanol 3	-	33	-	-	67
Acetonitril 1*	-	-	67	-	33
Acetonitril 2	-	-	50	-	50
Acetonitril 3	-	-	33	-	67
Isopropanol 1*	-	-	-	67	33
Isopropanol 2	-	-	-	50	50
Isopropanol 3	-	-	-	33	67

\*Analysierbare Extrakte

Die Polarität  $\delta$  eines Lösungsmittels berechnet sich summarisch aus den quadrierten Werten der Dispersionskräfte  $\delta_d$ , Dipolkräfte  $\delta_p$  und Wasserstoffbrückenbindungen  $\delta_h$ . Der Zusammenhang der Variablen ist in Gleichung 6 angegeben. Je höher der Wert  $\delta$ , desto höher ist die Polarität einer Verbindung.<sup>181</sup> In Tabelle 4 sind die Löslichkeitsparameter der verwendeten Extraktionsmittel aufgeführt.

$$\delta^2 = \delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2 \quad 6$$

Tabelle 4: Löslichkeitsparameter nach Hansen.<sup>181</sup>

Lösungsmittel	Polarität $\delta$	Dispersionskräfte $\delta_d$	Dipolkräfte $\delta_p$	Wasserstoffbrückenbindungen $\delta_h$
Wasser	23,5	6,0	15,3	16,7
Methanol	14,3	7,4	6,0	10,9
Ethanol	12,9	7,7	4,3	9,5
Propanol	12,0	7,8	3,3	8,5
Acetonitril	11,9	7,5	8,8	3,0

Da bei dem NTP Ansatz der Fokus auf den polaren Metaboliten der Kakaoschale und des Kakao-kerns liegt, wurde die Auswahl der optimalen Extraktionsmittelzusammensetzung auf ein Gemisch aus Methanol und Wasser beschränkt, da diese Lösungsmittel die höchste Polarität zeigen und somit am besten geeignet sind, polare Metaboliten zu extrahieren.



Zur Verdeutlichung des Polaritätsunterschiedes und den darauf beruhenden Extraktionsunterschieden ist in Abbildung 18 ein PCA-Modell der NTP Analyse im negativen Ionenmodus der analysierbaren Extrakte aus Tabelle 3 aufgeführt. Hierbei wird deutlich, dass die Extraktionsmittelgemische mit Isopropanol (lila), Ethanol (grün) und Acetonitril (rot) im linken Bereich des *scores-plots* clustern und die Extrakte mit Methanol (blau) im rechten Bereich des *plots* liegen. Demnach unterscheidet sich das Extraktionsvermögen der Lösungsmittelgemische mit Isopropanol, Ethanol und Acetonitril nur sehr gering, während Methanol ein stark abweichendes Extraktionspotential aufweist. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Löslichkeitsparametern nach HANSEN (vgl. Tabelle 4). Die Polaritäten von Ethanol, Propanol und Acetonitril liegen zwischen 11,9 und 12,9, während die Polarität von Methanol mit 14,3 deutlich höher liegt. Demnach lässt sich das Clustern der Ethanol-, Propanol- und Acetonitril-Ansätze und die Abseitsstellung von Methanol durch die Polaritätsunterschiede der Lösungsmittel erklären.

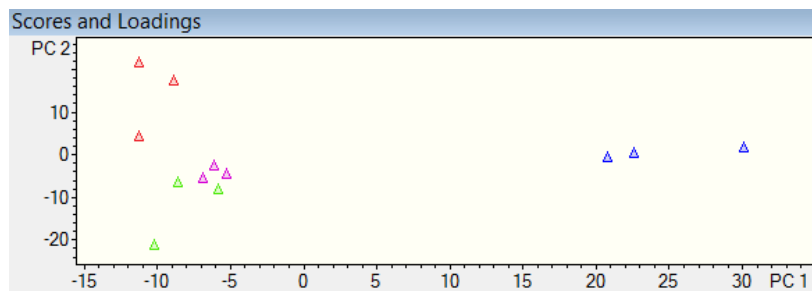


Abbildung 18: *Scores-Plot* von jeweils drei Kakaoschalenproben extrahiert mit unterschiedlichen Extraktionsmittelgemischen (Rot: Acetonitril/Wasser 2/1, Grün: Ethanol/Wasser 2/1, Lila: Isopropanol/Wasser 2/1 und Blau: Methanol/Wasser 2/1) (80//70).

In einem zweiten Ansatz wurde die optimale Extraktionsmittelzusammensetzung von Methanol und Wasser erarbeitet. Ein geringerer Anteil an Methanol als 60 % im Extraktionsmittel führt zu trüben Extrakten und die Schwebstoffe konnten auch nach Spritzenfiltration und weiteren Zentrifugationsschritten nicht abgetrennt werden. Die Extrakte mit einem Methanolgehalt von kleiner als 60 % sind daher nicht für eine Analyse geeignet. Für die Identifizierung des optimalen Verhältnisses aus Wasser und Methanol wurden daher nur Mischungsverhältnisse mit einem Methanolgehalt von mindestens 60 % eruiert. Für die weitere Auswertung wurden, analog zu dem beschriebenen Verfahren, 30 potenzielle Schlüsselmetaboliten aus Tabelle 67 verwendet und deren skalierte Intensitäten als Box-Plots dargestellt. Anhand der ausgewählten potenziellen Schlüsselmetaboliten wurden das gesamte Polaritätsspektrum und der gesamte Massenbereich abgedeckt.

Tabelle 5: Extraktionsmittelansätze mit unterschiedlichen Methanol- und Wasseranteilen.

Bezeichnung	Methanol [%]	Wasser [%]
Extraktionsansatz 1	100	0
Extraktionsansatz 2	90	10
Extraktionsansatz 3	80	20
Extraktionsansatz 4	70	30
Extraktionsansatz 5	60	40

Wasser unterscheidet sich mit einem Polaritätswert von 23,5 deutlich von Methanol und den anderen Alkoholen der homologen Reihe (vgl. Tabelle 4). Dieser Polaritätsunterschied erklärt die differierenden Ergebnisse der durchgeführten Extraktionen mit unterschiedlichen Anteilen an Methanol und Wasser. Exemplarisch lässt sich dies für zwei detektierte Verbindungen nachvollziehen (vgl. Abbildung 19): Mit steigendem Methanolanteil im Extraktionsmittel steigt die skalierte Intensität der Verbindung 7,62 min : 522,203  $m/z$  schrittweise von 3,4 bei 60 % Methanol bis 6,2 bei 100 % Methanol. Reziprok verhalten sich die skalierten Intensitäten bei der Verbindung 9,26 min : 199,144  $m/z$ .

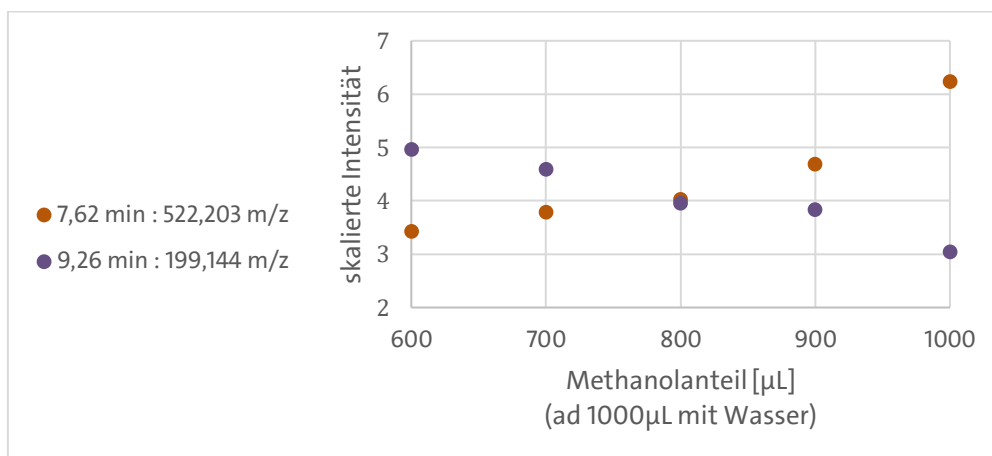


Abbildung 19: Skalierte Intensität zweier potenzieller Schlüsselmetaboliten bei verschiedenen Extraktionsmittelzusammensetzungen.

Entsprechend eignet sich die Extraktionsmittelzusammensetzung 100 % Methanol nicht für den *non-targeted* Ansatz, da hier einige Verbindungen überproportional diskriminiert bzw. verstärkt werden. Vorteilhaft erscheinen die Mischungen mit einem Methanolanteil von 60, 70, 80 sowie 90 %, die im Sinne eines *non-targeted* Ansatzes einen nivellierenden Effekt auf die Extrahierbarkeit der unterschiedlichen Metaboliten zeigen. Beim direkten Vergleich der Extraktionsmittelzusammensetzungen lässt sich in Abbildung 20 für den positiven Ionenmodus und Abbildung 21 für den negativen erkennen, dass der interquartile Abstand und Median bei einem

Methanolanteil von 90 % bei den höchsten Ordinatenwerten liegen und somit die höchste Extraktionseffizienz indiziert. Daher ist das Extraktionsmittel mit einem Methanolanteil von 90 % am geeignetsten für die Extraktion polarer Metaboliten und wurde die folgenden Analysen verwendet.

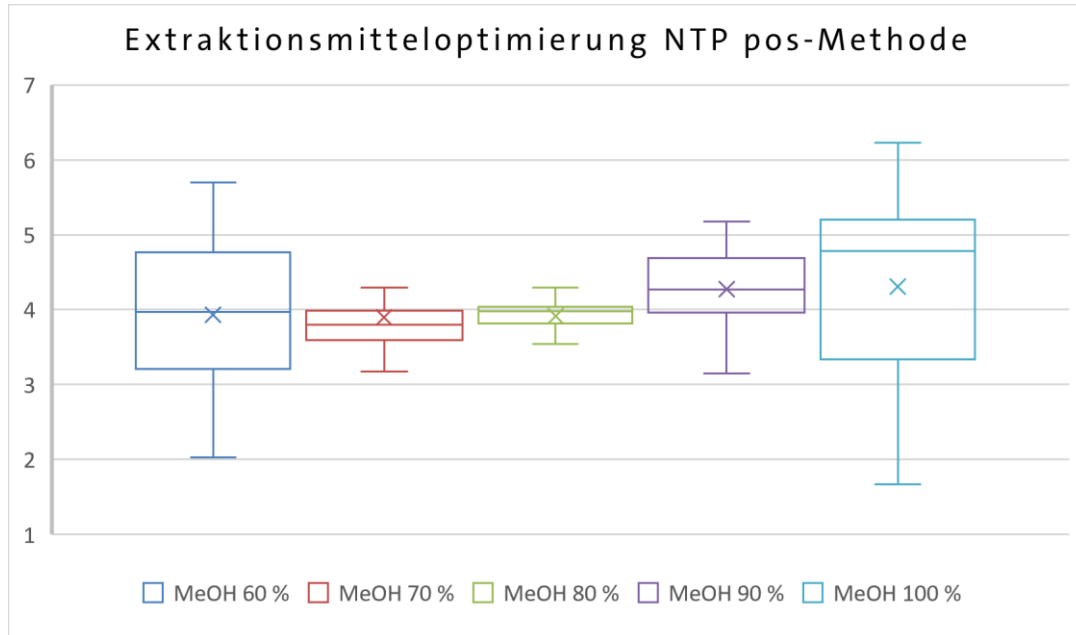


Abbildung 20: Box-plot Extraktionsmittelloptimierung der NTP Methode im positiven Ionenmodus (Median: MeOH 60 %: 3,97; MeOH 70 %: 3,80; MeOH 80 % 3,98; MeOH 90 %: 4,27; MeOH 100 %: 4,78).

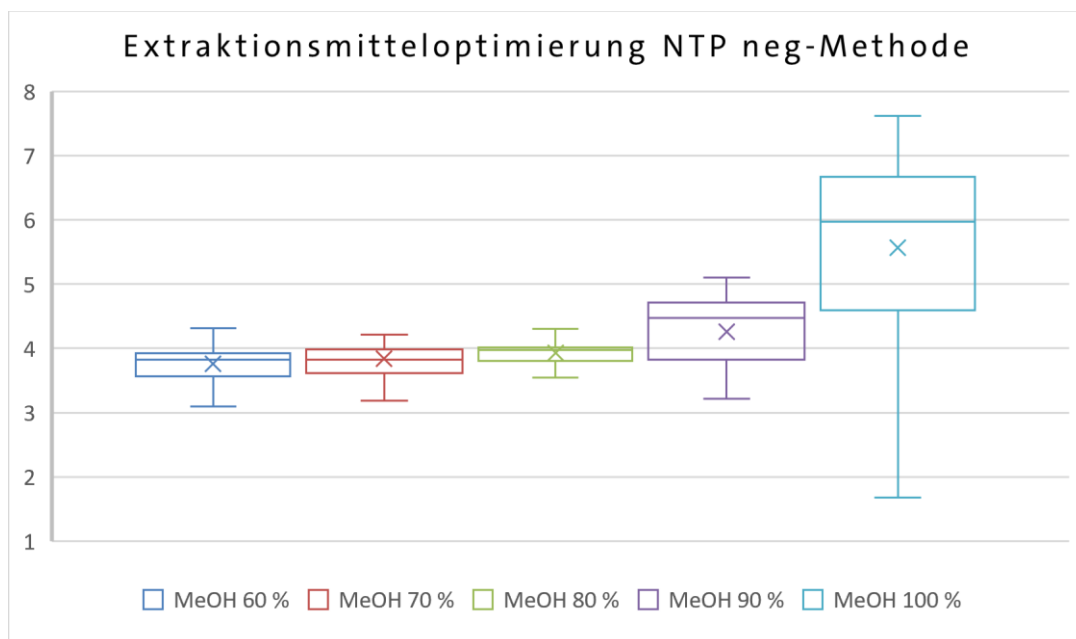


Abbildung 21: Box-plot Extraktionsmittelloptimierung der NTP Methode im negativen Ionenmodus (Median: MeOH 60 %: 3,82; MeOH 70 %: 3,83; MeOH 80 % 3,98; MeOH 90 %: 4,48; MeOH 100 %: 5,97).

5.1.1.3.1.2 NTNP Extraktionsmittelzusammensetzung

Für die Extraktionsmittelzusammensetzungen aus Tabelle 6 wurden jeweils drei Kakaoschalen- und Kakaokernproben eingewogen und gemäß dem Extraktionsprotokoll in Abschnitt 6.2.7 extrahiert. Nach der Spritzenfiltration konnten lediglich bei den markierten Extraktionsmittelzusammensetzungen klare und schwebstofffreie Extrakte nach einer Lagerung von 10 Tagen bei ca. -20 °C erhalten werden. Bei allen anderen Zusammensetzungen konnten keine Extrakte erhalten werden, die für eine Analyse eingesetzt werden konnten, und die Ansätze wurden daher verworfen.

Tabelle 6: Untersuchte Extraktionsmittelzusammensetzungen für den NTNP-Ansatz.

Bezeichnung	Isopropanol [%]	Chloroform [%]	Methanol [%]	Acetonitril [%]
Isopropanol - Methanol 1	90	-	10	-
Isopropanol - Methanol 2	70	-	30	-
Isopropanol - Acetonitril 1	90	-	-	10
Isopropanol - Acetonitril 2	70	-	-	30
Isopropanol - Chloroform 1*	67	33	-	-
Isopropanol - Chloroform 2*	50	50	-	-
Isopropanol - Chloroform 3	33	67	-	-
Isopropanol	100	-	-	-
Chloroform - Methanol 1	-	90	10	-
Chloroform - Methanol 2	-	70	30	-
Chloroform - Acetonitril 1	-	90	-	10
Chloroform - Acetonitril 2	-	70	-	30
Chloroform	-	100	-	-

\*Analysierbare Extrakte

Um das optimale Verhältnis von Isopropanol und Chloroform für die Extraktion der unpolaren Metaboliten der Kakaoschale und des Kakaokerns zu bestimmen, wurden in einem zweiten Ansatz weitere Extraktionen mit unterschiedlichen Anteilen der beiden Extraktionsmittel durchgeführt.

Tabelle 7: Extraktionsmittelansätze mit unterschiedlichen Isopropanol- und Chloroform-Anteilen.

Bezeichnung	Isopropanol [%]	Chloroform [%]
Extraktionsansatz 1	90	10
Extraktionsansatz 2	80	20
Extraktionsansatz 3	70	30
Extraktionsansatz 4	60	40
Extraktionsansatz 5	50	50

Für die Auswertung wurden analog zur NTP Methode 30 potenzielle Schlüsselmetaboliten ausgewählt (s. Tabelle 66) und die skalierten Intensitäten als Box-Plot in Abbildung 22 dargestellt.

Als geeignete Extraktionsmittel kommen nach Abbildung 22 die Isopropanol-Chloroform-Mischungen mit Isopropanol-Anteilen von 60 und 80 % in Betracht, weil hier die Bereiche des interquartilen Abstands und die Mediane die höchsten Ordinatenwerte aufweisen und somit die höchste Extraktionseffizienz indizieren.

Bei der Wahl der Extraktionsmittelzusammensetzung sollten an dieser Stelle auch die Umwelt- und Gesundheitsrisiken in die Entscheidung mit einbezogen werden. Aufgrund der kanzerogenen Wirkung von Chloroform sollte der verwendete Anteil so klein wie möglich sein.<sup>182</sup> Entsprechend erfolgt die unpolare Extraktion mit einem Isopropanol-Chloroform-Gemisch in einem Verhältnis von vier zu eins.

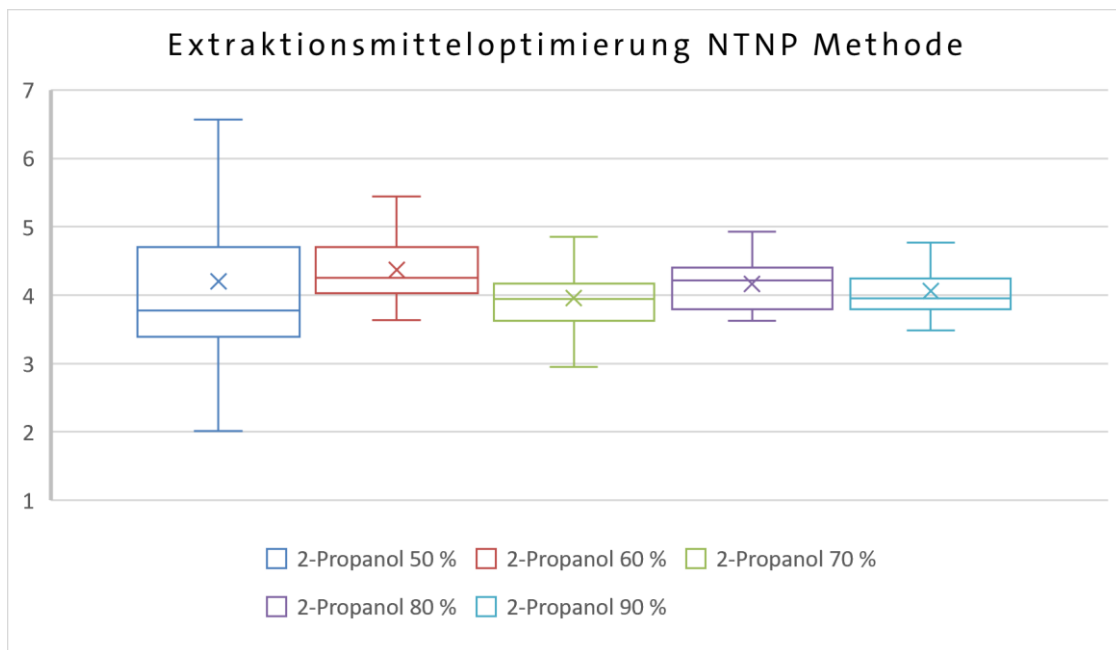


Abbildung 22: Box-plot Extraktionsmittelloptimierung der NTNP Methode im positiven Ionenmodus (Median: 2-Propanol 50 %: 3,77; 2-Propanol 60 %: 4,22; 2-Propanol 70 %: 3,94; 2-Propanol 80 %: 4,22; 2-Propanol 90 %: 3,96).

Für die TNP (*targeted-non-polar*) Methode wurde eine weitere Optimierung des Extraktionsmittels mit der Vorgabe, die Verwendung von halogenierten Kohlenwasserstoffen zu vermeiden, durchgeführt. Aufgrund der sehr guten Extraktionseigenschaften für unpolare Verbindungen konnte bei der NTNP Methode nicht auf Chloroform verzichtet werden, da anderenfalls eine deutlich niedrigere Anzahl an Verbindungen detektiert werden würde.

5.1.1.3.2 Extraktionsmitteladditiv

Additive werden dem Extraktionsansatz zur Einstellung des pH-Wertes zugesetzt und können weiterhin einen Einfluss auf die Polarität des Extraktionsmittels haben. Die Veränderung des pH-Wertes im Extraktionsmittel stellt einen weiteren Parameter zur potenziellen Verbesserung und Optimierung des Extraktionspotentials dar.<sup>100-102</sup> Für die Identifizierung des optimalen Extraktionsmitteladditives mit dem größten Extraktionspotential für die polare und unpolare Extraktion wurden jeweils drei Kakaoschalenproben gemäß den Extraktionsprotokollen in Abschnitt 6.2.7 mit abweichenden Additiven im Extraktionsmittel aufgearbeitet und analysiert. Es wurde der Zusatz von Ameisensäure, Ammoniumformiat und Ammoniumacetat als Extraktionsmitteladditiv (vgl. Tabelle 8) evaluiert.

Tabelle 8: Evaluierte Extraktionsmitteladditive für die NTP und NTNP Methode.

<b>Additiv</b>	<b>NTP Methode</b>	<b>NTNP Methode</b>
Ohne Additiv	Ohne Additiv	Ohne Additiv
Ameisensäure	0,1%	0,1 %
Ammoniumformiat	5 mM	5 mM
	20 mM	20 mM
Ammoniumacetat	5 mM	5 mM
	20 mM	20 mM

5.1.1.3.2.1 Optimierung des Extraktionsmittels der NTP Methode

Analog zur Auswertung der Extraktionsmittelzusammensetzung wurden auch bei der Evaluierung der Additive PCA-Modelle der Messreihen berechnet, welche in Abbildung 23 für den positiven und in Abbildung 24 für den negativen Ionenmodus, jeweils für Kakaoschalenproben, dargestellt sind. Bei beiden PCA-Modellen clustern die *scores* der Dreifachmessung erwartungsgemäß und es sind keine ausreißerverdächtigen *scores* zu erkennen. Demnach können unabhängig von der Wahl des Extraktionsmitteladditives reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden.

Die analysierten Proben ohne Additiv-Zusatz befinden sich bei beiden *scores-plots* am rechten Rand des *plots*. Alle anderen analysierten Proben mit Additiv zeigen einen niedrigeren Wert bei der PC1-Achse und liegen dementsprechend links von den analysierten Proben ohne Additiv. Die kürzeste Distanz zu den Proben ohne Additiv zeigen die analysierten Proben mit einem Zusatz von 0,1 % Ameisensäure als Additiv im Extraktionsmittel. Demnach scheint der Zusatz von Ameisensäure zu den geringsten Veränderungen bei der Extraktion zu führen. Weiterhin zeigen die Proben mit einer Pufferkonzentration von 5 mM einen geringen Abstand zu den Proben ohne Additiv als die Proben mit einer Pufferkonzentration von 20 mM. Diese zu erwartende Tendenz

bestätigt die Plausibilität der generierten Modelle. Die Auftrennung der unterschiedlichen verwendeten Puffer wird durch die Dimension der zweiten Hauptkomponente hervorgerufen. Da die zweite Hauptkomponente eine geringere Varianz als die erste Hauptkomponente beinhaltet, zeigt die Art des verwendeten Puffersystems, AF oder AAc, eine geringere Varianz als die verwendete Pufferkonzentration, welche durch die erste Hauptkomponente definiert wird. Dieser Zusammenhang ist zwischen den verwendeten Extraktionsmitteladditiven und der Lokalisierung der scores in Abbildung 23 sehr gut zu erkennen.

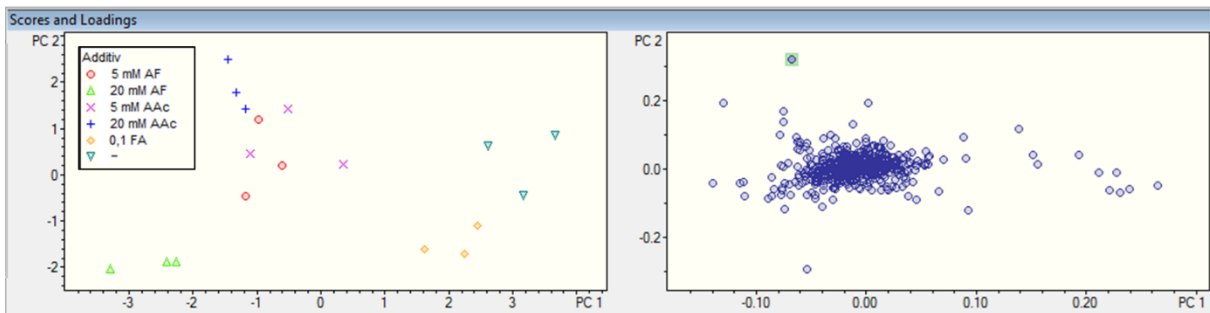


Abbildung 23: PCA-Modell unterschiedlicher getesteter Additive analysiert mit der NTP Methode im positiven Ionenmodus (90//50).

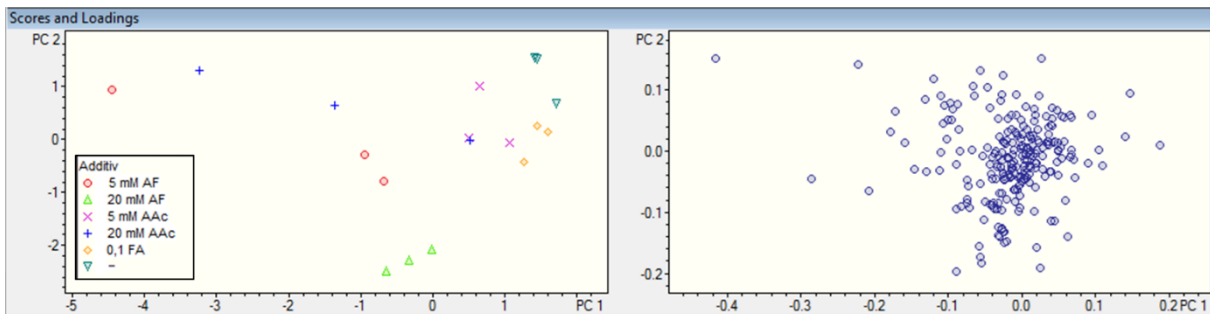


Abbildung 24: PCA-Modell unterschiedlicher getesteter Additive analysiert mit der NTP Methode im negativen Ionenmodus (90//50).

Neben der Auswertung des Extraktionsmitteladditives anhand der PCA-Modelle, bei der bei allen Additiven reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden konnten, erfolgt eine weitere Auswertung anhand der skalierten Intensitäten der potenziellen Schlüsselmetaboliten. Hierbei gilt es, das Extraktionsmitteladditiv zu identifizieren, bei dem der höchste Median der skalierten Intensitäten der potenziellen Schlüsselmetaboliten erhalten werden konnte. Da für die Analyse im positiven und negativen Ionenmodus die gleichen Probenextrakte verwendet werden sollen, muss das Extraktionsmitteladditiv auch in beiden Ionenmodi ein gutes Extraktionsvermögen zeigen. Die Ergebnisse der Optimierung für die NTP Methode sind als Box-plot in Abbildung 25 und Abbildung 26 dargestellt. Die erhaltenen Median-Werte, Spannweiten und interquartile Abstände zeigen lediglich eine sehr geringe Schwankungsbreite zwischen den verwendeten Additiven.

Der Medianwert des Additivs 5 mM AAc zeigt in beiden Ionenmodi mit 4,22 beim positiven Ionenmodus bzw. 4,07 beim negativen Ionenmodus sehr hohe Werte bei einer geringen Streuung. Daher wurde ein Zusatz von 5 mM AAc als Extraktionsmitteladditiv für die NTP Methoden ausgewählt.

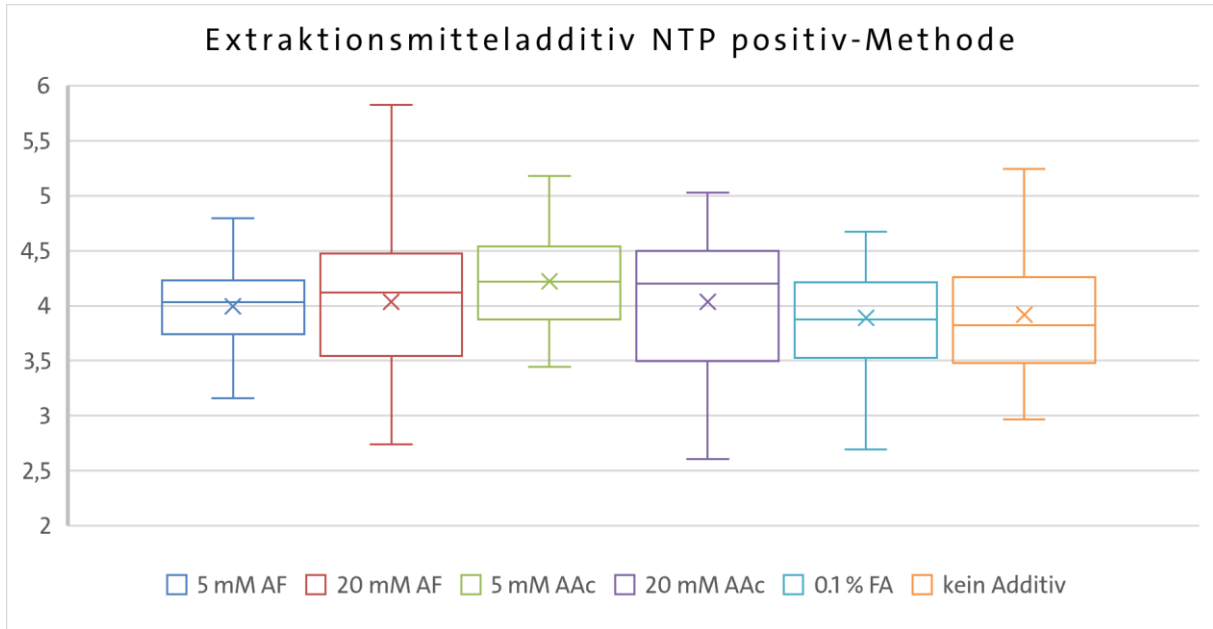


Abbildung 25: Box-plot Extraktionsmitteladditive der NTP Methode im positiven Ionenmodus (Median: 5 mM AF: 4,03; 20 mM AF: 4,12; 5 mM AAc: 4,22; 20 mM AAc: 4,20; 0,1% FA: 3,88; kein Additiv: 3,82).

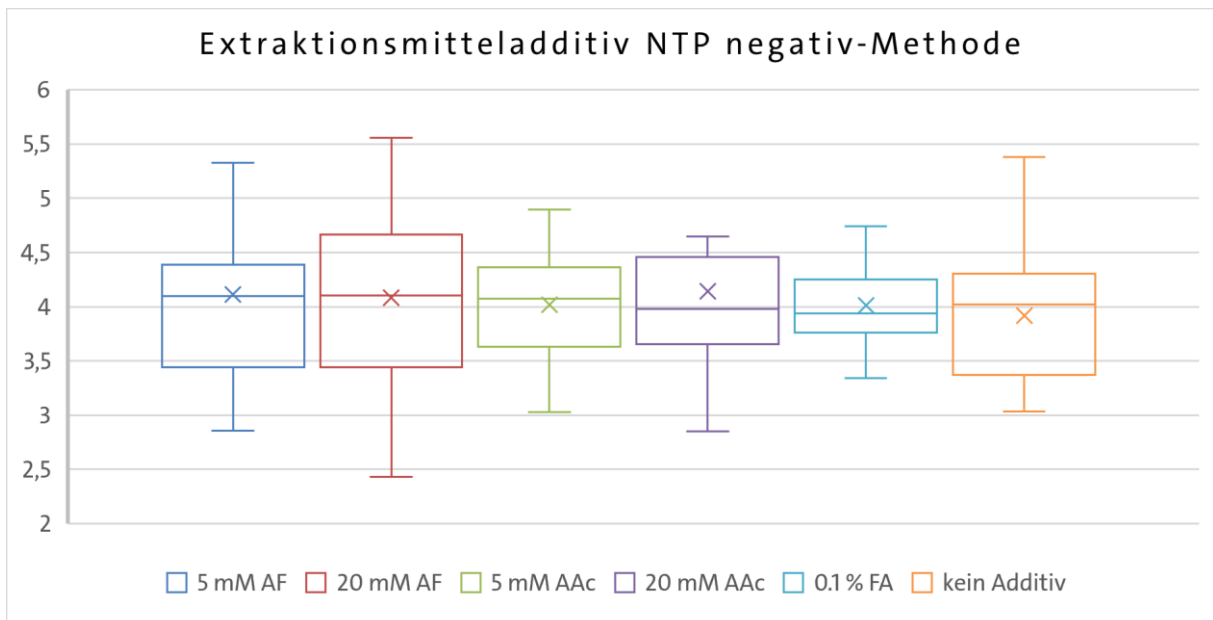


Abbildung 26: Box-plot Extraktionsmitteladditive der NTP Methode im negativen Ionenmodus (Median: 5 mM AF: 4,10; 20 mM AF: 4,10; 5 mM AAc: 4,07; 20 mM AAc: 3,98; 0,1% FA: 3,94; kein Additiv: 4,02).



5.1.13.2.2 Optimierung des Extraktionsmitteladditivs der NTNP Methode

Die Optimierung der Extraktionsmitteladditive für die NTNP Methode erfolgt analog zu der NTP Methode. Da bei der unpolaren Methode die Analyse lediglich im positiven Ionenmodus erfolgt, mussten bei der Auswahl des potentesten Additivs nur die Ergebnisse der Analysen im positiven Ionenmodus berücksichtigt werden.

Das berechnete PCA-Modell der Analysen ist in Abbildung 27 dargestellt. Dem Modell ist zu entnehmen, dass die analysierten Proben mit den Extraktionsmitteladditiven 20 mM AAc und 20 mM AF aufgrund der strengen Cluster-Bildung die Ergebnisse mit der höchsten Reproduzierbarkeit zeigten. Der Abstand zwischen den analysierten Proben der anderen Additive ist deutlich höher, weshalb Extrakte mit diesen Additiven keine reproduzierbaren Ergebnisse generieren können. Die weitere Bewertung des Extraktionspotentials der Additive erfolgte anhand von Box-Plots. Wie auch bei der NTP Methode gilt es, das Extraktionsmitteladditiv zu identifizieren, das den höchsten Medianwert bei einer geringen Streuung der skalierten Intensitäten aufweist. In Abbildung 28 ist der Box-Plot für die NTNP Methode aufgeführt. Die Additive 5 mM AF und 20 mM AAc zeigen mit einer skalierten Intensität von 4,00 den höchsten Medianwert und damit verbunden das beste Extraktionspotential. Bei der Interpretation des PCA-Modells ist bereits aufgefallen, dass die Additive 20 mM AAa und AF eine sehr hohe Reproduzierbarkeit gezeigt haben. Aufgrund der hohen Reproduzierbarkeit, der geringen Streuung und des hohen Medianwertes zeigt das Additiv 20 mM AAc die besten Eigenschaften für die Extraktion unpolarer Metaboliten.

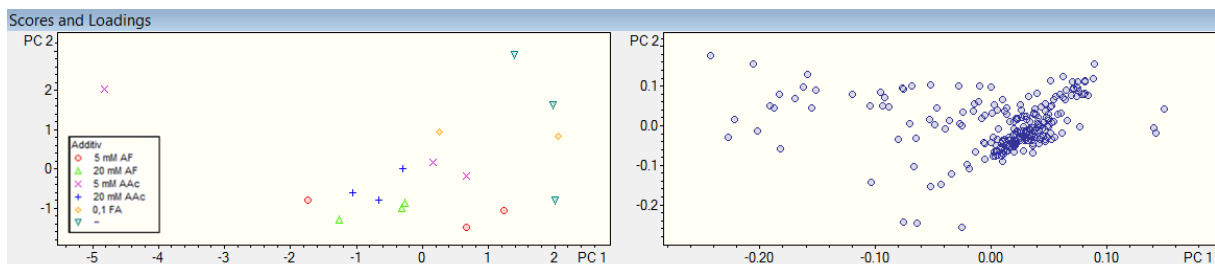


Abbildung 27: PCA-Modell unterschiedlicher getesteter Additive analysiert mit der NTNP Methode im positiven Ionenmodus (90//50).

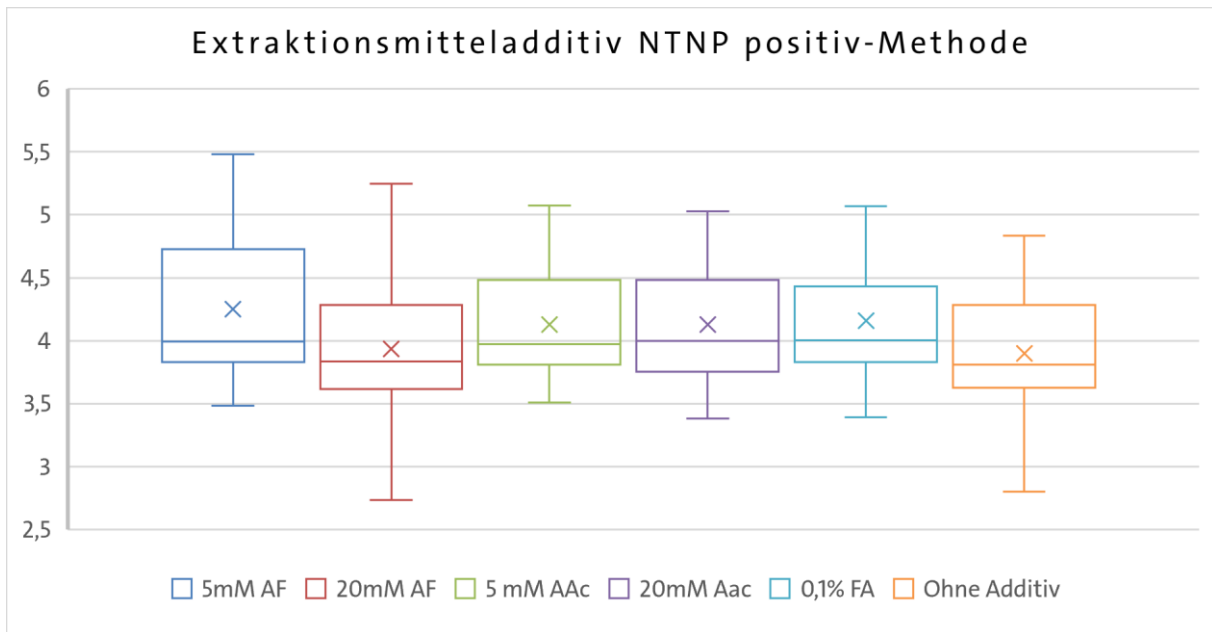


Abbildung 28: Box-plot Extraktionsmitteladditive der NTNP Methode im positiven Ionenmodus (Median: 5 mM AF: 4,00; 20 mM AF: 3,81; 5 mM AAc: 3,97; 20 mM AAc: 4,00; 0,1% FA: 3,99; kein Additiv: 3,84).

#### 5.1.1.4 LC Methode

Bei der Analyse von komplexen biologischen Systemen wie Kakao mit LC-MS Systemen kommt es zu vielen co-eluierenden Verbindungen. Durch co-eluierende Substanzen, die gemeinsam in die Ionenquelle des Massenspektrometers gelangen, kommt es zu Ionensuppression und damit verbunden zu einer geringeren detektierten Intensität und eine geringere Anzahl an detektierbaren Analyten.<sup>183</sup> Der Ionensuppression kann auf zwei Ebenen begegnet werden.<sup>157</sup> Zum einen können durch eine gezielte Extraktion unrelevante Matrixbestandteile abgetrennt werden oder die co-Elution von Verbindungen wird durch das flüssigchromatographische System minimiert. Bei der *non-targeted* Analyse eines biologischen Systems kann nicht, wie bei vielen *targeted* Ansätzen, ein Großteil der Matrix durch eine gezielte Extraktion abgetrennt werden, um die Ionensuppression zu reduzieren, weil bei der *non-targeted* Analyse das gesamte Spektrum der vorliegenden Matrix von Interesse ist. Daher ist die Entwicklung eines gezielten Extraktionsprotokolls bei *non-targeted* Analysen nicht zielführend, weshalb lediglich die Optimierung des flüssigchromatographischen Systems als Option zur Reduzierung der Ionensuppression besteht. Aus diesem Grund ist eine optimierte chromatographische Trennung von besonderem Interesse.

Für die polare und für die unpolare *non-targeted* Methode wurden umfangreiche Optimierungen des flüssigchromatographischen Systems durchgeführt. Hierbei wurden die Laufmittel, Art und Konzentration des Laufmitteladditivs, der Gradient, die Temperatur des Säulenofens und die

Fließgeschwindigkeit optimiert. Als Bewertungskriterien wurden eine gleichmäßige Verteilung der detektierten Signale über den gesamten chromatographischen Lauf sowie eine hohe Signalintensität und eine maximale Anzahl an detektierten Verbindungen bei einer möglichst kurzen Analysendauer definiert.

### 5.1.1.4.1 NTNP Methode

#### 5.1.1.4.1.1 Laufmittel

Im ersten Schritt der Optimierung des flüssigchromatographischen Systems wurde die Zusammensetzung des Laufmittels optimiert. Aufgrund des vorgegebenen polaren Charakters der Laufmittel bei RP-Systemen wurde Wasser für den Eluenten A ausgewählt. Im Zuge der Optimierung der Laufmittelzusammensetzung galt es, das Laufmittel B mit der besten chromatographischen Auflösung zu identifizieren.<sup>116</sup> Es wurden unterschiedliche Isopropanol-Acetonitril- und Isopropanol-Methanol-Mischungen hinsichtlich der chromatographischen Trennleistung analysiert. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Zusammensetzungen des Eluenten B sind im Anhang in Abbildung 69 bis Abbildung 72 dargestellt.

Die optimierte Methode sollte sowohl für die Matrix Kakaokern als auch für die Kakaoschale anwendbar sein. Daher wurden alle untersuchten Elutionsmittelzusammensetzungen sowohl für den Kakaokern als auch für die -schale getestet. In Tabelle 9 sind die Mittelwerte der Anzahlen an detektierten Verbindungen einer Dreifachbestimmung bei Verwendung unterschiedlicher Elutionsmittel dargestellt. Aufgrund der kürzeren Analysedauer, gekoppelt mit einer sehr guten chromatographischen Auflösung und einer sehr hohen Anzahl an detektierten Verbindungen, konnten die besten Ergebnisse mit einer Elutionsmittelzusammensetzung von Isopropanol/Acetonitril (3/2, v/v), dargestellt in Chromatogramm D der jeweiligen Abbildung, erhalten werden.

Ausgehend von den dargestellten Ergebnissen wurde bei den folgenden Analysen mit einer Elutionsmittelzusammensetzung von Isopropanol/Acetonitril (3/2, v/v) für das Elutionsmittel B gearbeitet.

Tabelle 9: Anzahl an detektierten Verbindungen bei unterschiedlichen Elutionsmittelzusammensetzungen.

Laufmittelzusammensetzung		Detektierte Verbindungen			
Acetonitril	A Kern Isopropanol/Acetonitril 1/1, v/v	Kern	2322	Schale	2001
	B Kern Isopropanol/Acetonitril 2/3, v/v		2406		2026
	C Kern Isopropanol/Acetonitril 3/1, v/v		2759		2240
	D Kern Isopropanol/Acetonitril 3/2, v/v		2540		2476
	E Kern Isopropanol/Acetonitril 4/1, v/v		2706		2553
Methanol	Kern Isopropanol/Methanol 3/1, v/v	Kern	2381	Schale	2487
	Kern Isopropanol/Methanol 3/2, v/v		2858		2742
	Kern Isopropanol/Methanol 4/1, v/v		2423		2287

#### 5.1.1.4.1.2 Laufmitteladditiv

In diesem Abschnitt sollte getestet werden, inwiefern sich 10 mM AF, 10 mM AAc oder ein Zusatz von 0,1 % Ameisensäure (FA, engl. *formic acid*) auf die Trennleistung und die Ionisierung der Analyten auswirken. Diese Additive eignen sich besonders für LC-MS-Applikationen, da sie sich in der ESI-Quelle verflüchtigen, ohne dabei auszukristallisieren.<sup>184</sup> Anschließend wurde die optimale Konzentration des Laufmitteladditives mit den besten Ionisierungseigenschaften ermittelt. Die Chromatogramme und *survey views* der Analysen von jeweils einer Kakaokern- und Kakaoschalenprobe für die unterschiedlichen Laufmitteladditive sind im Anhang in Abbildung 73 bzw. Abbildung 74 dargestellt. In einer umfangreichen Studie konnten Creydt et al. zeigen, dass ein Zusatz von 10 mM AF zum Elutionsmittel bei der Analyse von pflanzlichen Proben im positiven Ionenmodus die besten Ergebnisse für *non-targeted* Studien gezeigt hatte.<sup>185</sup>

Die Verwendung von 10 mM AAc als Laufmitteladditiv (Chromatogramm B) führt im Vergleich zu 10 mM AF (Chromatogramm A) sowohl bei den Kakaokern- als auch bei den Kakaoschalenproben zu Verlusten bei der Signalintensität wie in Abbildung 73 bzw. Abbildung 74 zu sehen ist. Der Verlust von Signalintensität bei Verwendung von AAc anstatt von AF ist auch in der Literatur beschrieben. Cajka et al. zeigten, dass es bei der *Lipidomics*-Analyse im positiven ESI-Modus unter Verwendung von AAc als Laufmitteladditiv zu sinkenden Signalintensitäten kommt.<sup>186</sup>

Die Verwendung von 0,1 % FA als Laufmitteladditiv scheint vor allem die Ionisation von Verbindungen, die bei Retentionszeiten von 12,5-15,5 min eluieren, massiv zu verschlechtern. Sowohl bei den Kakaokern- als auch bei den Kakaoschalenproben sind keine Signale bei diesen Retentionszeiten in den Chromatogrammen C in Abbildung 73 bzw. Abbildung 74 zu erkennen.

Bei LC-MS-Applikationen werden Puffer bzw. Laufmitteladditive aus zwei Gründen zugesetzt: Einerseits wird im Falle von Puffersalzen eine Stabilisierung des pH-Wertes der mobilen Phase gewährleistet, was zu einer höheren Reproduzierbarkeit führt, und andererseits können die Additive eine entscheidende Rolle bei der Ionisierung und Bildung von Pseudo-Molekülonen spielen.<sup>187</sup> Dies könnte als Erklärung für die fehlenden Signale bei dem Einsatz von Ameisensäure als Laufmitteladditiv dienen. Anhand der ebenfalls dargestellten *survey views* ist zu erkennen, dass bei Retentionszeiten von mehr als 13 min vorwiegend Verbindungen mit einem  $m/z$  von 800-1000 detektiert werden. Bei diesen Signalen handelt es sich um Fraktionen verschiedener Triacylglycerole, welche mit einem Ammoniumkation Pseudo-Molekülonen der Summenformel  $[M+NH_4]^+$  ausbilden.<sup>188</sup> Bei Verwendung von FA als Laufmitteladditiv ist die Bildung solcher Ammoniumaddukte nicht möglich, weshalb die Triacylglycerole in der ESI-Quelle keine stabilen Ionen bilden können. Folglich gelangen die Triacylglycerole auch nicht in das qToF-System und können nicht detektiert werden.

In Ergänzung zur Bewertung der detektierten Signalintensitäten erfolgt ein weiterer Auswertungsansatz anhand der Anzahl an detektierbaren Verbindungen bei der Verwendung unterschiedlicher Laufmitteladditive. In Tabelle 10 sind die Mittelwerte von jeweils drei Analysen mit den unterschiedlichen Laufmitteladditiven für die Kakaoschale und den -kern aufgeführt. Die Ergebnisse der Auswertung anhand der maximal detektierbaren Verbindungen deckten sich mit der Auswertung anhand der detektierten Signalintensität. Bei dem Laufmitteladditiv AF konnten mit 2656 detektierbaren Verbindungen für den Kakaokern und 2937 Verbindungen für die Kakaoschale jeweils die meisten Verbindungen detektiert werden. Aufgrund der maximalen Anzahl an detektierten Verbindungen und der höchsten Signalintensität wurde AF als Laufmitteladditiv der unpolaren Methode ausgewählt. Eine Verwendung von AF als das optimale Laufmitteladditiv wurde bereits in anderen Arbeiten beschrieben.<sup>186</sup>

Nachdem AF als das potenteste Laufmitteladditiv identifiziert werden konnte, erfolgt anschließend die Evaluierung der optimalen AF-Konzentration im Laufmittel. In Abbildung 75 und Abbildung 76 sind die Chromatogramme und *survey views* für Kakaokern und Kakaoschale bei veränderten AF-Konzentrationen aufgeführt. Anhand der Chromatogramme wird deutlich, dass die Konzentration des Laufmitteladditives sowohl einen Einfluss auf die Intensität als auch auf die Retentionszeit der Signale bewirkt. Der Intensitätsunterschied lässt sich anhand der Bildung von  $[M+NH_4]^+$ -Ionen in der Ionenquelle erklären. Liegen in der Quelle mehr Ammonium-Ionen vor, so

können auch mehr  $[M+NH_4]^+$ -Ionen gebildet werden und somit steigt die detektierte Signalintensität der Analyten mit der AF-Konzentration.

Durch die unterschiedlichen AF-Konzentrationen im Laufmittel ändert sich die Polarität der mobilen Phase, wodurch sich ebenfalls das Elutionsverhalten der Analyten verändert. Mit AF als ein ionisches Agens wird die Polarität des Laufmittels zum Hydrophilen verschoben. Hydrophobe Analyten zeigen daraufhin eine geringere Affinität zur mobilen Phase, sodass sich das Verteilungsgleichgewicht zwischen der mobilen und stationären Phase in Richtung stationärer verschiebt und es zu einer stärkeren Retardierung der Analyten kommt. Dieser Effekt ist umso stärker ausgeprägt, je höher die gewählte Pufferkonzentration ist. Einen entsprechenden Zusammenhang konnten Zhang et al. und Flieger in ihren Veröffentlichungen über den Zusatz von solvatisierten, ionischen Verbindungen zur mobilen Phase eines flüssigchromatographischen Systems zeigen.<sup>189, 190</sup>

Aufgrund der starken Intensitätsverluste und der deutlich niedrigeren Anzahl an detektierten Verbindungen wurde der Ansatz mit einer Pufferkonzentration von 5 mM AF im Elutionsmittel ausgeschlossen (vgl. Abbildung 76; Chromatogramm B). Die Analyse mit einer Pufferkonzentration von 15 mM AF führte zu einer Zunahme der detektierten Intensität, die jedoch im Falle der Lipidfraktionen (RT 14-18 min) der Kakaokernprobe die Detektorgrenze überschreitet (s. Abbildung 75; Chromatogramm C). In den dargestellten Chromatogrammen ist jeweils das Signal mit der höchsten Intensität zu jeder Zeiteinheit, das *Base Peak Chromatogramm*, dargestellt. Durch die Zunahme der Signalintensitäten der jeweils intensivsten Signale bei einer Erhöhung der Pufferkonzentration kommt es jedoch zunehmend zu einer steigenden Ionensuppression in der Ionenquelle, sodass potenziell Verbindungen niedriger Intensität nicht mehr detektiert werden können. Dieser Zusammenhang zwischen der Pufferkonzentration im Elutionsmittel und der Anzahl an detektierbaren Verbindungen bei der Verwendung von massenspektrometrischen Systemen mit ESI-Quelle wurde bereits von Garcia et al. beschrieben und konnte auch beim vorliegenden Beispiel beobachtet werden.<sup>191</sup> Obwohl die Erhöhung der Pufferkonzentration zu intensiveren Signalen führt, konnten bei der Analyse mit 15 mM AF im Elutionsmittel über 500 Verbindungen weniger detektiert werden als bei den Analysen mit 10 mM AF (vgl. Tabelle 10).

Aus den dargelegten Gründen wurden die folgenden Analysen mit einer AF-Konzentration im Elutionsmittel von 10 mM durchgeführt.

Tabelle 10: Detektierte Verbindungen bei den unterschiedlichen verwendeten Laufmitteladditiven und Laufmitteladditivkonzentrationen.

Additiv	Detektierte Verbindungen			
10 mM AF	Kern	2625	Schale	2937
10 mM AAc		1545		1139
0,1 % FA		1041		999
Konzentration des Additivs				
5 mM AF	Kern	2052	Schale	2088
15 mM AF		2136		2270

#### 5.1.1.4.1.3 Gradient

Im Anschluss an die Optimierung der Elutionsmittelzusammensetzung und des Elutionsmitteladditives wurde der Gradient des flüssigchromatographischen Systems überarbeitet. Hierbei galt es, die Analysendauer bei gleichbleibender chromatographischer Auflösung und ohne den Verlust von detektierbaren Verbindungen zu reduzieren. Die analysierten Gradienten sind in Tabelle 11 aufgeführt und die Ergebnisse der Analyse von Kakaokern- und Kakaoschalen im Anhang in Abbildung 77 und Abbildung 78 einzusehen. Ausgehend von Gradient 1 wurde der Anteil des Elutionsmittels B (Isopropanol/Acetonitril 3/2) immer weiter erhöht, sodass die Retardierung der unpolaren Analyten abnahm und die Elution beschleunigt wurde. Bei den Gradienten 1 und 2 (s. Abbildung 77 und Abbildung 78; Chromatogramme A und B) eluieren die Analyten noch nach dem Kalibriersegment der Methode bei 21 Minuten. Ab diesem Punkt beginnt bereits die Rekalibrierung des Systems, sodass die Analyten nach dem Kalibriersegment bei der Auswertung nicht miterfasst werden. Demnach müsste die Laufzeit der Methode bei diesen beiden Gradienten weiter erhöht werden, damit alle Analyten innerhalb des Elutionszeitraums der Methode erfasst werden. Das Ziel der Überarbeitung des Gradientens war jedoch eine Verkürzung der Analysendauer, weshalb die Gradienten 1 und 2 aufgrund der langen Analysendauer nicht für einen großen Probendurchsatz geeignet sind.

Weiterhin wurde die Anzahl an detektierbaren Verbindungen bei den unterschiedlichen Gradienten analysiert (vgl. Tabelle 12). Die Anzahl der detektierbaren Verbindungen unterscheidet sich zwischen den vier unterschiedlichen, evaluierten Gradienten nur gering. Die besten Ergebnisse konnten mit dem Gradienten 1 erzielt werden, da hier die Analyten über den längsten Zeitraum eluieren. Allerdings konnten beim Gradienten 4 nur ca. 10 Verbindungen weniger als bei den analysierten Kakaokernproben und 100 Verbindungen bei den analysierten Kakaoschalenproben

detektiert werden. Die gewonnene Zeitersparnis beim Gradienten 4 im Vergleich zum Gradienten 1 überwiegt hierbei gegenüber der marginal geringeren Anzahl an detektierten Verbindungen.

Aus den dargelegten Gründen wurde der Gradient 4 für die weiteren Analysen verwendet, da bei diesem Gradienten eine maximale chromatographische Auflösung bei einer minimalen Analysendauer zu beobachten war.

Tabelle 11: Darstellungen der analysierten Gradienten.

Gradient 1			Gradient 3		
Zeit [min]	A* [%]	B* [%]	Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	35	65	0	35	65
2	35	65	2	35	65
5	10	90	5	15	85
15	0	100	10	0	100
21	0	100	21	0	100
21,1	35	65	21,1	35	65
25	35	65	25	35	65
Gradient 2			Gradient 4		
Zeit [min]	A [%]	B [%]	Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	35	65	0	35	65
2	35	65	2	35	65
7	10	90	4	15	85
15	0	100	8	0	100
21	0	100	21	0	100
21,1	35	65	21,1	35	65
25	35	65	25	35	65

\*A: Wasser + 10 mM AF; B: Isopropanol/Acetonitril 3/2, v/v + 10 mM AF

Tabelle 12: Anzahl an detektierten Verbindungen bei unterschiedlichen Gradienten

Gradienten	Detektierte Verbindungen			
Gradient 1	Kern	2000	Schale	2151
Gradient 2				2096
Gradient 3				2092
Gradient 4				2046



### 5.1.1.4.1.4 Temperatur und Fließgeschwindigkeit

Die ersten Messungen wurden mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,35 mL/min und einer Säulentemperatur von 40 °C durchgeführt.<sup>85</sup> Für die Analysen der vorliegenden Arbeit stand ein Dionex™ UltiMate™ 3000 HPLC-System der Firma Thermo Scientific zur Verfügung, welches einen maximalen Druck von 620 bar zulässt. Der Gegendruck der HPLC lag bei den Analysen mit den originären Einstellungen bereits bei über 500 bar. Da aufgrund des maximalen Drucks der HPLC-Apparatur kein Handlungsspielraum für eine Optimierung der Fließgeschwindigkeit und der Säulenofentemperatur gegeben war, wurden keine weiteren Messungen mit abweichenden Einstellungen durchgeführt.

Die originäre Einstellung der Säulenofentemperatur von 40 °C und einer Flussrate von 0,35 mL/min wurden beibehalten.

### 5.1.1.4.2 NTP Methode

#### 5.1.1.4.2.1 Laufmittel

Als stationäre Phase wurde für die NTP Methoden eine ANP-Phase (s. Abschnitt 3.4.1.3) verwendet. Im Gegensatz zur klassischen Normalphasenchromatographie ist es bei der verwendeten Cogent Diamond Hydride™ Chromatographiesäule möglich, eine wässrige mobile Phase zu verwenden. Dies wird durch das Einbringen von Hydrid-Gruppen und langen Kohlenstoffketten auf das Säulenmaterial ermöglicht.<sup>192</sup> Als Laufmittel A wurde daher Wasser verwendet. Bei der Auswahl des Laufmittels B wurde für diese stationäre Phase in der Literatur meist Acetonitril oder ein Acetonitrilgemisch mit Methanol oder Isopropanol verwendet.<sup>127, 193, 194</sup> Zur Evaluierung der geeignetsten Zusammensetzung des Laufmittels B wurden unterschiedliche Mischungen aus Acetonitril, Methanol und Isopropanol analysiert. Bei allen Mischungen wurde überwiegend Acetonitril verwendet, da in der Literatur hiermit die besten Ergebnisse erzielt werden konnten. Als Erweiterung zu der unpolaren Methode erfolgte die Detektion bei der polaren Methode sowohl im positiven als auch im negativen Ionenmodus. Die Ergebnisse der Elutionsmittelloptimierung sind im Anhang in Abbildung 79 bis Abbildung 82 dargestellt. Neben den Chromatogrammen ist jeweils der korrespondierende *survey view* aufgeführt.

Bei der Verwendung von reinem Acetonitril als Laufmittel B konnte für alle vier Methoden (Kakaoschale und Kakaokern jeweils im positiven und negativen Ionenmodus) die höchste Anzahl an detektierbaren Verbindungen und die beste chromatographische Auflösung erhalten werden (vgl. Tabelle 13). Im Gegensatz zu Isopropanol und Methanol weist Acetonitril keinen protischen

Charakter auf. Dieser Unterschied zwischen den Elutionsmitteln könnte Grund für bessere Retardierung der Analyten mit Acetonitril sein. Dies steht in Bezug zu anderen Arbeiten, bei denen eine höhere Konzentration des protischen Lösungsmittels Methanol zu einer kürzeren Retardierung und damit zu einer schlechteren chromatographischen Auflösung führte.<sup>130</sup> Gemäß der Löslichkeitsparameter nach HANSEN (s. Tabelle 4) zeigt Acetonitril weiterhin die geringste Polarität. Dies könnte ergänzend zu dem aprotischen Charakter für die besten Retardierungseigenschaften bei der Verwendung einer ANP-Phase verantwortlich sein.

Aus diesen Gründen konnte reines Acetonitril als das geeignetste Elutionsmittel B identifiziert werden.

Tabelle 13: Anzahl an detektierten Verbindungen bei der Elutionsmitteloptimierung der NTP Methode.

Elutionsmittelzusammensetzung	Detektierte Verbindungen					
		pos. Ionenmodus	neg. Ionenmodus		pos. Ionenmodus	neg. Ionenmodus
Acetonitril	Kein	1868	504	Schale	1789	521
Acetonitril/Isopropanol 5/1, v/v		1411	434		1322	406
Acetonitril/Isopropanol 9/1, v/v		1486	483		1294	461
Acetonitril/Methanol 5/1, v/v		1385	355		1289	351
Acetonitril/Methanol 9/1, v/v		1543	416		1307	389

#### 5.1.1.4.2.2 Gradient

Für die Optimierung der NTP Methode wurden zehn verschiedene Gradienten auf ihre chromatographische Auflösung und die Anzahl detektierbarer Verbindungen getestet. Hierbei wurden die jeweiligen Erkenntnisse, welche durch die Analyse der ersten Gradienten gewonnen werden konnten, in die Entwicklung der folgenden gesteckt. Die evaluierten Gradienten sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Als Weiterentwicklung der Normalphasenchromatographie folgt die ANP-Chromatographie den gleichen Grundprinzipien. Je höher der Anteil an unpolaren Elutionsmitteln, desto stärker werden die polaren Analyten retardiert. Diese Aussage lässt sich durch Ergebnisse von Gradient 8 bestätigen, bei dem über die ersten 15 Minuten ausschließlich Acetonitril als mobile Phase verwendet wurde. Die Ergebnisse des Gradienten 8 sind im Anhang in Abbildung 83 bis Abbildung 86 jeweils in Chromatogramm H dargestellt. Nahezu alle Analyten eluierten erst nachdem Wasser der mobilen Phase nach 15 min zugeführt wurde. Die Ergebnisse des Gradienten 8 zeigen zwar die beste Retardierung der Analyten, jedoch auch die schlechteste chromatographische

Auflösung. Nahezu alle Analyten eluieren bei diesem Gradienten innerhalb von ca. 1 min. Demnach verlängert sich die Retentionszeit bei einer Analyse mit reinem Acetonitril, allerdings ist ein geringer Prozentsatz von Wasser vonnöten, um eine Trennung der Analyten herbeizuführen. Daher wurden weitere Gradienten mit unterschiedlich starken Zunahmen des wässrigen Teils in der mobilen Phase über unterschiedliche Zeiteinheiten evaluiert. Ausgehend von Gradient 1 bis hin zu Gradient 7 erfolgte eine immer geringere Zugabe von Wasser zur mobilen Phase. Bei dem Gradienten 7 (Chromatogramm G) konnte eine stetige Elution der Analyten über einen Zeitraum von mehr als 15 min und eine maximale chromatographische Auflösung erhalten werden.

Die gute chromatographische Auflösung von Gradienten 7 konnte durch die Auswertung der detektierbaren Verbindungen bestätigt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 dargestellt. Bei allen Methoden konnte für den Gradienten 7 die maximale Anzahl an detektierbaren Verbindungen erfasst werden.

Aufgrund der maximalen chromatographischen Auflösung und der höchsten Anzahl an detektierbaren Verbindungen wurden die weiteren Analysen mit dem Gradienten 7 durchgeführt.

Tabelle 14: Anzahl an detektierten Verbindungen bei der Gradientenoptimierung der NTP Methode.

Gradient	Detektierte Verbindungen					
	positiver Ionenmodus		negativer Ionenmodus		negativer Ionenmodus	
Gradient 1	Kern	2177	538	Schale	1864	535
Gradient 2		1667	245		1683	399
Gradient 3		2589	556		2338	544
Gradient 4		2179	612		1912	557
Gradient 5		2470	610		1937	577
Gradient 6		2374	621		2038	582
Gradient 7		2806	746		2369	627
Gradient 8		1219	230		1390	327
Gradient 9		2272	558		1818	482
Gradient 10		1998	566		1673	412

## Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 15: Getestete Gradienten für die Optimierung der chromatographischen Trennung für die NTP Methode; Eluent A: H<sub>2</sub>O + 5 mM FA; Eluent B: ACP + 5 mM FA.

Gradient 1			Gradient 2			Gradient 3		
Zeit [min]	Eluent A* [%]	Eluent B* [%]	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	0	100	0	0	100	0	0	100
2	0	100	2	0	100	2	0	100
5	40	60	3,5	40	60	8	40	60
8	40	60	8	40	60	12,5	40	60
15	100	0	15	100	0	15	100	0
19,8	100	0	19,8	100	0	19,8	100	0
20	0	100	20	0	100	20	0	100
24	0	100	24	0	100	24	0	100
Gradient 4			Gradient 5			Gradient 6		
Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	0	100	0	0	100	0	0	100
2	0	100	2	0	100	2	0	100
10	40	60	3,5	20	80	5	20	80
14,5	40	60	8	20	80	8	20	80
17	100	0	15	100	0	15	100	0
19,8	100	0	19,8	100	0	19,8	100	0
20	0	100	20	0	100	20	0	100
24	0	100	24	0	100	24	0	100
Gradient 7			Gradient 8			Gradient 9		
Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	0	100	0	0	100	0	10	90
2	0	100	15	0	100	2	10	90
8	20	80	15,5	100	0	5	40	60
12,5	20	80	19,8	100	0	8	40	60
15	100	0	20	0	100	15	100	0
19,8	100	0	24	0	100	19,8	100	0
20	0	100				20	10	90
24	0	100				24	10	90
Gradient 10								
Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]						
0	5	95						
2	5	95						
8	40	80						
12,5	40	80						
15	100	0						
19,8	100	0						
20	5	95						
24	5	95						

\*A: Wasser + 0,1% HAc; \*B: Acetonitril + 0,1% HAc

5.1.1.4.2.3 Laufmitteladditiv

In diesem Abschnitt wurde der Einfluss des Zusatzes von 1 mM AF, 0,1 % FA und 0,1 % Essigsäure (HAc, engl. *acetic acid*) auf die Trennleistung und die Ionisierung bei der NTP Methode analysiert. Erste Versuche mit einer Pufferkonzentration von 5 mM AF als Laufmitteladditiv wurden aufgrund einer Verstopfung der Säule durch die hohe Pufferkonzentration verworfen. Durch eine Reduktion der Pufferkonzentration auf 1 mM AF konnte ein Druckanstieg umgangen werden, während die Möglichkeit der Bildung von Ammonium-Addukten während der Ionisierung weiterhin gegeben war. Die Ergebnisse zur Analyse des optimalen Laufmitteladditivs sind im Anhang in Abbildung 87 bis Abbildung 90 aufgeführt.

Der Vorteil der verwendeten Additive beruht auf der Eigenschaft kompatibel mit einer LC-MS-Applikationen zu sein.<sup>131,184</sup> Zur Bewertung der Laufmitteladditive wurde die Anzahl an detektierbarer Verbindungen untersucht. Bei der Analyse der Kakaokernproben konnten im positiven Ionenmodus für AF und FA als Additive ca. 50 Verbindungen mehr detektiert werden als beim Verwenden von HAc (vgl. Tabelle 16). Bei den Kakaoschalenproben konnten wiederum bei den Analysen mit HAc ca. 150 Verbindungen mehr detektiert werden als bei AF und ca. 250 mehr als bei FA. Da das Ziel dieser Arbeit die Identifizierung von Kakaoschalen-Schlüsselmetaboliten war, wurde besonderer Wert auf eine erhöhte Anzahl an detektierten Verbindungen bei der Kakaoschale gelegt. Analog dazu konnten die identischen Ergebnisse bei der Analyse im negativen Ionenmodus detektiert werden. Hier wurden bei der Analyse der Kakaoschale ebenfalls bei der Verwendung von HAc als Additiv die meisten Verbindungen detektiert.

Aufgrund der höheren Signalintensitäten und der maximalen Anzahl an detektierten Verbindungen in der Kakaoschale wurde für die weiteren Analysen 0,1 % HAc als Elutionsmitteladditiv verwendet. Eine Verwendung von Essigsäure als optimales Elutionsmitteladditiv für die Analyse polarer Metaboliten wurde bereits in der Literatur beschrieben.<sup>130</sup>

Tabelle 16: Anzahl an detektierten Verbindungen bei unterschiedlichen Elutionsmitteladditiven.

	Elutionsmitteladditiv	Detektierter Verbindungen	
		Positiver Ionenmodus	Negativer Ionenmodus
Kern	1 mM AF	2449	724
	0,1% HAc	2399	688
	0,1% FA	2455	455
Schale	1 mM AF	2057	585
	0,1% HAc	2191	598
	0,1% FA	1954	391

Die Verwendung von HAc als Elutionsmitteladditiv führte zu einer stärkeren Retardierung der Analyten, weshalb der Gradient bei gleichbleibender chromatischer Auflösung weiter verkürzt werden konnte. Durch eine Kürzung der *Ramp*-Phase zu Beginn der Methode konnte der Gradient um 4 Minuten gekürzt werden. Der resultierende Gradient ist in Tabelle 17 aufgeführt. Die Reduktion der Gradientendauer konnte ohne Verluste der detektierten Signale und der chromatographischen Auflösung durchgeführt werden. In Abbildung 91 sind die Chromatogramme des aktualisierten Gradienten 11 der Kakaoschale und des Kakaokern im positiven und negativen Ionenmodus aufgeführt.

Tabelle 17: Gradient 11 der NTP Methode.

Gradient 11		
Zeit [min]	Eluent A* [%]	Eluent B* [%]
0	0	100
2	0	100
4	20	80
9,5	20	80
12	100	0
16,8	100	0
17	0	100
21	0	100

\*A: Wasser + 0,1 % HAc; \*B: Acetonitril + 0,1 % HAc

#### 5.1.1.4.2.4 Temperatur

Die Veränderung der Säulenofentemperatur wird oft als Parameter zur Kontrolle der Retentionszeit und Verbesserung der Peakform genutzt. In typischen RP-Experimenten nimmt die Retardierung der Analyten mit Zunahme der Temperatur ab.<sup>195</sup> Begründet liegt dies zum einen in der verringerten Viskosität der mobilen Phase und dem dadurch reduzierten Gegendruck und zum anderen ändern sich die Diffusionsprozesse, welche wiederum einen Einfluss auf die VAN-DEETMER-Gleichung ausüben.<sup>196</sup> Zwar verstärkt eine zunehmende Temperatur die Longitudinaldiffusion (negativer, Peak-verbreiternder Effekt), aber verringert zeitgleich den Term des Massentransfers und führt so zu einer schnelleren Elution. Dabei ist der Einfluss der Longitudinaldiffusion eher gering und oftmals vernachlässigbar.<sup>195</sup> Jedoch ist eine Verbesserung der Trennleistung durch eine erhöhte bzw. niedrigere Temperatur individuell auf die jeweilige Trennproblematik anzupassen.

Für die Optimierung der Säulenofentemperatur wurden die Temperaturen 25 °C, 30 °C, 40 °C, 45 °C und 50 °C bezüglich des Einflusses auf die Retentionszeit der Analyten und die

chromatographische Auflösung getestet. Die maximale Temperaturbelastung der verwendeten Chromatographiesäule liegt bei 60 °C.<sup>197</sup> Um eine Beschädigung des Säulenmaterials durch die Temperatureinwirkung auszuschließen, wurde mit einer maximalen Säulenofentemperatur von 10 °C weniger als dem vom Hersteller vorgegebenen Maximalwert gearbeitet.

Wie bereits eingehend beschrieben führt die Verwendung von höheren Säulenofentemperaturen zu einer schnelleren Elution der Analyten. Dies zeigt sich beispielhaft im Retentionsbereich zwischen 6,5 min bis 8,0 min (vgl. Abbildung 92 und Abbildung 93). Neben der beobachteten schnelleren Elution kommt es durch die Erhöhung der Temperatur auch zu einer Verbesserung der chromatographischen Auflösung. Die Retardierung der Analyten nimmt stoffspezifisch mit dem Temperaturanstieg unterschiedlich stark zu oder ab. Diese Beobachtungen konnten bei der verwendeten stationären Phase in Experimenten mit unterschiedlichen Aminosäuren ebenso nachgewiesen werden.<sup>130</sup> Gemäß Pesek et al. kann dies entweder durch eine Enthalpie-Veränderung, durch die veränderten Wechselwirkungen der gelösten Stoffe mit der stationären Phase oder zusätzlich durch die Entropie des Systems hervorgerufen werden. Eine andere Studie dokumentiert die Temperatureffekte auf die Trennleistung von Phenolsäuren. Hier konnte sowohl eine Zu- als auch eine Abnahme der Retentionszeit beobachtet werden, sodass sich die Retentionsreihenfolge zweier Phenolsäuren (Syringasäure und 4-Hydroxyphenylelessigsäure) bei einem Temperaturanstieg von 40 °C auf 60 °C geändert hat.<sup>198</sup> Durch die unterschiedliche zeitliche Veränderung der Elution ergeben sich durch die Temperaturkontrolle neue Möglichkeiten zur Verbesserung der Trennleistung. Zudem führen höhere Temperaturen zu einer verringerten Viskosität und einem schnelleren Massentransfer, was zu einer Reduzierung der Peakbreite führt.<sup>195</sup> Dies liefert ein weiteres Mittel zur Verbesserung der chromatographischen Auflösung in Abhängigkeit von der Retention und Diffusion in Bezug auf die stationäre Phase.<sup>130</sup>

Die Anzahl der detektierten Verbindungen war bei allen getesteten Säulentemperaturen nahezu identisch (s. Tabelle 18). Aufgrund der verbesserten Peakform und chromatographischen Auflösung bei einer erhöhten Säulenofentemperatur wurden die folgenden Analysen bei einer Säulentemperatur von 50 °C durchgeführt.

Tabelle 18: Anzahl an detektierten Verbindungen bei unterschiedlichen Säulenofentemperaturen im positiven Ionenmodus.

Säulenofentemperatur [°C]	Detektierte Verbindungen			
25	Kern	1484	Schale	1437
30		1428		1336
40		1311		1367
45		1388		1323
50		1471		1396

#### 5.1.1.4.2.5 Fließgeschwindigkeit

Für die Optimierung der Fließgeschwindigkeit wurden die Flussraten von 400 µL/min, 500 µL/min und 600 µL/min bezüglich des Einflusses auf die Retentionszeit der Analyten und die chromatographische Auflösung getestet. Durch die Erhöhung der Fließgeschwindigkeit war eine schnellere Elution und eine Abnahme der Peakbreite zu erwarten. Diese Ergebnisse konnten sowohl für die Kakaokern- und Kakaoschalenproben im negativen als auch im positiven Ionenmodus bestätigt werden (vgl. Abbildung 96 bis Abbildung 99). Callahan et al. beschrieb bei einer erhöhten Flussrate eine Abnahme der Signalintensität und Reduzierung der detektierten Verbindungen.<sup>194</sup> Diese Beobachtungen konnten bei den durchgeführten Analysen nicht bestätigt werden. Es konnte bei allen Flussraten nahezu die gleiche Anzahl an Verbindungen detektiert werden (vgl. Tabelle 20). Aufgrund der früheren Elution der Analyten durch die Erhöhung der Flussrate konnte der Gradient um eine weitere Minute gekürzt werden. Der finale Gradient (Gradient 12) der NTP Methode ist in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Gradient 12 der NTP Methode.

Gradient 12		
Zeit [min]	Eluent A* [%]	Eluent B* [%]
0	0	100
2	0	100
4	20	80
9,5	20	80
12	100	0
15,8	100	0
16	0	100
20	0	100

\*A: Wasser + 0,1 % HAc; \*B: Acetonitril + 0,1 % HAc



Tabelle 20: Anzahl an detektierten Verbindungen bei unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten.

Fließgeschwindigkeit [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	Detektierte Verbindungen					
		positiver Ionenmodus	negativer Ionenmodus		positiver Ionenmodus	negativer Ionenmodus
400	Kein	1471	-	Schale	1396	-
500		1634	446		1391	378
600		1689	482		1362	390

### 5.1.1.5 MS Methode

Auch das massenspektrometrische System wurde für die *non-targeted* Analyse der Kakaoschale und des Kakaokerns optimiert. Neben der Optimierung der *transition time* und der *pre pulse storage* galt es vorrangig, die Quellenparameter, welche für die Ionisierung der Analyten maßgeblich sind, zu optimieren. Bei der Optimierung der Parameter für die polaren Extrakte wurden sowohl Kakaokern- als auch Kakaoschalenextrakte verwendet, um überprüfen zu können, ob die Optimierung der Parameter auf beide Matrices den gleichen Effekt hat. Da die Ergebnisse bei nahezu allen Parametern für beide Matrices identisch ausfielen, wurde bei der Optimierung der MS-Parameter für die unpolaren Extrakte nur noch eine Probenmatrix eingesetzt. Hier wurden ganze Kakaobohnen verwendet, sodass sowohl die Analyten der Kakaoschale als auch des Kakaokerns vertreten waren. Durch die Verwendung eines einzelnen Probenextraktes konnte die benötigte Messzeit um die Hälfte reduziert werden. Abgesehen von dem Einsatz ganzer Kakaobohnen wurde die Probenvorbereitung und Extraktion gemäß dem angegebenen Extraktionsprotokoll in Abschnitt 6.2 durchgeführt. Um den Einfluss der optimierten Parameter gesondert zu erfassen, wurde bei der Optimierung immer lediglich ein Parameter verändert, damit die Auswirkungen der Veränderung direkt diesem Parameter zugeordnet werden konnten.

Optimierte Parameter:

- *Capillary voltage*: Hierbei handelt es sich um die an der Kapillare angelegte Spannung, die maßgeblich zur Ionenbildung beiträgt.
- *Endplate voltage*: Die *end plate voltage* steht für die am *spray shield* angelegte Spannung. Hierbei handelt es sich um die Gegenelektrode zur Kapillare.
- *Nebulizer gas*: Bei pneumatisch unterstützten ESI-Grenzflächen wird die aus der Kapillare austretende mobile Phase mit Hilfe eines *nebulizer gas* zerstäubt. Das *nebulizer gas*, wofür meistens Stickstoff verwendet wird, umströmt die Kapillare und hilft bei der Aerosolbildung (vgl. Abschnitt 3.4.2.2) und kann durch unterschiedliche Druckeinstellungen angepasst werden.

- *Dry gas*: Das *dry gas* wird der Ionenquelle zugeführt und trägt zur Evaporation des Lösungsmittels bei. Als *dry gas* wird vornehmlich Stickstoff verwendet und die Steuerung der Evaporation des Lösungsmittels kann über den Volumenstrom und die Temperatur des Gases erfolgen.
- *Transition time* und *pre pulse storage*: Das verwendete qToF-System ist mit einem Hexapol ausgestattet, welches als *ion cooler* die kinetische Energie der Ionen verringert, die Ionen sammelt und als Ionenpakete in den Beschleuniger des ToF entlässt. Für die Steuerung des Hexapols sind zwei Einstellungen bedeutsam: Die *transition time* ist das Zeitfenster, in dem die Ionen-Bündel vom Hexapol an den ToF-Analysator übermittelt werden, und die *pre pulse storage* bezeichnet die Zeit zwischen der *transition time* und dem Moment, in dem die Ionen durch den orthogonal Beschleuniger gepulst werden.<sup>199,200</sup> Aufgrund des Zusammenwirkens der beiden Parameter wurden diese simultan optimiert.

Analog zur Auswertung der LC-Optimierung wurde auch in diesem Abschnitt eine Auswertung anhand der Anzahl an detektierten Verbindungen und anhand der detektierten Signalintensität durchgeführt. Für alle Einstellungen wurde jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Ergebnisse der detektierten Verbindungen sind für alle Methoden und Parameter in der Tabelle 21 aufgeführt. Die Einstellungen der jeweils optimierten Parameter mit den besten erzielten Ergebnissen sind grün hervorgehoben und wurden für die NTNP und NTP Methoden übernommen.

Tabelle 21: Anzahl an detektierten Verbindungen bei unterschiedlichen Einstellungen des massenspektrometrischen Systems für die NTNP und die NTP Methoden.

Parameter	Einstellung	Detektierte Verbindungen				
		NTNP	NTP			
			Positiver Ionenmodus		Negativer Ionenmodus	
			Kakaokern	Kakaoschale	Kakaokern	Kakaoschale
Capillary voltage [V]	2500	965	1603	1660	548	429
	3000	1878	1967	1529	681	536
	3500	1919	2205	1841	780	608
	4000	-	2504	2049	847	680
Enplate voltage [V]	400	1422	1786	1350	623	489
	500	1878	1967	1529	681	536
	600	1536	2041	1562	699	539

Parameter	Einstellung	Detektierte Verbindungen				
		NTNP	NTP			
			Positiver Ionenmodus		Negativer Ionenmodus	
			Kakaokern	Kakaoschale	Kakaokern	Kakaoschale
Nebulizar gas [bar]	3	1856	1883	1346	629	551
	4	1878	1967	1529	681	536
	5	1277	1947	1457	806	682
Dry gas [L/min]	8	1358	2073	1579	657	744
	9	1878	1967	1529	681	536
	10	1439	1793	1275	691	626
Dry gas [°C]	150	1942	1897	1296	782	672
	250	1878	1967	1529	681	536
	300	1657	1888	1618	729	575
Transition time / pre pulse storage [µs]	60 / 5	1878	1967	1486	681	536
	80 / 7	1866	2061	1529	554	502
	100 / 9	1738	1625	1491	388	411

#### 5.1.1.5.1 Zusammenfassung der non-targeted Methodenoptimierung

Die optimierten Einstellungen des LC-MS Systems für die NTNP und die NTP Methode sind im Abschnitt Material und Methoden in Tabelle 45 bis Tabelle 48 aufgeführt. Durch die umfangreichen Optimierungen konnte die Anzahl an detektierbaren Verbindungen in den Kakaoschalen- und Kakaokernproben für jede Methode deutlich erhöht werden. Bei der NTNP Methode konnte die Anzahl an detektierten Verbindungen von ca. 2200 auf über 3300, für die NTP Methode im positiven Ionenmodus von ca. 1600 auf über 2600 und im negativen von ca. 700 Verbindungen auf über 1500 erhöht werden (vgl. Abschnitt 5.1.1.2 und 5.2.6). Durch die Erhöhung der Anzahl an detektierbaren Verbindungen wurde die Chance, Verbindungen identifizieren zu können, welche in der Kakaoschale mit einer hohen Intensität und im Kakaokern nicht oder nur in geringer Konzentration nachweisbar sind, deutlich erhöht.

### 5.1.2 Targeted LC-MS Method

#### 5.1.2.1 Extraktion

Bei der NTNP Methode wurde als Extraktionsmittel ein Gemisch aus Isopropanol und Chloroform (3/2, v/v) verwendet. Das hierbei verwendete Chloroform ist als potenziell krebserregend eingestuft,<sup>201</sup> weshalb nach § 6 Abs. 1 Gefahrstoffverordnung (GefStoffV) eine Ersatzstoffprüfung durchgeführt werden sollte. Aus diesem Grund wurden unterschiedliche Extraktionsmittelgemische auf ihr Extraktionsvermögen gegenüber den Schlüsselmetaboliten

(vgl. Tabelle 22) untersucht. Abgesehen von den abweichenden Extraktionsmittel wurde die Extraktion analog zur NTNP Methode durchgeführt. Für jede Extraktionsmittelzusammensetzung wurde eine Dreifachbestimmung einer Kakaoschalenprobe analysiert. Die Analysen wurden mit der in Abschnitt 6.7 dargestellten Methode an einem LC-ESI-QqQ-System durchgeführt.

Um die optimale Extraktionsmittelzusammensetzung zu bestimmen, wurde folgendes Auswertungsschema verwendet: Der Mittelwert der detektierten Signalflächen der Dreifachbestimmung von den Schlüsselmetaboliten wurde für jede Extraktionsmittelzusammensetzung berechnet und der Größe nach absteigend sortiert, sodass für jeden Schlüsselmetaboliten die geeignetsten Extraktionsmittelzusammensetzungen in absteigender Reihenfolge dargestellt wurden. Die Extraktionsmittelzusammensetzung mit der höchsten Signalfläche, also dem besten Extraktionsvermögen für das jeweils betrachtete Schlüsselmetabolit, hat die Wertung eins bekommen und analog dazu folgend die mit der zweihöchsten Signalfläche die Wertung zwei usw.

Abschließend wurde die Summe der Wertungen für die Extraktionsmittelzusammensetzungen aller Schlüsselmetaboliten gebildet und als Bewertungsgrundlage für das Extraktionsvermögen herangezogen. Je niedriger die Summe der Wertungen einer Extraktionsmittelzusammensetzung ausfiel, desto höher das Extraktionsvermögen für die Schlüsselmetaboliten.

Die Ergebnisse der Extraktionsmitteloptimierung sind in Tabelle 22 aufgeführt. In der Tabelle sind einige Extraktionsmittelzusammensetzungen mit halogenierten Kohlenwasserstoffen (Ansatz 1-4) aufgeführt, die lediglich als Vergleich für das Extraktionsvermögen gegenüber den halogenfreien Lösungsmitteln anzusehen sind und die aufgrund der Toxizität nicht für die Verwendung in Frage kommen.

Daher wurde die Auswertung der Extraktionsmitteloptimierung erneut ohne die halogenierten Extraktionsmittel durchgeführt. Die Ergebnisse der Auswertung sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

Wie der Tabelle 23 zu entnehmen ist, konnten die besten Extraktionsergebnisse mit einem MTBE/ISO-Gemisch erzielt werden. Es sei angemerkt, dass im Vergleich zu den halogenierten Extraktionsmitteln mit dem MTBE/ISO-Gemisch ein geringeres Extraktionsvermögen erzielt werden konnte (vgl. Tabelle 22).

Tabelle 22: Auswertung der Extraktionsmittelloptimierung.

Ansatz	Isopropanol [%]	Chloroform [%]	Dichlormethan [%]	Methyl-tert-butylether (MTBE) [%]	Acetonitril [%]	Methanol [%]	Summe der Wertungen
Ansatz 1	80	20	0	0	0	0	37
Ansatz 2	50	50	0	0	0	0	69
Ansatz 3	80	0	20	0	0	0	120
Ansatz 4	50	0	50	0	0	0	141
Ansatz 5	80	0	0	20	0	0	114
Ansatz 6	50	0	0	50	0	0	97
Ansatz 7	20	0	0	80	0	0	152
Ansatz 8	80	0	0	0	20	0	126
Ansatz 9	50	0	0	0	50	0	158
Ansatz 10	80	0	0	0	0	20	187
Ansatz 11	50	0	0	0	0	50	205

Tabelle 23: Auswertung der Extraktionsmittelloptimierung ohne halogenierte Kohlenwasserstoffe.

Ansatz	Isopropanol [%]	Chloroform [%]	Dichlormethan [%]	Methyl-tert-butylether [%]	Acetonitril [%]	Methanol [%]	Summe der Wertungen
Ansatz 1	80	0	0	20	0	0	46
Ansatz 2	50	0	0	50	0	0	37
Ansatz 3	20	0	0	80	0	0	74
Ansatz 4	80	0	0	0	20	0	75
Ansatz 5	50	0	0	0	50	0	79
Ansatz 6	80	0	0	0	0	20	105
Ansatz 7	50	0	0	0	0	50	117

Im nächsten Schritt wurde das MTBE-Isopropanol Mischungsverhältnis mit dem besten Extraktionsvermögen definiert. Hierfür wurden sechs Ansätze mit unterschiedlichen Anteilen an MTBE und Isopropanol in einer Dreifachbestimmung analysiert und analog zum ersten Abschnitt der Extraktionsmitteloptimierung ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 24 aufgeführt. Die Extraktionsansätze mit 10 % und 20 % MTBE haben keine analysierbaren Extrakte ergeben (Trübung auch nach Filtration) und konnten daher nicht bei der Auswertung berücksichtigt werden.

Tabelle 24: Auswertung der Extraktionsmitteloptimierung Teil 2.

Ansatz	Methyl-tert-butylether [%]	Isopropanol [%]	Summe der Wertungen
Ansatz 1	30	70	36
Ansatz 2	40	60	57
Ansatz 3	50	50	53
Ansatz 4	60	40	53
Ansatz 5	70	30	65
Ansatz 6	80	20	80

Das beste Extraktionsergebnisse konnte mit einer Mischung aus 30 % MTBE und 70 % Isopropanol erzielt werden.

Für alle weiteren Bestimmungen wurde dieses Extraktionsmittelgemisch verwendet, weil es die Alternative mit den besten Extraktionseigenschaften gegenüber dem zuvor verwendeten Extraktionsmittel mit Chloroform darstellt.

### 5.1.2.2 LC System

Für das flüssigchromatographische System der TNP Methode wurden die Parameter der NTNP Methode übernommen und für die gezielte Analyse der Schlüsselmetaboliten optimiert. Ziel der Optimierung war eine Erhöhung der Trennleistung bei einer Verkürzung der Analysendauer. Hierfür wurden unterschiedliche stationäre Phasen und Gradienten evaluiert. Die Elutionsmittelzusammensetzung, Elutionsmitteladditive, Flussrate und Säulentemperatur wurden in diesem Zusammenhang nicht noch einmal optimiert.

#### 5.1.2.2.1 Optimierung der stationären Phase

Aufgrund des unpolaren Charakters der Schlüsselmetaboliten wurden für die chromatographische Auftrennung unterschiedlich modifizierte RP-Phasen verwendet. Hierbei wurde vor allem auf eine maximale Trennleistung und eine gute Peakform geachtet. Weiterhin wurde auch die Analysedauer berücksichtigt, da die angestrebte Methode so kurz wie möglich sein sollte.

In Tabelle 14 sind die untersuchten stationären Phasen aufgeführt. Diese unterscheiden sich in der Zusammensetzung des Säulenmaterials, der Länge sowie dem Hersteller.

Tabelle 25: Spezifikationen der evaluierten stationären Phasen.

Bezeichnung	Partikelgröße [µm]	Säulendimension [mm]	Säulenmaterial	Hersteller
Brownlee Validated IBD	5	50 x 4,6	Intrinsically base deactivated	Brownlee
Brownlee Analytical DB BiPh	5	50 x 4,6	Bi-Phenyl	Brownlee
Zorbax Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD	1,8	50 x 2,1	C <sub>18</sub>	Zorbax
Accucore™ RP-MS	2,6	150 x 2,1	C <sub>18</sub>	Thermo Fischer

In Abbildung 29 sind die Chromatogramme einer analysierten Kakaoprobe mit einem Kakao-schalengehalt von 10 % für die unterschiedlichen stationären Phasen, bei ferner identischen chromatographischen Bedingungen, dargestellt.

# Ergebnisse und Diskussion

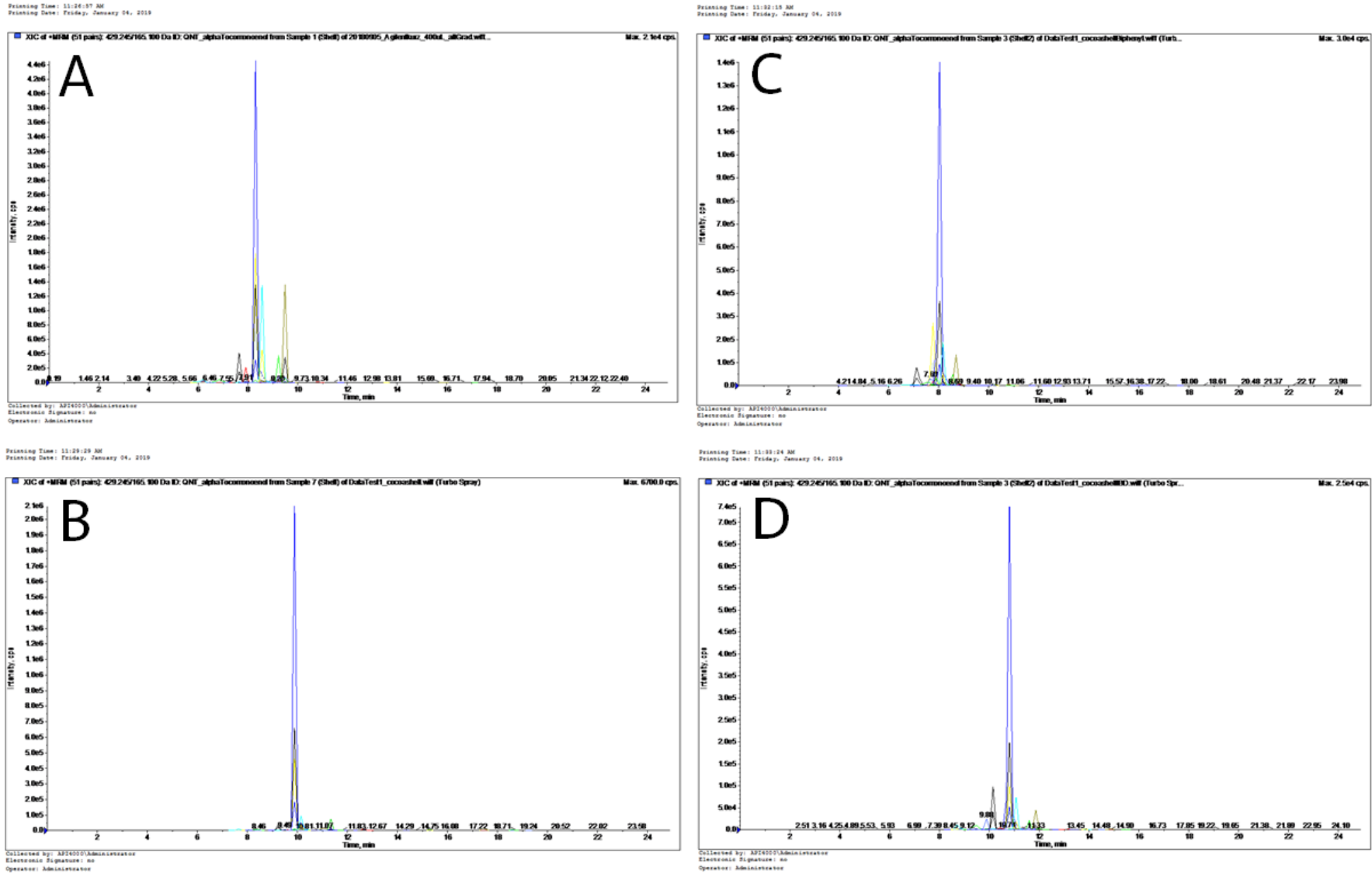


Abbildung 29: Analytierte stationäre Phasen für die TNP Methode (A: Zorbax Eclipse Plus C18; B: Accucore™ RP-MS; C: Brownlee BiPh; D: Brownlee IBD).



Die Bewertung zur Auswahl der stationären Phasen basierte auf der chromatographischen Trennleistung, Peakform und Analysendauer, die so gering wie möglich sein sollte, um einen höheren Probendurchsatz zu ermöglichen.

Die beste Auftrennung der Metaboliten zeigte die Zorbax Eclipse Säule von Agilent. Hier eluierte der Großteil der Analyten zwischen 7 und 10 min und zeigte eine scharfe Peakform. Die Intensität des größten Peaks betrug bei dieser Säule  $4,4 \cdot 10^6$  Skt.. Da für das Screening der stationären Phasen stets dieselbe Konzentration der Analyten analysiert wurde und die Intensität der Peaks hier der Peakhöhe entspricht, ist eine hohe Intensität mit einer schmalen Peakform gleichzusetzen. Dies wiederum spricht für eine geringe Ionensuppression, da durch die kurze Elutionsdauer der einzelnen Metaboliten die Gefahr für eine gleichzeitige Elution minimiert wird. Die stationären Phasen Accucore™ RP-MS, Brownlee Validated IBD und Brownlee Analytical BiPh zeigten ähnliche Resultate. Allerdings zeichnete sich die chromatographische Trennung dieser Säulen durch einen niedrigeren Elutions-Zeitraum von lediglich 2 bis 2,5 min für den Großteil der Analyten aus, was zu einer Verstärkung der Suppressions-Effekte führen kann. Die detektierten Intensitäten lagen bei den unterschiedlichen stationären Phasen bei ca.  $1,0 \cdot 10^6$  Skt und somit deutlich niedriger als bei der Zorbax Eclipse Säule. Dies lässt auf eine breitere Peakform bei den anderen stationären Phasen schließen.

Die Zorbax Eclipse Säule zeigte bei allen definierten Bewertungskriterien die besten Resultate und wurde daher als stationäre Phase für die TNP Methode ausgewählt. Durch eine gute chromatographische Auflösung eluieren die Komponenten in einer größeren Zeitspanne, wodurch das Risiko einer Ionensuppression in der Ionenquelle minimiert wird und hohe Intensitäten bei der Detektion erhalten werden können.

### 5.1.2.2.2 Gradient

Der Gradient der mobilen Phase sollte so angepasst werden, dass eine maximale Trennung der Analyten in möglichst kurzer Analysenzeit erzielt werden kann. Die Peaks sollten dabei eine schmale Form zeigen und kein *tailing* oder *fronting* aufweisen.

Es wurden insgesamt 19 verschiedene Gradienten, die sich in der Analysendauer und der Zusammensetzung der mobilen Phase unterscheiden, getestet. Für alle Gradienten wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt, um potenzielle Schwankungen in der Analyse detektieren zu können. Im Anhang sind in Tabelle 62 die Parameter der getesteten Gradienten und in Abbildung 100 die entsprechenden Chromatogramme aufgeführt.

Der ursprüngliche Gradient aus der NTNP Methode hatte eine Analysendauer von 25 min. Um die Analysenzeit zu reduzieren, wurden insgesamt 12 Gradienten (Gradient 1-12; Chromatogramme A-L) mit einer verkürzten Dauer von 20 min getestet. Neben der Zeitersparnis und den dadurch ermöglichten größeren Probendurchsatz wird durch die Reduktion weniger Elutionsmittel benötigt, was eine zusätzliche Geldersparnis und Reduzierung der Umweltbelastung darstellt. Eine kürzere Dauer kann sich jedoch auch negativ auf die chromatographische Trennung der Komponenten auswirken. Die Analyten werden aufgrund der kürzeren Interaktionsdauer mit der stationären Phase weniger retardiert und eluieren somit schneller, woraus eine schlechtere chromatographische Trennleistung und co-Elutionen entstehen können.

Den Chromatogrammen in Abbildung 100 ist zu entnehmen, dass mit einer Analysendauer von 25 min deutlich bessere Ergebnisse bezüglich der chromatographischen Trennung sowie der Intensitäten erzielt werden konnten. Im Chromatogramm B sind die Ergebnisse mit einer Analysenzeit von 20 min zu sehen und entsprechend im Chromatogramm N die Ergebnisse mit einer Analysenzeit von 25 min. Bei diesem Beispiel kann eine entscheidend bessere chromatographische Trennleistung bei einer Laufzeit von 25 min beobachtet werden. Aufgrund der deutlich besseren Trennleistung wurde die Analysendauer auf 25 min festgelegt.

Weiterhin wurde die Laufmittelzusammensetzung zu Beginn der Analyse optimiert. Der prozentuale Anteil der wässrigen Phase wurde zwischen 35 und 15 % in 5 % Schritten variiert (Gradient 13-17; Chromatogramme M-Q). Durch die Verringerung des wässrigen Anteils in der mobilen Phase wird der hydrophile Charakter dieser verringert, wodurch die Affinität der Analyten, welche ausnahmslos einen unpolaren Charakter besitzen, zur mobilen Phase erhöht wird und es zu einer geringeren Wechselwirkung mit der stationären Phase kommt. Zur Verdeutlichung wurde die Retentionszeit des intensivsten Peaks, Lignocerin säuretryptamid (LAT), in den Chromatogrammen betrachtet. LAT eluierte bei einem Anteil von 35 % Wasser im Laufmittel zu Beginn der Messung bei ca. 8,6 min (vgl. Chromatogramm M). Bei 20 % Wasser betrug die Elutionszeit nur noch 5 min (vgl. Chromatogramm P) und wurde bei einem Anteil von 15 % Wasser auf 1,5 min reduziert (vgl. Chromatogramm Q). Durch die Verringerung des wässrigen Anteils kommt es demnach zu einer verringerten Retardierung und die Analyten eluieren in kürzeren Abständen. Zudem ist festzustellen, dass die Peakform aller Komponenten deutlich verschlechtert wird. Insgesamt zeigte eine Laufmittelzusammensetzung mit 30 % Wasser zu Beginn der Analyse (Gradient 14; Chromatogramm N) die besten Resultate.

Der Anteil der wässrigen Phase wurde in den Gradienten nicht direkt von 30 % auf 0 % reduziert, sondern über eine zusätzlich eingebaute Plateauphase zunächst auf 15 % und anschließend auf 0 % reduziert. Durch die Verwendung einer Plateauphase wird die Zusammensetzung des Elutionsmittels für die jeweilige Dauer der Plateauphase konstant gehalten. Analyten, die bei dieser Laufmittelzusammensetzung eluieren, können somit durch eine verlängerte Zeit bei gleicher Elutionsmittelzusammensetzung besser voneinander getrennt werden. Die Verlängerung der Plateauphase bzw. die Reduktion der Steigung des Gradienten resultierte in einer Verschlechterung der chromatographischen Auflösung. Dies ist in den Chromatogrammen R und S zu sehen, wobei sich die Peakform durch die Veränderung der Plateauphase deutlich verschlechtert hat.

Somit wurde der Gradient Nr. 14, zu sehen im Chromatogramm N, für die weitere Analyse verwendet, da bei diesem Gradienten bezüglich Trennleistung und Peakform die besten Ergebnisse beobachtet werden konnten.

### 5.1.2.3 MS System

Für die Analyse der Schlüsselmetaboliten wurden die vom Hersteller empfohlenen Standardeinstellungen der Ionenquelle verwendet,<sup>202</sup> da mit diesen Parametern sehr gute Ergebnisse erzielt werden konnten. Auch bei einem niedrigen Schalengehalt von 1 % konnten detektierbare Signale für die Metaboliten erhalten werden (vgl. Abschnitt 5.1). Daher wurde keine weitere Optimierung der Quellenparameter vorgenommen. Eine weitere Optimierung des MS-System erfolgte anhand des *Automatic Compound Optimization* (vgl. Abschnitt 6.7) im Zuge der Entwicklung der MRM-Methode für alle Analyten. Hier wurden die Einstellungen der Quadrupole für eine Maximierung der nachgewiesenen Intensitäten automatisch angepasst.

### 5.1.2.4 Validierung

Die Validierung der *targeted* Methode wurde zur Überprüfung der entwickelten Methode und der Eignung für die Kakaomatrix durchgeführt. Anhand der Validierung können Aussagen über Linearität, Genauigkeit, Richtigkeit und Selektivität der Methode getroffen werden.<sup>203</sup> Die Validierung erfolgte nach anerkannten Richtlinien der FDA und DIN 32645 und wurde anhand kommerziell erworbener Standards durchgeführt.<sup>204, 205</sup>

Es konnte nicht für alle Schlüsselmetaboliten die entsprechenden Standardsubstanzen erworben werden. Für die Metaboliten, für die keine Standards erworben werden konnten, wurden repräsentativ Vertreter aus der gleichen Substanzklasse verwendet. Aufgrund der strukturellen

Ähnlichkeit und der ähnlichen Fragmentierungsmuster konnten die erhaltenen Ergebnisse auf die Verbindungen der gleichen Substanzklassen extrapoliert werden.

In der Tabelle 26 sind die erworbenen Standardsubstanzen stellvertretend für die jeweiligen Substanzklassen aufgeführt.

Tabelle 26: Vertreter der Substanzklassen.

Verbindungsklasse	Vertreter	CAS-Nummer
Fettsäuretryptamide	Behensäuretryptamid	7367-79-5
Fettsäure-5-hydroxy-tryptamide	Arachidonsäure-5-hydroxy-tryptamid	187947-37-1
Triacylglycerole	Triolein	122-32-7
Ceramide	Dihydroceramide (d18:0/16:0)	5966-29-0
	16:0(2S-OH) Ceramide	890041-50-6
$\alpha$ -Tocopherol Derivate	$\alpha$ -Tocopherolpalmitat	34562-29-3

Es wurden eine Grundkalibrierung, welche lediglich die zu untersuchenden Standards im Extraktionsmittel enthielt, und eine Matrixkalibrierung durchgeführt. Bei der Matrixkalibrierung wurde den Proben ebenfalls ein Aliquot Kakaomassenmatrix hinzugefügt. Die Validierung erfolgte mit 20 Standards in aufsteigender Konzentration. Das Pipettierschema der Grundkalibrierung ist im Anhang in Tabelle 79 dargestellt. Zur Herstellung der Kalibrierstandards wurden die Multistandards 2 und 3 (vgl. Tabelle 77 und Tabelle 78) verwendet. Die Konzentration der Metaboliten erstreckten sich von 0,0002  $\mu\text{mol/L}$  bis 1  $\mu\text{mol/L}$ .

Die zusammengefassten Ergebnisse der Grund- und Matrixkalibrierung sind in Tabelle 27 und die ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in Tabelle 28 aufgeführt.

Anhand der Kalibrierstandards wurde die Linearität der Schlüsselmetaboliten überprüft. Alle untersuchten Substanzen konnten eine sehr gute Linearität von einem Bestimmtheitsmaß von mindestens 0,996 aufweisen. Zudem wurde der lineare Arbeitsbereich der Grundkalibrierung mit dem Linearitätstest nach MANDEL bestimmt (vgl. Formel 19). Bei diesem Test wird sowohl die lineare als auch für die quadratische Funktion an die Kalibrierdaten angepasst und die Summe der Abweichungsquadrate berechnet. Im nächsten Schritt wird ein F-Test durchgeführt, indem die Differenz der gebildeten Summen durch die Restvarianz aus der quadratischen Anpassung geteilt wird. Der erhaltene Wert wird als Prüfgröße bezeichnet und mit dem Tabellenwert der F-Verteilung verglichen. Bei einer Prüfgröße, die kleiner als der entsprechende Tabellenwert ist, gilt der lineare Zusammenhang der Funktion als bewiesen. Im angegebenen Konzentrationsbereich

konnte ein linearer Zusammenhang für alle Metaboliten bestätigt werden (vgl. Tabelle 27). Der lineare Arbeitsbereich der Metaboliten wurde ebenfalls im Konzentrationsbereichs des Multi-standards 1 (2  $\mu\text{M}$  – 100  $\mu\text{M}$ ) getestet. Die Metaboliten zeigten in diesem Konzentrationsbereich jedoch keine lineare Abhängigkeit.

Die Nachweisgrenze (LOD, engl. *limit of detection*) der Substanzen wurde mithilfe der Leerwertmethode (vgl. DIN 32645) aus zehn unabhängigen Blanks berechnet.<sup>205</sup> Die Nachweisgrenze gilt als die Konzentration, ab der eine Substanz mit Sicherheit qualitativ nachgewiesen werden kann. Unterhalb dieser Konzentration kann das detektierte Signal nicht vom Grundrauschen differenziert werden.<sup>206</sup> Die Nachweisgrenze wurde mithilfe der Gleichung 24 (s. Formelsammlung) berechnet. Die Bestimmungsgrenze wiederum entspricht dem Dreifachen der Nachweisgrenze.<sup>207</sup> Die Bestimmungsgrenze (LOQ, engl. *limit of quantification*) ist die Konzentration, ab der quantitative Aussagen zu dem detektierten Signal zulässig sind. Die LOQ stellt die Untergrenze des Kalibrierbereichs dar.<sup>208</sup> Die Berechnung der Bestimmungsgrenze erfolgte mithilfe der Gleichung 25 (s. Formelsammlung).

Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass als Berechnungsgrundlage jeweils lediglich die Steigung der repräsentativen Standardsubstanzen der jeweiligen Stoffklassen zur Verfügung standen. Daher musste für die Berechnung der NWG die Steigung der jeweils repräsentativen Verbindung (vgl. Tabelle 26) zusammen mit dem detektierten Gehalt der tatsächlichen Verbindungen in den Blanks verwendet werden. Aufgrund von abweichenden Retentionszeiten der stellvertretenden Substanzen und der tatsächlichen Verbindung kann es zu unterschiedlich starken Ionensuppressionen bei den Analyten kommen und somit auch zu abweichenden Gehalten. Obwohl diese Einschränkungen für die Ergebnisse der berechneten LOD und LOQ bestehen, können die Ergebnisse der Leerwertmethode dennoch als eine gute Annäherung angesehen werden, da sich die Vertreter der einzelnen Substanzklassen nur in geringem Maße unterscheiden.

Anschließend wurden die Genauigkeit (engl. *accuracy*) und Präzision (engl. *precision*) berechnet. Die Präzision gibt an, wie stark die Analysenwerte aufgrund von zufälligen Fehlern streuen und die Genauigkeit stellt ein Maß für den Gesamtfehler einer Analyse dar. Ein Ergebnis gilt als genau, wenn es frei von zufälligen und systematischen Fehlern ist.<sup>209</sup>

Laut der Richtlinien der FDA dürfen die Abweichungen bei der Präzision und Richtigkeit maximal 15 % und bei dem niedrigsten Kalibrierpunkt 20 % betragen. Alle Werte konnten den gestellten

Anforderungen gerecht werden (vgl. Tabelle 26). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Analyse nur geringe systematische und zufällige Fehler zeigt.

Im Anschluss an die Grundkalibrierung erfolgte die Matrixkalibrierung, bei der die zu untersuchenden Substanzen nicht nur im Extraktionsmittel vorlagen, sondern ebenfalls mit einem Aliquot an extrahierter Kakaomatrix versehen wurden. Dafür wurden zehn verschiedene Kakao-massenproben extrahiert und zusammengefügt. Das Pipettierschema der Matrixkalibrierung ist in Tabelle 80 dargestellt. Die Matrixkalibrierung wurde im gleichen Konzentrationsbereich wie die Grundkalibrierung durchgeführt.

Wie auch bei der Grundkalibrierung konnte für alle Substanzen eine sehr gute Linearität von mindestens 0,99 berechnet werden. Für das Triacylglycerol, Triolein, konnte bei der Matrixkalibrierung kein linearer Zusammenhang detektiert werden. Bei den Triacylglycerolen sind aufgrund des hohen lipophilen Gehaltes im Kakao stärkere Matrixeffekte zu erwarten. Aufgrund der hohen Konzentration an Triacylglycerolen könnte der Sättigungsbereich des Detektors erreicht worden sein. Aus diesen Gründen und aufgrund einer unzureichenden Linearität wurden die beiden Triacylglyceride der Schalenmetaboliten nicht für den weiteren Nachweis der Kakaoschale herangezogen. Der potenziellen Sättigung des Detektors hätte durch eine stärkere Verdünnung der Probe entgegengewirkt werden können. Eine weitere Verdünnung hätte jedoch auch die Konzentrationen der anderen Schlüsselmetaboliten beeinflusst, sodass diese ggf. nicht mehr nachzuweisen wären oder durch die stärkere Verdünnung nicht mehr im linearen Arbeitsbereich liegen würden. Daher wurde keine Verdünnung der Probenextrakte vorgenommen.

Analog zu der Bestimmung der Leerwertmethode bei der Grundkalibrierung wurde für die Schlüsselmetaboliten die Nachweis- sowie die Bestimmungsgrenze anhand von zehn unabhängigen Blanks durchgeführt. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen liegen im niederen nanomolaren Bereich. Hier ist zu erkennen, dass die berechneten Werte minimal höher sind als bei der Grundkalibrierung. Demnach konnten Matrixeffekte bei der Quantifizierung detektiert werden, die jedoch aufgrund der minimalen Erhöhung der NWG gering ausfallen. Eine Ausnahme stellt  $\alpha$ -Tocomonoenol dar. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze sind mit 9,977 nM und 29,92 nM bei der Matrixkalibrierung deutlich höher. Es ist möglich, dass eine verstärkte Ionensuppression und Störung durch andere Komponenten in der Kakaomatrix die Quantifizierung von  $\alpha$ -Tocomonoenol stärker als die anderen Metaboliten beeinträchtigt.

Ebenso wie bei der Grundkalibrierung wurden die definierten Abweichungsgrenzen an die Richtigkeit und Präzision der FDA auch bei der Matrixkalibrierung eingehalten. Die Abweichungen bei der Richtigkeit und Präzision überstiegen nicht die Vorgabe von 15 bzw. 20 % beim niedrigsten Standard (vgl. Tabelle 26).

Als Ergebnis kann zusammengefasst werden, dass die verwendete Methode selektive, empfindliche, reproduzierbare und robuste Ergebnisse für die Kakaomatrix liefert. Zudem konnte eine sehr gute Linearität der Substanzen in einem breiten linearen Arbeitsbereich analysiert werden. Da nicht alle Schalenmetaboliten kommerziell erhältlich waren, wurden, wie zu Anfang des Kapitels erwähnt, repräsentative Verbindungen aus den gleichen Substanzklassen verwendet, welche ähnliche Strukturen, gleiche Fragmentierungsmuster und eine identische Löslichkeit im verwendeten Extraktionsmittel zeigen. Durch die Wahl strukturverwandter Verbindungen können die erhaltenen Ergebnisse als repräsentativ für die Schlüsselmetaboliten angesehen werden. Die Anforderungen der FDA und DIN 32645 konnten, unter Vorbehalt der dargelegten Problematik, erfüllt werden.

Bei der Analyse der Blanks konnte zu Beginn eine erhöhte Konzentration der TAG beobachtet werden. Dies ist wahrscheinlich auf sog. *carry over*-Effekte durch die Injektionsnadel zurückzuführen. Rückstände der sehr unpolaren TAG konnten nicht vollständig von der Injektionsnadel entfernt werden. Diesem Problem wurde durch einen zusätzlichen *needle wash* Schritt nach jeder Injektion mit einer Waschlösung aus Isopropanol und Chloroform (2/1, v/v) begegnet. Durch den eingeführten Reinigungsschritt der Injektionsnadel konnte der *carry over*-Effekt unterbunden werden.

## Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 27: Ergebnisse der Grund- und Matrixkalibrierung.

Standardsubstanz	Grundkalibrierung						
	Regressionsgleichung	R2	Linearer Arbeitsbereich	Prüfgröße nach Mandel	Accuracy [%]		Precision [%]
Arachinsäure-5-hydroxy-tryptamid	$y = 248220,2 \cdot x + 1533,5$	0,999	0,001 - 1	-13	Kleinster*	12,85	11,65
					Mittlerer*	9,42	3,78
					Höchster*	0,45	2,14
Behensäuretryptamid	$y = 12455742,5 \cdot x + 543249,3$	0,992	0,06 - 1	-5	Kleinster	2,77	7,09
					Mittlerer	9,00	3,75
					Höchster	3,19	2,71
Dihydroceramid (d18:0/16:0)	$y = 1773104,3 \cdot x + 13728,51$	0,998	0,0002 - 1	-17	Kleinster	5,66	11,31
					Mittlerer	8,75	8,91
					Höchster	1,11	3,39
16:0(2S-OH) Ceramid	$y = 1782136,1 \cdot x + 1191,2$	0,999	0,001 - 1	-13	Kleinster	12,49	15,35
					Mittlerer	7,29	7,41
					Höchster	2,78	5,98
$\alpha$ -Tocopherolpalmitat	$y = 16762174,8 \cdot x + 5161,2$	0,998	0,0002 - 0,01	-7	Kleinster	14,42	5,20
					Mittlerer	2,34	5,31
					Höchster	13,70	6,60
Matrixkalibrierung							
Arachinsäure-5-hydroxy-tryptamid	$y = 278210,6 \cdot x - 986,1$	0,999	0,002 – 0,8	1	Kleinster	8,72	8,83
					Mittlerer	6,67	4,68
					Höchster	1,34	14,11
Behensäuretryptamid	$y = 14596705,2 \cdot x + 9745880,4$	0,996	0,008 – 0,8	-6,54	Kleinster	10,21	3,40
					Mittlerer	5,10	2,33
					Höchster	2,77	3,54
Dihydroceramid (d18:0/16:0)	$y = 1977769,7 \cdot x - 39526,9$	0,999	0,0004 – 0,8	5,11	Kleinster	6,58	4,67
					Mittlerer	4,78	5,43
					Höchster	2,26	4,31
16:0(2S-OH) Ceramid	$y = 3298578,8 \cdot x + 15185,9$	0,999	0,002 – 0,8	6,31	Kleinster	6,61	6,71
					Mittlerer	3,05	4,65
					Höchster	2,05	0,73



## Ergebnisse und Diskussion

Standardsubstanz	Regressionsgleichung	R2	Linearer Arbeitsbereich	Prüfgröße nach Mandel	Accuracy [%]		Precision [%]
					Kleinster	Mittlerer	Höchster
α-Tocopherolpalmitat	$y = 352568,9 \cdot x + 14953,1$	0,992	0,008 – 0,8	5,58	17,34	11,08	5,16
					5,53	8,14	5,93

\*Analysierter Standard

Tabelle 28: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Schlüsselmetaboliten.

Schlüsselmetabolit	Grundkalibrierung		Matrixkalibrierung	
	NWG [nM]	BG [nM]	NWG [nM]	BG [nM]
α-Tocomonoenol	0,211	0,633	9,977	29,930
Heneicosansäuretryptamid	0,002	0,007	0,005	0,014
Behensäuretryptamid	0,077	0,232	0,148	0,445
Heneicosansäure-5-hydroxy-tryptamid	0,267	0,802	0,240	0,719
Tricosansäuretryptamid	0,019	0,057	0,036	0,109
Behensäure-5-hydroxy-tryptamid	1,076	3,229	0,964	2,893
Pentacosansäuretryptamid	0,014	0,041	0,026	0,079
Lignocerinsäure-5-hydroxy-tryptamid	2,189	6,566	1,961	5,883
Cerotinsäuretryptamid	0,028	0,083	0,053	0,160
Dihydroceramide (d18:0/16:0)	0,395	1,184	0,522	1,567
Pentacosansäure-5-hydroxy-tryptamid	0,237	0,712	0,213	0,638
Cerotinsäure-5-hydroxy-tryptamid	1,289	3,868	1,155	3,466
α-Tocopherolmyristat	0,009	0,027	0,432	1,296
α-Tocopherolpalmitat	0,006	0,018	0,276	0,828
Cer(d25:0(OH)/18:0(3OH))	0,068	0,203	0,037	0,110
TG(18:2/22:0/18:2)	0,146	0,439	-	-
TG(22:1/18:0/20:3)	0,021	0,062	-	-
Lignocerinsäuretryptamid	0,175	0,526	0,337	1,010

## 5.2 Bestimmung der Schlüsselmetaboliten

Für die Detektion potenzieller Schlüsselmetaboliten wurden Extrakte der Kakaoschale und des Kakaokerns getrennt voneinander mit Hilfe der optimierten *non-targeted* LC-ESI-QToF-Methoden analysiert und mittels multivariater Datenanalyse verglichen.

Die Vorgehensweise zur Detektion der potenziellen Schlüsselmetaboliten ist im Folgenden beispielhaft anhand der NTNP Methode im positiven Ionenmodus aufgeführt. Es wurde ein PCA-Modell für jeweils sechs Kakaoschalen- und Kakaokernproben berechnet. Das Modell ist in Abbildung 30 dargestellt und zeigt, dass die Proben der Kakaoschale und des Kakaokerns im *scores-plot* getrennte Cluster aufweisen. Im *loading-plot* sind die *loadings*, auch als *buckets* bezeichnet, gezeigt. Es handelt sich hierbei um jeweils eine detektierte Verbindung, die durch das *m/z*, die Retentionszeit und einer Intensität in den analysierten Proben definiert wird. Die *loadings* in der Mitte des *loading-plots* repräsentieren solche Verbindungen, die sowohl in der Kakaoschale als auch im Kakaokern mit einer gleichen Intensität enthalten sind. Ganz rechts bzw. ganz links sind Verbindungen dargestellt, die jeweils nur in der Kakaoschale bzw. dem Kakaokern in einer hohen Konzentration vorhanden sind. Beispielhaft ist ebenfalls in Abbildung 30 ein *bucket statistic view* einer Verbindung gezeigt, die im rechten Bereich des *loading-plots* lokalisiert ist. Wie dem *statistic view* zu entnehmen ist, schwankt die Intensität dieser Verbindung in den Schalenproben zwischen  $2,1-3,4 \cdot 10^4$ , während in den Kernproben kein Signal oberhalb der Nachweisgrenze detektiert werden konnte. Somit handelt es sich hierbei um eine Verbindung, die charakteristisch für die Kakaoschale ist. Alle Verbindungen mit einer entsprechenden Verteilung der detektierten Intensitäten können für den selektiven Nachweis der Kakaoschale herangezogen werden. Diese Verbindungen, für die eine Intensität in den Kakaoschalen- und keine Intensität in den Kakaokernproben nachgewiesen werden konnte, werden als potenzielle Schlüsselmetaboliten (engl. *key metabolites*) bezeichnet und in die Liste der potenziellen Schlüsselmetaboliten der NTNP Methode im positiven Ionenmodus aufgenommen (vgl. Tabelle 63).

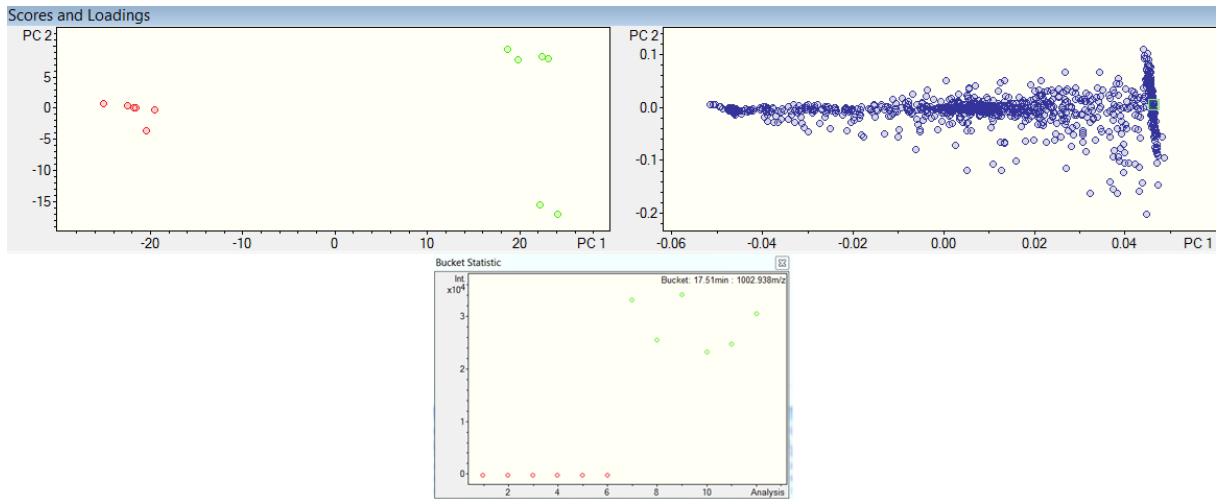


Abbildung 30: PCA-Modell für die Detektion der Schlüsselmetaboliten mittels NTNP Methode im positiven Ionenmodus (rote Punkte: Kakaokernproben, grüne Punkte: Kakaoschalenproben). Beispielhaft ist ein *bucket statistic view* von einem potenziellen Schlüsselmetabolit (17,51 min/ 1002.938  $m/z$ ) gezeigt (50//40).

Um die Aussagekraft der gebildeten Hauptkomponenten abschätzen zu können, wird der *Explained variance plot* gebildet. In Abbildung 31 ist dieser *plot* für das in Abbildung 30 dargestellte PCA-Modell aufgeführt. Der *plot* wurde mit der Software ProfileAnalysis berechnet und besagt, dass bereits in der ersten gebildeten Hauptkomponente ca. 70 % der Varianz von den berücksichtigten Daten enthalten ist. Durch die erste Hauptkomponente findet die Auftrennung zwischen Kakaokern- und Kakaoschalenproben statt, welche somit die größte Varianz zwischen den berücksichtigten Proben darstellt (vgl. Abbildung 30). Anhand der ersten beiden Hauptkomponenten werden ca. 80 % der Varianz der Daten ausgedrückt. Demnach macht die zweite Hauptkomponente lediglich 10 % der Varianz des Systems aus. Die zweite Hauptkomponente ist in diesem Beispiel für die Auftrennung der Cluster der Kakaoschalen- und Kakaokernproben verantwortlich (vgl. Abbildung 30). In dieser Hauptkomponente sind demnach die Informationen zur Varianz innerhalb der analysierten Kakaokerne und -schalen enthalten. Wie bereits beschrieben, ist diese Varianz im Vergleich zu der Varianz zwischen den Kakaokern- und Kakaoschalenproben deutlich geringer. Gemäß Abschnitt 3.6.2 nimmt die Zunahme der erklärten Varianz mit der Nummer der Hauptkomponente immer weiter ab. Dieser Zusammenhang ist in Form einer Sättigungskurve im *Explained variance plot* in Abbildung 31 dargestellt.

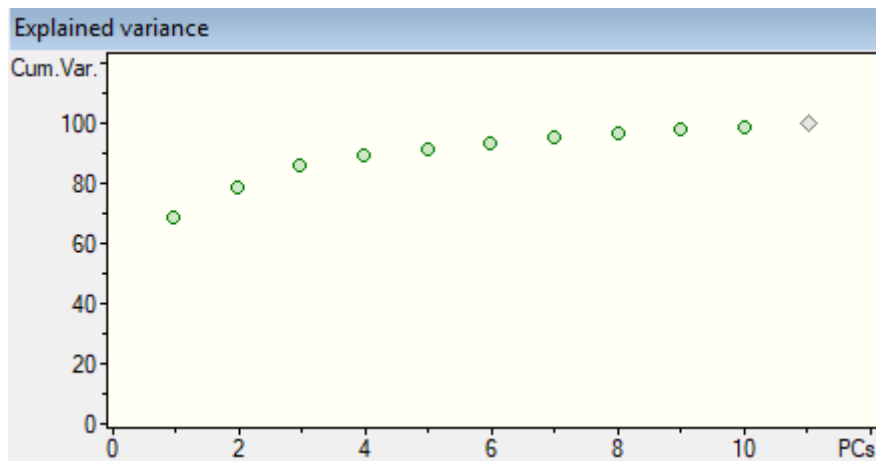


Abbildung 31: Graphische Darstellung der erklärten Varianz des Datensatzes durch die gebildeten Hauptkomponenten.

Neben der Berechnung des PCA-Modells wurde auch ein  $t$ -Test zur Identifizierung weiterer potenzieller Schlüsselmetaboliten durchgeführt. Anhand des Tests lässt sich überprüfen, ob sich zwei Probenpopulationen (hier Kakaoschale und Kakaokern) statistisch signifikant unterscheiden und es können diejenigen Merkmale extrahiert werden, welche für die signifikante Unterscheidung der Populationen verantwortlich sind. Der  $t$ -Test wird eingesetzt, um den Mittelwert zweier Gruppen zu vergleichen und zu überprüfen, ob die zwei Gruppen aus derselben Grundgesamtheit stammen. Zur Visualisierung der Ergebnisse wurde ein *Volcano Plot* (vgl. Abbildung 32) verwendet. In diesem Plot wurde der  $p$ -Value gegen den *Fold-Change* der identifizierten Verbindungen aufgetragen. Der  $p$ -Value gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein Stichprobenereignis (Zuordnung zur gleichen Grundgesamtheit) anhand des betrachteten Metaboliten erhalten werden kann. Der  $p$ -Value kann als Wahrscheinlichkeit Werte von 0 bis 1 annehmen. Da es sich bei den potenziellen Schlüsselmetaboliten um Verbindungen handelt, die lediglich in der Kakaoschale und nicht im -kern nachweisbar sind, also nur in einer der beiden analysierten Gruppen, besitzen die potenziellen Schlüsselmetaboliten ein  $p$ -Value von nahezu null. Ausgehend von den potenziellen Schlüsselmetaboliten liegt die Wahrscheinlichkeit, ob die zwei Gruppen, Kakaoschale und Kakaokern, aus derselben Grundgesamtheit stammen, bei nahezu null. Für eine bessere Darstellungsweise wurde der negativ dekadische Logarithmus des  $p$ -Values im *Volcano-Plot* aufgetragen. Der *Fold-Change* ist der reziproke Wert des Verhältnisses der Intensitäten der Metaboliten in der Kakaoschale und im Kakaokern. Im *Volcano-Plot* wurde der Logarithmus zur Basis zwei des *Fold-Change* aufgetragen, um die Veränderungen in beide Richtungen äquidistant vom Zentrum darstellen zu können.

Durch die gewählte Achsenbelegung sind die relevanten *Buckets* für den Kakaoschalennachweis im oberen rechten Bereich des *Volcano-Plots* lokalisiert. Zur Verdeutlichung ist hier ein *Bucket Statistic View* für eine exemplarische Verbindung aus diesem Bereich aufgeführt (siehe Abbildung 32). Als Auswahlkriterium für die potenziellen Schlüsselmetaboliten anhand des *t*-Tests wurden ein maximales *p*-value von  $<0,0001$  und ein *Average Ratio* (Schale/Kern) von  $>3$  definiert. Das *Average Ratio* ist definiert als der Quotient der Intensität einer Verbindung in den Kakaoschalen- und Kakaokernproben. Anhand des *t*-Tests werden auch Verbindungen identifiziert, die zwar in den Kakaokernproben nachweisbar sind, jedoch in den Kakaoschalenproben mit einer deutlich höheren Intensität enthalten sind. Alle identifizierten Metaboliten, welche entweder die definierten Kriterien des PCA-Modells oder des *t*-Tests erfüllen, werden in die Liste der potenziellen Schlüsselmetaboliten für den Kakaoschalennachweis der NTNP Methode im positiven Ionenmodus im Anhang in Tabelle 63 aufgenommen. Für die NTP-pos/neg Methoden wurde analog verfahren. Die potenziellen Schlüsselmetaboliten dieser Methoden sind im Anhang in Tabelle 64 und Tabelle 65 aufgeführt.

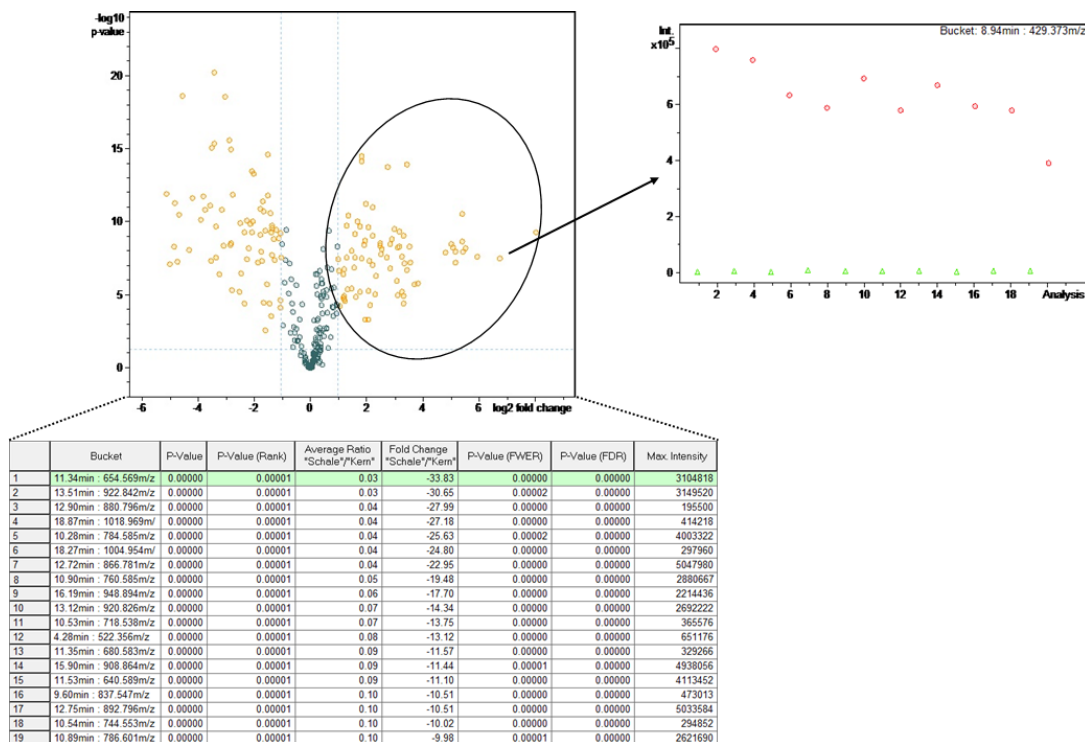


Abbildung 32: *t*-Test, *Bucket Table* und *Bucket Statistic* von jeweils 10 Kakaoschalen- und Kakaokern-Proben analysiert mittels NTNP positiv Methode (Kakaokernproben: grüne Dreiecke; Kakaoschalenproben: rote Kreise).

Die Eignung der potenziellen Schlüsselmetaboliten für den Kakaoschalennachweis gilt es, anhand unterschiedlicher definierter Bewertungskriterien in diesem Kapitel zu überprüfen. Eine Zusammenfassung der Bewertungskriterien ist in Abschnitt 6.6.6.1 aufgeführt. Abweichend von dem Verarbeitungsablauf der Kakaosamen wurde die Temperaturstabilität und somit das definierte Röstungskriterium als erstes Kriterium für die potenziellen Schlüsselmetaboliten überprüft. Die Temperaturstabilität der potenziellen Schlüsselmetaboliten wurde als obligatorisch angesehen, da Schlüsselmetaboliten, welche dieses Kriterium nicht erfüllen, aufgrund der großen Diversität der unterschiedlichen Röstverfahren nicht als Schlüsselmetabolit geeignet sind. Somit dient das Röstungskriterium als erste Filterung des Pools der potenziellen Schlüsselmetaboliten, bevor die weiteren definierten Bewertungskriterien angewendet werden.

### 5.2.1 Überprüfung der Temperaturstabilität (Röstungskriterium)

Die fermentierten Kakaobohnen werden von den jeweiligen Herstellern oder verarbeitenden Betrieben auf unterschiedliche Arten geröstet, wobei verschiedene Rösttemperaturen und -zeiten angesetzt werden können. Aufgrund der unterschiedlichen Röstungsparameter müssen die Schlüsselmetaboliten eine Temperaturstabilität unabhängig der durchgeführten Röstung zeigen. Ausschließlich die temperaturstabilen, potenziellen Schlüsselmetaboliten können perspektivisch als Biomarker für die Bestimmung des Schalenanteils in unterschiedlichen Kakaoprodukten eingesetzt werden. Durch die experimentelle Imitation unterschiedlicher Röstungen sollte die Temperaturstabilität der Schlüsselmetaboliten geprüft werden. Die durchgeführten Röstansätze sind in Abschnitt 6.3 aufgeführt. Für die unterschiedlichen Röstansätze wurde jeweils ein Aliquot der Probe Nr. 024 bei Rösttemperaturen zwischen 130 und 200 °C und einer Röstdauer zwischen 15 und 45 min geröstet und anschließend gemäß dem Extraktionsprotokoll behandelt. Die Röstbedingungen der unterschiedlichen Ansätze sind in Tabelle 29 aufgeführt.

Tabelle 29: Röstdauer und Temperaturen der Röstreihe.

Röstansatz	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Ansatz 0	ungeröstet	
Ansatz 1	165	15
Ansatz 2	165	25
Ansatz 3	165	35
Ansatz 4	130	15
Ansatz 5	130	30
Ansatz 6	130	45
Ansatz 7	200	40

In der Software QuantAnalyis<sup>®</sup> wurden Integrationsmethoden für die identifizierten, potenziellen Schlüsselmetaboliten erstellt. Zudem wurden die Listen um einige Signale erweitert, die bei Betrachtung der software-basierten Integration durch QuantAnalyis<sup>®</sup> dahingehend auffielen, dass auch sie in den Chromatogrammen der Schalenproben Signale zeigten, nicht aber in denen der Kakaokernproben.

Die Signalflächen der vorab bekannten, für die Kakaoschale charakteristischen Metaboliten Behensäuretryptamid (BAT) sowie Lignocerinsäuretryptamid (LAT) sind in Abbildung 33 bzw. Abbildung 34 zu erkennen. Beide Metaboliten weisen höhere Signalflächen in den Schalenproben als in den Kernproben auf. Die Signalflächen dieser Verbindungen zeigen bei allen Röstansätzen konstante Werte, sodass bei BAT und LAT eine Temperaturstabilität gegenüber unterschiedlichen Röstungsparametern vorliegt.

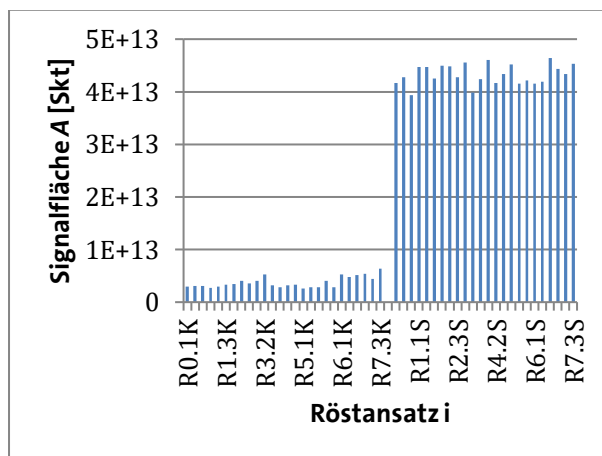


Abbildung 33: Signalflächen der Verbindung Behensäuretryptamid bei verschiedenen Röstansätzen.

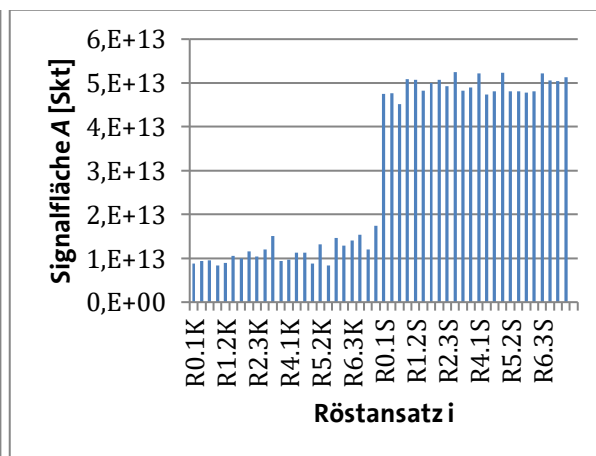


Abbildung 34: Signalflächen der Verbindung Lignocerinsäuretryptamid bei verschiedenen Röstansätzen.

Für die Fettsäuretryptamide wird ein Konzentrationsverhältnis zwischen der Kakaoschale und dem Kakaokern von 16:1 angegeben.<sup>2</sup> Das Verhältnis der Signalflächen von den vorliegenden Schalen- zu Kernproben des BAT liegt bei 12:1 und tendiert damit in Richtung des publizierten Wertes. Für LAT kann analog ein Verhältnis der Signalflächen von 4:1 berechnet werden.

Neben den bereits bekannten Schlüsselmetaboliten wurde die Temperaturstabilität aller experimentell identifizierten potenziellen Schlüsselmetaboliten überprüft. In Abbildung 35 bis Abbildung 37 sind die Ergebnisse von drei analysierten, potenziellen Schlüsselmetaboliten der NTNP Methode exemplarisch aufgeführt. Bei der ersten Verbindung (Abbildung 35) konnten bei allen durchgeführten Röstungen, bzw. ungerösteten Proben, nahezu identische Flächeninhalte bestimmt werden, weshalb diese Verbindung als temperaturstabil angesehen werden kann.

Bei dem Beispiel in Abbildung 36 handelt es sich demgegenüber um eine temperaturinstabile Verbindung, deren Konzentration mit der Intensität des Röstprozesses abnimmt. Als drittes Beispiel ist in Abbildung 37 das Ergebnis einer Verbindung dargestellt, deren Konzentration durch die Intensität des Röstprozesses zunimmt. Auch diese Verbindung ist nicht für den Kakaoschalennachweis geeignet, da die Konzentration dieser Verbindung abhängig von der Intensität der durchgeführten Röstung ist.

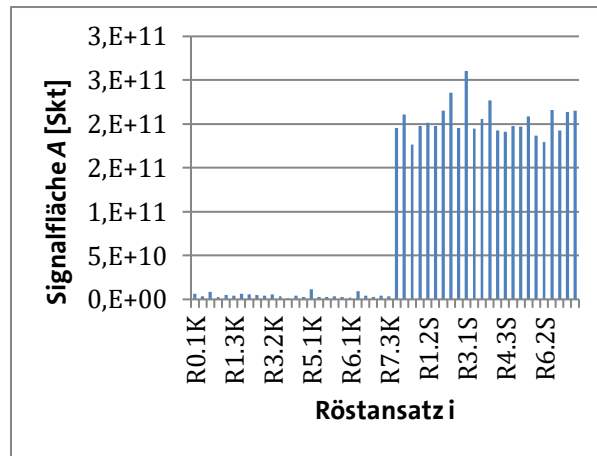


Abbildung 35: Signalflächen des Signals 714,678  $m/z$  bei 13,43 min bei verschiedenen Röstansätzen.

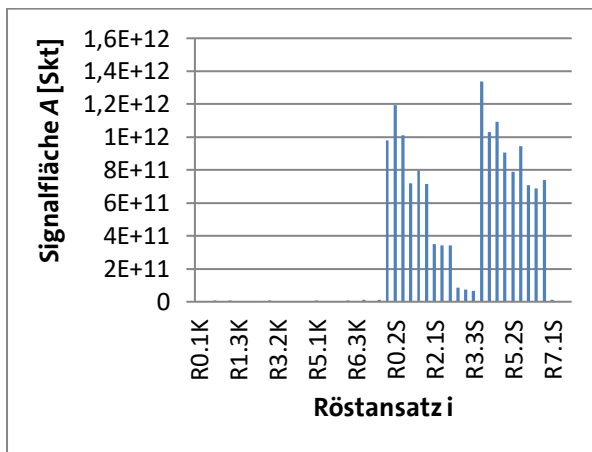


Abbildung 36: Signalflächen des Signals 720,544  $m/z$  bei 12,01 min bei verschiedenen Röstansätzen.

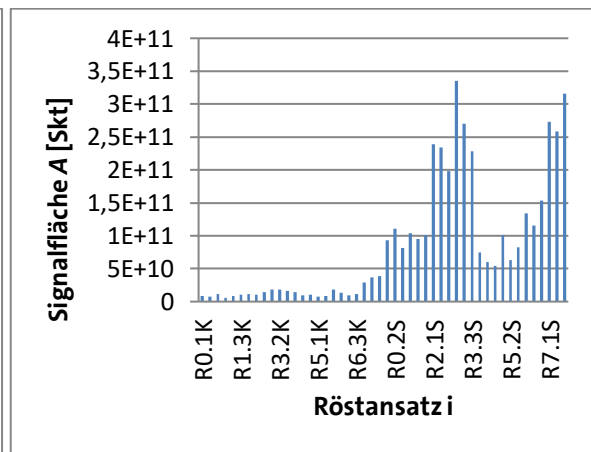


Abbildung 37: Signalflächen des Signals 676,661  $m/z$  bei 11,26 min bei verschiedenen Röstansätzen.

Von den dargestellten Verbindungen konnte lediglich für die erste eine Temperaturstabilität detektiert werden. Während die anderen Verbindungen aus dem Pool der potenziellen Schlüsselmetaboliten gestrichen werden, sollte die Eignung der ersten Verbindung als Schlüsselmetabolit für den Kakaoschalennachweis weiter analysiert werden. Neben der visuellen Auswertung der



Balkendiagramme wurde der Variationskoeffizient der analysierten Schalenproben berechnet. Das Röstungskriterium gilt bei einem Variationskoeffizienten von  $\leq 20\%$  als erfüllt.

Im Anhang ist in Tabelle 68 die Liste der 104 temperaturstabilen potenziellen Schlüsselmetaboliten der NTNP Methode aufgeführt. Analog wurde mit den potenziellen Schlüsselmetaboliten der NTP Methoden verfahren. Die Listen der temperaturstabilen potenziellen Schlüsselmetaboliten befinden sich in Tabelle 69 für den positiven Ionenmodus und in Tabelle 70 für den negativen Ionenmodus. Während bei den potenziellen Schlüsselmetaboliten der unpolaren Methode ca. 50 % eine Temperaturstabilität gezeigt haben, konnte lediglich bei ca. 10 % der polaren, potenziellen Schlüsselmetaboliten im positiven Ionenmodus und bei ca. 2,5 % im negativen Ionenmodus eine Temperaturstabilität festgestellt werden. Dieser bedeutende Unterschied könnte auf die größere Anzahl an funktionellen Gruppen, welche den Polaritätsunterschied bei den polaren Metaboliten ausmachen, zurückgeführt werden. Durch die größere Anzahl an funktionellen Gruppen und die geringere Molekülgröße steigt die Reaktivität der Verbindungen. Dies könnte erklären, weshalb so wenige potenzielle Schlüsselmetaboliten der polaren Methoden eine Konzentrationsstabilität gegenüber dem Temperatureinfluss gezeigt haben. Durch den Temperatureinfluss auf die Kakaobohne kann es zu unterschiedlichen, bekannten Reaktionsmechanismen wie der MAILLARD-Reaktion oder den STRECKER-Abbau kommen, an denen vornehmlich kleine polare Moleküle wie Kohlenhydrate und Aminosäuren beteiligt sind.

Das Röstungskriterium wird als obligatorisch für die Eignung der potenziellen Schlüsselmetaboliten angenommen, weshalb die folgenden Bewertungskriterien lediglich auf die temperaturstabilen, potenziellen Schlüsselmetaboliten angewendet wurden. Unabhängig von den erzielten Ergebnissen der folgenden Bewertungskriterien wurden alle Kriterien auf die temperaturstabilen, potenziellen Schlüsselmetaboliten angewendet.

### 5.2.2 Überprüfung der Fermentationsstabilität (Fermentationskriterium)

Die Fermentationsstabilität bzw. -unabhängigkeit der potenziellen Schlüsselmetaboliten sollte anhand des Vergleichs der Signalflächen zwischen fermentierten und unfermentierten Kakao-proben überprüft werden. Hierfür wurden, neben den analysierten fermentierten und gerösteten Proben, auch sechs unfermentierte Proben analysiert. Anhand dieser Proben sollte geprüft werden, ob und wie stark der Einfluss der Fermentation auf die potenziellen Schlüsselmetaboliten ist. Da es sich bei der Fermentation nicht um ein standardisiertes Verfahren handelt, kann es regional zu stark abweichenden Durchführungen und beteiligten Mikroorganismen kommen.

Unterscheiden sich die jeweiligen arithmetischen Mittel der Probenpopulationen der fermentierten und unfermentierten Proben nicht, ist von keinem fermentativen Einfluss auf die Metabolitkonzentration auszugehen. Für die Berechnung wurde der relative Signalflächenunterschied mit Hilfe von Gleichung 10 (s. Formelsammlung) berechnet. Ein Wert von 100 % ist als optimal anzusehen, welcher fermentationseinflussfreie Metaboliten indiziert. Da lediglich sechs nicht fermentierte Proben nur einer geographischen Herkunft analysiert werden konnten, ist die Datenmenge klein und die Werte dieser Proben sollten eher als Richtwert angesehen werden. Daher wurde bei der Bewertung mit 25 % akzeptierten Signalflächenunterschied eine hohe relative Abweichung toleriert.

In Abbildung 38 sind die exemplarischen Ergebnisse einer Verbindung aufgeführt, die das Fermentationskriterium nicht erfüllen konnte. Anhand des deutlichen Unterschieds in der Balkenhöhe zwischen den fermentierten und den unfermentierten Proben kann die Fermentationsabhängigkeit dieser Verbindung festgemacht werden.

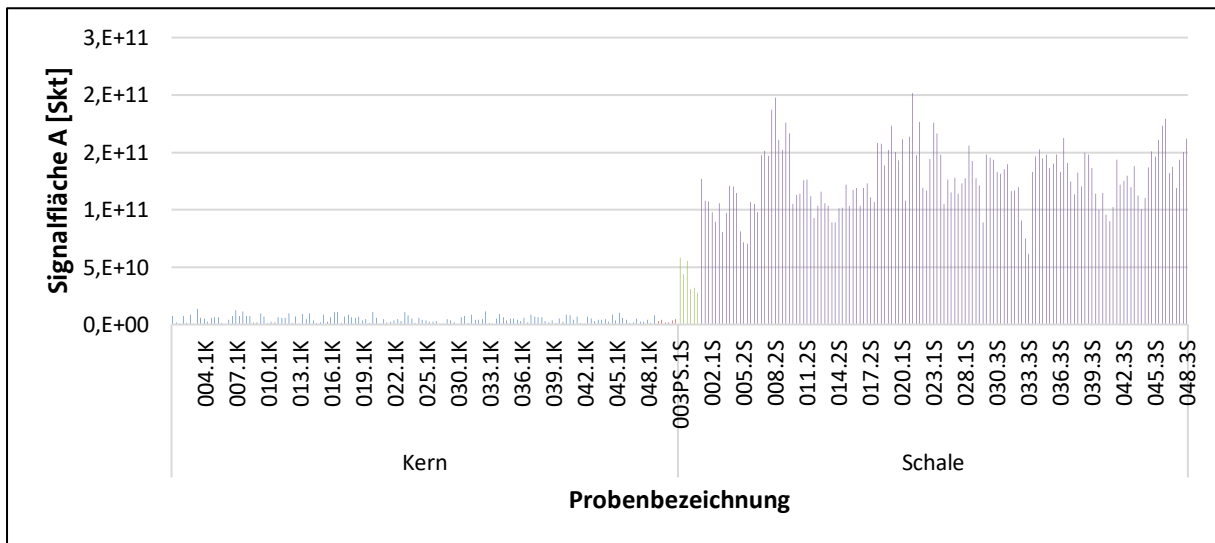


Abbildung 38: Detektierte Signalflächen eines potenziellen Schlüsselmetaboliten ohne Fermentationsstabilität ((Verbindung 384,3472  $m/z$ ; Retentionszeit: 12,28 min) blaue Balken: fermentierte Kakaokernproben; rote Balken: unfermentierte Kakaokernproben; grüne Balken: unfermentierte Kakaoschalenproben; lila Balken: fermentierte Kakaoschalenproben)).

Als zweites Beispiel sind die Ergebnisse einer fermentationsstabilen Verbindung in Abbildung 39 aufgeführt. In diesem Beispiel konnten sowohl für die unfermentierten als auch für die fermentierten Kakaoschalenproben die gleichen Signalflächen, dargestellt durch die grün- und lilafarbenen Balken, detektiert werden.

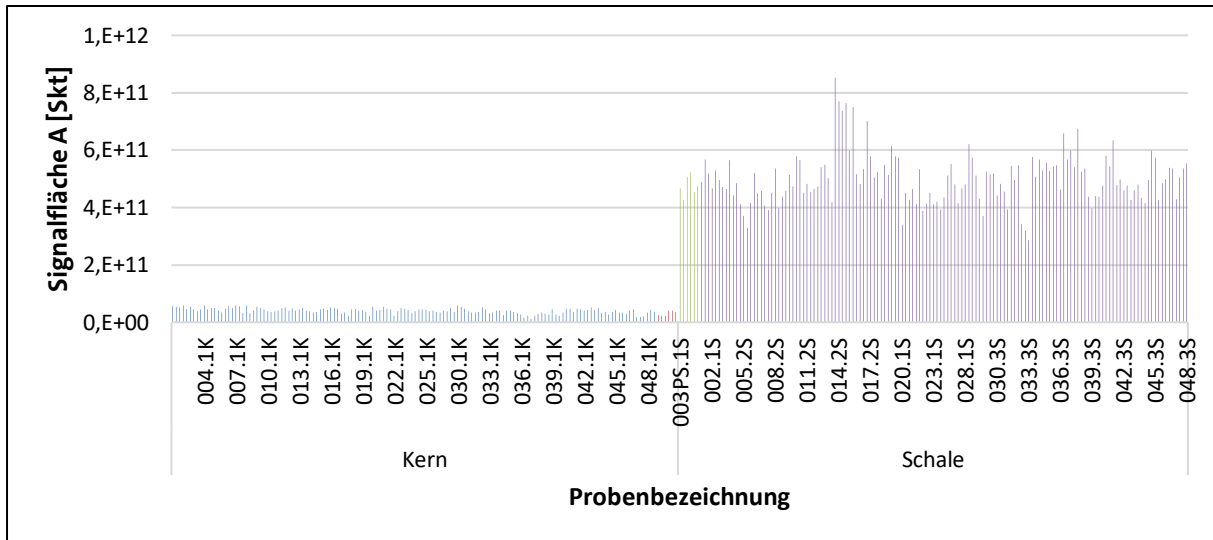


Abbildung 39: Detektierte Signalflächen eines potenziellen Schlüsselmetaboliten mit Fermentationsstabilität ((Verbindung 383,368  $m/z$ ; Retentionszeit: 13,5 min) blaue Balken: fermentierte Kakaokernproben; rote Balken: unfermentierte Kakaokernproben; grüne Balken: unfermentierte Kakaoschalenproben; lila Balken: fermentierte Kakaoschalenproben)).

Die berechneten relativen Unterschiede  $\eta$  der potenziellen Schlüsselmetaboliten der unpolaren Methode sind im Anhang in der Tabelle 71, für die polare Methode im positiven Ionenmodus in Tabelle 72 und im negativen Ionenmodus in Tabelle 73 angegeben und dort durch farbliche Abstufungen (Relativer Signalflächenunterschied:  $\leq 75\%$  rot;  $> 75\%$  und  $< 125\%$  grün;  $\geq 125\%$  rot) markiert. Neben den Ergebnissen des Fermentationskriteriums sind in diesen Tabellen auch die Ergebnisse der anderen Bewertungskriterien aufgeführt.

Bei der NTNP Methode konnten 40, bei der NTP Methode im positiven Ionenmodus drei und im negativen Ionenmodus keine der temperaturstabilen, potenziellen Schlüsselmetaboliten das Fermentationskriterium erfüllen.

### 5.2.3 Überprüfung der Konzentrationsunabhängigkeit bei unterschiedlichen Herkünften oder Erntejahren (Gleichmäßigkeitskriterium)

Der Einfluss unterschiedlicher Herkünfte, Erntejahre, Bewirtschaftungsbedingungen oder die Kakaosorte auf die Konzentration der temperaturstabilen, potenziellen Schlüsselmetaboliten, wurde anhand der Analyse von unterschiedlichen Kakaoproben überprüft. Für die Auswertung der Ergebnisse wurde der Variationskoeffizient nach Gleichung 9 (s. Formelsammlung) der Schlüsselmetaboliten in den Kakaoschalenproben berechnet. In Abbildung 40 und Abbildung 41 sind die unterschiedlichen Herkünfte und Erntejahre der analysierten Proben aufgeführt. Weitere Informationen zu den Herkünften, Erntejahren oder Bewirtschaftungsbedingungen der analysierten Proben sind im Anhang in der Tabelle 55 aufgeführt. Es konnten Proben aus nahezu

allen Ländern akquiriert werden, die Kakao in einem wirtschaftlich relevanten Maßstab kultivieren.

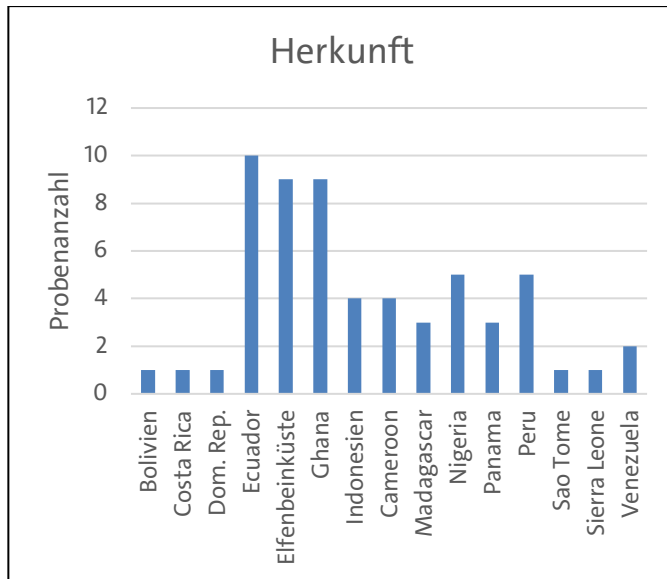


Abbildung 40: Herkunft der analysierten Kakaoproben.

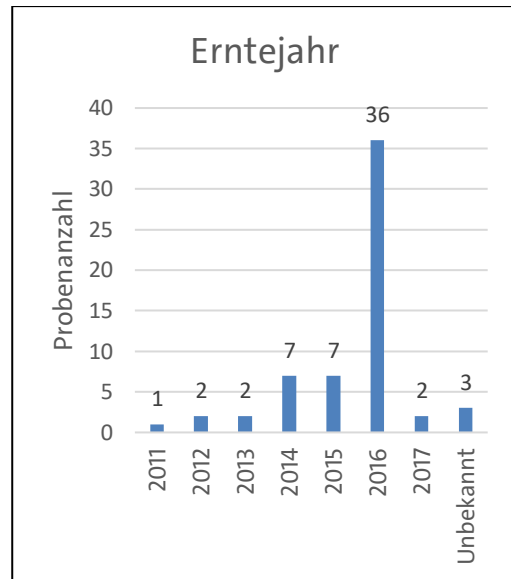


Abbildung 41: Erntejahr der analysierten Kakaoproben.

Ein geringer Variationskoeffizient bei den detektierten Signalflächen der Kakaoschalenproben deutet auf eine Unabhängigkeit der Konzentration gegenüber der Herkunft und dem Erntejahr der Kakaoproben hin. Im Balkendiagramm in Abbildung 42 sind die integrierten Signalflächen der analysierten Proben eines potenziellen Schlüsselmetaboliten aufgeführt. Hierbei ist zum einen deutlich zu erkennen, dass lediglich in den Schalenproben hohe Konzentrationen dieser Verbindung detektiert werden konnten und zum anderen, dass die Signale in den Schalenproben unterschiedlicher Herkünfte und Erntejahre mit ähnlicher Intensität bestimmt werden konnten.

Daher konnte bei der dargestellten Verbindung (658,6913  $m/z$ ; 12,75 min) die Konzentrationsunabhängigkeit gegenüber unterschiedlichen Herkünften und Erntejahren gezeigt werden.

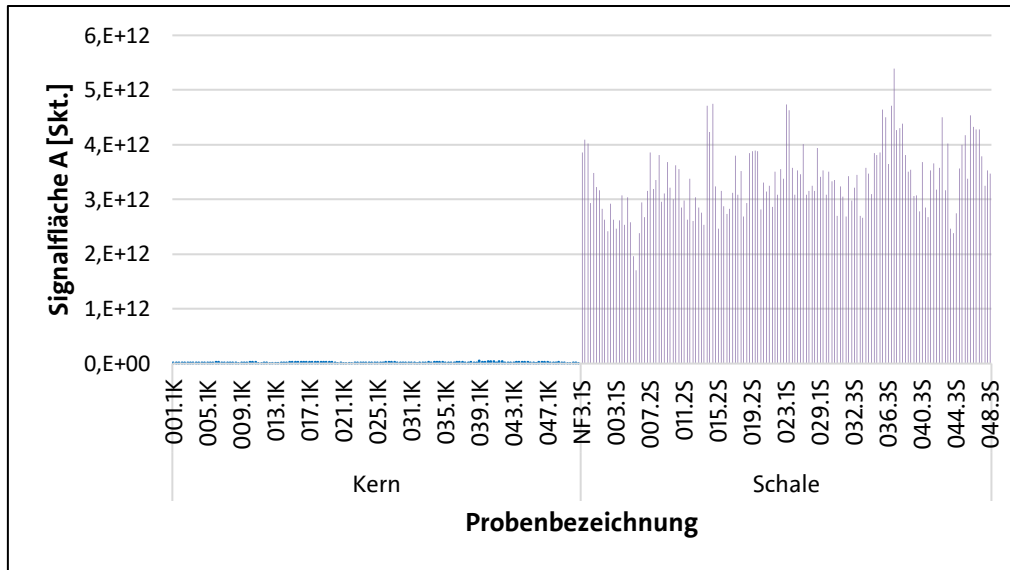


Abbildung 42: Signalflächen der Verbindung 658,613  $m/z$  bei 12,75 min bei Proben unterschiedlichen Herkünften und Erntejahren (blau: Kakaokernproben; lila Kakaoschalenproben).

Im Kontrast zu dem Beispiel in Abbildung 42 sind in Abbildung 43 die Signalflächen eines potenziellen Schlüsselmetaboliten dargestellt, der keine Konzentrationsstabilität gegenüber unterschiedlichen Herkünften und Erntejahren zeigen konnte. Die detektierten Signalflächen der unterschiedlichen, analysierten Schalenproben weichen stark voneinander ab. Obwohl diese Verbindung eine höhere Signalintensität in den Kakaoschalen- als Kakaokernproben und eine Temperaturstabilität gezeigt hat, ist diese Verbindung nicht für den Kakaoschalennachweis geeignet, da diese Verbindung unterschiedliche Konzentrationen in Proben abweichender Herkünfte und Erntejahre aufweist.

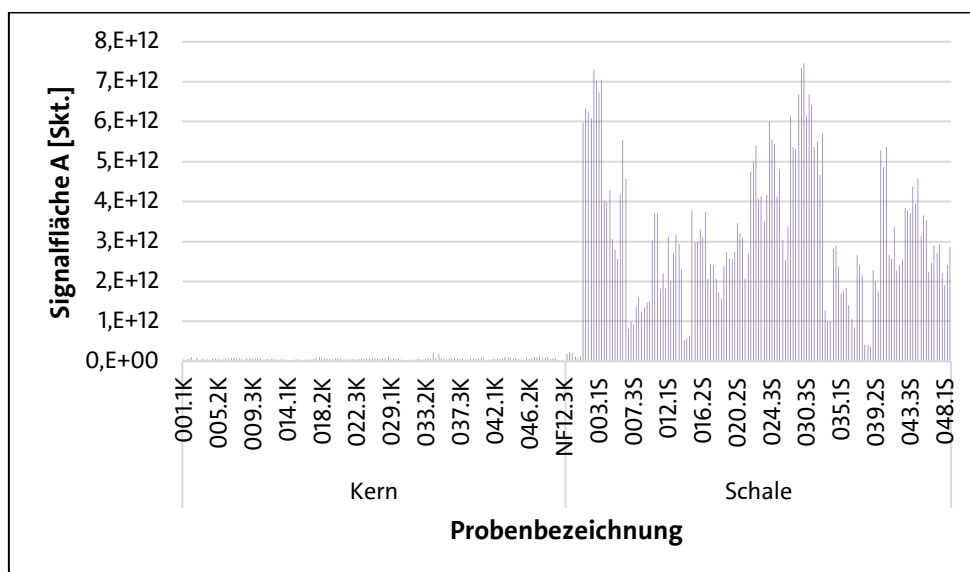


Abbildung 43: Signalflächen der Verbindung 556,530  $m/z$  bei 10,22 min bei Proben unterschiedlichen Herkünften und Erntejahren (blau: Kakaokernproben; lila Kakaoschalenproben).

Die Ergebnisse sind durch entsprechende farbliche Hervorhebungen bezüglich der Erfüllung des Kriteriums gekennzeichnet (Variationskoeffizient:  $\leq 25\%$  grün;  $< 25\%$  und  $\geq 30\%$  gelb;  $< 30,5\%$  rot).

Bei der NTNP Methode konnten 28 und bei den NTP Methoden jeweils keine der temperaturstabilen potenziellen Schlüsselmetaboliten das Gleichmäßigkeitskriterium erfüllen.

### 5.2.4 Überprüfung des Konzentrationsunterschieds zwischen der Kakaoschale und dem Kakaokern (Exklusivkriterium)

Die Bewertung des Exklusivkriteriums stellt die Grundlage der Eignung eines potenziellen Schlüsselmetaboliten dar. Das Kriterium gibt Auskunft über den Konzentrationsunterschied der potenziellen Schlüsselmetaboliten in der Kakaoschale und im Kakaokern. Zur Berechnung wurde der Quotient des Signal-Rausch-Verhältnisses ( $S/N$ ) des Metaboliten in der Kakaoschale und im Kakaokern gebildet.

Das Exklusivkriterium gilt als erfüllt, wenn der Quotient des  $S/N$  über zehn liegt, als teilweise erfüllt, wenn es über fünf liegt und als nicht erfüllt, wenn es kleiner als fünf ist. Somit erfüllen dieses Kriterium ausschließlich Verbindungen, deren  $S/N$  in der Kakaoschale um das 10-fache höher ist als im Kakaokern.

Die Ergebnisse sind durch entsprechende farbliche Hervorhebungen bezüglich der Erfüllung des Kriteriums gekennzeichnet (Exklusivkriterium:  $< 5$  rot;  $\geq 5$  und  $< 10$  gelb;  $\geq 10$  grün). Wie auch bei den bisherigen Kriterien steht eine grüne Farbe für die Erfüllung, eine gelbe Farbe für eine teilweise Erfüllung und eine rote Farbe für die Nichterfüllung des Kriteriums.

Bei der NTNP Methode konnten 58, bei der NTP Methode im positiven Ionenmodus 14 und im negativen Ionenmodus sieben der temperaturstabilen, potenziellen Schlüsselmetaboliten das Exklusivkriterium erfüllen.

### 5.2.5 Überprüfung der Konzentration in der Kakaoschale (Konzentrationskriterium)

Für die Bewertung des Konzentrationskriteriums werden die  $S/N$  der potenziellen Schlüsselmetaboliten in den Schalenproben betrachtet. Die beschriebenen  $S/N$  wurden in reinen Kakaoschalenproben detektiert. Da die Kakaoschale für gewöhnlich eine Minorkomponente, zum Beispiel in der Kakaomasse oder in Schokoladen darstellt, wird das  $S/N$  der Schlüsselmetaboliten in dieser Art von Proben deutlich kleiner sein. Daher zeigen ausschließlich Schlüsselmetaboliten eine

Praxistauglichkeit, welche mit einer hohen Konzentration in den reinen Kakaoschalenproben nachgewiesen werden konnten. Die Nachweisgrenze wird üblicherweise mit einem  $S/N$  von 3 oder zum Teil auch mit 10 beschrieben.<sup>210, 211</sup> Um eine Bewertung der Anforderungen des Codex-Alimentarius abgeben zu können, müssen Kakaoschalengehalte von 5 % bestimmbar sein, so dass hier das Signal eines Schlüsselmetaboliten in reinen Kakaoschalenproben einen  $S/N$  von größer als 60 (ein  $S/N$  von 3 bei einer Probe mit 5 % Kakaoschale entspricht einem  $S/N$  von 60 bei einer Probe mit 100 % Kakaoschale) aufweisen muss. Damit das Signal der Schlüsselmetaboliten auch bei Kakaomassen oder Schokoladen, die lediglich einen Gehalt von ca. 1 % Kakaoschale aufweisen, nicht unter die Nachweisgrenze (engl. *limit of detection*, LOD) sinkt, muss das detektierte Signal der Schlüsselmetaboliten in den reinen Kakaoschalenproben ein  $S/N$  von größer als 300 aufweisen.

Die Ergebnisse sind durch entsprechende farbliche Hervorhebungen bezüglich der Erfüllung des Kriteriums gekennzeichnet ( $S/N$ : < 60 rot;  $\geq 60$  und < 300 gelb;  $\geq 300$  grün).

Bei der NTNP Methode konnten 39, bei der NTP Methode im positiven Ionenmodus elf und im negativen Ionenmodus vier der temperaturstabilen, potenziellen Schlüsselmetaboliten das Konzentrationskriterium erfüllen.

### 5.2.6 Zusammenfassung der Bewertungskriterien der Schlüsselmetaboliten

Die Ergebnisse und die damit verbundene Reduktion des Pools an potenziellen Schlüsselmetaboliten durch die definierten Bewertungskriterien sind für die einzelnen *non-targeted* Methoden in Tabelle 30 aufgeführt. Die hohe Anzahl an detektierten potenziellen Schlüsselmetaboliten für die polaren Methoden, obwohl bei diesen Methoden deutlich weniger Verbindungen detektiert werden konnten, ist auf eine andere Einstellung des *Molecular Features*-Algorithmus zurückzuführen. Für die polaren Methoden wurden kleinere Wert für das minimale  $S/N$  definiert, ab dem ein Signal einer Verbindung zugeordnet werden darf. Aus diesem Grund konnten bei den polaren Methoden mehr Verbindungen als potenzielle Schlüsselmetaboliten identifiziert werden.

Die Zusammenfassung der Ergebnisse zeigt eindeutig, dass die unpolaren, potenziellen Schlüsselmetaboliten bessere Eigenschaften gegenüber den Bewertungskriterien gezeigt haben. Während bei den polaren Methoden kein potenzieller Schlüsselmetabolit identifiziert werden konnte, dass alle Bewertungskriterien erfüllt, konnten bei der unpolaren Methode 18 potenzielle Schlüsselmetaboliten identifiziert werden, die zufriedenstellende Ergebnisse bei den Bewertungskriterien gezeigt haben.

Tabelle 30: Zusammenfassung der Evaluierung der potenziellen Schlüsselmetaboliten.

Bewertungskriterium	Unpolare Methode	Polare Methode	
		Positive Ionenmodus	Negative Ionenmodus
Detektierte Verbindungen	3300	2600	1500
Potenzielle Schlüsselmetaboliten	196	459	170
Röstungskriterium <sup>1,a</sup>	104	33	12
Gleichmäßigkeitskriterium <sup>2,b</sup>	28	0	0
Fermentationskriterium <sup>3,b</sup>	40	3	0
Exklusivkriterium <sup>4,b</sup>	58	14	7
Konzentrationskriterium <sup>5,b</sup>	39	11	4
Erfüllung aller Kriterien <sup>c</sup>	18	0	0

<sup>1</sup>Überprüfung der Temperaturstabilität; <sup>2</sup>Überprüfung der Konzentrationsunabhängigkeit gegenüber der Herkunft, Sorte und des Erntejahres; <sup>3</sup>Überprüfung der Konzentrationsunabhängigkeit gegenüber dem Fermentationsprozess; <sup>4</sup>Bewertung des Konzentrationsunterschiedes zwischen der Kakaoschale und dem Kakaokern; <sup>5</sup>Bewertung der Konzentration der Schlüsselmetaboliten in der Kakaoschale; <sup>a</sup>Angewendet auf alle potenziellen Schlüsselmetaboliten; <sup>b</sup>Angewendet auf alle temperaturstabilen Schlüsselmetaboliten; <sup>c</sup>Zufriedenstellende Ergebnisse.

In Abbildung 44 sind die Ergebnisse des Auswahlverfahrens der Schlüsselmetaboliten, welche anhand der NTNP Methode identifiziert werden konnten, graphisch dargestellt. Durch die definierten Bewertungskriterien hat sich der Pool der potenziellen Schlüsselmetaboliten stetig auf die verbleibenden 18 Verbindungen reduziert, die für die *targeted* Methode verwendet werden sollten und somit als Biomarker bezeichnet werden können.

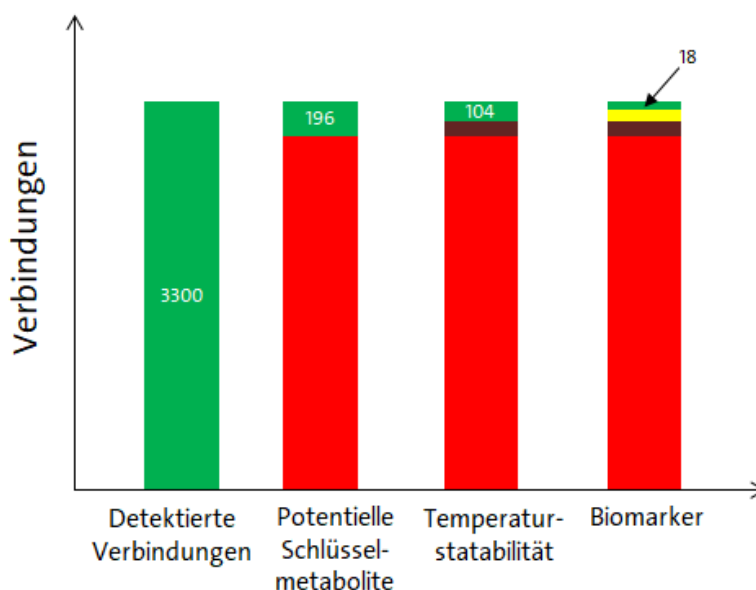


Abbildung 44: Graphische Darstellung des Auswahlverfahrens der Schlüsselmetaboliten der NTNP Methode.



### 5.2.7 Strukturaufklärung der Schlüsselmetaboliten

Nach der Evaluierung und Entfernung ungeeigneter potenzielle Schlüsselmetaboliten anhand der fünf definierten Bewertungskriterien konnten bei 18 Verbindungen der NTNP Methode zufriedenstellende Ergebnisse detektiert werden. Von den potenziellen Schlüsselmetaboliten der beiden polaren Methoden konnte keine Verbindung identifiziert werden, die für eine Bestimmung des Kakaoschalenanteils geeignet ist. In Tabelle 31 sind die 18 potenziellen Schlüsselmetaboliten mit den besten Ergebnissen für die Bewertungskriterien aufgeführt. Von den ausgewählten Verbindungen konnten fünf Verbindungen alle definierten Bewertungskriterien vollständig erfüllen. Da für die Bestimmung des Kakaoschalenanteils jedoch ein multiparametrischer Ansatz angestrebt wurde, wurden 13 weitere Verbindungen ausgewählt, die so viele der Bewertungskriterien wie möglich erfüllen oder Ergebnisse gezeigt haben, die dicht an der Grenze zur Erfüllung der Kriterien liegen.

Tabelle 31: Potenzielle Schlüsselmetaboliten mit den besten Ergebnissen für die Bewertungskriterien.

<i>m/z</i>	<i>R<sub>t</sub></i> [min]	Variationskoeffizient <i>v</i> [%]	Signalflächen-Unterschied $\eta$ fermentierte vs. nicht fermentierter Schalenproben [%]	Konzentrationskriterium [ <i>S/N</i> ]	Exklusivkriterium
429,332	8,88	26	144	1696	40,4
469,419	8,93	22	67	23689	13,3
483,431	9,40	8	93	4356	5,7
485,414	8,25	26	68	62	10,3
497,416	9,50	20	79	10198	32,4
499,427	8,58	27	124	4346	21,9
525,481	10,08	33	84	4548	23,7
527,462	7,65	44	115	2369	18,4
539,49	10,40	33	91	4482	48,1
540,535	10,35	38	110	4610	24,1
541,437	9,50	24	124	307	15,4
555,369	9,75	25	175	1088	5,8
658,613	12,75	20	101	925	77,1
686,648	13,13	19	93	3243	108,1
696,65	13,70	20	113	99	19,8
956,865	14,00	167	34	5130	96,8
965,856	9,25	26	69	6000	130,4
984,897	14,72	34	118	1024	25,6
1.021,92	9,80	21	83	16247	34,9

Zur Strukturaufklärung der NTNP Schlüsselmetaboliten wurden die Informationen der hochauflösenden qToF-MS Analysen herangezogen. Durch die analysierten exakten Massen und dem Isotopenmuster konnte softwaregestützt die wahrscheinlichste Summenformel errechnet werden. Aufgrund der Datenreduktion mit Hilfe des *Find Molecular Feature* Algorithmus werden verschiedene Addukte eines Metaboliten zu einer einzigen detektierten Verbindung zusammengefasst und nur das intensivste Signal zur Auswertung verwendet. Dadurch entsprechen die detektierten Signale nicht zwangsläufig dem Pseudo-Molekülion  $[M+H]^+$ , sondern evtl. auch Produktionen der Form  $[N+NH_4]^+$  oder  $[2M+H]^+$ .

Aus diesen Informationen lässt sich die Summenformel des Neutramoleküls berechnen. Die Summenformel des Neutramoleküls wurde zusammen mit den Informationen der akquirierten MS<sup>2</sup>-Spektren für die datenbankbasierte Vorhersage der wahrscheinlichsten Strukturformel mittels MetFrag verwendet.<sup>212</sup> Zusätzlich wurde jede Strukturformel manuell anhand des Fragmentspektrums auf Plausibilität überprüft. Anhand der datenbankbasierten Vorhersage und der Überprüfung anhand der detektierten Fragmentspektren konnte die Struktur aller 18 Schlüsselmetaboliten aufgeklärt werden. In Tabelle 32 ist eine Übersicht der identifizierten Schlüsselmetaboliten mit Zuordnung zu der jeweiligen Substanzklasse dargestellt.

Tabelle 32: Schlüsselmetaboliten für den Kakaoschalennachweis.

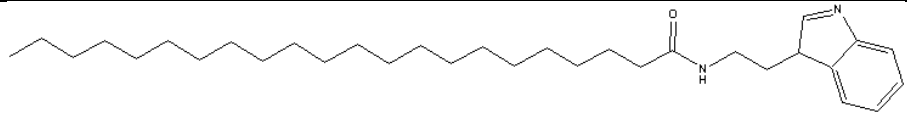
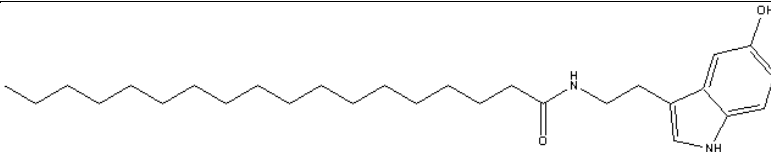
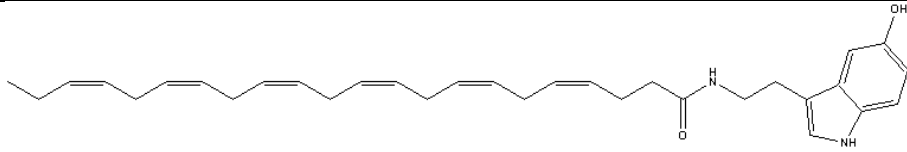
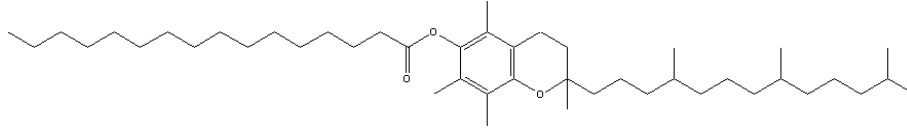
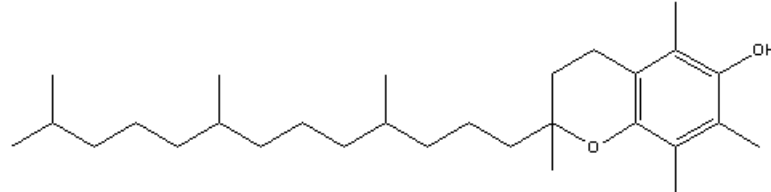
Substanzklasse	Verbindung	Summenformel	m/z [DA]
Fettsäuretryptamide	Heneicosäuretryptamid	C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O	469,419 (H+)
	Behensäuretryptamid	C <sub>32</sub> H <sub>54</sub> N <sub>2</sub> O	483,431 (H+)
	Tricosäuretryptamid	C <sub>33</sub> H <sub>56</sub> N <sub>2</sub> O	497,447 (H+)
	Pentacosäuretryptamid	C <sub>35</sub> H <sub>60</sub> N <sub>2</sub> O	525,477 (H+)
	Cerotinsäuretryptamid	C <sub>36</sub> H <sub>62</sub> N <sub>2</sub> O	539,49 (H+)
	Lignocerinsäuretryptamid	C <sub>68</sub> H <sub>116</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	1021,918 (2M+H+)
Fettsäure-5-hydroxy-tryptamide (Serotonin-Derivate)	Heneicosäure-5-hydroxy-tryptamid	C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	485,410 (H+)
	Behensäure-5-hydroxy-tryptamid	C <sub>32</sub> H <sub>54</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	499,427 (H+)
	Lignocerinsäure-5-hydroxy-tryptamid	C <sub>34</sub> H <sub>58</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	527,457 (H+)
	Pentacosäure-5-hydroxy-tryptamid	C <sub>35</sub> H <sub>60</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	541,472 (H+)
	Cerotinsäure-5-hydroxy-tryptamid	C <sub>36</sub> H <sub>62</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	555,488 (H+)
α-Tocopherol-derivate	α-Tocomonoenol	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	429,372 (H+)
	α-Tocopherolmyristat	C <sub>43</sub> H <sub>76</sub> O <sub>3</sub>	658,613 (NH4+)
	α-Tocopherolpalmitat	C <sub>45</sub> H <sub>80</sub> O <sub>3</sub>	686,645 (NH4+)

Substanzklasse	Verbindung	Summenformel	m/z [DA]
Triacylglycerole	TG(18:2/22:0/18:2)	C <sub>61</sub> H <sub>110</sub> O <sub>6</sub>	956,864 (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )
	TG(22:1/18:0/20:3)	C <sub>63</sub> H <sub>114</sub> O <sub>6</sub>	984,895 (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )
Ceramide	Dihydroceramide (d18:0/16:0)	C <sub>34</sub> H <sub>69</sub> NO <sub>3</sub>	540,535 (H <sup>+</sup> )
	Cer(d25:0(OH)/18:0(3OH))	C <sub>43</sub> H <sub>85</sub> NO <sub>5</sub>	696,650 (H <sup>+</sup> )

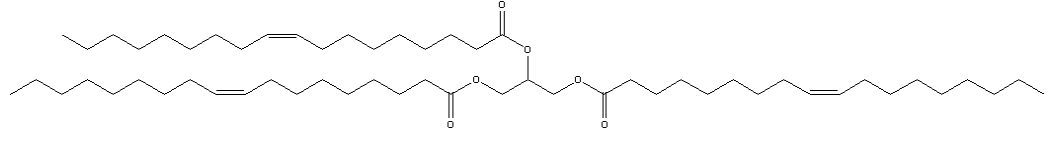
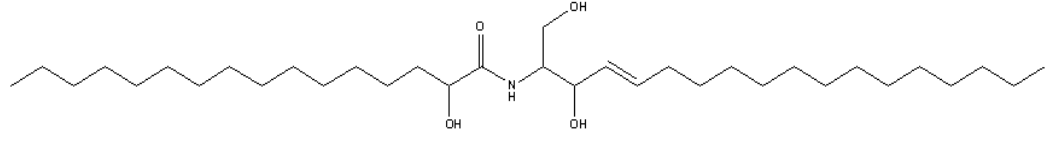
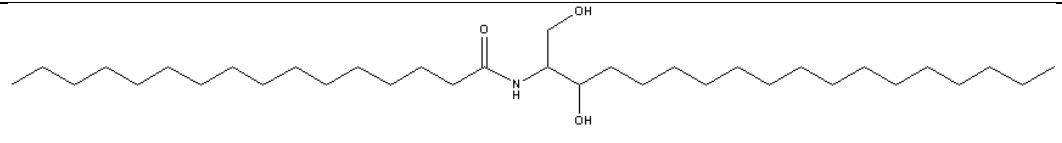
Die 18 potenziellen Schlüsselmetaboliten mit den besten Evaluationsergebnissen konnten fünf verschiedenen Stoffklassen: Fettsäuretryptamide, Fettsäure-5-hydroxy-tryptamide (Serotonin Derivate),  $\alpha$ -Tocopherol Derivate, Ceramide und Triacylglycerolen, zugeordnet werden. Weiterhin sollte die Identität gemäß den Empfehlungen der *Chemical Analysis Working Group* (CAWG) im Rahmen der *Metabolomics Standards Initiative* (MSI) zusätzlich durch den Vergleich mit Standardsubstanzen überprüft werden.<sup>213</sup> Hierfür konnte für jede Substanzklasse mindestens eine Standardsubstanz erworben werden. Durch den Vergleich der Fragmentierungsmuster und der Retentionszeiten der erworbenen Standardsubstanzen und der Schlüsselmetaboliten konnten die zuvor aufgestellten Vermutungen der Identität bestätigt werden.

Für die Überprüfung der identifizierten Verbindungen wurden die in der Tabelle 33 aufgelisteten Verbindungen verwendet.

Tabelle 33: Standardsubstanzen für die Überprüfung der Identität der identifizierten Schlüsselmetaboliten.

Stoffklasse	Verbindung	CAS	Summenformel	Strukturformel
Fettsäuretryptamide	Behensäuretryptamid	7367-79-5	C <sub>32</sub> H <sub>54</sub> N <sub>2</sub> O	
Fettsäure-5-hydroxytryptamide	Stearinsäure-5-hydroxytryptamide	67964-87-8	C <sub>28</sub> H <sub>46</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
	Docosahexaensäure-5-hydroxytryptamide	283601-58-1	C <sub>32</sub> H <sub>42</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
Tocopherol Derivate	α-Tocopherol Palmitat	34562-29-3	C <sub>45</sub> H <sub>80</sub> O <sub>3</sub>	
	α-Tocopherol	10191-41-0	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	

## Ergebnisse und Diskussion

Stoffklasse	Verbindung	CAS	Summenformel	Strukturformel
Triacylglycerole	Triolein	122-32-7	$C_{57}H_{104}O_6$	
Ceramide	N-(2'-(S)-hydroxypalmitoyl)-D-erythro-sphingosine	890041-50-6	$C_{34}H_{67}NO_4$	
	N-palmitoyl-D-erythro-sphinganine	5966-29-0	$C_{34}H_{69}NO_3$	

Im folgenden Abschnitt sind drei Beispiele für die Interpretation der Fragmentierungsmuster der potenziellen Schlüsselmetaboliten dargestellt.

In Abbildung 45 ist das analysierte Fragmentierungsmuster von Lignocerinsäuretryptamid exemplarisch für alle anderen Fettsäuretryptamide und Fettsäure-5-hydroxy-tryptamide dargestellt. Bei den Fettsäuretryptamiden konnten sowohl das Pseudo-Molekülion  $[M+H]^+$  als auch das  $[2M+H]^+$ -Addukt nachgewiesen werden. Zudem konnten die charakteristischen Fragmente mit dem  $m/z$  von 144,08 und 161,11 identifiziert werden, die bereits in der Literatur beschrieben wurden und charakteristisch für die Substanzklasse der Fettsäuretryptamide gelten.<sup>45, 214</sup> In Abbildung 45 sind die entsprechenden MS/MS-Spektren zusammen mit den dazugehörigen Fragmentationen für die intensivsten Signale dargestellt.

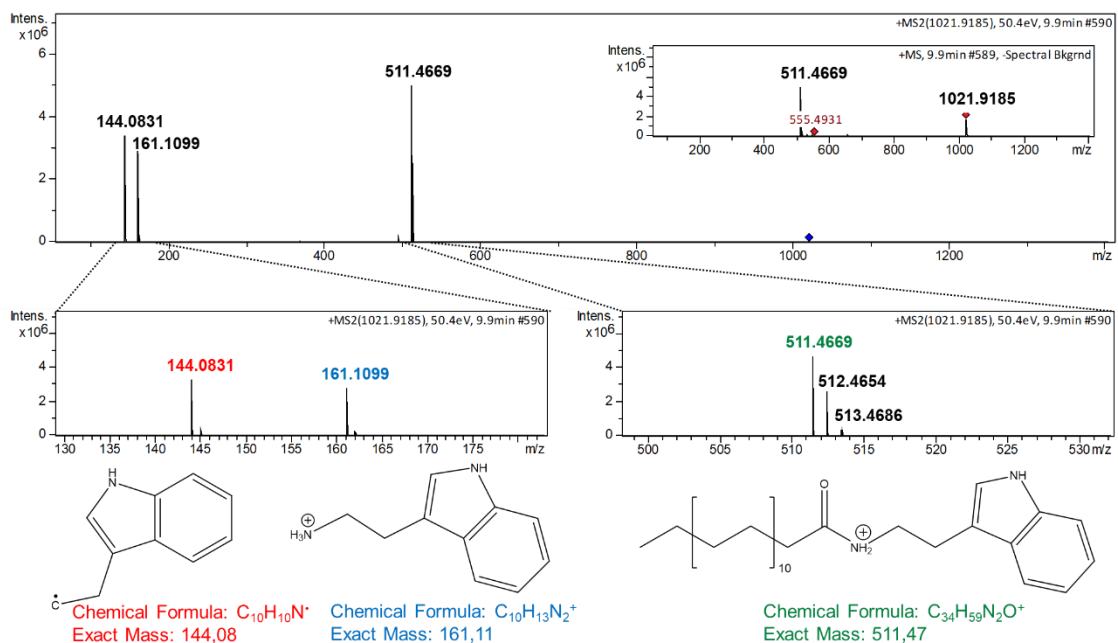


Abbildung 45: MS<sup>2</sup>-Spektrum von Lignocerinsäuretryptamid bei 50,4 eV sowie exemplarische Erläuterung der charakteristischen Fragment-Ionen.

Aus der Stoffklasse der Ceramide konnte unter anderem das *N*-(hexadecanoyl)-sphinganine identifiziert werden. Detektiert wurde das Pseudo-Molekülion  $[M+H]^+$ . Bei der Analyse des Fragmentierungsmusters konnten die für die Dihydrosphingosine charakteristischen  $m/z$  von 266,29 und 284,29 detektiert werden.<sup>215-217</sup> In Abbildung 46 ist das charakteristische Fragmentierungsmuster von *N*-(hexadecanoyl)-sphinganine dargestellt. Weiterhin konnten die charakteristischen Fragmente mit dem  $m/z$  von 264 und 282 im MS<sup>2</sup>-Spektrum detektiert werden.

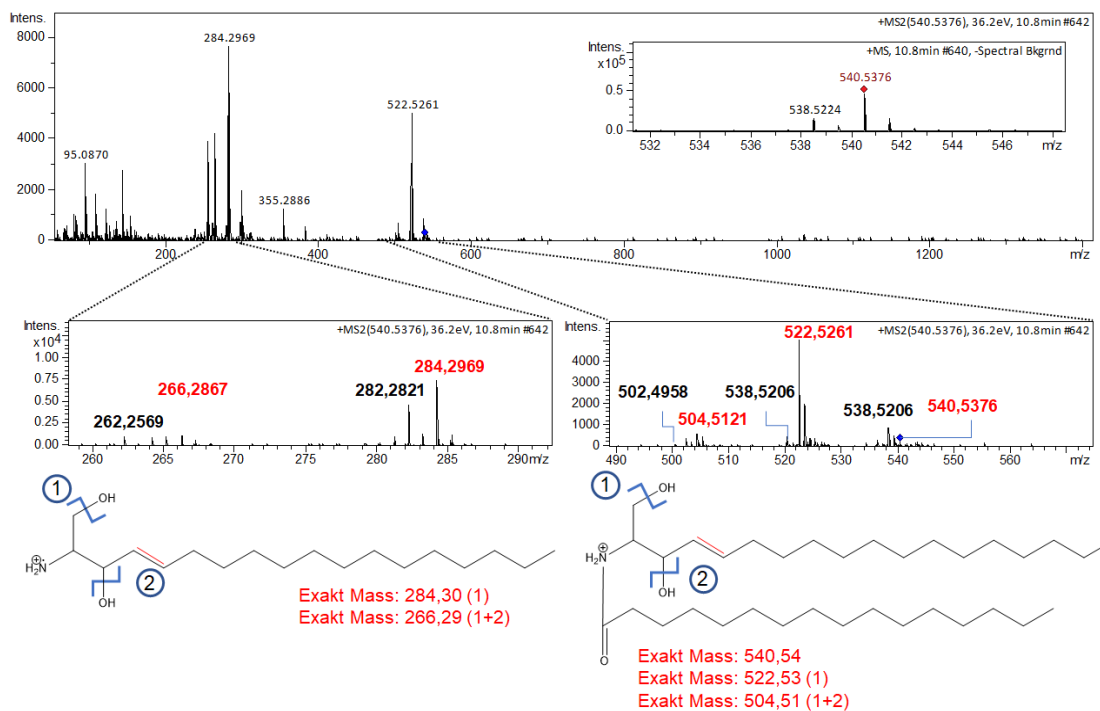


Abbildung 46: MS<sup>2</sup>-Spektrum von *N*-(hexadecanoyl)-sphinganine bei 36,2 eV sowie exemplarische Erläuterung der charakteristischen Fragment-Ionen. In Rot die zusätzliche Doppelbindung des *N*-Steroylsphingosine mit den zugehörigen *m/z*-Verhältnissen.

Als drittes Beispiel ist das Fragmentierungsmuster von TG(18:2/18:2/24:0) dargestellt. Die Triacylglycerole konnten im MS-Spektrum als Ammonium-Addukte [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> identifiziert werden. Zudem konnten die charakteristischen [Acyl]<sup>+</sup>, [Acyl-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> und [Acyl+74]<sup>+</sup> Ionen in den Fragmentenspektren nachgewiesen werden.<sup>218, 219</sup> Anhand der beschriebenen charakteristischen Fragment-Ionen ließ sich die Identität des Triacylglycerols und die Zusammensetzung der Fettsäuren innerhalb des Moleküls bestätigen. Eine schematische Darstellung der Identifizierung von TG(18:2/18:2/24:0) ist in Abbildung 47 aufgeführt.

## Ergebnisse und Diskussion

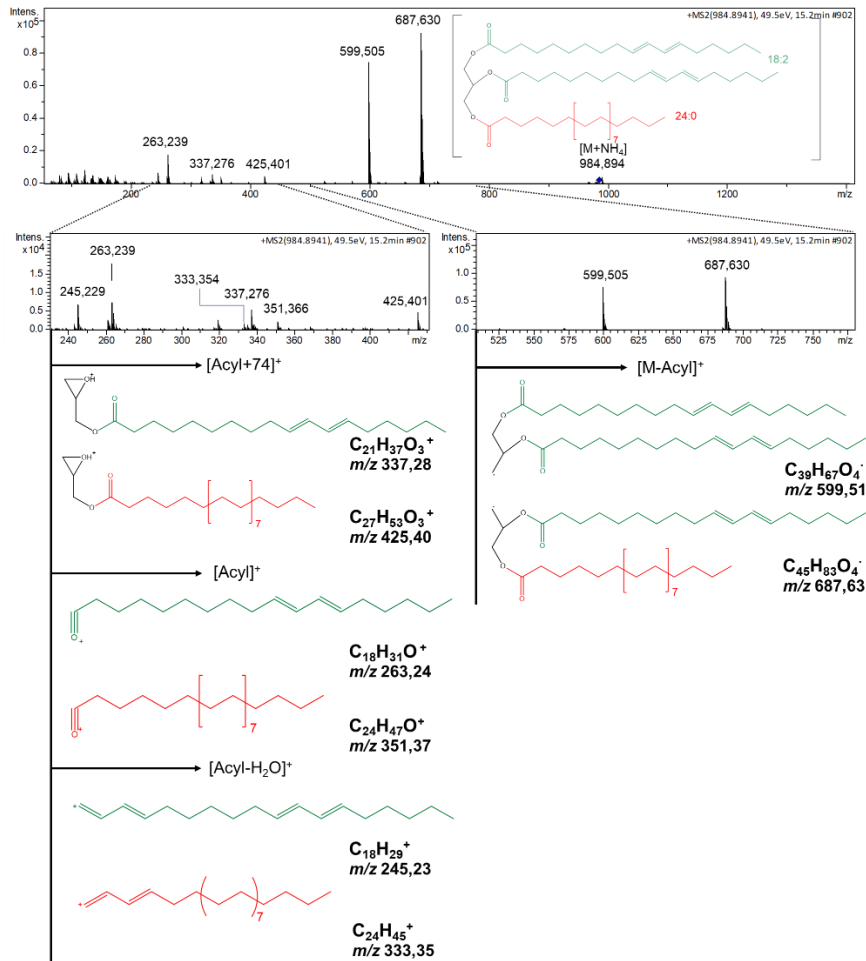


Abbildung 47: MS<sup>2</sup>-Spektrum von TG(18:2/18:2/24:0) bei 49,5 eV sowie exemplarische Erläuterung zu aussagekräftigen, charakteristischen Fragment-Ionen; grün: C18:2 Seitenkette, rot C24:0 Seitenkette.

Für eine absolute Strukturaufklärung der Triacylglycerole, auch im Hinblick auf die Positionen der einzelnen Fettsäurereste am Glycerol und der Doppelbindungen innerhalb der Fettsäuren, sollte eine Analyse mittels NMR-Spektroskopie erfolgen. Für die Fragestellung ist dies jedoch nicht von Relevanz, da die Analyse mit einem massenselektiven Detektor durchgeführt wurde und eine Unterscheidung zwischen den unterschiedlichen Isomeren mit der verwendeten Applikation nicht möglich ist.



### 5.2.8 Überprüfung der Linearität im relevanten Arbeitsbereich

Zur Überprüfung der Linearität der identifizierten Schlüsselmetaboliten wurde eine Kakaoschalenverdünnungsreihe, hergestellt nach Verfahren 2 Abschnitt 6.2.6, in einer fünffachen Bestimmung jeder Konzentrationsstufe analysiert. Die Mischungsverhältnisse der einzelnen Konzentrationsstufen sind in Tabelle 34 aufgeführt.

Tabelle 34: Mischungsverhältnisse der erstellten Kakaoschalen-Verdünnungsreihe.

Kalibrierpunkt	Kakaokern [g]	Kakaoschale [g]	Gesamteinwaage [g]	Anteil Kakaoschale [%]
1	4,950	0,050	5,00	1,00
2	4,902	0,104	5,01	2,08
3	4,852	0,150	5,00	3,00
4	4,803	0,201	5,00	4,02
5	4,749	0,251	5,00	5,01
6	4,702	0,302	5,00	6,04
7	4,652	0,350	5,00	6,99
8	4,605	0,400	5,00	7,98
9	4,552	0,450	5,00	9,00
10	4,499	0,500	5,00	10,00

Zur Visualisierung des linearen Zusammenhangs zwischen den detektierten Signalflächen und der Kakaoschalenkonzentration wurden diese gegeneinander in einem Koordinatensystem aufgetragen. In Abbildung 48 bis Abbildung 52 ist für jede Substanzklasse beispielhaft das Ergebnis einer Verbindung dargestellt. Für alle weiteren Schlüsselmetaboliten sind die linearen Regressionskoeffizienten in Tabelle 35 aufgeführt.

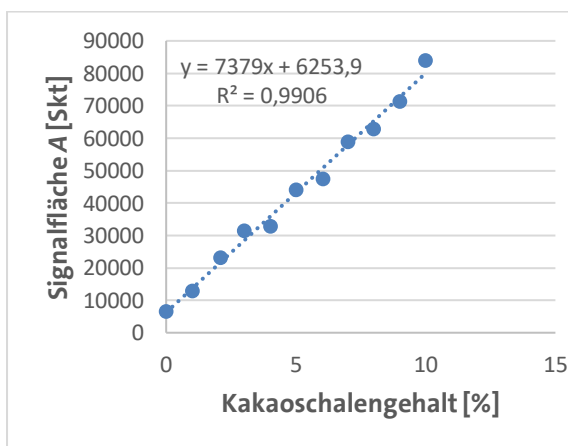


Abbildung 48: Signalflächen von  $\alpha$ -Tocomenol bei verschiedenen Kakaoschalengehalten.

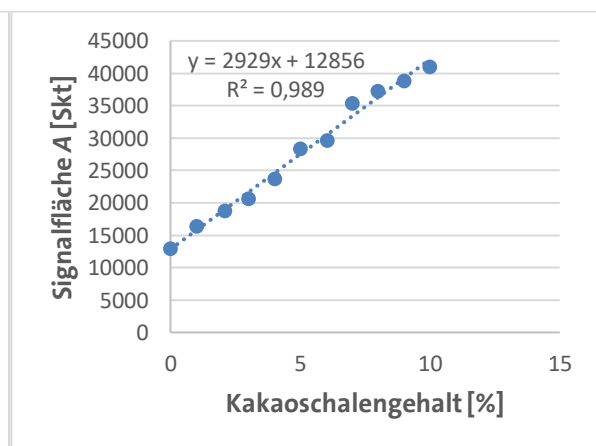


Abbildung 49: Signalflächen von Heneicosansäuretryptamid verschiedenen Kakaoschalengehalten.

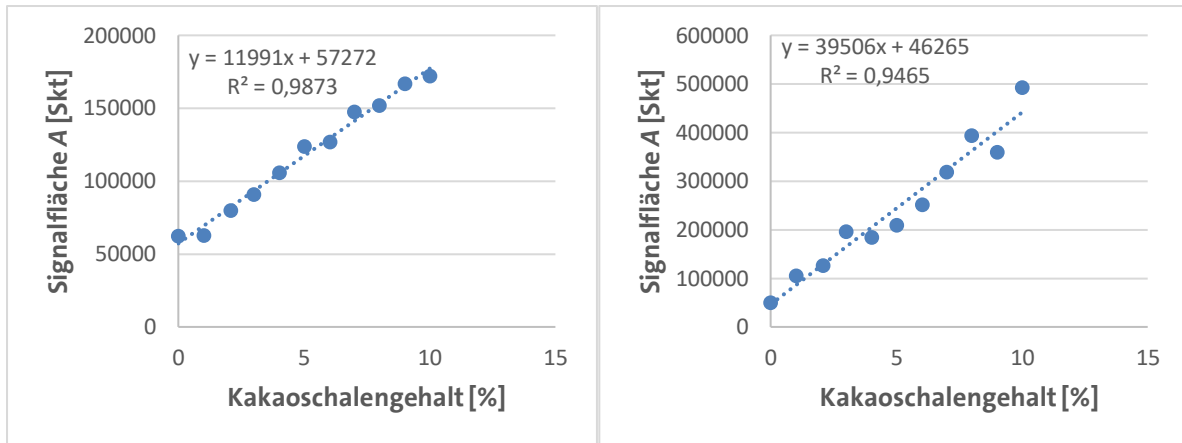


Abbildung 50: Signalflächen von Behensäure-5-hydroxy-tryptamid bei verschiedenen Kakaoschalengehalten.

Abbildung 51: Signalflächen von Dihydroceramide (d18:0/16:0) bei verschiedenen Kakaoschalengehalten.

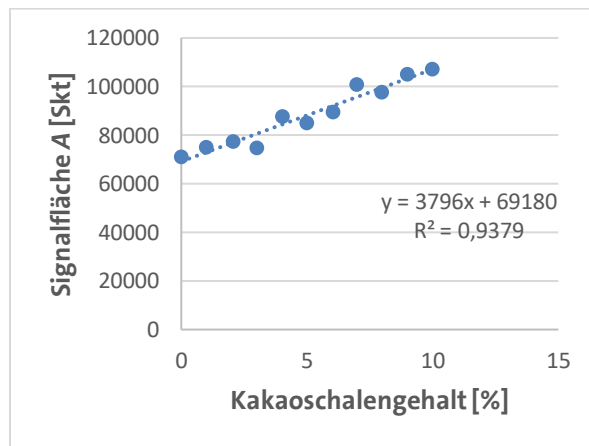


Abbildung 52: Signalflächen von TG(18:2/22:0/18:2) bei verschiedenen Kakaoschalengehalten.

Um den linearen Zusammenhang zu überprüfen, wurde analog zu Abschnitt 5.1.2.4 der Linearitätstest nach MANDEL durchgeführt.<sup>220</sup> Der Grenzwert der F-Verteilung ( $f_1=1$  und  $f_2=n-3$ ) liegt für die analysierten Regressionen bei 11,26. Die Prüfgrößen der Schlüsselmetaboliten liegen, mit Ausnahme des TG(22:1/18:0/20:3), alle zwischen 1,000 und 1,014 und zeigen somit eine Linearität im Konzentrationsbereich von 0-10 % Kakaoschale. Für das TG(22:1/18:0/20:3) konnte bereits visuell kein linearer Zusammenhang detektiert werden.

In Tabelle 35 ist eine Zusammenfassung der identifizierten Schlüsselmetaboliten dargestellt. Neben den Ergebnissen der Bewertungskriterien sind die Summenformeln,  $m/z$ , detektierten Fragment-Ionen und der Regressionskoeffizient der analysierten Kakaoschalenverdünnungsreihe für alle Schlüsselmetaboliten aufgeführt. Diese Verbindungen stellen die Grundlage für die Entwicklung einer *targeted* Methode mit einem HPLC-ESI-QQQ System dar.

## Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 35: Zusammenfassung der identifizierten Schlüsselmetaboliten zusammen mit den Ergebnissen der Bewertungskriterien und der Strukturaufklärung.

Schlüsselmetaboliten	Summenformel	<i>m/z</i>	RT [min]	Addukt	MS/MS Fragment-Ion [ <i>m/z</i> ]	R <sup>2</sup>	<i>v</i>	Fermentationskriterium	Exklusivitätskriterium	Konzentrationskriterium [S/N]
α-Tocomonoenol	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	429,372	8,9	H <sup>+</sup>	165.07; 205.12; 233.15	0.991	26	144	40,4	1696
Heneicosäuretryptamid	C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O	469,419	8,9	H <sup>+</sup>	144.08; 161.11; 326.34	0.989	22	67	13,3	23689
Behensäuretryptamid	C <sub>32</sub> H <sub>54</sub> N <sub>2</sub> O	483,431	9,4	H <sup>+</sup>	144.08; 161.11; 340.36	0.991	8	93	5,7	4356
Heneicosäure-5-hydroxytryptamid	C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	485,410	8,3	H <sup>+</sup>	160.08; 177.1; 326.34	0.961	26	68	10,3	62
Tricosäuretryptamid	C <sub>33</sub> H <sub>56</sub> N <sub>2</sub> O	497,447	9,5	H <sup>+</sup>	144.08; 161.11; 354.38	0.991	20	79	32,4	10198
Behensäure-5-hydroxytryptamid	C <sub>32</sub> H <sub>54</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	499,427	8,6	H <sup>+</sup>	160.08; 177.1; 340.36	0.988	27	124	21,9	4346
Pentacosäuretryptamid	C <sub>35</sub> H <sub>60</sub> N <sub>2</sub> O	525,477	10,1	H <sup>+</sup>	144.08; 161.11; 382.42	0.988	33	84	23,7	4548
Lignocerinsäure-5-hydroxytryptamid	C <sub>34</sub> H <sub>58</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	527,457	7,7	H <sup>+</sup>	160.08; 177.1; 368.4	0.987	44	115	18,4	2369
Cerotinsäuretryptamid	C <sub>36</sub> H <sub>62</sub> N <sub>2</sub> O	539,49	10,4	H <sup>+</sup>	144.08; 161.11; 396.44	0.988	33	91	48,1	4482
Dihydroceramide (d18:0/16:0)	C <sub>34</sub> H <sub>69</sub> NO <sub>3</sub>	540,535	10,4	H <sup>+</sup>	256.26; 284.29; 504.51; 522.52	0.988	38	110	24,1	4610
Pentacosäure-5-hydroxytryptamid	C <sub>35</sub> H <sub>60</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	541,472	9,5	H <sup>+</sup>	160.08; 177.1; 382.42	0.978	24	124	15,4	307
Cerotinsäure-5-hydroxytryptamid	C <sub>36</sub> H <sub>62</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	555,488	9,75	H <sup>+</sup>	160.08; 177.1; 396.44	0.989	25	175	5,8	1088
α-Tocopherolmyristat	C <sub>43</sub> H <sub>76</sub> O <sub>3</sub>	658,613	12,8	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	149.1; 165.09; 375.29; 431.39; 641.59	0.995	20	101	77,1	925

## Ergebnisse und Diskussion

Schlüsselmetaboliten	Summenformel	<i>m/z</i>	RT [min]	Addukt	MS/MS Fragment-Ion [ <i>m/z</i> ]	R <sup>2</sup>	<i>v</i>	Fermentationskriterium	Exklusivitätskriterium	Konzentrationskriterium [S/N]
α-Tocopherolpalmitat	C <sub>45</sub> H <sub>80</sub> O <sub>3</sub>	686,645	13,1	NH <sub>4</sub> <sup>+k</sup>	149.1; 165.09; 403.32; 431.39; 669.62	0.994	19	93	108,1	3243
Cer(d25:0(OH)/18:0(3OH))	C <sub>43</sub> H <sub>85</sub> NO <sub>5</sub>	696,650	11,7	H <sup>+</sup>	280.26; 298.26; 381.37; 660.63; 678.64	0.348	18	232	19,8	1433
TG(18:2/22:0/18:2)	C <sub>61</sub> H <sub>110</sub> O <sub>6</sub>	956,864	14	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	263;24; 337;27; 398.37; 600.51; 660.6	0.938	167	34	96,8	5130
TG(22:1/18:0/20:3)*	C <sub>63</sub> H <sub>114</sub> O <sub>6</sub>	984,895	14,7	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	263.24; 337.27; 425.4; 600.51; 688.63	0,005	34	118	25,6	1024
Lignocerinsäuretryptamid	C <sub>68</sub> H <sub>116</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	1021,918	9,8	[2M+H <sup>+</sup> ]	144.08; 161.11; 368.4; 507.47	0.983	21	83	34,9	16247

\*Keine Linearität im Konzentrationsbereich 0-10 % Kakaoschale

### 5.3 Kakaoschalennachweis mittels *targeted* LC-MS

#### 5.3.1 Vorhersagemodelle für den Kakaoschalengehalt

Für die Bestimmung des Kakaoschalengehalts in verschiedenen Kakaoprodukten wurden unterschiedliche PLS-R Modelle als Vorhersagemodell erstellt. Die Erstellung der Modelle erfolgte anhand von Kakaoschalen-Verdünnungsreihen mit bekanntem und definiertem Schalengehalt. Die Kakaoschalen-Verdünnungsreihen wurden auf zwei unterschiedliche Arten hergestellt, um eine Aussage treffen zu können, welche Methode besser für die Vorhersage des Kakaoschalengehaltes geeignet ist. Die beiden hergestellten Kakaoschalen-Verdünnungsreihen unterscheiden sich in der Herstellung. Bei der ersten Variante wurde der jeweilige Anteil des Kakaoschale und des -kerns direkt in das Extraktionsgefäß eingewogen (Kalibrierbereich: 0-8 % Kakaoschale). Bei der zweiten Variante wurden zuerst jeweils ca. 5 g Ansätze der unterschiedlichen Verdünnungsstufen hergestellt, durch Schütteln homogenisiert und anschließend ein Aliquot dieser Mischungen für die die Extraktion verwendet (Kalibrierbereich: 0-10 % Kakaoschale). Während bei der zweiten Variante eine potenziell inhomogene Verteilung der Kakaoschale im 5 g Ansatz vorliegen kann, wird beim ersten Ansatz immer ein definierter Kakaoschalenanteil in den Extraktionsansatz eingewogen. Dieser definierte Kakaoschalengehalt beträgt bei einer Probe mit 1 % Kakaoschale und einem Gesamtgewicht des Ansatzes von 50 mg lediglich 0,5 mg. Die Einwaage solch geringer Massen beinhaltet einen großen Wägefehler und ist sehr zeitintensiv. Durch die Auswertung der analysierten unterschiedlichen Verdünnungsreihe sollte beurteilt werden, welche Variante besser für die Vorhersage des Kakaoschalengehaltes in Proben mit bekanntem und unbekanntem Kakaoschalengehalt geeignet ist. Neben der Vorhersagequalität wurde auch die Durchführbarkeit der beiden Methoden bewertet.

Die Kalibrierung des Systems musste anhand von hergestellten Kakaoschalen-Verdünnungsreihen erfolgen, weil nicht für alle Schlüsselmetaboliten die entsprechenden Standardsubstanzen und isotoopenmarkierte Verbindungen für die interne Kalibrierung erworben werden konnten.

Zur Erstellung eines robusten und aussagekräftigen Modells muss sichergestellt werden, dass die Schlüsselmetaboliten, welche für die Erstellung des Vorhersagemodells verwendet werden, im relevanten Konzentrationsbereich (0 – 10 % Kakaoschale) einen linearen Zusammenhang aufweisen, damit anhand der Signale der Metaboliten auf die Konzentration der Schale in unbekanntem Kakaoprodukten zurückgeschlossen werden kann. Der lineare Zusammenhang der Schlüsselmetaboliten wurde bereits anhand der NTNP Methode bewiesen, muss allerdings

aufgrund der abweichenden Extraktion und LC-MS/MS Systems erneut erfolgen. Für die Überprüfung des linearen Zusammenhangs wurde, analog zu der NTNP Methode, eine Fünffachbestimmung der Kakaoschalen-Verdünnungsreihe analysiert, der Mittelwert der einzelnen Konzentrationsstufen berechnet und der Linearitätstest nach MANDEL durchgeführt (s. Tabelle 36). Für die Überprüfung der Linearität wurde die Kalibrierreihe nach dem Verfahren 2, beschrieben Abschnitt 6.2.6, verwendet.

Neben den beiden Triacylglycerolen, welche die Anforderungen der Methodvalidierung nicht erfüllen konnten und keine Linearität bei der Analyse der Kakaoschalen-Kalibrierreihe gezeigt haben, konnte bei der entwickelten TNP Methode auch für  $\alpha$ -Tocopherolmyristat kein linearer Zusammenhang detektiert werden. Das Signal dieser Verbindung konnte erst bei einem höheren Kakaoschalengehalt von ca. 8 % erfasst werden. Durch die Umstellung der Extraktion und das Verwenden eines anderen Detektorsystems hat sich die Nachweisgrenze von  $\alpha$ -Tocopherolmyristat verändert, sodass die Verbindung nicht in Proben mit einem Kakaoschalengehalt von kleiner als 8 % nachgewiesen werden konnte. Die Änderung der Nachweisgrenze könnte auch durch die Verwendung einer anderen Ionenquelle, bei der es sich ebenfalls um eine ESI-Quelle handelt, die jedoch aufgrund eines anderen Herstellers auch ein abweichendes Ionisierungsvermögen aufweisen kann, hervorgerufen worden sein. Die Erstellung der Vorhersagemodelle wurde anhand der 15 verbliebenen Schlüsselmetaboliten durchgeführt. Der lineare Zusammenhang der verbleibenden 15 Schlüsselmetaboliten konnte anhand des Linearitätstest nach MANDEL bewiesen werden (vgl. Tabelle 36).

Tabelle 36: Ergebnisse zur Überprüfung des linearen Zusammenhangs der Schlüsselmetaboliten.

Schlüsselmetaboliten	Gradengleichung	R <sup>2</sup>	Berechnete PG nach MANDEL
$\alpha$ -Tocomonoenol	$y = 4805,2 \cdot x + 7684,8$	0,978	-7,99
Heneicosansäure-5-hydroxytryptamid	$y = 1667,9 \cdot x + 5794,5$	0,984	-6,71
Behensäure-5-hydroxytryptamid	$y = 53050,7 \cdot x + 214106,5$	0,961	-8,00
Lignocerinsäure-5-hydroxytryptamid	$y = 79445,3 \cdot x + 414380,6$	0,958	-8,00
Pentacosansäure-5-hydroxytryptamid	$y = 3281,0 \cdot x + 14449,13$	0,963	-7,99

Schlüsselmetaboliten	Gradengleichung	R <sup>2</sup>	Berechnete PG nach MANDEL
Cerotinsäure-5-hydroxy-tryptamid	$y = 6733,8 \cdot x + 67877,8$	0,900	-8,00
Behensäuretryptamid	$y = 713457,1 \cdot x + 3800340,5$	0,973	-8,00
Heneicosäuretryptamid	$y = 9699,8 \cdot x + 34095,5$	0,970	-7,97
Tricosäuretryptamid	$y = 32807,8 \cdot x + 128215,6$	0,971	-8,00
Pentacosäuretryptamid	$y = 44778,0 \cdot x + 257361,8$	0,932	-8,00
Cerotinsäuretryptamid	$y = 97658,2 \cdot x + 735776,3$	0,860	-8,00
Dihydroceramide (d18:0/16:0)	$y = 9566,1 \cdot x + 13204,8$	0,977	-8,00
Cer(d25:0(OH)/18:0(3OH))	$y = 4204,4 \cdot x + 1279,4$	0,982	-7,98
α-Tocopherolpalmitat	$y = 361,0 \cdot x + 592,1$	0,925	0,43
Lignocerinsäuretryptamid	$y = 927564,8 \cdot x + 6667329,9$	0,958	-8,00
TG(18:2/22:0/18:2)	-	-	-
TG(22:1/18:0/20:3)	-	-	-
α-Tocopherolmyristat	-	-	-

Für die Erstellung der Vorhersagemodelle wurden die Signalflächen der Schlüsselmetaboliten von den Kakaoschalen-Verdünnungsreihen als Grundlage zur Erstellung der PLS-R Modelle verwendet. Die Parameter zur Berechnung der PLS-R Modelle sind in Tabelle 85 und für die Berechnung der Regression in Tabelle 86 dargestellt. Die Verdünnungsreihen wurden in einer Fünffachbestimmung analysiert. Für die Erstellung des Modells wurden alle Datenpunkte der Verdünnungsreihen und nicht die Mittelwerte verwendet, um durch die höhere Anzahl an Messwerten ein robusteres Modell für die Vorhersage zu erhalten.

Bei der Erstellung der Modelle besteht die Möglichkeit eine Gewichtung einzelner Schlüsselmetaboliten vorzunehmen. Durch eine Gewichtung kann großer Einfluss auf das Modell genommen werden. Zur Überprüfung der Vorhersagegüte der einzelnen Schlüsselmetaboliten, auch im Hinblick auf eine potenzielle Gewichtung einzelner Verbindungen, wurde eine Auswertung anhand der einzelnen linearen Regressionen der Metaboliten vorgenommen. Um die erstellten linearen

Regressionen auf ihre Eignung zu überprüfen, wurden acht Proben unterschiedlicher Herkunft mit einem bekannten Schalenanteil hergestellt und analysiert (vgl. Tabelle 84). Anhand des Vergleichs zwischen dem eingewogenen Kakaoschalengehalt und dem durch die Regressionen vorhergesagten Gehalt konnte die Vorhersagegüte der einzelnen Schlüsselmetaboliten für die Proben unterschiedlicher Herkünfte bewertet werden.

Die vorhergesagten Kakaoschalengehalte der Schlüsselmetaboliten sind in Tabelle 37 für zwei der analysierten Proben exemplarisch aufgeführt. Die Ergebnisse beziehen sich auf die Proben aus Ecuador und der Elfenbeinküste. Für die Probe aus Ecuador wurde ein Kakaoschalengehalt von 6,06 % und für die aus der Elfenbeinküste von 2,01 % eingewogen.

Tabelle 37: Kakaoschalenanteil bezogen auf die einzelnen Schlüsselmetaboliten.

<b>Metabolit</b>	<b>Kakaoschalengehalt Probe Ecuador [%]</b>	<b>Kakaoschalengehalt Probe Elfenbeinküste [%]</b>
α-Tocomonoenol	8,97	1,7
Heneicosansäure-5-hydroxy-tryptamid	1,10	2,0
Behensäure-5-hydroxy-tryptamid	1,63	1,8
Lignocerinsäure-5-hydroxy-tryptamid	4,28	1,0
Pentacosansäure-5-hydroxy-tryptamid	3,81	0,2
Cerotinsäure-5-hydroxy-tryptamid	12,46	-0,8
Behensäuretryptamid	4,68	1,7
Heneicosansäuretryptamid	3,80	1,7
Tricosansäuretryptamid	6,48	1,8
Pentacosansäuretryptamid	14,42	1,0
Cerotinsäuretryptamid	22,41	0,1
Dihydroceramide (d18:0/16:0)	5,59	5,2
Cer(d25:0(OH)/18:0(3OH))	5,22	2,4
α-Tocopherolpalmitat	4,45	0,0
Lignocerinsäuretryptamid	8,94	1,2
Mittelwert	7,22	1,4

Die vorhergesagten Schalenanteile der analysierten Probe streuen bei der Probe aus Ecuador zwischen 1,10 % und 22,41 % und bei der Probe von der Elfenbeinküste zwischen -0,8 % und 5,2 %. Die einzelnen erhaltenen Ergebnisse lassen keine valide Aussage über den Kakaoschalengehalt



der analysierten Proben zu. Wird jedoch der Mittelwert der vorhergesagten Schalengehalte gebildet, wird ein Wert von 7,22 % Kakaoschale für die Probe aus Ecuador und 1,4 % für die Probe von der Elfenbeinküste erhalten. Diese Werte weichen lediglich um ca. 1 % bzw. 0,6 % von dem tatsächlichen Schalengehalt der Probe ab. Demnach lässt sich der Kakaoschalengehalt der Proben durch Berücksichtigung aller Schlüsselmetaboliten mit einer geringen Abweichung vorher-sagen.

Die einzelnen Schlüsselmetaboliten zeigen nicht immer einen abweichend zu hohen oder zu niedrigen Gehalt für die beiden dargestellten Proben. Als Beispiele können die Ergebnisse von Cerotinsäuretryptamid und Heneicosansäure-5-hydroxy-tryptamid herangezogen werden. Die Vorhersage des Kakaoschalengehalts auf Basis von Cerotinsäuretryptamid ergibt für die Probe aus Ecuador einen deutlich höheren Wert und bei der Probe von der Elfenbeinküste einen deutlich niedrigeren Wert als den Mittelwert. Bei der Vorhersage von der Verbindung Heneicosan-säure-5-hydroxy-tryptamid ist der reziproke Fall zu beobachten. Da bei den Abweichungen von den Vorhersagen der einzelnen Schlüsselmetaboliten kein Schema zu erkennen ist, kann durch eine gezielte Gewichtung oder durch eine Auswahl einzelner Verbindungen die Vorhersagegüte für unbekannte Proben nicht gesteuert werden. Aufgrund der starken Streuung der vorherge-sagten Kakaoschalengehalte der einzelnen Metaboliten und den schwankenden Abweichungen zwischen den analysierten Proben ist es notwendig, so viele Metaboliten wie möglich für die Erstellung des Vorhersagemodells heranzuziehen, um ein robustes Modell zu erhalten. Durch die Berechnung des Mittelwertes aller verwendeten Metaboliten kann der Kakaoschalengehalt be-stimmt werden. Daher wurde keine Gewichtung oder Auswahl einzelner Metaboliten bei der Er-stellung der PLS-R Modelle vorgenommen.

Um die erstellten Kalibrierreihen und die daraus gebildeten PLS-R Modelle auf ihre Eignung und Aussagekraft zu überprüfen, wurden die gleichen acht Proben unterschiedlicher Herkunft mit bekanntem Schalenanteil verwendet, die auch schon zur Bewertung der einzelnen linearen Re-gressionen der Schlüsselmetaboliten herangezogen wurden (siehe oben). Anschließend wurden 14 verschiedene, kommerziell erworbene Schokoladensorten sowie drei Kakaobutterproben ana-lysiert und mithilfe der erstellten Modelle eine Vorhersage für den Schalenanteil in diesen Pro-ben entwickelt. Weiterhin wurde eine Verdünnungsreihe im Bereich von 0 – 100 % Kakaoschale hergestellt, um die Linearität der Metaboliten im gesamten Konzentrationsbereich zu überprü-fen.

## 5.3.1.1 Vorhersagemodell der Kakaoschalen-Verdünnungsreihe nach Variante 1

In Abbildung 53 ist das PLS-R Modell der Kakaoschalenverdünnungsreihe nach dem Verfahren 1 dargestellt. Bei dieser Verdünnungsreihe wurde der jeweilige Kakaoschalen- und Kakaokernanteil direkt in das Extraktionsgefäß eingewogen und extrahiert. Bei der Erstellung des Modells wurde keine Gewichtung einzelner Schlüsselmetaboliten vorgenommen. Die Parameter für die Erstellung des Modells sind in Tabelle 85 aufgeführt.

Dem dargestellten Diagramm ist zu entnehmen, dass eine lineare Abhängigkeit zwischen den Signalflächen der Metaboliten und dem Kakaoschalengehalt vorliegt. Die aus dem Modell gebildete Regression weist ein Bestimmtheitsmaß von 0,89 auf.

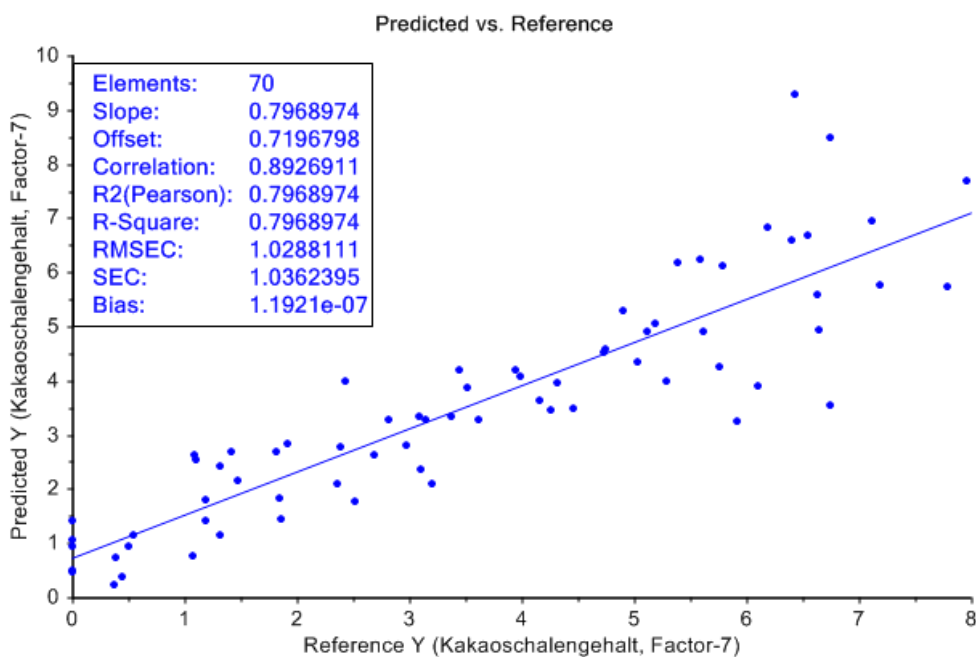


Abbildung 53: PLS-R Modell der ersten Kalibrierreihe.

Die Validierung des Modells wurde anhand einer *Random Cross Validation* mit 20 Segmenten und jeweils 20 Proben pro Segment durchgeführt. Die Ergebnisse der Validierung des Modells sind in Abbildung 54 dargestellt.

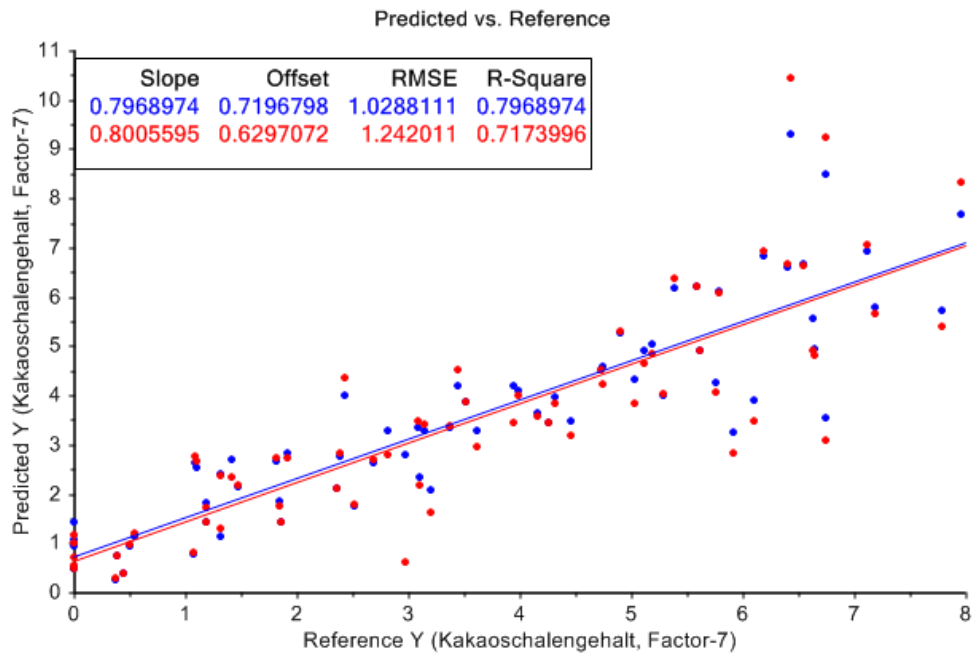


Abbildung 54: Validierungsergebnisse des PLS-R Modells der ersten Kalibrierreihe (Blaue Punkte: Punkte der Kalibrierung; Rote Punkte: Punkte der Validierung).

Das erstellte Modell sollte anschließend zur Überprüfung der Vorhersagegüte auf die hergestellten Proben mit bekanntem Kakaoschalengehalt angewendet werden. Die Proben bekannten Gehaltes wurden jeweils in einer Dreifachbestimmung analysiert.

In Tabelle 38 sind die vorhergesagten und tatsächlichen Gehalte der analysierten Proben zusammen mit der Abweichung der beiden Werte angegeben.

Tabelle 38: Vorhersage der bekannten Proben mithilfe des ersten Modells.

Probe	Kakaoschale (Vorhersage) [%]	Kakaoschale (eingewogen) [%]	Abweichung [%-Kakaoschale]
Ghana	0,34	1,08	0,74
Elfenbeinküste	1,80	2,01	0,21
Nigeria	2,29	2,98	0,69
Panama	3,41	4,10	0,69
Indonesien	4,67	5,02	0,35
Ecuador	5,31	6,06	0,75
Madagaskar	4,96	7,26	2,3
Venezuela	3,37	7,32	3,95

Für die Proben aus Ghana, Elfenbeinküste, Nigeria, Panama und Indonesien konnten geringe Abweichungen von den tatsächlichen Konzentrationen erhalten werden. Eine Abweichung von ca. 1 % ist hierbei als sehr gutes Ergebnis einzustufen. Bei den Proben aus Madagaskar und Venezuela konnte eine deutlich höhere Abweichung der Vorhersage detektiert werden. Dies könnte zum einen auf die abweichende Herkunft der Proben, zum anderen auf den höheren Kakaoschalen-engehalt in den Proben zurückgeführt werden. Der Kakaoschalen-Konzentrationsbereich der verwendeten Kalibrierreihe reicht nur bis ca. 8 % (vgl. Abbildung 53). Somit liegt der tatsächliche Kakaoschalen-engehalt der Proben aus Madagaskar und Venezuela am oberen Ende des Konzentrationsbereichs. Ein weiteres Argument für die stärkere Abweichung dieser Proben könnte sich bei den größeren Abweichungen der Kalibrierpunkte von der Regressionsgerade im höheren Konzentrationsbereich finden lassen. Ab einem Kakaoschalen-engehalt von ca. 6 % kann eine deutlich stärkere Abweichung der Proben von der Regressionsgerade detektiert werden. Diese stärkere Abweichung könnte sich ebenfalls auf die schlechtere Vorhersagegüte der Proben, welche beide in diesem Konzentrationsbereich liegen, ausgewirkt haben.

Anhand des berechneten Modells der ersten Kakaoschalen-Verdünnungsreihe konnten für die Proben mit einem geringen Kakaoschalen-engehalt sehr gute Ergebnisse erhalten werden. Um die Vorhersagequalität im höheren Konzentrationsbereich zu verbessern, wurde eine weitere Kakaoschalen-Verdünnungsreihe hergestellt. Die zweite Verdünnungsreihe wurde in einem Konzentrationsbereich von 0-10 % Kakaoschale hergestellt. Durch die Erweiterung des Konzentrationsbereichs soll die Vorhersagegüte für Proben mit einem erhöhten Kakaoschalen-engehalt verbessert werden.

### 5.3.1.2 Vorhersagemodell der Kakaoschalen-Verdünnungsreihe nach Variante 2

Neben der Erweiterung des Konzentrationsbereichs wurde für die zweite Verdünnungsreihe ein anderes Herstellungsverfahren entwickelt. Während bei der ersten Verdünnungsreihe die Kakaoschale und der Kakaokern direkt in das Extraktionsgefäß eingewogen wurden, wurde bei der zweiten Verdünnungsreihe zuerst ein 5 g-Ansatz der einzelnen Verdünnungsstufen hergestellt, homogenisiert und anschließend ein Aliquot für die Extraktion verwendet.

Das erstellte PLS-R Modell der zweiten Kakaoschalen-Verdünnungsreihe ist in Abbildung 55 und die Ergebnisse der Validierung in Abbildung 56 dargestellt.

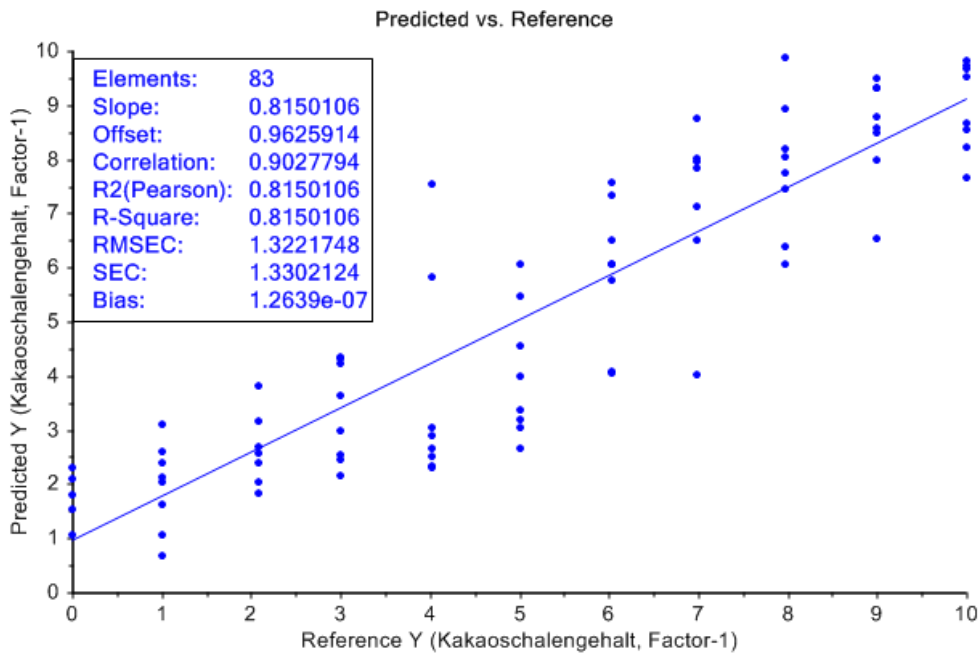


Abbildung 55: PLS-R Modell der zweiten Kalibrierreihe.

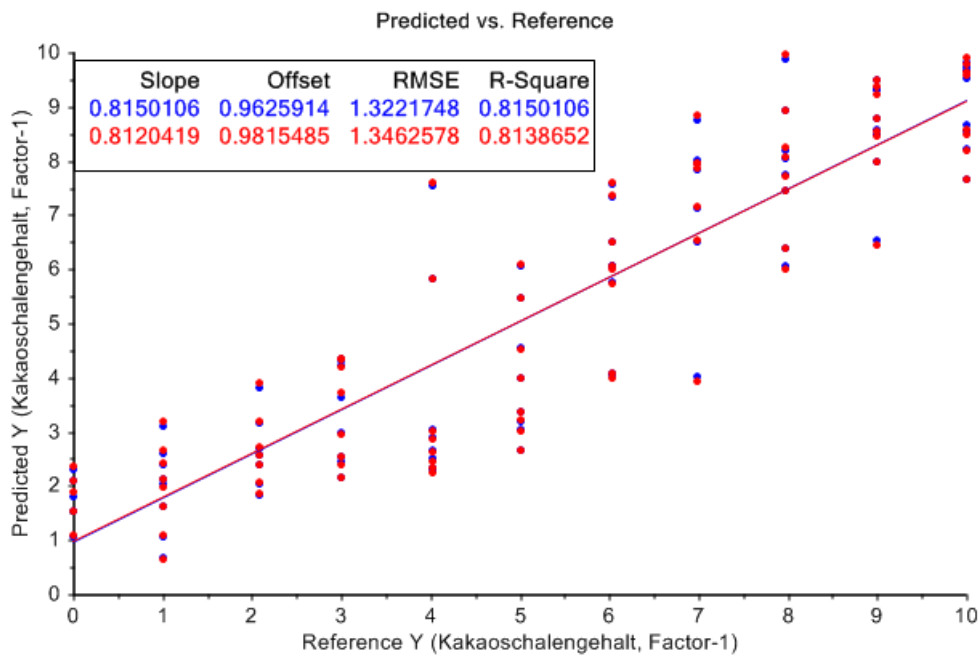


Abbildung 56: Validierung des PLS-R Modells der zweiten Kalibrierreihe (Blaue Punkte: Punkte der Kalibrierung; Rote Punkte: Punkte der Validierung).

Als Grundlage für die Erstellung des Modells wurde eine Achtfachbestimmung der Verdünnungsreihe verwendet. Die einzelnen Datenpunkte der Konzentrationsstufen zeigen eine starke Streuung um die gebildete Regressionsgerade. Eine besonders starke Streuung der Datenpunkte ist bei einem Kakaoschalengehalt von 4 % zu beobachten. Hier liegen zwei der acht Datenpunkte deutlich über und sechs deutlich unter der gebildeten Regressionsgeraden. Bei den anderen

Kalibrierpunkten zeigen die Datenpunkte eine homogene Streuung oberhalb und unterhalb der Regressionsgraden. Zur Überprüfung der Homogenität der Streuung wurde ein weiteres PLS-R Modell mit den Mittelwerten der einzelnen Kalibrierpunkte erstellt. Das erstellte Modell ist in Abbildung 57 dargestellt.

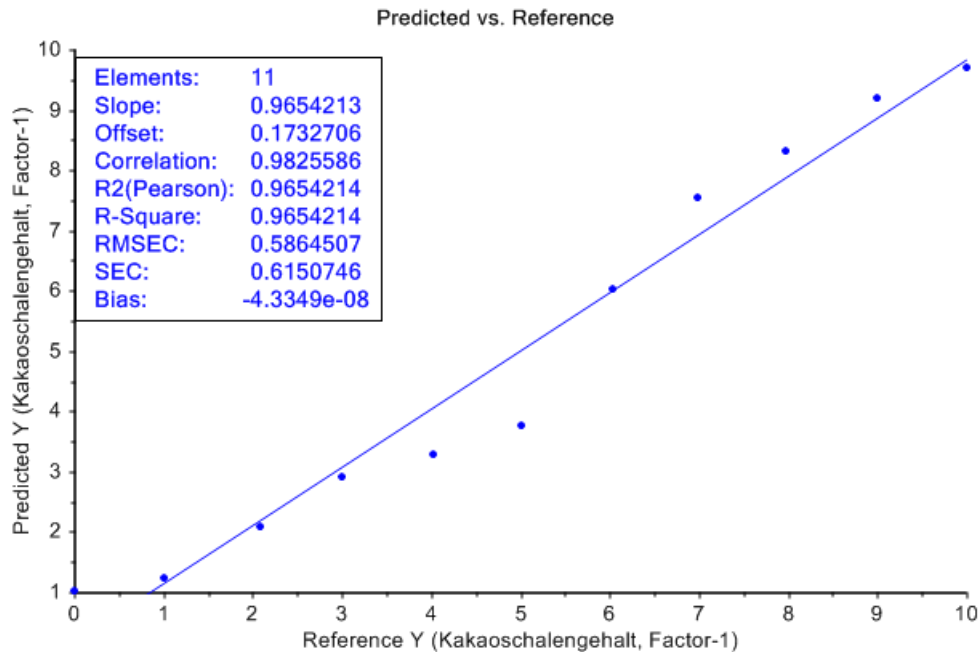


Abbildung 57: PLS-R Modell von den Mittelwerten der zweiten Kalibrierreihe.

Die bereits angenommene homogene Verteilung der Datenpunkte der einzelnen Kalibrierpunkte konnte durch die Bildung des PLS-R Modells anhand der Mittelwerte bestätigt werden. Die erhaltene Regressionsgerade weist ein Bestimmtheitsmaß von 0,97 auf und es kann lediglich eine kleine Streuung der Datenpunkte um die gebildete Regressionsgerade beobachtet werden.

Die in Abbildung 55 detektierte Streuung der Datenpunkte kann durch die potenzielle Inhomogenität der Kalibrierreihe erklärt werden. Bei der Mischung der Kakaoschalen- und Kakaokernproben, welche beide in Pulverform vorlagen, wurde jeweils nur ein geringer Anteil Kakaoschale (0-10 %) verwendet. Durch den geringen Anteil der Kakaoschale und die Eigenschaften der Pulver ist davon auszugehen, dass sich die Kakaoschale nicht absolut homogen im Kakaokernpulver verteilt hat. Die Inhomogenität konnte in den erhaltenen Ergebnissen des PLS-R Modells wiedergefunden werden. Durch die wiederholte Messung der gleichen Konzentrationsstufen konnte jedoch als Mittelwert das richtige Ergebnis erhalten werden, während die Analyse einer Einfachbestimmung eine deutlich größere Abweichung und ein schlechteres Bestimmtheitsmaß

ergeben hat. Die detektierte Inhomogenität der hergestellten Kakaoschalenverdünnungsreihe konnte durch die Analyse der Achtfachbestimmung ausgeglichen werden.

Für die Vorhersage des Kakaoschalengehaltes in den bekannten Proben wurde jedoch das PLS-R Modell mit allen Datenpunkten verwendet, da durch die höhere Anzahl an Datenpunkten ein robusteres Regressionsmodell erhalten wird. Wie bei dem ersten Modell ist auch hier eine lineare Abhängigkeit der Metaboliten im untersuchten Konzentrationsbereich von 1–10 % gegeben. Das Bestimmtheitsmaß der Kalibration beträgt 0,82.

Beim Vergleich der beiden PLS-R Modelle (s. Abbildung 53 und Abbildung 55) wird deutlich, dass beim ersten Modell der Ordinatenabschnitt mit 0,79 % niedriger als bei dem zweiten Modell mit 0,96 % ist. Durch den höheren Ordinatenabschnitt im zweiten Modell, wird dem Blindwert hier ein höherer Kakaoschalengehalt zugesprochen. Für den Blindwert wird ein Kakaoschalengehalt vorhergesagt, weil die identifizierten Schlüsselmetaboliten auch in geringer Konzentration im Kakaokern vertreten sind. Die Streuung der Werte im höheren Konzentrationsbereich aus dem ersten Modell konnte beim zweiten Modell nicht detektiert werden. Zur Bewertung der Vorhersagegüte wurde der Kakaoschalengehalt der bekannten Proben anhand des Modells vorhergesagt. Die Ergebnisse der Vorhersage für die Mittelwerte tabellarisch in Tabelle 39 aufgeführt.

Tabelle 39: Vorhersage der bekannten Proben mithilfe des zweiten Modells.

<b>Probe</b>	<b>Kakaoschale (Vorhersage) [%]</b>	<b>Kakaoschale (eingewogen) [%]</b>	<b>Abweichung [%-Kakaoschale]</b>
Ghana	0,22	1,08	0,86
Elfenbeinküste	2,16	2,01	0,15
Nigeria	4,35	2,98	1,37
Panama	5,14	4,10	1,04
Indonesien	5,94	5,02	0,92
Ecuador	6,83	6,06	0,77
Madagaskar	8,04	7,26	0,78
Venezuela	6,87	7,32	0,45

Die Proben mit bekanntem Schalengehalt wurden auf die gleiche Weise wie die zweite Kakaoschalen-Verdünnungsreihe hergestellt. Die potenzielle Inhomogenität bei der Mischung von zwei Pulvern wurde bereits in diesem Abschnitt thematisiert. Bei der Betrachtung der einzelnen

Bestimmungen der Proben mit bekanntem Schalenanteil kann ebenfalls eine Abweichung detektiert werden (vgl. Abbildung 58). Diese Abweichung kann wiederum auf die potenzielle Inhomogenität der hergestellten Proben zurückgeführt werden. Zur Überprüfung dieser Hypothese erfolgte die Analyse von unterschiedlichen Schokoladen, welche eine homogene Form aufweisen, ebenfalls in einer Dreifachbestimmung. Bei diesen Bestimmungen konnte lediglich eine minimale Abweichung bei den einzelnen Bestimmungen detektiert werden (vgl. Abbildung 59), sodass die hier detektierten Abweichungen nicht auf die Nachweismethode, sondern auf die Inhomogenität der hergestellten Proben zurückzuführen ist. Durch die Analyse weiterer Proben könnte die Aussagekraft der Ergebnisse weiter erhöht werden.

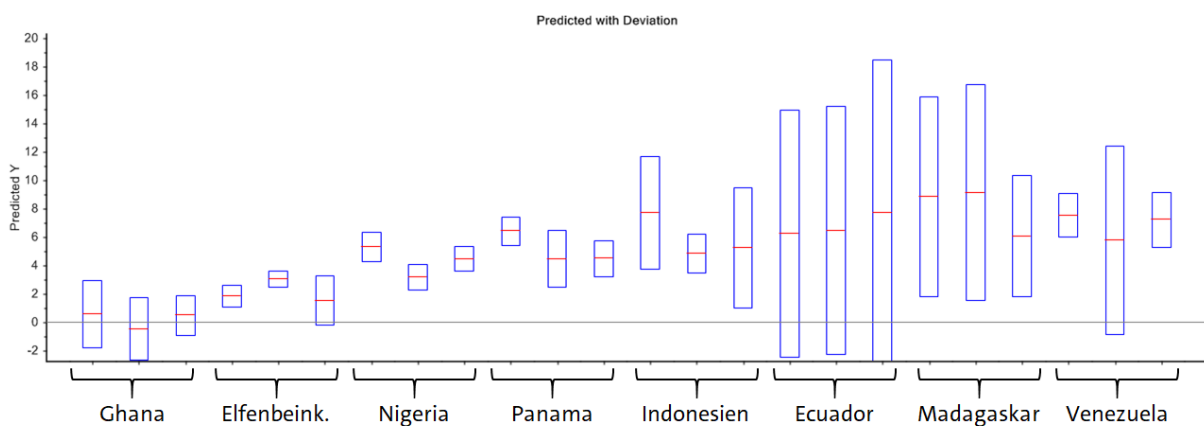


Abbildung 58: Vorhersage der bekannten Proben mithilfe des zweiten Modells für alle analysierten Proben der Dreifachbestimmung.

Beim Vergleich der vorhergesagten Schalenanteile mit den tatsächlichen fällt auf, dass bei allen Proben nur eine geringe Abweichung vorliegt. Im Vergleich zum ersten Modell werden bei diesem Modell auch für die Proben aus Madagaskar und Venezuela sehr gute Ergebnisse erhalten.

Aufgrund der besseren Vorhersagegüte und leichteren Herstellungsweise wurde das PLS-R Modell, welches auf Grundlage der Kakaoschalen-Verdünnungsreihe nach dem Verfahren 2 hergestellt wurde, für die Vorhersage weiterer Proben verwendet.

### 5.3.1.3 Bestimmung des Kakaoschalengehaltes in unterschiedlichen Schokoladen

Das erstellte Modell wurde für die Vorhersage des Kakaoschalengehaltes in unterschiedlichen Schokoladen und Kakaobutter verwendet. Da es sich bei den analysierten Proben um konventionelle Proben handelt, lagen keine Information über den Kakaoschalengehalt der Proben vor. Alle Proben wurden in einer Dreifachbestimmung analysiert. In Tabelle 40 sind die vorhergesagten Kakaoschalengehalte als Mittelwerte und in Abbildung 59 aller Werte dargestellt. Neben den



vorhergesagten Kakaoschalengehalten sind in der Tabelle ebenfalls der Kakaogehalt der analysierten Schokoladen und der Kakaoschalengehalt bezogen auf das verwendete Kakaoprodukt angegeben.

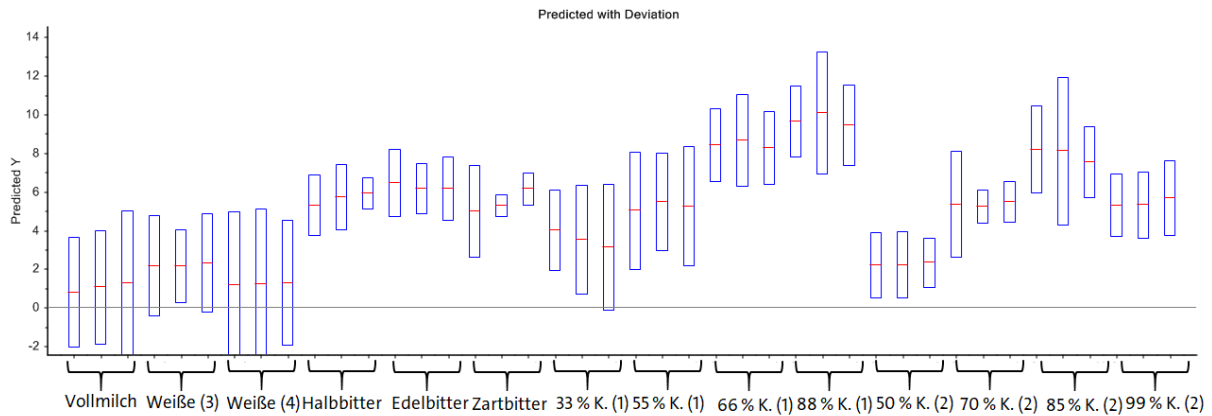


Abbildung 59: Vorhersage der Schokoladenproben mithilfe des zweiten Modells für alle analysierten Werte.

Tabelle 40: Vorhersage der Schokoladenproben mithilfe des zweiten Modells.

Schokolade	Kakaoschale [%]	Kakaogehalt* [%]	Kakaoschale im Kakaoprodukt [%]
Vollmilch Schokolade <sup>5</sup>	1,04	~ 30	3,47
Weißer Schokolade <sup>3</sup>	2,20	~ 30	7,33
Weißer Schokolade <sup>4</sup>	1,21	~ 30	4,03
Halbbitter Schokolade <sup>6</sup>	5,62	55	10,22
Edelbitter Schokolade <sup>6</sup>	6,24	50	12,48
Zartbitter Schokolade <sup>7</sup>	5,47	75	7,49
33% Schokolade <sup>1</sup>	3,56	33	10,79
55% Schokolade <sup>1</sup>	5,21	55	9,47
66% Schokolade <sup>1</sup>	8,41	66	12,74
88% Schokolade <sup>1</sup>	9,69	88	11,01
50% Schokolade <sup>2</sup>	2,25	50	4,50
70% Schokolade <sup>2</sup>	5,37	70	7,67
85% Schokolade <sup>2</sup>	7,92	85	9,32
99% Schokolade <sup>2</sup>	5,42	99	5,47
Kakaobutter	8,30	100	8,30

<sup>x</sup> unterschiedliche Hersteller; \*Summe aus Kakaomasse und Kakaobutter

Die detektierte Streuung bei der Analyse der hergestellten Kakaopulverproben mit bekanntem Schalengehalt konnte bei den analysierten Schokoladenproben nicht beobachtet werden.

Bei der Herstellung der Schokolade werden unterschiedliche Walzen- und Conchiermaschinen eingesetzt, um ein homogenes Produkt zu erhalten (vgl. Abschnitt 3.1). Durch die geringen Abweichungen der Messungen der Schokoladen konnte die Reproduzierbarkeit der Nachweismethode und der Extraktion bestätigt werden.

Für die analysierten Schokoladen lagen keine Informationen über den Kakaoschalengehalt vor. Zur Bewertung der Plausibilität der erhaltenen Ergebnisse wurden daher die Ergebnisse untereinander verglichen und der Kakaoschalengehalt bezogen auf das eingesetzte Kakaoprodukt berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 40 aufgeführt. Neben den analysierten Schokoladen wurden auch drei Kakaobutterproben analysiert, deren Ergebnisse ebenfalls in Tabelle 40 dargestellt sind.

In erster Instanz wurden die Ergebnisse der analysierten Schokoladen miteinander verglichen. Hierbei konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der eingesetzten Menge an Kakaoprodukten und dem analysierten Kakaoschalengehalt detektiert werden. Es wurden jeweils vier Schokoladen mit ansteigendem Kakaoschalengehalt von zwei unterschiedlichen Herstellern analysiert (vgl. Tabelle 40; Hersteller 1 und 2). Hierbei konnte ein konsequenter Anstieg des Kakaoschalengehaltes mit einer Erhöhung des eingesetzten Kakaoanteils detektiert werden. Als Ausnahme ist die Schokolade mit einem Kakaogehalt von 99 % anzusehen. Hier konnte mit einem Kakaoschalengehalt von 5,42 % ein deutlich niedriger Wert, als für die Schokoladen mit einem Kakaoanteil von 70 bzw. 85 % des gleichen Herstellers, bestimmt werden. Die Abnahme des Kakaoschalenanteils bei dieser Schokolade könnte mit einer abweichenden Prozessführung bei der Herstellung oder dem Einsatz von hochwertigerer Ausgangsware erklärt werden. Bei den vier Schokoladen des Herstellers 1 konnte der Zusammenhang eines erhöhten Kakaoschalengehaltes mit steigendem Kakaoanteil bei allen Schokoladen erkannt werden.

Der detektierte Schalenanteil bei den Halb-, Edel- und Zartbitterschokoladen liegt in dem gleichen Konzentrationsbereich wie bei den analysierten Schokoladen der anderen Hersteller mit einem entsprechenden Kakaoanteil. Bei den analysierten weißen Schokoladen und der Vollmilkschokolade wurden deutlich niedrigere Gehalte detektiert. Dies kann ebenfalls durch den niedrigeren Kakaoanteil begründet werden.

Die identifizierten Schlüsselmetaboliten aus der Kakaoschale gelangen als Anhaftungen, die beim Schälprozess nicht abgetrennt wurden, in die Kakaomasse und über diese beim Abpressen aufgrund des lipophilen Charakters auch in die Kakaobutter. Daher konnten in den analysierten

weißen Schokoladen, in denen keine Kakaomasse, sondern ausschließlich Kakaobutter eingesetzt wird, die Schlüsselmetaboliten der Kakaoschale nachgewiesen werden. Weiterhin wurde in den analysierten Kakaobutterproben ein Kakaoschalengehalt von 8,30 % vorhergesagt.

Die berechneten Kakaoschalengehalte, bezogen auf das eingesetzte Kakaoprodukt, zeigen für die Schokoladen der einzelnen Hersteller ähnliche Gehalte. Während die eingesetzten Kakaoprodukte beim Hersteller 1 einen Kakaoschalengehalt von ca. 10 % aufweisen, konnten bei den Schokoladen des Herstellers 2 im Mittel ca. 7 % und bei dem Hersteller 6 11 % nachgewiesen werden. Während der detektierte Kakaoschalengehalt, bezogen auf die verwendeten Kakaoprodukte, bei Betrachtung aller Werte eine starke Streuung aufweist, kann für die einzelnen Hersteller ein Trend erkannt werden.

Sowohl die Korrelation zwischen den detektierten Kakaoschalengehalten als auch der Zusammenhang zwischen dem Kakaoschalengehalt in den verwendeten Kakaoprodukten und den Herstellern spricht für die Plausibilität der Messungen. Die analysierten Schokoladen wurden in randomisierter Reihenfolge analysiert, sodass die Ergebnisse nicht auf die Analysereihenfolge zurückzuführen sind.

Nachdem die Plausibilität der Verhältnisse zwischen den detektierten Kakaoschalengehalten bestätigt werden konnte, galt es weiterhin die Höhe der detektierten Kakaoschalengehalt zu bewerten. Zunächst erscheinen die analysierten Ergebnisse deutlich zu hoch auszufallen, da der Grenzwert für den Kakaoschalengehalt in Kakaomassen durch die Codex Alimentarius Kommission auf 5 %, bezogen auf die fettfreie Kakaotrockenmasse, festgelegt wurde. Da sich dieser Gehalt jedoch auf die fettfreie Kakaotrockenmasse bezieht und diese nur 40-45 % der Kakaomasse ausmacht, reduziert sich der Grenzwert, bezogen auf die gesamte Kakaomasse, weiter auf einen Wert von 2-3 % Kakaoschale. Wird dieser Grenzwert zur Bewertung der eingesetzten Kakaoprodukte in den analysierten Schokoladen herangezogen, überschreitet ein Großteil der Schokoladen den Grenzwert um mehr als das Dreifache.

Aus diesem Grund galt es, die Plausibilität der Höhe der analysierten Kakaoschalengehalte zu überprüfen. Hierfür wurden unterschiedliche, durch Projektpartner bereitgestellte, Kakaomassen (KM) analysiert und die vorhergesagten Kakaoschalengehalte mit denen der Schokoladen verglichen. Für die Vorhersage wurde ebenfalls das PLS-R Modell der zweiten Kakaoschalen-Kalibrierreihe verwendet. Die Ergebnisse der analysierten Kakaomassen sind numerisch in Tabelle 41 dargestellt.

Tabelle 41: Vorhersage der Mittelwerte von Kakaomassenproben mithilfe des zweiten Modells.

Kakaomasse	Kakaoschale [%]	Herkunft
Kakaomasse 1	11,35	Dominikanische Republik
Kakaomasse 2	10,48	Panama
Kakaomasse 3	7,12	West Afrika
Kakaomasse 4	5,86	West Afrika
Kakaomasse 5	1,22	Ecuador
Kakaomasse 6	4,43	Ecuador
Kakaomasse 7	13,05	Westafrika
Kakaomasse 8	11,38	Ecuador
Kakaomasse 9	6,00	Ecuador
Kakaomasse 10	12,13	Mischung
Kakaomasse 11	10,37	Mischung
Kakaomasse 12	7,7	Panama

Die vorhergesagten Kakaoschalengehalte der analysierten Kakaomassen streuen in einem Bereich von 1,22 % für die KM 5 und 13,05 % für die KM 7. Neben der Herkunft standen keine weiteren Informationen zu den KM zu Verfügung. Einen Zusammenhang zwischen einem bestimmten Kakaoschalengehalt und der Herkunft der Proben konnte nicht beobachtet werden. Sowohl in den Proben aus West Afrika, als auch in denen aus Ecuador konnten sehr niedrige (KM 4 und 5) und sehr hohe Gehalte detektiert werden (KM 7 und 8). Die Analysen wurden in randomisierter Reihenfolge und als Dreifachbestimmung durchgeführt. Obwohl für die vorliegenden Kakaomassen keine Informationen zum Kakaoschalengehalt vorlagen, können die erhaltenen Ergebnisse dennoch zur Bewertung der Plausibilität der Höhe des Kakaoschalengehaltes in den Schokoladen herangezogen werden. Die Ergebnisse der KM 4-6 und 9 zeigen, dass bei der Analyse von KM, die für die konventionelle Herstellung von Kakaoprodukten eingesetzt werden, Schalengehalte von 6 % und kleiner detektiert werden können.

Bei der Analyse der Schokoladen wurde meist ein deutlich höherer Kakaoschalengehalt detektiert. Die hohen detektierten Gehalte lassen die Vermutung zu, dass die Kalibrierung durch die verwendete Kakaoschalenverdünnungsreihe für alle analysierten Proben einen gleichmäßigen zu hohen Schalengehalt vorhersagt. Die Plausibilität der relativen Gehalte zwischen den analysierten Schokoladen konnte bereits bestätigt werden. Durch die Analyse der KM konnte jedoch

gezeigt werden, dass bei KM, die durch marktübliche Verfahren hergestellt wurden, ein Kakaoschalengehalt von kleiner als 6 % und sogar von lediglich 1,22 % nachgewiesen werden konnte. Durch diesen Nachweis konnte auch die Plausibilität der Höhe des vorhergesagten Schalenanteils bestätigt werden, da anhand des Modells auch Kakaoschalengehalte für KM detektiert werden konnten, die unter dem festgelegten Grenzwert liegen.

Die detektierten Ergebnisse lassen begründet auf einen deutlich zu hohen Kakaoschalengehalt in den analysierten Schokoladen schließen. Um die Aussagekraft der Methode in Bezug auf die analysierten Schokoladen weiter zu erhöhen sollte eine Matrixvalidierung für die unterschiedlichen Schokoladensorten durchgeführt werden. Starke Matrixeffekte sind jedoch ausgehend von den anderen Zutaten in Schokoladen nicht zu erwarten. Neben der Kakaomasse ist Zucker, eingesetzt als Saccharose, der zweite Hauptbestandteil von Schokoladen.<sup>6</sup> Es ist nicht zu erwarten, dass ein erhöhter Zuckergehalt in der Matrix zu einer Verfälschung der Analyseergebnisse führt, da durch die unpolare Extraktion die polaren Zucker nicht mit extrahiert werden und somit auch keine Matrixeffekte bei der Analyse hervorgerufen werden können.

Für eine weitere Prüfung sollten mehrere Schokoladenproben aus unterschiedlichen Chargen analysiert werden, um die Ergebnisse vergleichen zu können. Bei den analysierten Proben könnte es sich aufgrund des kleinen Stichprobenumfangs um Ausreißer handeln.

### 5.3.1.4 Überprüfung der Reichweite des linearen Arbeitsbereichs der TNP Methode

Zusätzlich zu den Kalibrierungsreihen zwischen 0 und 10 % wurden Proben mit einem Schalenanteil zwischen 0 % und 100 % in 10 bzw. 20 % Schritten hergestellt und analysiert, um die lineare Abhängigkeit der Schlüsselmetaboliten außerhalb des zuvor untersuchten Konzentrationsbereiches überprüfen zu können. In Abbildung 60 ist das PLS-R Modell für den Kakaoschalengehalt von 0 – 100 % dargestellt.

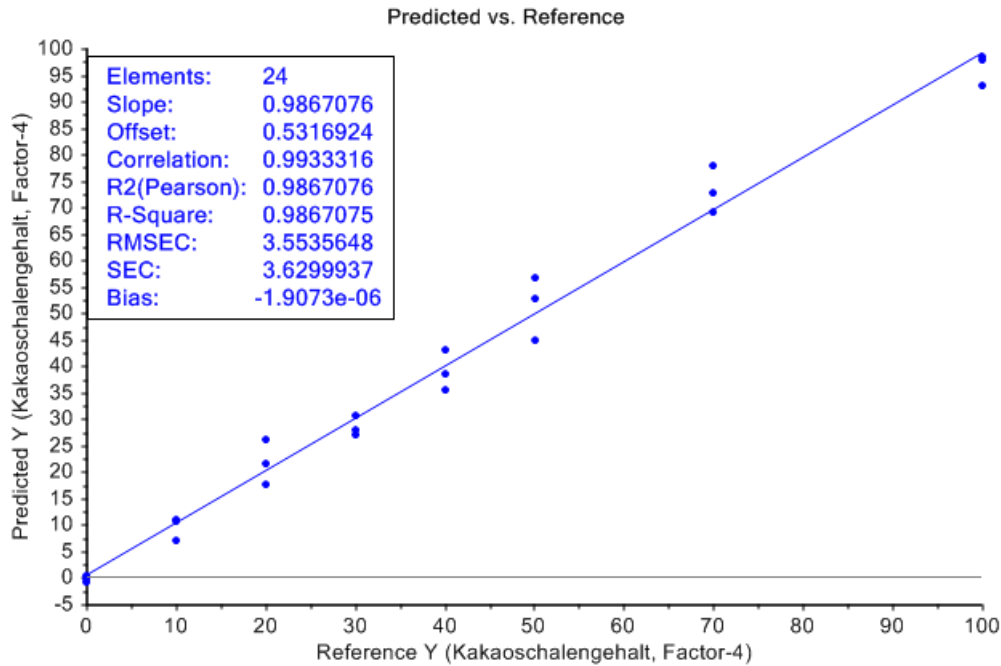


Abbildung 60: PLS-R Modell für den Kakaoschalengehalt im Konzentrationsbereich von 0 – 100 %.

Wie in der Abbildung zu erkennen ist, liegt für den gesamten Konzentrationsbereich von 0 – 100 % Schale eine Linearität vor. Dies konnte durch den Linearitätstest nach MANDEL für alle Metaboliten bestätigt werden. Das Bestimmtheitsmaß der Regressionsgerade liegt bei 0,99. Durch eine entsprechende Kalibrierung kann der Kakaoschalengehalt über den gesamten möglichen Konzentrationsbereich vorhergesagt werden. Während die Eignung der Methode für den in Kakaomassen relevanten Konzentrationsbereich in diesem Kapitel bereits erklärt wurde, kann die Methode aufgrund des weiten linearen Arbeitsbereichs auch für andere Fragestellungen der Qualitätssicherung verwendet werden.

Die bei der Herstellung von Kakaoprodukten anfallende Kakaoschale wird als Viehfutter, Düngemittel oder zur Gewinnung von Theobromin verwendet (vgl. 3.1).<sup>6, 26</sup> Durch die entwickelte Methode kann dieser Nebenstrom der Kakaoindustrie überwacht werden. Zusammen mit der Kakaoschale werden auch Pulparesten, Sand und andere Kontaminationen beim Sichten der gebrochenen Kakaobohnen aus dem System entfernt, welche als Kontamination und qualitätsmindernd einzustufen sind. Durch die Bestimmung des Kakaoschalenanteils bei dem aus dem System entfernten Gemisch kann die Qualität des Nebenstroms bewertet werden.

Weiterhin könnte die Methode zur Überwachung des Sichtungsprozesses eingesetzt werden. Sollten für die Verarbeitung saubere Bohnen mit einem geringen Anteil an Fremdbestandteilen

verwendet werden, kann die Methode weiterhin zur Überprüfung des Abtrennungsprozesses zwischen der Kakaoschale und des Kakaokerns eingesetzt werden. Durch die Methode kann der Kakaoschalenanteil und durch Differenzrechnung somit auch der Kakaokernanteil in dem Ausschuss bestimmt werden. Durch die Kenntnis über den Kakaokernanteil in der entfernten Kakaoschale kann eine Optimierung der Abtrennung, hinsichtlich eines minimalen nachweisbaren Kakaokernanteils, erfolgen.

### 5.4 Methodenvergleich

Bereits in Abschnitt 3.2.3 wurden die in einem Zeitraum von über einem Jahrhundert entwickelten Nachweisverfahren für die Bestimmung des Kakaoschalenanteils aufgeführt. Die frühen Nachweisverfahren beruhen auf gravimetrischen und mikroskopischen Verfahren, die aufgrund der Weiterentwicklung der Walzenwerke und der dadurch feineren Vermahlung des Kakaos an Aussagekraft eingebüßt haben.<sup>45</sup> Die als Merkmale für den mikroskopischen Nachweis herangezogenen Sklereiden und Schleimzellen werden durch die feineren Walzenwerke oftmals bei der Weiterverarbeitung so stark zerstört, dass lediglich Bruchteile dieser Merkmale unter dem Mikroskop nachgewiesen werden können und somit die Aussagekraft der Methoden stark reduziert wird. Die feinere Vermahlung des Kakaos wirkt sich ebenfalls negativ auf die unterschiedlichen gravimetrischen Methoden, auch als Schlemmmethoden bezeichnet, aus. Durch die feinere Vermahlung lassen sich die Schalenbestandteile nicht quantitativ abtrennen und gravimetrisch bestimmen. Weiterhin wurden für die Vorhersage des Schalengehalts bei der Schlemmmethode Tabellenwerke für die Umrechnung von dem gravimetrisch bestimmten Anteil auf den Kakaoschalengehalt benötigt.<sup>221</sup> Die als Grundlage verwendeten Tabellenwerke müssten jedoch auf den Vermahlungsgrad der Proben angepasst werden, um eine valide Aussage über den Kakaoschalengehalt zulassen zu können. Durch die Weiterentwicklung der Verarbeitungsapparaturen sind die frühen entwickelten Nachweisverfahren nicht mehr in der Lage, eine valide Aussage über den Kakaoschalengehalt in Kakaoprodukten zu treffen.

Die auf Grundlage der Arbeiten von FINCKE und SACHER entwickelte Blauwertmethode stellt ein, nach vorangegangener Derivatisierung, photometrisches Nachweisverfahren der vornehmlich in der Kakaoschale enthaltenen Fettsäuretryptamide dar. Bereits 1963 konnte gezeigt werden, dass zwei Verbindungen, welche durch spätere Nachweise als Behensäuretryptamid und Lignocerinsäuretryptamin identifiziert werden konnten, in deutlich höherer Konzentration in der Kakaoschale als im Kakaokern vorkommen. Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass neben

den bereits beschriebenen Fettsäuretryptamiden drei weitere Verbindungen dieser Substanzklasse identifiziert werden konnten, die für den Kakaoschalennachweis herangezogen werden können. Bei der photometrischen Nachweismethode handelt es sich um einen nicht selektiven Nachweis, der, obwohl zuerst angenommen, lediglich die Verbindungen Behensäuretryptamid und Lignocerinsäuretryptamid umfasst, auch die anderen in dieser Arbeit nachgewiesenen Verbindungen dieser Stoffklasse mit erfasst. Neben den Fettsäuretryptamiden wird mit diesem Nachweisverfahren auch die Stoffklasse, der ebenfalls in dieser Arbeit identifizierten Fettsäure-5-hydroxy-tryptamide nachgewiesen. Die beiden Substanzklassen unterscheiden sich ausschließlich in der Hydroxylgruppe am aromatischen System. Für die Derivatisierung spielt dieser zusätzliche Substituent an dieser Position des aromatischen Systems des Indols keine Rolle. Pindur et al. konnte zeigen, dass *p*-( $\alpha$ -dimethylamino)benzaldehyde mit allen Indolderivaten reagiert, die an der zweiten Position des Ringsystems keinen Substituenten aufweisen.<sup>222</sup> Das Absorptionsmaximum der derivatisierten Fettsäure-5-Hydroxy-tryptamide verschiebt sich, bedingt durch den Bathochromen-Effekt der Hydroxylgruppe, geringfügig in den längerwelligen Bereich der elektromagnetischen Strahlung. Trotz der leichten Verschiebung des Absorptionsmaximums im Vergleich zu den Fettsäuretryptamiden werden die Fettsäure-5-hydroxy-tryptamide ebenfalls bei der Blauwertmethode erfasst. Durch die fehlende Selektivität der photometrischen Nachweismethode werden durch die Blauwertmethode 11 der in dieser Arbeit identifizierten Schlüsselmetaboliten nachgewiesen. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass auch weitere Verbindungen durch die beschriebene Methode miterfasst werden, deren Anwesenheit bis dato noch nicht nachgewiesen werden konnte. Bei der Blauwertmethode werden diese Verbindungen als Summenparameter erfasst, sodass der Einfluss derjenigen Verbindungen mit einem kleineren absoluten Gehalt deutlich geringer ausfällt als derer mit einer hohen Konzentration. Als große Nachteile dieser Methode sind die geringe Anwendungsbreite und der große Einfluss der Durchführung der Derivatisierung auf die Farbintensität zu nennen.<sup>223</sup> Aufgrund der photometrischen Detektion können anhand dieser Methode lediglich Produkte analysiert werden, die eine geringe Eigenfärbung aufweisen. Die Blauwertmethode kann daher lediglich für die Analyse von Kakaobutter und nicht für Kakaomassen, Kakaopulver oder Schokoladen verwendet werden.<sup>2</sup>

Als Weiterentwicklung der Blauwertmethode kann die Nachweismethode von Behensäuretryptamid und Lignocerinsäuretryptamid mittels HPLC von Münch et al. angesehen werden.<sup>45</sup> Bei dieser Methode werden die Analyten mittels Fluoreszenzdetektor nachgewiesen, der sich aufgrund der festgelegten Anregungs- und Emissionswellenlänge durch eine hohe Selektivität auszeichnet. Durch das veränderte Detektionsverfahren lassen sich anhand der entwickelten



HPLC-Methode nicht nur Kakaobutter, sondern auch alle anderen Kakaoerzeugnisse analysieren. Während bei der Blauwertmethode alle Verbindungen der Fettsäuretryptamide und der 5-Hydroxy-Fettsäuretryptamide erfasst werden, werden bei der HPLC-Methode lediglich Behensäuretryptamid und Lignocerinsäuretryptamid erfasst, die jedoch mengenmäßig den größten Anteil der Stoffklasse ausmachen. Als Vorteil dieser Methode ist der getrennte und selektive Nachweis dieser Verbindungen zu nennen. Während bei der Blauwertmethode alle Analyten als Summenparameter detektiert werden, findet bei der HPLC-Methode eine unabhängige Detektion der beiden Analyten statt, sodass der erhaltene Kakaoschalengehalt von zwei Variablen beschrieben wird. Als Negativum der HPLC-Methode kann die lange Aufarbeitungsdauer aufgefasst werden. Bei der Probenvorbereitung und Extraktion wird eine 15-minütige Kaltextraktion gefolgt von einer 10-minütigen Zentrifugation und einer Festphasenextraktion durchgeführt. Insbesondere die Festphasenextraktion, die einen Konditionierungs-, Spühl- und Elutions-schritt umfasst, stellt einen erheblichen zeitlichen Aufwand dar. Weiterhin muss das Lösungsmittel der Elutionslösung von der Festphasenextraktion entfernt werden und der Rückstand anschließend erneut aufgenommen werden, um für die Analyse eingesetzt zu werden.<sup>2, 45</sup>

Durch einen multiparametrischen Ansatz für den Nachweis der Kakaoschale lässt sich die Robustheit und Validität der Nachweismethode erhöhen. Aufgrund von potenziell unterschiedlichen Konzentrationen der nachgewiesenen Analyten, abhängig von unterschiedlichen Herkünften, Erntejahren und Prozessierungsstufen der Proben, kann das resultierende Ergebnis fehlerbehaftet oder ungenau sein. Wird jedoch eine Vielzahl an Verbindungen für den Nachweis herangezogen steigt die Wahrscheinlichkeit, dass sich die Unterschiede zwischen den Konzentrationen der einzelnen Analyten und der unterschiedlichen Herkünfte, Erntejahre und Bewirtschaftungsbedingungen nivellieren und eine robuste Vorhersage über den Kakaoschalengehalt getroffen werden kann.

Dieser Ansatz war der Grundstein für die vorliegende Arbeit, bei der durch den *non-targeted Metabolomics* Ansatz eine möglichst große Anzahl an Verbindungen identifiziert werden sollte, die als Schlüsselmetaboliten für den Kakaoschalengehalt herangezogen werden können. Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte *targeted* Methode umfasst neben Behensäuretryptamid und Lignocerinsäuretryptamin 13 weitere Schlüsselmetaboliten und stellt somit eine robuste und valide Nachweismethode für den Kakaoschalengehalt dar. Die Vorhersagegüte dieser Methode wurde bereits ausführlich in Abschnitt 5.3 diskutiert und als sehr hoch und valide eingestuft.

Neben dem Hauptkriterium, der Vorhersagegüte, kann eine weitere Bewertung der unterschiedlichen Methoden anhand der Durchführbarkeit, dem zeitlichen und finanziellen Aufwand und der benötigten apparativen Ausstattung erfolgen. Die Ergebnisse dieser Bewertungskriterien sind in der Tabelle 42 durch eine farbliche Skalierung aufgeführt. Eine rote Färbung steht für eine schlechte, eine gelbe für eine mittlere und eine grüne Farbe für eine vollständige Erfüllung der Bewertungskriterien.

Tabelle 42: Tauglichkeit unterschiedlicher Methoden für den Kakaoschalennachweis.<sup>45-47, 50, 87, 224</sup>

Bewertungskriterien	Gravimetrische Methoden	Mikroskopische Methoden	Blauwert Methode	HPLC-Tryptamid Methode	Metabolomics Methode
Vorhersagegüte	Red	Red	Yellow	Green	Green
Zeitaufwand	Red	Red	Red	Red	Green
Chemikalieneinsatz	Red	Green	Red	Yellow	Green
Apparative Ausstattung	Green	Green	Green	Yellow	Yellow
Anwendbarkeit auf Kakao-Produkte	Green	Green	Red	Green	Green

Bei der Interpretation der Bewertungskriterien ist zu berücksichtigen, dass das Bewertungskriterium der Vorhersagegüte eine übergeordnete Rolle einnimmt. Eine Erfüllung dieses Kriteriums ist obligatorisch für die Eignung der Methode für den Kakaoschalennachweis.

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte Methode konnte bei fast allen Kriterien, insbesondere bei dem obligatorischen Bewertungskriterium der Vorhersagegüte, sehr gute Ergebnisse erzielen. Für die entwickelte Methode wird sowohl ein MS-System in Form eines QqQ-Massenspektrometers als auch ein HPLC-System benötigt. Diese Systeme finden in der Routineanalytik bereits ein breites Anwendungsspektrum, sind aber in den meistens sehr kleinen Laboren zur Qualitätssicherung in den Herstellungsbetrieben nicht vorhanden. Daher konnte die entwickelte Methode als einziges Bewertungskriterium die Anforderungen an die benötigte apparative Ausstattung nur teilweise erfüllen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die neu entwickelte Methode, basierend auf einem *Metabolomics* Ansatz, die besten Ergebnisse für die Bewertungskriterien aufweist. Während alle anderen Methoden deutliche Defizite, wie eine schlechte Vorhersagegüte oder einen sehr hohen zeitlich Aufwand, aufzeigen, zeichnet sich die entwickelte Methode durch eine ausgezeichnete Eignung für den Kakaoschalennachweis bei entsprechender apparativer Ausstattung aus.

## 5.5 Fazit

Das Ziel der Identifizierung von Schlüsselmetaboliten und Schlüsselmetabolit-Gruppen für den Kakaoschalennachweis in Kakaoprodukten und die Entwicklung einer *targeted* Methode für den schnellen und kostengünstigen Nachweis des Kakaoschalengehaltes in unterschiedlichen Kakaoprodukten konnte erfüllt werden. Mit der entwickelten multiparametrischen Methode kann der Kakaoschalengehalt unabhängig der Herkunft, dem Erntejahr sowie weiteren Probenmerkmalen, wie der Sorte oder den Bewirtschaftungsbedingungen, mit einer Abweichung von ca. 1 % Kakaoschale nachgewiesen werden. Die Konzentrationsunabhängigkeit der Schlüsselmetaboliten gegenüber unterschiedlichen Rösttemperaturen, Fermentationen und unterschiedlichen Herkünften, Erntejahren, Kakaosorten oder Bewirtschaftungsbedingungen konnte valide dargelegt werden. Durch die Einsetzbarkeit der Methode für unterschiedliche Kakaoprodukte, wie Kakaopulver, -massen, -butter und Schokoladen, kann die gesamte Wertschöpfungskette mit der entwickelten Methode überwacht werden und die jeweiligen Herstellungsschritte im Sinne einer guten Prozessführung und einem geringen Kakaoschalengehalt optimiert werden. Mit der entwickelten Methode steht den Einkäufern von Halbfabrikaten aus den Anbauländern eine leistungsfähige Methode zur Überprüfung der Produktqualität hinsichtlich des Kakaoschalengehaltes zur Verfügung. Neben der Wareneingangskontrolle und der Möglichkeit, die Optimierung der Prozessführung überwachen zu können, kann die Methode auch zur Aufdeckung von *Food Fraud* eingesetzt werden. Es können bewusste oder unbewusste Streckung von Kakaoprodukten mit der kostengünstigeren Kakaoschale im Sinne der Gewinnmaximierung überwacht und aufgedeckt werden.

Zusätzlich zu der Möglichkeit, die Qualität unterschiedlicher Kakaoprodukte zu überwachen, eignet sich die Methode aufgrund des weiten linearen Arbeitsbereichs auch zur Qualitätskontrolle von Kakaoschalenprodukten. Zu diesen Produkten zählen Kakaoschalentee, Düngemittel oder der Einsatz von Kakaoschalen als Substrat für die Theobromingewinnung. Neben der Kakaoschale werden beim Brechen und Sichten der Kakaobohnen auch weitere organische oder anorganische Anhaftungen wie Pulparesten oder Sand zusammen mit der Kakaoschale aus dem System entfernt und gesammelt. Um den Kakaoschalengehalt, der in dieser Mischung den wertgebenden Bestandteil ausmacht, bestimmen zu können, kann die entwickelte Methode herangezogen werden.

Bei der Methodenoptimierung wurden sowohl die unterschiedlichen Bereiche der Probenvorbereitung als auch die Extraktion und die Analyse der Proben anhand bereits zuvor definierter potenzieller Schalenschlüsselmetaboliten, der chromatographischen Auflösung und der Anzahl an detektierbaren Verbindungen optimiert. Weiterhin wurde der Fokus der Optimierung auch auf eine möglichst schnelle und einfache Durchführbarkeit gelegt. Analog zur entwickelten *targeted* Methode kann die *non-targeted* Analyse einer Probe in weniger als 45 Minuten, inklusive der Extraktion, durchgeführt werden. Durch die umfangreiche Methodenoptimierung der *non-targeted* Methoden konnte die Anzahl an detektierbaren Verbindungen sowohl für die Kakaoschale als auch für den Kakaokern um mindestens 800 Verbindungen, bis hin zu 1100 Verbindungen erhöht werden. Durch die höhere Anzahl an detektierbaren Verbindungen konnte die Wahrscheinlichkeit potenzielle Schlüsselmetaboliten für den Kakaoschalennachweis zu identifizieren deutlich erhöht werden. Im Fall der NTNP Methode, anhand welcher die definierten Schlüsselmetaboliten identifiziert wurden, konnte die Anzahl an detektierten Verbindungen um ca. ein Drittel erhöht werden.

Neben der sehr guten Vorhersagegüte zeichnet sich die entwickelte Methode durch eine kurze Analysendauer und durch eine geringe Menge an benötigten Chemikalien aus. Für den Nachweis einer Probe wird in der Summe nur ca. 15 mL Lösungsmittel für die Extraktion und die Analyse (inklusive Laufmittel) benötigt.

Die erzielte Leistungsfähigkeit und das sehr gute Abschneiden im Sinne der weiteren definierten Bewertungskriterien (Zeitaufwand, Chemikalieneinsatz, apparative Ausstattung und Anwendbarkeit auf unterschiedliche Kakaoprodukte) zeigt, dass die entwickelte Methode ein großes Potential zur Etablierung in der Routineanalytik für den Kakaoschalennachweis besitzt.

## 5.6 Ausblick

Im Zuge des Entwicklungsprozesses der *targeted* Methode konnte der Schlüsselmetabolit  $\alpha$ -Tocopherolmyristat nicht mehr in ausreichend hoher Intensität nachgewiesen werden, sodass diese Verbindungen bei der Berechnung der Regressionsmodelle nicht berücksichtigt wurde. Da diese Verbindung bei der Analyse entsprechender Kakaoschalen-Kalibrierreihen mit der *non-targeted* Methode sehr gute Ergebnisse geliefert hat, ist davon auszugehen, dass der Intensitätsverlust durch die Umstellung der Extraktion oder durch eine geringere Sensitivität des QqQ-Massenspektrometers zu erklären ist. Bei einer Etablierung der Methode in der Routineanalytik sollte angestrebt werden, diese Verbindung bei der Verwendung sensitiverer Massenspektrometer, erneut in die Liste der Schlüsselmetaboliten aufzunehmen.

Für die Kalibrierung und die Erstellung der Regressionsmodelle in Form von PLS-R Modellen wurde bisher eine eigens hergestellte Kakaoschalen-Kalibrierreihe verwendet. Aufgrund der limitierten Homogenität der hergestellten Kakaoschalen-Kalibrierreihe musste für die Erstellung eines robusten Regressionsmodells jeder Kalibrierpunkt in einer Mehrfachbestimmung analysiert werden, damit sich die Streuung der einzelnen Werte nivelliert. Dieses Verfahren wurde in dieser Form durchgeführt, da nicht für alle verwendeten Schlüsselmetaboliten die entsprechenden Standardsubstanzen erworben werden konnten. Für eine weitere Verbesserung der Vorhersagegüte und die Möglichkeit einer absoluten Quantifizierung der Schlüsselmetaboliten sollten die entsprechenden Standardsubstanzen und für jede Substanzklasse mindestens eine isotope markierte Verbindung als interner Standard erworben werden. Auf diese Weise ist die Herstellung der Kakaoschalen-Verdünnungsreihe überflüssig und die Kalibrierung des Systems kann anhand der Standardsubstanzen erfolgen. Die Umstellung der Kalibrierung auf die entsprechenden Standardsubstanzen müsste jedoch mit der Erstellung entsprechender Tabellenwerke und Umrechnungsfaktoren von den analysierten Konzentrationen der Schlüsselmetaboliten zu dem entsprechenden Kakaoschalengehalt einhergehen. Dennoch ist die Kalibrierung anhand der Standardsubstanzen im Sinne der Qualitätssicherung, leichteren Durchführbarkeit und der Präzision der entwickelten Methode erstrebenswert und für die Etablierung der Methode in der Routineanalytik von Dienstleistungslaboren obligatorisch.

Sofern für alle Schlüsselmetaboliten die entsprechenden Standardsubstanzen vorliegen, sollte die Methodvalidierung mit allen Verbindungen wiederholt werden. Weiterhin sollte eine Matrixvalidierung für alle relevanten Kakaoprodukte durchgeführt werden.

Obwohl die Stabilität und Konzentrationsunabhängigkeit der identifizierten Schlüsselmetaboliten durch die gewählten Bewertungskriterien gezeigt werden konnten, gilt es auch weiterhin die Stabilität dieser Verbindungen zu überwachen. Weiterentwicklungen in Form von abweichenden Röstungen, Fermentationen, neuen Hybridsorten oder neu erschlossenen Anbaugebieten und Bewirtschaftungsformen können Auswirkungen auf die Konzentration der Schlüsselmetaboliten haben und somit direkt auf die Anwendbarkeit der entwickelten Methode. Auch die Veränderung der klimatischen Bedingungen stellt ein weiteres Risiko für die Konzentrationsunabhängigkeit der Schlüsselmetaboliten gegenüber den Einflussfaktoren dar, weshalb ein ständiges Monitoring bezüglich der Konzentrationsunabhängigkeit der Schlüsselmetaboliten durchgeführt werden sollte.

Der Pool an identifizierten Schlüsselmetaboliten sollte durch fortlaufende Analysen stetig erweitert werden, um den Umfang des multiparametrischen Ansatzes weiter zu erhöhen und somit auch die Robustheit der Methode. Die Anzahl der Schlüsselmetaboliten könnte durch die Analyse der unpolaren Extrakte im negativen Ionenmodus, welche aufgrund der geringen Anzahl an Signalen im Zuge dieser Arbeit nicht weiterverfolgt wurde, ergänzt werden. Durch die Möglichkeit von *data fusion* können weitere Schlüsselmetaboliten, welche mit anderen Analysetechniken wie der der GC-MS oder NMR-Spektroskopie detektiert werden können, mit den bereits identifizierten Metaboliten zusammengeführt werden und so den multiparametrischen Ansatz weiter vergrößern.

## 6 Material und Methoden

Eine Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien, Geräte, Software und Chemikalien befindet sich im Anhang in Abschnitt 8.2. Wird im Folgenden von „Wasser“ gesprochen, so ist stets durch das Wasseraufbereitungssystem Direct-Q® UV gereinigtes reinst Wasser gemeint, sofern nicht anders angegeben.

### 6.1 Probenmaterial

#### 6.1.1 Kakaoproben

Die verwendeten Kakaoproben, welche sich hinsichtlich ihrer Herkünfte, Erntejahre und Anbauarten unterscheiden, wurden von verschiedenen Projekt- und Industriepartnern bereitgestellt. Der akquirierte Kakaoprobenpool umfasst 90 unterschiedliche Proben. Neben den bereits aufgeführten Probenmerkmalen waren zum Teil zusätzliche Informationen, wie die Charge und die Sorte, bekannt. Neben 60, überwiegend aus den Hauptanbauländern stammende fermentierten Kakaobohnen, konnten zudem drei nicht-fermentierte Proben aus Panama akquiriert werden (vgl. Abbildung 61). Die restlichen Proben setzten sich aus gerösteten Kakaonibs, Kakaomassen und Schokoladen zusammen, welche als handelsübliches Probenmaterial zur Kontrolle der entwickelten Methode dienen sollte.

Für die eindeutige Identifizierung der Kakaoproben wurden die Proben mit einem universellen Code versehen (vgl. Abschnitt 6.1.2). In Tabelle 55 ist eine vollständige Auflistung der akquirierten Kakaoproben aufgeführt.

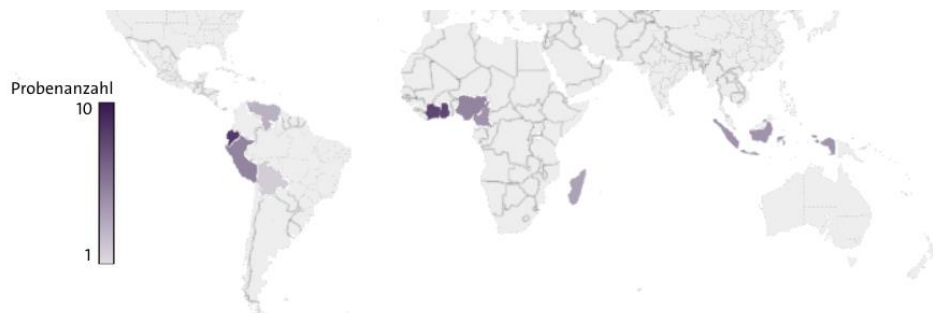


Abbildung 61: Geographische Herkunft der akquirierten Kakaobohnenproben.



### 6.1.2 Kennzeichnung der Kakaoproben

Die Kakaoproben wurden mit Hilfe eines Codes benannt, welcher Informationen über Erntejahr, Herkunftsland, Sorte, Anbauart, Probenform und eine fortlaufende Nummer beinhaltet. So sind die Informationen jeder Probe eindeutig zusammengefasst. Der Beschriftungscode ermöglicht eine sofortige Identifizierung jeder Probe zusammen mit den relevanten Informationen. In Abbildung 62 ist der Beschriftungscode beispielhaft für eine ghanaische Probe gezeigt. In Tabelle 56 ist die Aufschlüsselung des Beschriftungscode aufgeführt.

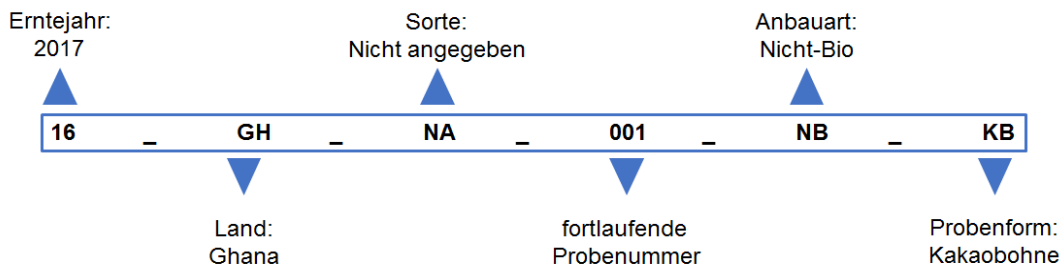


Abbildung 62: Beschriftungscode einer Kakaoprobe.

### 6.2 Probenvorbereitung

Der Workflow des durchgeführten *Metabolomics* Experiments ist schematisch in Abbildung 63 dargestellt.

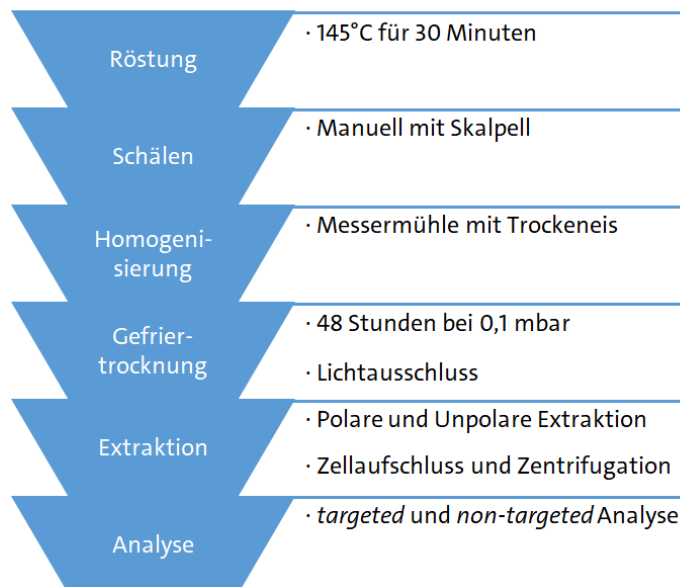


Abbildung 63: Schematische Darstellung des Workflows ausgehend von fermentierten Kakaoproben bis zur Analyse.

Die optimierten Arbeitsabläufe der Probenvorbereitung sind in den Abschnitten 6.2.2 bis 6.2.7 aufgeführt. Bei allen Aufarbeitungsschritten wurde der direkte Kontakt des Probenmaterials

durch Tragen von Handschuhen verhindert, um eine Kontamination auszuschließen. Bei allen Schritten wurde die Temperatur der Extraktionslösung auf ein Maximum von 4 °C reduziert, um eine Veränderung des Metaboloms während der Aufarbeitung zu verhindern.

### 6.2.1 Lagerung

Die Proben wurden nach dem Eingang katalogisiert, mit dem Beschriftungscode versehen, in Gefrierbeutel überführt und bei -80 °C bis zur Probenvorbereitung gelagert. Von jeder Probe wurde mindestens 1 kg akquiriert.

### 6.2.2 Röstung

Die Röstung der fermentierten Kakaobohnen wurde im labormaßstab in einem Trockenschrank durchgeführt. Es wurden ca. 120 g der tiefgefrorenen Kakaobohnen für eine Stunde bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend auf einem mit Alufolie bedeckten Rost gleichmäßig verteilt. Die Kakaobohnen wurden für 30 Minuten in einem auf 145 °C vorgeheizten Trockenschrank geröstet. Nach der Röstung wurden die Proben auf Zimmertemperatur abgekühlt und luftdicht bis zum Schälen gelagert.

### 6.2.3 Schälen

Die Kakaobohnen wurden manuell mit Hilfe eines Skalpells geschält. Hierbei wurden lediglich Fragmente weiterverwendet, die eindeutig entweder dem Kakaokern oder der Kakaoschale zuzuordnen waren. Der Keimling wurde im Folgenden zusammen mit der Kakaoschale homogenisiert. Nicht eindeutig zuzuordnende Bruchstücke wurden verworfen, um eine Kreuzkontamination zu verhindern. Die Summe aus Kakaoschalen und Keimlingen wird in der vorliegenden Arbeit konsequent als Kakaoschale bezeichnet.

### 6.2.4 Homogenisierung

Die Homogenisierung der Kakaoschale und des Kakaokerns erfolgte unter Zugabe von Trockeneis in einer Messermühle. Die optimierten Mahlprogramme für die Kakaokerne und Kakaoschalen sind in der Tabelle 57 aufgeführt. Das Mahlgut wurde jeweils mit Trockeneis auf eine Masse von 500 g aufgestockt. Die erhaltenen Homogenisate wurden in Gefrierbeutel überführt und bei -20 °C für 24 Stunden zum Abdampfen des Trockeneis gelagert. Die Homogenisate wurden anschließend für die Gefriertrocknung in 500 mL Rundkolben überführt.

### 6.2.5 Gefriertrocknung

Die Homogenisate wurden unter Lichtausschluss bei 0,1 mbar für 48 h gefriergetrocknet. Die gefriergetrockneten Proben wurden auf jeweils zwei 50 mL Schraubdeckelröhrchen aufgeteilt und in zwei unterschiedlichen Kühleinheiten bei -80 °C gelagert. Jeweils eine Probe wurde als Rückstellprobe angesehen.

### 6.2.6 Herstellung der Kakaoschalen Kalibrierungsreihe

Zur Bestimmung des linearen Arbeitsbereichs der Schlüsselmetaboliten und zur Erstellung der Regressionsmethoden für die Kakaoschalenbestimmung mittels *targeted* Methode wurden drei unterschiedliche Kakaoschalen-Kalibrierreihen hergestellt.

Für den ersten Ansatz wurden die Kakaoschalen- und Kakaokernanteile direkt in ein 2 mL-Reaktionsgefäß eingewogen, welches für die Extraktion verwendet wurde. Der Konzentrationsbereich der Schale sollte hier zwischen 0 - 8 % liegen.

Im zweiten Ansatz wurden Kakaokern- und Kakaoschalenmischungen mit definierten Kakaoschalenanteilen in 5 g Ansätzen hergestellt. Dafür wurden eine definierte Menge an Kakaokern sowie Kakaoschale in einem 50 mL Schraubdeckelgefäß eingewogen und durch Schütteln homogenisiert. Anschließend wurden hiervon jeweils 50 mg für die Analyse verwendet. Die Konzentration der Ansätze wurde in jeweils 1 % Schritten von 0 bis 10 % gewählt.

Analog zur zweiten Variante wurde eine weitere Kalibrierreihe im Kakaoschalen-Konzentrationsbereich von 0 bis 100 % Kakaoschale hergestellt.

Die Einwaagen sowie die resultierenden Konzentrationen der Kakaoschale aller Ansätze sind in Tabelle 81 bis Tabelle 83 aufgeführt.

### 6.2.7 Extraktion

#### 6.2.7.1 NTP Extraktion

Es wurden  $50 \pm 0,5$  mg der Kakaokern- bzw. Kakaoschalen-Homogenisate in 2 mL-Reaktionsgefäße mit Einmal-Kunststoff-Spateln eingewogen. Für die polare Extraktion wurde im Anschluss das Homogenisat mit zwei Stahlkugeln und 900  $\mu$ L gekühltem (4 °C) Methanol (+5 mM AAC) versetzt und mit Hilfe eines Bead-Ruptors bei 3,1 m/s für 2 min dispergiert. Die Dispersion wurde anschließend für die Proteinpräzipitation 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 100  $\mu$ L gekühltes (4 °C) Wasser (+5 mM AAC) hinzugegeben und der Ansatz erneut bei 3,1 m/s für 4 min für den Zellaufschluss im Bead-Ruptors behandelt. Nach dem Zellaufschluss wurde

der Extraktionsansatz bei 14.800 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Einmal-Spritzen aufgenommen, membranfiltriert, in ein Glasvial überführt und mit einer Bördelkappe verschlossen. Sofern die Analyse nicht direkt nach der Extraktion erfolgt, wurden die Proben bis zur Messung bei -20 °C gelagert.

#### 6.2.7.2 NTNP Extraktion

Für die unpolare non-targeted Extraktion wurde dem eingewogenen Homogenisat ( $50 \pm 0,5$  mg) zwei Stahlkugeln und 1000  $\mu$ L einer gekühlten Extraktionslösung (2-Propanol/Chloroform (4:1; v/v) + 20 mM AAc) hinzugefügt. Die Extraktion der unpolaren Metaboliten erfolgte mittels eines Bead-Ruptors bei 3,1 m/s für 5 min. Die Zentrifugation und Überführung der Extrakte wurde analog zur polaren Extraktion durchgeführt.

#### 6.2.7.3 TNP Extraktion

Für die unpolare *targeted* Extraktion wurden den eingewogenen Proben ( $50 \pm 0,5$  mg) zwei Stahlkugeln und 1000  $\mu$ L einer gekühlten Extraktionslösung (2-Propanol/MTBE (7:3; v/v)) hinzugefügt. Die Extraktion der unpolaren Metaboliten erfolgte mittels eines Bead-Ruptors bei 3,1 m/s für 5 min. Anschließend wurde ein weiterer Milliliter der Extraktionslösung hinzugefügt, die Probengefäße geschüttelt und die Zentrifugation und Überführung der Extrakte analog zur polaren Extraktion durchgeführt.

### 6.3 Röstreihe

Zur Überprüfung der thermischen Stabilität der potenziellen Schlüsselmetaboliten wurden Röstansätze mit unterschiedlicher Röstdauer und Temperatur durchgeführt. Insgesamt wurden sieben Röstansätze mit je 150 g Ausgangsmaterial (Probe Nr. 024) anhand der in Tabelle 43 aufgeführten Temperaturen und Zeiten durchgeführt.

Abgesehen von den abweichenden Röstparametern wurden die Proben gemäß der Probenvorbereitung nach Abschnitt 6.2 behandelt. Die Analyse der Probenextrakte fand in einer randomisierten Reihenfolge statt. Die Überprüfung der thermischen Stabilität wurde sowohl für die polaren als auch für die unpolaren potenziellen Schlüsselmetaboliten durchgeführt.

Tabelle 43: Röstdauer und Temperaturen der Röstreihe.

Röstansatz	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Ansatz 0	ungeröstet	
Ansatz 1	165	15
Ansatz 2	165	25
Ansatz 3	165	35

Röstansatz	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Ansatz 4	130	15
Ansatz 5	130	30
Ansatz 6	130	45
Ansatz 7	200	40

## 6.4 Qualitätskontrolle

Die Robustheit und Stabilität des flüssigchromatographischen und massenspektrometrischen Systems wurden durch die regelmäßig wiederholte Messung einer QC-Probe überprüft. Für die QC-Probe wurden gleiche Teile randomisiert ausgewählter Proben entsprechend Abschnitt 6.2 aufgearbeitet und fusioniert. Für die Herstellung der QC-Proben wurden ungeschälte Proben unterschiedlicher Herkunft verwendet (Fortlaufende Probennummer: 001, 004, 007, 010, 011, 014, 017, 020, 022 und 035). Es wurde jeweils eine QC-Probe für die NTNP und NTP Methode entsprechend dem Extraktionsprotokollen hergestellt.

## 6.5 Stammlösungen und Multistandards

Die verwendeten Stammlösungen sind in Tabelle 75, der Multistandard I in Tabelle 76, der Multistandard II in Tabelle 77 und der Multistandard III in Tabelle 78 dargestellt. Das Pipettierschema für die Grundkalibrierung ist in Tabelle 79 und für die Matrixkalibrierung in Tabelle 80 abgebildet.

Die Lösungen zur Überprüfung der Strukturaufklärung der Schlüsselmetaboliten sind in Tabelle 44 aufgeführt.

Tabelle 44: Lösungen der Standardsubstanzen für die Überprüfung der Strukturaufklärung.

Verbindung	Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Lösungsmittel
Behensäuretryptamid	100	Isopropanol
Docosahexansäure-5-hydroxytryptamid	100	Isopropanol
Stearinsäure-5-hydroxytryptamid	100	Isopropanol
16:0(2S-OH) Ceramide	100	Isopropanol
Dihydroceramide (d18:0/16:0)	100	Isopropanol
$\alpha$ -Tocopherol	100	Isopropanol
$\alpha$ -Tocopherolpalmitat	100	Isopropanol
Triolein	100	Isopropanol/Chloroform (1:1, v/v)

## 6.6 Non-Targeted LC-MS Methoden; HPLC-ESI-QToF-MS

Die LC-ESI-QToF Methoden wurden zur Identifizierung der Schlüsselmetaboliten verwendet. Für die flüssigchromatographische Trennung wurde ein HPLC-System der Firma Thermo Scientific (Dionex™ UltiMate™ 3000) und für die massenselektive Detektion ein Impact™ der Firma Bruker verwendet. Die optimierten Einstellungen des LC- und MS-Systems sind im Abschnitt 6.6.1 aufgeführt.

### 6.6.1 NTNP Methode

Die Einstellungen des chromatographischen Trennsystems der NTNP Methode sind in Tabelle 45 und graphisch in Abbildung 64 aufgeführt.

Tabelle 45: Chromatographiebedingungen der NTNP Methode.

Parameter	Einstellung		
Probentemperatur	20 °C		
Injektionsvolumen	5 µL		
Chromatographiesäule	Accucore™ RP-MS Dim. (mm) 150 x 2,1; Particle Sz. 2,6 µm und Vorsäule		
Säulenofentemperatur	40 °C		
Eluent A	Wasser + 10 mM AF		
Eluent B	2-Propanol/ACN (3/2, v/v) + 10 mM AF		
Gradient	Zeit t [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
	0,0	35	65
	2,0	35	65
	4,0	15	85
	8,0	0	100
	21,0	0	100
	21,1	35	65
	25,0	35	65
	vgl. Abbildung 64		
Flussrate	0,35 mL/min		

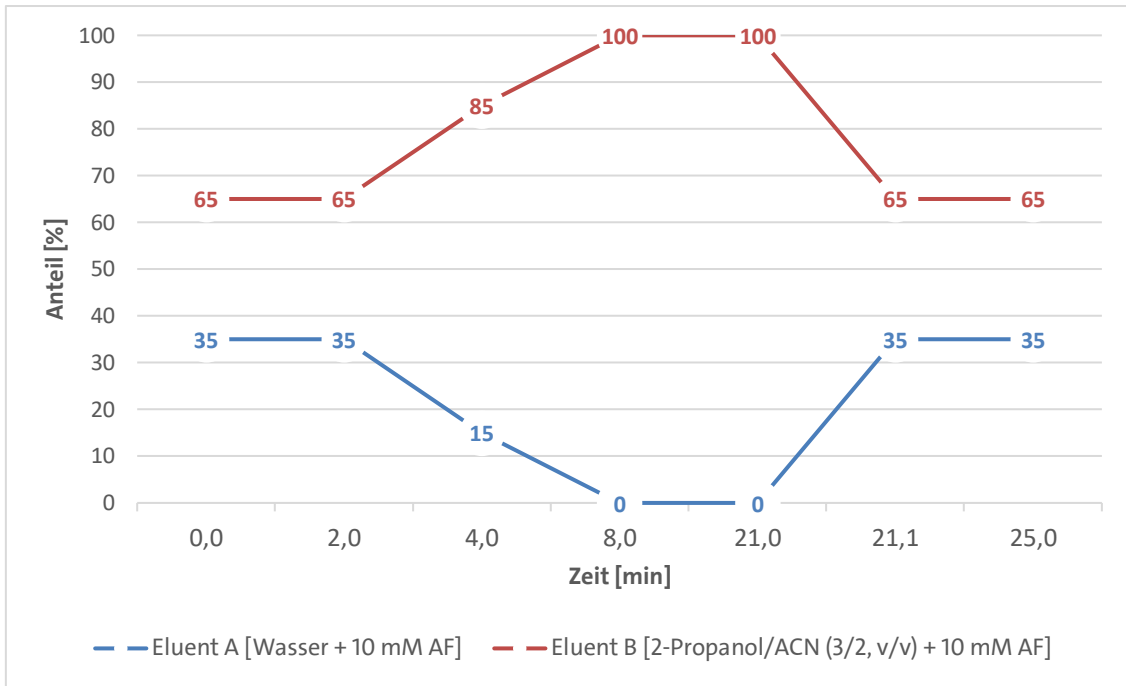


Abbildung 64: Gradient der NTNP Methode.

### Massenspektrometrisches System

In Tabelle 46 sind allgemeine Informationen zum massenspektrometrischen System und zur Kalibrierung des Systems aufgeführt.

Tabelle 46: Informationen zur Kalibrierung und dem massenspektrometrischen System.

Parameter	Einstellung	
Spectra Rate	1 Hz	
Massenbereich	60-1400 $m/z$	
Ionenquelle	ESI	
Parameter Ionenquelle	end plate voltage [V]	500 V
	capillary voltage [V]	3500 V
	dry gas Volumenstrom [L/min]	9 L/min
	nebulizer [bar]	4 bar
	dry gas Temperatur [ °C]	200 °C
Kalibrant	Natriumformiat-Cluster	
Methodensegmente	Segment 1	0 min - 21,2 min
	Segment 2 (Kalibriersegment)	21,2 min - 21,3 min
	Segment 3	21,3 min – 25 min
Iontentransfer	isCID Energy	0,0 eV
	Set Hexapol RF	200 Vpp
	Funnel 1 RF	300 Vpp
Quadrupol	Ion Energy Offset	5 eV
	Isolation Mass	60 $m/z$
Collision Cell	Collision Energy	10 eV
	Quench Time	5 ms

Parameter	Einstellung	
Collision Cell	Collision cell RF	300 Vpp
	transition time [ms]	80 ms
	pre pulse storage [ms]	7 ms
MS/MS Einstellungen (nur bei MS/MS Experimenten)	Modus	autoMS/MS oder targeted MS/MS
	Collision Energy	10-40 eV

### 6.6.2 NTP Methode

#### Flüssigchromatographisches System

In Tabelle 47 sind die chromatographischen Bedingungen der optimierten NTP Methode aufgeführt. Der verwendete Gradient ist in Abbildung 65 graphisch dargestellt.

Tabelle 47: Chromatographie Bedingungen des ANP-Systems.

Parameter	Einstellung		
Proben temperatur	5 °C		
Injektionsvolumen	5 µL		
Chromatographiesäule	Cogent Diamond Hydride™ Dim. (mm) 150 x 2,1; Cat. No. 70200-15P-2; 2,2 µm 120 A und Vorsäule		
Säulenofentemperatur	50 °C		
Eluent A	Wasser + 0,1 % Essigsäure (HAc)		
Eluent B	Acetonitril + 0,1 % Essigsäure (HAc)		
Gradient	Zeit t [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
	0,0	0	100
	2,0	0	100
	4,0	20	80
	9,5	20	80
	12,0	100	0
	15,8	100	0
	16,0	0	100
	20,0	0	100
vgl. Abbildung 65			
Flussrate	0,6 mL/min		



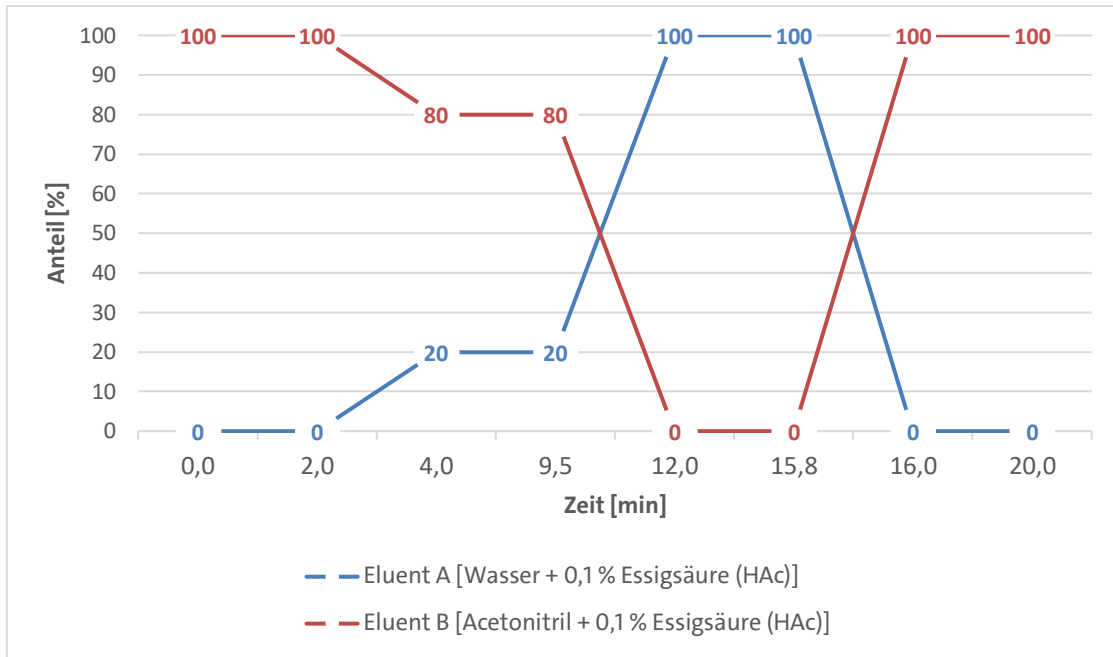


Abbildung 65: Gradient der NTP Methode.

Massenspektrometrisches System

In der Tabelle 48 sind die optimierten Einstellungen des massenspektrometrischen Systems für die NTP positiv und negativ Methode aufgeführt.

Tabelle 48: Einstellungen des massenspektrometrischen Systems für die NTP positiv und negativ Methode.

Parameter	Einstellung	
Spectra Rate	1 Hz	
Massenbereich	60-1400 <i>m/z</i>	
Ionenquelle	ESI	
Parameter Ionenquelle	end plate voltage [V]	±600 V
	capillary voltage [V]	4000 V
	dry gas Volumenstrom [L/min]	9 L/min
	nebulizer [bar]	5 bar
	dry gas Temperatur [ °C]	250 °C
Kalibrant	Natriumformiat-Cluster	
Methodensegmente	Segment 1	0 min - 21,2 min
	Segment 2 (Kalibriersegment)	21,2 min - 21,3 min
	Segment 3	21,3 min – 25 min
Ionentransfer	isCID Energy	0,0 eV
	Set Hexapol RF	200 Vpp
	Funnel 1 RF	300 Vpp
Quadrupol	Ion Energy Offset	5 eV
	Isolation Mass	60 <i>m/z</i>
Collision Cell	Collision Energy	10 eV
	Quench Time	5 ms
	Collision cell RF	300 Vpp

Parameter	Einstellung	
Collision Cell	transition time [ms]	60 ms
	pre pulse storage [ms]	5 ms
MS/MS Einstellungen (nur bei MS/MS Experimenten)	Modus	autoMS/MS oder targeted MS/MS
	Collision Energy	10-40 eV

### 6.6.3 Kalibration

Die Kalibrierung der *non-targeted* Messungen im positiven und negativen Ionenmodus erfolgte mittels Natriumformiat-Cluster vor jeder Messreihe als Grundkalibrierung des Massenspektrometers und bei jeder durchgeführten Messung. Hierfür wurde im Segment 2 jeder Messung jeweils 20 µL des Clusters über eine Injektionsschleife zur Rekalibrierung der Datensätze in die Ionenquelle injiziert. Die Zufuhr des Clusters erfolgte über eine Spritzenpumpe mit einer Flussrate von 0,2 mL/h. Die Rekalibrierung der Datensätze nach den Messungen wurde mit der Software DataAnalysis 4.1 durchgeführt. Die verwendeten Einstellungen für die Kalibration der verschiedenen Methoden sind in Tabelle 58 aufgeführt.

### 6.6.4 Analyse der Probenextrakte

Die Probenextrakte wurden gemäß Abschnitt 6.2 hergestellt und zur Analyse eingesetzt. Die Extrakte wurden in einer Dreifachbestimmung in randomisierter Reihenfolge analysiert. Bei den unpolaren Analysen wurde alle zehn und bei den polaren Analysen alle fünf Messungen ein Blank und eine QC-Probe zur Qualitätssicherung gemessen.

### 6.6.5 Auswertung

Eine komplette Liste, der für die Auswertung verwendeten Softwares, ist im Anhang in Tabelle 53 zusammengefasst.

Die Identifizierung potenzieller Metaboliten in den analysierten Datensätzen erfolgt anhand der *Feature Detection* Funktion der Software DataAnalysis 4.1. Die verwendeten Einstellungen für die Identifizierung der Verbindungen der einzelnen Methoden sind in und Tabelle 59 aufgeführt.

Basierend auf den detektierten *Features* wurde als Grundlage für die weitere multivariate Datenanalyse und zur Identifizierung potenzieller Schlüsselmetaboliten ein *Bucket-Table* mit der Software ProfileAnalysis 2.1 erstellt.

Die *Bucket-Table* fasst Informationen zur Retentionszeit,  $m/z$  und Signalintensität der *Features* in allen berücksichtigten Messungen zusammen. Die verwendeten Parameter zur Erstellung der *Bucket-Table* und zur Erstellung der PCA-Modelle sind in Tabelle 60 aufgeführt.

Zur Überprüfung der analysierten Intensitäten wurde mittels der Software QuantAnalysis 2.1 die Signalfläche der potenziellen Schlüsselmetaboliten bestimmt und die erhaltenen Flächen unterschiedlicher Kakaoproben miteinander verglichen. Die Einstellungen zur Erstellung der Integrationsmethode sind in der Tabelle 61 dargestellt.

### 6.6.6 Identifizierung von Schlüsselmetaboliten

Für die Identifizierung der potenziellen Schlüsselmetaboliten wurden PCA-Modelle und  $t$ -Tests mithilfe der Software ProfileAnalysis 2.1 berechnet. Die Extraktion der Schlüsselmetaboliten erfolgte anhand der entsprechenden  $p$ -values und dem *Average Ratios* zwischen den definierten Probengruppen der Kakaoschale und des Kakaokerns. Weiterhin wurden alle Verbindungen als potenzielle Schlüsselmetaboliten angesehen, die in den analysierten Kakaokernproben keine, jedoch in den Kakaoschalenproben eine Intensität aufweisen konnten. Alle so definierten potenziellen Schlüsselmetaboliten wurden zuerst auf ihre Temperaturstabilität und bei erfolgreicher Prüfung anschließend auf alle weiteren Bewertungskriterien überprüft.

#### 6.6.6.1 Bewertungskriterien

Die identifizierten potenziellen Schlüsselmetaboliten wurden anhand der folgenden fünf Bewertungskriterien beurteilt und deren Eignung als Schlüsselmetabolit bewertet:

1. Die Temperaturstabilität stellt ein obligatorisches Kriterium für die potenziellen Schlüsselmetaboliten dar. Als Schlüsselmetaboliten gelten ausschließlich diese Verbindungen, die nach der Röstung und nach Röstungen unterschiedlicher Intensität noch mit derselben Konzentration nachweisbar sind. Da unterschiedliche Hersteller oder Verarbeiter die Kakaobohnen auf verschiedene Weisen rösten und die entwickelte Methode unabhängig von der durchgeführten Röstung valide Ergebnisse erzielen soll, muss eine Temperaturstabilität der Schlüsselmetaboliten gegeben sein. Zur Überprüfung der Temperaturstabilität wurde eine Röstreihe gemäß Abschnitt 6.3 analysiert (Röstungskriterium).
2. Für einen validen und robusten Nachweis müssen die Metaboliten eine Konzentrationsunabhängigkeit gegenüber unterschiedlichen Probenmerkmalen aufweisen. Für die Überprüfung wurden Kakaobohnenproben unterschiedlicher Herkünfte, Erntejahre und

Sorten analysiert und die Konzentrationsabweichungen unter den unterschiedlichen Proben anhand des Variationskoeffizienten bestimmt (Gleichmäßigkeitskriterium).

3. Wie bei der Röstung wird auch die Fermentation nicht in allen Regionen identisch durchgeführt. Aufgrund der unterschiedlichen Fermentationstechniken sollte die Konzentration der potenziellen Schlüsselmetaboliten nicht durch den Fermentationsprozess beeinflusst werden. Zur Überprüfung dieses Kriteriums wurde die Konzentration der potenziellen Schlüsselmetaboliten in fermentierten und nicht fermentierten Proben überprüft und die Abweichung bestimmt (Fermentationskriterium).

4. Die potenziellen Schlüsselmetaboliten sollen in möglichst geringer Konzentration in den Kakaokernproben und in möglichst hoher in den Kakaoschalenproben nachweisbar sein. Für die Bewertung des Konzentrationsunterschiedes wurde der Quotient aus den Signal-Rausch-Verhältnissen (bestimmt mittels der Software QuantAnalysis 2.1) der Kakaoschalen- und Kakaokernproben berechnet (Exklusivkriterium).

5. Die Konzentration der potenziellen Schlüsselmetaboliten in der Kakaoschale sollte möglichst hoch sein. Je höher die Konzentration der Schlüsselmetaboliten, desto sensibler kann die Kakaoschale, perspektivisch auch in Schokoladenprodukten mit niedrigeren Kakaoschalengehalt, nachgewiesen werden (Konzentrationskriterium).

Durch die aufgestellten Bewertungskriterien wurde die erstellte Liste der potenziellen Schlüsselmetaboliten auf diejenigen Verbindungen reduziert, welche möglichst viele der definierten Kriterien erfüllen. Die verbleibenden Verbindungen können als Schlüsselmetaboliten für den Kakaoschalennachweis angesehen werden.

### 6.6.7 Strukturaufklärung der Schlüsselmetaboliten

Die Strukturaufklärung der identifizierten Schlüsselmetaboliten erfolgte durch den Vergleich der genauen Masse, dem Isotopenverhältnis und der Fragmentspektren mit frei verfügbaren Datenbanken (MetFrag, PubChem und ChemSpider). Zur Überprüfung der Identität der identifizierten Verbindungen wurden sofern verfügbar Standardsubstanzen oder alternativ Standardsubstanzen der gleichen Substanzklasse analysiert und die Retentionszeit, genaue Masse und das Fragmentierungsmuster verglichen.

## 6.7 Targeted LC-MS Methode; HPLC-ESI-QqQ-MS/MS

In Abschnitt 8.1 des Anhangs ist eine Standardarbeitsanweisung (engl. Standard Operating Procedure; SOP) für die Durchführung der targeted Methode aufgeführt.

Für die chromatographische Auftrennung wurde eine Agilent 1260 Infinity Series HPLC mit einer Zorbax Eclipse Plus C18 Chromatographiesäule verwendet. Als massenspektrometrisches System stand ein API 4000 der Firma Sciex zur Verfügung.

### Flüssigchromatographisches System

In Tabelle 49 sind die chromatographischen Bedingungen der optimierten TNP Methode aufgeführt. Der verwendete Gradient ist in Abbildung 66 graphisch dargestellt.

Tabelle 49: Chromatographiebedingungen der TNP Methode.

Parameter	Einstellung		
Injektionsvolumen	5 µL		
Chromatographiesäule	ZORBAX Eclipse Plus C18, Rapid Resolution HD Dim. (mm) 50 x 2,1; Particle Sz. 1,8 µm		
Säulenofentemperatur	40 °C		
Eluent A	Wasser + 10 mM AF		
Eluent B	2-Propanol/ACN (3/2, v/v) + 10 mM AF		
Gradient Nr. 4	Zeit t [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
	0,0	30	70
	2,0	30	70
	4,0	15	85
	8,0	0	100
	21,0	0	100
	21,1	30	70
	25,0	30	70
	vgl. Abbildung 66		
Flußrate	0,4 mL/min		

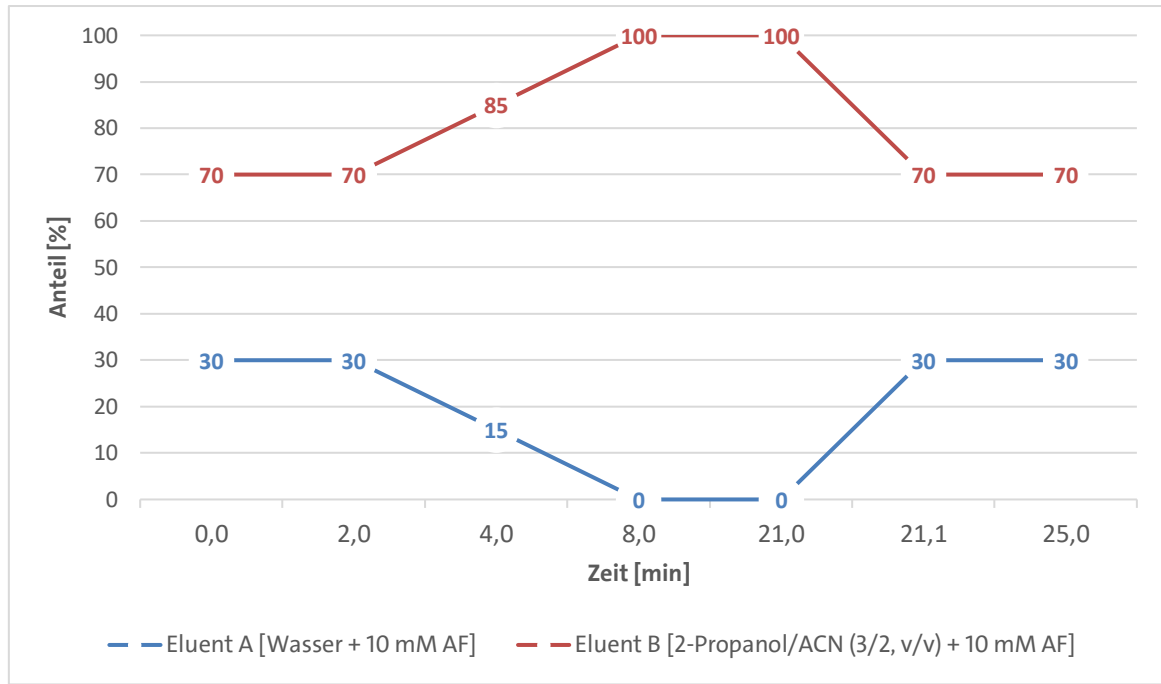


Abbildung 66: Optimierter Gradient TNP Methode.

### Massenspektrometrisches System

Die allgemeinen Einstellungen des massenspektrometrischen Systems für die TNP Methode und für die *Automatic Compound Optimization* sind Tabelle 50 zu entnehmen.

Tabelle 50: Einstellungen des massenspektrometrischen Systems der TNP Methode.

Parameter	Einstellung der TNP-Methode	Einstellungen beim Automatic Compound Optimization
Ionisationsmethode	ESI	
Ionisationsmodus	positiv	
Ionenquelle		
Ion Spray Voltage	5500V	5500V
Temperatur	450 °C	0 °C
Ion Source Gas 1	30 psi	30 psi
Ion Source Gas 2	70 psi	0 psi
Curtain Gas	20 psi	10 psi
Collision Gas	5 psi	5 psi

Um die Sensitivität und Selektivität der Analysen zu erhöhen wurden die Analysen im MRM-Modus durchgeführt. Zur Ermittlung der idealen massenspektrometrischen Einstellungen für die Analyten wurde ein *Automatic Compound Optimization* durchgeführt. Hierfür wurden ca. 10 µM Lösungen der Schlüsselmetaboliten hergestellt und per Direkteinlass mithilfe einer

Spritzenpumpe mit einer Fließgeschwindigkeit von 8  $\mu\text{L}/\text{min}$  in die ESI-Quelle des massenspektrometrischen Systems eingebracht. Sofern die Standardsubstanz nicht kommerziell zu erwerben war, wurde für die Optimierung stellvertretend ein anderer Vertreter der gleichen Substanzklassen verwendet. Mit Hilfe der Funktion *Automatic Compound Optimization* der Software Analyst 1.6 wurden sowohl für die Precursor-Ionen als auch für die zwei intensivsten Fragment-Ionen automatisch die optimalen Parameter der elektrischen Spannungen für die Ionenoptiken und Quadrupole bestimmt, um eine maximale Transmission zu gewährleisten. Das intensivste Fragment-Ion wird im Folgenden als „Quantifier“ (Qnt) bezeichnet und für die quantitative Auswertung verwendet. Das zweitintensivste Fragment wird als „Qualifier“ (Qal) bezeichnet und dient der Überprüfung der Identität des Precursor-Ions.

Die optimierten Einstellungen der Schlüsselmetaboliten sind in Tabelle 74 dargestellt. Bei allen Substanzen, für die keine Standardsubstanzen erworben werden konnten, wurden die Einstellungen von Verbindungen aus der gleichen Substanzklasse übernommen. Für die Fettsäuretryptamide wurden die optimierten Einstellungen vom Behensäuretryptamid, für die Fettsäure-5-hydroxy-tryptamide vom Docosahexansäure-5-hydroxy-tryptamid, für die Tocopherolderivate vom  $\alpha$ -Tocopherol und vom  $\alpha$ -Tocopherolpalmitat, für die Triacylglyceride vom Triolein und für das Dihydroxyceramid vom 16:0(2S-OH) Ceramide übernommen. Die Masse der Precursor-Ionen und der intensivsten Fragmente war bereits aus den MS/MS-Versuchen der Strukturaufklärung bekannt und konnte adaptiert werden.

### 6.7.1 Validierung

Die Validierung der *targeted* HPLC-ESI-QqQ-MS/MS Methode wurde in Anlehnung an die anerkannten Richtlinien der FDA und der DIN 32645 durchgeführt. Es wurde eine Grund- und eine Matrixkalibrierung der entwickelten *targeted* Methode durchgeführt. Stammlösungen, Multi-standards und Pipettierschemata sind im Anhang in Tabelle 75 bis Tabelle 80 aufgeführt. Nach der Analyse wurden die unten aufgeführten Validierungsparameter gemäß den Richtlinien der *Bioanalytical Method Validation* der FDA für jeden der enthaltenen Metaboliten berechnet.<sup>209</sup>

Da wie bei der Strukturaufklärung mittels MS/MS-Versuchen nicht für alle identifizierten Schlüsselmetaboliten die entsprechenden Standardsubstanzen erworben werden konnten, wurde auch hier jeweils ein Vertreter der Stoffklasse analysiert und die Ergebnisse auf alle Verbindungen dieser Klasse extrapoliert.

- Empfindlichkeit ( $m$ ): Entspricht der Steigung der Regressionsgeraden und ist ein Maß für die Sensitivität der Methode.
- Mittleres Begleitsignal ( $b$ ): Entspricht dem Ordinatenabschnitt der Regressionsgeraden und gibt den systematischen Fehler einer Messung an.
- Bestimmtheitsmaß der Kalibriergeraden ( $R^2$ ): Ist ein Maß für die Güte des linearen Zusammenhangs zwischen zwei Variablen. Das Bestimmtheitsmaß wird durch quadrieren des PEARSON'schen Korrelationskoeffizientens erhalten.
- Reststandardabweichung der linearen Regression ( $S_R$ ): Stellt ein Maß für die Präzision der Messungen dar.
- Verfahrensstandardabweichung ( $S_V$ ): Ist ein Gütemaß für die Leistungsfähigkeit einer Methode. Die Verfahrensstandardabweichung wird aus der Normierung der Präzision auf den mittleren Arbeitsbereich berechnet.
- Verfahrensvariationskoeffizient ( $V_{KV}$ ): Ist ein Maß für die Robustheit einer Methode und erlaubt einen Vergleich verschiedener Verfahren.
- Wiederholgrenze ( $r$ ): Gibt die maximale tolerierbare Differenz zwischen zwei Messwerten bei wiederholter Analyse an.
- Linearer Arbeitsbereich (LA): Ist der Bereich, in dem ein detektiertes Signal proportional zur Konzentration eines Analyten ist.
- Richtigkeit: Die Richtigkeit beschreibt die Abweichung der gemittelten Messergebnisse zum tatsächlichen Konzentrationswert und entspricht der Richtigkeit der Kalibrierfunktion.
- Präzision: Die Präzision ist das Maß für die zufällige Streuung von Messwerten, gibt die Reproduzierbarkeit unabhängig berechneter Messwerte (Variationskoeffizienten).

Die Bestimmung der Nachweisgrenzen wurde mittels Leerwertmethode nach DIN 32 645 durchgeführt. Für die Bestimmung wurden zehn unabhängig erstellte Blindwertproben analysiert. Die Nachweisgrenze (LOD) beschreibt die niedrigste Konzentration eines Analyten, bei der bei einmaliger Messung die Verbindung sicher qualitativ nachgewiesen werden kann. Zur Identifizierung von Ausreißern wurde der Test nach DEAN und DIXON verwendet. Die benötigten Gleichungen zur Berechnung der Validierungsparameter sind in der Formelsammlung in Abschnitt 8.15 aufgeführt.



## 7 Literaturliste

- (1) Statistisches Bundesamt: Produktion von Schokolade und Schokoladenwaren in Deutschland in den Jahren 1970 bis 2015 (in Tonnen). <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/72696/umfrage/produktion-von-schokoladenwaren-in-deutschland-seit-1970> (8. März 2019).
- (2) Janßen, K.; Matissek, R. Fatty acid tryptamides as shell indicators for cocoa products and as quality parameters for cocoa butter. *Eur Food Technol.* **2001.** 2014:259-264.
- (3) DIN, E. ISO/IEC 17025 Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien. *Berlin: Beuth.* **2005.**
- (4) Lange, H.; Fincke, A., Kakao und Schokolade. In *Alkaloidhaltige Genussmittel, Gewürze, Kochsalz*, Springer: **1970**; pp 210-309.
- (5) Lieberei, R.; Franke, W.; Reisdorff, C., *Nutzpflanzenkunde: 118 Tabellen*. Georg Thieme Verlag: **2007.**
- (6) Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P., *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Springer-Verlag: **2008.**
- (7) Statistisches Bundesamt: Erntemenge von Kakaobohnen weltweit in den Jahren 1980/81 bis 2017/18 (in 1.000 Tonnen). <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/6097/umfrage/entwicklung-der-erntemengen-von-kakao-seit-1980/> (11. März 2019).
- (8) The International Cocoa Organization Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics Cocoa year 2017/18. *Quarterly Bulletin.* **2018.** Vol. XLIV, No. 3.
- (9) Rimbach, G.; Erbersdobler, H. F.; Möhring, J., *Lebensmittel-Warenkunde für Einsteiger*. Springer: **2010.**
- (10) Somarriba, E.; Beer, J. Productivity of Theobroma cacao agroforestry systems with timber or legume service shade trees. *Agroforestry systems.* **2011.** 81, 109-121.
- (11) Bisseleua, D.; Missou, A.; Vidal, S. Biodiversity conservation, ecosystem functioning, and economic incentives under cocoa agroforestry intensification. *Conservation biology.* **2009.** 23, 1176-1184.
- (12) Sharma, S. K. Cauliflory & cannonball tree. **2011.**
- (13) Lieberei, R., *Nutzpflanzenkunde : 118 Tabellen*. 7., vollst. überarb. und erw. Aufl. ed.; Thieme: Stuttgart u.a., **2007.**
- (14) Guehi, T. S.; Dadie, A. T.; Koffi, K. P.; Dabonne, S.; Ban-Koffi, L.; Kedjebo, K. D.; Nemlin, G. J. Performance of different fermentation methods and the effect of their duration on the quality of raw cocoa beans. *International journal of food science & technology.* **2010.** 45, 2508-2514.
- (15) Schwan, R. F.; Wheals, A. E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical reviews in food science and nutrition.* **2004.** 44, 205-221.
- (16) Camu, N.; De Winter, T.; Addo, S. K.; Takrama, J. S.; Bernaert, H.; De Vuyst, L. Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* **2008.** 88, 2288-2297.
- (17) Camu, N.; De Winter, T.; Verbrugghe, K.; Cleenwerck, I.; Vandamme, P.; Takrama, J. S.; Vancanneyt, M.; De Vuyst, L. Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007.** 73, 1809-1824.
- (18) Hansen, C. E.; del Olmo, M.; Burri, C. Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* **1998.** 77, 273-281.
- (19) Fowler, M. S.; Coutel, F. Cocoa beans: from tree to factory. *Beckett's Industrial Chocolate Manufacture and Use.* **2017.** 9-49.

- (20) Belitz, H.-D.; Grosch, W., *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Springer-Verlag: **2013**.
- (21) Jinap, S.; Thien, J.; Yap, T. Effect of drying on acidity and volatile fatty acids content of cocoa beans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **1994**. *65*, 67-75.
- (22) Ramli, N.; Hassan, O.; Said, M.; Samsudin, W.; Idris, N. A. Influence of roasting conditions on volatile flavor of roasted Malaysian cocoa beans. *Journal of Food Processing and Preservation*. **2006**. *30*, 280-298.
- (23) Kleinert, J., Cleaning, roasting and winnowing. In *Industrial Chocolate Manufacture and Use*, Springer: **1994**; pp 55-69.
- (24) Kattenberg, H.; Kemmink, A. Flavor of cocoa in relation to the origin and processing of the cocoa beans. *Developments in food science*. **1993**. *32*, 1-22.
- (25) Jinap, S.; Wan Rosli, W.; Russly, A.; Nordin, L. Effect of roasting time and temperature on volatile component profiles during nib roasting of cocoa beans (*Theobroma cacao*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **1998**. *77*, 441-448.
- (26) Okiyama, D. C.; Navarro, S. L.; Rodrigues, C. E. Cocoa shell and its compounds: Applications in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*. **2017**. *63*, 103-112.
- (27) Hoskin, J.; Dimick, P. Observations of chocolate during conching by scanning electron microscopy and viscometry. *Journal of Food Science*. **1980**. *45*, 1541-1545.
- (28) Fincke, A., *Handbuch der Kakaoverzeugnisse*. Springer-Verlag: **1965**.
- (29) Amézqueta, S.; Gonzalez-Penas, E.; Murillo, M.; Lopez de Cerain, A. Occurrence of ochratoxin A in cocoa beans: effect of shelling. *Food additives and contaminants*. **2005**. *22*, 590-596.
- (30) Copetti, M. V.; Iamanaka, B. T.; Nester, M. A.; Efraim, P.; Taniwaki, M. H. Occurrence of ochratoxin A in cocoa by-products and determination of its reduction during chocolate manufacture. *Food chemistry*. **2013**. *136*, 100-104.
- (31) Manda, P.; Dano, D. S.; Kouadio, J. H.; Diakite, A.; Sangare-Tigori, B.; Ezoulin, M. J. M.; Soumahoro, A.; Dembele, A.; Fourny, G. Impact of industrial treatments on ochratoxin A content in artificially contaminated cocoa beans. *Food Additives and Contaminants*. **2009**. *26*, 1081-1088.
- (32) Mounicou, S.; Szpunar, J.; Andrey, D.; Blake, C.; Lobinski, R. Concentrations and bioavailability of cadmium and lead in cocoa powder and related products. *Food Additives & Contaminants*. **2003**. *20*, 343-352.
- (33) Meursing, E., Cocoa mass, cocoa butter, cocoa powder. In *Industrial chocolate manufacture and use*, Springer: **1994**; pp 70-82.
- (34) Kamphuis, H. Production and quality standards of cocoa mass, cocoa butter and cocoa powder. *Industrial chocolate manufacture and use*. **2009**. 121-140.
- (35) Beckett, S. T., *The science of chocolate*. Royal Society of Chemistry: Cambridge, **2015**.
- (36) Beckett, S. T., *Industrial chocolate manufacture and use*. John Wiley & Sons: **2011**.
- (37) The Royal Society of Chemistry Cocoa Powder Order, 1918. *Analyst*. **1918**. *43*, 248-249.
- (38) RICHTLINIE DES RATES vom 24. Juli 1973 zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedsstaaten für zur Ernährung bestimmte Kakao- und Schokoladenprodukte.
- (39) RICHTLINIE 2000/36/EG DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 23. Juni 2000 über Kakao- und Schokoladenerzeugnisse für die menschliche Ernährung.
- (40) Standard for cocoa (cocoa) mass (cocoa/chocolate liquor) and cocoa cake codex stan 141-1983. **2014**.
- (41) Hanausek, T. F. Hollandischer Eichelkakao. *Zeitschrift für Nahrungs-mittel-Untersuchung, Hygiene und Waarenkunde*. **1887**. *1*, 247.
- (42) Beythien, A.; Pannwitz, P. Beiträge zur Untersuchung von Kakao und Schokolade. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*. **1923**. *46*, 223-235.
- (43) Plücker, W.; Steinruck, A.; Starck, F. Mikroskopischen Bestimmung des Schalengehaltes in Kakaowaren. *Zeitschrift für Untersuchung der Lebensmittel*. **1925**. *50*, 307-315.

- (44) Griebel, C.; Sonntag, F. Zur mikroskopischen Bestimmung des Schalengehaltes in Kakaowaren. *Zeitschrift für Untersuchung der Lebensmittel*. **1926**. 51, 185-198.
- (45) Münch, M.; Schieberle, P. A sensitive and selective method for the quantitative determination of fatty acid tryptamides as shell indicators in cocoa products. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*. **1999**. 208, 39-46.
- (46) Filsinger, F. Zur Untersuchung der Kakaofabrikate auf Gehalt an Kakaoschalen. *Zeitschrift für öffentliche Chemie*. **1899**. 5, 27.
- (47) Grünhut, L.; Beythien, A.; Pannwitz, P.; Filsinger, F.; Drawe, P.; Franke, H.; Ulrich, C.; Welmans, P.; Grosse-Bohle, H.; Häussler, E. Nachweis von Kakaoschalen im Kakao, mit allgemeinen Angaben über Rohfaser- und Pentosanbestimmung. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. **1917**. 56, 332-363.
- (48) Galanos, S. Beiträge zur Kakaountersuchung. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*. **1924**. 48, 207-211.
- (49) Knapp, A. W.; McLellan, B. G. The estimation of cacao shell. *Analyst*. **1919**. 44, 2-22.
- (50) Fincke, A.; Sacher, H. Investigation to estimate the purity of cocoa butter and fats from chocolates. *Süßwaren*. **1963**. 9, 428-431.
- (51) Sacher, H. Behensäuretryptamid, ein Inhaltsstoff der Kakaoschale. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*. **1965**. 128, 264-267.
- (52) Chocolate and Sugar Confectionery Analytical Method No 108. **1988**.
- (53) Muench, M.; Schieberle, P.; Fischer, M.; Bacher, A. Analysenverfahren für den Nachweis von Kakaoschalen in Kakaoprodukten (Patentnummer: DE10019289A1). **2000**.
- (54) Quelal-Vásconez, M. A.; Lerma-García, M. J.; Pérez-Esteve, É.; Arnau-Bonachera, A.; Barat, J. M.; Talens, P. Fast detection of cocoa shell in cocoa powders by near infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Food Control*. **2019**. 99, 68-72.
- (55) Villas-Bôas, S. G.; Mas, S.; Åkesson, M.; Smedsgaard, J.; Nielsen, J. Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass spectrometry reviews*. **2005**. 24, 613-646.
- (56) Dettmer, K.; Aronov, P. A.; Hammock, B. D. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass spectrometry reviews*. **2007**. 26, 51-78.
- (57) Issaq, H. J.; Veenstra, T. D., Biomarker discovery: study design and execution. In *Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery*, Elsevier: **2013**; pp 1-16.
- (58) Dunn, W. B.; Broadhurst, D. I.; Atherton, H. J.; Goodacre, R.; Griffin, J. L. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chemical Society Reviews*. **2011**. 40, 387-426.
- (59) Ramsden, J., Metabolomics and metabonomics. In *Bioinformatics*, Springer: **2015**; pp 265-270.
- (60) Nicholson, J. K.; Lindon, J. C.; Holmes, E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*. **1999**. 29, 1181-1189.
- (61) Fiehn, O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comp Funct Genomics*. **2001**. 2, 155-168.
- (62) Nicholson, J. K.; Lindon, J. C. Systems biology: Metabonomics. *Nature*. **2008**. 455, 1054-1056.
- (63) Kitano, H., *Foundations of systems biology*. The MIT Press Cambridge, Massachusetts London, England: **2001**.
- (64) Metabolomics takes its place as latest up-and-coming "omic" science. Oxford University Press: **2004**.
- (65) Patti, G. J.; Yanes, O.; Siuzdak, G. Metabolomics: the apogee of the omic trilogy. *Nature reviews. Molecular cell biology*. **2012**. 13, 263.

- (66) Griffiths, W. J., *Metabolomics, metabonomics and metabolite profiling*. Royal society of chemistry: **2007**.
- (67) Ellis, D. I.; Dunn, W. B.; Griffin, J. L.; Allwood, J. W.; Goodacre, R. Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. **2007**.
- (68) Riedl, J.; Esslinger, S.; Fauhl-Hassek, C. Review of validation and reporting of non-targeted fingerprinting approaches for food authentication. *Analytica Chimica Acta*. **2015**. *885*, 17-32.
- (69) Roessner, U.; Bowne, J. What is metabolomics all about? *Biotechniques*. **2009**. *46*, 363.
- (70) Kell, D. B.; Brown, M.; Davey, H. M.; Dunn, W. B.; Spasic, I.; Oliver, S. G. Metabolic footprinting and systems biology: the medium is the message. *Nature reviews microbiology*. **2005**. *3*, 557.
- (71) Allen, J.; Davey, H. M.; Broadhurst, D.; Heald, J. K.; Rowland, J. J.; Oliver, S. G.; Kell, D. B. High-throughput classification of yeast mutants for functional genomics using metabolic footprinting. *Nat Biotechnol*. **2003**. *21*, 692-696.
- (72) Creydt, M.; Hudzik, D.; Rurik, M.; Kohlbacher, O.; Fischer, M. Food Authentication: Small-Molecule Profiling as a Tool for the Geographic Discrimination of German White Asparagus. *Journal of agricultural and food chemistry*. **2018**. *66*, 13328-13339.
- (73) Wieling, J. LC-MS-MS experiences with internal standards. *Chromatographia*. **2002**. *55*, S107-S113.
- (74) Hewavitharana, A. K. Matrix matching in liquid chromatography–mass spectrometry with stable isotope labelled internal standards—is it necessary? *Journal of Chromatography A*. **2011**. *1218*, 359-361.
- (75) Cevallos-Cevallos, J.; Reyes-De-Corcuera, J.; Etxeberria, E.; Danyluk, M. D.; Rodrick, G. E. Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends in Food Science & Technology*. **2009**. *20*.
- (76) Wishart, D. S.; Tzur, D.; Knox, C.; Eisner, R.; Guo, A. C.; Young, N.; Cheng, D.; Jewell, K.; Arndt, D.; Sawhney, S. HMDB: the human metabolome database. *Nucleic acids research*. **2007**. *35*, D521-D526.
- (77) Yuliana, N. D.; Khatib, A.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R. Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. *Phytotherapy Research*. **2011**. *25*, 157-169.
- (78) Ikeda, T.; Kanaya, S.; Yonetani, T.; Kobayashi, A.; Fukusaki, E. Prediction of Japanese green tea ranking by Fourier transform near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry*. **2007**. *55*, 9908-9912.
- (79) Johnson, C. H.; Gonzalez, F. J. Challenges and opportunities of metabolomics. *Journal of cellular physiology*. **2012**. *227*, 2975-2981.
- (80) Danezis, G. P.; Tsagkaris, A. S.; Brusica, V.; Georgiou, C. A. Food authentication: state of the art and prospects. *Current Opinion in Food Science*. **2016**. *10*, 22-31.
- (81) Esslinger, S.; Riedl, J.; Fauhl-Hassek, C. Potential and limitations of non-targeted fingerprinting for authentication of food in official control. *Food Research International*. **2014**. *60*, 189-204.
- (82) Fiehn, O.; Sumner, L. W.; Rhee, S. Y.; Ward, J.; Dickerson, J.; Lange, B. M.; Lane, G.; Roessner, U.; Last, R.; Nikolau, B. Minimum reporting standards for plant biology context information in metabolomic studies. *Metabolomics*. **2007**. *3*, 195-201.
- (83) Johnson, C. H.; Patterson, A. D.; Idle, J. R.; Gonzalez, F. J. Xenobiotic metabolomics: major impact on the metabolome. *Annual review of pharmacology and toxicology*. **2012**. *52*, 37-56.
- (84) Nilsson, T. Carbohydrate composition during long-term storage of carrots as influenced by the time of harvest. *Journal of horticultural science*. **1987**. *62*, 191-203.
- (85) Klockmann, S.; Reiner, E.; Bachmann, R.; Hackl, T.; Fischer, M. Food fingerprinting: metabolomic approaches for geographical origin discrimination of hazelnuts (*Corylus avellana*) by UPLC-QTOF-MS. *Journal of agricultural and food chemistry*. **2016**. *64*, 9253-9262.

- (86) Hori, K.; Kiriyama, T.; Tsumura, K. A liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry-based metabolomics approach for the discrimination of cocoa beans from different growing regions. *Food analytical methods*. **2016**. *9*, 738-743.
- (87) Cain, N.; Segelke, T.; Stahl, A.; Frerichs, H.; Fischer, M. Metabolic Fingerprinting: Kakaoschalennachweis in Kakaoprodukten. *FOOD-LAB*. **2017**. *2*, 18-22.
- (88) Sykes, B. D. Urine stability for metabolomic studies: effects of preparation and storage. *Metabolomics*. **2007**. *3*, 19-27.
- (89) Bernini, P.; Bertini, I.; Luchinat, C.; Nincheri, P.; Staderini, S.; Turano, P. Standard operating procedures for pre-analytical handling of blood and urine for metabolomic studies and biobanks. *Journal of biomolecular NMR*. **2011**. *49*, 231-243.
- (90) Laparre, J.; Kaabia, Z.; Mooney, M.; Buckley, T.; Sherry, M.; Le Bizec, B.; Dervilly-Pinel, G. Impact of storage conditions on the urinary metabolomics fingerprint. *Analytica chimica acta*. **2017**. *951*, 99-107.
- (91) Oikawa, A.; Otsuka, T.; Jikumaru, Y.; Yamaguchi, S.; Matsuda, F.; Nakabayashi, R.; Takashina, T.; Isuzugawa, K.; Saito, K.; Shiratake, K. Effects of freeze-drying of samples on metabolite levels in metabolome analyses. *Journal of separation science*. **2011**. *34*, 3561-3567.
- (92) Bogdanov, M.; Matson, W. R.; Wang, L.; Matson, T.; Saunders-Pullman, R.; Bressman, S. S.; Beal, M. F. Metabolomic profiling to develop blood biomarkers for Parkinson's disease. *Brain*. **2008**. *131*, 389-396.
- (93) Soga, T.; Igarashi, K.; Ito, C.; Mizobuchi, K.; Zimmermann, H.-P.; Tomita, M. Metabolomic profiling of anionic metabolites by capillary electrophoresis mass spectrometry. *Analytical chemistry*. **2009**. *81*, 6165-6174.
- (94) Johnson, H. E.; Broadhurst, D.; Goodacre, R.; Smith, A. R. Metabolic fingerprinting of salt-stressed tomatoes. *Phytochemistry*. **2003**. *62*, 919-928.
- (95) Fotakis, C.; Zervou, M. NMR metabolic fingerprinting and chemometrics driven authentication of Greek grape marc spirits. *Food chemistry*. **2016**. *196*, 760-768.
- (96) Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. **1957**. *226*, 497-509.
- (97) Bligh, E. G.; Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*. **1959**. *37*, 911-917.
- (98) Huie, C. W. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and bioanalytical chemistry*. **2002**. *373*, 23-30.
- (99) Naidong, W.; Bu, H.; Chen, Y.-L.; Shou, W. Z.; Jiang, X.; Halls, T. D. Simultaneous development of six LC-MS-MS methods for the determination of multiple analytes in human plasma. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. **2002**. *28*, 1115-1126.
- (100) El Rammouz, R.; Létisse, F.; Durand, S.; Portais, J.-C.; Moussa, Z. W.; Fernandez, X. Analysis of skeletal muscle metabolome: Evaluation of extraction methods for targeted metabolite quantification using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical biochemistry*. **2010**. *398*, 169-177.
- (101) Duportet, X.; Aggio, R. B. M.; Carneiro, S.; Villas-Bôas, S. G. The biological interpretation of metabolomic data can be misled by the extraction method used. *Metabolomics*. **2012**. *8*, 410-421.
- (102) Kim, H. K.; Verpoorte, R. Sample preparation for plant metabolomics. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*. **2010**. *21*, 4-13.
- (103) Mushtaq, M. Y.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R.; Wilson, E. G. Extraction for metabolomics: access to the metabolome. *Phytochemical Analysis*. **2014**. *25*, 291-306.
- (104) Chelius, D.; Bondarenko, P. V. Quantitative profiling of proteins in complex mixtures using liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of proteome research*. **2002**. *1*, 317-323.

- (105) De Vos, R. C.; Moco, S.; Lommen, A.; Keurentjes, J. J.; Bino, R. J.; Hall, R. D. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature protocols*. **2007**. *2*, 778.
- (106) Albert, K., *On-line LC-NMR and related techniques*. John Wiley & Sons: **2003**.
- (107) Exarchou, V.; Krucker, M.; van Beek, T. A.; Vervoort, J.; Gerothanassis, I. P.; Albert, K. LC–NMR coupling technology: recent advancements and applications in natural products analysis. *Magnetic Resonance in Chemistry*. **2005**. *43*, 681-687.
- (108) Ramautar, R.; Somsen, G. W.; de Jong, G. J. CE-MS in metabolomics. *Electrophoresis*. **2009**. *30*, 276-291.
- (109) Zhou, B.; Xiao, J. F.; Tuli, L.; Ressom, H. W. LC-MS-based metabolomics. *Molecular BioSystems*. **2012**. *8*, 470-481.
- (110) Jonsson, P.; Johansson, A. I.; Gullberg, J.; Trygg, J.; Grung, B.; Marklund, S.; Sjöström, M.; Antti, H.; Moritz, T. High-throughput data analysis for detecting and identifying differences between samples in GC/MS-based metabolomic analyses. *Analytical chemistry*. **2005**. *77*, 5635-5642.
- (111) Marseglia, A.; Acquotti, D.; Consonni, R.; Cagliani, L.; Palla, G.; Caligiani, A. HR MAS 1H NMR and chemometrics as useful tool to assess the geographical origin of cocoa beans—Comparison with HR 1H NMR. *Food research international*. **2016**. *85*, 273-281.
- (112) Teye, E.; Huang, X.; Dai, H.; Chen, Q. Rapid differentiation of Ghana cocoa beans by FT-NIR spectroscopy coupled with multivariate classification. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **2013**. *114*, 183-189.
- (113) Meinhardt, L. W.; Rincones, J.; Bailey, B. A.; Aime, M. C.; Griffith, G. W.; Zhang, D.; Pereira, G. A. *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: what's new from this old foe? *Molecular plant pathology*. **2008**. *9*, 577-588.
- (114) Martins, L. G.; Figueiredo, I. M.; Marsaioli, A. J.; Efraim, P.; Pezoa-Garcia, H. H NMR spectroscopy applied to the cocoa evaluation of Theobroma cacao clones. **2010**.
- (115) Mayorga-Gross, A.; Quirós-Guerrero, L.; Fourny, G.; Vaillant, F. An untargeted metabolomic assessment of cocoa beans during fermentation. *Food Research International*. **2016**. *89*, 901-909.
- (116) Gey, M. H., *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen*. Springer-Verlag: **2015**.
- (117) van Deemter, J. J.; Zuiderweg, F.; Klinkenberg, A. v. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. *Chemical Engineering Science*. **1956**. *5*, 271-289.
- (118) Meyer, V. R., *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*. John Wiley & Sons: **2009**.
- (119) Dorschel, C. A.; Ekmanis, J. L.; Oberholtzer, J. E.; Warren Jr, F. V.; Bidlingmeyer, B. A. LC detectors: evaluation and practical implications of linearity. *Analytical Chemistry*. **1989**. *61*, 951A-968A.
- (120) Swartz, M. E. UPLC™: an introduction and review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **2005**. *28*, 1253-1263.
- (121) De Vos, J.; Broeckhoven, K.; Eeltink, S. Advances in ultrahigh-pressure liquid chromatography technology and system design. *Analytical chemistry*. **2015**. *88*, 262-278.
- (122) Gritti, F.; Leonardis, I.; Abia, J.; Guiochon, G. Physical properties and structure of fine core-shell particles used as packing materials for chromatography: relationships between particle characteristics and column performance. *Journal of Chromatography A*. **2010**. *1217*, 3819-3843.
- (123) Hayes, R.; Ahmed, A.; Edge, T.; Zhang, H. Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. *Journal of chromatography A*. **2014**. *1357*, 36-52.

- (124) Majors, R. E.; Przybyciel, M. Columns for reversed-phase LC separations in highly aqueous mobile phases. *LCGC NORTH AMERICA*. **2002**. *20*, 584-593.
- (125) Horvath, C.; Melander, W. Liquid chromatography with hydrocarbonaceous bonded phases; theory and practice of reversed phase chromatography. *Journal of Chromatographic Science*. **1977**. *15*, 393-404.
- (126) Sandoval, J. E.; Pesek, J. J. Synthesis and characterization of a hydride-modified porous silica material as an intermediate in the preparation of chemically bonded chromatographic stationary phases. *Analytical Chemistry*. **1989**. *61*, 2067-2075.
- (127) Pesek, J.; Matyska, M. T. A comparison of two separation modes: HILIC and aqueous normal phase chromatography. *LC GC NORTH AMERICA*. **2007**. *25*, 480.
- (128) Borges, E. M. Silica, hybrid silica, hydride silica and non-silica stationary phases for liquid chromatography. *Journal of chromatographic science*. **2014**. *53*, 580-597.
- (129) Borges, E. M.; Volmer, D. A. Silica, hybrid silica, hydride silica and non-silica stationary phases for liquid chromatography. Part II: chemical and thermal stability. *Journal of chromatographic science*. **2015**. *53*, 1107-1122.
- (130) Pesek, J. J.; Matyska, M. T.; Fischer, S. M.; Sana, T. R. Analysis of hydrophilic metabolites by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry using a silica hydride-based stationary phase. *Journal of chromatography A*. **2008**. *1204*, 48-55.
- (131) Pesek, J. J.; Matyska, M. T.; Dang, A. Analysis of cycloserine and related compounds using aqueous normal phase chromatography/mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. **2012**. *64*, 72-76.
- (132) Engelhardt, H., *Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie*. Springer-Verlag: **2013**; Vol. 14.
- (133) de Hoffmann, E.; Stroobant, V., *Mass spectrometry: principles and applications*. John Wiley & Sons: **2007**.
- (134) Wilm, M. Principles of electrospray ionization. *Molecular & Cellular Proteomics*. **2011**. *10*, M111.009407.
- (135) Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. Electrospray ionization—principles and practice. *Mass Spectrometry Reviews*. **1990**. *9*, 37-70.
- (136) Mortier, K. A.; Zhang, G.-F.; Van Peteghem, C. H.; Lambert, W. E. Adduct formation in quantitative bioanalysis: effect of ionization conditions on paclitaxel. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. **2004**. *15*, 585-592.
- (137) Desiderio, D. M.; Nibbering, N. M.; Kraj, A., *Mass spectrometry: instrumentation, interpretation, and applications*. John Wiley & Sons: **2008**; Vol. 20.
- (138) Wilhelm, O.; Mädler, L.; Pratsinis, S. E. Electrospray evaporation and deposition. *Journal of Aerosol Science*. **2003**. *34*, 815-836.
- (139) Wilm, M. S.; Mann, M. Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last? *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*. **1994**. *136*, 167-180.
- (140) Iribarne, J.; Thomson, B. On the evaporation of small ions from charged droplets. *The Journal of Chemical Physics*. **1976**. *64*, 2287-2294.
- (141) Dole, M.; Mack, L. L.; Hines, R. L.; Mobley, R. C.; Ferguson, L. D.; Alice, M. B. Molecular beams of macroions. *The Journal of Chemical Physics*. **1968**. *49*, 2240-2249.
- (142) Whitehouse, C.; Dreyer, R.; Yamashita, M.; Fenn, J. Electrospray ionization for mass-spectrometry of large biomolecules. *Science*. **1989**. *246*, 64-71.
- (143) Lange, E.; Tautenhahn, R.; Neumann, S.; Gröpl, C. Critical assessment of alignment procedures for LC-MS proteomics and metabolomics measurements. *BMC bioinformatics*. **2008**. *9*, 375.
- (144) Hernández, F.; Ibáñez, M.; Sancho, J. V.; Pozo, Ó. J. Comparison of different mass spectrometric techniques combined with liquid chromatography for confirmation of pesticides

- in environmental water based on the use of identification points. *Analytical chemistry*. **2004**. 76, 4349-4357.
- (145) Griffiths, W. J.; Koal, T.; Wang, Y.; Kohl, M.; Enot, D. P.; Deigner, H. P. "Targeted Metabolomics" in der Biomarkerforschung. *Angewandte Chemie*. **2010**. 122, 5554-5575.
- (146) Klockmann, S.; Reiner, E.; Cain, N.; Fischer, M. Food targeting: Geographical origin determination of hazelnuts (*Corylus avellana*) by LC-QqQ-MS/MS-based targeted metabolomics application. *Journal of agricultural and food chemistry*. **2017**. 65, 1456-1465.
- (147) Cammann, K., *Instrumentelle analytische Chemie: Verfahren, Anwendungen, Qualitätssicherung*. Spektrum-Verlag: Heidelberg, **2010**.
- (148) Gross, J. H. Massenspektrometrie. *Ein Lehrbuch*. Berlin [ua]: Springer Spektrum. S. **2013**. 260, 414.
- (149) Johnson, J. V.; Yost, R. A.; Kelley, P. E.; Bradford, D. C. Tandem-in-space and tandem-in-time mass spectrometry: triple quadrupoles and quadrupole ion traps. *Analytical chemistry*. **1990**. 62, 2162-2172.
- (150) Domon, B.; Aebersold, R. Mass spectrometry and protein analysis. *science*. **2006**. 312, 212-217.
- (151) Demetrowitsch, T.; Schwarz, K. Metabolomics: new analytical methods for metabolome research. *Ernährungs-Umschau*. **2014**. 61, 102-111.
- (152) El-Aneed, A.; Cohen, A.; Banoub, J. Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews*. **2009**. 44, 210-230.
- (153) Gross, J. H., *Massenspektrometrie: Ein Lehrbuch*. Springer-Verlag: **2012**.
- (154) Wiley, W.; McLaren, I. H. Time-of-flight mass spectrometer with improved resolution. *Review of Scientific Instruments*. **1955**. 26, 1150-1157.
- (155) Matuszewski, B.; Constanzer, M.; Chavez-Eng, C. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC–MS/MS. *Analytical chemistry*. **2003**. 75, 3019-3030.
- (156) Annesley, T. M. Ion suppression in mass spectrometry. *Clinical chemistry*. **2003**. 49, 1041-1044.
- (157) Jessome, L. L.; Volmer, D. A. Ion suppression: a major concern in mass spectrometry. *Lc Gc North America*. **2006**. 24, 498.
- (158) Tracqui, A.; Kintz, P.; Mangin, P. HPLC/MS determination of buprenorphine and norbuprenorphine in biological fluids and hair samples. *Journal of Forensic Science*. **1997**. 42, 111-114.
- (159) Gangl, E. T.; Annan, M.; Spooner, N.; Vouros, P. Reduction of signal suppression effects in ESI-MS using a nanosplitting device. *Analytical chemistry*. **2001**. 73, 5635-5644.
- (160) Baiocchi, C.; Brussino, M. C.; Pramauro, E.; Prevot, A. B.; Palmisano, L.; Marçi, G. Characterization of methyl orange and its photocatalytic degradation products by HPLC/UV–VIS diode array and atmospheric pressure ionization quadrupole ion trap mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*. **2002**. 214, 247-256.
- (161) Worley, B.; Powers, R. Multivariate analysis in metabolomics. *Current Metabolomics*. **2013**. 1, 92-107.
- (162) Kessler, W., *Multivariate datenanalyse: für die pharma, bio-und Prozessanalytik*. John Wiley & Sons: **2007**.
- (163) Wold, S.; Albano, C.; Dunn, W.; Edlund, U.; Esbensen, K.; Geladi, P.; Hellberg, S.; Johansson, E.; Lindberg, W.; Sjöström, M., Multivariate data analysis in chemistry. In *Chemometrics*, Springer: **1984**; pp 17-95.
- (164) Katajamaa, M.; Orešič, M. Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. *Journal of chromatography A*. **2007**. 1158, 318-328.



- (165) van den Berg R. A.; Hoefsloot H. G.; Westerhuis J. A.; Smilde A. K.; J., v. d. W. M. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics*. **2006**. 7.
- (166) Idborg, H.; Zamani, L.; Edlund, P.-O.; Schuppe-Koistinen, I.; Jacobsson, S. P. Metabolic fingerprinting of rat urine by LC/MS: Part 2. Data pretreatment methods for handling of complex data. *Journal of Chromatography B*. **2005**. 828, 14-20.
- (167) Andreev, V. P.; Rejtar, T.; Chen, H.-S.; Moskovets, E. V.; Ivanov, A. R.; Karger, B. L. A universal denoising and peak picking algorithm for LC- MS based on matched filtration in the chromatographic time domain. *Analytical chemistry*. **2003**. 75, 6314-6326.
- (168) Bruker DataAnalysis User Manual 4.1. **2012a**.
- (169) Castillo, S.; Gopalacharyulu, P.; Yetukuri, L.; Orešič, M. Algorithms and tools for the preprocessing of LC-MS metabolomics data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. **2011**. 108, 23-32.
- (170) De Livera, A. M.; Dias, D. A.; De Souza, D.; Rupasinghe, T.; Pyke, J.; Tull, D.; Roessner, U.; McConville, M.; Speed, T. P. Normalizing and integrating metabolomics data. *Analytical chemistry*. **2012**. 84, 10768-10776.
- (171) Gromski, P. S.; Xu, Y.; Hollywood, K. A.; Turner, M. L.; Goodacre, R. The influence of scaling metabolomics data on model classification accuracy. *Metabolomics*. **2015**. 11, 684-695.
- (172) Abdi, H.; Williams, L. J. Principal component analysis. *Wiley interdisciplinary reviews: computational statistics*. **2010**. 2, 433-459.
- (173) Rao, C. R. The use and interpretation of principal component analysis in applied research. *Sankhyā: The Indian Journal of Statistics, Series A*. **1964**. 329-358.
- (174) Liland, K. H. Multivariate methods in metabolomics—from pre-processing to dimension reduction and statistical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **2011**. 30, 827-841.
- (175) Wold, H. Soft modelling by latent variables: the non-linear iterative partial least squares (NIPALS) approach. *Journal of Applied Probability*. **1975**. 12, 117-142.
- (176) Manne, R. Analysis of two partial-least-squares algorithms for multivariate calibration. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. **1987**. 2, 187-197.
- (177) Geladi, P.; Kowalski, B. R. Partial least-squares regression: a tutorial. *Analytica chimica acta*. **1986**. 185, 1-17.
- (178) Matissek, R.; Raters, M. "Hot spots" in Cocoa? Mycotoxin Distribution in cocoa beans. *Mycotoxin Research*. **2006**. 21, 182-186.
- (179) Bro, R.; Smilde, A. K. Principal component analysis. *Analytical Methods*. **2014**. 6, 2812-2831.
- (180) Bruker ProfilAnalysis User Manual 2.1. **2013**.
- (181) Hansen, C. M. The three dimensional solubility parameter. *Danish Technical: Copenhagen*. **1967**. 14.
- (182) Regulation (EC) No 1272/2008. EC, Ed. **2008**.
- (183) Taylor, P. J. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clinical biochemistry*. **2005**. 38, 328-334.
- (184) Klockmann, S. Entwicklung von LC-MS basierten Metabolomics-Applikationen zu Diabetes mellitus und dem metabolischen Syndrom. **2013**.
- (185) Creydt, M.; Fischer, M. Plant Metabolomics: Maximizing Metabolome Coverage by Optimizing Mobile Phase Additives for Nontargeted Mass Spectrometry in Positive and Negative Electrospray Ionization Mode. *Analytical chemistry*. **2017**. 89, 10474-10486.
- (186) Cajka, T.; Fiehn, O. Increasing lipidomic coverage by selecting optimal mobile-phase modifiers in LC-MS of blood plasma. *Metabolomics*. **2016**. 12, 34.

- (187) Mallet, C. R.; Lu, Z.; Mazzeo, J. R. A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2004**. *18*, 49-58.
- (188) Murphy, R. C.; James, P. F.; McAnoy, A. M.; Krank, J.; Duchoslav, E.; Barkley, R. Detection of the abundance of diacylglycerol and triacylglycerol molecular species in cells using neutral loss mass spectrometry. *Journal of Analytical biochemistry*. **2007**. *366*, 59-70.
- (189) Flieger, J. Effect of ionic liquids as mobile-phase additives on chromatographic parameters of neuroleptic drugs in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Analytical Letters*. **2009**. *42*, 1632-1649.
- (190) Zhang, W.; He, L.; Gu, Y.; Liu, X.; Jiang, S. Effect of ionic liquids as mobile phase additives on retention of catecholamines in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Analytical letters*. **2003**. *36*, 827-838.
- (191) Garcia, M. The effect of the mobile phase additives on sensitivity in the analysis of peptides and proteins by high-performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. **2005**. *825*, 111-123.
- (192) Microsolv Cogent Katalog. Cogent, Ed. Cogent: **2017**; Vol. 2017-18.
- (193) Pesek, J. J.; Matyska, M. T.; Boysen, R. I.; Yang, Y.; Hearn, M. T. Aqueous normal-phase chromatography using silica-hydride-based stationary phases. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **2013**. *42*, 64-73.
- (194) Callahan, D. L.; Souza, D. D.; Bacic, A.; Roessner, U. Profiling of polar metabolites in biological extracts using diamond hydride-based aqueous normal phase chromatography. *Journal of separation science*. **2009**. *32*, 2273-2280.
- (195) Guillarme, D.; Heinisch, S.; Rocca, J. Effect of temperature in reversed phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. **2004**. *1052*, 39-51.
- (196) Dolan, J. W. Temperature selectivity in reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. **2002**. *965*, 195-205.
- (197) Cogent Diamond Hydride C8 Specifications. [https://mtc-usa.com/diamond\\_hydride\\_specs](https://mtc-usa.com/diamond_hydride_specs) (26.04.2018).
- (198) Soukup, J.; Jandera, P. Hydrosilated silica-based columns: the effects of mobile phase and temperature on dual hydrophilic-reversed-phase separation mechanism of phenolic acids. *Journal of Chromatography A*. **2012**. *1228*, 125-134.
- (199) Klitgaard, A.; Iversen, A.; Andersen, M. R.; Larsen, T. O.; Frisvad, J. C.; Nielsen, K. F. Aggressive dereplication using UHPLC–DAD–QTOF: screening extracts for up to 3000 fungal secondary metabolites. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2014**. *406*, 1933-1943.
- (200) Bruker qToF Control User Manual. **2015**.
- (201) Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006. *1272/2008*, (EG), E. G., Ed. **2008**.
- (202) Sciex API 4000TM LC/MS/MS System Hardware Manuel. *Sciex Hardware Guide*. **2004**.
- (203) Wellmitz, J.; Gluschke, M., *Leitlinie zur Methodvalidierung*. Umweltbundesamt: **2005**.
- (204) FDA, U. Draft guidance for industry: bioanalytical method validation. US Department of Health and Human Services, US FDA. **2013**.
- (205) DIN 32645:2008-11 Chemical analysis - Decision limit, detection limit and determination limit under repeatability conditions - Terms, methods, evaluation. **2008**.
- (206) Long, G. L.; Winefordner, J. D. Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. *Analytical chemistry*. **1983**. *55*, 712A-724A.

- (207) Berechnung der Verfahrensstandardabweichung und Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze aus einer Kalibrierung gemäß DIN 32645. [https://www.uni-due.de/imperia/md/content/iac/git\\_erw\\_1.pdf](https://www.uni-due.de/imperia/md/content/iac/git_erw_1.pdf)
- (208) Zorn, M. E.; Gibbons, R. D.; Sonzogni, W. C. Evaluation of approximate methods for calculating the limit of detection and limit of quantification. *Environmental science & technology*. **1999**. *33*, 2291-2295.
- (209) Rockville, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. US Department of Health and Human Services. *Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CV)*, **2018**.
- (210) Desimoni, E.; Brunetti, B. About estimating the limit of detection by the signal to noise approach. *PHARMACEUTICA ANALYTICA ACTA*. **2015**. *6*, 1-4.
- (211) Kromidas, S.; Kuss, H.-J., *Chromatogramme richtig integrieren und bewerten: Ein Praxishandbuch für die HPLC und GC*. John Wiley & Sons: **2008**.
- (212) Ruttkies, C.; Schymanski, E. L.; Wolf, S.; Hollender, J.; Neumann, S. MetFrag relaunched: incorporating strategies beyond in silico fragmentation. *Journal of cheminformatics*. **2016**. *8*, 3.
- (213) Sumner, L. W.; Amberg, A.; Barrett, D.; Beale, M. H.; Beger, R.; Daykin, C. A.; Fan, T. W.-M.; Fiehn, O.; Goodacre, R.; Griffin, J. L. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics*. **2007**. *3*, 211-221.
- (214) Lang, R.; Hofmann, T. A versatile method for the quantitative determination of  $\beta$ N-alkanoyl-5-hydroxytryptamides in roasted coffee. *European Food Research and Technology*. **2005**. *220*, 638-643.
- (215) Gu, M.; Kerwin, J. L.; Watts, J. D.; Aebersold, R. Ceramide profiling of complex lipid mixtures by electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical biochemistry*. **1997**. *244*, 347-356.
- (216) Zheng, W.; Kollmeyer, J.; Symolon, H.; Momin, A.; Munter, E.; Wang, E.; Kelly, S.; Allegood, J. C.; Liu, Y.; Peng, Q. Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. **2006**. *1758*, 1864-1884.
- (217) Liebisch, G.; Drobnik, W.; Reil, M.; Trümbach, B.; Arnecke, R.; Olgemöller, B.; Roscher, A.; Schmitz, G. Quantitative measurement of different ceramide species from crude cellular extracts by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). *Journal of lipid research*. **1999**. *40*, 1539-1546.
- (218) Byrdwell, W.; Neff, W. E. Dual parallel electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (MS), MS/MS and MS/MS/MS for the analysis of triacylglycerols and triacylglycerol oxidation products. *Rapid communications in mass spectrometry*. **2002**. *16*, 300-319.
- (219) Kalo, P.; Ollilainen, V.; Rocha, J.; Malcata, F. Identification of molecular species of simple lipids by normal phase liquid chromatography–positive electrospray tandem mass spectrometry, and application of developed methods in comprehensive analysis of low erucic acid rapeseed oil lipids. *International Journal of Mass Spectrometry*. **2006**. *254*, 106-121.
- (220) Mandel, J., *The statistical analysis of experimental data*. John Wiley & Sons: Washington, **1964**.
- (221) Goske, A. Über die Bestimmung des Schalengehaltes im Kakao. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*. **1910**. *19*, 154-158.
- (222) Pindur, U. 2, 2'-Diindolylmethane, 7. Mitt. Diindolylmethan-Leukobasen bei der van Urk-Reaktion mit physiologisch aktiven Indolen. *Archiv der Pharmazie*. **1984**. *317*, 502-505.
- (223) Szelag, H.; Zwierzykowski, W. Evaluation of behenic acid tryptamide in cocoa fat on the basis of Blue Value determinations *Food / Nahrung*. **1988**. *32*.

- (224) Cain, N.; Alka, O.; Segelke, T.; Von Wuthenau, K.; Kohlbacher, O.; Fischer, M. Food Fingerprinting: Mass spectrometric determination of the cocoa shell content (*Theobroma cacao* L.) in cocoa products by HPLC-QTOF-MS. *Food Chemistry*. **2019**. 125013.
- (225) GESTIS-Stoffdatenbank - Gefahrstoffinformationssystem der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung. [www.dguv.de/ifa/stoffdatenbank](http://www.dguv.de/ifa/stoffdatenbank) (30.08.2019).
- (226) Kessler, W., *Multivariate Datenanalyse*. Wiley-VCH: **2006**.
- (227) Scheffler, E., *Statistische Versuchsplanung und-auswertung*. Stuttgart, Germany, **1997**; Vol. 3. Auflage.
- (228) Graf, U.; Wilrich, P.-T.; Henning, H.-J.; Stange, K., *Formeln und Tabellen der angewandten mathematischen Statistik*. Springer: **1997**.

## 8 Anhang

### 8.1 SOP zur Durchführung der *targeted* Methode für den Kakaoschalennachweis

Einleitung: Im Zuge dieser Arbeit wurden 18 Metabolite identifiziert und charakterisiert, anhand derer ein Kakaoschalennachweis in Kakaoprodukten durchgeführt werden kann. Die identifizierten Marker sind fünf unterschiedlichen Stoffklassen zuzuordnen: Fettsäuretryptamide, 5-Hydroxy-Fettsäuretryptamide (Serotonin-Derivate),  $\alpha$ -Tocopherol-Derivate, Triacylglycerole und Ceramid-Derivate. Anhand 15 der identifizierten Metaboliten wurde eine *targeted*-Methode für ein LC-ESI-QqQ System entwickelt. Im Folgenden ist eine SOP für die Durchführung der Probenanalyse mittels der entwickelten *targeted*-Methode aufgeführt.

	Durchführung
Hinweise	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Vermeidung des direkten Kontaktes mit dem Probenmaterial durch Tragen von Handschuhen</li> <li>- Überwachung der Probentemperatur (<math>\leq 4\text{ °C}</math>)</li> </ul>
Homogenisierung	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nur homogenes Probenmaterial verwenden</li> <li>- Homogenisierung mittels Messermühle oder unter aufschmelzen der Proben</li> </ul>
Extraktion	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>50 \pm 0,5</math> mg Probe mit Einmal-Kunststoff-Spateln in 2-mL-Eppendorf Reaktionsgefäße einwiegen</li> <li>- Zugabe von 2 Stahlkugeln</li> <li>- Zugabe von 1000 <math>\mu\text{L}</math> Extraktionslösung (<math>4\text{ °C}</math>) [2-Propanol/Methyl-tert-butylether (7:3; v/v)]</li> <li>- Zellaufschluss mittels Kugelmühle bei 3,1 m/s für 5 min</li> <li>- Zugabe von 1000 <math>\mu\text{L}</math> Extraktionslösung (<math>4\text{ °C}</math>) [2-Propanol/Methyl-tert-butylether (7:3; v/v)]</li> <li>- Zentrifugation bei 14.800 rpm für 5 min</li> <li>- Aufnahme des Überstandes mit Einmal-Spritzen</li> <li>- Membranfiltration des Überstandes</li> <li>- Überführung der Probe in ein Glasvial</li> <li>- Verschließen mit Bördelkappe</li> <li>- Direkt für die Analyse einsetzen</li> </ul>

<b>Durchführung</b>																																											
<b>Kalibrierung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kalibrierung mittels Kakaoschalen-in-Kakaokern-Verdünnungsreihe</li> <li>- Kakaokern- und Kakaoschalen-Homogenisate (Pulverform) für die Verdünnungsreihe verwenden</li> <li>- Mischung der Homogenisate zu jeweils 5 g-Ansätzen mit einem Kakaoschalengehalt in einem Konzentrationsbereich von 0-10 % Kakaoschale in 1 %-Schritten (elf Kalibrierpunkte)</li> <li>- Homogenisierung der Ansätze mittels Mörser und Pistill</li> </ul>																																										
<b>Analyse</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- HPLC: 1260 Infinity Series (Agilent)</li> <li>- Chromatographiesäule: Zorbax Eclipse Plus C18 (Agilent)</li> <li>- Massenspektrometer: API 4000 (Sciex)</li> </ul> <p>Die Parameter für das flüssigchromatographische und massenspektrometrische System sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.</p> <p>Chromatographiebedingungen der TNP-Methode:</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">Parameter</th> <th style="text-align: center;">Einstellung</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Injektionsvolumen</td> <td>5 µL</td> </tr> <tr> <td>Chromatographiesäule</td> <td>ZORBAX Eclipse Plus C18, Rapid Resolution HD Dim. (mm) 50 x 2,1; Particle Sz. 1,8 µm</td> </tr> <tr> <td>Säulenofentemperatur</td> <td>40 °C</td> </tr> <tr> <td>Autosamplertemperatur</td> <td>20 °C</td> </tr> <tr> <td>Eluent A</td> <td>Wasser + 10 mM AF</td> </tr> <tr> <td>Eluent B</td> <td>2-Propanol/ACN (3/2, v/v) + 10 mM AF</td> </tr> <tr> <td>Gradient</td> <td> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">Zeit t [min]</th> <th style="text-align: center;">Eluent A [%]</th> <th style="text-align: center;">Eluent B [%]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td style="text-align: center;">0,0</td><td style="text-align: center;">30</td><td style="text-align: center;">70</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">2,0</td><td style="text-align: center;">30</td><td style="text-align: center;">70</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">4,0</td><td style="text-align: center;">15</td><td style="text-align: center;">85</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">8,0</td><td style="text-align: center;">0</td><td style="text-align: center;">100</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">21,0</td><td style="text-align: center;">0</td><td style="text-align: center;">100</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">21,1</td><td style="text-align: center;">30</td><td style="text-align: center;">70</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">25,0</td><td style="text-align: center;">30</td><td style="text-align: center;">70</td></tr> </tbody> </table> </td> </tr> <tr> <td>Flußrate</td> <td>0,4 mL/min</td> </tr> </tbody> </table>	Parameter	Einstellung	Injektionsvolumen	5 µL	Chromatographiesäule	ZORBAX Eclipse Plus C18, Rapid Resolution HD Dim. (mm) 50 x 2,1; Particle Sz. 1,8 µm	Säulenofentemperatur	40 °C	Autosamplertemperatur	20 °C	Eluent A	Wasser + 10 mM AF	Eluent B	2-Propanol/ACN (3/2, v/v) + 10 mM AF	Gradient	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">Zeit t [min]</th> <th style="text-align: center;">Eluent A [%]</th> <th style="text-align: center;">Eluent B [%]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td style="text-align: center;">0,0</td><td style="text-align: center;">30</td><td style="text-align: center;">70</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">2,0</td><td style="text-align: center;">30</td><td style="text-align: center;">70</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">4,0</td><td style="text-align: center;">15</td><td style="text-align: center;">85</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">8,0</td><td style="text-align: center;">0</td><td style="text-align: center;">100</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">21,0</td><td style="text-align: center;">0</td><td style="text-align: center;">100</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">21,1</td><td style="text-align: center;">30</td><td style="text-align: center;">70</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">25,0</td><td style="text-align: center;">30</td><td style="text-align: center;">70</td></tr> </tbody> </table>	Zeit t [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	0,0	30	70	2,0	30	70	4,0	15	85	8,0	0	100	21,0	0	100	21,1	30	70	25,0	30	70	Flußrate	0,4 mL/min
Parameter	Einstellung																																										
Injektionsvolumen	5 µL																																										
Chromatographiesäule	ZORBAX Eclipse Plus C18, Rapid Resolution HD Dim. (mm) 50 x 2,1; Particle Sz. 1,8 µm																																										
Säulenofentemperatur	40 °C																																										
Autosamplertemperatur	20 °C																																										
Eluent A	Wasser + 10 mM AF																																										
Eluent B	2-Propanol/ACN (3/2, v/v) + 10 mM AF																																										
Gradient	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">Zeit t [min]</th> <th style="text-align: center;">Eluent A [%]</th> <th style="text-align: center;">Eluent B [%]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td style="text-align: center;">0,0</td><td style="text-align: center;">30</td><td style="text-align: center;">70</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">2,0</td><td style="text-align: center;">30</td><td style="text-align: center;">70</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">4,0</td><td style="text-align: center;">15</td><td style="text-align: center;">85</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">8,0</td><td style="text-align: center;">0</td><td style="text-align: center;">100</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">21,0</td><td style="text-align: center;">0</td><td style="text-align: center;">100</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">21,1</td><td style="text-align: center;">30</td><td style="text-align: center;">70</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">25,0</td><td style="text-align: center;">30</td><td style="text-align: center;">70</td></tr> </tbody> </table>	Zeit t [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	0,0	30	70	2,0	30	70	4,0	15	85	8,0	0	100	21,0	0	100	21,1	30	70	25,0	30	70																		
Zeit t [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]																																									
0,0	30	70																																									
2,0	30	70																																									
4,0	15	85																																									
8,0	0	100																																									
21,0	0	100																																									
21,1	30	70																																									
25,0	30	70																																									
Flußrate	0,4 mL/min																																										

		<b>Durchführung</b>							
Analyse	Einstellungen des massenspektrometrischen Systems der TNP-Methode:								
	<b>Parameter</b>				<b>Einstellung</b>				
	Ionisationsmethode				ESI				
	Ionisationsmodus				positiv				
	Ionenquelle								
	Ion Spray Voltage				5500V				
	Temperatur				450 °C				
	Ion Source Gas 1				50 psi				
	Ion Source Gas 2				50 psi				
	Curtain Gas				20 psi				
Collision Gas				Medium					
MRM-Parameter der TNP-Methode:									
<b>Schlüsselmetabolit</b>		<b>Precursor</b>	<b>Fragment</b>	<b>Dwell Time</b>	<b>DP</b>	<b>EP</b>	<b>CE</b>	<b>CXP</b>	
		<b>[m/z]</b>	<b>[m/z]</b>	<b>[msec]</b>	<b>[V]</b>	<b>[V]</b>	<b>[V]</b>	<b>[V]</b>	
α-Tocomonoenol		429,245	165,1	20	81	10	10	29	
Heneicosansäure Tryptamid		469,419	143,9	20	106	10	10	39	
Behensäure Trypta- mid		483,227	143,9	20	106	10	10	39	
Heneicosansäure Se- rotonin		485,41	160	20	101	10	10	49	
Tricosansäure Trypta- mid		497,447	143,9	20	106	10	10	39	
Behensäure Seroto- nin		499,427	160	20	101	10	10	49	
Lignocerinsäure Tryp- tamid		511,462	143,9	20	106	10	10	39	
Pentacosansäure Tryptamid		525,457	143,9	20	106	10	10	39	

		Durchführung																	
Analyse	<b>Schlüsselmetabolit</b>	<b>Precursor [m/z]</b>	<b>Fragment [m/z]</b>	<b>Dwell Time [msec]</b>	<b>DP [V]</b>	<b>EP [V]</b>	<b>CE [V]</b>	<b>CXP [V]</b>											
	Lignocerinsäure Serotonin	527,457	160	20	101	10	10	49											
	Cerotinsäure Tryptamid	539,49	143,9	20	106	10	10	39											
	Dihydroceramide (d18:0/16:0)	540,359	522,5	20	71	10	10	29											
	Pentacosansäure Serotonin	541,472	160	20	101	10	10	49											
	Cerotinsäure Serotonin	555,488	160	20	101	10	10	49											
	α-Tocopherol Palmitat	686,444	669,6	20	211	10	10	23											
	Cer(d25:0(OH)/18:0(3 OH))	696,65	280,3	20	71	10	10	39											
Auswertung	<p>- Auswertung der Chromatogramme mittels Herstellersoftware Analyst 1.6</p> <p>- Überführen der detektierten Signalflächen über die Software Excel® in die Software The Unscrambler X10.3®</p> <p>- Erstellung des Regressionsmodells anhand der Ergebnisse der Kalibrierreihe</p> <p>Die weiteren relevanten Parameter für die Erstellung des Modells sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.</p> <p>Parameter zur Erstellung des Modells:</p>																		
		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Parameter</th> <th>Einstellung</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Centering</td> <td>Mean centering</td> </tr> <tr> <td>Identify Outliers</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>Algorithm</td> <td>NIPLAS</td> </tr> <tr> <td>Validierung</td> <td>Random Cross Validation</td> </tr> <tr> <td>Gewichtungen</td> <td>keine</td> </tr> </tbody> </table>							Parameter	Einstellung	Centering	Mean centering	Identify Outliers	ON	Algorithm	NIPLAS	Validierung	Random Cross Validation	Gewichtungen
Parameter	Einstellung																		
Centering	Mean centering																		
Identify Outliers	ON																		
Algorithm	NIPLAS																		
Validierung	Random Cross Validation																		
Gewichtungen	keine																		



<b>Durchführung</b>																			
<b>Auswertung</b>	<p>- Vorhersage unbekannter Proben anhand des erstellten PLS-R Modells</p> <p>- Überführung der detektierten Signalfächen der unbekanntenen Proben in die Software The Unscrambler X 10.3®</p> <p>- Bestimmung des Kakaoschalengehaltes mittels Vorhersagefunktion der Software</p> <p>Für die Vorhersage wird das zuvor anhand der Kalibriergeraden berechnete PLS-R Modell und die Parameter in der folgenden Tabelle verwendet.</p> <p>Parameter für die Vorhersage unbekannter Proben:</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Parameter</th> <th style="text-align: left;">Einstellung</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Components</td> <td style="text-align: center;">1</td> </tr> <tr> <td>Prediction</td> <td>Full Prediction</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Identify Outlier</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Leverage Limit</td> <td style="text-align: center;">3.0</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Sample Outlier Limit, Validation</td> <td style="text-align: center;">2.6</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Individual Value Outlier, Validation</td> <td style="text-align: center;">3.0</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Total Explained Variance [%]</td> <td style="text-align: center;">20</td> </tr> <tr> <td>Include Y reference</td> <td style="text-align: center;">Off</td> </tr> </tbody> </table>	Parameter	Einstellung	Components	1	Prediction	Full Prediction	Identify Outlier		Leverage Limit	3.0	Sample Outlier Limit, Validation	2.6	Individual Value Outlier, Validation	3.0	Total Explained Variance [%]	20	Include Y reference	Off
Parameter	Einstellung																		
Components	1																		
Prediction	Full Prediction																		
Identify Outlier																			
Leverage Limit	3.0																		
Sample Outlier Limit, Validation	2.6																		
Individual Value Outlier, Validation	3.0																		
Total Explained Variance [%]	20																		
Include Y reference	Off																		
<b>Ergebnis</b>	<p>- Vorhersage des Schalengehaltes in Prozent mit relativer Standardabweichung angegeben.</p>																		

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien, Geräte, Chemikalien und Standardsubstanzen sind mit den entsprechenden Spezifikationen in Tabelle 51 bis Tabelle 54 aufgeführt.

## 8.2 Verbrauchsmaterialien, Geräte, Softwares, Chemikalien und akquirierte Kakaoproben

Tabelle 51: Liste der Verbrauchsmaterialien.

Material	Hersteller	Spezifikation
Aluminiumfolie	Cofresco Frischhalteprodukte GmbH&Co.KG Minden, Deutschland	Toppits® Alufolie, extra reißfest
Bördelkappen	Machery-Nagel GmbH&Co.KG Düren, Deutschland	Aluminiumbördelkappe, 11 mm, farblos lackiert mit Loch, Naturkautschuk rot-orange/Butyl/TEF transparent. 1,0 mm
Braunglasvials	Machery-Nagel GmbH&Co.KG Düren, Deutschland	LLG-Probengläser, N11, braun mit Rollrand
Einmalhandschuhe	VWR International GmbH Darmstadt, Deutschland	Einmalhandschuhe, puderfrei
Mikro-Einweg-Laborspatel	Carl Roth GmbH&Co.KG Karlsruhe, Deutschland	Einweg-Kunststoff-Spatel mikro, antistatisch, unsteril
Einmal-Spritzen	Henke-Sass Wolf GmbH Tuttlingen, Deutschland	NORM-Ject® Einmal-Spritzen, zweiteilig, latex- und silikonölfrei, steril verpackt
Spritzenfilter	Carl Roth GmbH&Co.KG Karlsruhe, Deutschland	Rotilabo®-Spritzenfilter Ø15 mm, PTFE, unsteril, Porengröße
Gefrierbeutel	pely-plastic GmbH&Co.KG Wahlstedt, Deutschland	Handelsüblich, V = 10 L, reißfest und kälteelastisch bis -40 °C
	Budnikowsky GmbH&Co.KG Hamburg, Deutschland	Gefrierbeutel, PE, V = 6 L, 26,5 x 50 cm, kochfest bis 115 °C, gefrierfest bis -40 °C
Pipettenspitzen	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland	Ep T.I.P.S® reload V = 10-100 µL V = 50-1000 µL
	Sarstedt Newton, NC, USA	V = 10 mL
Präzisionswischtücher	Kimberley-Clark Professional Koblenz-Rheinhafen, Deutschland	Weiß, 11 x 21 cm
Eppendorf Tubes	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland	2 MI Eppendorf-Tubes mit safe-lock-Funktion, zentrifugation up to 25.000 g
Schraubdeckelröhrchen	Sarstedt Aktiengesellschaft&Co. Nürnberg, Deutschland	PP-Schraubröhre mit Spitzboden, steril, pyrogenfrei V = 15 mL; 120 x 17 mm V = 50 mL; 114 X 28 mm
Stahlkugeln	Fahrradgebrauchtmarkt Hamburg, Deutschland	Fahrradlagerkugeln, Ø3 mm, entfettet durch Soxhlet-Extraktion mit n-Hexan
Skalpellschneiden	Heinz Herenz Medizinbedarf GmbH Hamburg, Deutschland	Skalpellschneiden aus Carbonstahl, steril verpackt, Blade size No. 11

## Anhang

Tabelle 52: Liste der verwendeten Geräte.

Gerät		Hersteller	Spezifikation
Analysenwaage Für Probeneinwaagen		KERN & SOHN GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland	KERN ABJ Maximalgewicht: 220 g Minimalgewicht: 10 mg e = 1 mg d = 0,1 mg
Analysenwaage für die Einwaage interner Standard-Substanzen		Mettler Toledo Greifensee, Schweiz	XA105 DualRange Max 41 g/ 120 g d = 0,01 mg/ 0,1 mg
Bördelzange		unbekannt	-
Chromatographiesäule polar (ANP)		MicroSolv Technology Corporation, Leland, North Carolina, USA	Cogent Diamond Hydride™ Dim. (mm) 150 x 2,1; Cat. No. 70200-15P-2; 2.2 µm 120 A Cogent Guard Column Kit with Diamond Hydride 2.0, 120 A; 2.2 µm; 2.00 mm x 10 mm
Chromatographiesäule unpolar (RP)		Thermo Fisher Scientific Inc. Bremen, Deutschland	Accucore™ RP-MS Dim. (mm) 150 x 2,1; Particle Sz. 2,6 µm; SN: 10509505; LOT: 14485 with Accucore™ RP-MS Dim. (mm) 10 x 2,1; Particle Sz. 2,6 µm
Eismaschine		ITV Ice Makers Miami, USA	Ice queen
Skalpells Griff		Heint Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg, Deutschland	Griff-Typ Nr. 3
Gefrierschrank (-80 °C) Zur Lagerung der Kakaoproben		ARCTIKO Esbjerg, Dänemark	Ultratiefkühltruhe Arctiko (ULTF320), 284 Liter, -86 °C
Gefrierschrank (-20 °C)		Robert Bosch Hausgeräte GmbH München, Deutschland	Handelsüblich
Gefriertruhe (-20 °C)		Liebherr International AG Bulle, Schweiz	Breite: 1,10 m; Höhe: 0,80 m; Tiefe: 0,65 m Explosionsschutzter Innenraum
HPLC-ESI-QTOF-MS	HPLC	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, USA	Dionex™ UltiMate™ 3000 System
	Massenspektrometer Q-TOF	Bruker® Daltonik GmbH Bremen, Deutschland	Impact™
HPLC-ESI-QTOF-MS	HPLC	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA	Agilent 1260 Infinity Series Quaternary Pump (integrated Degasser): G1311B Autosampler: G1329B Thermostated Column Compartment: G1316A
	Massenspektrometer ESI-QQQ	AB Sciex, Foster City, CA, USA	API 4000 mit ESI-Ionenquelle
Kolbenhubpipette		Eppendorf AG Hamburg, Deutschland	Eppendorf Research variabel® V = 10 - 100 µL V = 50 - 1000 µL V = 1 - 10 mL
Küchenwaage		Soehnle Nassau Deutschland	Exacta, Type: Pure

## Anhang

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Spezifikation</b>
Kugelmühle	Omni International™ Kennesaw, USA	OMNI Bead Ruptor 24
Kühlschrank (0 °C) Extraktionslösungen	Liebherr International AG Bulle, Schweiz	MediLine LKUv 1610 Explosionsgeschützter Innenraum V = 141 L
Messermühle	Retsch Technology® GmbH Haan, Deutschland	Messermühle, Grindomix GM 300
Spritzenpumpe für Kalibrierung	Scientific Inc. Holliston, USA	KDS 100 10 µL - 60 mL 0,1 µL/h – 423 mL/h
Trockenschrank	Memmert GmbH&Co. KG Schwabach, Deutschland	Universalschrank U, Modellgröße Nr. 260
Ultraschallgerät	VWR International GmbH Darmstadt, Deutschland	Ultrasonic Cleaner
Vortexer	Scientific Industries, Inc. New York, USA	Vortex-Genie 2
Wasseraufbereitungssystem	Merck™ KGaA Darmstadt, Deutschland	Direct-Q® R & Direct-Q UV-R
Zentrifuge	Sartorius Stedim Biotech™ AG Göttingen, Deutschland	SIGMA 1-14 Microfuge
Gefriertrockner	Martin Christ, Osterode am Harz, Deutschland	Gamma 1-20


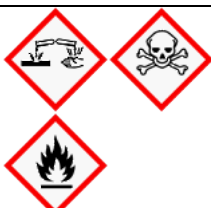

Tabelle 53: Liste der verwendeten Softwares.

<b>Software</b>	<b>Version</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Anwendung</b>
Chromeleon <sup>®</sup>	6.8	Dionex <sup>™</sup> GmbH Idstein, Deutschland	Software zur Steuerung des Dionex <sup>™</sup> - HPLC-Systems UltiMate <sup>™</sup> 3000
DataAnalysis <sup>®</sup>	4.1	Bruker <sup>®</sup> Daltonic GmbH Bremen, Deutschland	Software zur Datenvorverar- beitung der qToF-Daten
Microsoft <sup>®</sup> Excel <sup>®</sup> 2016	16.0	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA	Software zur statistischen Auswertung
HyStar <sup>®</sup>	3.2	Bruker <sup>®</sup> Daltonic GmbH Bremen, Deutschland	Software zur Verknüpfung der An-wendungen Chro- meleon <sup>®</sup> und microToFcon- trol <sup>®</sup>
microTOFcontrol <sup>®</sup>	3.4	Bruker <sup>®</sup> Daltonic GmbH Bremen, Deutschland	Software zur Steuerung des qToF-MS maXis
ProfileAnalysis <sup>®</sup>	2.1	Bruker <sup>®</sup> Daltonic GmbH Bremen, Deutschland	Software zur Datenvorverbar- beitung der qToF-Daten
QuantAnalysis <sup>®</sup>	2.1	Bruker <sup>®</sup> Daltonic GmbH Bremen, Deutschland	Software zum Integrieren der Signalflächen
MetFrag	-	de.NBI	Datenbankgestützte Struktur- aufklärung




## Chemikalien und Entsorgung

In Tabelle 54 sind die Chemikalien aufgeführt, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden. Dort finden sich auch die Gefahrensätze nach dem global harmonisierten System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien (engl. *globally harmonized system of classification, labelling and packaging of chemicals*, GHS) und die Entsorgungshinweise.<sup>225</sup>





Tabelle 54: Liste der verwendeten Chemikalien mit Entsorgungshinweis.

Substanz	CAS-Nummer	Hersteller	Reinheit	Gefahrenpiktogramm	H-Sätze	P-Sätze	Entsorgung[a]
α-Tocopherolpalmitat	34562-29-3	Sigma-Aldrich®	-		-		(2)
Acetonitril	75-05-8	MerckTM	hypergrade for LC-MS		H225, H332, H302, H312, H319	P210, P240, P302+352, P305+351+338, P403+233	(2)
Ameisensäure	64-18-6	Honeywell, FlukaTM	eluent additive for LC-MS		H226, H302, H314, H331 EUH071	P210	(3)
Ammoniumformiat-Lösung (10 M in H2O)	540-69-2	Sigma-Aldrich®	BioUltra		H315, H319, H335	P261, P305+351+338	(3)
Ammoniumacetat	631-61-8	MerckTM	For analysis EMSURE® ACS, Reag. Ph Eur., Merck	kein gefährlicher Stoff nach GHS			(3)

## Anhang


Substanz	CAS-Nummer	Hersteller	Reinheit	Gefahrenpiktogramm	H-Sätze	P-Sätze	Entsorgung[a]
Acetonitril	75-05-8	MerckTM	hypergrade for LC-MS		H225, H332, H302, H312, H319	P210, P240, P302+352, P305+351+338, P403+233	(2)
Ameisensäure	64-18-6	Honeywell, FlukaTM	eluent additive for LC-MS		H226, H302, H314, H331 EUH071	P210	(3)
Ammoniumformiat-Lösung (10 M in H2O)	540-69-2	Sigma-Aldrich®	BioUltra		H315, H319, H335	P261, P305+351+338	(3)
Ammoniumacetat	631-61-8	MerckTM	For analysis EMSURE® ACS, Reag. Ph Eur., Merck	kein gefährlicher Stoff nach GHS			(3)
Arachidonsäure-5-hydroxy-tryptamid	187947-37-1	Sigma-Aldrich®	-	-	-	-	(2)
Behensäuretryptamid	7367-79-5	Sigma-Aldrich®	-	-	-	-	(2)
Dihydroceramid (d18:0/16:0)	5966-29-0	Sigma-Aldrich®	-	-	-	-	(2)

Anhang

Substanz	CAS-Nummer	Hersteller	Reinheit	Gefahrenpiktogramm	H-Sätze	P-Sätze	Entsorgung[a]
Hexakis(2,2-difluoroethoxy) phosphazene	186817-57-2	Apollo Scientific Ltd.	97 %		H315, H319, H335	P280, P264, P261, P271, P302+352, P305+351+338, P332+313, P337+313, P304+340, P403+233, P501	(4)
n-Hexan	110-54-3	Carl Roth® GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland	für HPLC		H225, H304, H361f, H373, H315, H336, H411	P210, P240, P273, P301+310, P331, P302+352, P403+253	(1)
Kohlenstoffdioxid (Trockeneis)	124-38-9	-	-	-		P403	-
Methanol	67-56-1	MerckTM	hypergrade for LC-MS		H225, H331, H311, H301, H370	P210, P233, P280, P302+352, P304+340, P308+310, P403+235	(1)
2-Propanol	67-63-0	Honeywell, Riedel-de-HäenTM	LC-MS chroma-solv		H225, H319, H336	P210, P233, P240, P305+351+338, P403+235	(2)



## Anhang

Substanz	CAS-Nummer	Hersteller	Reinheit	Gefahrenpiktogramm	H-Sätze	P-Sätze	Entsorgung[a]
Trichlormethan	67-66-3	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland	≥ 99 % HPLC Grade		H302, H331, H315, H319, H351, H361d, H336, H372	P261, P381, P305+351+338, P311	(1)
Triolein	122-32-7	Sigma-Aldrich®	-		-		(2)
16:0(2S-OH) Ceramide	890041-50-6	Sigma-Aldrich®	-		-		(2)

<sup>[a]</sup>Entsorgungsschlüssel:

- (1) In den Kanister für halogenhaltige organische Lösungsmittel entsorgen.
- (2) In den Kanister für halogenfreie organische Lösungsmittel entsorgen.
- (3) In Wasser lösen und in den Kanister für andere Säuren entsorgen.
- (4) In den Behälter für Gefahrenmüll geben.

## Anhang

Tabelle 55: Übersicht über die verwendeten Kakaoproben (Abkürzungen: konventionell: Konv., sowie unbekannt: Ub).

Nr.	Herkunft	Probenankunft	Erntejahr	Anbauart	Crop/Charge	Sorte	Kontakt	Code
001	Ghana	12.01.2016	2016	Konv.	Maincrop	Ub.	Vollers Group GmbH	16_GH_NA_001_NB_KB
002	Ghana	12.01.2016	2016	Konv.	Maincrop	Ub.	Vollers Group GmbH	16_GH_NA_002_NB_KB
003	Ghana	12.01.2016	2016	Konv.	Maincrop	Ub.	Vollers Group GmbH	16_GH_NA_003_NB_KB
004	Elfenbeinküste	12.01.2016	2016	Konv.	Midcorp	Ub.	Vollers Group GmbH	16_CI_NA_004_NB_KB
005	Elfenbeinküste	12.01.2016	2016	Konv.	Maincrop	Ub.	Vollers Group GmbH	16_CI_NA_005_NB_KB
006	Elfenbeinküste	12.01.2016	2016	Konv.	Maincrop	Ub.	Vollers Group GmbH	16_CI_NA_006_NB_KB
007	Nigeria	12.01.2016	2016	Konv.	Maincrop	Ub.	Vollers Group GmbH	16_NG_NA_007_NB_KB
008	Nigeria	12.01.2016	2016	Konv.	Maincrop	Ub.	Vollers Group GmbH	16_NG_NA_008_NB_KB
009	Nigeria	12.01.2016	2016	Konv.	Maincrop	Ub.	Vollers Group GmbH	16_NG_NA_009_NB_KB
010	Panama	19.01.2016	2016 (Sep/Okt)	Bio	PANBO2410201650	Ub.	Ludwig Weinrich GmbH&Co.KG	16_PA_NA_010_B_KB
011	Kamerun	24.01.2017	2016	Konv.	E9115	Ub.	Quast&Cons. GmbH&Co.KG	16_CM_NA_011_NB_KB
012	Kamerun	24.01.2017	2016	Konv.	E9142	Ub.	Quast&Cons. GmbH&Co.KG	16_CM_NA_012_NB_KB
013	Kamerun	24.01.2017	2016	Konv.	E9138	Ub.	Quast&Cons. GmbH&Co.KG	16_CM_NA_013_NB_KB
014	Indonesien (Java)	24.01.2017	2015	Konv.	#36174	Ub.	Quast&Cons. GmbH&Co.KG	15_ID_NA_014_NB_KB
015	Indonesien (Java)	24.01.2017	2014	Konv.	#35622	Ub.	Quast&Cons. GmbH&Co.KG	14_ID_NA_015_NB_KB
016	Indonesien (Java)	24.01.2017	2011	Konv.	#34191	Ub.	Quast&Cons. GmbH&Co.KG	11_ID_NA_016_NB_KB
017	Ecuador	24.01.2017	2016	Konv.	#81688	Ub.	Quast&Cons. GmbH&Co.KG	16_EC_NA_017_NB_KB
018	Ecuador	24.01.2017	2015	Konv.	#36236	Ub.	Quast&Cons. GmbH&Co.KG	15_EC_NA_018_NB_KB

## Anhang

Nr.	Herkunft	Probenankunft	Erntejahr	Anbauart	Crop/Charge	Sorte	Kontakt	Code
019	Ecuador	24.01.2017	2014	Konv.	#68503	Ub.	Quast&Cons. GmbH&Co.KG	14_EC_NA_019_NB_KB
020	Nigeria	24.01.2017	2012	Konv.	Good Fermented	Ub.	Vollers Group GmbH	12_NG_NA_020_NB_KB
021	Nigeria	24.01.2017	2013/2014	Konv.	Maincrop	Ub.	Vollers Group GmbH	13/14_NG_NA_021_NB_KB
022	Elfenbein- küste	24.01.2017	2013	Konv.	Good Fermented	Ub.	Vollers Group GmbH	13_CI_NA_022_NB_KB
023	Elfenbein- küste	24.01.2017	2012	Konv.	Rainforest Alliance	Ub.	Vollers Group GmbH	12_CI_NA_023_NB_KB
024	Elfenbein- küste	09.03.2017	2016	Konv.		Ub.	Vollers Group GmbH	16_CI_NA_024_NB_KB
025	Ghana	09.03.2017	2016	Konv.		Ub.	Vollers Group GmbH	16_GH_NA_025_NB_KB
026	Elfenbein- küste	09.03.2017	2016	Konv.		Ub.	Schokomann	16_CI_NA_026_NB_GKN
028	Ecuador	09.03.2017	2016	Bio	95593	Ub.	Ludwig Weinrich GmbH&Co.KG	16_EC_NA_028_B_KB
029	Panama	09.03.2017	2016	Bio	PANBO22122016500	Ub.	Ludwig Weinrich GmbH&Co.KG	16_PA_NA_029_B_KB
030	Ghana	27.03.2017	2014/2015	Konv.		Ub.	Lindt & Sprüngli GmbH	14_GH_NA_030_NB_KB
031	Ghana	27.03.2017	2015/2016	Konv.		Ub.	Lindt & Sprüngli GmbH	15_GH_NA_031_NB_KB
032	Ghana	27.03.2017	2016/2017	Konv.		Ub.	Lindt & Sprüngli GmbH	16_GH_NA_032_NB_KB
033	Ecuador	27.03.2017	2014/2015	Konv.		Ub.	Lindt & Sprüngli GmbH	14_EC_NA_033_NB_KB
034	Ecuador	27.03.2017	2015/2016	Konv.		Ub.	Lindt & Sprüngli GmbH	15_EC_NA_034_NB_KB
035	Ecuador	27.03.2017	2016/2017	Konv.		Ub.	Lindt & Sprüngli GmbH	16_EC_NA_035_NB_KB
036	Madagas- kar	27.03.2017	2014/2015	Konv.		Ub.	Lindt & Sprüngli GmbH	14_MG_NA_036_NB_KB
037	Madagas- kar	27.03.2017	2015/2016	Konv.		Ub.	Lindt & Sprüngli GmbH	15_MG_NA_037_NB_KB
038	Madagas- kar	27.03.2017	2016/2017	Konv.		Ub.	Lindt & Sprüngli GmbH	16_MG_NA_038_NB_KB

## Anhang

Nr.	Herkunft	Probenankunft	Erntejahr	Anbauart	Crop/Charge	Sorte	Kontakt	Code
039	Ecuador	11.04.2017	2015/2016	Konv.		Edelroh-kakao Arriba ASS	KESSKO Kessler&Comp GmbH&Co.KG	15/16_EC_AR_039_NB_KB
040	Ecuador	11.04.2017	2016	Bio		Ub.	KESSKO Kessler&Comp GmbH&Co.KG	17_EC_NA_040_B_KB
041	Indonesien (Java)	11.04.2017	2016	Konv.		Criollo	KESSKO Kessler&Comp GmbH&Co.KG	17_ID_CR_041_NB_KB
042	West-Af-rika	11.04.2017	2016	Konv.		Forastero	KESSKO Kessler&Comp GmbH&Co.KG	17_WA_FO_042_NB_KB
043	Panama	24.04.2017	2016/2017	Bio	Panbo 24012017500	Ub.	Ludwig Weinrich GmbH & Co. KG	17_PA_NA_043_B_KB
044	Sao Tome	24.04.2017	2017	Bio	2510359 Charge 3/16/125	Ub.	Ludwig Weinrich GmbH & Co. KG	17_ST_NA_044_B_KB
045	Kamerun	24.04.2017	2016	Konv.	2410378 Charge 3/17/017	Ub.	Ludwig Weinrich GmbH & Co. KG	16_CM_NA_045_NB_KB
046	Ecuador	24.04.2017	2016	Konv.	Partie Nr. 61791	Arriba	Lubeca v. Minden&Bruhns GmbH&Co.KG	16_EC_AR_046_NB_KB
047	Peru	24.04.2017	2016	Bio	Partie Nr. 63402	u.a. ICS 95, Chun- cho, IMC 67, CCN51	Lubeca v. Minden&Bruhns GmbH&Co.KG	16_PE_NA_047_B_KB
048	Venezuela	24.04.2017	2016	Konv.	Partie Nr. 62317	Rio Caribe	Lubeca v. Minden&Bruhns GmbH&Co.KG	16_VE_NA_048_NB_KB
049	Peru	10.07.2017	2014	Konv.	F-065	ICS 1, ICS 6, ICS 39, ICS 95, TSH 565	Rausch	14_PE_NA_049_NB_KB
050	Venezuela	10.07.2017	2014	Konv.	D-97-2	Ub.	Rausch	14_VE_NA_050_NB_KB
051	Peru	10.07.2017	2013	Konv.	F-114	Ub.	Rausch	13_PE_NA_051_NB_KB
052	Costa Rica	10.07.2017	2015	Konv.	E-077	ICS 95 (T1), CC137, Pmct 58,	Rausch	15_CR_NA_052_NB_KB

## Anhang

Nr.	Herkunft	Probenankunft	Erntejahr	Anbauart	Crop/Charge	Sorte	Kontakt	Code
						Cartie R1+R4+R6		
053	Bolivien	10.07.2017	2016	Konv.	AD-001	Ub.	Rausch	16_BO_NA_053_NB_KB
054	Ghana	14.07.2017	2016/2017	Konv.		Ub.	Hans Riegelein	16_GH_NA_054_NB_KB
055	Elfenbein- küste	14.07.2017	2016/2017	Konv.		Ub.	Hans Riegelein	16_CI_NA_055_NB_KB
056	Nigeria	14.07.2017	2016/2017	Konv.		Ub.	Hans Riegelein	16_NG_NA_056_NB_KB
057	Peru	14.07.2017	2016/2017	Konv.		Ub.	Hans Riegelein	16_PE_NA_057_NB_KB
058	Nigeria	13.09.2017	k.a.	Konv.		Ub.	Hans Riegelein	k.A._NG_NA_058_NB_KB
059	Elfenbein- küste	13.09.2017	k.a.	Konv.		Ub.	Hans Riegelein	k.A._CI_NA_059_NB_KB
060	Peru	13.09.2017	k.a.	Konv.		Ub.	Hans Riegelein	k.A._PE_NA_060_NB_KB
061	Sierra Le- one	13.09.2017	k.a.	Konv.		Ub.	Hans Riegelein	k.A._SL_NA_061_NB_KB
062	Domeni- kanische Republik	13.09.2017	2017	Konv.		Ub.	Kessko	k.A._DO_NA_062_NB_KB
063	Domeni- kanische Republik	13.09.2017	2017	Konv.		Ub.	Kessko	k.A._DO_NA_063_NB_GKN
064	Domeni- kanische Republik	13.09.2017	2017	Konv.		Ub.	Kessko	k.A._DO_NA_064_NB_KM
070	Panama	04.10.2017	2017	Bio	Kakaonibs Größe 1	Ub.	Ludwig Weinrich GmbH & Co. KG	17_PA_NA_070_B_GKN
071	Panama	04.10.2017	2017	Bio	Kakaonibs Größe 2	Ub.	Ludwig Weinrich GmbH & Co. KG	17_PA_NA_071_B_GKN
072	Panama	04.10.2017	2017	Bio	Kakaonibs Größe 3	Ub.	Ludwig Weinrich GmbH & Co. KG	17_PA_NA_072_B_GKN
073	Panama	04.10.2017	2017	Bio	Kakaomasse	Ub.	Ludwig Weinrich GmbH & Co. KG	17_PA_NA_073_B_KM

## Anhang

Nr.	Herkunft	Probenankunft	Erntejahr	Anbauart	Crop/Charge	Sorte	Kontakt	Code
077	Westafrika	06.10.2017	2017	Konv.	Kakaonibs	Ub.	Storck	17_WA_NA_077_NB_GKN
078	Westafrika	06.10.2017	2017	Konv.	Kakaomasse	Ub.	Storck	17_WA_NA_078_NB_KM
079	Westafrika	06.10.2017	2017	Konv.	Edelrahm-Schokolade	Ub.	Storck	17_WA_NA_079_NB_S
080	Ecuador	22.12.2017	2017	Ub.	Kakaomasse ECL 088/17	Edelroh- kakao Arriba	Hans Riegelein	17_EC_AR_080_NB_KM
081	Ecuador	22.12.2017	k.a.	Ub.	Kakaomasse 131723101	Edelroh- kakao Arriba	Hans Riegelein	k.A._EC_AR_081_NB_KM
082	Westafrika	22.12.2017	k.a.	Ub.	Kakaomasse 01174692	Ub.	Hans Riegelein	k.A._WA_NA_082_NB_KM
083	Ecuador	22.12.2017	k.a.	Ub.	Kakaomasse 131174101	Edelroh- kakao Arriba	Hans Riegelein	k.A._EC_AR_083_NB_KM
084	Ecuador	22.12.2017	k.a.	Ub.	Kakaomasse 131745101	Edelroh- kakao Arriba	Hans Riegelein	k.A._EC_AR_084_NB_KM
085	Mischung	22.12.2017	k.a.	Ub.	Kakaomasse KAA2+2(8)041017	Ub.	Hans Riegelein	17_Mi- schung_NA_085_NB_KM
086	Mischung	22.12.2017	k.a.	Ub.	Kakaomasse KAA2+2(8)041017	Ub.	Hans Riegelein	17_Mi- schung_NA_086_NB_KM
*NF3	Panama	30.05.2017	2017	Konv.		Ub.	Ludwig Weinrich GmbH & Co. KG	17_PA_NA_NF03_NB_KB
*NF 9	Panama	30.05.2017	2017	Konv.		Ub.	Ludwig Weinrich GmbH & Co. KG	17_PA_NA_NF09_NB_KB
*NF12	Panama	30.05.2017	2017	Konv.		Ub.	Ludwig Weinrich GmbH & Co. KG	17_PA_NA_NF12_NB_KB

\*Nicht fermentierte Kakaobohnen

## 8.3 Informationen zur Probenvorbereitung und Extraktion

Tabelle 56: Verwendete Abkürzungen im Barcodesystem.

Herkunft		Anbauart	
Land	Kürzel	Anbauart	Kürzel
Ecuador	EC	Biologischer Anbau	Bio
Elfenbeinküste	CI	Konventioneller Anbau	NB
Ghana	GH	Probenform	
Indonesien	ID	Form	Kürzel
Kamerun	CM	Kakaobohnen	KB
Madagaskar	MG	Kakaomasse	KM
Nigeria	NG	Kakaoschale	KS
Panama	PA	Geröstete Kakaonibs	GKN
Peru	PE	Schokolade	S
Sao Tome	ST	Sorte	
Venezuela	VE	Sorte	Kürzel
West-Afrika	WA	Unbekannt	NA
		Arriba	AR
		Criollo	CR
		Forastero	FO

Tabelle 57: Mahlprogramme der Messermühle für die Homogenisierung von Kakaokern und Kakaoschale.

		Segemente	Dauer t [s]	Umdrehung U [rpm]
		Kakaokerne	Kakaoschalen und Keimwurzeln	1
2 (Pause)	5			0
3	30			4000
4 (Pause)	5			0
5	30			4000
6 (Pause)	5			0
7	30			4000
8 (Pause)	5			0
9	30			4000
10 (Pause)	5			0
11	20			1000
12 (Pause)	5			0
13	30			4000
14 (Pause)	5			0
15	30			4000
16 (Pause)	5			0
17	30			4000
18 (Pause)	5			0
19	30			4000

Ergebnisse der Analyse von Kakaoschalen- und Kakaokernproben mittels NTNP Methode im negativen Ionenmodus.

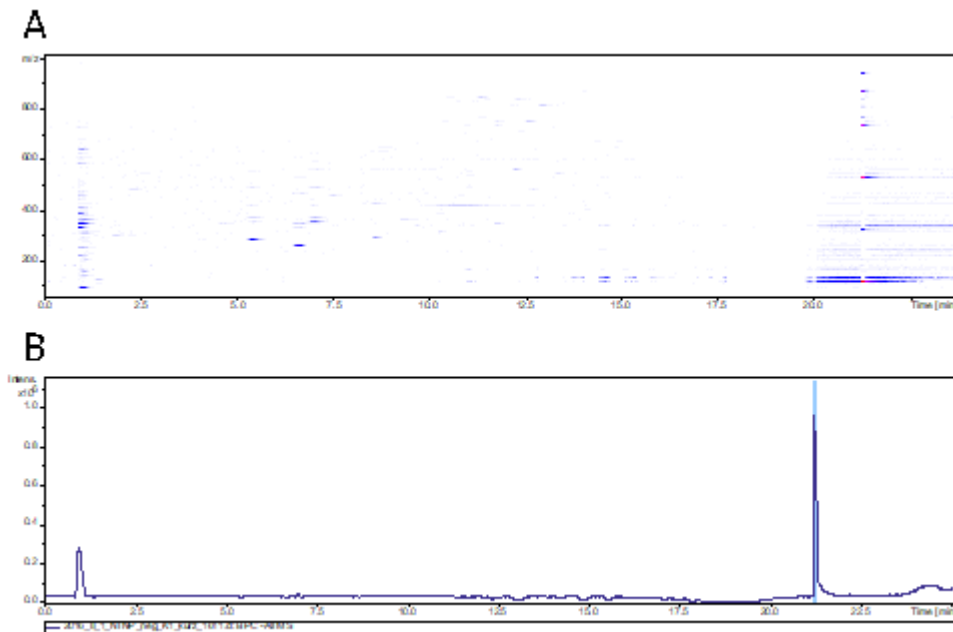


Abbildung 67: Survey View (A) und Base Peak Chromatogramm (B) einer Kakaokernprobe analysiert mittels NTNP negativ Methode.

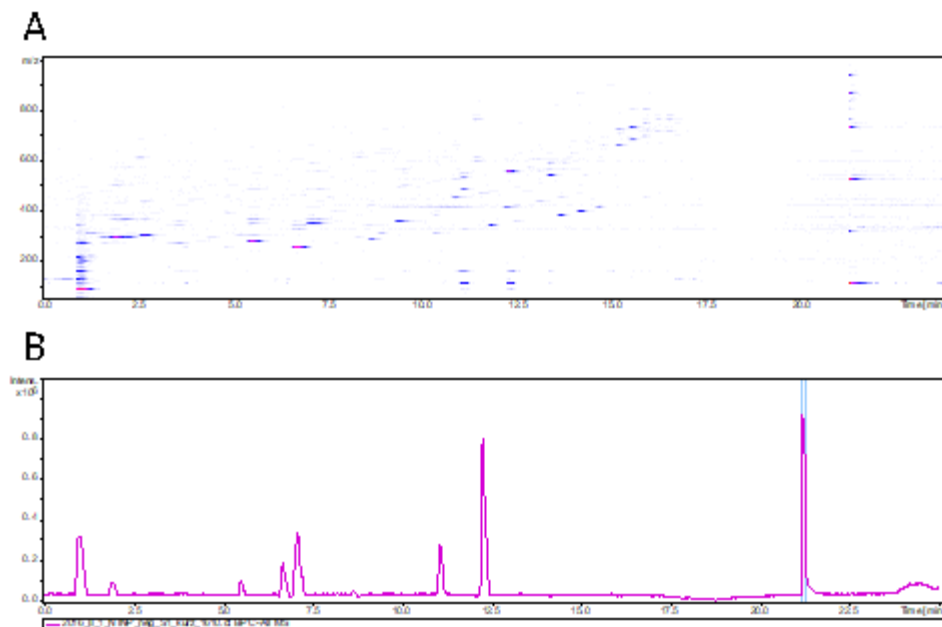


Abbildung 68: Survey View (A) und Base Peak Chromatogramm (B) einer Kakaoschalenprobe analysiert mittels NTNP negativ Methode.



## 8.4 Software Einstellungen

Tabelle 58: Verwendete Einstellungen der Software DataAnalysis 4.1.

		NTP neg	NTP pos	NTNP pos
<b>Find Molecular Features</b>				
Compound detection	S/N threshold	s.: Tabelle 59		
	Correlation coefficient treshold			
	Minimum compound lenght			
	Smoothing width			
	Additional smoothing	ausgewählt	ausgewählt	ausgewählt
Chemistry	Adducts	Negative: [M-H] <sup>-</sup> [M-H <sub>2</sub> O-H] [M+Na-H <sub>2</sub> ] [M+K-H <sub>2</sub> ] [M+Cl] [M+HCOOH-H] <sup>-</sup> [M+CH <sub>3</sub> COOH-H] <sup>-</sup>	Positive: [M+H] <sup>+</sup> [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> [M+Na] <sup>+</sup> [M+K] <sup>+</sup> [M+H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup> [M+CO <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup> [M+NH <sub>3</sub> +H] <sup>+</sup> [M+CH <sub>3</sub> OH+H] <sup>+</sup>	Positive: [M+H] <sup>+</sup> [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> [M+Na] <sup>+</sup> [M+K] <sup>+</sup> [M+H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup> [M+CO <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup> [M+NH <sub>3</sub> +H] <sup>+</sup> [M+CH <sub>3</sub> OH+H] <sup>+</sup>
	Proteomics, CHNO	ausgewählt	ausgewählt	ausgewählt
Mass spectrum calculation	Spectrum type	Auto	Auto	Auto
	Background subtraction	Spectral	Spectral	Spectral
	Mass List peak finder	-	-	Sum Peak
	Add fragment spectra	nicht ausgewählt	nicht ausgewählt	nicht ausgewählt
<b>Calibration</b>				
Internal calibration	Calibration group	<Method>	<Method>	<Method>
	Calibration list	Natriumformiat (negativ)	Natriumformiat (positiv)	Natriumformiat (positiv)
	Mode	Enhanced Quadratic	Enhanced Quadratic	Enhanced Quadratic
	Search range (m/z)	0,5	0,5	0,5
	Intensity treshold	1000	1000	1000
Automatic internal Calibration	Start [min]	16,0	16,0	21,1
	End [min]	17,0	17,0	21,4
	Spectrum type	Auto	Auto	Auto

Tabelle 59: Einstellungen für das Compound detection der Software DataAnalysis 4.1.

Analysenschritt	Polarität	Modus	S/N threshold	Correlation coefficient threshold	Smoothing width	minimum compound length
Methodenoptimierungen	polar	pos	2	0,7	6	3
		neg	3	0,7	8	3
	un-polar	pos	4	0,7	8	3
Extraktionsmittel	polar	pos	2	0,7	6	3
		neg	3	0,7	8	3
	un-polar	pos	4	0,7	8	3
Additiv	un-polar	pos	5	0,7	8	3
	polar	pos	2	0,7	6	3
		neg	3	0,7	8	3
MS-Parameter	polar	pos	2	0,7	6	3
		neg	3	0,7	8	3
	un-polar	pos	3	0,7	4	3
Röstreihe	polar	pos	2	0,7	6	3
		neg	3	0,7	8	3
	un-polar	pos	3	0,7	4	3
Herkunftsproben	polar	pos	2	0,7	6	3
		neg	3	0,7	8	3
	un-polar	pos	3	0,7	4	3

## Anhang

Tabelle 60: Einstellungen zur Berechnung einer *bucket*-Liste der Software ProfileAnalysis 2.1.

Method	Parameter	Positiver Ionenmodus	Negativer Ionenmodus
General	Data selection and processing	Find Molecular Features	Find Molecular Features
	Spectrum type	Line	Line
	Spectrum polarity	Positive	negative
	Spectral background subtraction	ausgewählt	ausgewählt
	Perform MS recalibration	nicht ausgewählt	nicht ausgewählt
	Use time alignment	ausgewählt	ausgewählt
Find Molecular Features	Mode	Load from previous processing without parameter checking	Load from previous processing without parameter checking
	<i>bucketing</i> basis	Maximum isotope	Maximum isotope
<i>bucket</i> Generation	Retention time Start [min]	0,01667	0,01667
	Retention time End [min]	20	20
	Mass range Start ( <i>m/z</i> )	1	1
	Mass range End ( <i>m/z</i> )	1200	1200
	Rectangular <i>bucketing</i>	nicht ausgewählt	nicht ausgewählt
	Advanced <i>bucketing</i>	ausgewählt	ausgewählt
	Time width [min]	0,5	0,5
	Mass width [ppm]	5	5
<i>bucket</i> Generation	<i>Get parameters from time alignment</i>	nicht ausgewählt	nicht ausgewählt
	<i>Split bucket with multiple compounds</i>	ausgewählt	ausgewählt
	Normalization	Sum of <i>bucket</i> values in analysis	
	Value count of <i>Bucket</i>	Diese Einstellungen sind abhängig von der verfolgten Fragestellung und sind für jedes PCA-Modell in der Bildunterschrift in Form ( _//_ ) angegeben.	
	Value count of group attribute within <i>Bucket</i>		
	Allow empty group attributes	ausgewählt	ausgewählt
	Missing values substitution	Average <i>bucket</i> value of group attribute	Average <i>bucket</i> value of group attribute
	<i>bucket</i> value transformation	None	None
	Display <i>bucket</i> values in table	ausgewählt	ausgewählt
PCA-Modell	Scaling algorithm	Level	Level
	Confidence Level	95 %	95 %

Tabelle 61: Einstellungen zur Erstellung einer Integrationsmethode mit der Software QuantAnalysis 2.1.

	Parameter	Einstellung
General	Default Injection Volume	5
	Accuracy limit [%]	20
	Apply dilution factor to ISTD compounds	nicht ausgewählt
	Load mass calibration from DataAnalysis results	ausgewählt
Chromatograms Traces	Type	Extracted Ion Chromatogram
	Filter	All (MS and MSn)
	Masses	Eintragen der bekannten $m/z$
	Width	$\pm 0,5$
	Polarity	both
	Smth Width (Gauss[s])	1
	Cycles	1
ISTD Compounds	Nicht verwendet	
Target Compounds	Name	$m/z$ der Verbindung
	CAS No.	nichts eingetragen
	Chrom.	zugehöriges EIC ausgewählt
	ISTD	<None>
	Retention time [min]	Retentionszeit der Verbindung
	Window [min]	0,5
	Concentration units	nichts eingetragen
Integration Parameters	Apply to all chromatograms	nicht ausgewählt
	Algorithm	Version 2.1
	S/N threshold	1
	Area threshold	Relative; 0,1
	Intensity threshold	Relative; 0,1
	Skim ratio	0,1
	Smoothing width	1
	Width	Use actual width of peak

8.5 Optimierung der *non-targeted* Methoden

## 8.5.1 Optimierung der LC-Methode

## 8.5.1.1 NTNP Methode

## 8.5.1.1.1 Laufmittel

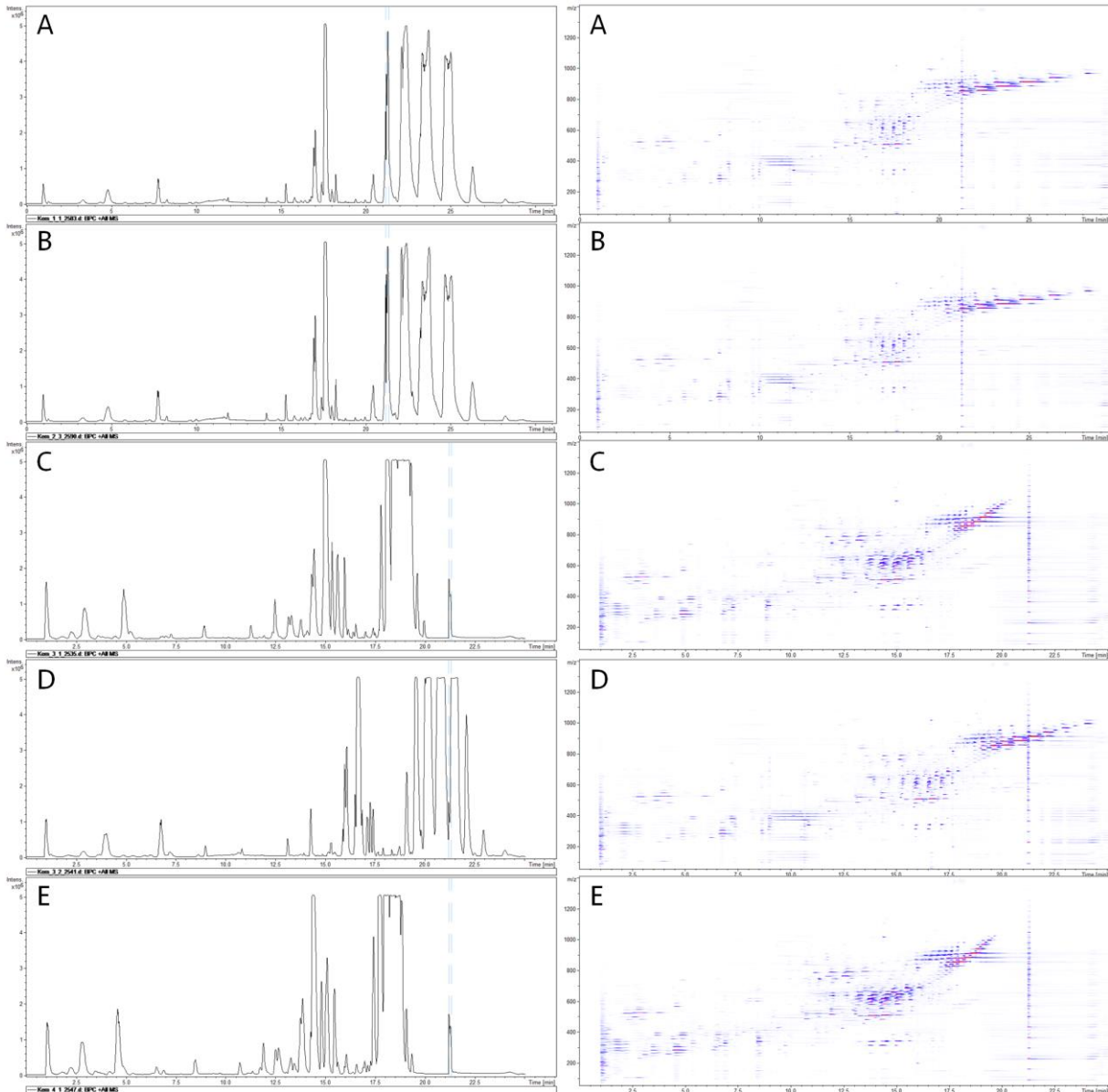


Abbildung 69: Analytierte Kakaokernproben mit unterschiedlichen Anteilen von Isopropanol und Acetonitril im Eluenten B (A: Isopropanol/Acetonitril: 1/1 v/v; B: Isopropanol/Acetonitril: 2/3 v/v; C: Isopropanol/Acetonitril: 3/1 v/v; D: Isopropanol/Acetonitril: 3/2 v/v; E: Isopropanol/Acetonitril: 4/1 v/v).

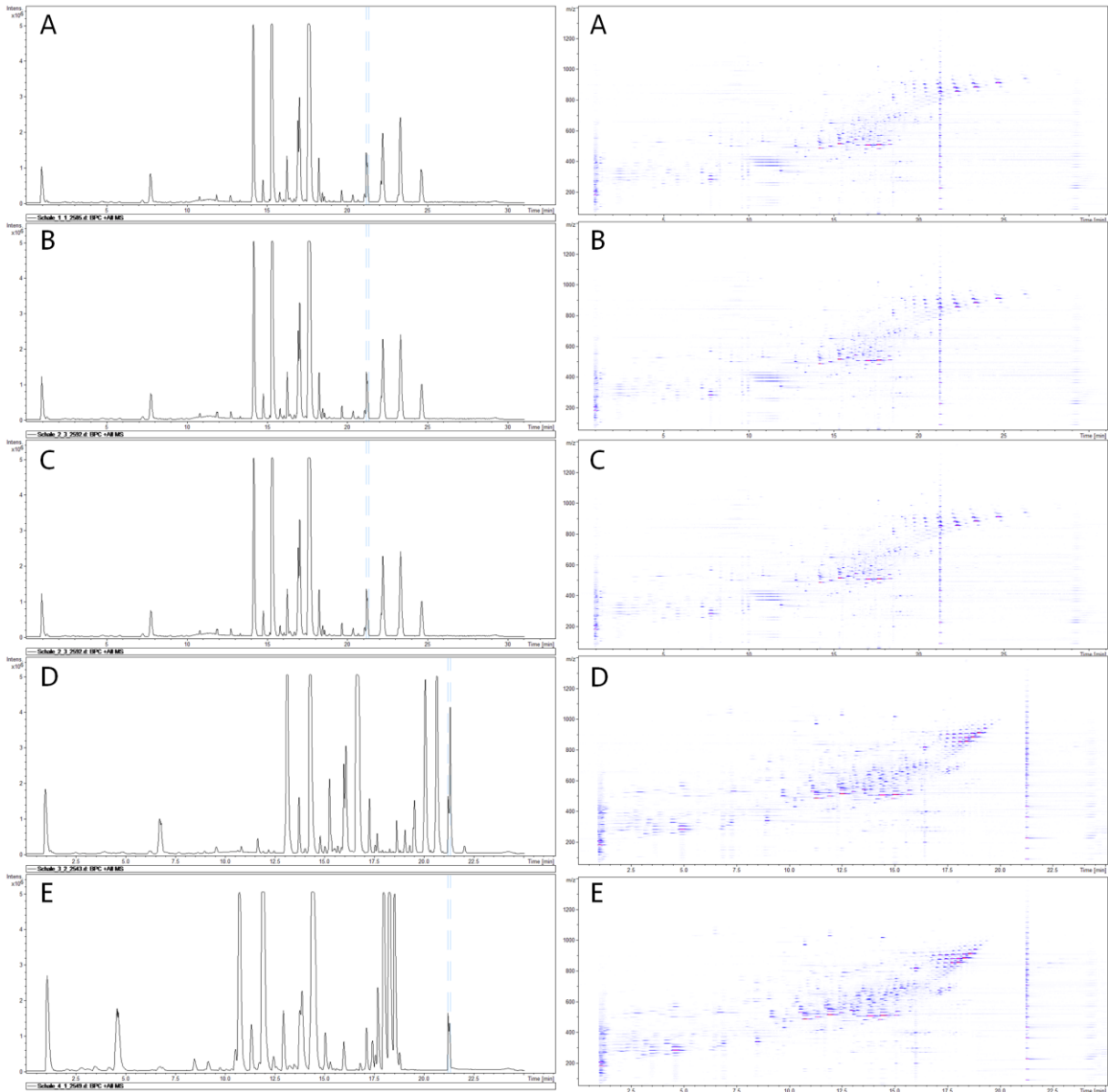


Abbildung 70: Analytierte Kakaoschalenproben mit unterschiedlichen Anteilen von Isopropanol und Acetonitril im Eluenten B (A: Isopropanol/Acetonitril: 1/1 v/v; B: Isopropanol/Acetonitril: 2/3 v/v; C: Isopropanol/Acetonitril: 3/1 v/v; D: Isopropanol/Acetonitril: 3/2 v/v; E: Isopropanol/Acetonitril: 4/1 v/v).

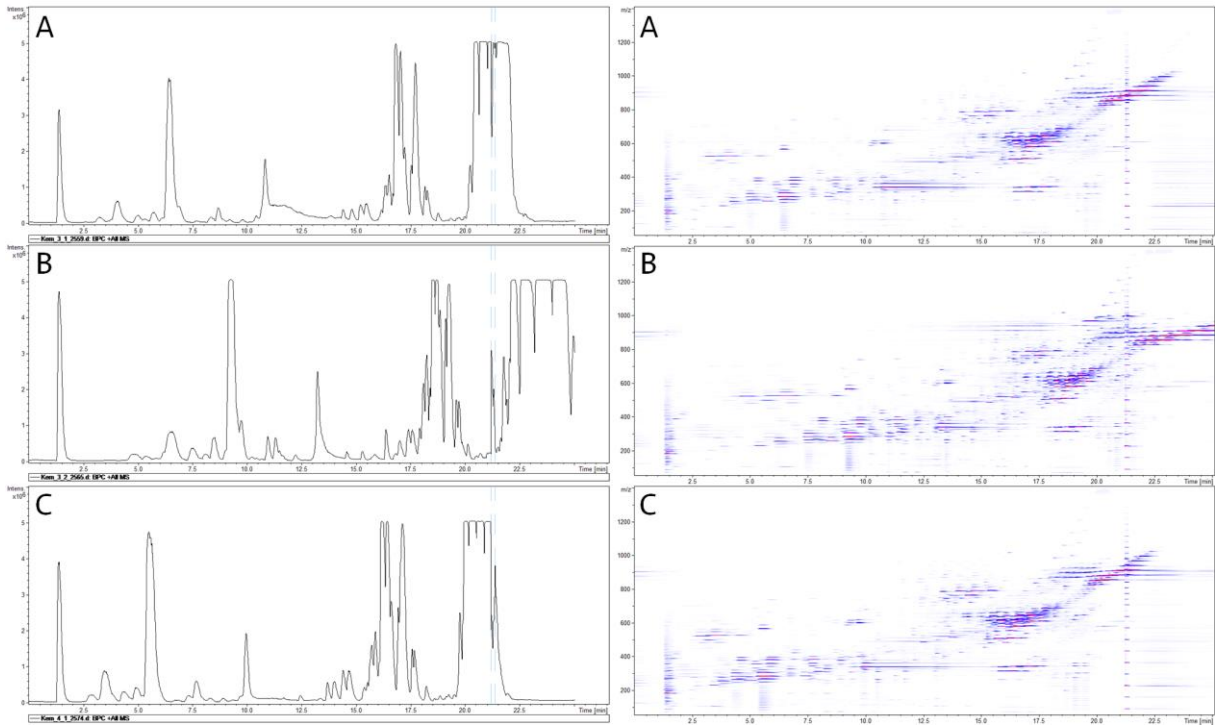


Abbildung 71: Analytierte Kakaokernproben mit unterschiedlichen Anteilen von Isopropanol und Methanol im Eluenten B (A: Isopropanol/Methanol: 3/1 v/v; B: Isopropanol/Methanol: 3/2 v/v; C: Isopropanol/Methanol: 4/1 v/v).

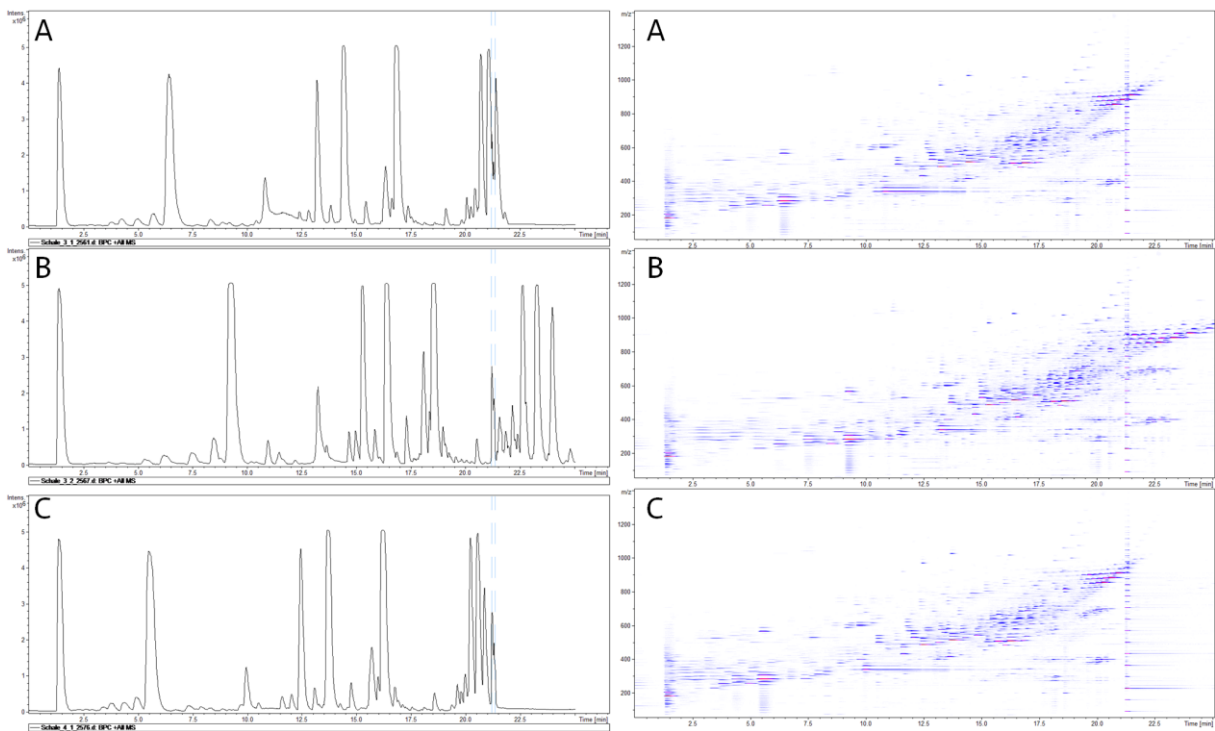


Abbildung 72: Analytierte Kakaoschalenproben mit unterschiedlichen Anteilen von Isopropanol und Methanol im Eluenten B (A: Isopropanol/Methanol: 3/1 v/v; B: Isopropanol/Methanol: 3/2 v/v; C: Isopropanol/Methanol: 4/1 v/v).

8.5.1.1.2 Laufmitteladditiv

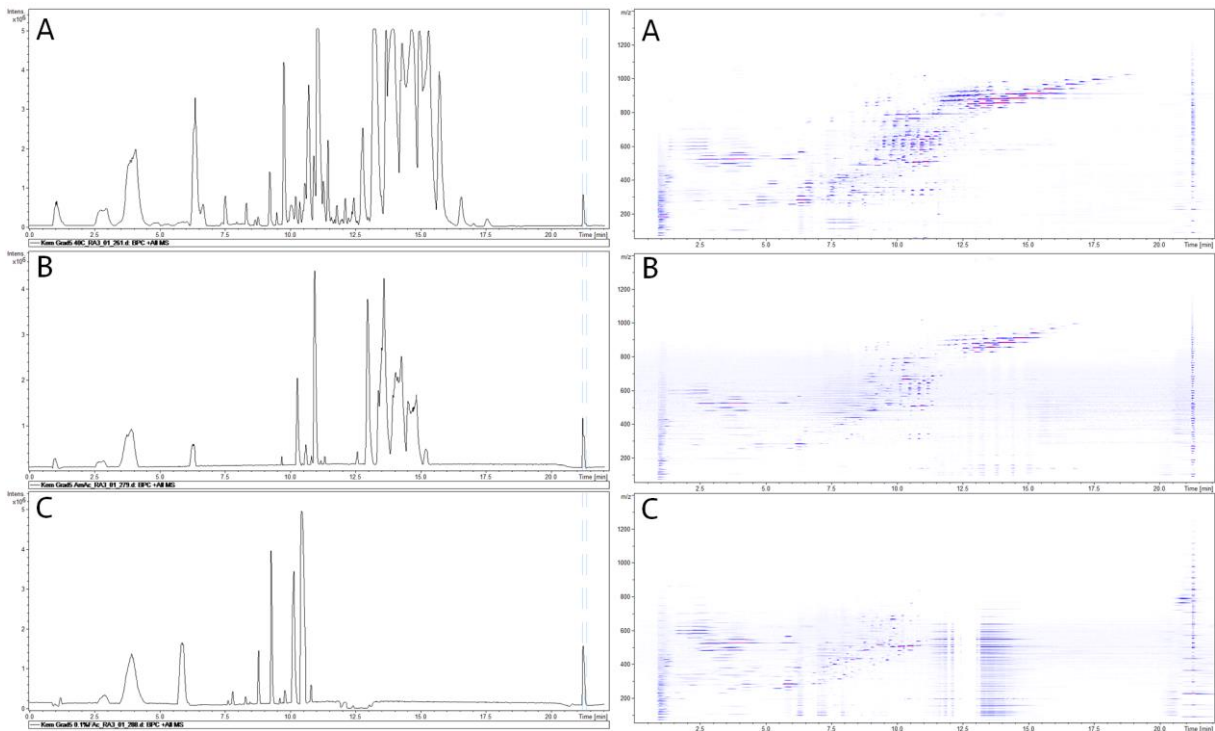


Abbildung 73: Analytierte Kakaokernproben mit unterschiedlichen Laufmitteladditiven (A: 10 mM AF; B: 10 mM AAC; C: 0,1% FA).

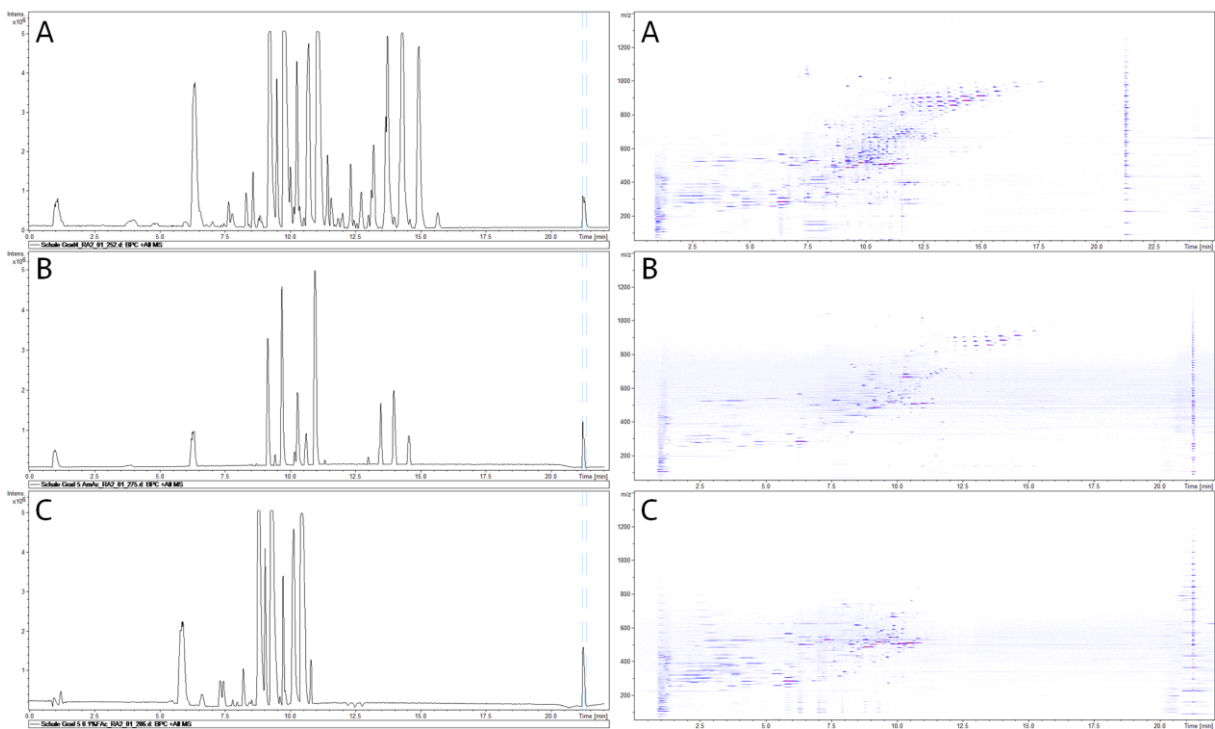


Abbildung 74: Analytierte Kakaoschalenproben mit unterschiedlichen Laufmitteladditiven (A: 10 mM AF; B: 10 mM AAC; C: 0,1% FA).



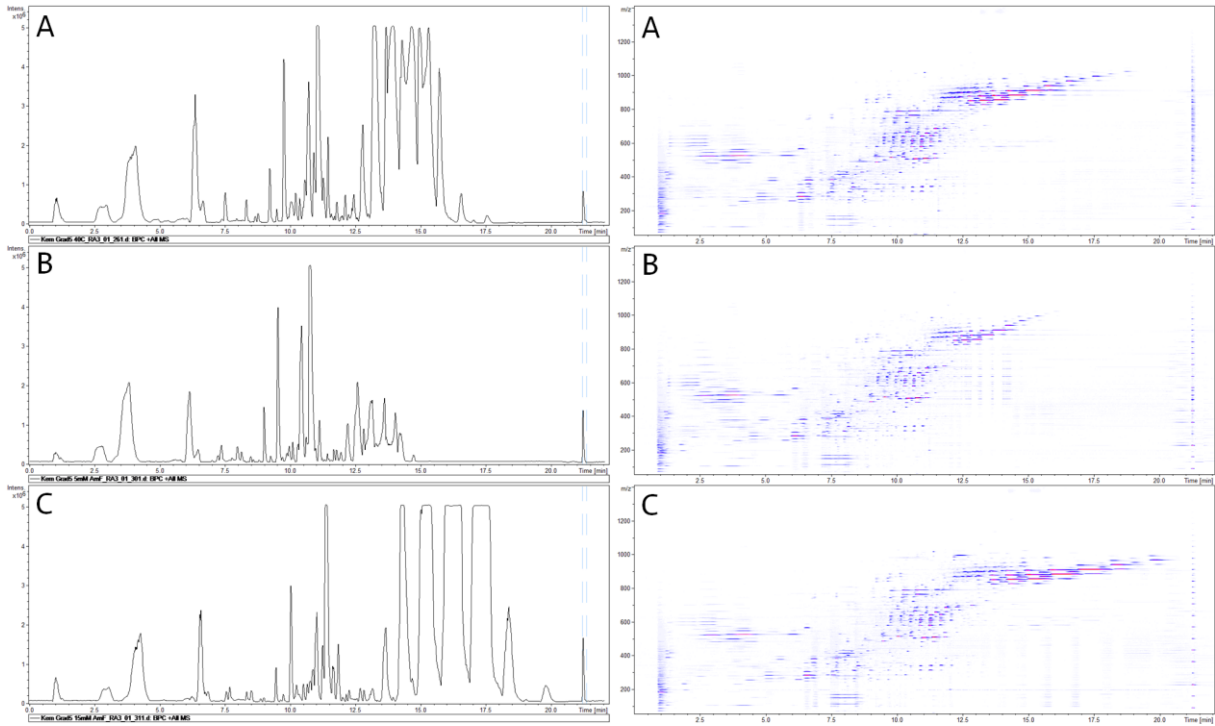


Abbildung 75: Analytierte Kakaokernproben mit unterschiedlichen AF-Konzentrationen im Elutionsmittel (A: 10 mM AF; B: 5 mM AF; C: 15 mM AF).

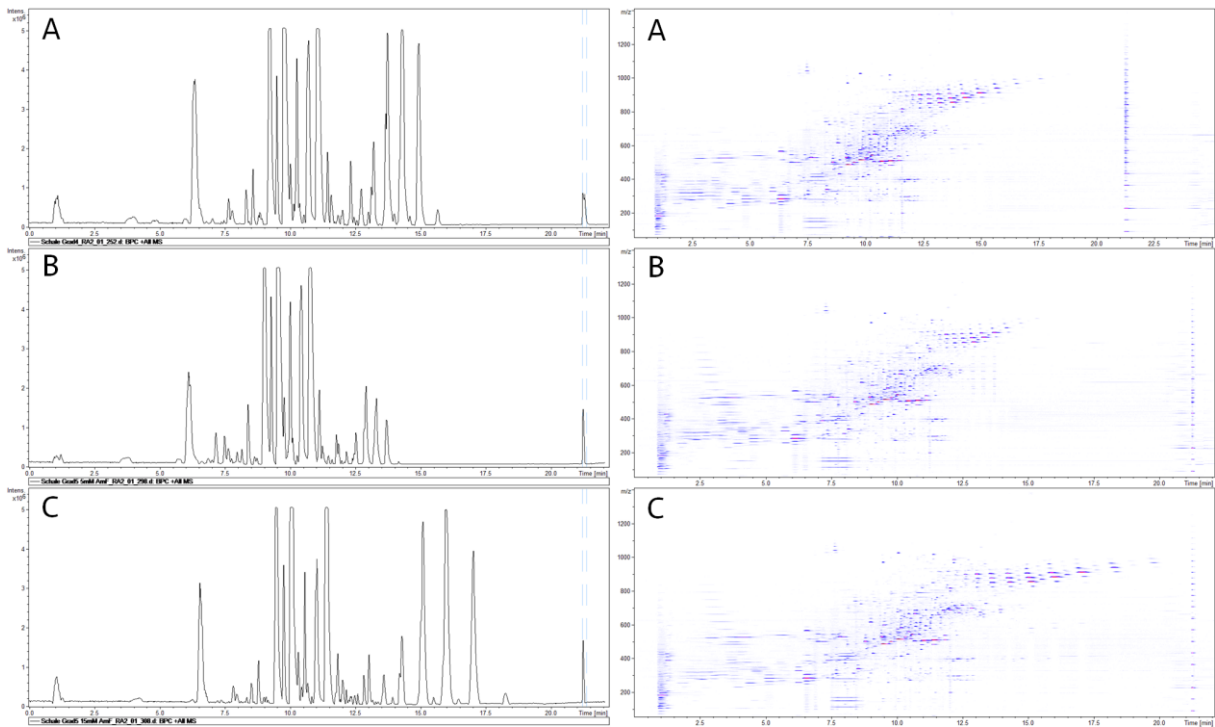


Abbildung 76: Analytierte Kakaokernproben mit unterschiedlichen AF-Konzentrationen im Elutionsmittel (A: 10 mM AF; B: 5 mM AF; C: 15 mM AF).

## 8.5.1.13 Gradient

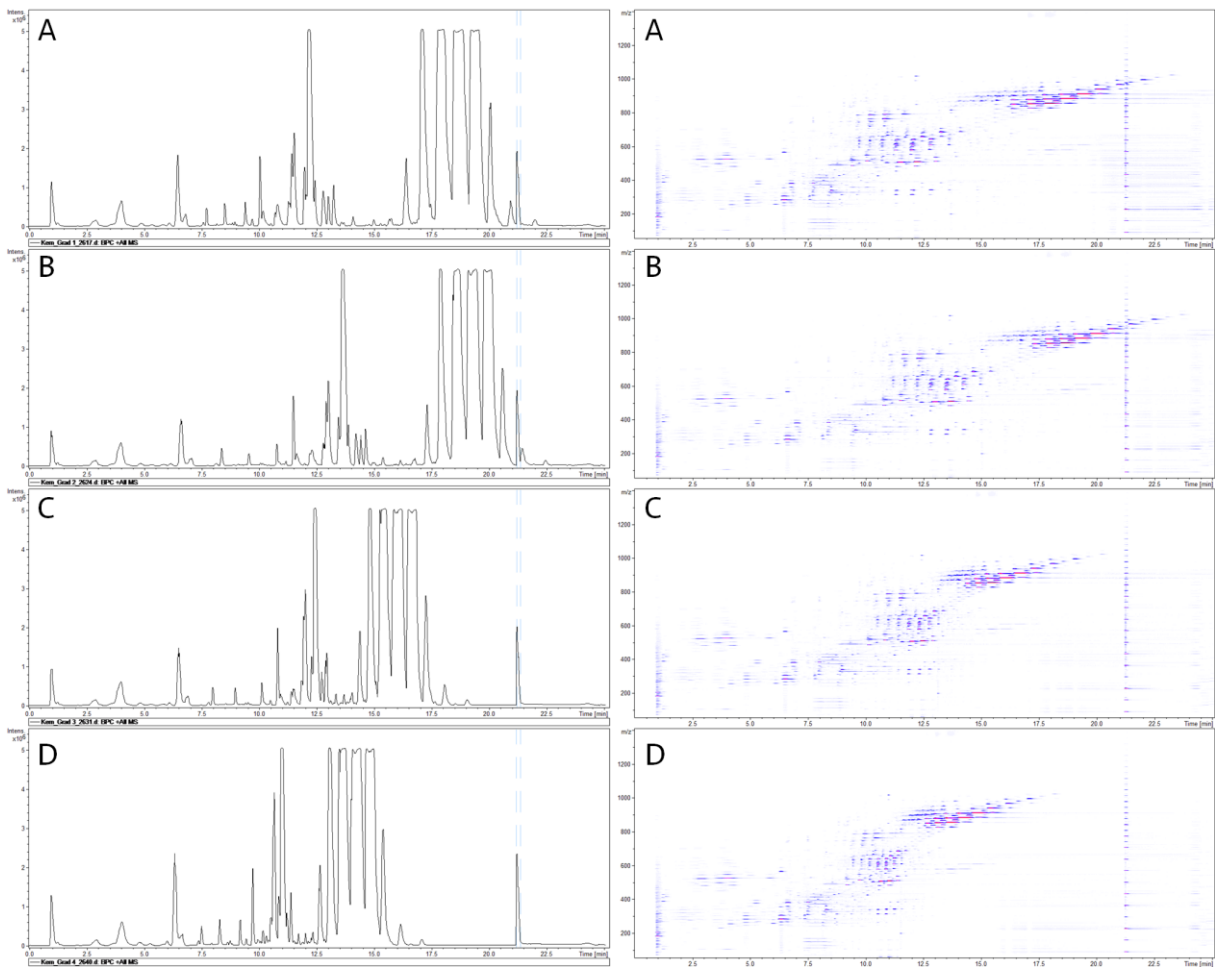


Abbildung 77: Analytierte Kakaokernproben mittels unterschiedlicher Gradienten (A: Gradient 1; B: Gradient 2; C: Gradient 3; D: Gradient 4).

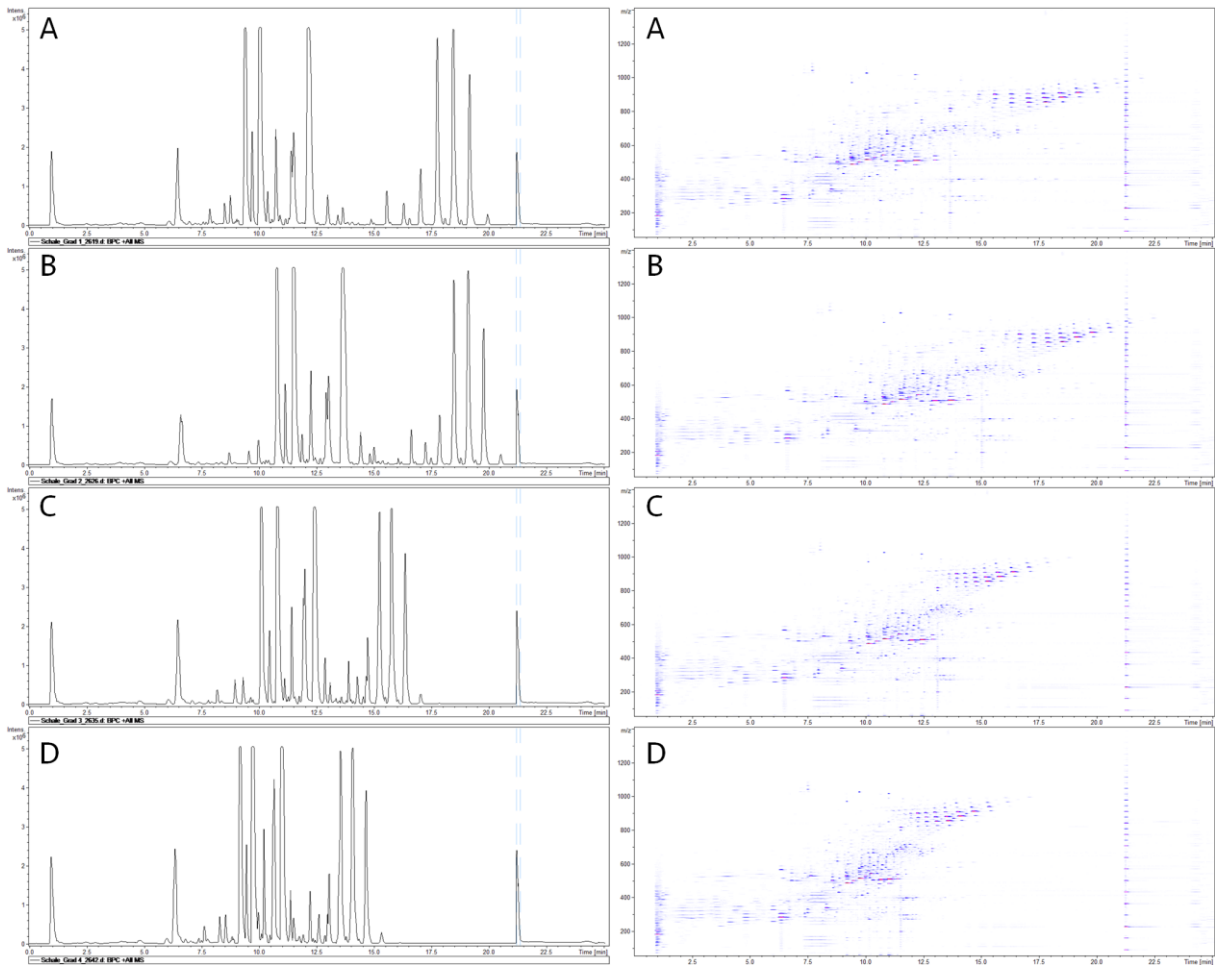


Abbildung 78: Analytierte Kakaoschalenproben mittels unterschiedlicher Gradienten (A: Gradient 1; B: Gradient 2; C: Gradient 3; D: Gradient 4).

8.5.1.2 NTP Methoden

8.5.1.2.1 Laufmittel

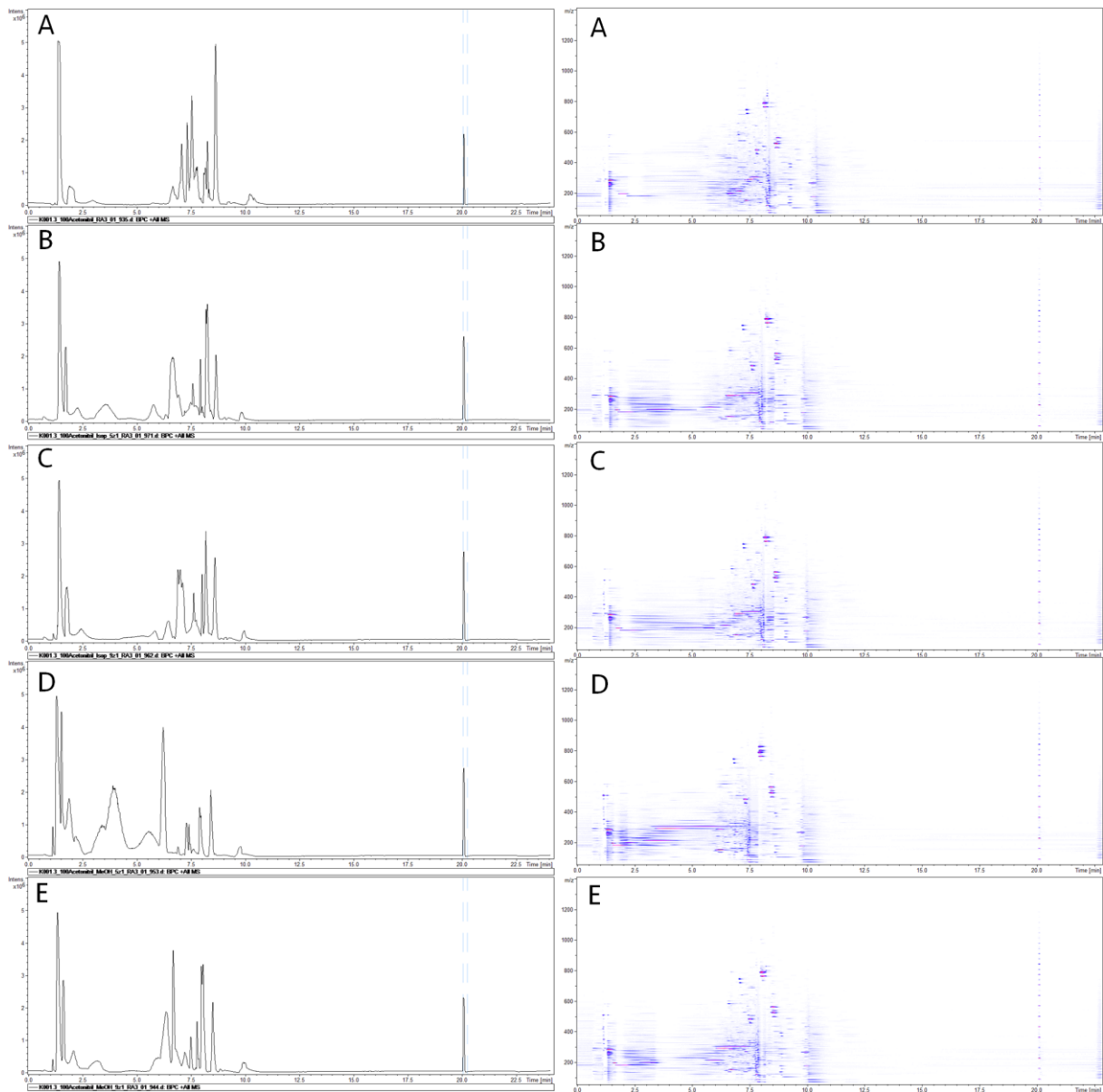


Abbildung 79: Analyzierte Kakaokernproben im positiven Ionenmodus mit unterschiedlichen Anteilen von Acetonitril, Methanol und Isopropanol im Eluenten B (A: Acetonitril; B: Acetonitril/Isopropanol 5/1, v/v; C: Acetonitril/Isopropanol 9/1, v/v; D: Acetonitril/Methanol 5/1, v/v; E: Acetonitril/Methanol 9/1, v/v).

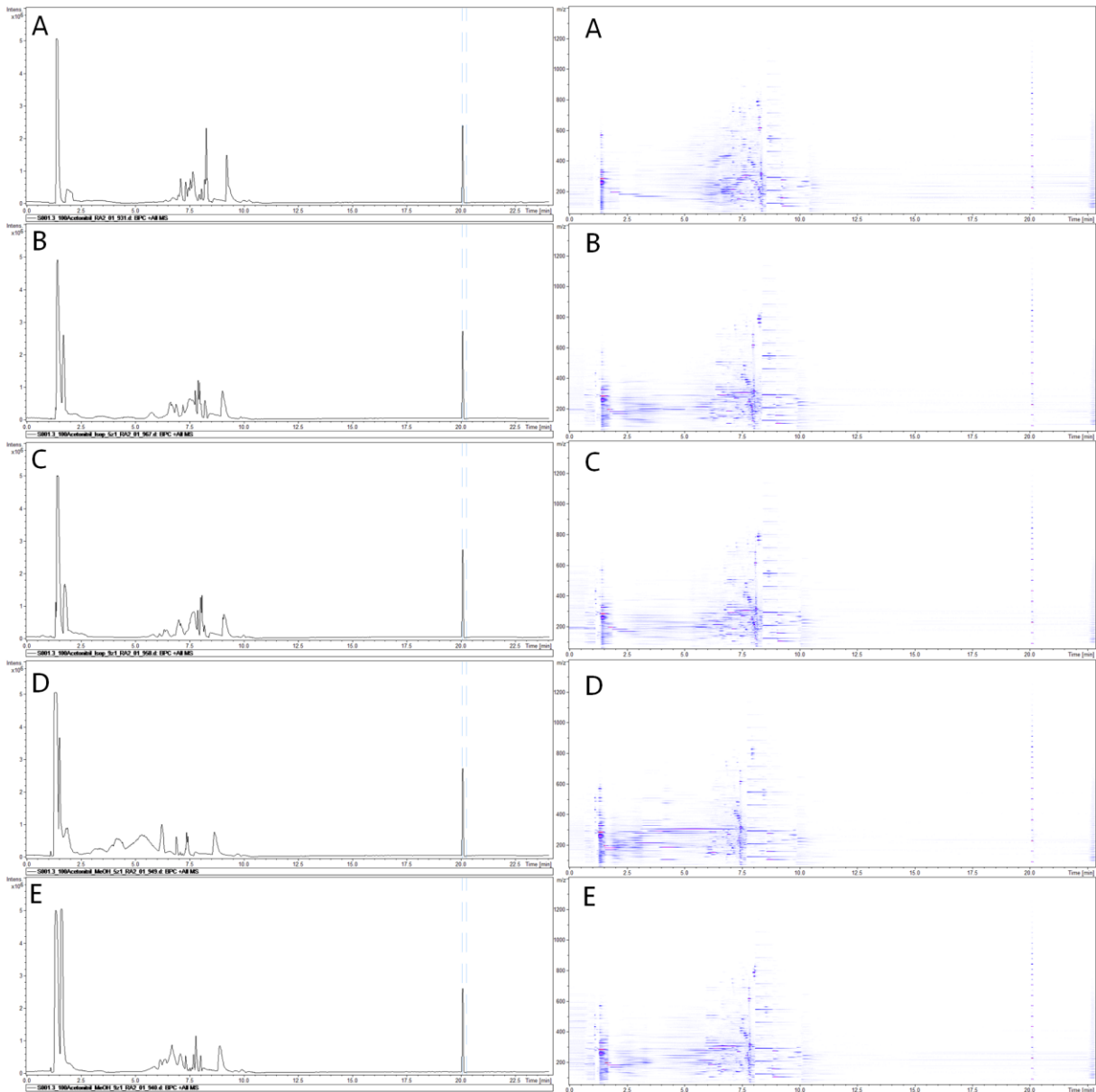


Abbildung 80: Analytierte Kakaoschalenproben im positiven Ionenmodus mit unterschiedlichen Anteilen von Acetonitril, Methanol und Isopropanol im Eluenten B (A: Acetonitril; B: Acetonitril/Isopropanol 5/1, v/v; C: Acetonitril/Isopropanol 9/1, v/v; D: Acetonitril/Methanol 5/1, v/v; E: Acetonitril/Methanol 9/1, v/v).

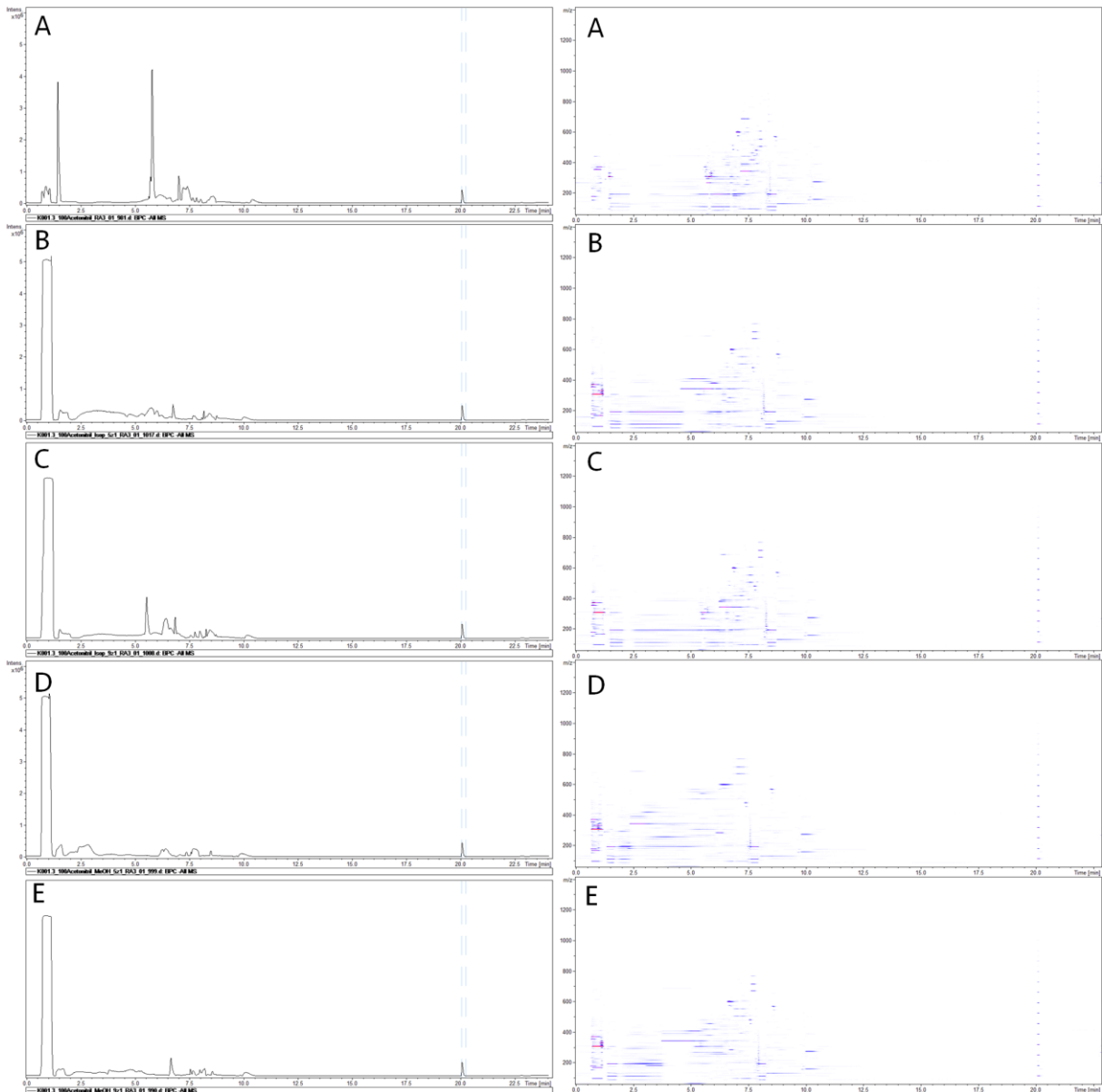


Abbildung 81: Analytierte Kakaokernproben im negativen Ionenmodus mit unterschiedlichen Anteilen von Acetonitril, Methanol und Isopropanol im Eluenten B (A: Acetonitril; B: Acetonitril/Isopropanol 5/1, v/v; C: Acetonitril/Isopropanol 9/1, v/v; D: Acetonitril/Methanol 5/1, v/v; E: Acetonitril/Methanol 9/1, v/v).

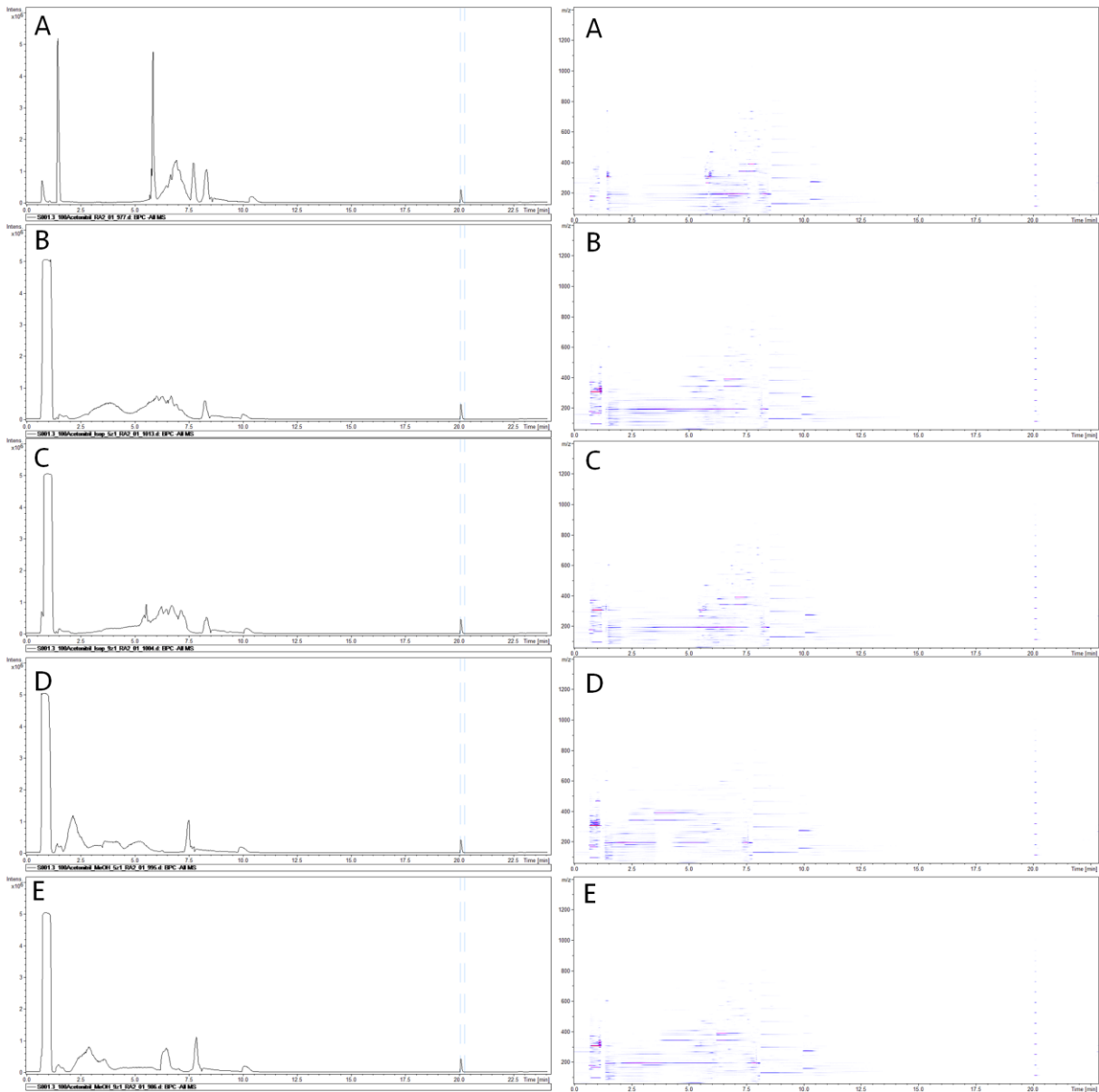


Abbildung 82: Analytierte Kakaoschalenproben im negativen Ionenmodus mit unterschiedlichen Anteilen von Acetonitril, Methanol und Isopropanol im Eluenten B (A: Acetonitril; B: Acetonitril/Isopropanol 5/1, v/v; C: Acetonitril/Isopropanol 9/1, v/v; D: Acetonitril/Methanol 5/1, v/v; E: Acetonitril/Methanol 9/1, v/v).

## 8.5.1.2.2 Gradient

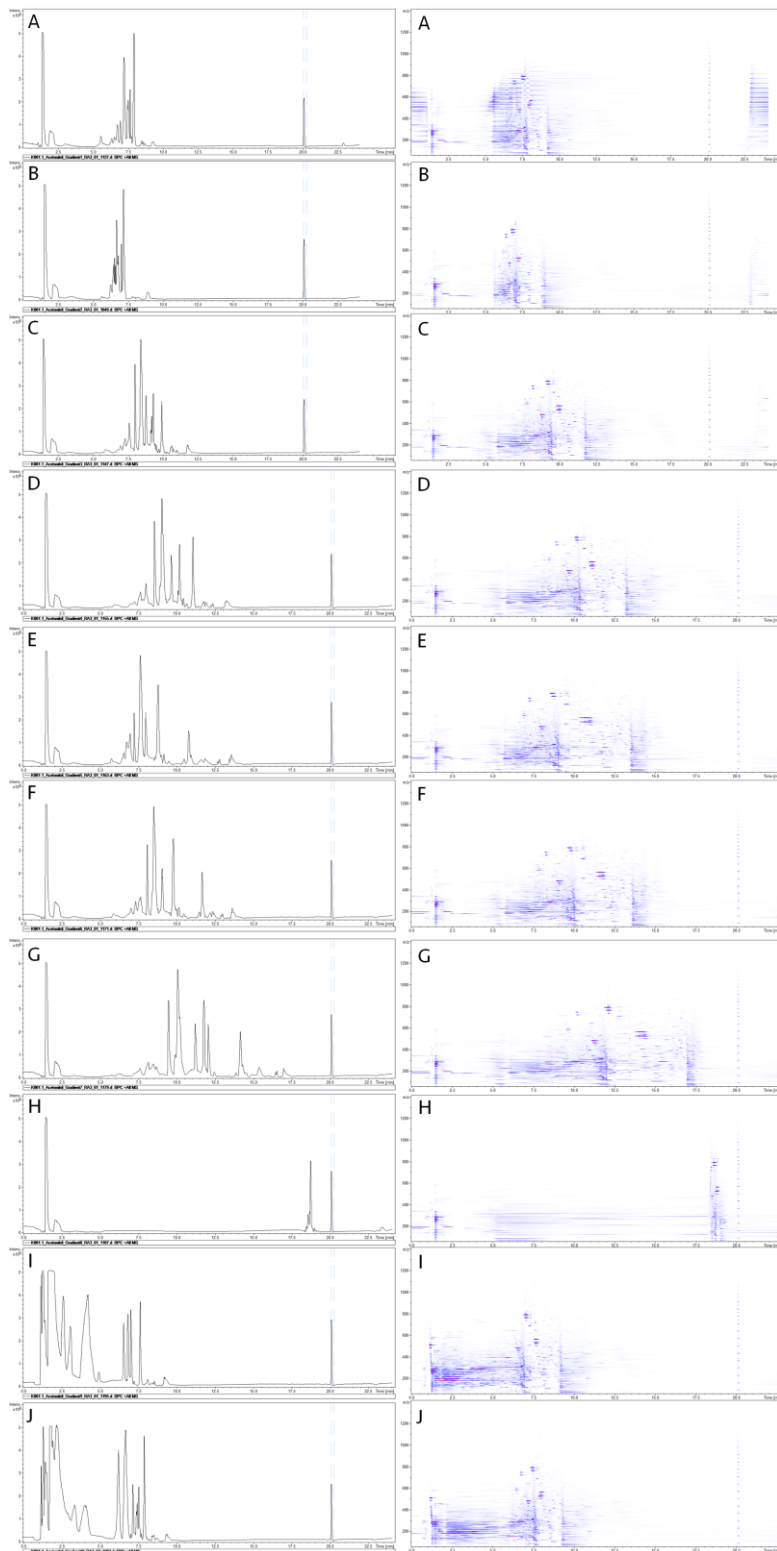


Abbildung 83: Analytierte Kakaokernproben mittels unterschiedlicher Gradienten im positiven Ionenmodus (A: Gradient 1; B: Gradient 2; C: Gradient 3; D: Gradient 4; E: Gradient 5; F: Gradient 6; G: Gradient 7; H: Gradient 8; I: Gradient 9; J: Gradient 10).



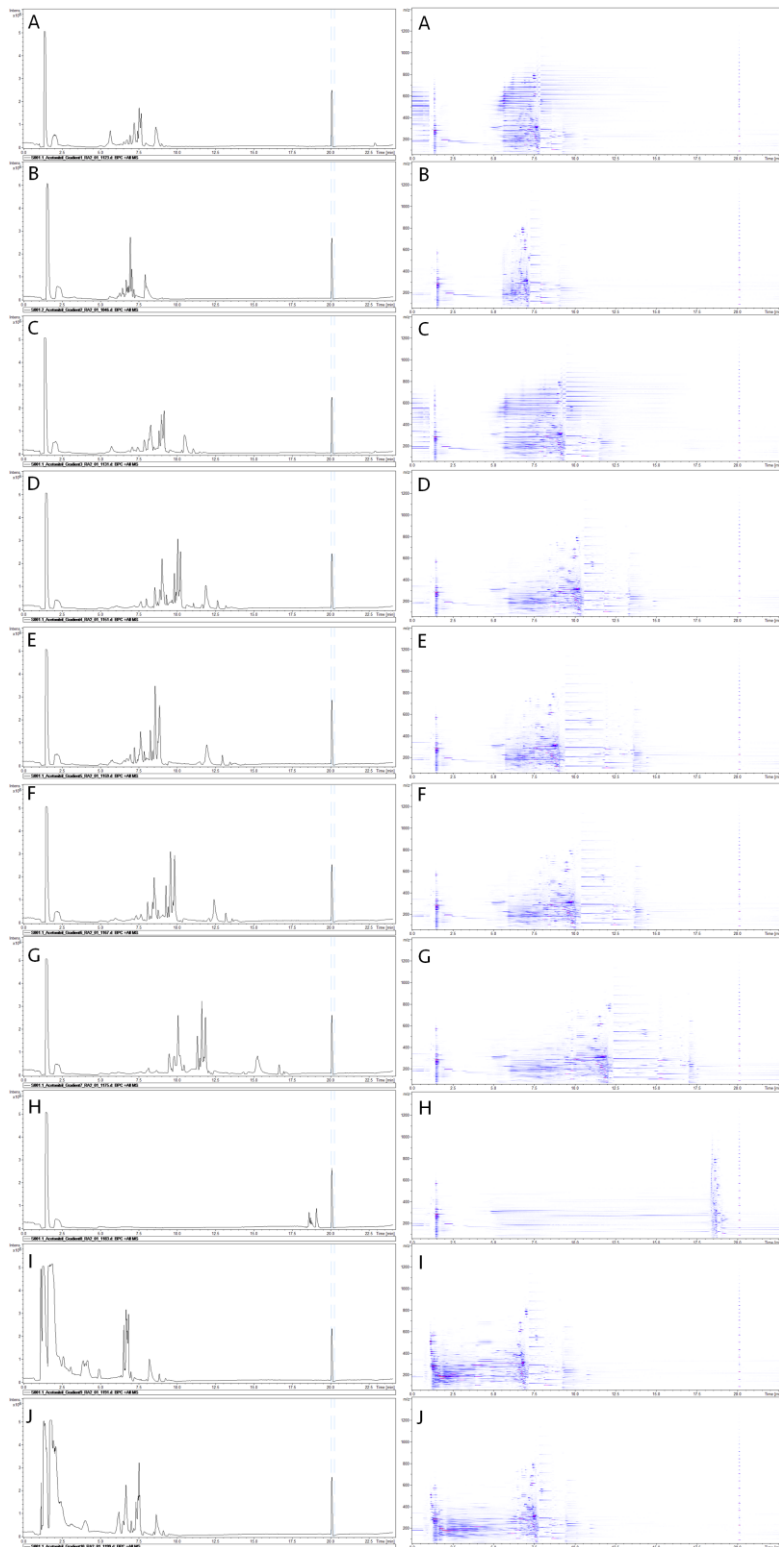


Abbildung 84: Analyierte Kakaoschalenproben mittels unterschiedlicher Gradienten im positiven Ionenmodus (A: Gradient 1; B: Gradient 2; C: Gradient 3; D: Gradient 4; E: Gradient 5; F: Gradient 6; G: Gradient 7; H: Gradient 8; I: Gradient 9; J: Gradient 10).

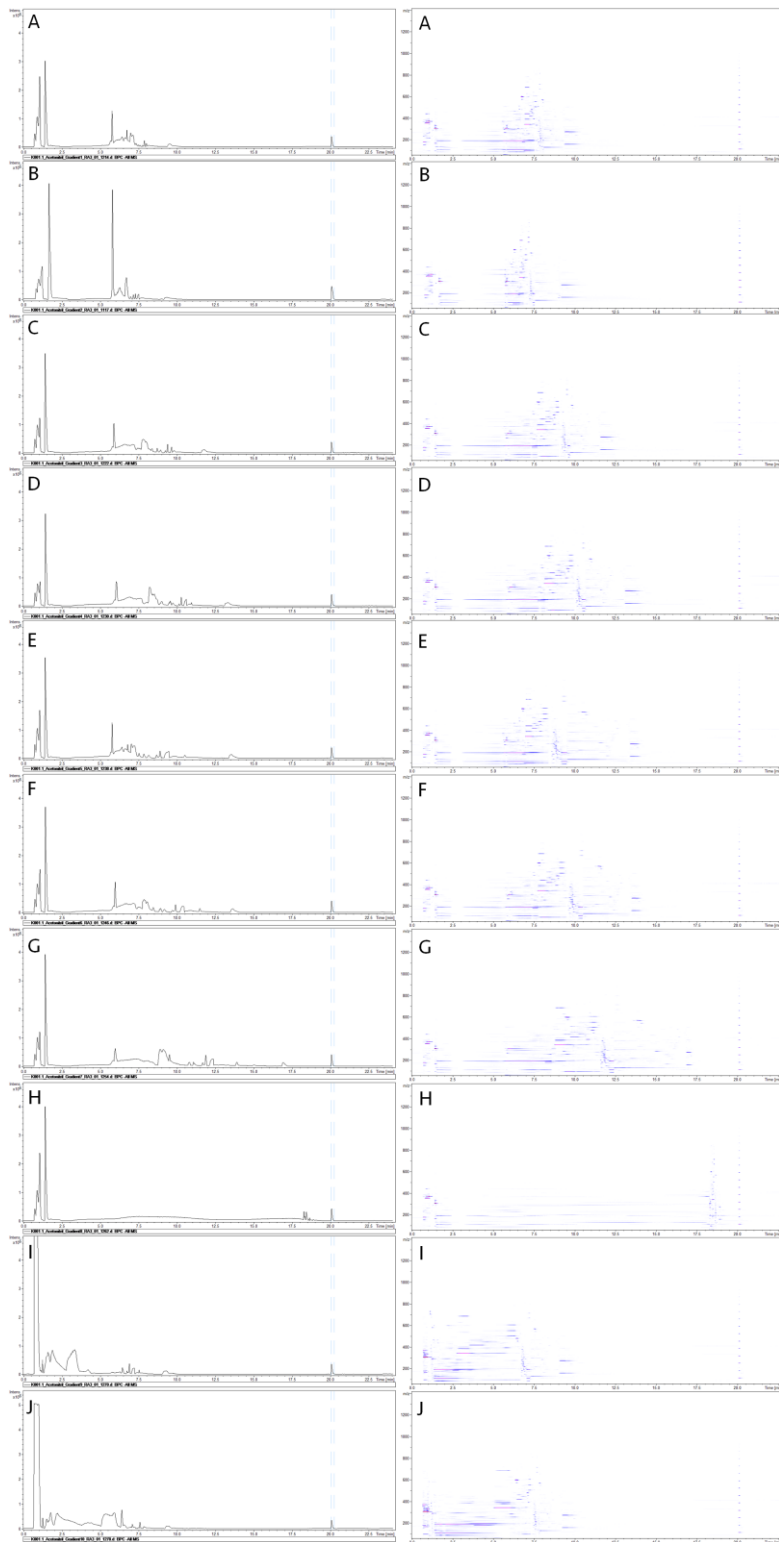


Abbildung 85: Analytierte Kakaokernproben mittels unterschiedlicher Gradienten im negativen Ionenmodus (A: Gradient 1; B: Gradient 2; C: Gradient 3; D: Gradient 4; E: Gradient 5; F: Gradient 6; G: Gradient 7; H: Gradient 8; I: Gradient 9; J: Gradient 10).

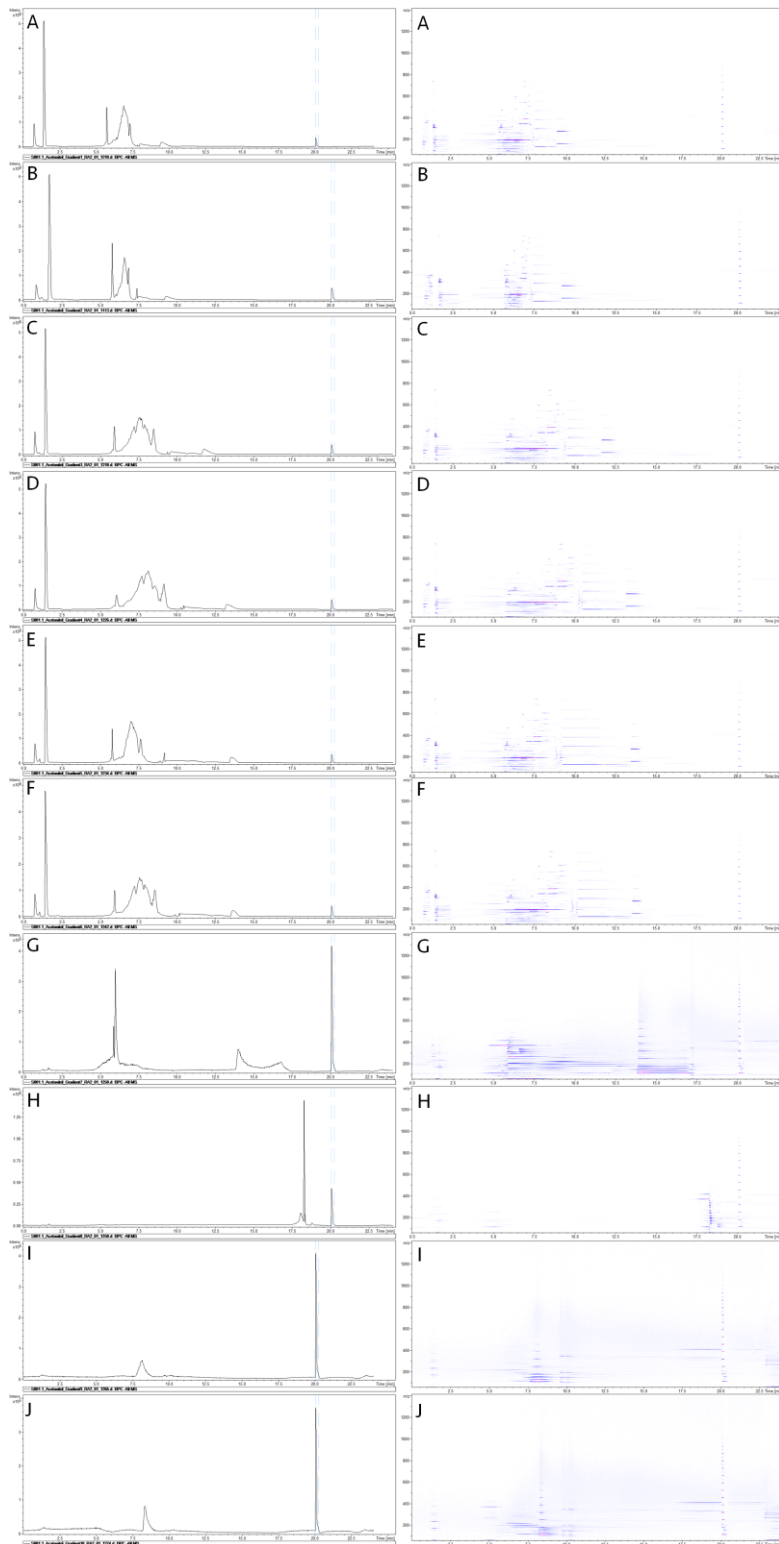


Abbildung 86: Analysierte Kakaoschalenproben mittels unterschiedlicher Gradienten im negativen Ionenmodus (A: Gradient 1; B: Gradient 2; C: Gradient 3; D: Gradient 4; E: Gradient 5; F: Gradient 6; G: Gradient 7; H: Gradient 8; I: Gradient 9; J: Gradient 10).

8.5.1.2.3 Laufmitteladditiv

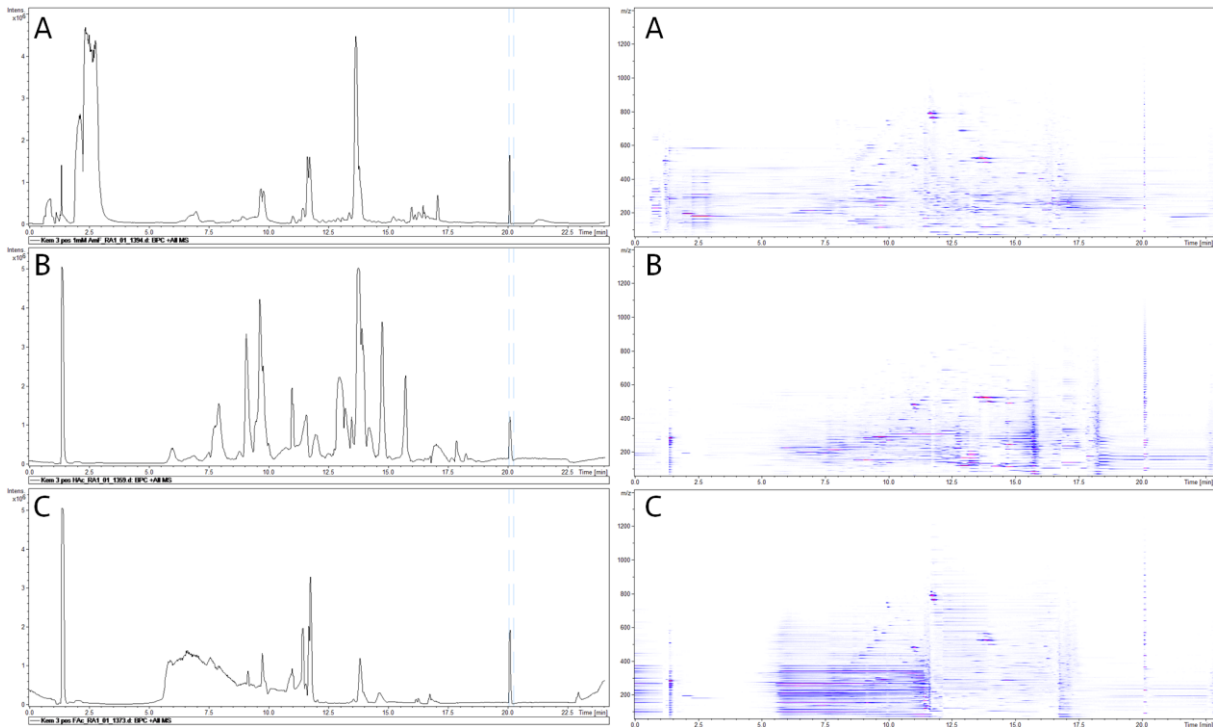


Abbildung 87: Analytierte Kakaokernproben mit unterschiedlichen Laufmitteladditiven im positiven Ionenmodus (A: 1 mM AF; B: 0,1 % Essigsäure; C: 0,1 % Ameisensäure).

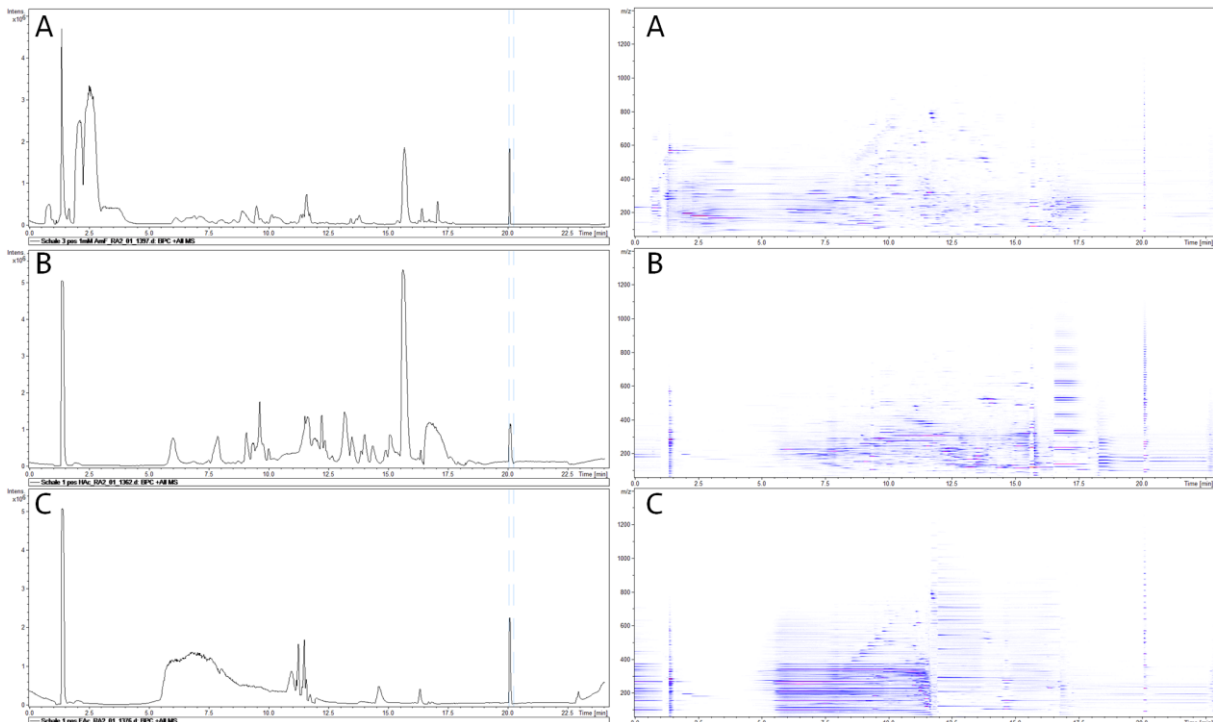


Abbildung 88: Analytierte Kakaoschalenproben mit unterschiedlichen Laufmitteladditiven im positiven Ionenmodus (A: 1 mM AF; B: 0,1 % Essigsäure; C: 0,1 % Ameisensäure).

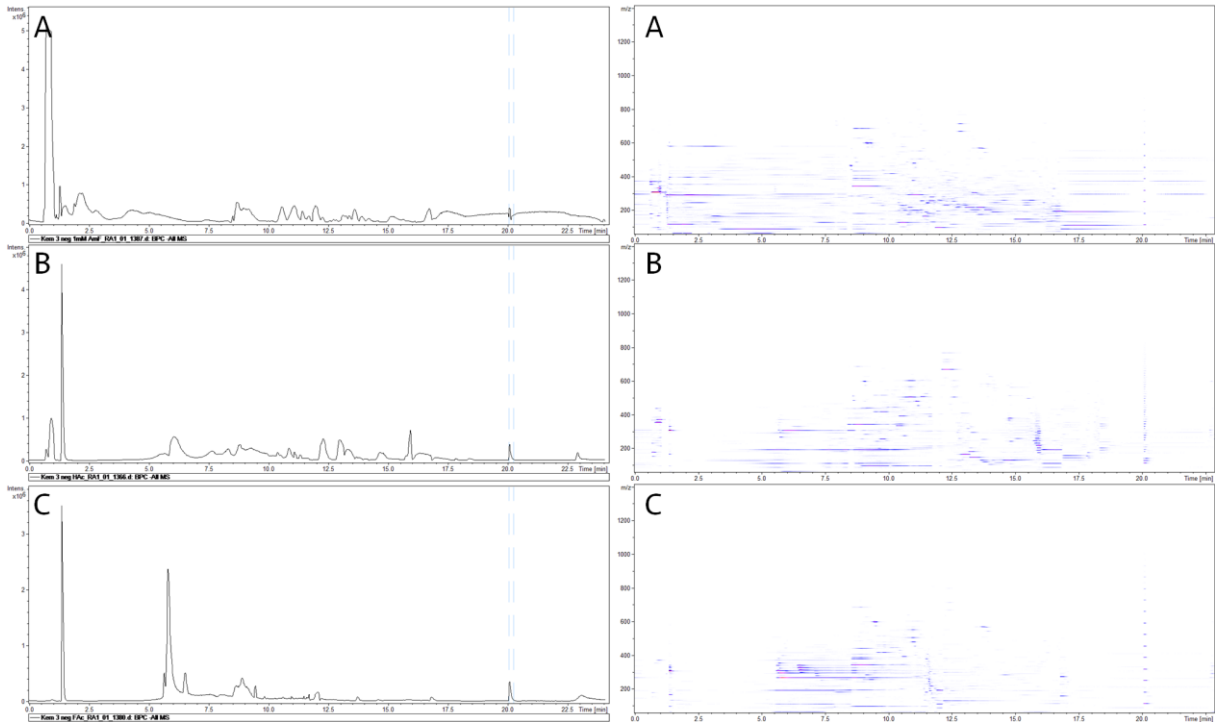


Abbildung 89: Analytierte Kakaokernproben mit unterschiedlichen Laufmitteladditiven im negativen Ionenmodus (A: 1 mM AF; B: 0,1% Essigsäure; C: 0,1% Ameisensäure).

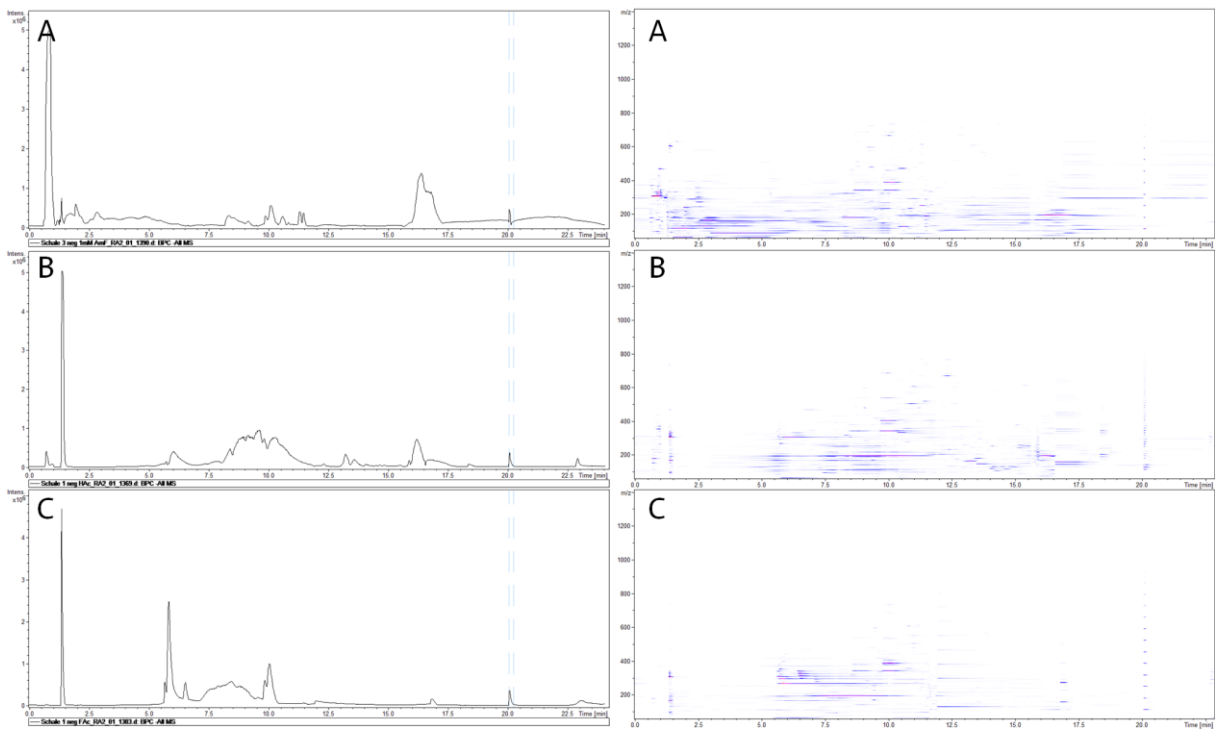


Abbildung 90: Analytierte Kakaoschalenproben mit unterschiedlichen Laufmitteladditiven im negativen Ionenmodus (A: 1 mM AF; B: 0,1% Essigsäure; C: 0,1% Ameisensäure).

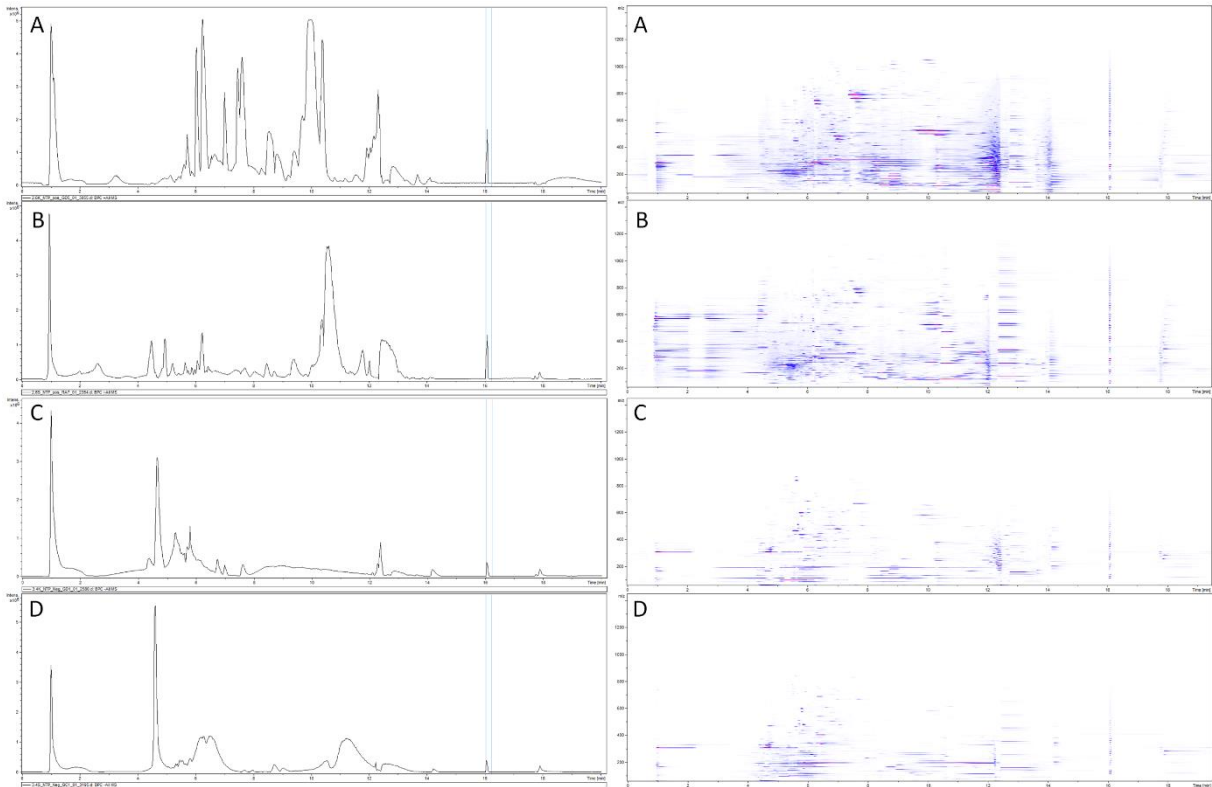


Abbildung 91: Optimierter NTP Gradient (A: Kakaokernprobe positiver Ionenmodus; B: Kakaoschalenprobe positiver Ionenmodus; C: Kakaokernprobe negativer Ionenmodus; D: Kakaoschalenprobe negativer Ionenmodus).

## 8.5.1.2.4 Temperatur

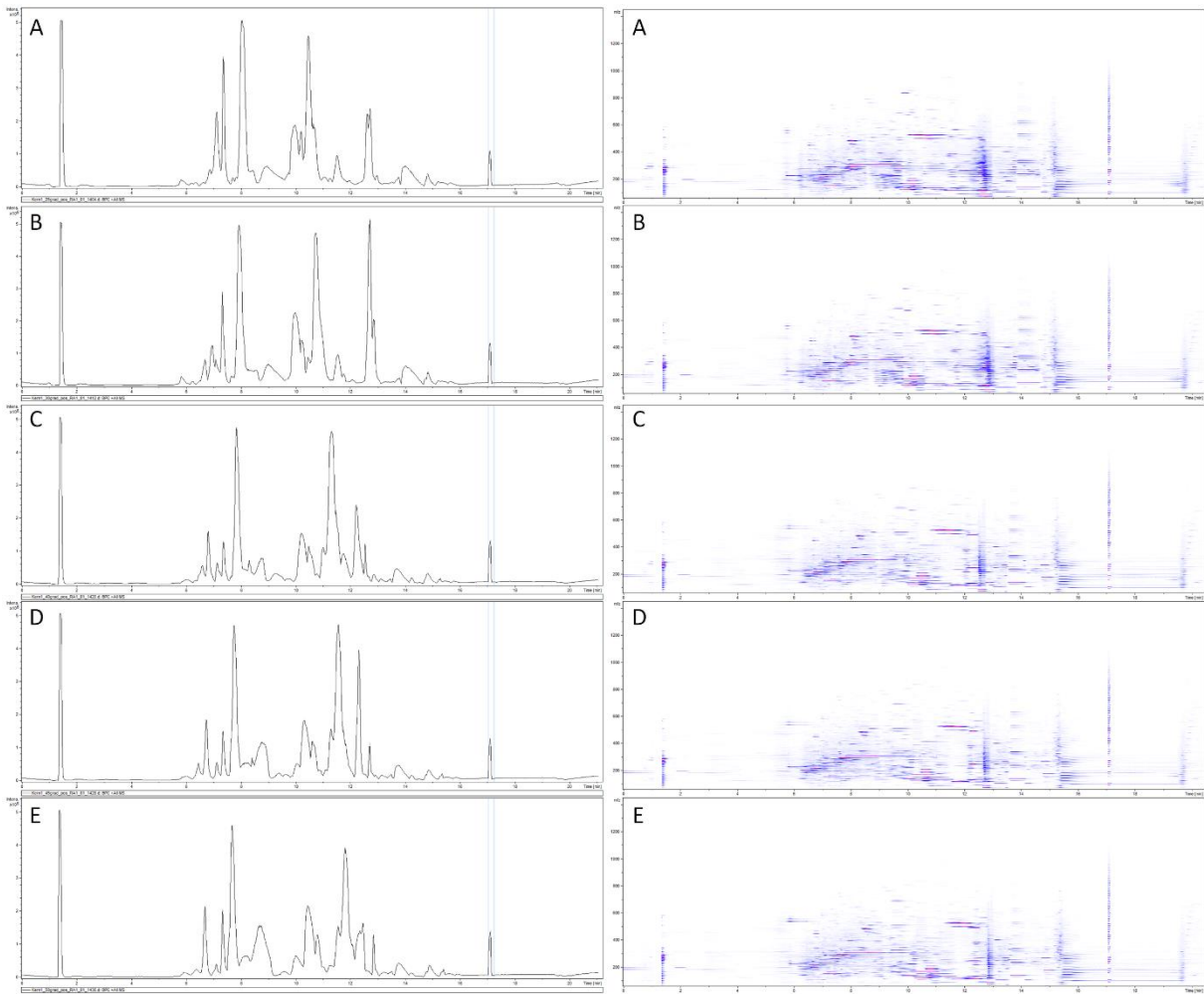


Abbildung 92: Analysierte Kakaokernproben bei unterschiedlichen Säulenofentemperaturen im positiven Ionenmodus (A: 25 °C; B: 30 °C; C: 40 °C; D: 45 °C; E: 50 °C).

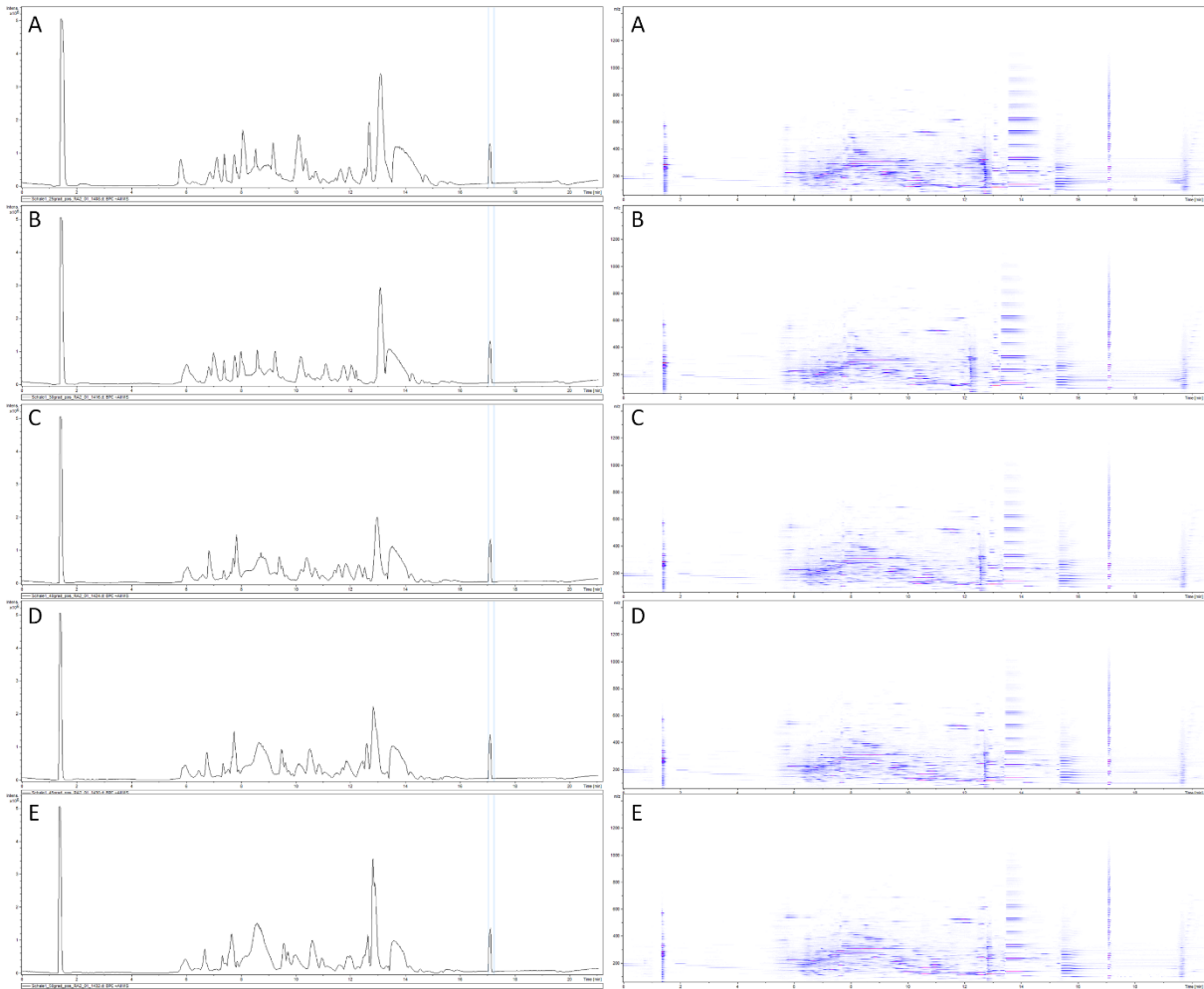


Abbildung 93: Analytierte Kakaoschalenproben bei unterschiedlichen Säulenofentemperaturen im positiven Ionenmodus (A: 25 °C; B: 30 °C; C: 40 °C; D: 45 °C; E: 50 °C).



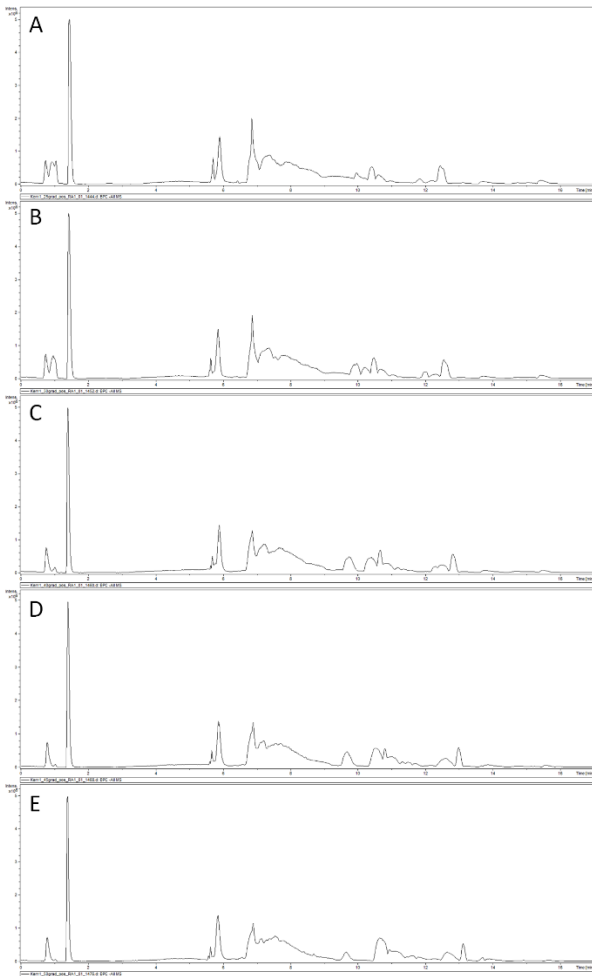


Abbildung 94: Analytierte Kakaokernproben bei unterschiedlichen Säulenofentemperaturen im negativen Ionenmodus (A: 25 °C; B: 30 °C; C: 40 °C; D: 45 °C; E: 50 °C).

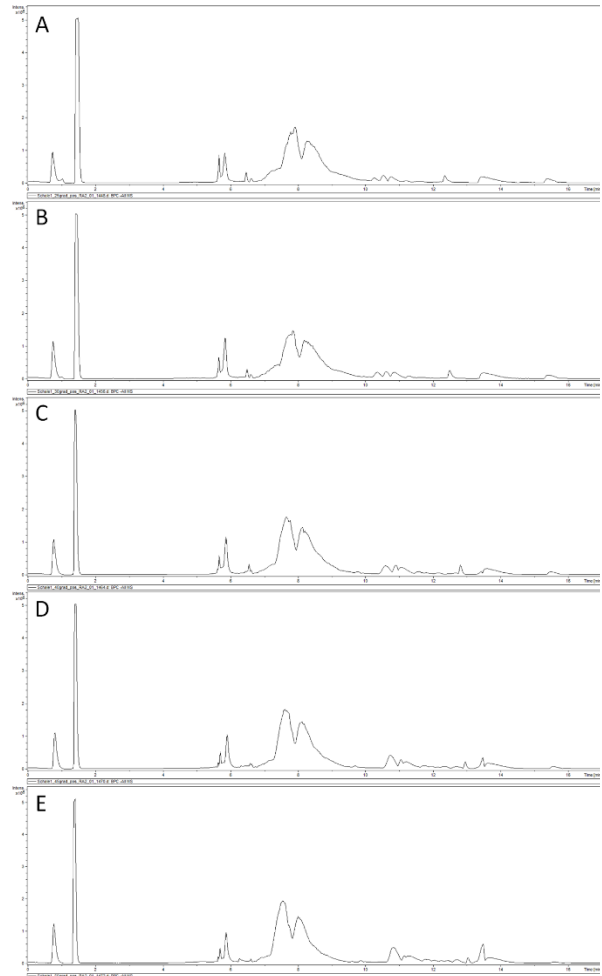


Abbildung 95: Analytierte Kakaokernproben bei unterschiedlichen Säulenofentemperaturen im negativen Ionenmodus (A: 25 °C; B: 30 °C; C: 40 °C; D: 45 °C; E: 50 °C).

8.5.1.2.5 Fließgeschwindigkeit

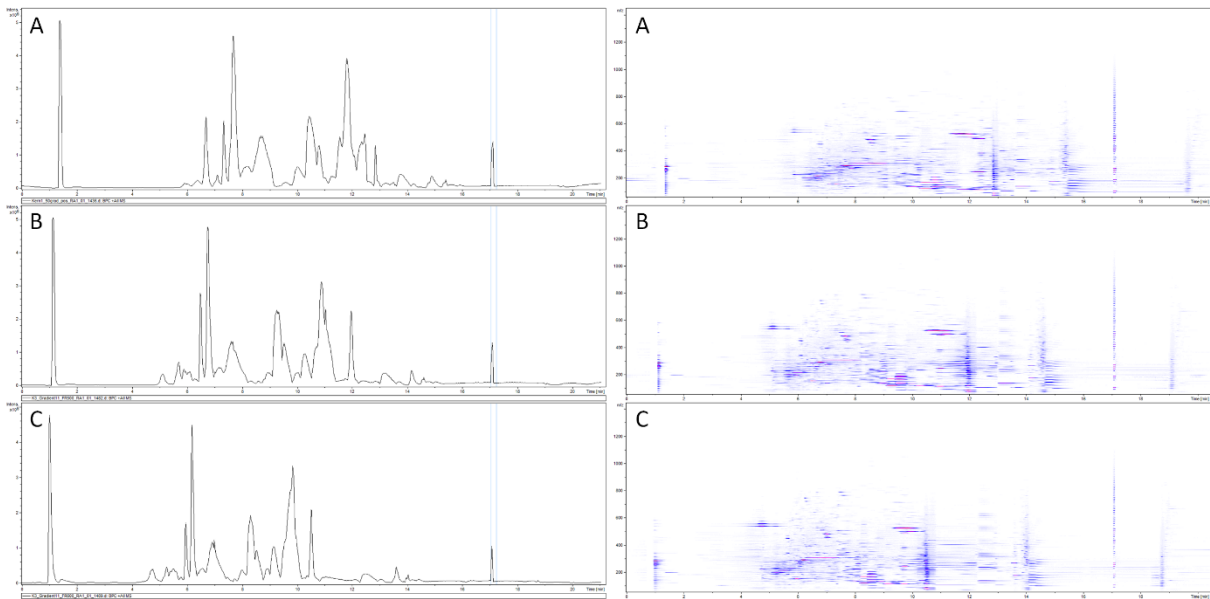


Abbildung 96: Analytierte Kakaokernproben bei unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten im positiven Ionenmodus (A: 400 µL/min; B: 500 µL/min; C: 600 µL/min).

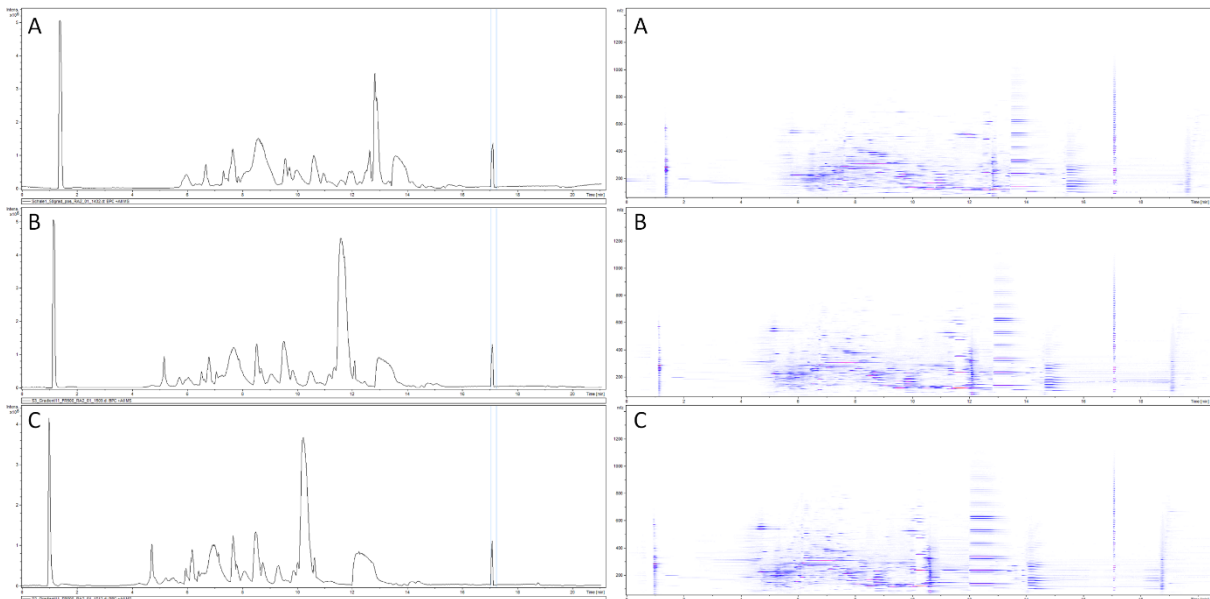


Abbildung 97: Analytierte Kakaoschalenproben bei unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten im positiven Ionenmodus (A: 400 µL/min; B: 500 µL/min; C: 600 µL/min).

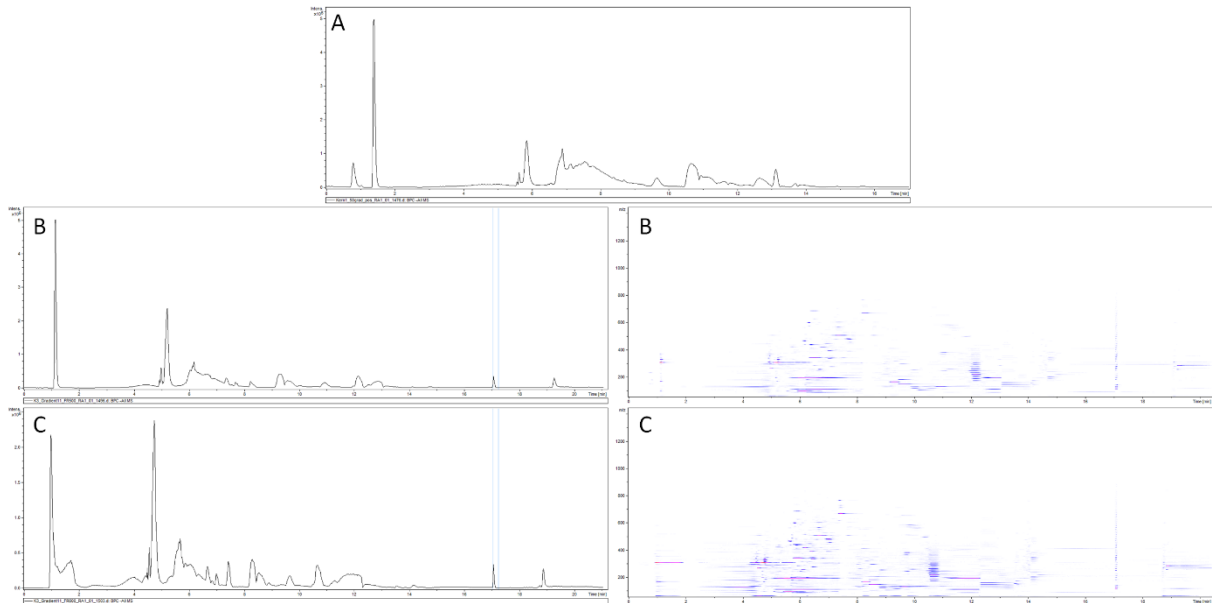


Abbildung 98: Analytierte Kakaokernproben bei unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten im negativen Ionenmodus (A: 400  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; B: 500  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; C: 600  $\mu\text{L}/\text{min}$ ).

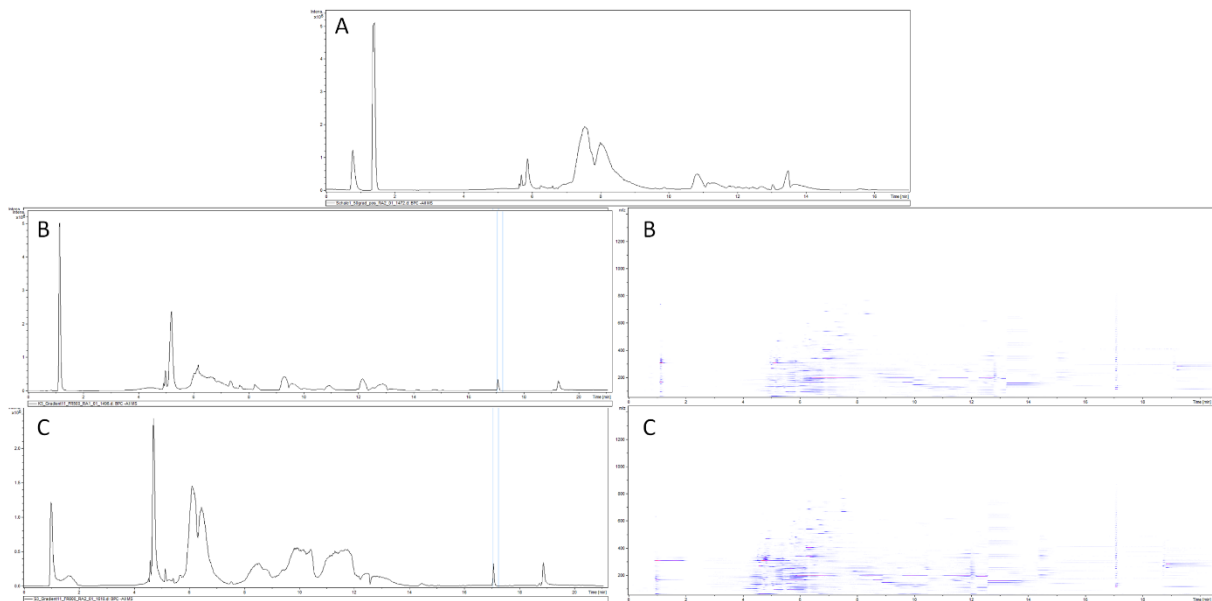


Abbildung 99: Analytierte Kakaoschalenproben bei unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten im negativen Ionenmodus (A: 400  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; B: 500  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; C: 600  $\mu\text{L}/\text{min}$ ).

## 8.6 Optimierung der TNP Methode

Tabelle 62: Getestete Gradienten für die TNP Methode.

Gradient 1			Gradient 2			Gradient 3			Gradient 4		
Zeit [min]	A* [%]	B* [%]	Zeit [min]	A* [%]	B* [%]	Zeit [min]	A* [%]	B* [%]	Zeit [min]	A* [%]	B* [%]
0	35	65	0	30	30	0	25	75	0	20	80
4	35	65	4	30	30	4	25	75	4	20	80
6	0	100	6	0	100	6	0	100	6	0	100
16	0	100	16	0	100	16	0	100	16	0	100
16,1	35	65	16,1	30	70	16,1	25	75	16,1	20	80
20	35	65	20	30	70	20	25	75	20	20	80
Gradient 5			Gradient 6			Gradient 7			Gradient 8		
Zeit [min]	A* [%]	B* [%]	Zeit [min]	A* [%]	B* [%]	Zeit [min]	A* [%]	B* [%]	Zeit [min]	A* [%]	B* [%]
0	15	85	0	10	90	0	35	65	0	30	30
4	15	85	4	10	90	6	35	65	6	30	30
6	0	100	6	0	100	8	0	100	8	0	100
16	0	100	16	0	100	16	0	100	16	0	100
16,1	15	85	16,1	10	90	16,1	35	65	16,1	30	70
20	15	85	20	10	90	20	35	65	20	30	70
Gradient 9			Gradient 10			Gradient 11			Gradient 12		
Zeit [min]	A* [%]	B* [%]	Zeit [min]	A* [%]	B* [%]	Zeit [min]	A* [%]	B* [%]	Zeit [min]	A* [%]	B* [%]
0	25	75	0	20	80	0	15	85	0	10	90
6	25	75	6	20	80	6	15	85	6	10	90
8	0	100	8	0	100	8	0	100	8	0	100
16	0	100	16	0	100	16	0	100	16	0	100
16,1	25	75	16,1	20	80	16,1	15	85	16,1	10	90
20	25	75	20	20	80	20	15	85	20	10	90
Gradient 13			Gradient 14			Gradient 15			Gradient 16		
Zeit [min]	A* [%]	B* [%]	Zeit [min]	A* [%]	B* [%]	Zeit [min]	A* [%]	B* [%]	Zeit [min]	A* [%]	B* [%]
0	35	65	0	30	70	0	25	75	0	20	80
2	35	65	2	30	70	2	25	75	2	20	80
4	15	85	4	15	85	4	15	85	4	15	85
8	0	100	8	0	100	8	0	100	8	0	100
21	0	100	21	0	100	21	0	100	21	0	100
21,1	35	65	21,1	30	80	21,1	25	75	21,1	20	80
25	35	65	25	30	80	25	25	75	25	20	80
Gradient 17			Gradient 18			Gradient 19					
Zeit [min]	A* [%]	B* [%]	Zeit [min]	A* [%]	B* [%]	Zeit [min]	A* [%]	B* [%]			
0	15	85	0	30	70	0	30	70			
2	15	85	2	30	70	2	30	70			
4	15	85	9	15	85	11	15	85			
8	0	100	11	0	100	13	0	100			
21	0	100	21	0	100	21	0	100			
21,1	15	85	21,1	30	70	21,1	30	70			
25	15	85	25	30	70	25	30	70			

\*A: Wasser +10 mM AF; \*B: Isoropanol/Acetonitril (3/2, v/v) + 10 mM AF

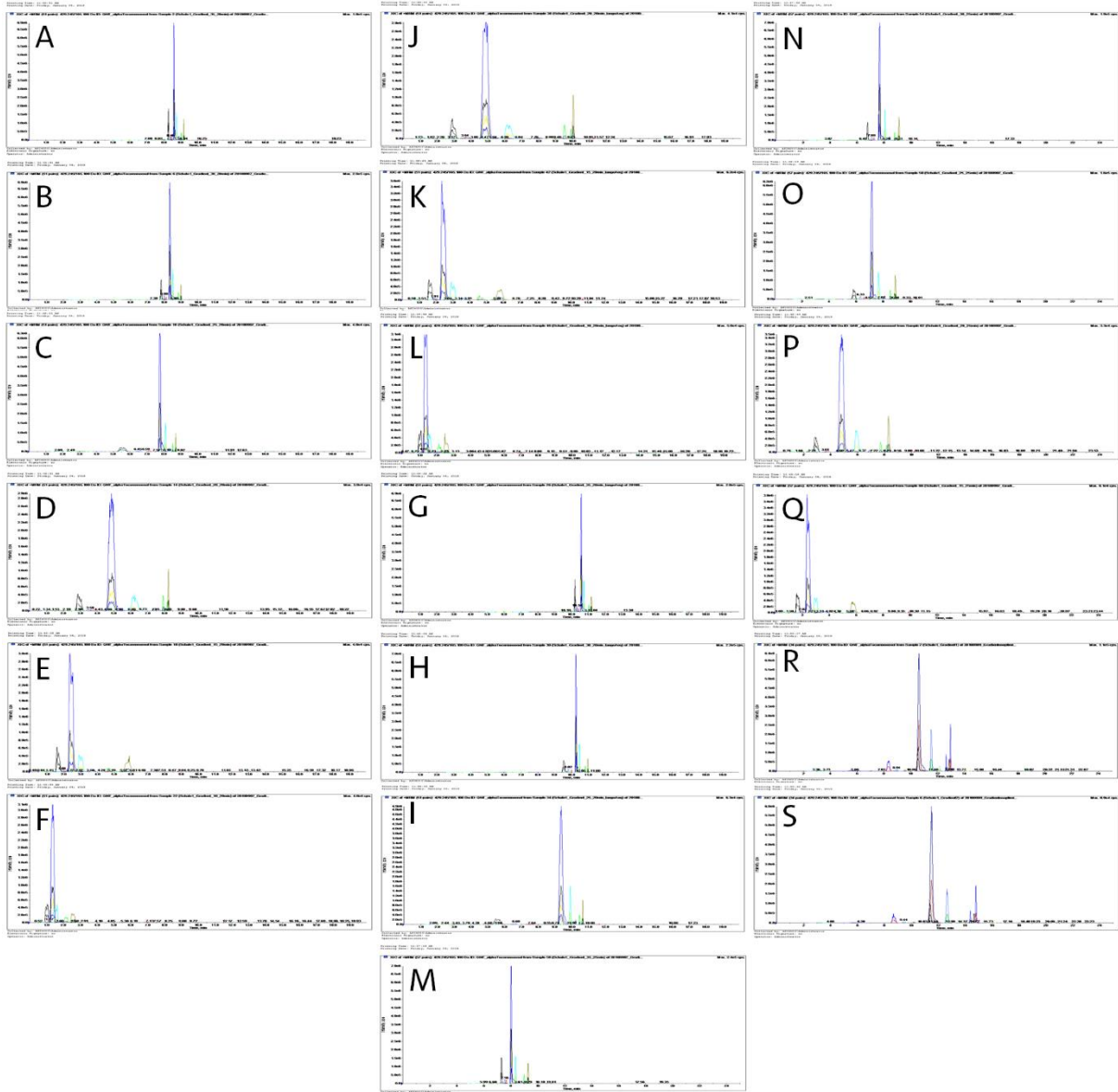


Abbildung 100: Analyierte Gradienten der TNP Methode (A: Gradient 1; B: Gradient 2; C: Gradient 3; D: Gradient 4; E: Gradient 5; F: Gradient 6; G: Gradient 7; H: Gradient 8; I: Gradient 9; J: Gradient 10; K: Gradient 11; L: Gradient 12; M: Gradient 13; N: Gradient 14; O: Gradient 15; P: Gradient 16; Q: Gradient 17; R: Gradient 18; S: Gradient 19).

## 8.7 Potenzielle Schlüsselmetaboliten

Tabelle 63: Potenzielle Schlüsselmetaboliten der NTNP positiv Methode, sortiert nach  $m/z$ .

$m/z$	Rt [min]	$m/z$	Rt [min]	$m/z$	Rt [min]	$m/z$	Rt [min]
123,117	11,69	521,391	9,20	736,650	11,83	890,821	13,78
144,081	9,26	525,481	10,11	736,756	13,83	892,828	13,39
273,259	11,31	527,462	7,62	744,596	11,20	894,851	13,39
295,228	11,92	556,533	10,17	750,736	12,55	910,757	11,38
299,239	10,63	577,429	10,60	752,640	10,61	915,745	8,84
311,296	11,78	590,429	14,32	752,645	11,03	922,881	13,81
353,307	11,37	593,600	11,58	758,634	11,40	926,820	13,09
365,268	6,01	608,565	11,42	772,593	10,00	930,816	12,49
383,368	13,89	620,577	11,30	774,613	10,48	934,846	13,03
383,368	12,92	652,590	11,28	774,613	10,48	934,884	15,21
383,369	13,34	658,544	10,12	774,735	13,51	937,836	17,25
386,400	14,75	658,617	12,63	774,735	13,51	939,829	12,97
395,368	13,33	659,708	15,88	778,767	12,91	940,835	13,31
395,368	13,89	663,569	10,43	780,640	10,61	942,851	13,93
397,383	14,79	666,714	15,54	782,654	10,92	944,832	13,32
397,384	14,19	676,661	12,31	785,703	12,64	944,867	14,22
400,416	13,62	678,481	14,33	785,705	12,82	946,881	14,14
407,319	7,32	678,481	13,85	789,763	13,08	952,906	17,49
409,384	12,71	680,637	13,34	792,711	12,49	957,830	9,72
411,364	12,28	680,691	12,56	797,720	9,62	958,846	12,81
413,345	7,98	682,651	16,86	798,738	12,90	960,826	11,74
417,277	8,64	684,631	12,61	800,752	13,31	968,868	13,94
419,355	8,73	686,648	13,20	802,601	8,41	970,845	12,66
421,391	8,26	686,648	13,20	802,768	13,77	970,883	14,81
427,362	8,23	688,661	12,59	804,708	12,51	972,898	14,77
429,374	8,83	690,621	13,05	808,741	13,30	976,699	10,45
448,396	11,77	692,637	13,32	817,794	13,32	984,898	14,43
458,348	13,41	692,637	13,06	818,779	14,11	991,802	9,49
458,348	13,87	694,652	13,85	831,725	13,81	998,914	14,74
458,349	14,32	696,654	11,76	831,774	12,15	1012,929	15,38
469,419	8,95	698,683	14,81	831,809	14,40	1027,825	15,36
471,398	7,87	704,691	12,67	833,790	13,29	1036,698	7,53
482,460	10,06	708,726	13,36	842,729	12,29	1040,960	15,85
485,414	8,22	710,536	9,14	842,729	12,29	1042,104	11,52
495,444	10,08	710,614	11,74	845,824	14,69	1047,862	10,21
497,416	7,05	713,661	13,00	848,777	13,19	1080,905	12,80
497,449	9,55	714,678	13,43	858,714	11,15	1108,935	13,02
499,427	8,58	720,544	8,63	859,803	12,48	1157,043	15,74
502,375	14,32	722,507	14,35	873,855	15,40	1164,949	10,24
502,375	13,86	722,508	16,86	873,855	14,21	1174,897	12,41
509,448	16,77	726,641	11,64	875,695	8,25		
513,443	7,25	733,613	10,19	876,775	12,08		
515,423	5,31	734,562	8,84	881,702	12,99		

## Anhang

Tabelle 64: Potenzielle Schlüsselmetaboliten der NTP, positiver Ionenmodus, sortiert nach dem  $m/z$ .

$m/z$	Rt [min]	$m/z$	Rt [min]	$m/z$	Rt [min]	$m/z$	Rt [min]	$m/z$	Rt [min]	$m/z$	Rt [min]	$m/z$	Rt [min]	$m/z$	Rt [min]
59,014	10,58	133,051	7,74	173,045	3,41	208,098	1,72	264,087	10,98	321,119	10,48	401,144	1,86	511,042	10,33
61,989	1,86	135,045	5,08	173,045	4,13	209,030	11,21	265,147	1,88	322,202	1,90	402,300	1,85	513,145	6,31
72,994	8,86	135,045	10,22	173,045	4,45	209,066	4,13	265,147	5,05	323,029	11,39	403,088	10,84	513,254	2,03
78,959	11,56	137,024	1,72	173,082	1,86	209,068	2,35	266,096	8,97	323,134	8,25	404,105	9,00	515,125	11,40
85,030	10,68	138,020	2,33	173,093	11,55	210,077	1,80	267,073	4,56	325,114	2,92	404,155	2,67	516,246	8,35
85,030	11,19	138,971	10,61	174,041	11,27	213,124	11,71	271,103	4,50	325,114	9,34	405,126	11,44	517,035	8,96
87,009	10,58	139,026	2,72	174,077	11,71	215,128	1,64	271,166	3,52	326,103	2,24	405,139	2,31	522,182	9,68
87,009	11,77	140,983	9,45	175,061	5,79	216,087	2,65	271,227	1,82	327,072	10,58	407,203	7,58	523,148	1,72
88,041	3,36	141,019	4,95	177,040	1,51	216,088	10,96	272,092	2,53	327,092	10,77	409,044	1,82	524,234	1,95
89,025	1,59	144,066	3,56	179,035	11,06	217,071	5,15	273,170	1,92	327,128	7,19	409,125	1,91	528,229	3,56
91,055	10,22	145,014	6,57	179,056	8,84	218,103	3,36	274,093	9,74	328,151	9,64	415,124	3,13	529,122	2,06
94,981	1,40	145,051	1,79	179,056	10,11	221,030	11,17	275,008	9,83	328,151	11,71	416,265	7,02	529,176	6,22
94,981	2,07	145,062	5,78	181,051	2,32	221,067	1,92	275,017	11,52	328,224	9,36	416,265	7,34	531,208	10,94
96,969	11,57	146,046	7,69	181,071	6,29	221,067	9,16	275,103	7,99	329,087	3,51	418,280	7,33	533,223	2,12
96,977	2,07	146,046	10,16	182,032	2,71	222,077	5,57	275,125	11,72	330,902	11,96	419,131	3,54	535,202	2,00
99,045	2,99	146,046	11,38	182,997	10,12	222,077	13,94	276,124	1,77	331,176	2,99	420,097	10,81	538,144	2,09
99,045	5,26	147,030	3,46	183,017	2,55	223,046	10,48	277,155	9,09	333,059	10,94	421,207	2,58	547,238	2,02
99,045	11,05	147,066	2,90	183,035	2,70	225,088	6,18	278,067	10,52	333,145	1,88	421,207	2,81	553,187	3,73
101,061	10,58	149,009	11,16	184,062	9,33	225,113	1,84	278,139	2,63	337,012	1,40	425,166	9,01	556,260	3,90
103,004	5,69	149,046	1,64	185,009	10,82	227,067	9,88	282,061	10,85	337,077	8,56	427,145	10,18	557,207	4,04
103,004	9,12	150,013	10,22	185,093	12,02	227,103	9,02	282,995	4,55	337,150	7,36	428,316	1,81	558,218	1,95
103,004	10,57	150,971	10,34	186,041	11,24	228,124	1,75	283,068	3,96	340,161	4,90	429,124	6,30	563,102	8,66
103,040	3,01	151,007	2,33	186,077	2,31	229,083	10,39	283,103	3,01	341,108	9,01	430,280	6,93	563,183	9,04
105,019	9,49	152,029	2,52	186,077	10,15	230,140	2,80	283,103	6,86	343,103	2,52	431,140	8,09	569,187	1,99
111,009	11,44	152,986	10,32	187,061	2,24	233,077	4,52	285,182	3,05	343,212	1,58	434,112	10,92	569,220	9,01
111,020	3,77	153,019	1,52	187,097	1,69	234,914	11,58	288,156	11,07	347,075	6,12	435,186	4,71	571,288	8,13
112,988	10,22	153,029	2,63	188,093	3,68	235,118	5,51	290,088	9,58	351,069	4,65	437,124	6,19	574,232	2,29
112,988	10,58	131,071	4,52	172,062	3,22	205,035	11,20	260,114	2,15	314,114	7,95	391,160	3,40	487,202	3,14
114,020	10,52	155,010	3,75	172,098	2,28	206,046	2,21	261,056	2,29	314,124	11,22	393,176	2,98	492,310	8,18

Anhang

m/z	Rt [min]	m/z	Rt [min]	m/z	Rt [min]	m/z	Rt [min]	m/z	Rt [min]	m/z	Rt [min]	m/z	Rt [min]	m/z	Rt [min]
115,004	11,28	155,010	4,80	188,093	4,85	206,082	4,74	261,098	10,13	315,072	4,41	393,187	7,95	494,057	12,07
117,019	3,49	156,013	3,73	188,093	9,86	236,092	4,90	263,128	1,34	316,974	11,54	395,167	9,26	499,112	2,02
117,056	1,88	157,025	7,29	188,963	11,47	237,040	5,67	291,067	5,99	319,053	8,60	396,166	11,07	501,181	3,53
117,056	2,30	157,037	2,27	189,004	11,02	238,108	1,94	291,098	5,46	351,129	3,95	400,099	10,43	505,078	1,57
118,023	3,49	158,082	3,06	189,077	1,83	239,077	5,52	291,098	8,35	352,132	5,21	437,202	6,36	506,188	9,58
119,035	4,13	158,082	3,46	191,020	11,05	240,871	11,52	291,144	2,98	354,178	11,90	437,202	6,73	575,219	3,54
119,035	4,54	158,082	4,92	191,020	11,44	241,119	4,01	293,087	1,87	355,160	2,24	441,098	1,99	575,234	7,16
119,035	5,45	158,082	11,08	191,056	3,53	241,119	8,30	293,150	9,19	356,256	8,71	441,124	6,47	577,214	2,88
121,029	10,40	158,976	5,90	191,056	4,10	243,015	10,86	294,062	11,06	357,103	11,33	441,140	3,14	579,178	9,02
122,025	6,30	159,030	2,32	191,092	3,57	243,123	2,59	294,119	9,65	358,114	8,86	443,191	4,47	581,184	7,83
124,007	7,91	160,061	7,08	193,072	1,88	243,171	9,25	295,034	10,69	359,098	7,10	445,155	8,94	587,234	10,95
124,040	10,85	160,061	7,78	194,947	11,53	243,196	1,85	295,103	10,04	361,113	2,68	449,069	7,99	594,187	2,38
124,041	1,80	160,061	9,34	195,052	2,97	244,065	1,87	295,130	2,47	361,223	2,54	449,114	10,43	597,304	8,06
124,991	1,52	161,045	4,56	196,061	2,30	244,066	2,63	297,119	5,06	363,145	1,92	449,275	1,55	602,265	3,39
125,024	11,10	161,045	10,97	196,061	2,73	244,082	2,86	299,259	1,63	364,187	9,47	455,277	1,39	608,218	2,28
125,025	11,62	163,025	11,17	197,046	3,11	244,155	1,94	302,150	9,23	365,144	4,28	457,135	4,05	615,192	2,26
127,051	7,99	163,040	10,52	197,129	8,07	246,008	10,97	307,103	10,39	365,198	1,38	457,152	4,49	625,270	4,48
128,035	10,70	163,061	4,55	198,077	7,17	247,082	10,24	308,077	10,64	369,016	10,74	461,042	8,10	633,182	2,34
128,035	11,74	164,108	1,94	198,077	7,63	248,129	1,94	308,135	8,89	376,151	8,18	461,042	9,01	663,291	9,87
129,019	1,48	165,019	2,78	199,038	9,69	251,056	5,07	309,082	6,40	377,085	9,01	463,087	3,04	665,214	10,90
129,019	2,44	165,031	7,88	199,097	1,67	251,077	9,96	309,173	2,64	377,160	2,11	463,148	2,08	684,235	9,77
129,019	6,43	165,040	10,88	200,056	10,75	251,077	10,84	309,173	4,34	378,130	9,06	468,125	1,57	691,257	7,98
129,019	11,16	165,056	2,87	200,093	2,86	251,104	2,67	309,174	1,57	379,083	8,09	471,109	2,06	699,219	10,61
129,056	2,53	165,056	4,50	202,108	3,00	253,035	10,39	311,098	6,31	385,306	10,61	473,129	1,54	713,250	3,52
130,051	9,08	167,021	5,34	202,108	4,19	256,130	11,99	311,140	8,59	387,165	4,01	475,166	9,49	481,292	1,39
131,010	4,42	167,035	3,03	204,066	2,10	257,114	6,73	312,124	2,80	388,117	8,09	479,277	1,39	486,269	11,95
131,035	1,87	167,035	3,51	204,088	5,65	258,098	10,30	312,891	11,60	388,117	9,01	391,124	2,96	487,100	1,81
131,035	2,21	168,981	10,34	205,035	8,69	259,076	8,53	313,094	8,63	389,144	2,24	313,238	1,32	260,023	8,48
131,035	4,62	172,025	4,60	205,035	10,68										



## Anhang

Tabelle 65: Potenzielle Schlüsselmetaboliten der NTP, negativer Ionenmodus, sortiert nach dem  $m/z$ .

$m/z$	Rt [min]	$m/z$	Rt [min]	$m/z$	Rt [min]	$m/z$	Rt [min]	$m/z$	Rt [min]	$m/z$	Rt [min]	$m/z$	Rt [min]	$m/z$	Rt [min]
100,93	5,91	151,02	4,17	181,01	1,00	214,88	4,26	286,17	13,2	351,21	4,87	405,15	7,18	481,08	5,77
101,06	4,24	153,02	1,11	182,99	5,41	214,96	6,06	288,12	10,1	357,10	6,98	407,09	6,72	485,15	6,48
116,92	5,82	155,00	4,44	184,95	5,89	215,14	11,6	293,17	10,4	358,29	7,23	409,06	12,1	486,18	7,34
116,92	6,28	155,04	13,6	187,07	5,53	218,10	4,78	294,97	6,07	372,07	6,48	413,09	11,9	492,31	6,13
121,02	4,26	157,06	11,2	188,03	5,28	222,13	13,4	303,03	5,41	372,27	7,24	417,07	5,13	494,13	10,2
124,00	6,18	158,93	5,86	188,09	5,33	223,04	5,18	307,03	5,48	372,31	7,05	417,24	5,82	503,16	6,72
124,97	4,84	165,04	9,02	189,07	1,00	223,04	7,78	307,10	4,46	373,16	4,87	419,17	10,3	518,14	6,92
126,98	5,05	166,04	5,65	193,03	4,49	233,06	5,21	309,04	5,36	374,29	7,23	421,22	0,99	519,15	12,2
128,07	9,98	166,05	8,51	193,03	5,26	240,90	5,61	311,09	5,77	375,18	4,88	423,23	6,00	523,14	4,92
128,96	12,5	168,04	1,06	194,94	7,30	243,07	13,8	313,11	6,20	384,21	5,83	437,25	5,99	527,33	10,4
130,05	8,89	173,09	11,6	194,94	7,75	246,09	7,57	319,05	5,40	385,30	11,4	450,25	6,02	535,15	6,35
133,05	3,74	174,07	7,93	195,05	6,08	252,92	5,86	321,08	3,23	386,29	7,03	451,99	6,53	538,17	6,31
134,04	8,11	175,02	1,03	195,05	10,0	256,96	12,7	321,08	5,21	388,27	6,66	456,02	6,12	541,15	6,69
135,03	4,52	175,02	4,47	196,05	6,01	256,99	4,80	323,07	4,85	388,30	7,01	456,02	6,51	542,34	5,83
135,03	5,67	175,02	5,23	197,02	5,87	265,14	4,83	327,09	6,59	391,03	4,96	459,04	6,35	545,22	6,09
136,99	5,00	176,09	10,4	198,99	4,83	267,07	5,80	328,04	6,20	391,18	5,50	463,26	5,97	547,30	10,7
138,02	15,0	177,04	3,62	208,09	7,69	267,09	1,01	329,09	1,84	393,19	5,07	474,30	6,02	570,15	6,72
139,97	5,61	179,02	0,99	209,06	5,57	267,14	0,99	331,14	6,38	401,09	7,21	475,67	6,50	571,11	12,2
139,99	5,02	179,02	6,13	211,02	4,80	280,02	11,9	337,20	0,99	402,13	6,32	141,06	11,7	179,02	6,45
150,97	5,40	180,01	0,99	211,08	5,91	280,99	5,73	340,07	4,80	404,23	5,82	212,89	4,27	283,10	6,06
351,18	1,03	404,30	6,67												

## 8.8 Potenzielle Schlüsselmetaboliten für die Methodenoptimierung

Tabelle 66: Schlüsselmetaboliten der NTNP Methode, die zur Auswertung der Extraktionsmittel- sowie Additiv-Fragestellungen ausgewählt wurden, jeweils sortiert nach der Retentionszeit.

m/z	Rt [min]	m/z	Rt [min]	m/z	Rt [min]
324,287	2,64	555,499	12,53	534,561	15,78
254,248	3,29	424,452	13,12	197,081	16,53
513,406	4,59	515,413	13,64	295,227	16,61
368,316	5,10	800,617	14,05	916,798	17,28
310,311	7,24	452,483	14,14	848,771	18,34
965,855	11,34	504,514	14,51	900,803	18,35
569,455	11,74	480,514	14,99	850,787	18,64
413,378	12,22	506,531	15,07	878,819	18,93
572,525	12,42	682,635	15,71	906,850	19,21
1021,918	12,52	508,545	15,74	946,881	19,35

Tabelle 67: Schlüsselmetaboliten der NTP Methoden, die zur Auswertung der Extraktionsmittel- sowie Additiv-Fragestellungen ausgewählt wurden, jeweils sortiert nach der Retentionszeit.

Extraktionsmittelzusammensetzung				Extraktionsmittel-Additiv			
neg		pos		neg		pos	
m/z	Rt [min]	m/z	Rt [min]	m/z	Rt [min]	m/z	Rt [min]
191,056	2,18	369,311	3,22	204,066	2,32	90,055	2,42
147,066	2,39	229,119	3,16	181,051	2,43	229,118	3,72
218,103	2,44	522,203	7,62	361,113	2,45	152,057	6,58
175,061	2,48	279,134	7,65	131,035	2,51	147,092	7,13
89,0250	2,53	132,102	7,73	94,981	2,63	279,134	7,13
294,062	2,59	314,092	7,76	103,004	2,74	136,062	7,22
132,030	2,63	388,306	8,54	173,045	2,91	112,051	7,38
188,093	2,79	390,321	8,56	172,098	3,49	314,092	8,12
94,981	2,85	166,086	9,07	308,077	3,68	227,103	8,44
236,092	3,09	147,092	9,08	188,093	4,24	126,066	8,55
130,051	3,80	199,144	9,26	225,088	4,52	354,336	8,95
274,093	4,79	104,071	9,99	347,074	6,04	302,305	9,22
160,061	5,84	167,093	10,02	341,108	6,49	318,300	9,29
157,025	6,14	211,119	10,08	105,019	7,41	288,290	9,38
146,046	6,74	90,055	10,25	274,093	7,46	166,086	9,48
241,119	7,02	183,092	10,45	179,056	7,76	132,102	9,76
308,135	7,05	233,150	10,46	91,055	8,94	72,080	9,84
509,287	7,78	215,139	10,65	149,009	8,95	130,086	11,00
341,109	7,82	354,337	10,67	168,981	8,95	476,187	11,06
388,117	7,84	302,306	10,78	101,061	9,15	116,071	11,15
168,981	8,50	318,300	10,78	277,155	9,34	536,371	11,26
135,045	8,60	347,342	10,94	263,140	9,66	175,108	11,44
173,009	9,18	288,290	10,84	128,035	10,19	215,139	11,54
277,155	9,79	342,337	11,00	186,041	11,15	263,172	11,62
243,171	9,81	403,230	11,19	191,020	11,48	403,230	11,67
263,140	10,08	536,371	11,24	125,024	11,75	144,102	11,72
186,041	11,20	263,172	11,26	87,009	11,99	104,071	11,75
146,046	11,41	249,145	11,35	111,009	12,01	187,108	11,83
173,093	11,53	266,160	12,42	191,020	12,01	226,155	12,16

## 8.9 Temperaturstabile Schlüsselmetaboliten

Tabelle 68: Temperaturstabile Schlüsselmetaboliten der Röstreihe NTNP positiv, in Summe 104 Verbindungen, sortiert nach dem  $m/z$ .

$m/z$	Rt [min]	$m/z$	Rt [min]	$m/z$	Rt [min]	$m/z$	Rt [min]
144,081	9,25	452,483	9,93	656,595	12,50	828,650	10,80
161,107	9,23	469,419	8,93	658,613	12,75	842,729	12,22
161,107	9,80	485,414	8,25	658,617	12,72	848,772	9,90
197,081	10,65	485,414	8,25	668,598	12,25	858,704	11,30
295,227	11,95	497,411	9,50	680,637	13,50	910,757	11,45
295,228	12,02	497,449	9,53	684,631	12,70	940,835	13,48
299,239	10,62	499,427	8,58	684,650	12,60	942,851	13,93
299,258	3,70	525,481	10,08	686,648	13,13	944,867	14,50
353,307	11,37	527,462	7,65	692,637	13,48	946,881	15,10
383,368	13,50	529,400	7,63	692,637	13,17	956,865	14,00
384,347	12,28	529,400	9,18	694,652	13,68	965,856	9,25
384,347	13,50	536,371	9,53	696,650	13,70	968,868	13,90
384,347	14,08	540,535	10,35	696,654	11,72	970,845	12,68
386,400	14,77	540,535	10,63	698,683	15,13	970,883	14,45
395,368	13,48	541,437	9,50	708,726	13,13	972,898	15,08
395,368	14,13	541,737	7,37	713,661	13,13	974,913	15,10
396,420	13,45	543,452	6,82	714,678	13,61	976,699	10,43
397,384	14,45	555,369	9,75	720,544	8,41	984,897	14,75
400,416	13,60	556,530	10,22	736,756	14,05	984,898	14,72
407,319	7,32	556,533	10,22	744,592	11,30	990,944	14,05
413,378	9,93	566,550	7,65	744,596	11,27	991,802	9,48
427,362	8,28	572,525	9,77	756,539	12,17	998,914	15,05
429,332	8,88	597,520	9,33	764,483	8,32	1012,929	15,38
429,374	8,88	620,577	11,37	785,703	12,31	1021,918	9,80
430,378	8,88	647,572	11,38	800,752	13,48	1027,825	15,77
431,388	8,25	654,603	12,60	802,768	14,00	1040,960	16,16

Tabelle 69: Temperaturstabile Schlüsselmetaboliten NTP, positiver Ionenmodus, in Summe 33 Verbindungen, sortiert nach dem  $m/z$ .

$m/z$	RT [min]	$m/z$	RT [min]	$m/z$	RT [min]
104,115	6,2	249,147	10,85	469,237	10,54
129,161	5,71	255,097	10,77	499,337	0,98
132,093	10,94	293,131	1,02	509,099	10,77
143,095	6,17	295,164	0,96	511,373	0,99
144,115	11,02	314,034	7,44	529,139	10,93
169,992	5,03	352,177	10,54	566,257	0,98
170,07	5,34	367,016	6,2	586,312	10,54
184,066	6,21	372,106	10,74	607,119	6,57
200,042	12,96	392,106	10,91	703,401	10,54
230,151	13,47	420,252	6,76	736,395	11,98
235,14	10,49	422,21	6,62	820,466	10,47

Tabelle 70: Temperaturstabile Schlüsselmetaboliten NTP, negativer Ionenmodus, in Summe 12 Verbindungen, sortiert nach dem  $m/z$ .

$m/z$	RT [min]	$m/z$	RT [min]
124,972	4,84	175,061	1,08
122,976	4,73	182,995	5,41
139,999	5,02	187,072	5,53
153,023	4,66	233,066	5,21
155,009	4,44	267,072	5,8
167,938	6,19	175,061	1,08
168,034	6,14	182,995	5,41

## 8.10 Bewertungskriterien der potenziellen Schlüsselmetaboliten

Tabelle 71: Ergebnisse der Auswertung der Kakaoproben unterschiedlicher Herkünfte, Erntejahre und Fermentationsgrade.

$m/z$	Rt [min]	Variationskoeffizient $v$ [%]	Signalflächen-Unterschied $\eta$ fermentierte vs. nicht fermentierter Schalenproben [%]	Konzentrationskriterium [S/N]	Exklusivkriterium
144,081	9,25	15	85	90	6,0
161,107	9,23	12	88	105	4,8
161,107	9,80	14	85	142	8,4
197,081	10,65	59	1437	332	83,0
295,227	11,95	24	242	749	68,1
295,228	12,02	25	138	295	42,1
299,239	10,62	44	734	209	5,0
353,307	11,37	83	356	26	5,2
383,368	13,50	18	105	333	17,5
384,347	13,50	46	35	110	6,1
384,347	14,08	17	105	111	15,9
384,347	12,28	21	309	68	13,6
386,400	14,77	61	96	51	6,4
396,368	13,45	18	90	146	10,4
397,384	14,45	31	301	438	73,0
400,416	13,60	33	275	57	8,1
407,319	7,32	30	143	192	19,2
413,378	9,93	61	1202	7206	18,1
427,362	8,28	85	839	1125	22,1
429,332	8,88	26	144	1696	40,4
430,378	8,88	26	147	603	30,2
431,388	8,25	39	150	70	10,0
452,483	9,93	53	403	54	2,6
469,419	8,93	22	67	23689	13,3
483,431	9,40	8	93	4356	5,7
485,414	8,25	26	68	62	10,3

## Anhang

m/z	Rt [min]	Variationskoeffizient v [%]	Signalflächen-Unterschied $\eta$ fermentierte vs. nicht fermentierter Schalenproben [%]	Konzentrationskriterium [S/N]	Exklusivkriterium
497,416	9,50	20	79	10198	32,4
499,427	8,58	27	124	4346	21,9
525,481	10,08	33	84	4548	23,7
527,462	7,65	44	115	2369	18,4
529,400	7,63	36	124	147	11,3
529,410	9,18	20	154	305	9,5
536,371	9,53	21	94	121	7,1
540,535	10,35	38	110	4610	24,1
540,535	10,63	59	3294	485	30,3
541,437	9,50	24	124	307	15,4
541,437	7,37	26	70	153	17,0
543,452	6,82	36	164	301	12,0
555,369	9,75	25	175	1088	5,8
556,530	10,22	53	2126	1920	51,9
566,550	7,65	47	60	67	9,6
572,525	9,77	78	6149	449	20,4
597,520	9,33	84	4367	126	3,4
620,577	11,37	139	449	375	19,7
647,572	11,38	40	582	634	5,6
654,603	12,60	25	92	251	41,8
656,595	12,50	41	73	134	134,0
658,613	12,75	20	101	925	77,1
668,598	12,25	37	277	427	0,6
680,637	13,50	20	116	273	18,2
684,631	12,70	26	96	189	189,0
686,648	13,13	19	93	3243	108,1
692,637	13,17	22	127	349	10,3
692,637	13,48	42	84	292	32,4
694,652	13,68	21	109	879	16,6
696,650	13,70	20	113	99	19,8
696,654	11,72	18	232	1433	15,1
698,683	15,13	52	338	15	5,0
708,726	13,13	18	99	113	9,4
713,661	13,13	39	143	108	13,5
714,678	13,61	22	92	170	56,7
720,544	8,41	83	9843	304	60,8
736,756	14,05	32	93	31	7,8
744,592	11,30	54	168	208	14,9
756,539	12,17	76	3704	111	37,0
764,483	8,32	74	2005	57	14,3
785,703	12,31	110	3997	579	14,8
800,752	13,48	23	122	13	2,6

## Anhang

m/z	Rt [min]	Variationskoeffizient v [%]	Signalflächen-Unterschied $\eta$ fermentierte vs. nicht fermentierter Schalenproben [%]	Konzentrationskriterium [S/N]	Exklusivkriterium
802,768	14,00	34	111	29	5,8
828,650	10,8	34	225	182	3,1
842,729	12,22	38	396	511	9,6
848,772	9,90	60	186	48	48,0
858,704	11,30	26	190	295	2,1
910,757	11,45	37	46	1030	2,9
940,835	13,48	33	125	160	5,3
942,851	13,93	41	105	548	42,2
944,867	14,50	36	103	154	38,5
946,881	15,10	37	137	18	1,5
956,865	14,00	167	34	5130	96,8
965,856	9,25	26	69	6000	130,4
968,868	13,90	39	102	73	18,3
970,845	12,68	42	53	110	3,2
970,883	14,45	47	98	238	34,0
972,898	15,08	70	79	155	51,7
974,913	15,10	51	140	32	5,3
976,699	10,43	57	92	22	22,0
984,897	14,72	34	118	1024	25,6
990,944	14,05	97	62	28	1,8
991,802	9,48	38	85	23	23,0
998,914	15,05	45	104	87	43,5
1.012,929	15,38	37	191	130	4,2
1.021,918	9,80	21	83	16247	34,9
1.027,825	15,77	48	127	10	3,3
1.040,960	16,16	84	74	14	2,3

## Anhang

Tabelle 72: Bewertungskriterien der Schlüsselmetaboliten NTP, positiver Ionenmodus, in Summe 33 Verbindungen sortiert nach dem  $m/z$ .

$m/z$	Rt [min]	Variationskoeffizient $v$ [%]	Signalflächen-Unterschied $\eta$ fermentierte vs. nicht fermentierter Schalenproben [%]	Konzentrationskriterium [S/N]	Exklusivkriterium
104,115	6,20	89.90	25,78	1699	25,4
129,161	5,71	51.79	64,27	100	4,3
132,093	10,94	66.81	15,44	85	3,0
143,095	6,17	80.21	43,80	31	2,4
144,115	11,02	131.52	11,86	452	50,2
169,992	5,03	41.06	58,96	75	3,3
170,070	5,34	42.09	71,45	88	0,6
184,066	6,21	80.89	63,87	2511	16,2
200,042	12,96	74.27	81,77	98	1,2
230,151	13,47	90.11	33,69	86	6,1
235,140	10,49	75.04	3,16	4577	69,3
249,147	10,85	85.47	28,57	25	6,3
255,097	10,77	78.15	16,16	43	8,6
293,131	1,02	65.96	63,34	39	1,9
295,164	0,96	72.18	36,67	35	2,9
314,034	7,44	87.35	143,77	478	8,1
352,177	10,54	103.67	0,36	1224	174,9
367,016	6,20	81.45	197,37	94	7,8
372,106	10,74	116.34	10,41	17	2,8
392,106	10,91	72.92	12,39	20	1,5
420,252	6,76	58.44	9,81	245	10,2
422,210	6,62	50.52	1,78	399	17,3
469,237	10,54	103.45	0,74	531	106,2
499,337	0,98	40.61	232,67	205	18,6
509,099	10,77	93.72	82,93	8	1,1
511,373	0,99	54.44	161,86	1892	54,1
529,139	10,93	70.34	37,27	9	1,1
566,257	0,98	223.04	19,40	1142	103,8
586,312	10,54	111.42	1,76	212	42,4
607,119	6,57	35.63	83,05	90	7,5
703,401	10,54	116.10	5,39	100	10,0
736,395	11,98	74.52	2,40	876	24,3
820,466	10,47	134.66	69,49	42	1,7

Tabelle 73: Bewertungskriterien der Schlüsselmetaboliten NTP, negativer Ionenmodus, in Summe 12 Verbindungen sortiert nach dem m/z.

m/z	Rt [min]	Variationskoeffizient v [%]	Signalflächen-Unterschied $\eta$ fermentierte vs. nicht fermentierter Schalenproben [%]	Konzentrationskriterium [S/N]	Exklusivkriterium
122,976	4,73	48.88	4,59	772	8,4
124,972	4,84	72.19	5,10	1479	30,2
139,999	5,02	74.41	5,50	225	32,1
153,023	4,66	58.32	139,80	145	6,0
155,009	4,44	75.93	518,08	62	2,5
167,938	6,19	117.05	44,70	554	16,3
168,034	6,41	116.67	5,70	507	11,5
175,061	1,08	62.06	22,10	242	12,1
182,995	5,41	46.89	14,17	290	10,0
187,072	5,53	89.16	13,99	41	6,8
233,066	5,21	139.87	46,99	24	6,0
267,072	5,80	117.29	367,10	294	12,8

## 8.11 Detektionsparameter der TNP-Methode

Tabelle 74: Einstellungen des Massenspektrometers für die TNP Methode im MRM-Modus.

Massenübergänge	Precursor [m/z]	Fragment [m/z]	Dwell Time [msec]	DP [V]	EP [V]	CE [V]	CXP [V]
QNT $\alpha$ -Tocomonoenol	429 ,245	165 ,1	20	81	10	10	29
QAL1 $\alpha$ -Tocomonoenol	429 ,245	205 ,1	20	81	10	10	29
QNT Heneicosansäuretryptamid	469 ,419	143 ,9	20	106	10	10	39
QAL1 Heneicosansäuretryptamid	469 ,419	161 ,1	20	106	10	10	27
QNT Behensäuretryptamid	483 ,227	143 ,9	20	106	10	10	39
QAL1 Behensäuretryptamid	483 ,227	161 ,1	20	106	10	10	27
QNT Heneicosansäure-5-hydroxy-tryptamid	485 ,41	160	20	101	10	10	49
QAL1 Heneicosansäure-5-hydroxy-tryptamid	485 ,41	159 ,6	20	101	10	10	49
QNT Tricosansäuretryptamid	497 ,447	143 ,9	20	106	10	10	39
QAL1 Tricosansäuretryptamid	497 ,447	161 ,1	20	106	10	10	27
QNT Behensäure-5-hydroxy-tryptamid	499 ,427	160	20	101	10	10	49
QAL1 Behensäure-5-hydroxy-tryptamid	499 ,427	159 ,6	20	101	10	10	49
QNT Lignocerinsäuretryptamid	511 ,462	143 ,9	20	106	10	10	39
QAL1 Lignocerinsäuretryptamid	511 ,462	161 ,1	20	106	10	10	27
QNT Pentacosansäuretryptamid	525 ,457	143 ,9	20	106	10	10	39



## Anhang

Massenübergänge	Precursor [m/z]	Fragment [m/z]	Dwell Time [msec]	DP [V]	EP [V]	CE [V]	CXP [V]
QAL1 Pentacosansäuretryptamid	525 ,457	161 ,1	20	106	10	10	27
QNT Lignocerinsäure-5-hydroxy-tryptamid	527 ,457	160	20	101	10	10	49
QAL1 Lignocerinsäure-5-hydroxy-tryptamid	527 ,457	159 ,6	20	101	10	10	49
QNT Cerotinsäuretryptamid	539 ,49	143 ,9	20	106	10	10	39
QAL1 Cerotinsäuretryptamid	539 ,49	161 ,1	20	106	10	10	27
QNT Dihydroceramide (d18:0/16:0)	540 ,359	522 ,5	20	71	10	10	29
QAL1 Dihydroceramide (d18:0/16:0)	540 ,359	284 ,2	20	71	10	10	41
QNT Pentacosansäure-5-hydroxy-tryptamid	541 ,472	160	20	101	10	10	49
QAL1 Pentacosansäure-5-hydroxy-tryptamid	541 ,472	159 ,6	20	101	10	10	49
QNT Cerotinsäure-5-hydroxy-tryptamid	555 ,488	160	20	101	10	10	49
QAL1 Cerotinsäure-5-hydroxy-tryptamid	555 ,488	159 ,6	20	101	10	10	49
QNT α-Tocopherolmyristat	658 ,613	641 ,58	20	211	10	10	23
QAL1 α-Tocopherolmyristat	658 ,613	149 ,2	20	211	10	10	45
QNT α-Tocopherolpalmitat	686 ,444	669 ,6	20	211	10	10	23
QAL1 α-Tocopherolpalmitat	686 ,444	149 ,2	20	211	10	10	45
QAL1 Cer(d25:0(OH)/18:0(3OH))	696 ,65	678 ,6	20	71	10	10	17
QNT Cer(d25:0(OH)/18:0(3OH))	696 ,65	280 ,3	20	71	10	10	39
QNT TG(18:2/22:0/18:2)	956 ,864	263 ,2	20	141	10	10	55
QAL1 TG(18:2/22:0/18:2)	956 ,864	600 ,51	20	141	10	10	33
QANT TG(22:1/18:0/20:3)	984 ,895	263 ,2	20	141	10	10	55
QAL1 TG(22:1/18:0/20:3)	984 ,895	600 ,51	20	141	10	10	33

\*DP: declustering potential; EP: entrance potential; CE: collision energy; CXP: collision cell exit potential

## 8.12 Stammlösungen und Validierungsparameter

Tabelle 75: Stammlösungen.

Verbindung	Molare Masse [g/mol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Stoffmenge [mmol]	Konzentration [mmol/L]
Behensäuretryptamid	482,78	9,72	10	0,0201	2,013
Dihydroceramide (d18:0/16:0)	539,917	6,7	5	0,0124	2,482
16:0(2S-OH) Ceramide	553,9	4,75	5	0,0086	1,715
Docosahexaenoyl-5-hydroxy-tryptamid	486,7	5	0,5	0,0108	21,612
$\alpha$ -Tocopherolpalmitat	669,11	23,26	10	0,0348	3,476
Triolein	885,43	16,65	10	0,0188	1,880

Tabelle 76: Herstellung und Zusammensetzung des Multistandard I.

Verbindung	Volumen Stammlösung [mL]	Konzentration im Multistandard I [ $\mu$ mol/L]
Behensäuretryptamid	0,993	200
Dihydroceramide (d18:0/16:0)	0,806	200
16:0(2S-OH) Ceramide	1,166	200
Docosahexaenoyl-5-hydroxy-tryptamid	0,093	200
$\alpha$ -Tocopherolpalmitat	0,575	200
Triolein	1,064	200
Ad. 10 mL Isopropanol		

Tabelle 77: Herstellung und Zusammensetzung des Multistandard II.

Verbindung	Volumen Multistandard I [ $\mu$ L]	Konzentration im Multistandard I [ $\mu$ mol/L]
Behensäuretryptamid	10	2
Dihydroceramide (d18:0/16:0)	10	2
16:0(2S-OH) Ceramide	10	2
Docosahexaenoyl-5-hydroxy-tryptamid	10	2
$\alpha$ -Tocopherolpalmitat	10	2
Triolein	10	2
Ad. 10 mL Isopropanol		

## Anhang

Tabelle 78: Herstellung und Zusammensetzung des Multistandard III.

Verbindung	Volumen Multistandard I [ $\mu\text{L}$ ]	Konzentration im Multistandard I [ $\mu\text{mol/L}$ ]
Behensäuretryptamid	10	0,02
Dihydroceramide (d18:0/16:0)	10	0,02
16:0(2S-OH) Ceramide	10	0,02
Docosahexaenoyl-5-hydroxy-tryptamid	10	0,02
$\alpha$ -Tocopherolpalmitat	10	0,02
Triolein	10	0,02
Ad. 10 mL Isopropanol		

Tabelle 79: Pipettierschema und resultierende Konzentrationen der Grundkalibrierung.

Standard	Konzentration Multistandard [ $\mu\text{M}$ ]	Volumen Multistandard [ $\mu\text{L}$ ]	Volumen Extraktionsmittel [ $\mu\text{L}$ ]	Konzentration der Analyten im Standard [ $\mu\text{M}$ ]
Standard 1	0,02	10	990	0,0002
Standard 2	0,02	10	490	0,0004
Standard 3	0,02	15	485	0,0006
Standard 4	0,02	20	480	0,0008
Standard 5	0,02	25	475	0,001
Standard 6	0,02	50	450	0,002
Standard 7	0,02	100	400	0,004
Standard 8	0,02	150	350	0,006
Standard 9	0,02	200	300	0,008
Standard 10	0,02	250	250	0,01
Standard 11	2	10	990	0,02
Standard 12	2	10	490	0,04
Standard 13	2	15	485	0,06
Standard 14	2	20	480	0,08
Standard 15	2	25	475	0,1
Standard 16	2	50	450	0,2
Standard 17	2	100	400	0,4
Standard 18	2	150	350	0,6
Standard 19	2	200	300	0,8
Standard 20	2	250	250	1,0

Tabelle 80: Pipettierschema und resultierende Konzentrationen der Matrixkalibrierung.

Standard	Konzentration Multistandard [ $\mu\text{M}$ ]	Volumen Multistandard [ $\mu\text{L}$ ]	Volumen Matrixlösung [ $\mu\text{L}$ ]	Volumen Extraktionslösung [ $\mu\text{L}$ ]	Konzentration der Analyten im Standard [ $\mu\text{M}$ ]
Standard 1	0,02	10	500	490	0,0002
Standard 2	0,02	10	250	240	0,0004
Standard 3	0,02	15	250	235	0,0006
Standard 4	0,02	20	250	230	0,0008
Standard 5	0,02	25	250	225	0,001
Standard 6	0,02	50	250	200	0,002
Standard 7	0,02	100	250	150	0,004
Standard 8	0,02	150	250	100	0,006
Standard 9	0,02	200	250	50	0,008
Standard 10	0,02	125	125	0	0,01
Standard 11	2	10	250	740	0,02
Standard 12	2	10	250	240	0,04
Standard 13	2	15	250	235	0,06
Standard 14	2	20	250	230	0,08
Standard 15	2	25	250	225	0,1
Standard 16	2	50	250	200	0,2
Standard 17	2	100	250	150	0,4
Standard 18	2	150	250	100	0,6
Standard 19	2	200	250	50	0,8
Standard 20	2	250	250	0	1,0

### 8.13 Kakaoschalen-Kalibrierreihen

Tabelle 81: Herstellung der Kakaoschalen-Verdünnungsreihe nach Variante 1.

<b>Standard</b>	<b>Einwaage Schale [g]</b>	<b>Einwaage Kern [g]</b>	<b>Kakaoschalen-Gehalt [%]</b>
Standard 0	0	5,000	0
Standard 1	0,050	4,950	1,00
Standard 2	0,104	4,902	2,08
Standard 3	0,150	4,852	3,00
Standard 4	0,201	4,803	4,02
Standard 5	0,251	4,749	5,01
Standard 6	0,302	4,702	6,04
Standard 7	0,350	4,652	6,99
Standard 8	0,400	4,605	7,98
Standard 9	0,450	4,552	9,00
Standard 10	0,500	4,499	10,00

## Anhang

Tabelle 82: Herstellung der Kakaoschalen-Verdünnungsreihe nach Variante 2.

Probe	Schale [mg]	Kern [mg]	Gehalt [%]	Probe	Schale [mg]	Kern [mg]	Gehalt [%]	Probe	Schale [mg]	Kern [mg]	Gehalt [%]
1_1	0	51,17	0	6_1	1,45	54,15	2,68	11_1	2,45	47,17	5,19
1_2	0	50,62	0	6_2	1,45	51,47	2,82	11_2	2,42	47,37	5,11
1_3	0	49,81	0	6_3	1,15	48,11	2,39	11_3	2,54	48	5,29
1_4	0	49,14	0	6_4	1,22	48,6	2,51	11_4	2,38	50,06	4,75
1_5	0	50,92	0	6_5	1,43	48,75	2,93	11_5	2,62	49,19	5,33
2_1	0,19	48,6	0,39	7_1	1,44	48,46	2,97	12_1	2,69	46,7	5,76
2_2	0,27	50,25	0,54	7_2	1,51	48,87	3,09	12_2	2,76	47,68	5,79
2_3	0,18	49,17	0,37	7_3	1,56	48,69	3,20	12_3	2,92	49,38	5,91
2_4	0,25	49,51	0,50	7_4	1,54	49,65	3,10	12_4	2,65	47,22	5,61
2_5	0,22	49,92	0,44	7_5	1,57	49,86	3,15	12_5	2,58	47,97	5,38
3_1	0,53	49,61	1,07	8_1	1,69	48,05	3,52	13_1	2,65	47,53	5,58
3_2	0,55	49,97	1,10	8_2	1,66	48,28	3,44	13_2	2,93	47,32	6,19
3_3	0,55	50,85	1,08	8_3	1,64	48,69	3,37	13_3	3,07	46,92	6,54
3_4	0,58	49,04	1,18	8_4	1,92	48,14	3,99	13_4	2,87	47,03	6,10
3_5	0,65	54,84	1,19	8_5	1,79	49,62	3,61	13_5	3,18	47,15	6,74
4_1	0,94	51,01	1,84	9_1	1,89	47,81	3,95	14_1	3,22	48,5	6,64
4_2	0,72	49,08	1,47	9_2	2,07	49,81	4,16	14_2	3,08	47,93	6,43
4_3	0,65	49,5	1,31	9_3	2,07	48,62	4,26	14_3	3,35	46,65	7,18
4_4	0,71	50,21	1,41	9_4	2,06	47,77	4,31	14_4	3,07	46,28	6,63
4_5	0,64	48,57	1,32	9_5	1,97	47,97	4,11	14_5	3,25	48,15	6,75
5_1	0,93	50,23	1,85	10_1	2,43	51,4	4,73	15_1	3,72	46,73	7,96
5_2	1,2	49,29	2,43	10_2	2,44	48,52	5,03	15_2	3,79	47,8	7,93
5_3	0,92	50,57	1,82	10_3	2,11	47,41	4,45	15_3	3,59	56,07	6,40
5_4	0,94	49,11	1,91	10_4	2,26	49,69	4,55	15_4	3,43	48,27	7,11
5_5	1,15	48,78	2,36	10_5	2,35	47,97	4,90	15_5	3,64	46,74	7,79

## Anhang

Tabelle 83: Herstellung der Kakaoschalen-Verdünnungsreihe im Konzentrationsbereich 0-100 %.

Kalibrier-Standard	Kakaoschale [mg]	Kakaokern [mg]	Kakaoschalengehalt [%]
0_1	0	50,10	0,00
0_2	0	50,21	0,00
0_3	0	50,05	0,00
1_1	4,90	44,84	9,85
1_2	5,45	44,24	10,97
1_3	4,78	44,73	9,65
2_1	11,41	40,75	21,88
2_2	9,90	40,37	19,69
2_3	11,13	41,16	21,29
3_1	16,12	34,76	31,68
3_2	14,70	35,91	29,05
3_3	13,87	37,87	26,81
4_1	21,00	32,00	39,62
4_2	20,88	33,37	38,49
4_3	20,30	30,07	40,30
5_1	25,87	29,65	46,60
5_2	26,60	26,90	49,72
5_3	26,34	28,15	48,34
6_1	35,67	14,12	71,64
6_2	35,40	14,71	70,64
6_3	35,09	16,80	67,62
7_1	49,50	0	100,00
7_2	51,30	0	100,00
7_3	50,51	0	100,00

Tabelle 84: Einwaagen der Proben mit bekanntem Kakaoschalengehalt.

Probe	Kakaoschale [mg]	Kakaonibs [mg]	Kakaoschalengehalt [%]
Ghana	10,79	990,1	1,08
Elfenbeinküste	20,11	979,9	2,01
Nigeria	29,80	970,1	2,98
Panama	41,00	959,2	4,10
Indonesien	50,27	950,2	5,02
Ecuador	60,71	941,3	6,06
Madagaskar	73,16	934,5	7,26
Venezuela	82,03	1039,3	7,32

## 8.14 PLS-R Modelle

Tabelle 85: Parameter zur Berechnung der PLS-R (Analyse).

Parameter		Einstellungen
X-Werte		Fläche der potenziellen Schlüsselmetabolit Signale (keine Gewichtung)
Y-Werte		Konzentration der Kalibrierreihe
Datenvorbehandlung		<i>mean-centering</i> <sup>226</sup>
Validierung		<i>random cross-validation</i> , mit 20 Segmenten und je 20 Proben pro Segment
Algorithmus		NIPALS
Warning limits	<i>Leverage limit</i>	3,0,0
	<i>Sampler Outlier Limit, Calibration</i>	3,0
	<i>Sampler Outlier Limit, Validation</i>	3,0
	<i>Individual Value Outlier, Calibration</i>	3,0
	<i>Individual Value Outlier, Validation</i>	2,6
	<i>Variable Outlier Limit, Calibration</i>	3,0
	<i>Variable Outlier Limit, Validation</i>	3,0
	<i>Total Explained Variance [%]</i>	20
	<i>Ratio of Calibrated to Validated Residual Variance</i>	0,5
	<i>Ratio of Validated to Calibrated Residual Variance</i>	0,75
	<i>Residual Variance Increase Limit [%]</i>	6,0

Tabelle 86: Parameter zur Berechnung der Vorhersage.

Parameter		Einstellung
<i>Prediction</i>		<i>Identify outliers</i>
Warning limits	<i>Leverage limit</i>	3,0
	<i>Sampler Outlier Limit, Validation</i>	2,6
	<i>Individual Value Outlier, Validation</i>	3,0
	<i>Total Explained Variance [%]</i>	20



## 8.15 Formelsammlung

### Berechnung des Mittelwerts

Mit Hilfe von Gleichung 7 lässt sich das arithmetische Mittel berechnen <sup>(227)</sup>.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i \quad 7$$

In Gleichung 7 sind:

Größe	Einheit	Beschreibung
$\bar{x}$	Entspricht der Einheit von $x_i$	Arithmetisches Mittel
$n$		Anzahl der Messwerte
$i$		Summationsindex
$x_i$	variabel	$i$ -tes Element der Messreihe

### Berechnung der Standardabweichung

Die Standardabweichung  $s$  errechnet sich mittels Gleichung 8 <sup>(227)</sup>.

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad 8$$

In Gleichung 8 sind:

Größe	Einheit	Beschreibung
$s$	Entspricht der Einheit von $x_i$	Standardabweichung
$x_i$	variabel	$i$ -tes Element der Messreihe
$\bar{x}$	Entspricht der Einheit von $x_i$	Arithmetisches Mittel
$n$		Anzahl der Messwerte

*Berechnung des Variationskoeffizient*

Der Variationskoeffizient  $v$  errechnet sich mittels Gleichung 9 <sup>(227)</sup>.

$$v = \frac{s}{x_i} \cdot 100 \% \quad 9$$

In Gleichung 9 sind:

Größe	Einheit	Beschreibung
$v$	[%]	Variationskoeffizient
$s$	Entspricht der Einheit von $x_i$	Standardabweichung
$x_i$	variabel	i-tes Element der Messreihe

*Berechnung des relativen Unterschieds*

Der relative Unterschied  $\eta$  zwischen zwei Probenpopulationen errechnet sich mittels Gleichung 10.

$$\eta = \frac{\bar{A}_f}{\bar{A}_{nf}} \cdot 100 \% \quad 10$$

In Gleichung 10 sind:

Größe	Einheit	Beschreibung
$\eta$	[%]	Relatives Verhältnis
$\bar{A}_f$		Arithmetisches Mittels der Signalflächen eines Signals von Proben fermentierter Kakaobohnen
$\bar{A}_{nf}$		Arithmetisches Mittels der Signalflächen eines Signals von Proben nicht fermentierter Kakaobohnen

*Berechnung der Skalierung*

Die Skalierung der Intensitäten erfolgte nach dem interquartilen Verhältnis <sup>(85)</sup>:

$$I_{\text{skal}} = \frac{I_i - M}{Q_3 - Q_1} + 4 \quad 11$$

In Gleichung 11 sind:

Größe	Einheit	Beschreibung
$I_{\text{skal}}$	[Skt]	Skalierte Intensität
$I_i$	[Skt]	Intensität der Verbindung i
M	[Skt]	Median
$Q_1$	[Skt]	Unteres (erstes) Quartil
$Q_3$	[Skt]	Oberes (drittes) Quartil
4		Konstante

*Berechnung der linearen Regression*

Die lineare Regression stellt die Abhängigkeit zweier Variablen über das Prinzip der kleinsten Fehlerquadrate in einen linearen Zusammenhang. Die daraus resultierende Regressionsgerade kann durch Gleichung 12 beschrieben werden.

$$y = m \cdot x + b \quad 12$$

In Gleichung 12 sind:

Größe	Einheit	Beschreibung
y	[counts]	Signalfläche
m	[counts/ $\mu\text{M}$ ]	Steigung der Regressionsgerade (Empfindlichkeit)
x	[ $\mu\text{M}$ ]	Konzentration der Probe
b	[counts]	Ordinatenabschnitt der Regressionsgerade (mittleres Begleitsignal)

*Berechnung der quadratischen Regression*

Die quadratische Regression stellt die Abhängigkeit zweier Variablen über das Prinzip der kleinsten Fehlerquadrate in einen quadratischen Zusammenhang. Die daraus resultierende Regressionskurve kann durch Gleichung 13 beschrieben werden

$$y = a \cdot x^2 + b \cdot x + c \quad 13$$

In Gleichung 13 sind:

Größe	Einheit	Beschreibung
y	[counts]	Signalfläche
a	[counts/ $\mu\text{M}$ ]	Steigung der Regressionskurve
x	[ $\mu\text{M}$ ]	Konzentration der Probe
b	[counts/ $\mu\text{M}^1$ ]	Abzissenabschnitt der Regressionskurve
c	[counts]	Ordinatenabschnitt der Regressionskurve

*Test auf Normalverteilung nach DAVID*

Der Test auf Normalverteilung nach DAVID gibt Auskunft darüber, ob bei einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit bei den erhaltenen Messwerten eine Normalverteilung vorliegt, welche für diverse statistische Verfahren Grundvoraussetzung ist. Ist der errechnete Prüfwert kleiner als der entsprechende Tabellenwert (Tabelle für den Test auf Normalverteilung nach DAVID)<sup>228</sup>, liegt bei den Messwerten mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % eine Normalverteilung vor.

$$PG = \frac{V}{s} \quad 14$$

In Gleichung 14 sind:

Größe	Einheit	Beschreibung
PG	-	Prüfgröße ( $\alpha=0,05$ )
V	-	Variationsbreite
s	-	Standardabweichung

*Ausreißertest nach DEAN und DIXON*

Ein Ausreißer stellt einen Wert dar, der sich stark von den übrigen Werten der Reihe unterscheidet, sodass es sich nicht mehr um eine statistische Abweichung handelt. Voraussetzung für die Durchführung des Ausreißertests ist die Normalverteilung der Messwerte, welche aus mehr als drei Werten bestehen müssen. Ist der errechnete Prüfwert größer als der entsprechende Tabellenwert (Tabelle zum Ausreißertest nach DEAN und DIXON) <sup>228</sup>, handelt es sich bei dem Messwert mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % um einen Ausreißer. Zur Ermittlung des Tabellenwertes gilt der Freiheitsgrad  $f = n - 2$ .

$$PG = \frac{|x_1 - x_2|}{|x_1 - x_n|} \quad 15$$

In Gleichung 15 sind:

Größe	Einheit	Beschreibung
PG	-	Prüfgröße ( $\alpha=0,05$ )
$x_1$	-	kleinster / größter Wert
$x_2$	-	nächstliegender Wert zu $x_1$
$x_n$	-	Weit entferntester Wert zu $x_1$

*Berechnung der Reststandardabweichung der linearen Regression*

Die Reststandardabweichung ist eine Größe für die Abweichung bzw. Streuung der Kalibrierpunkte in Bezug zu der Regressionsgerade.

$$S_{LR} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_{L,i})^2}{n-2}} \quad 16$$

In Gleichung 16 sind:

Größe	Einheit	Beschreibung
$S_{LR}$	[counts]	Reststandardabweichung der linearen Regression
$y_i$	[counts]	Gemessene Peakfläche an Stelle i
$\hat{y}_{L,i}$	[counts]	Berechnete Peakfläche (mittels linearer Regessiongerade) an Stelle i
n	-	Anzahl der Messwerte

*Berechnung der Reststandardabweichung der quadratischen Regression*

Die Reststandardabweichung ist eine Größe für die Abweichung bzw. Streuung der Kalibrierpunkte in Bezug zu der Regressionskurve.

$$S_{QR} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_{Q,i})^2}{n-3}} \quad 17$$

In Gleichung 17 sind:

Größe	Einheit	Beschreibung
$S_{LQ}$	[counts]	Reststandardabweichung der quadratischen Regression
$y_i$	[counts]	Gemessene Peakfläche an Stelle i
$\hat{y}_{Q,i}$	[counts]	Berechnete Peakfläche (mittels quadratischer Regressionskurve) an Stelle i
n	-	Anzahl der Messwerte

*Ausreißertest für lineare Funktionen*

Ein Ausreißer innerhalb einer linearen Regression stellt einen Wert dar, dessen Abweichung so groß ist, dass es sich nicht mehr um eine statistische Abweichung handelt. Sobald die berechnete Prüfgröße größer als der entsprechende Tabellenwert (Tabelle zur F-Verteilung)<sup>228</sup>, handelt es sich bei dem Messwert mit einer Wahrscheinlichkeit von 99 % um einen Ausreißer. Bei den durchgeführten Versuchen gelten die Freiheitsgrade  $f_1 = 1$  und  $f_2 = n - 3$  zur Bestimmung des Tabellenwertes.

$$PG = \frac{((n-2) \cdot S_{R1}^2 - (n-3) \cdot S_{R2}^2)}{S_{R2}^2} \quad 18$$

In Gleichung 18 sind:

Größe	Einheit	Beschreibung
PG	-	Prüfgröße ( $\alpha=0,01$ )
n	-	Anzahl der Kalibrierpunkte

$S_{R1}^2$	[counts]	Reststandardabweichung der linearen Regression mit dem potenziellen Ausreißer
$S_{R2}^2$	[counts]	Reststandardabweichung der linearen Regression ohne den potenziellen Ausreißer

*Linearitätstest nach Mandel*

Anhand des Linearitätstests nach MANDEL wird geprüft, ob die lineare Regression signifikant besser ist als die quadratische Regression und somit angewendet werden kann.

Hierbei wird die Reststandardabweichung der beiden Regressionen miteinander verglichen und zur Berechnung der Prüfgröße herangezogen. Liegt die berechnete Prüfgröße (PG) unterhalb des entnommenen Tabellenwertes (Tabelle zur F-Verteilung)<sup>228</sup>, ist die lineare Regression mit einer Wahrscheinlichkeit von 99 % der quadratischen Regression vorzuziehen. Für die Bestimmung des Tabellenwertes werden die Freiheitsgrade  $f_1 = 1$  und  $f_2 = n - 3$  herangezogen.

$$PG = \frac{((n-2) \cdot S_R^2 - (n-3) \cdot S_{QR}^2)}{S_{QR}^2} \quad 19$$

In Gleichung 19 sind:

Größe	Einheit	Beschreibung
PG	-	Prüfgröße
n	-	Anzahl der Kalibrierpunkte
$S_R^2$	[counts]	Reststandardabweichung der linearen Regression mit dem potenziellen Ausreißer
$S_{QR}^2$	[counts]	Reststandardabweichung der quadratischen Regression ohne den potenziellen Ausreißer

*Berechnung des Bestimmtheitsmaß*

Das Bestimmtheitsmaß gibt ist ein Maß zur Beurteilung der Anpassungsgüte einer Regression. Anhand des Bestimmtheitsmaßes lässt sich die Abweichung der Regression zu den Messwerten abschätzen.

$$R^2 = \left( \frac{\sum (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \cdot (y_i - \bar{y})^2}} \right)^2 \quad 20$$

In Gleichung 20 sind:

Größe	Einheit	Beschreibung
$R^2$	-	Bestimmtheitsmaß
$X_i$	[ $\mu\text{Mol}$ ]	Konzentration an Stelle i
$\bar{x}$	[ $\mu\text{Mol}$ ]	Mittelwert der Konzentration
$y_i$	[counts]	Peakfläche an Stelle i
$\bar{y}$	[counts]	Mittelwert der Peakflächen

*Berechnung der Verfahrensstandardabweichung*

Die Verfahrensstandardabweichung gibt die Leistungsfähigkeit des Messverfahrens an.

$$S_V \frac{S_R}{m} \quad 21$$

In Gleichung 21 sind:

Größe	Einheit	Beschreibung
$S_V$	[ $\mu\text{Mol}$ ]	Verfahrensstandardabweichung
$S_R$	[counts]	Reststandardabweichung
$m$	[counts/ $\mu\text{Mol}$ ]	Empfindlichkeit (Steigung der Regressionsgerade)



*Berechnung des Verfahrensvariationskoeffizient*

Der Verfahrensvariationskoeffizient ist ein relatives Maß für die Präzision einer Messmethode.

$$VK_V = \frac{S_V}{\bar{x}} \cdot 100 \% \quad 22$$

In Gleichung 22 sind:

Größe	Einheit	Beschreibung
$VK_V$	[%]	Verfahrensvariationskoeffizient
$S_V$	[ $\mu\text{Mol}$ ]	Verfahrensstandardabweichung
$\bar{x}$	[ $\mu\text{Mol}$ ]	Mittelwert der Konzentration

*Berechnung der Wiederholgrenze*

Die Wiederholbarkeit gibt die maximale Differenz zwischen zwei Messwerten an, die bei der Wiederholung einer Messung akzeptabel ist.

$$r = S_V \cdot 2 \quad 23$$

In Gleichung 23 sind:

Größe	Einheit	Beschreibung
$r$	[ $\mu\text{Mol}$ ]	Wiederholgrenze
$S_V$	[ $\mu\text{Mol}$ ]	Verfahrensstandardabweichung

*Berechnung der Nachweisgrenze nach der Leerwertmethode*

Die Nachweisgrenze ist die niedrigste Analytkonzentration, die bei einer einmaligen Messung qualitativ nachgewiesen werden kann. Für die Berechnung wird der Tabellenwert aus dem Tabelle für die Student-t-Verteilung mit n-1 benötigt.<sup>228</sup>

$$NWG = \frac{s \cdot t \cdot \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n}}}{m} \quad 24$$

In Gleichung 24 sind:

<b>Größe</b>	<b>Einheit</b>	<b>Beschreibung</b>
NWG	[µMol]	Nachweisgrenze
s	[counts]	Standardabweichung
t	-	Tabellenwert aus einseitiger t-Tabelle für n-1
p	-	Anzahl an Parallelbestimmungen der Kalibrierreihe
n	-	Anzahl der Blindproben
m	[counts/µMol]	Empfindlichkeit (Steigung der Regressionsgerade)

*Berechnung der Bestimmungsgrenze*

Die Bestimmungsgrenze ist die niedrigste Analytkonzentration, die bei einer einmaligen Messung quantitativ nachgewiesen werden kann.

$$BG = NWG \cdot 3 \quad 25$$

In Gleichung 25 sind:

Größe	Einheit	Beschreibung
BG	[µMol]	Bestimmungsgrenze
NWG	[µMol]	Nachweisgrenze

*Berechnung des Variationskoeffizienten*

Der Variationskoeffizient ist ein relatives Maß für die Streuung der Messwerte.

$$VK = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \% \quad 26$$

In Gleichung 26 sind:

Größe	Einheit	Beschreibung
VK	[%]	Variationskoeffizient
s	[µMol]	Standardabweichung
$\bar{x}$	[µMol]	Mittelwert der Konzentration

## 9 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde. In diese Arbeit eingebrachte Ergebnisse aus Praktika und Projektstudien entstammen meiner Anleitung.

Hamburg, den 17.07.2020

---

Nicolas Cain