



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt

Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität

Untersuchungen zur Chiralität und Isomerisierung von Hopfenbitterstoffen

Richard Franz-Xaver Plapperer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Th. Becker

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. M. Coelhan

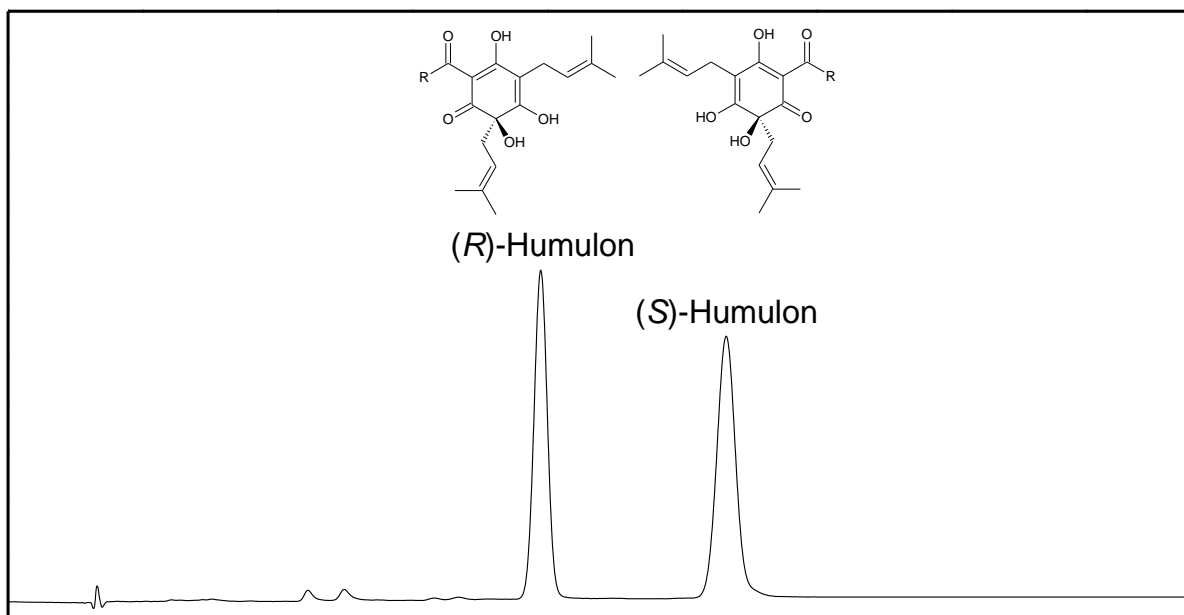
2. Univ.-Prof. Dr. M. Rychlik

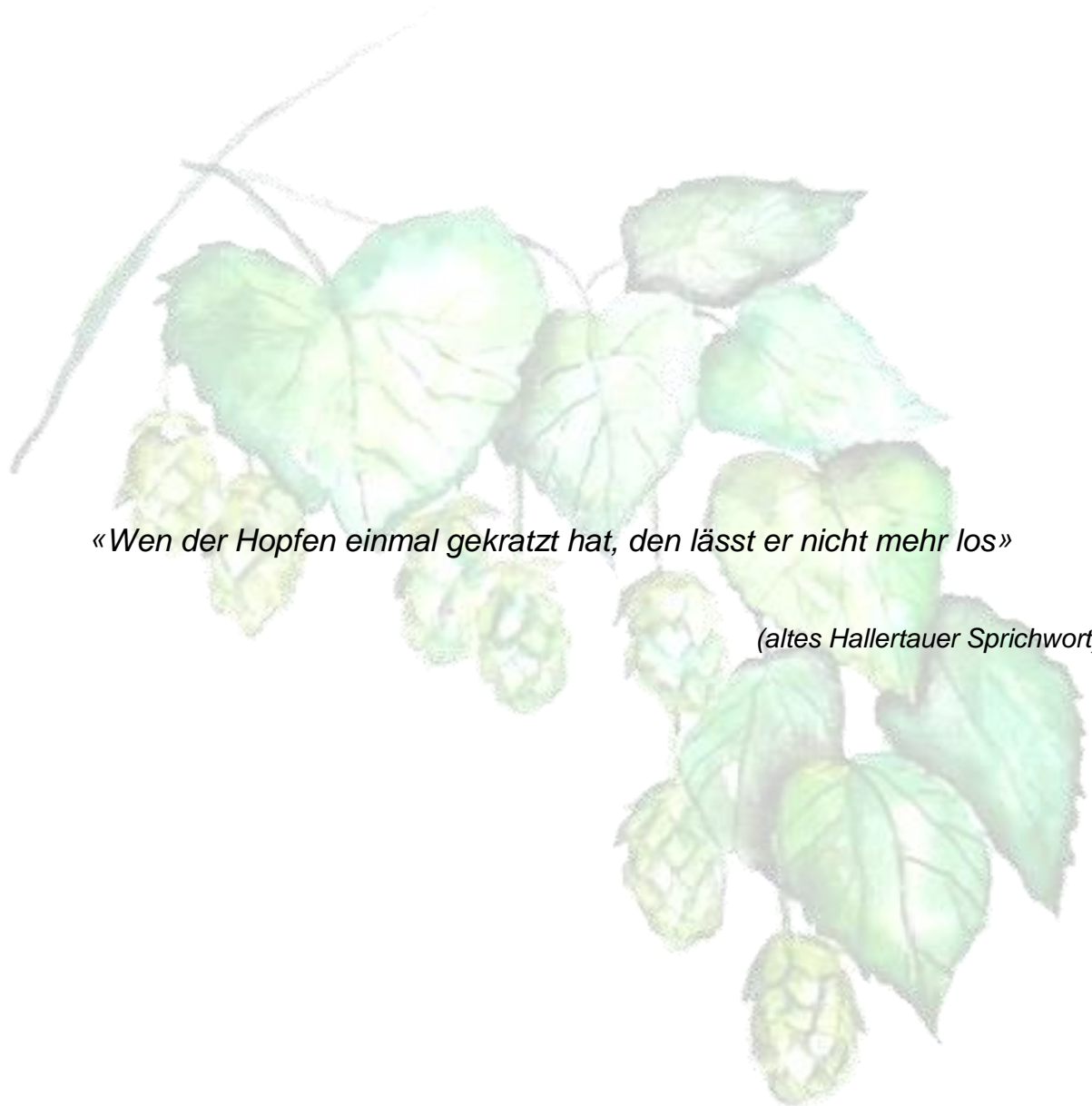
Die Dissertation wurde am 23.09.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 27.01.2015 angenommen.

UNTERSUCHUNGEN ZUR CHIRALITÄT UND ISOMERISIERUNG VON HOPFENBITTERSTOFFEN

von

Richard Franz-Xaver Plapperer





«Wen der Hopfen einmal gekratzt hat, den lässt er nicht mehr los»

(altes Hallertauer Sprichwort)

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen 2009 und 2014 unter der Leitung von apl. Prof. Dr. Mehmet Coelhan am *Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität* angefertigt. Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Coelhan für die Überlassung des hochinteressanten Themas sowie für das in mich gesetzte Vertrauen.

Bei der Firma *Simon H. Steiner Hopfen GmbH*, insbesondere bei Herrn Sandro Cocuzza, möchte ich mich für die nette Zusammenarbeit und die stets unkomplizierte Versorgung mit Hopfenprodukten bedanken.

Ein herzlicher Dank gebührt außerdem allen Mitarbeitern des *Forschungszentrums Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität* sowie des (ehemaligen) *Lehrstuhls für Chemisch-Technische Analyse und Chemische Lebensmitteltechnologie*, die zum guten Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Während meiner Promotion wurde unter meiner Betreuung u.a. eine Bachelorarbeit mit dem Titel „Einfluss von Katalysatoren auf die Isomerisierung von Hopfenbitterstoffen“ angefertigt. Für ihre ausgezeichnete Arbeit und ihr Engagement möchte ich mich herzlich bei Frau Katharina Mühlberger bedanken.

Meiner Familie gilt ein großer Dank für die Ermöglichung meines Studiums sowie für ihre Unterstützung. Last but not least gebührt mein größter Dank Frau Stefanie Sachs für ihre unendliche Geduld und moralische Unterstützung während der gesamten Dauer der Doktorarbeit.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abkürzungen und Symbole	iv
Abbildungs- und Formelverzeichnis	ix
Tabellenverzeichnis	xvii
Begriffsdefinitionen	1
<i>Humulon bzw. n-, co-, ad-, post-, prä- und adprä-Humulon</i>	1
<i>Isomerisierung und Racemisierung</i>	2
1 Einleitung	3
2 Aufgabenstellung	6
3 Theoretischer Teil	8
3.1 <i>Die Botanik und Allgemeines zum Hopfen</i>	8
3.2 <i>Die Inhaltsstoffe und die Chemie des Hopfens</i>	13
3.3 <i>Die Strukturformel von (n-)Humulon</i>	16
3.4 <i>Isomerisierung von Humulon zu Isohumulon</i>	24
3.5 <i>Racemisierung von Humulon</i>	30
3.6 <i>Chirale Trennung</i>	31
3.7 <i>Chirale Detektoren für die HPLC</i>	38
4 Ergebnisse und Diskussion	42
4.1 <i>Analytische RP-HPLC</i>	42
4.2 <i>Präparative RP-HPLC</i>	53
4.3 <i>Chirale HPLC</i>	56
4.4 <i>Isomerisierung von Humulon zu Isohumulon</i>	66
4.4.1 <i>Isomerisierung von racemisiertem Humulon (rac-AS) zu rac-IAS</i>	66
4.4.2 <i>Isomerisierung an fester Phase</i>	68
4.4.3 <i>Isomerisierung in Lösung</i>	73
4.4.4 <i>Einfluss von Katalysatoren auf die Isomerisierung</i>	75
4.4.5 <i>Isomerisierung in MeOH/H₂O/NaOH unter Zugabe von β-Cyclodextrin (β-CD)</i>	82
4.4.6 <i>Isomerisierung im Specksteingefäß</i>	83
4.4.7 <i>Vergleich der unterschiedlichen Isomerisierungsversuche</i>	87
4.5 <i>Racemisierung von (6S)-Humulon</i>	89
4.5.1 <i>Racemisierung in Toluol unter Rückfluss (Referenzversuch)^[22]</i>	89
4.5.2 <i>Temperaturabhängigkeit der Racemisierungs-Geschwindigkeit</i>	92
4.5.3 <i>Racemisierung von Hopfenextrakt bei 32 °C</i>	93
4.5.4 <i>Racemisierung von Hopfenpellets in Wasser</i>	95

4.5.5	Racemisierung von Iso- α -Säuren	96
4.6	<i>Detektion mittels des Polarimeters (OR-Detektion)</i>	97
4.7	<i>Analyse verschiedener Hopfensorten hinsichtlich der AS-Enantiomere</i>	101
4.8	<i>Test von ICE-3 hinsichtlich der Enantiomere</i>	106
4.9	<i>Test von Iso-90 hinsichtlich der Enantiomere</i>	109
4.10	<i>Isolierung der Enantiomere und sensorische Tests</i>	112
4.10.1	α -Säuren	112
4.10.2	Iso- α -Säuren	112
5	Zusammenfassung und Ausblick	115
6	Experimenteller Teil	119
6.1	<i>Verwendete Hopfenprodukte</i>	119
6.2	<i>Chemikalien und Lösemittel</i>	121
6.3	<i>Geräte und Verbrauchsmaterialien</i>	123
6.3.1	HPLC-Anlagen	123
6.3.2	HPLC-Säulen	125
6.3.3	Arbeits- und Messgeräte	128
6.3.4	Verbrauchs- und sonstiges Labormaterialien	128
6.4	<i>HPLC-Methoden</i>	131
6.5	<i>Isomerisierung von Humulon</i>	133
6.5.1	Isomerisierung von Hopfenextrakt in Phosphatpuffer	133
6.5.2	Isomerisierung von racemisiertem Humulon (rac-AS).....	134
6.5.3	Isomerisierung an fester Phase	134
6.5.3.1	<i>Isomerisierung an Aluminiumoxid (sauer, neutral und basisch), Kieselgel, Kieselgur, Florisil® und Aktivkohle</i>	134
6.5.3.2	<i>Temperaturabhängigkeit der Isomerisierung an Florisil®</i>	135
6.5.4	Isomerisierung in Lösung (KOH- bzw. NaOH-Lösung, basische und sonstige organische Lösemittel)	137
6.5.5	Einfluss von Katalysatoren auf die Isomerisierung	139
6.5.5.1	<i>Isomerisierung in flüssiger Phase: Diverse Salze und Oxide als Katalysator</i>	139
6.5.5.2	<i>Isomerisierung an Festsubstanzen ohne Lösemittel</i>	143
6.5.5.3	<i>Isomerisierung an Eisenoxid: Temperatur- und Zeitabhängigkeit</i>	144
6.5.6	Isomerisierung in MeOH/H ₂ O/NaOH unter Zugabe von β -Cyclodextrin (β - CD)	145
6.5.7	Isomerisierung im Specksteingefäß.....	145
6.6	<i>Racemisierung von Humulon</i>	147
6.6.1	Racemisierung in Toluol unter Rückfluss.....	147

6.6.2	Temperaturabhängigkeit der Racemisierungs-Geschwindigkeit	148
6.6.3	Racemisierung von Hopfenextrakt bei 32 °C	148
6.6.4	Racemisierung von Hopfenpellets in Toluol bzw. H ₂ O	149
6.6.5	Racemisierung von Iso- α -Säuren	150
6.7	<i>Detektion mittels des Polarimeters (OR-Detektion)</i>	150
6.8	<i>Analyse verschiedener Hopfensorten hinsichtlich der AS-Enantiomere</i>	152
6.9	<i>Test von ICE-3 hinsichtlich der Enantiomere</i>	152
6.10	<i>Test von Iso-90 hinsichtlich der Enantiomere</i>	153
6.11	<i>Präparative HPLC</i>	153
6.12	<i>Isolierung der Enantiomere und sensorische Tests</i>	153
6.12.1	α -Säuren	153
6.12.2	Iso- α -Säuren	154
6.13	<i>Extraktionsmethoden</i>	154
7	Literaturverzeichnis	156
8	Anhang	173
Anhang 1:	HPLC-Chromatogramm nach EBC-Methode 7.8 ^[154]	173
Anhang 2:	Strukturformeln von rac-Humulon und rac-Isolumulon	174
Anhang 3:	Chirale HPLC-Säulen	176
Anhang 4:	Isomerisierung an Florisil® bei 40 °C: Chromatogramme	178
Anhang 5:	Isomerisierung an diversen Festsubstanzen ohne Lösemittel	180
Anhang 6:	Temperaturabhängigkeit der Racemisierungs-Geschwindigkeit: Diagramme	183
Anhang 7:	Diverse Hopfensorten aus Deutschland und Mitteleuropa bzw. England, Neuseeland und USA	185

Abkürzungen und Symbole

Die folgenden Abkürzungen und Symbole wurden in dieser Arbeit verwendet. Einige Abkürzungen haben dabei mehrere Bedeutungen und müssen aus dem Kontext des Textes geschlossen werden.

Abkürzungen

Å	Ångström (10^{-10} m)
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
aq	in wässriger Lösung (von lateinisch aqua)
AU	absorption unit(s) (Absorptionseinheit(en))
a.u.	arbitrary unit(s) (willkürliche Einheit(en))
β-CD	β-Cyclodextrin
c_x	Konzentration von Substanz x
C8 bzw. C-8	8-gliedrige Kohlenstoffkette (Modifizierung von Kieselgel bei RP-HPLC-Phasen)
C18 bzw. C-18	18-gliedrige Kohlenstoffkette (Modifizierung von Kieselgel bei RP-HPLC-Phasen)
cm	Zentimeter
CSP	chirale stationäre Phase
C/T	<i>cis:trans</i> -Verhältnis (<i>cis</i> -Isohumulon zu <i>trans</i> -Isohumulon)
d	Tag(e)
dd	bidestilliert
dm	Dezimeter
Da	Dalton
DCHA	Dicyclohexylamin
ec	end-capped (bei RP-HPLC-Säulen)
EBC	European Brewery Convention
ee	enantiomeric excess (Enantiomerenüberschuss)
Et₂O	Diethylether
EtOH	Ethanol
ESI	Elektronenspray-Ionisation
et al.	und andere (bei Literaturangaben)
g	Gramm
h	Stunde(n)

HPLC	high performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
ICE-2 bzw. ICE-3	<i>International Calibration Extract</i> , für α - und β -Säuren (Internationaler Kalibrierungsextrakt der 2. bzw. 3. Generation)
ICS-I2 bzw. ICS-I3	<i>International Calibration Standard</i> , für Iso- α -Säuren (Internationaler Kalibrierungsstandard der 2. bzw. 3. Generation)
ICP-OES	inductively coupled plasma - optical emission spectrometry (optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma)
ID	Innendurchmesser
k'	Retentionsfaktor
kV	Kilovolt
L (Volumen)	Liter
L (Maßeinheit)	Länge
LC-MS	liquid chromatography - mass spectroscopy (Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie)
m	Masse
m	Meter
M	Molekülpeak oder Molekülion (bei der Massenspektrometrie)
M	Molekulargewicht ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
M	Molar ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
mAU	milli absorption unit(s) (Milliabsorptionseinheit(en))
mbar	Millibar
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
μg	Mikrogramm
min	Minute(n)
mL	Milliliter
μL	Mikroliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
μm	Mikrometer
mmol	Millimol
μmol	Mikromol
MS	Massenspektrometrie
MS-C	MS-Chromatogramm (Chromatogramm durch MS-Detektion)
m/z	Verhältnis Masse : Ladung
n	Stoffmenge

nat-	nativ (unbehandelt)
n.d.	nicht detektierbar / nicht bestimmbar
nm	Nanometer
NMR	nuclear magnetic resonance (Kernspinresonanz)
NP-	normal phase (Normalphase)
Nr.	Nummer
OR	optische Rotation
OR-C	OR-Chromatogramm (Chromatogramm durch OR-Detektion)
ORD	optische Rotationsdispersion
p.a.	pro analysi (für analytische Zwecke)
PFP	Pentafluorphenyl
PrOH	Propanol
PTFE	Polytetrafluorethylen
ppm	parts per million (= 0,0001 %)
R	<i>rectus</i> (lateinisch: rechts)
R	Rest
rac-	racemisiert
RP-	reversed phase (Umkehrphase)
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
R_s	Auflösung
RT	Raumtemperatur
S	<i>sinister</i> (lateinisch: links)
s	Sekunde(n)
SIM	single ion monitoring (Aufnahme einzelner m/z)
T	Temperatur
t	Tonne(n)
t	Zeit
t_R	Retentionszeit
t₀	Totzeit
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
TIC	total ion current (Totalionenstrom)
U	Umsatz (der IAS, bei der Isomerisierung)
UV	Ultraviolett
UV-C	UV-Chromatogramm (Chromatogramm durch UV-Detektion)
V	Volumen
V	Volt

Vis	visible (sichtbar)
v/v [%]	volume per volume (Volumen pro Volumen)
w/w [%]	weight per weight (Gewicht pro Gewicht)
W	Watt
W	Peakbreite
½W	Peakbreite bei halber Peakhöhe
WF	Wiederfindung (der AS, bei der Isomerisierung und Racemisierung)

Kurzbezeichnungen der α -Säuren, β -Säuren und der Iso- α -Säuren (die post-, prä- und adprä-Homologen sind nicht berücksichtigt)

AS	α -Säure(n)
R-AS	AS mit (<i>R</i>)-Konfiguration
S-AS	AS mit (<i>S</i>)-Konfiguration
H	Humulon
CH	co-Humulon
NH	n-Humulon
AH	ad-Humulon
BS	β -Säure(n)
L	Lupulon
CL	co-Lupulon
NL	n-Lupulon
AL	ad-Lupulon
IAS	Iso- α -Säure(n)
IAS-1	(4 <i>S</i> ,5 <i>R/S</i>)- Iso- α -Säure(n) (entstehen aus S-AS)
IAS-2	(4 <i>R</i> ,5 <i>S/R</i>)- Iso- α -Säure(n) (entstehen aus R-AS)
TIAS	<i>trans</i> -Iso- α -Säure(n)
CIAS	<i>cis</i> -Iso- α -Säure(n)
ICH	Iso-co-Humulon
INH	Iso-n-Humulon
IAH	Iso-ad-Humulon
TICH	<i>trans</i> -Iso-co-Humulon
CICH	<i>cis</i> -Iso-co-Humulon
TINH	<i>trans</i> -Iso-n-Humulon
CINH	<i>cis</i> -Iso-n-Humulon
TIAH	<i>trans</i> -Iso-ad-Humulon
CIAH	<i>cis</i> -Iso-ad-Humulon

Symbole

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$	spezifischer Drehwinkel bei 20 °C und 589 nm
α	(gemessener) Drehwinkel
α	Selektivitätsfaktor
°	Grad
°C	Grad Celsius
λ	Wellenlänge
%	Prozent
*	Markierung eines Stereozentrums
≡	identisch
<	kleiner als
>	größer als
≤	kleiner als oder gleich
≥	größer als oder gleich
≈	ungefähr

Abbildungs- und Formelverzeichnis

Abbildungen

Abb. 0-1:	Strukturformeln von Humulon sowie n-, co-, ad-, post-, prä- und adprä-Humulon.....	1
Abb. 0-2:	Isomerisierung; Umwandlung von Humulon zu <i>cis</i> - (links) und <i>trans</i> -Isohumulon (rechts).....	2
Abb. 0-3:	Racemisierung; Umwandlung von (<i>S</i>)-Humulon zum (<i>S/R</i>)-Racemat.....	2
Abb. 1-1:	(<i>S</i>)-Humulon (links) und (<i>R</i>)-Humulon (rechts) mit Spiegelebene.....	5
Abb. 3-1:	Rechtswindende Kletterrichtung.....	8
Abb. 3-2:	Die Hopfenanbaugebiete zwischen dem 35. und 55. Breitengrad der nördlichen und südlichen Halbkugel. ^[25]	9
Abb. 3-3:	Hopfenanbaugebiete in Deutschland. ^[26]	10
Abb. 3-4:	Hopfendolde (Hopfenzapfen); links: an der Rebe ^[30] , rechts: Längsschnitt mit sichtbarem Lupulin ^[31]	14
Abb. 3-5:	Unterteilung der Gesamtharze. ^[26]	15
Abb. 3-6:	Strukturformel von n-Humulon nach H. WIELAND ^[19,42] (links) und deren modifizierte Form ^[19,44-47] (rechts).....	17
Abb. 3-7:	Optische Rotationsdispersionskurve von (-)-n-Humulon. ^[48]	19
Abb. 3-8:	Definition der Oktanten am Beispiel des Cyclohexanons. ^[52]	20
Abb. 3-9:	Die Vorzeichen der vier hinteren Oktanten (-z) bei der Oktantenregel.....	20
Abb. 3-10:	Oktantendiagramme von n-Humulon; (1): (<i>R</i>)-n-Humulon in Konformation a, (1'): (<i>R</i>)-n-Humulon in Konformation b, (2): (<i>S</i>)-n-Humulon in Konformation a, (2'): (<i>S</i>)-n-Humulon in Konformation b. ^[48]	21
Abb. 3-11:	Alte Strukturformel von Humulon nach D. DE KEUKELEIRE & M. VERZELE ((<i>R</i>)-Konfiguration). ^[19,48,49]	22
Abb. 3-12:	Korrekte Strukturformel von Humulon nach URBAN ET AL. ((<i>S</i>)-Konfiguration). ^[20]	22
Abb. 3-13:	Röntgenstruktur von (6 <i>S</i>)-(-)-n-Humulon-(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-1,2-Diaminocyclohexan nach URBAN ET AL.. ^[20]	23
Abb. 3-14:	Strukturformel von (6 <i>S</i> ,2' <i>S</i>)-ad-Humulon. ^[20,61]	23
Abb. 3-15:	Mechanismus der Isomerisierung von Humulon (oben) zu <i>cis</i> -Isohumulon (unten links) und <i>trans</i> -Isohumulon (unten rechts) nach URBAN ET AL.. ^[20]	26
Abb. 3-16:	Reaktionsschema der Isomerisierung von Humulon zu Isohumulon unter katalytischem Einfluss von Metallionen. ^[73,75]	27

Abb. 3-17:	Strukturformeln von <i>Rho</i> - (links), Tetrahydro- (mitte) und Hexahydro-Iso- α -Säure (rechts).....	29
Abb. 3-18:	Einteilung der chiralen stationären Phasen (CSPs) nach Y. OKAMOTO & T. IKAI. ^[87]	34
Abb. 3-19:	Strukturformeln von Cellulosetriacetat (links) und Cellulose-tris(4-Methylbenzoat) (rechts).....	35
Abb. 3-20:	Prinzip der chiralen Erkennung: 3-Punkte-Modell. ^[108]	36
Abb. 3-21:	Struktur von Amylose (links) und Cellulose (rechts).....	38
Abb. 3-22:	Drehung der Polarisationssebene von linear polarisiertem Licht um den Winkel α ; E-Vektor = Vektor des elektrischen Feldes. ^[133]	39
Abb. 4-1:	HPLC Chromatogramm (UV: 290 nm) von <i>AS-pur</i> ($c = 50$ g/L, 0,2 μ L injiziert), Anlage 1, Säule 11, T = 45 °C, Fluss: 1 mL/min, mobile Phase: 0,025 % H ₃ PO ₄ /ACN = 50/50 (isokratisch, HPLC-Methode-1).	45
Abb. 4-2:	HPLC Chromatogramm (UV: 260 nm) einer IAS-Probe der Firma Hopsteiner ($c = 3,5$ g/L, 3 μ L injiziert), Anlage 1, Säule 11, T = 45 °C, Fluss: 1 mL/min, mobile Phase: 0,025 % H ₃ PO ₄ / ACN = 55/45 (isokratisch, HPLC-Methode-2).....	46
Abb. 4-3:	HPLC Chromatogramm (UV: 260 nm und 290 nm) einer selbst isomerisierten Hopfenprobe (3 mg zerkleinerte Pellets Hallertauer Magnum in 5 mL Würze 1 h gekocht); $c_{AS/IAS} \approx 2$ g/L, 5 μ L injiziert, Anlage 2 (ohne MS), Säule 11, T = 45 °C, Fluss: 1 mL/min, HPLC-Methode-10 (Gradient).	46
Abb. 4-4:	Vergleichschromatogramm einer IAS- bzw. AS-Trennung nach JASKULA ET AL. ^[141] ; UV: 270 nm, H ₂ O(pH 2,80 mit H ₃ PO ₄)/ACN = 48/52, Fluss: 1,8 mL/min, Säule: Alltima C18 5 μ m (150 mm x 4,6 mm, Alltech Associates, Deerfield, IL, USA); 1a: TICH, 1b: CICH, 2a: TINH, 2b: CINH, 3a: TIAH, 3b: CIAH, 4: CH, 5: NH, 6: AH.....	47
Abb. 4-5:	HPLC Chromatogramme von IAS und AS ($c_{IAS} = 10$ g/L, $c_{AS} = 10$ g/L, 5 μ L injiziert); oben: UV-Detektion, unten: MS-Detektion; Anlage 2, Säule 11, T = 45 °C, Fluss: 1 mL/min, mobile Phase: 0,03 % TFA/ACN = 50/50 (isokratisch, HPLC-Methode-7 bzw. -8).	48
Abb. 4-6:	UV-Spektren: AS in 0,025 % H ₃ PO ₄ /ACN = 50/50, $\lambda = 225 - 400$ nm.	49
Abb. 4-7:	UV-Spektren: IAS in 0,025 % H ₃ PO ₄ /ACN = 55/45, $\lambda = 225 - 400$ nm.....	50
Abb. 4-8:	m/z-Spektren: AS in 0,03 % TFA/ACN = 50/50, TIC: m/z 190 – 430.....	50
Abb. 4-9:	m/z-Spektren: IAS in 0,03 % TFA/ACN = 50/50, TIC: m/z 190 – 430 (TIAH konnte bei der chromatographischen Trennung nicht aufgelöst werden).	52
Abb. 4-10:	HPLC Chromatogramm der präparativen AS-Trennung (UV: 290 nm), $c_{AS-pur} = 100$ g/L \triangleq 89 g/L AS, 10 μ L injiziert, Anlage 1, Säule 13, T = 45 °C,	

- Fluss: 10 mL/min, mobile Phase: 0,075 % H₃PO₄/ACN = 40/60 (isokratisch, HPLC-Methode-3).54
- Abb. 4-11:** HPLC Chromatogramm der präparativen IAS-Trennung (UV: 260 nm), $c_{iso-90} = 10 \text{ g/L} \triangleq 9 \text{ g/L}$ IAS, 40 μL injiziert, Anlage 1, Säule 13, T = 45 °C, Fluss: 10 mL/min, mobile Phase: 0,015 % H₃PO₄/ACN = 45/55 (isokratisch, HPLC-Methode-4).55
- Abb. 4-12:** Vergleichschromatogramm einer präparativen IAS-Trennung nach VERZELE ET AL.^[140]; UV: 270 nm, ACN/H₂O/H₃PO₄ = 50/50/2 + 6 g/L MgSO₄, Fluss: 10 mL/min, Säule: RoSil-C₁₈ (RSL) 10 μm (250 mm x 22 mm, RSL, Eke, Belgien).55
- Abb. 4-13:** HPLC Chromatogramme von rac-AS (oben, UV: 290 nm) und rac-IAS (unten, UV: 260 nm), Anlage 1, Säule 15, T = 35 °C, Fluss: 1 mL/min, mobile Phasen: rac-AS: 0,075 % H₃PO₄/ACN = 50/50 (isokratisch), rac-IAS: 0,075 % H₃PO₄/ACN = 60/40 (isokratisch).57
- Abb. 4-14:** Strukturformeln von IAS-1 und IAS-2 bei rac-IAS.58
- Abb. 4-15:** HPLC Chromatogramme von rac-AS (oben, UV: 290 nm) und rac-IAS (unten, UV: 260 nm), Anlage 1, Säule 16, T = 35 °C, Fluss: 2 mL/min, mobile Phasen: rac-AS: 0,025 % H₃PO₄/ACN = 60/40 (isokratisch), rac-IAS: 0,075 % H₃PO₄/ACN = 60/40 (isokratisch); zu rac-IAS: 1 \triangleq (S)-Konfiguration am C-4-Atom der IAS, 2 \triangleq (R)-Konfiguration am C-4-Atom der IAS.59
- Abb. 4-16:** HPLC Chromatogramm von rac-AS (UV: 290 nm), Anlage 1, Säule 17, T = 35 °C, Fluss: 2 mL/min, mobile Phase: 0,075 % H₃PO₄/ACN = 55/45 (isokratisch).60
- Abb. 4-17:** HPLC Chromatogramm von rac-IAS (UV: 260 nm), Anlage 1, Säule 19, T = 40 °C, Fluss: 2 mL/min, mobile Phase: 2,5 % HCOOH/ACN = 72/28 (isokratisch).61
- Abb. 4-18:** HPLC Chromatogramm von rac-AS (UV: 290 nm), Anlage 1, Säule 20, T = 40 °C, Fluss: 2 mL/min, mobile Phase: 0,075 % H₃PO₄/ACN = 65/35 (isokratisch).61
- Abb. 4-19:** HPLC Chromatogramme von rac-AS (oben, UV: 290 nm) und rac-IAS (unten, UV: 260 nm), Anlage 1, Säule 22, T = 45 °C, Fluss: 2 mL/min, mobile Phasen: rac-AS: 0,075 % H₃PO₄/ACN = 60/40 (isokratisch, HPLC-Methode-5), rac-IAS: 0,075 % H₃PO₄/ACN = 70/30 (isokratisch, HPLC-Methode-6), zu rac-AS: AH-2 und AH-3: durch die künstliche Racemisierung entstandene AHs (Konfigurationen am C-6- und C-2'-Atom nicht genau zu bestimmen); zu rac-IAS: 1: TICH-2, 2: TICH-1, 3: CICH-2, 4: CICH-1,

5: TINH-2, 6: TIAH-4, 7: CINH-2, 8: TIAH-3, 9: CIAH-3, 10: TIAH-2, 11: TINH-1, 12: CINH-1, 13: TIAH-1, 14: CIAH-2, 15: CIAH-1.	63
Abb. 4-20: UV-Spektren von S-/R-CH, S-/R-NH und AH-1/-2/-3 in 0,075 % H ₃ PO ₄ /ACN = 60/40.	63
Abb. 4-21: HPLC Chromatogramm von rac-AS; oben: UV-Detektion, unten: MS- Detektion; Anlage 2, Säule 22, T = 45 °C, Fluss: 1 mL/min, mobile Phase: 0,3 % TFA/ACN = 52/48 (isokratisch, HPLC-Methode-9).....	66
Abb. 4-22: Isomerisierung von «rac-AS» zu «rac-IAS».; RP-HPLC: Säule 11, HPLC- Methode-2.	67
Abb. 4-23: HPLC-Chromatogramme; chirale Trennung von isolierten rac-IAS- Fraktionen: rac-TICH (0,2 g/L), rac-CICH (0,9 g/L), rac-TINH (0,7 g/L), rac- CINH (1,7 g/L), rac-TIAH (0,1 g/L), rac-CIAH (0,4 g/L); jeweils 25 µL injiziert, Anlage 1, Säule 22, HPLC-Methode-6.....	68
Abb. 4-24: Isomerisierung an Al ₂ O ₃ ; oben: sauer, mitte: neutral, unten: basisch; Anlage 1, Säule 9.	69
Abb. 4-25: Isomerisierung an Florisil®, 100 °C, 60 min; Anlage 1, Säule 9.	71
Abb. 4-26: Peakflächen-Verhältnisse von IAS:AS bei der Isomerisierung an Florisil® (40 °C).....	72
Abb. 4-27: Peakflächen-Verhältnisse von IAS:AS bei der Isomerisierung an Florisil® (25 °C): Extrakt-1, Ofen.	73
Abb. 4-28: Peakflächen-Verhältnisse von IAS:AS bei der Isomerisierung an Florisil® (RT): Extrakt-1, Fensterbank.	73
Abb. 4-29: Peakflächen-Verhältnisse von IAS:AS bei der Isomerisierung an Florisil® (25 °C): Extrakt-2, Ofen.	73
Abb. 4-30: Peakflächen-Verhältnisse von IAS:AS bei der Isomerisierung an Florisil® (RT): Extrakt-2, Fensterbank.	73
Abb. 4-31: Isomerisierung in KOH-Lösung, C/T.	74
Abb. 4-32: Isomerisierung in KOH-Lösung, U bzw. AS-WF.....	74
Abb. 4-33: Isomerisierung in NaOH-Lösung, C/T.....	74
Abb. 4-34: Isomerisierung in NaOH-Lösung, U bzw. AS-WF.	74
Abb. 4-35: Einfluss von FeO auf die Isomerisierung (bei 100 °C), oben: ohne FeO, unten: mit FeO; Anlage 1, Säule 9.....	78
Abb. 4-36: Struktur von β-Cyclodextrin (β-CD).....	82
Abb. 4-37: Isomerisierung in MeOH/H ₂ O/NaOH bei 70 °C unter Zugabe von β- Cyclodextrin (β-CD), oben: t = 30 min, mitte: t = 60 min, unten: t = 120 min, 1: TICH, 2: CICH, 3: TINH, 4: CINH, 5: TIAH, 6: CIAH; Anlage 1, Säule 9.....	83

- Abb. 4-38:** Isomerisierung in H₂O unter Rückfluss; Speckstein vs. Glas: 30 – 120 min, 1: TICH, 2: CICH, 3: TINH, 4: CINH, 5: TIAH (nicht aufgelöst, Coelution mit CINH), 6: CIAH; Anlage 2, Säule 11, mobile Phase: 0,03 % TFA/ACN, Gradient: 0 – 18 min 50 % ACN, 18 – 25 min 50 % – 60 % ACN.....85
- Abb. 4-39:** Isomerisierung in (ungehopfter) Würze unter Rückfluss; Speckstein vs. Glas: 60 min; Anlage 2, Säule 11.86
- Abb. 4-40:** ad-Humulon (AH) mit zwei Stereozentren: Vier stereoisomere Formen (AH-1, AH-2, AH-3, AH-4).....90
- Abb. 4-41:** HPLC Chromatogramme; chirale Trennung von (A) nat-AS (2 g/L), (B) rac-CH (0,4 g/L), (C) rac-NH (0,8 g/L) und (D) rac-AH (0,2 g/L), jeweils 5 µL injiziert, Anlage 2, Säule 22, HPLC-Methode-5.....91
- Abb. 4-42:** 1-stündige Racemisierung von Pellets in Toluol unter Rückfluss; Anlage 2, Säule 22, HPLC-Methode-9.....92
- Abb. 4-43:** Racemisierung von Hopfenextrakt bei 32 °C (7 – 78 d): ee_(S).94
- Abb. 4-44:** Racemisierung von Hopfenextrakt bei 32 °C (78 d), HPLC Chromatogramme; (A) UV (290 nm), (B) MS (TIC), (C) MS (m/z = 349), (D) MS (m/z = 363); Anlage 1, Säule 22.94
- Abb. 4-45:** 2-stündige Racemisierung von Hopfenpellets in Toluol (oben) bzw. H₂O (unten) bei 100 °C im Temperierbad; Anlage 1, Säule 22, HPLC-Methode-5. ...96
- Abb. 4-46:** Strukturformel von (4*S*)-*cis*/*trans*-IAS.96
- Abb. 4-47:** OR in Abhängigkeit der Wellenlänge (λ); Probe: *AS-pur*, 100 mg/L in MeOH. ...97
- Abb. 4-48:** OR-Messungen von *AS-pur* (nat-AS) auf Säule 11 (C-18); unten: UV-Detektion, oben: OR-Detektion.....98
- Abb. 4-49:** OR-Messungen von *AS-pur* (nat-AS) auf Säule 16 (chiral); unten: UV-Detektion, oben: OR-Detektion.....98
- Abb. 4-50:** OR-Messungen von rac-AS auf Säule 11 (C-18); unten: UV-Detektion, oben: OR-Detektion.....98
- Abb. 4-51:** OR-Messungen von rac-AS auf Säule 16 (chiral); unten: UV-Detektion, oben: OR-Detektion.....99
- Abb. 4-52:** OR-Messungen von *Iso-90* (nat-IAS) auf Säule 11 (C-18); unten: UV-Detektion (Kontrolle), mitte: UV-Detektion (intendierte Überladung der Säule), oben: OR-Detektion..... 100
- Abb. 4-53:** OR-Messungen von «rac-IAS» (rac-IAS) auf Säule 16 (chiral); unten: UV-Detektion, oben: OR-Detektion; 1: TICH-2, 2: CICH-2, 3: TICH-1, 4: CINH-2, 5: CICH-1, 6: TINH-1, 7: CINH-1. 101
- Abb. 4-54:** Isolierung von CH, NH und AH aus Hallertauer Magnum und Untersuchung hinsichtlich der Existenz von (*R*)-Enantiomeren; Anlage 2, Säule 22, T =

45 °C, Fluss: 1 mL/min, mobile Phase: 0,3 % TFA/ACN = 52,5/47,5 (isokratisch).....	103
Abb. 4-55: Vergrößert: Isolierung von CH, NH und AH aus Hallertauer Magnum und Untersuchung hinsichtlich der Existenz von (<i>R</i>)-Enantiomeren (Bedingungen wie bei Abb. 4-54).....	104
Abb. 4-56: HPLC Chromatogramm von «rac-AS» (28 g/L, 1 µL injiziert); Anlage 2, Säule 22, T = 45 °C, Fluss: 1 mL/min, mobile Phase: 0,3 % TFA/ACN = 52,5/47,5 (isokratisch).	104
Abb. 4-57: UV-Spektren von <i>R</i> -/ <i>S</i> -CH (links) bzw. <i>R</i> -/ <i>S</i> -NH (rechts) in 0,075 % H ₃ PO ₄ /ACN = 60/40.....	105
Abb. 4-58: HPLC Chromatogramme von ICE-3 (22,4 g/L in MeOH \pm 10 g/L AS, 1 µL injiziert): UV- und MS-Detektion, 1: <i>R</i> -CH, 2: <i>R</i> -NH, 3: <i>S</i> -CH, 4: <i>S</i> -NH, 5: <i>S</i> - AH, 6: CL, 7: NL, 8: AL; Anlage 2, Säule 22, HPLC-Methode-9.....	107
Abb. 4-59: m/z-Spektren von <i>R</i> -CH, <i>R</i> -NH, <i>S</i> -CH, <i>S</i> -NH und <i>S</i> -AH; TIC: m/z 190 – 430.	107
Abb. 4-60: HPLC Chromatogramme von isolierten IAS (aus <i>Iso-90</i>); TICH (0,12 g/L), CICH (0,50 g/L), TINH (0,22 g/L), CINH (1,48 g/L), TIAH (0,03 g/L), CIAH (0,10 g/L), jeweils 50 µL injiziert; Anlage 1, Säule 22, HPLC-Methode-6.	109
Abb. 4-61: UV-Spektren von TICH-1 und -2 (links) bzw. CICH-1 und -2 (rechts) in 0,075 % H ₃ PO ₄ /ACN = 70/30.....	110
Abb. 4-62: UV-Spektren von TINH-1 und -2 (links) bzw. CINH-1 und -2 (rechts) in 0,075 % H ₃ PO ₄ /ACN = 70/30.....	111
Abb. 4-63: Isomerisierung von isolierten <i>S</i> - und <i>R</i> -AS: ICH-1, ICH-2, INH-1 und INH-2 (jeweils 1 g/L und 2 µL injiziert), Anlage 2, Säule 11.....	113
Abb. 4-64: Isomerisierung von isolierten <i>S</i> - und <i>R</i> -AS: ICH-1, ICH-2, INH-1 und INH-2 (jeweils 1 g/L und 2 µL injiziert), Anlage 2, Säule 22.....	113
Abb. 6-1: Probenzelle; 1: Eingang, 2: Ausgang.....	124
Abb. 6-2: Aufarbeitung der Proben nach der Isomerisierung an fester Phase; 1: 5-mL- Spritze mit Stempel, 2: Spritzenvorsatzfilter (0,45 µm, 15 mm), 3: Verschlusskappe, 4: MeOH, 5: Probe, 6: Festsubstanz (Florisil®) bleibt zurück, 7: Eluat mit AS bzw. IAS.	136
Abb. 6-3: Schematischer Versuchsaufbau der Isomerisierung im Specksteingefäß; 1: Rückflusskühler, 2: Gummimanschette, 3: Specksteingefäß mit Magnetührstäbchen, 4: Heizmagnetrührer.	146
Abb. 6-4: Versuchsaufbau der Isomerisierung im Specksteingefäß; links: Specksteingefäß, rechts: Erlenmeyerkolben (Kontrolle).	146

- Abb. 6-5:** Links: HPLC-Anlage 1 mit Polarimeter als zusätzlichen Detektor; rechts: Nahaufnahme des Polarimeters MCP 500 (Firma Anton Paar), verbunden mit dem Ausgang des UV-Detektors (⊗). 150
- Abb. 6-6:** Schematischer Aufbau der HPLC-Anlage 1 während der OR-Messungen..... 150
- Abb. 8-1:** Typisches HPLC-Chromatogramm von Iso- α -Säuren, α -Säuren und β -Säuren; Kopie aus EBC-Methode 7.8.^[154] 173
- Abb. 8-2:** Isomerisierung an Florisil® bei 40 °C; Tag 0 (oben) bis Tag 35 (unten); 1: TICH, 2: CICH, 3: TINH, 4: CINH, 5: TIAH, 6: CIAH, 7: AS; Anlage 1, Säule 9. 179
- Abb. 8-3:** Isomerisierung an diversen Festsubstanzen ohne Lösemittel; Kontrolle und Salze, 1: TICH, 2: CICH, 3: TINH, 4: CINH, 5: TIAH, 6: CIAH, 7: AS, 8: BS, ?: undefinierbar; Anlage 1, Säule 9 bzw. Säule 11 (KCl, K₂CO₃, NaCl, Na₂CO₃, PbCl₂, SnCl₂). 180
- Abb. 8-4:** Isomerisierung an diversen Festsubstanzen ohne Lösemittel; Oxide, 1: TICH, 2: CICH, 3: TINH, 4: CINH, 5: TIAH, 6: CIAH, 7: AS, 8: BS; Anlage 1, Säule 9 (TiO₂, ZnO) bzw. Säule 11. 181
- Abb. 8-5:** Isomerisierung an diversen Festsubstanzen ohne Lösemittel; Eisenhaltige Verbindungen, 1: TICH, 2: CICH, 3: TINH, 4: CINH, 5: TIAH, 6: CIAH, 7: AS, 8: BS; Anlage 1, Säule 9 bzw. Säule 11 (FeO). 181
- Abb. 8-6:** Isomerisierung an diversen Festsubstanzen ohne Lösemittel; Sonstige Verbindungen, 1: TICH, 2: CICH, 3: TINH, 4: CINH, 5: TIAH, 6: CIAH, 7: AS; Anlage 1, Säule 9. 182
- Abb. 8-7:** Racemisierungs-Geschwindigkeit bei 120 °C (*AS-pur* in Xylol). 183
- Abb. 8-8:** Racemisierungs-Geschwindigkeit bei 130 °C (*AS-pur* in Xylol). 183
- Abb. 8-9:** Racemisierungs-Geschwindigkeit bei 140 °C (*AS-pur* in Xylol). 184
- Abb. 8-10:** Racemisierungs-Geschwindigkeit bei 150 °C (*AS-pur* in Xylol). 184
- Abb. 8-11:** HPLC Chromatogramme diverser Hopfensorten aus Deutschland und Mitteleuropa: Pellets, alphabetisch geordnet; Anlage 1, Säule 22, Injektionsvolumen: 2 μ L ($C_{AS} \approx 30$ g/L, je nach Sorte), HPLC-Methode-5. 185
- Abb. 8-12:** HPLC Chromatogramme diverser Hopfensorten aus Deutschland und Mitteleuropa: Rohhopfen, alphabetisch geordnet; Anlage 1, Säule 22, Injektionsvolumen: 2 μ L ($C_{AS} \approx 30$ g/L, je nach Sorte), HPLC-Methode-5. 186
- Abb. 8-13:** HPLC Chromatogramme diverse Hopfensorten aus England, Neuseeland und USA: Pellets, alphabetisch geordnet; Anlage 2, Säule 22, Injektionsvolumen: 5 μ L ($C_{AS} \approx 15$ g/L, je nach Sorte), HPLC-Methode-9. 187

Formeln

- Formel 3-1:** Berechnung des Enantiomerenüberschusses (ee); S = Masse des Enantiomers mit (S)-Konfiguration, R = Masse des Enantiomers mit (R)-Konfiguration.^[97]32
- Formel 3-2:** Berechnung der Retentionsfaktoren k' zweier Peaks 1 und 2 in einem Chromatogramm; t_R = Retentionszeit, t_0 = Totzeit.....33
- Formel 3-3:** Berechnung des Selektivitätsfaktors α zweier Peaks 1 und 2 in einem Chromatogramm; t_R = Retentionszeit, t_0 = Totzeit.....33
- Formel 3-4:** Berechnung der Auflösung R_S zweier Peaks 1 und 2 in einem Chromatogramm; t_R = Retentionszeit, W = Peakbreite, $\frac{1}{2}W$ = Peakbreite bei halber Peakhöhe.33
- Formel 3-5:** *Drude-Gleichung*: Zusammenhang von $[\alpha]$ und λ (außerhalb von Absorptionsbanden); A_i = Konstante, λ_i = konstante Wellenlänge.^[134]40
- Formel 3-6:** Berechnung der spezifischen Drehung $[\alpha]$ gemäß dem *Biotschen Gesetz*; l = Schichtdicke [dm], c = Konzentration [g/100 mL].^[133,135]40
- Formel 6-1:** Berechnung des *cis:trans*-Verhältnisses (C/T).....133
- Formel 6-2:** Berechnung des Umsatzes (U); IAS_1 = Masse IAS nach der Reaktion, AS_0 = Masse AS vor der Reaktion.133
- Formel 6-3:** Berechnung der Wiederfindung (Isomerisierung); AS_1 = Masse AS nach der Reaktion, AS_0 = Masse AS vor der Reaktion.133
- Formel 6-4:** Berechnung der Wiederfindung (Racemisierung); AS_1 = Masse AS nach der Reaktion, AS_0 = Masse AS vor der Reaktion.147
- Formel 6-5:** Berechnung des Enantiomerenüberschusses (ee) des (S)-Enantiomers; S/R -AS = Masse des (S/R)-Enantiomers der entsprechenden AS.....147
- Formel 6-6:** Berechnung der prozentualen Anteile des (S)- bzw. (R)-Enantiomers; S/R -AS = Masse des (S/R)-Enantiomers der entsprechenden AS.....147

Tabellenverzeichnis

Tab. 3-1:	Weltweite Hopfenernte 2010 – 2012. ^[27]	9
Tab. 3-2:	Welthopfensortiment 2012 (<i>International Hop Growers` Convention</i>). ^[28]	10
Tab. 3-3:	Hopfenanbauflächen 2012 und 2013 (Deutschland). ^[29]	13
Tab. 3-4:	Prozentuale Zusammensetzung der Hopfendolden, lufttrocken. ^[23]	14
Tab. 3-5:	α -Säuregehalte ausgewählter Hopfensorten (Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Hüll, 2007). ^[23]	15
Tab. 3-6:	Spezifische Drehwinkel von Humulon bzw. Humulon-Salzen in verschiedenen Lösemitteln. ^[19,51]	18
Tab. 3-7:	Löslichkeiten von Humulon und Isohumulon in Würze bei Raumtemperatur und unterschiedlichen pH-Werten. ^[65]	24
Tab. 3-8:	Prozentuale Anteile von <i>cis</i> - und <i>trans</i> -Isohumulon bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen. ^[19,]	26
Tab. 3-9:	Reaktionsbedingungen, Halbwertszeiten und Geschwindigkeitskonstanten der durch zweiwertige Metallkationen katalysierten Isomerisierung in Natriumacetatlösung (0,1 M) unter N ₂ . ^[73]	27
Tab. 4-1:	Vergleich der Chromatogramme von Säule 9 und Säule 11 bei der RP- HPLC von IAS.	45
Tab. 4-2:	Peaks der m/z-Spektren mitsamt den entsprechenden Ionen; Probe: <i>AS-pur</i>	51
Tab. 4-3:	Peaks der m/z-Spektren mitsamt den entsprechenden Ionen; Probe: <i>Iso-90</i>	52
Tab. 4-4:	k' , α und R_s bei der chromatographischen rac-AS-Trennung mittels Säule 22 ($t_0 = 1,5$ min).	64
Tab. 4-5:	k' , α und R_s bei der chromatographischen rac-IAS-Trennung mittels Säule 22 ($t_0 = 1,5$ min).	64
Tab. 4-6:	Isomerisierung an saurem, neutralem und basischem Al ₂ O ₃ : C/T und U.	69
Tab. 4-7:	Temperaturabhängigkeit der 30-minütigen Isomerisierung an Florisil®: 50 – 150 °C: C/T und U.	71
Tab. 4-8:	Isomerisierung in KOH bzw. NaOH: C/T und U.	74
Tab. 4-9:	Einfluss bivalenter Salze auf die Isomerisierung (Variante 1 ^[158] : MeOH : H ₂ O : NaOH = 15 : 4,7 : 1; $n_{\text{Salz}} = 2 \times n_{\text{AS}}$, 70 °C, 45 min): C/T und U.	76
Tab. 4-10:	Einfluss bivalenter Salze auf die Isomerisierung (Variante 2: MeOH : H ₂ O : NaOH = 14,7 : 14,7 : 1; $n_{\text{Salz}} = 3 \times n_{\text{AS}}$, 80 °C, 60 min): C/T und U.	76

Tab. 4-11:	Einfluss diverser Oxide (Variante 2: MeOH : H ₂ O : NaOH = 14,7 : 14,7 : 1; $n_{\text{Oxid}} = 3 \times n_{\text{AS}}$, [$n_{\text{CuO}} = 3,75 \times n_{\text{AS}}$; $n_{\text{FeO}(2)} = 30 \times n_{\text{AS}}$], 80 °C, 60 min) auf die Isomerisierung: C/T und U.....	77
Tab. 4-12:	Einfluss von FeO auf die Isomerisierung (bei 100 °C): C/T und U.	78
Tab. 4-13:	Einfluss von FeSO ₄ ·7H ₂ O auf die Isomerisierung (ohne NaOH): C/T und U.	78
Tab. 4-14:	Einfluss der Fe ²⁺ -Ionenmenge auf die Isomerisierung: C/T und U.	79
Tab. 4-15:	Isomerisierung an diversen Festsubstanzen ohne Lösemittel (T = 100 °C, 60 min): C/T, U und IAS-Anteile.	80
Tab. 4-16:	Isomerisierung an FeO: Untersuchung der Temperatur- und Zeitabhängigkeit: C/T und U.	82
Tab. 4-17:	Isomerisierung in MeOH/H ₂ O/NaOH bei 70 °C unter Zugabe von β-Cyclodextrin (β-CD): C/T und U.	83
Tab. 4-18:	Isomerisierung in H ₂ O unter Rückfluss; Speckstein vs. Glas: 30 – 120 min: C/T und U.	84
Tab. 4-19:	Isomerisierung in (ungehopfter) Würze unter Rückfluss; Speckstein vs. Glas: 60 min: C/T und U.	86
Tab. 4-20:	ICP-OES; Test hinsichtlich des Herauslösens von Mg ²⁺ -Ionen aus dem Speckstein.....	87
Tab. 4-21:	Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der Isomerisierungsversuche.....	87
Tab. 4-22:	Zeit bis zur vollständigen Racemisierung bei unterschiedlichen Temperaturen (AS-pur in Xylol: 120 – 150 °C).	93
Tab. 4-23:	Racemisierung von Hopfenextrakt bei 32 °C (7 – 78 d): ee _(S)	93
Tab. 4-24:	2-stündige Racemisierung von Hopfenpellets in Toluol bzw. H ₂ O bei 100 °C: Erkenntnisse, WF und ee _(S)	95
Tab. 4-25:	OR in Abhängigkeit der Wellenlänge (λ); Probe: AS-pur, 100 mg/L in MeOH. ...	97
Tab. 4-26:	Prozentualen Anteile von S- und R-CH in verschiedenen Hopfensorten (jeweils Pellets und Rohhopfen).	102
Tab. 4-27:	Peaks der m/z-Spektren mitsamt den entsprechenden Ionen; Probe: ICE-3. .	108
Tab. 4-28:	Enantiomerenüberschüsse (ee _(IAS-1)) und prozentuale Anteile der IAS-1 bzw. IAS-2 in Iso-90.....	110
Tab. 4-29:	Isomerisierung von isolierten S- und R-AS: C/T und U.	114
Tab. 6-1:	Verwendete Vorsäulen.	125
Tab. 6-2:	Verwendete HPLC-Säulen.....	127
Tab. 6-3:	Gradientenprogramm (HPLC-Methode-10) zur simultanen Trennung von IAS und AS (RP-HPLC mit Säule 11).	131
Tab. 6-4:	Übersicht über die verwendeten HPLC-Methoden.....	132

Tab. 6-5:	Zeiten der Probennahme bei der Isomerisierung an Florisil® bei 40 °C.....	136
Tab. 6-6:	Isomerisierung an Florisil® bei 25 °C bzw. Raumtemperatur.	137
Tab. 6-7:	Reaktionsansätze: Isomerisierung in sonstigen (organischen) Lösemitteln. ...	138
Tab. 6-8:	Reaktionsansätze: Isomerisierung in flüssiger Phase: Diverse Salze und Oxide als Katalysator.....	140
Tab. 6-9:	Reaktionsansätze: Abhängigkeit der Isomerisierung von der Fe ²⁺ - Ionenmenge.	142
Tab. 6-10:	Reaktionsansätze: Isomerisierung in flüssiger Phase: Unterschiedliche Lösemittelmischungen aus H ₂ O und MeOH bzw. 1-PrOH – mit und ohne Zusatz von FeSO ₄ ·7H ₂ O.....	142
Tab. 6-11:	Reaktionsansätze: Isomerisierung an Festsubstanzen ohne Lösemittel.	143
Tab. 6-12:	Isomerisierung an Eisenoxid: Untersuchung der Temperatur- und Zeitabhängigkeit.	144
Tab. 6-13:	Reaktionsansätze: Temperaturabhängigkeit der Racemisierungs- Geschwindigkeit.	148
Tab. 6-14:	Zeitpunkte der Probennahmen bei der Racemisierung von Extrakt-1 bei 32 °C für 7 – 78 Tage.	149
Tab. 8-1:	Chirale Selektoren der chiralen HPLC-Säulen.....	176

Begriffsdefinitionen

In der vorliegenden Arbeit werden die Begriffe Humulon bzw. n-, co-, ad-, post-, prä- und adprä-Humulon sowie Isomerisierung bzw. Racemisierung häufig verwendet. Da diese in der Literatur nicht eindeutig und vor allem nicht einheitlich festgelegt sind, gelten, um Ungereimtheiten zu vermeiden, im gesamten Text die folgenden Begriffsdefinitionen:

Humulon bzw. n-, co-, ad-, post-, prä- und adprä-Humulon

Es existieren sechs verschiedene Homologe von Humulon (n-, co-, ad-, post-, prä- und adprä-Humulon). Als **Humulon** ohne Präfix wird die allgemeine Form der α -Säuren bezeichnet. Diese ist unabhängig vom Alkylrest R an der Seitenkette des C-2-Atoms des Rings. Außerdem wird darunter die Gesamtheit der sechs unterschiedlichen Homologe verstanden. Die entsprechenden Präfixe **n-**, **co-**, **ad-**, **post-**, **prä-** und **adprä-** werden verwendet, wenn es sich um ein bestimmtes Homolog handelt. Das gleiche gilt bei Isohumulon bzw. Iso-n-, Iso-co-, Iso-ad-, Iso-post-, Iso-prä- und Iso-adprä-Humulon. Abb. 0-1 zeigt die Strukturformeln von Humulon sowie n-, co-, ad-, post-, prä- und adprä-Humulon.

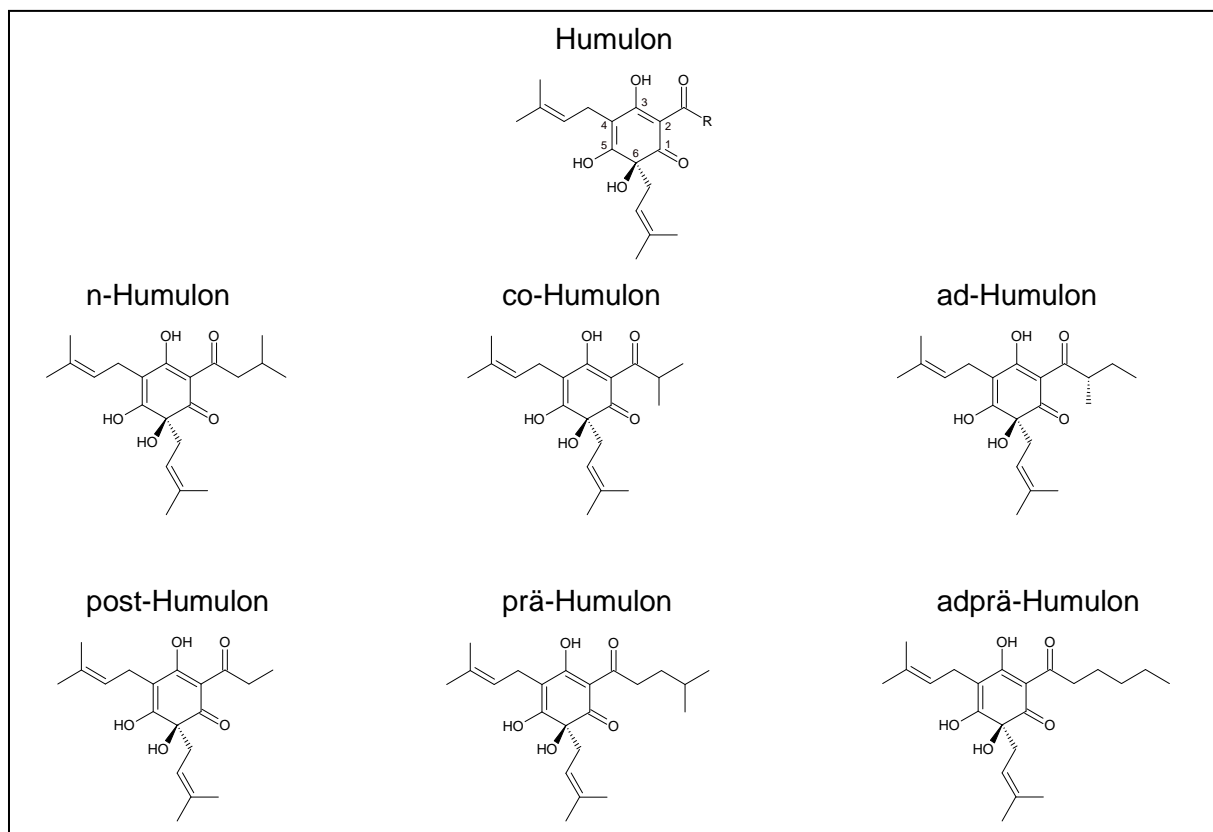


Abb. 0-1: Strukturformeln von Humulon sowie n-, co-, ad-, post-, prä- und adprä-Humulon.

Isomerisierung und Racemisierung

In der vorliegenden Arbeit werden häufig die Begriffe **Isomerisierung** und **Racemisierung** verwendet. Obwohl es sich im Allgemeinen bei der **Racemisierung** um eine Unterform der **Isomerisierung** handelt, werden hier beide Begriffe unterschiedlich definiert und bezeichnen jeweils einen speziellen Vorgang von zentraler Bedeutung für die vorliegende Forschungsarbeit. Um Irritationen zu vermeiden werden die beiden Begriffe im Folgenden kurz erläutert.

Unter **Isomerisierung** wird die intramolekulare Umwandlung der α -Säure (Humulon) in die entsprechende Iso- α -Säure (Isohumulon) verstanden. Dabei kommt es zu einer Ringkontraktion vom 6-gliedrigen (α -Säure) zum 5-gliedrigen (Iso- α -Säure) Ring, wobei je zwei Iso- α -Säuren (*cis* und *trans*) entstehen (Abb. 0-2).

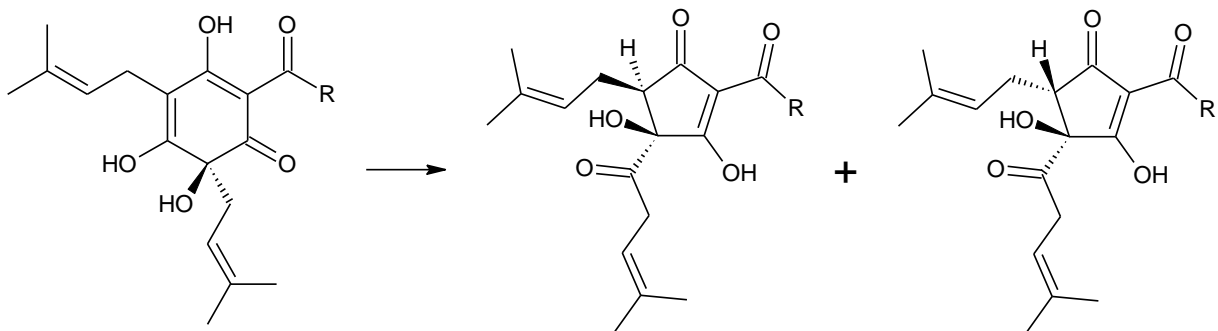


Abb. 0-2: Isomerisierung; Umwandlung von Humulon zu *cis*- (links) und *trans*-Isohumulon (rechts).

Als **Racemisierung** wird die intramolekulare Umwandlung vom (6*S*)-(-)-Humulon zum entsprechenden (6*S*/6*R*)-(\pm)-Racemat ($ee = 0\%$) bezeichnet (Abb. 0-3). Obwohl während der Forschungsarbeiten nicht immer eine vollständige Racemisierung stattfand ($ee \neq 0\%$), wird bei derartigen sog. **partiellen Racemisierungen** häufig auf den Zusatz «partiell» verzichtet und einfachheitshalber ebenso nur von einer **Racemisierung** gesprochen.

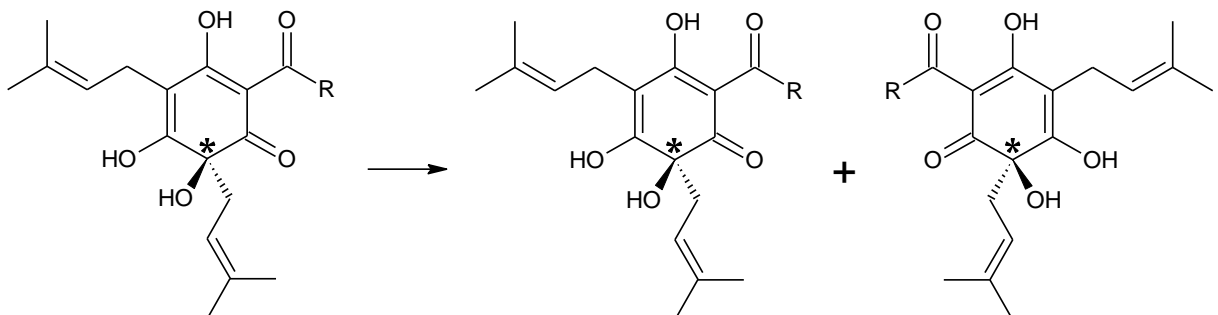


Abb. 0-3: Racemisierung; Umwandlung von (*S*)-Humulon zum (*S*/*R*)-Racemat.

1 Einleitung

«Klinische Prüfungen der jüngsten Vergangenheit zeigen, dass diese Kombination in der Behandlung von Unruhezuständen und Einschlafstörungen sinnvoll ist.»

Mit diesem Wortlaut begründete der „STUDIENKREIS ENTWICKLUNGSGESCHICHTE DER ARZNEI-PFLANZENKUNDE“ (Universität Würzburg) seine Entscheidung, den Hopfen zur „Arzneipflanze 2007“ zu küren. Dabei ist unter der beschriebenen Kombination die Verwendung des Hopfens als pflanzliches Beruhigungsmittel in Verbindung mit der Baldrianwurzel zu verstehen.^[1,2]

Obwohl über 95 %^[3] der Welthopfenernte nach wie vor in der Bierbrauerei verarbeitet werden, wird durch die Wahl des Hopfens zur „Arzneipflanze 2007“ seine in den letzten Jahren rasant ansteigende Bedeutung als gesundheitsfördernde Pflanze verdeutlicht. Doch nicht nur als pflanzliches Schlafmittel macht der Hopfen auf sich aufmerksam. Ihm wird eine ganze Reihe weiterer physiologischer Effekte zugeschrieben. So verfügt er neben der sedativen^[4] Wirkung noch über antibiotische^[5] und entzündungshemmende^[6,7] Eigenschaften. Zusätzlich wirkt er krebshemmend^[8], antimykotisch^[9] und antioxidativ^[10,11], nur um die wichtigsten Fähigkeiten zu nennen.^[4,12,13] Für diese gesundheitsfördernden Eigenschaften zeigen sich im Hopfen mehr oder minder die drei folgenden Substanzgruppen verantwortlich.^[14]

- Ätherische Öle
- Polyphenole
- Bitterstoffe

Für die Bierherstellung ist die Bitterkeit, neben der konservierenden Wirkung, die wichtigste Eigenschaft des Hopfens. Deshalb wird sich in der vorliegenden Arbeit größtenteils auf die Bitterstoffe konzentriert. Diese Bitterstoffe wiederum lassen sich in die sog. α -Säuren (Humulone), die β -Säuren (Lupulone) sowie in die Harze unterteilen. Den größten Stellenwert hierbei haben mit Abstand die Humulone. Während des Bierbrauens, genauer gesagt während des Würzekochens, werden diese α -Säuren in einer intramolekularen Reaktion zu ihren Isomerisierungsprodukten, den sog. Iso- α -Säuren (Isohumulone) umgewandelt. Diese sind weitaus besser in der Würze löslich und besitzen einen deutlich höheren Bitterwert als die Ausgangsprodukte. Letztendlich sind es diese Isohumulone, die im fertigen Bier in mehr oder weniger hohen Konzentrationen vorliegen und für den charakteristischen bitteren Biergeschmack verantwortlich sind.

Die Isohumulone sind aus strukturchemischer Sicht, genau wie ihre Ausgangsprodukte, die Humulone, chirale Moleküle. Das Wort chiral bzw. das entsprechende Substantiv, die Chiralität, wird abgeleitet vom griechischen Wort *cheír* (= Hand). Ins Deutsche übersetzt bedeutet Chiralität demnach Händigkeit und bezeichnet die Eigenschaft eines Objekts, bzw. aus chemischer Sicht eines Moleküls, mit seinem Spiegelbild nicht deckungsgleich zu sein.^[15]

Bild und Spiegelbild eines Moleküls, welche sich nicht zur Deckung bringen lassen, nennt man Enantiomere. Namentlich werden diese dadurch unterschieden, dass ihnen, gemäß ihrer jeweiligen räumlichen Anordnung, ein (*R*)- (von lat. *rectus*, rechts) bzw. ein (*S*)- (von lat. *sinister*, links) vorangestellt wird. Enantiomere besitzen identische physikalische und chemische Eigenschaften mit den Ausnahmen, dass sie die Schwingungsebene von linear polarisiertem Licht in entgegengesetzte Richtungen (gekennzeichnet durch die Stereodeskriptoren (+) oder (-)) drehen (optische Aktivität) und dass ihre Wechselwirkungen mit anderen chiralen Molekülen unterschiedlich sind. Außerdem besitzen sie oftmals stark voneinander abweichende physiologische Eigenschaften wie z.B. den Geruch oder den Geschmack. Ein charakteristisches Beispiel hierfür ist das *Carvon*. Es handelt sich dabei um einen Stoff, welcher in der Natur als Bestandteil von ätherischen Ölen in beiden enantiomeren Reinformen sowie auch als Gemisch vorkommt. Dabei besitzt das (*S*)-Carvon den typischen Geruch nach Kümmel, während (*R*)-Carvon nach Minze riecht.^[16] Neben derartigen Geruchs- oder Geschmacksunterschieden, wirken Enantiomere darüber hinaus häufig auch auf zum Teil extrem divergente Weise gesundheitsfördernd bzw. -schädlich auf Lebewesen. Letzteres ist aus dem pharmazeutischen Bereich von vielen chiralen Arzneistoffen bekannt. Hierbei besteht die Problematik, dass häufig nur ein Enantiomer (das sog. *Eutomer*^[17]) den gewünschten heilsamen Effekt bei der Verabreichung eines Medikamentes besitzt, während das Andere (*Distomer*^[17]) keine oder nur eine geringere Wirkung zeigt. Das Vorhandensein eines Distomers ist häufig auch die Ursache für Nebenwirkungen bei der Einnahme bestimmter Medikamente.^[18]

In der Literatur wird davon ausgegangen, dass im Hopfen ausnahmslos das linksdrehende (-)-Humulon vorkommt.^[19] Dieses besitzt, nach den neuesten Erkenntnissen und entgegen früherer Annahmen, die (*S*)-Konfiguration (Abb. 1-1, links).^[20] Durch künstliche Racemisierung^[21,22] bzw. durch äußere Einflüsse während der Verarbeitung des Hopfens ist es jedoch möglich, dass auch das andere Enantiomer, das (+)-Humulon, entsteht. Das oben beschriebene Phänomen ist naturgemäß auch beim Humulon denkbar: Die einzelnen, vom (-)-Humulon bekannten physiologischen Eigenschaften könnten beim (+)-Humulon folglich entweder verstärkt, abgeschwächt oder sogar gegensätzlich sein. So könnte z.B. das (+)-Humulon theoretisch durchaus einen süßlichen Geschmack aufweisen, obwohl das (-)-

Humulon bitter schmeckt. Abb. 1-1 zeigt die Strukturformeln von (*S*)-(-)- und (*R*)-(+)-Humulon, wobei ihre Chiralität durch den Vergleich mit einer menschlichen Hand (griechisch *cheír*) deutlich gemacht wird.

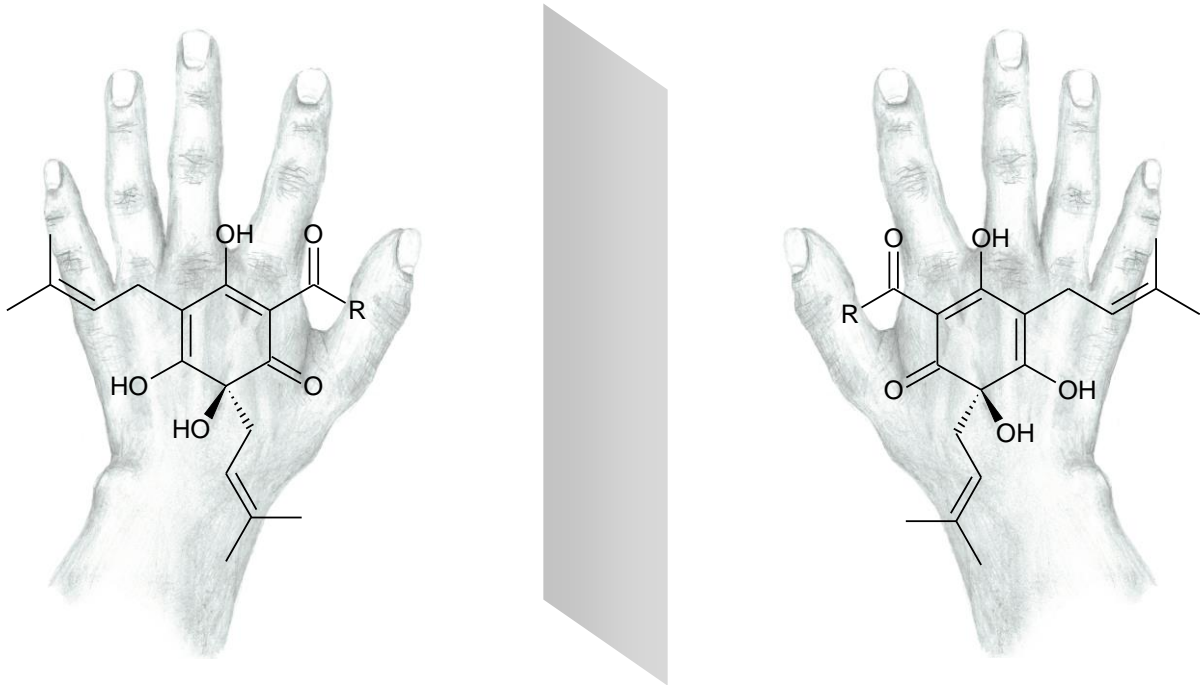


Abb. 1-1: (*S*)-Humulon (links) und (*R*)-Humulon (rechts) mit Spiegelebene.

2 Aufgabenstellung

Die vorliegende Arbeit gliedert sich grob in zwei Teile:

Der erste Teil befasst sich mit einem (fast) völlig neuen und in den letzten Jahrzehnten kaum Beachtung gefundenen Bereich der Hopfenforschung. Dabei handelt es sich um die Untersuchung der Hopfenbitterstoffe hinsichtlich ihrer Chiralität. So sollen die optisch aktiven α -Säuren zunächst künstlich racemisiert werden, um dann eine Methode entwickeln zu können, die Enantiomere mittels chiraler Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) zu trennen. Darüber hinaus soll untersucht werden, ob im unbehandelten Hopfen (\triangleq nativ), wie in der Literatur bisher einstimmig berichtet wird, tatsächlich ausschließlich das (-)-Humulon vorkommt oder ob auch das entsprechende Enantiomer vorliegt bzw. ob es, zumindest in kleinen Mengen, während der Hopfenverarbeitung gebildet wird. Außerdem soll in diesem Zusammenhang ein eventueller Einfluss des Standorts bzw. des Klimas (Sonnenstrahlung, Temperatur) auf ein mögliches Auftreten von (+)-Humulon untersucht werden. Zuletzt sollen die Humulon-Enantiomere präparativ getrennt und hinsichtlich ihrer eventuell unterschiedlichen Eigenschaften getestet werden. Das Hauptaugenmerk soll dabei zunächst in sensorischen Tests auf den Geschmack gelegt werden, um zu überprüfen, ob sie sich bezüglich ihrer Bitterkeit unterscheiden. Sollte in natürlichem Hopfen tatsächlich neben dem (-)-Humulon auch das Enantiomer vorliegen und sollten sich die beiden Formen hinsichtlich ihres Geschmacks unterscheiden, so bestünde in der herkömmlichen Hopfenanalytik folgende Problematik: Da bisher die Analytik von Hopfen nur bzgl. der α -Säuren an sich (α -Säuren als Racemat) möglich ist, würde dies bei einem geschmacklichen Unterschied beider Enantiomere die Charakterisierung des Hopfens hinsichtlich seines Brauwertes verfälschen. Da es sich hierbei um das wichtigste Qualitätskriterium des Hopfens handelt, wäre es demzufolge sinnvoll, (-)- und (+)-Humulon separat analysieren zu können. Eine geeignete Methodik hierfür soll in der vorliegenden Arbeit entwickelt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit soll der Einfluss verschiedener Parameter auf die Isomerisierung der α -Säuren zu ihren entsprechenden Iso- α -Säuren untersucht werden. Hierbei wird durch Variation von Temperatur und Zeit der Einfluss beider Größen auf die Isomerisierungsrate ermittelt. Außerdem wird eine Vielzahl von Substanzen hinsichtlich ihrer eventuellen katalytischen Wirkung im Bezug auf die Isomerisierung getestet. Eine effiziente Isomerisierung, d.h. eine möglichst rasche und quantitative Umwandlung zu Iso- α -Säuren ist sowohl aus energetischer als auch ökonomischer Sicht anzustreben. Außerdem sollen in der vorliegenden Arbeit die bei den unterschiedlichen Reaktionen entstehenden Iso- α -Säuren hinsichtlich ihres

cis:trans-Verhältnisses untersucht werden. Die Intention dahinter ist, dass ein hohes *cis:trans*-Verhältnis die Haltbarkeit von Bier merklich steigert, da *trans*-Iso- α -Säuren deutlich instabiler sind als die entsprechenden *cis*-Isomere. Die Isomerisierungsreaktionen werden sowohl in flüssiger Phase, um den Realfall des Bierbrauens zu simulieren, als auch an fester Phase durchgeführt und die jeweils unterschiedlichen Auswirkungen auf die Isomerisierung ermittelt.

3 Theoretischer Teil

3.1 Die Botanik und Allgemeines zum Hopfen

Der Hopfen ist eine winterharte zweihäusige Kletterpflanze. Zweihäusig (*diözisch*) bedeutet, dass es sowohl männliche als auch weibliche Hopfenpflanzen gibt. Allerdings bilden nur die weiblichen Pflanzen die sog. Hopfendolden aus, in denen sich größtenteils die für den Menschen und insbesondere für die Brauindustrie interessanten Inhaltsstoffe befinden. Da eine Befruchtung durch männliche Pflanzen den Lupulingehalt in den Dolden und somit die Qualität des Hopfens aufgrund des verringerten Brauwertes reduziert, werden die männlichen Hopfenpflanzen in Hopfenanbaugebieten weiträumig gerodet. Die Vermehrung des Hopfens erfolgt vegetativ durch sog. Fehser. Die männlichen Hopfensamen werden ausschließlich in der Hopfenforschung zur Züchtung neuer Sorten verwendet.^[23-26]

Die botanische Klassifizierung des Hopfens, genauer gesagt des zum Bierbrauen verwendeten Kulturhopfens, lautet wie folgt:^[26]

Abteilung:	Samenpflanzen (<i>Spermatophyta</i>)
Klasse:	Zweikeimblättrige (<i>Dicotyleae</i>)
Ordnung:	Nesselgewächse (<i>Urticaceae</i>)
Familie:	Hanfgewächse (<i>Cannabinaceae</i>)
Gattung:	Hopfen (<i>Humulus</i>)
Art:	Echter Hopfen (<i>Humulus lupulus L.</i>)

Der Hopfen windet sich im Uhrzeigersinn (rechtswindend, Abb. 3-1) um Kletterhilfen, wie den sog. Aufleitdrähten im Hopfenanbau oder z.B. Bäumen bei wildwachsendem Hopfen. Der Kulturhopfen treibt nach seiner Winterruhe im Frühjahr wieder aus und wächst anschließend von Ende April bis Anfang Juli. Somit beträgt seine Wachstumszeit ca. 70 Tage und er erreicht dabei bei einer durchschnittlichen Wachstumsgeschwindigkeit von 10 cm pro Tag eine Höhe von 7 – 8 m. Unter günstigen Bedingungen wächst der Hopfen sogar 30 – 35 cm täglich. Ende Juni beginnt er zu blühen und bildet anschließend innerhalb der nächsten zwei Monate die erntereifen Dolden aus. Je nach Sorte werden von Ende August bis Ende September die Dolden geerntet. Anschließend verwelkt die Pflanze und der Wurzelstock überwintert im Boden, bevor sie im nächsten Frühjahr wieder neu austreibt. So sind Hopfenpflanzen mit einem Alter von 50 Jahren zwar durchaus nachweisbar, allerdings ent-

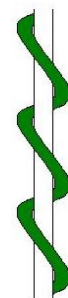


Abb. 3-1: Rechtswindende Kletterrichtung.

spricht dies eher der Seltenheit. Durchschnittlich werden Hopfenpflanzen 15 – 20 Jahre alt, bevor sie gerodet werden, um für neue Pflanzen bzw. neue Sorten Platz zu machen.^[25,26]

Neben der Bodenqualität und dem Klima (Temperatur und Niederschlagsmenge – der Hopfen bevorzugt Wärme und Feuchtigkeit) ist die Tageslichtlänge der wichtigste Aspekt für das perfekte Gedeihen des Hopfens. So wächst er im Wesentlichen ausschließlich zwischen dem 35. und 55. geographischen Breitengrad der nördlichen und südlichen Halbkugel (Abb. 3-2). Da hier im Sommer Tageslichtlängen von über 18 Stunden herrschen und die Tageslichtlänge für den Zeitpunkt der Blüte sowie für einen guten Ertrag verantwortlich ist, kann der Hopfenanbau – zumindest ohne künstliche Beleuchtung – nur hier betrieben werden.^[25,26]

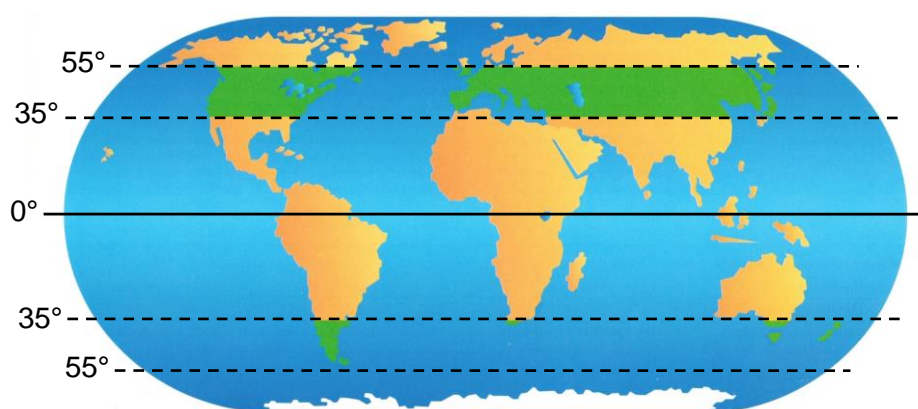


Abb. 3-2: Die Hopfenanbauggebiete zwischen dem 35. und 55. Breitengrad der nördlichen und südlichen Halbkugel.^[25]

Das bedeutendste Hopfenanbauland ist Deutschland mit einem Anteil von ca. 40 % (2012) der Welthopfenernte. In der folgenden Tab. 3-1 sind ausgewählte Daten der weltweiten Hopfenernte von 2010 – 2012 aufgeführt. Dabei sind die Erträge in Tonnen sowie der jeweilige prozentuale Anteil an der Weltausbeute zu sehen.^[27]

Tab. 3-1: Weltweite Hopfenernte 2010 – 2012.^[27]

Anbauggebiet	Abwaage 2010		Abwaage 2011		Abwaage 2012	
Hallertau	29 129 t	30 %	32 757 t	34 %	29 794 t	34 %
Deutschland total*	34 233 t	35 %	38 111 t	39 %	34 475 t	40 %
USA	29 707 t	31 %	29 348 t	30 %	27 782 t	32 %
China	10 150 t	10 %	10 230 t	11 %	7 544 t	9 %
Tschechien	7 772 t	8 %	6 088 t	6 %	4 338 t	5 %
Polen	2 668 t	3 %	2 268 t	2 %	1 818 t	2 %
Slowenien	2 400 t	2 %	2 470 t	3 %	1 560 t	2 %

Anbauggebiet	Abwaage 2010		Abwaage 2011		Abwaage 2012	
England	1 608 t	2 %	1 093 t	1 %	1 459 t	2 %
Australien	1 099 t	1 %	1 044 t	1 %	1 093 t	1 %
Spanien	1 037 t	1 %	936 t	1 %	1 028 t	1 %
Südafrika	913 t	1 %	956 t	1 %	1 003 t	1 %
Restliche Länder**	5 093 t	5 %	4 832 t	5 %	4 751 t	5 %
Welt total	96 680 t	100 %	97 376 t	100 %	86 851 t	100 %

* Deutschland total beinhaltet auch die Hallertau.

** Frankreich, Neuseeland, Österreich, Belgien, Bulgarien, Slowakei, Rumänien, Russland, Türkei, Ukraine, Portugal, Serbien, Weißrussland, Kroatien, Schweiz, Ungarn, Argentinien, Japan, Indien.

Innerhalb Deutschlands wiederum stellt die Hallertau, das weltweit größte zusammenhängende Hopfenanbauggebiet, mit ca. 86 % (2011/2012) den größten Anteil und produziert somit über 30 % des Weltbedarfs an Hopfen. Dieses Areal, welches zwischen dem Dreieck München, Ingolstadt und Landshut liegt, sowie die weiteren deutschen Hopfenanbaugebiete sind in Abb. 3-3 dargestellt.^[26,27]

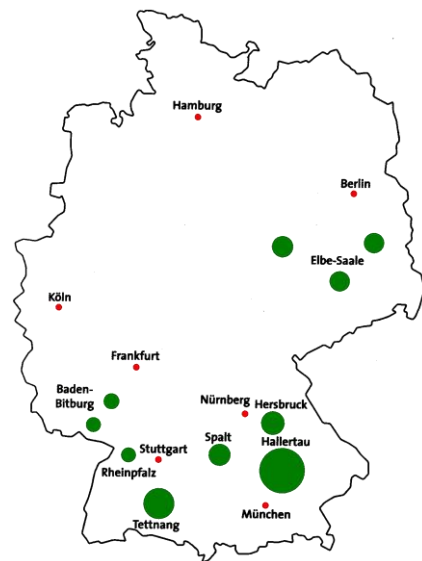


Abb. 3-3: Hopfenanbaugebiete in Deutschland.^[26]

Die *International Hop Growers` Convention* (IHGC) führte im Jahr 2012 187 unterschiedliche Hopfensorten. Diese sind, angeordnet nach ihrem Ursprungs-/Züchtungsland, in Tab. 3-2 aufgelistet.^[28] Die bei den Brauereien gefragtesten Sorten der beiden bedeutendsten Anbauländer, Deutschland und USA, sind dabei in fett dargestellt.

Tab. 3-2: Welthopfensortiment 2012 (*International Hop Growers` Convention*).^[28]

Sorte	Kategorie	Sorte	Kategorie
Australien		Belgien	
Ella	Flavour	Record	Bitter
Galaxy	Flavour		
Helga (prev. Southern Hallertau)	Aroma	China	
Pride of Ringwood	Bitter	Marco polo	Bitter
Summer	Flavour	Qingdao dahua	Bitter
Super Pride	Bitter	SA-1	Aroma
Sylva (prev. Southern Saaz)	Aroma	Deutschland	
Topaz	Flavour	Hallertau Blanc	Aroma

Sorte	Kategorie	Sorte	Kategorie
England		Hallertauer	Aroma
Admiral	Bitter	Hallertauer Magnum	Bitter
Boadicea	Dual	Hallertauer Merkur	Bitter
Bramling Cross (OT48)	Aroma	Hallertauer Mfr.	Aroma
Brewers Gold	Bitter	Hallertauer Taurus	Bitter
Early Choice	Aroma	Hallertauer Tradition	Aroma
Endeavour	Aroma	Herkules	Bitter
First Gold	Dual	Hersbrucker Spät	Aroma
Fuggle	Aroma	HU ZH-APA1 (Gold. Princess)	ornam.
Golding	Aroma	Hüll Melon	Aroma
Golding (clones Cobbs, Early Bird, Eastwell, Mathon)	Aroma	Hüller Bitter	Aroma
Golding US	Aroma	Mandarina Bavaria	Aroma
Northern Brewer	Bitter	Opal	Aroma
Phoenix	Bitter	Perle	Aroma
Pilgrim	Bitter	Polaris	Dual
Pilot	Bitter	Relax	Aroma
Pioneer	Bitter	Saphir	Aroma
Progress	Aroma	Smaragd	Aroma
Sovereign	Aroma	Spalter	Aroma
Whitbreads Golding Variety	Aroma	Spalter Select	Aroma
Wye Challenger	Dual	Tettnanger	Aroma
Wye Northdown	Bitter		
Wye Target	Bitter		
Japan		Frankreich	
Furano 18	Aroma	Aramis	Aroma
Furano 6	Aroma	Bouclier	Aroma
Furano Ace	Aroma	Strissel Spalt	Aroma
Furano Beauty	Aroma	Strisselspalter	Aroma
Furano Beta	Aroma	Triskel	Aroma
Furano Laura	Aroma		
Furano Royal Green	Aroma	Neuseeland	
Furano Special	Aroma	Dr Rudi	Dual
Golden Star	Bitter	Green Bullet	Dual
Kaikogane		Kohatu	Aroma
Kirin No.2		Motueka	Aroma
Little Star	Aroma	Nelson Sauvín	Dual
Nanbuwase		Pacific Gem	Bitter
Shinsyu Wase	Bitter	Pacific Jade	Bitter
Sinsyu Wase	Bitter	Pacifica	Aroma
Sorachi Ace	Aroma	Rakau	Dual
		Riwaka	Aroma
		Sticklebract	Bitter
		Wai-iti	Aroma
		Waimea	Bitter
		Wakatu	Aroma
Polen		Serbien/Montenegro	
Limbus	Aroma	Aroma	Aroma
Lomik	Aroma	Bačka	Aroma
Lubelski	Aroma	Robusta	Aroma
lunga	Bitter		
Marynka	Bitter	Slowenien	
Oktawia	Bitter	Extra Styrian Dana	Bitter
Sybilla	Aroma	Savinjski Golding	Aroma
Zbyszko	Bitter	Styrian Gold	Aroma
Zula	Bitter	Styrian golding	Aroma
Südafrika			

Sorte	Kategorie	Sorte	Kategorie
Outeniqua	Bitter	Styrian golding B = Bobek	Aroma
Southern Dawn	Bitter	Styrian golding C = Cerera	Aroma
Southern Promise	Dual	Styrian Savinjski golding	Aroma
Southern Star	Bitter	Super Styrian Aurora	Aroma
Tschechien		Ukraine	
Agnus	Bitter	Alta	Bitter
Bohemie	Aroma	Gaidamatskyi	Aroma
Bor	Aroma	Klon-18	Aroma
Harmonie	Aroma	National (Natsionalnyi)	Aroma
Kazbek	Aroma	Poliskyi	Bitter
Premiant	Aroma	Promin	Bitter
Rubin	Bitter	Slavianka	Aroma
Saaz	Aroma	Starovolynskyi Aromatychnyi	Aroma
Saaz Late	Aroma	Triumpf	Aroma
Saaz Special	Aroma	Ukrainskyi Aromatychnyi	Aroma
Saazer	Aroma	Zagrava	Aroma
Sladek	Aroma	Zlato Polissia	Aroma
Vital	Bitter	Zmina	Bitter
USA			
Ahtanum TM, YCR 1	Aroma	Horizon	Dual
Amarillo® VGXP01 c.v.	Aroma	Liberty	Aroma
Apollo	Bitter	Millennium	Bitter
Aquila	Bitter	MosaicTM, HBC 369 c.v.	Aroma
Banner	Bitter	Mt. Hood	Aroma
Bitter Gold	Bitter	Mt. Rainier	Aroma
Bravo	Bitter	Newport	Bitter
Calypso	Dual	Nugget	Bitter
Cascade	Aroma	Olympic	Bitter
Centennial	Dual	Palisade® YCR 4 c.v.	Aroma
Chelan	Bitter	Santiam	Aroma
Chinook	Dual	Satus® YCR 7 cv.	Bitter
Citra®, HBC 394 c.v.	Aroma	Simcoe® CR 14 c.v.	Dual
Cluster	Dual	Sterling	Aroma
Columbia	Aroma	Summit	Bitter
Columbus	Bitter	Super Galena	Bitter
Comet	Bitter	Talisman	Bitter
Crystal	Aroma	Tomahawk®	Bitter
Delta	Aroma	Ultra	Aroma
El Dorado®	Dual	Vanguard	Aroma
Eroica	Bitter	Warrior®, YCR 5 cv.	Bitter
Galena	Bitter	Willamette	Aroma
Glacier	Aroma	Zeus	Bitter

Die Bedeutung der einzelnen Sorten spiegelt sich auch in den Anbauflächen wider. Diese sind, exemplarisch für Deutschland und zusammen mit der Anzahl der Hopfenanbaubetriebe, in der folgenden Tab. 3-3 aufgeführt.^[29]

Tab. 3-3: Hopfenanbauflächen 2012 und 2013 (Deutschland).^[29]

Sorte	Gesamtfläche 2012 [ha]	Gesamtfläche 2013 [ha]	Jungfläche 2013 [ha]	Altfläche 2013 [ha]	Differenz* [ha]
Cascade	0	10,14	6,07	4,07	+10,14
Hallertau Blanc	0	12,29	11,42	0,87	+12,29
Hüll Melon	0	13,66	9,99	3,67	+13,66
Mandarina Bavaria	0	34,58	28,59	5,99	+34,58
Hallertauer Mfr.	1 011,90	924,57	14,62	909,95	-87,33
Spalter	105,60	112,48	14,18	98,30	+6,88
Hersbrucker spät	785,25	846,96	111,02	735,94	+61,71
Tettnanger	789,68	787,11	17,87	769,24	-2,57
Perle	3 202,88	3 048,35	105,03	2 943,32	-154,53
Spalter Select	537,87	495,78	11,58	484,20	-42,09
Hallertauer Tradition	2 747,82	2 660,93	128,05	2 532,88	-86,89
Saphir	252,52	324,42	94,66	229,76	+71,90
Opal	32,77	27,56	1,30	26,26	-5,21
Smaragd	43,47	40,53	0,45	40,08	-2,94
Hersbrucker Pure	7,00	0,61	0	0,61	-6,39
Saazer	12,91	12,15	1,97	10,18	-0,76
Northern Brewer	296,45	280,67	5,23	275,44	-15,78
Brewers Gold	21,53	18,72	0,65	18,07	-2,81
Nugget	207,08	184,23	4,95	179,28	-22,85
Target	2,10	0,86	0	0,86	-1,24
Hallertauer Magnum	3 509,49	3 102,05	35,29	3 066,76	-407,44
Hallertauer Taurus	821,25	709,24	2,26	706,98	-112,01
Hallertauer Merkur	49,14	37,53	2,09	35,44	-11,61
Herkules	2 641,84	3 086,20	459,43	2 626,77	+444,36
Record	0,87	0,87	0	0,87	±0
Zeus	0,10	0	0	0	-0,10
Comet	0	3,00	2,00	1,00	+3,00
Polaris	0	43,17	32,34	10,83	+43,17
Sonstige/Zuchtstämme	48,34	30,57	7,46	23,11	-17,77
Gesamt	17 127,86	16 849,23	1 108,50	15 740,73	-278,63
Betriebe	1 295	1 231			-64

* Differenz der Gesamtfläche 2012 – 2013.

3.2 Die Inhaltsstoffe und die Chemie des Hopfens

Die, botanisch korrekt als Hopfenzapfen^[26] bezeichneten und gemeinhin als Hopfendolden bekannten, ausgereiften Blütenstände der weiblichen Hopfenpflanzen sind aus mehreren Einzelteilen aufgebaut. Nämlich aus der sog. Spindel, den Deckblättern sowie den Vorblättern. An den Blättern, vor allem den Vorblättern, befinden sich die Lupulindrüsen, in denen sich das sog. Lupulin, ein gelbes klebriges Pulver bildet (Abb. 3-4^[30,31]). Neben den Polyphenolen, welche allerdings in größerem Maße in den Blättern vorkommen und einer Vielzahl weiterer Stoffe, besteht das Lupulin hauptsächlich aus den Bitterstoffen (Gesamtharze) sowie den ätherischen Ölen.^[23,26]



Abb. 3-4: Hopfendolde (Hopfenzapfen); links: an der Rebe^[30], rechts: Längsschnitt mit sichtbarem Lupulin^[31].

In der folgenden Tabelle ist die prozentuale Zusammensetzung von luftgetrockneten Hopfendolden aufgeführt. Während frische Dolden einen Wassergehalt von über 80 % aufweisen, enthalten sie nach der unmittelbar nach der Ernte erfolgenden Trocknung nur noch ca. 10 % Wasser.^[26]

Tab. 3-4: Prozentuale Zusammensetzung der Hopfendolden, lufttrocken.^[23]

Prozentualer Gehalt	Hopfeninhaltsstoff
10 – 25 %	Gesamtharze
4 – 14 %	Polyphenole
0,4 – 2,0 %	Hopfenöle
10 – 11 %	Wasser
3 %	Lipide und Wachse
12 – 22 %	Eiweiß
2 – 44 %	Kohlenhydrate
7 – 10 %	Mineralstoffe
10 – 17 %	Cellulose

Die Hopfenbitterstoffe (Gesamtharze), die sowohl in Diethylether als auch in Methanol löslich sind, lassen sich noch weiter unterteilen: Diese Gliederung basiert auf der Löslichkeit in Hexan, wobei die eine Fraktion, die sog. Weichharze, in Hexan löslich sind, während der unlösliche Rückstand die Fraktion der Hartharze darstellt. Die Weichharze wiederum lassen sich aufschlüsseln in die spezifischen Weichharze, zu denen die Hopfenbittersäuren (α - und β -Säuren) gehören, sowie in die unspezifischen Weichharze. Sowohl die unspezifischen Weich- als auch die Hartharze stellen Oxidationsprodukte der Hopfenbittersäuren dar.^[23,26] In Abb. 3-5 ist die Untergliederung der Hopfenbitterstoffe zur Veranschaulichung schematisch dargestellt. Außerdem sind die prozentualen Anteile der einzelnen Stoffgruppen im Bezug auf den Gesamtgehalt luftgetrockneter Hopfendolden aufgeführt.

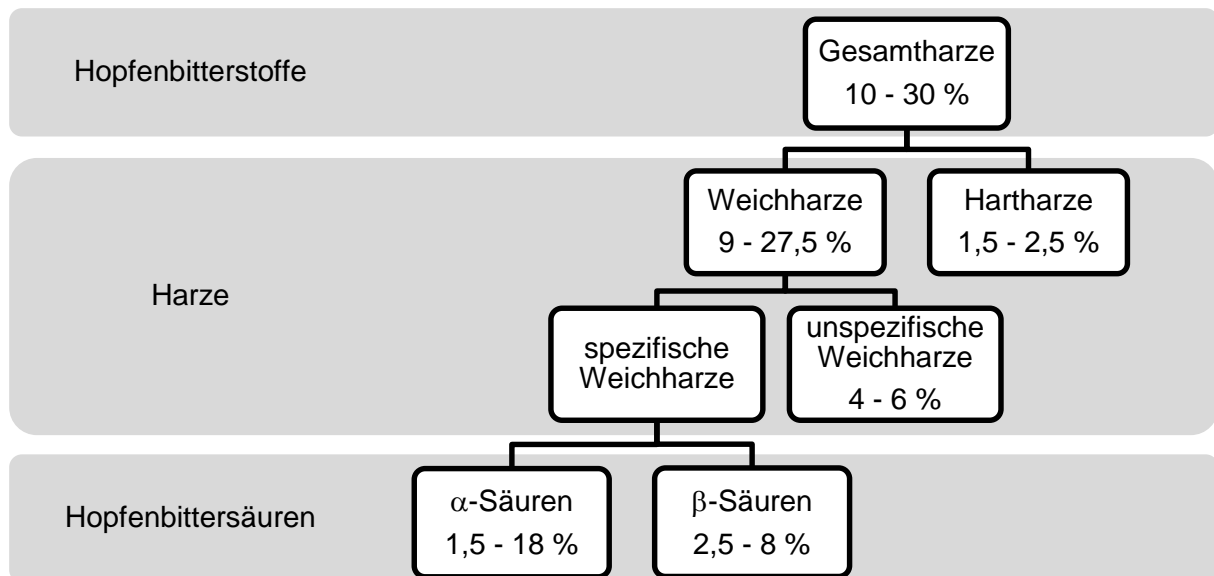


Abb. 3-5: Unterteilung der Gesamtharze.^[26]

Die wichtigsten Bestandteile sind hierbei mit Abstand die α -Säuren. Diese werden auch als Humulone bezeichnet und bestehen aus insgesamt sechs Homologen. Abhängig vom Alkylrest (-R) am C-2-Atom des Rings (Abb. 0-1) tragen diese sechs Kongenere die Präfixe n-, co-, ad-, post-, prä- und adprä-. Hierbei sind aufgrund des relativen Gehalts nur die drei erst genannten von Bedeutung, während post-, prä- und adprä-Humulon wegen ihrer minoren Anteile (1 – 3 % der Gesamt- α -Säurenmenge^[19]) vernachlässigt werden können. Die Gesamt- α -Säurenmenge sowie deren Zusammensetzung an den einzelnen Homologen ist zum einen genetisch bedingt und unterliegt zum anderen vielen weiteren Einflüssen, wie den Witterungsverhältnissen, der Düngung, der Provenienz, dem Jahrgang, dem Zeitpunkt der Ernte sowie der Behandlungsweise und dem Alter des Hopfens. In Tab. 3-5 sind die prozentualen α -Säuregehalte einiger Hopfensorten sowie die Anteile der drei Haupt- α -Säuren (n-, co-, und ad-Humulon) aufgeführt.^[23]

Tab. 3-5: α -Säuregehalte ausgewählter Hopfensorten (Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Hüll, 2007).^[23]

	Sorte	α -Säuren [%]	n-Humulon [%]*	co-Humulon [%]*	ad-Humulon [%]*
Aromahopfen	Hallertauer Mittelfrüh	4,3	67,4	19,9	12,7
	Hallertauer Tradition	6,1	58,7	25,9	15,4
	Hersbrucker Spät	3,2	61,1	20,7	18,2
	Opal	6,5	72,4	13,3	13,8
	Perle	7,1	51,6	32,8	15,6
	Saphir	3,6	79,1	11,8	9,1

Sorte	α -Säuren [%]	n-Humulon [%]*	co-Humulon [%]*	ad-Humulon [%]*
Smaragd	5,0	74,5	14,0	11,5
Spalter	4,1	62,2	24,8	13,0
Spalter Select	5,2	63,8	22,1	14,1
Tettnanger	4,1	60,0	26,0	14,0
Hallertauer Magnum	14,0	68,1	19,9	12,0
Bitterhopfen	Hallertauer Merkur	12,4	73,6	15,7
	Hallertauer Taurus	15,4	67,4	19,2
	Herkules	14,5	56,4	30,4
	Northern Brewer	9,1	62,1	27,4
	Nugget	11,3	60,4	24,3

* Die Anteile an post-, prä- und adprä-Humulon wurden in der Literatur nicht aufgeführt.

3.3 Die Strukturformel von (n-*)Humulon

Die Forschung bezüglich der Hopfenbitterstoffe kann auf eine lange Geschichte zurückblicken. Während der Träger der Hopfenbitterstoffe, das Lupulin, bereits 1821 von A. W. IVES namentlich benannt wurde^[32], war es im Jahr 1863 J. C. LERMER, der erstmals einen Bitterstoff aus Hopfen isolieren und kristallinisch rein darstellen konnte.^[33] Allerdings handelte es sich, wie später bewiesen werden konnte, nicht um die α -, sondern um die β -Säure. Auch H. BUNGENER konnte im Jahr 1884 eine Hopfenbittersäure isolieren, wobei es sich hier ebenfalls um die β -Säure handelte.^[34] Vier Jahre später wurde von M. HAYDUCK entdeckt, dass es sich beim Hopfenharz um drei unterschiedliche Harze handelt. Diese drei unterschiedlichen Harze konnten von HAYDUCK sowohl aus Hopfen direkt als auch aus Lupulin isoliert werden und wurden von ihm als α -Harz, β -Harz (sog. Weichharze) und γ -Harz (sog. Hartharz) bezeichnet. Dabei wurde deutlich, dass insbesondere das α -Harz und das β -Harz von Bedeutung und diese beiden schwach sauren Substanzen leicht unterscheidbar waren. Darüber hinaus entdeckte HAYDUCK, dass sowohl das α -Harz als auch das β -Harz teilweise kristallisierten. Während die Isolation der kristallinen Substanzen aus dem α -Harz noch fehlschlug, konnten diejenigen aus dem β -Harz isoliert werden, welche sich als identisch mit den bereits

* Zunächst wurde in der Literatur davon ausgegangen, dass nur ein Humulon-Kongener existiert. Dabei handelte es sich um die mengenmäßig dominierende und heute als n-Humulon bekannte Form. Die restlichen Homologen wurden erst später entdeckt (s. S. 23).

von LERMER & H. BUNGENER bekannten Hopfenbittersäuren (sog. Lupulinsäuren, später β -Hopfenbittersäuren genannt) erwiesen.^[35,36] Die Isolierung der aus dem α -Harz stämmigen kristallinen Substanzen gelang schließlich 1891 C. J. LINTNER & A. BUNGENER. Hierbei wurde auch erstmals eine Elementarzusammensetzung der entsprechenden Substanz ermittelt und so die totale Verschiedenheit gegenüber der Hopfenbittersäure von LERMER & H. BUNGENER bewiesen.^[37,38] LINTNER ET AL. prägten in der Folgezeit auch die Namen α - und β -Hopfenbittersäuren, in Abhängigkeit des nach HAYDUCK benannten Harzes, aus welchem die entsprechende kristalline Substanz isoliert wurde.^[35,39,40] Da die genaue Zusammensetzung der α -Säure aufgrund ihrer schwierigen Reindarstellung nach wie vor unklar war, wurden auch von G. BARTH^[38] im Jahr 1900, sowie von M. BAMBERGER & A. LANDSIEDL^[40] (1902) weitere Versuche unternommen, die α -Säure in Reinform darzustellen. Da es auch hier nicht gelang, diese gänzlich von dem ihr anhaftenden Harz zu befreien, haben auch diese Experimente nicht zu einer Aufstellung der korrekten Summenformel geführt. So schwankten BAMBERGER & LANDSIEDL nach weiteren Elementaranalysen und Molekulargewichtsbestimmungen zwischen den Formeln $C_{20}H_{28}O_5$ und $C_{20}H_{30}O_5$.^[40,41] Im Jahr 1904 modifizierten schließlich C. J. LINTNER & J. SCHNELL die Summenformel zu $C_{20}H_{32}O_5$ und gaben der α -Hopfenbittersäure den empirischen Namen Humulon.^[41] Nach dem in den darauf folgenden Jahren keine Arbeiten mehr über die chemische Natur der Hopfenbitterstoffe mehr erschienen sind^[35], nahm sich W. WÖLLMER im Jahr 1916 ihrer wieder an. In Analogie an den von LINTNER & SCHNELL geprägten Namen der α -Säure (Humulon) bezeichnete er die β -Säure als Lupulon. WÖLLMERS Analysen des Humulons führten zu der Summenformel $C_{21}H_{30}O_5$, welche auch heutzutage noch Gültigkeit besitzt. Des Weiteren entdeckte er die optische Aktivität des Humulons, wobei er eine starke Linksdrehung feststellte ($[\alpha]_D^{20} = -212,0^\circ$ in Alkohol und $[\alpha]_D^{20} = -232,2^\circ$ in Benzol). Während die ersten Versuche der Strukturaufklärung von Humulon auf das Jahr 1900 zurückgehen (α - und β -Säuren sind ungesättigte Verbindungen, G. BARTH^[38]) und diese Erkenntnisse durch W. WÖLLMER (1916)^[35] mit dem Vorhandensein einer enolischen Gruppe ergänzt wurden, war es im Jahr 1925 der spätere Chemienobelpreisträger H. WIELAND, der erstmalig eine detaillierte Strukturformel für n-Humulon (Abb. 3-6, links) vorschlug.^[19,42,43]

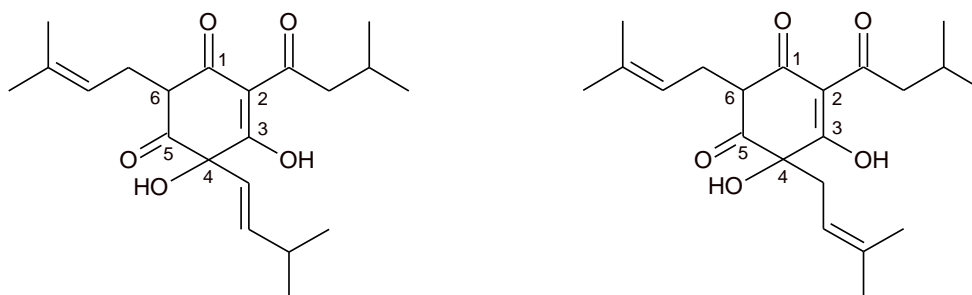


Abb. 3-6: Strukturformel von n-Humulon nach H. WIELAND^[19,42] (links) und deren modifizierte Form^[19,44-47] (rechts).

Diese Struktur behielt ca. 25 Jahre ihre Gültigkeit, erwies sich dann jedoch als nicht korrekt. Sie wurde nach Hydrolyse-^[44,45] bzw. Ozonolyseexperimenten^[46,47] während der 1950er Jahre dahingehend modifiziert, dass die Doppelbindung der ungesättigten Seitenkette am C-4-Atom um eine Stelle verschoben wurde (Abb. 3-6, rechts). Auch die Anordnung der Enolgruppen – d.h. die Anzahl und Anordnung der Doppelbindungen im Ring, sowie die Beschaffenheit der Sauerstoffsubstituenten am C-1-, C-3- und C-5-Atom – entsprach noch nicht die der heutzutage gültigen Strukturformel. Bevor jedoch die korrekte Enolgruppen-Anordnung im Jahre 1970 von D. DE KEUKELEIRE & M. VERZELE^[48,49] publiziert wurde (s. unten), nahm man sich zunächst der Konfiguration am chiralen Zentrum (C-4-Atom, Abb. 3-6) an. G. A. HOWARD machte 1956 den Vorschlag, dem Humulon in Analogie zu D- α -Hydroxycarbonsäuren, deren Salze polarisiertes Licht mehr nach rechts drehen als sie selbst, ebenfalls die D-Konfiguration zuzuschreiben. Er begründete seine Aussage mit der Tatsache, dass das linksdrehende (-)-Humulon rechtsdrehende Salze mit Alkalimetallen bildete.^[50] Diese Rechtsdrehung wurde von M. ANTEUNIS & M. VERZELE, ebenfalls 1956, auch mit anderen Salzen beobachtet.^[19,51] Die entsprechenden Messwerte sind in Tab. 3-6 aufgeführt.

Tab. 3-6: Spezifische Drehwinkel von Humulon bzw. Humulon-Salzen in verschiedenen Lösemitteln.^[19,51]

Lösemittel	$[\alpha]_D$
<i>iso</i> -Octan	-245°
Benzol	-226°
Methanol	-211°
Pyridin	-91°
Piperidin	+53°
Methanol + 1 Äquivalent NaOH	+32°
Benzol : Methanol = 1 : 1 + 1 Äquivalent Pb(OAc) ₂	+420°

Wie man heute durch eine im Jahr 2013 veröffentlichte Arbeit von URBAN ET AL.^[20] weiß, war die Annahme von G. A. HOWARD, nämlich dass das (-)-Humulon in der D-Konfiguration (\triangleq (S)-Humulon) vorliegt, richtig. Allerdings wurde die 43 (!) Jahre zuvor fälschlicherweise davon ausgegangen, dass das (-)-Humulon in der (6R)-Konfiguration^[48,49] vorliegt. Dieser Sachverhalt ist heutzutage, aufgrund der Aktualität der Erkenntnisse von URBAN ET AL.^[20], so noch in sämtlichen Lehrbüchern zu finden. Daher wird im Folgenden auch auf die damaligen Ergebnisse von D. DE KEUKELEIRE & M. VERZELE aus dem Jahr 1970^[48,49] genauer eingegangen (s. unten: Die Konfiguration am chiralen Zentrum). In der selben Arbeit von

DE KEUKELEIRE & VERZELE wurde auch das Keto-Enol-System des Rings korrigiert und neu beschrieben^[48,49] – dieses ist, im Gegensatz zur Bestimmung der absoluten Konfiguration, auch heute noch gültig.

- Das Keto-Enol-System des Rings:

Aus der Lage der UV-Absorptionsmaxima (320 nm, 277 nm und 234 nm, Schulter bei 355 nm) wurde ersichtlich, dass es sich um ein ausgedehntes konjugiertes System handeln musste. Das β -Tricarbonylsystem musste komplett enolisiert sein, bzw. in einer Cyclohexadien-diol-on-Form vorliegen. Dies wurde durch die Ermittlung der Anzahl der aktiven H-Atome bestätigt.^[19,49] Schließlich wurde nach IR- (Infrarot) und NMR-Messungen (*nuclear magnetic resonance*, Kernspinresonanz) bzw. weiteren chemischen Tests wie der Perhydrogenierung von (-)-Tetrahydrohumulon und dem Vergleich des Produktes mit 2-Acetylresorcinol bzw. 4-Acetylresorcinol auf die in Abb. 3-11 dargestellte Keto-Enol-Anordnung geschlossen.^[19,48,49]

- Die Konfiguration am chiralen Zentrum:

Da die Struktur des (-)-Humulons nun bis auf die Konfiguration am chiralen Zentrum (C-6-Atom, Abb. 3-11) aufgeklärt war, war dies im Folgenden die letzte Herausforderung bei der Ermittlung des endgültig korrekten und kompletten Molekülaufbaus. Dazu betrachteten D. DE KEUKELEIRE & M. VERZELE^[48] zunächst die optische Rotationsdispersionskurve von (-)-n-Humulon. Diese ist in Abb. 3-7 dargestellt und zeigt einen negativen Cotton-Effekt. Das Maximum der Kurve befindet sich bei $\lambda = 329$ nm und das Minimum bei $\lambda = 385$ nm. Der Cotton-Effekt wird durch die Asymmetrie im Carbonyl-Chromophor, die durch das chirale Zentrum am C-6-Atom (Abb. 3-11) hervorgerufen wird, verursacht.^[19,48]

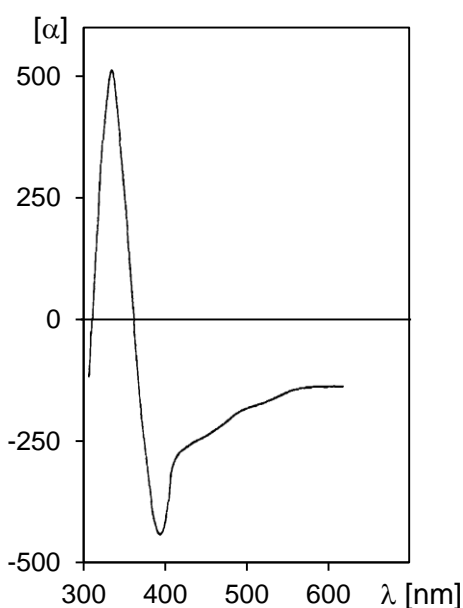


Abb. 3-7: Optische Rotationsdispersionskurve von (-)-n-Humulon.^[48]

Durch das Vorhandensein eines negativen Cotton-Effekts und der Kenntnis der Humulon-Struktur inklusive der Keto-Enol-Anordnung (Abb. 3-11) konnte nun mittels der Oktantenregel die absolute Konfiguration am chiralen Zentrum ermittelt werden. Diese semiempirische Regel wurde von W. MOFFITT ET AL. für Verbindungen mit C=O-Chromophor, wie z.B. dem Cyclohexanon konzipiert und stellt einen Zusammenhang zwischen der Molekülgeometrie und dem Vorzeichen des Cotton-Effektes her.^[52,53] In der Oktantenregel wird der Raum um eine chromophore Gruppe in acht Sektoren, die sog. Oktanten, eingeteilt (Abb. 3-8).^[52,54] Im Falle von Humulon ist diese chromophore Gruppe die Carbonylgruppe am C-1-Atom (Abb. 3-11). Die Einteilung in die Sektoren basiert auf einem linkshändigen dreidimensionalen Koordinatensystem (xyz), wobei die C=O-Bindung auf der z-Achse und das Zentrum des C=O-Chromophors im Schnittpunkt der drei Ebenen (xy, xz, yz) liegt.^[52] Der Rest des Moleküls befindet sich in den vier hinteren Oktanten (-z), wodurch die vier vorderen (+z) vernachlässigt werden können. Die vier hinteren Oktanten besitzen, projiziert auf die xy-Ebene, die in Abb. 3-9 dargestellten Vorzeichen.

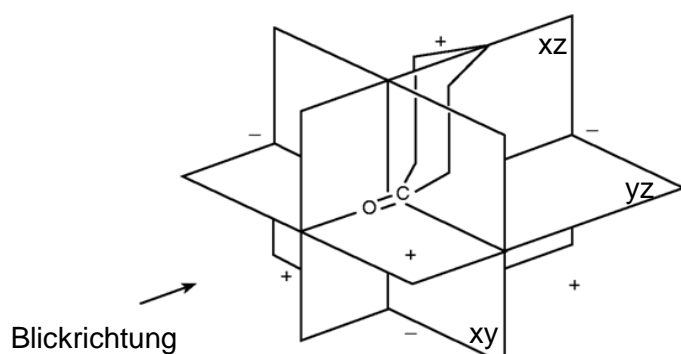


Abb. 3-8: Definition der Oktanten am Beispiel des Cyclohexanons.^[52]

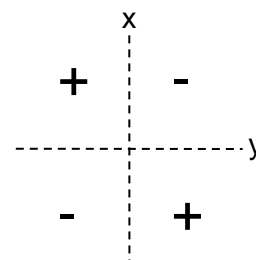


Abb. 3-9: Die Vorzeichen der vier hinteren Oktanten (-z) bei der Oktantenregel.

Das Humulon ist kein starres Molekül, sondern besitzt eine flexible Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung (C-1/C-6-Bindung, Abb. 3-11). Dadurch existiert das Humulon in zwei unterschiedlichen Konformationen (a und b), die die Hydroxylgruppe am chiralen Zentrum entweder in eine pseudo-axiale oder in eine pseudo-äquatoriale Position bringen. In der folgenden Abb. 3-10 sind die Oktantendiagramme der Enantiomere von Humulon in den beiden extremen Konformationen dargestellt. Oben links befindet sich dabei das n-Humulon, während es rechts um 60° gedreht dargestellt ist, um so die Blickrichtung (Pfeil) für die vier Oktantendiagramme ((1), (1'), (2), (2')) zu verdeutlichen. Da angenommen wurde, dass die 3-Methyl-2-Butenyl Seitenkette am C-6-Atom (Abb. 3-10) die pseudo-äquatoriale Lage einnimmt, sind die Konformationen (1) und (2') bevorzugt.^[19,48,49] Da das Vorzeichen des Cotton-Effekts davon abhängt, in welchen der Oktanten (vgl. Abb. 3-8 und Abb. 3-9) der überwiegende Teil des Moleküls hineinragt und Atome, die durch Ebenen durchschnitten werden, keinen Beitrag erbringen^[52], wird im Falle des Humulons der Cotton-Effekt ausschließlich von der pseudo-axialen OH-Gruppe am C-6-Atom (Abb. 3-10) bestimmt.

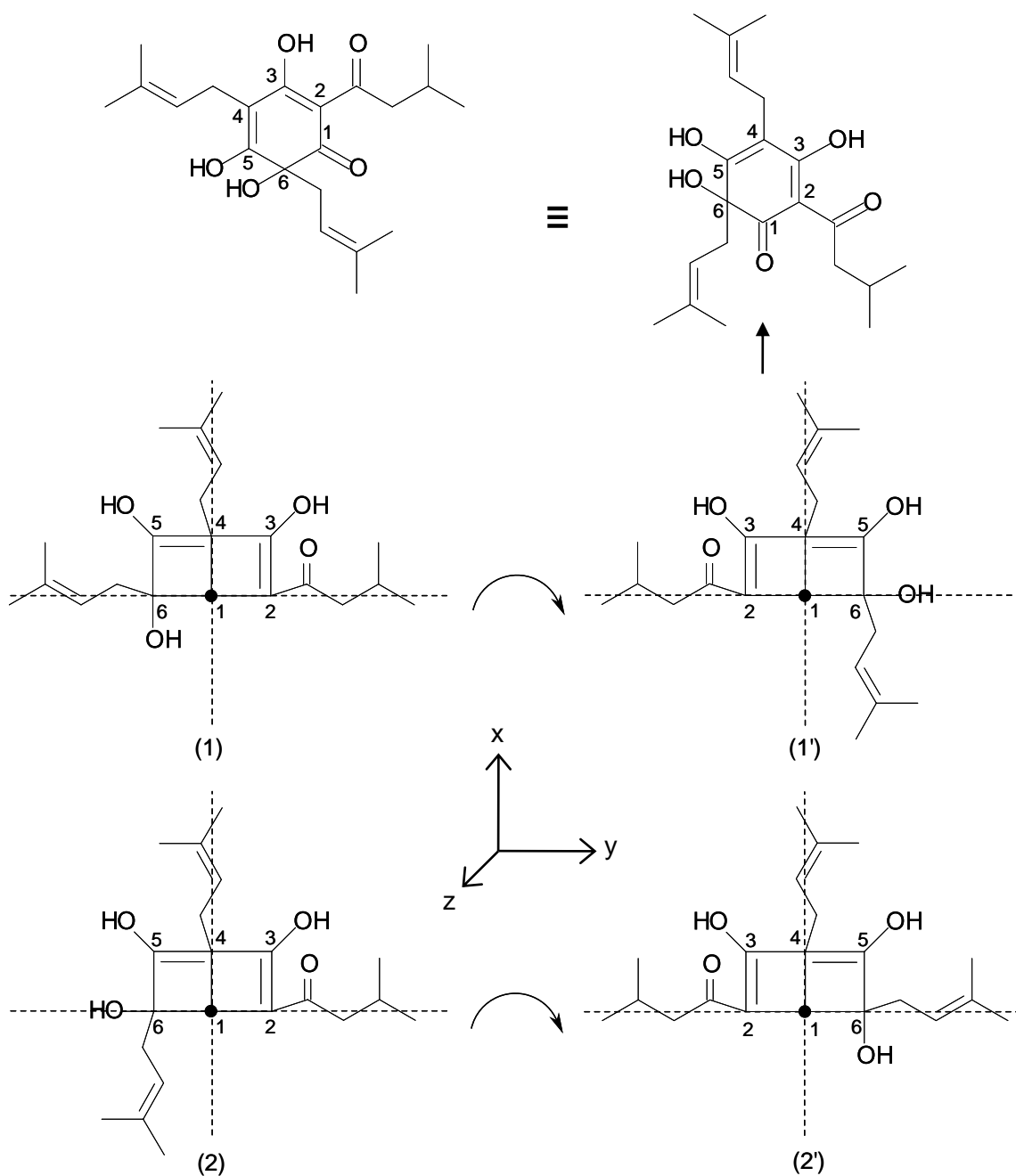


Abb. 3-10: Oktantendiagramme von n-Humulon; (1): (*R*)-n-Humulon in Konformation a, (1'): (*R*)-n-Humulon in Konformation b, (2): (*S*)-n-Humulon in Konformation a, (2'): (*S*)-n-Humulon in Konformation b.^[48]

Da experimentell ein negativer Cotton-Effekt ermittelt wurde, kamen D. DE KEUKELEIRE & M. VERZELE zu dem Schluss, dass es sich bei der Konformation (1) (OH-Gruppe am C-6-Atom im Oktanten mit negativem Vorzeichen, vgl. Abb. 3-9 und Abb. 3-10) um die richtige handeln musste. Die Anwendung der CAHN-INGOLD-PRELOG-Konvention^[55-57] (CIP-Regeln) führte schließlich zu der Erkenntnis, dass am chiralen Zentrum von n-Humulon die (*R*)-Konfiguration vorliegen und es sich somit um (*R*)-Humulon bzw. L-Humulon handeln musste. Nach Ozonolysereaktionen von (-)-Tetrahydrohumulon wurde nach der Aufarbeitung neben weiteren Produkten L-2-Hydroxy-5-Methylhexansäure erhalten, was ebenfalls auf eine (*R*)-

Konfiguration des Humulons schließen ließ. Die entsprechende Strukturformel ist in Abb. 3-11 dargestellt.^[19,48,49]

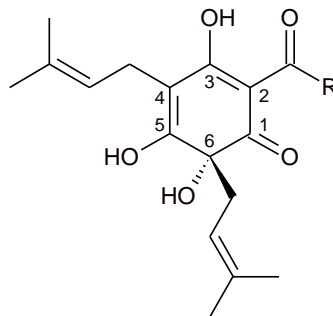


Abb. 3-11: Alte Strukturformel von Humulon nach D. DE KEUKELEIRE & M. VERZELE ((*R*)-Konfiguration).^[19,48,49]

Bei der Aufklärung der absoluten Konfiguration von (-)-Humulon durch DE KEUKELEIRE & VERZELE^[48] handelte es sich allerdings um ein theoretisches Verfahren. So benutzten sie zum einen die semiempirische Oktantenregel, zum anderen war die pseudo-äquatoriale Lage der 3-Methyl-2-Butenyl Seitenkette am C-6-Atom (Abb. 3-10) lediglich eine Annahme. Trotzdem wurde die Struktur mit der (*R*)-Konfiguration am C-6-Atom bis vor kurzem als die korrekte Form angenommen. Allerdings konnten URBAN ET. AL.^[20] mittels Röntgenstrukturanalysen an Kristallen von Humulon-Diaminocyclohexan-Salzen mittlerweile beweisen, dass das natürlich vorkommende (-)-Humulon tatsächlich jedoch die (*S*)-Konfiguration besitzt: Hierzu wurde zunächst in MeOH eine definierte Menge gereinigtes (-)-n-Humulon mit (1*R*,2*R*)-1,2-Diaminocyclohexan gemischt. Nach dem Entfernen des MeOH unter Vakuum wurde aus *tert*-Butylmethylether langsam umkristallisiert, wobei nach einigen Tagen Kristalle in Form von ca. 1/3 mm großen farblosen Nadeln entstanden. Diese wurden anschließend mittels eines Röntgendiffraktometers vermessen. Anhand der bekannten Konfigurationen des 1,2-Diaminocyclohexans (1*R*,2*R*) konnte schließlich auf die (*S*)-Konfiguration von (-)-Humulon geschlossen werden.^[20] Die nun wohl endgültig korrekte Struktur von (*S*)-(-)-Humulon ist in Abb. 3-12 gezeigt, darunter die entsprechende Röntgenstruktur von (6*S*)-(-)-n-Humulon-(1*R*,2*R*)-1,2-Diaminocyclohexan (Abb. 3-13).^[20]

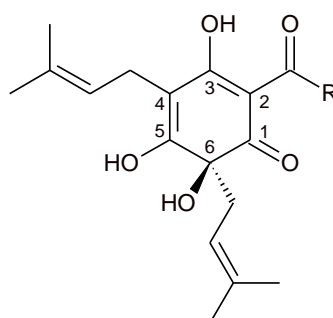


Abb. 3-12: Korrekte Strukturformel von Humulon nach URBAN ET AL. ((*S*)-Konfiguration).^[20]

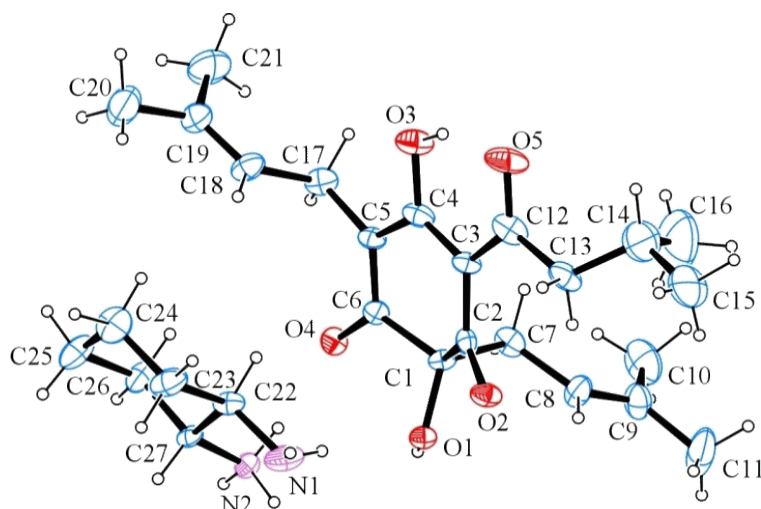


Abb. 3-13: Röntgenstruktur von (6S)-(-)-n-Humulon-(1R,2R)-1,2-Diaminocyclohexan nach URBAN ET AL..^[20]

Bis zum Jahr 1952 ging man davon aus, dass die α -Säuren homogen in einer einzigen Form vorlagen, nämlich in der heute als n-Humulon ($C_{21}H_{30}O_5$) bekannten. Nachdem von F. L. RIGBY & J. L. BETHUNE zunächst in Bier die Inhomogenität der iso- α -Säuren (im Bier hauptsächlich vorliegende Isomere der α -Säuren, vgl. Kap. 3.4: Isomerisierung von Humulon zu Isohumulon) festgestellt wurde^[58], konnte im Folgenden ebenso nachgewiesen werden, dass die α -Säuren auch in ihrer ursprünglichen Form im Hopfen in mehreren kongeneren Formen vorliegen. So stießen zunächst wiederum F. L. RIGBY & J. L. BETHUNE mittels Gegenstromverteilung (*Counter Current Distribution*) auf das sog. co- und ad-Humulon^[59], während M. VERZELE kurz darauf das prä- und post-Humulon^[60] entdeckte.^[19]

Bezüglich des ad-Humulons ist noch zu erwähnen, dass dieses als einziges der sechs Homologen ein weiteres Stereozentrum besitzt, nämlich am C-2'-Atom der spezifischen Methylbutanoyl-Seitenkette (Abb. 3-14). Durch Röntgenstrukturanalysen von *trans*-Iso-ad-Humulon konnte ermittelt werden, dass es sich dabei um die (S)-Konfiguration handelt.^[61] Daraus kann, unter Anbetracht der Ergebnisse von URBAN ET AL..^[20], geschlossen werden, dass es sich beim natürlich vorkommenden ad-Humulon um (6S,2'S)-ad-Humulon handeln muss. Im Folgenden ist die entsprechende Strukturformel abgebildet.

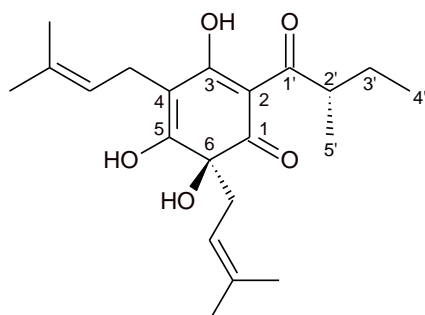


Abb. 3-14: Strukturformel von (6S,2'S)-ad-Humulon.^[20,61]

Die absolute Konfiguration am C-6-Atom des natürlich vorkommenden (-)-Humulons konnte also aufgeklärt werden (S).^[20] Allerdings ist nicht zu 100 % gesichert, dass im Hopfen tatsächlich ausschließlich, d.h. enantiomerenrein, das (-)-Humulon vorkommt. Auch wenn der spezifische Drehwinkel bei einem relativ hohen negativen Wert (-211° in MeOH^[51]) liegt, so ist es durchaus möglich, dass daneben auch mehr oder weniger (+)-Humulon existiert, ohne welches der spezifische Drehwert betragslich noch höher wäre. Außerdem könnte sich (+)-Humulon bei der Verarbeitung oder Lagerung von Hopfen bilden. Diese Eventualitäten sollen in dieser Arbeit geklärt werden.

3.4 Isomerisierung von Humulon zu Isohumulon

Die Isomerisierung des Humulons zum Isohumulon ist der zentrale Schritt für die bittere Geschmacksentwicklung des Bieres. Isohumulon macht mehr als 80 % aller im Bier vorliegenden Hopfenkomponenten aus, was seine enorme Bedeutung für das Getränk deutlich macht. Die Konzentration beträgt je nach Biersorte 15 – 80 mg/L^[19] – deutsches Pilsener Lagerbier weißt durchschnittlich 33,5 mg Isohumulon pro Liter auf.^[13] Die Isomerisierung findet während des sog. Würzekochens* statt und es entwickelt sich hier die Bittere, welche dem späteren Bier seinen unnachahmlichen Geschmack verleiht.^[23] Während die in Wasser bzw. Würze schwer löslichen α -Säuren (AS, Humulon) nur eine geringe^[62] bis gar keine^[63] Bitterkeit aufweisen, sind die gut wasserlöslichen Iso- α -Säuren (IAS, Isohumulon) stark bitter schmeckend (IAS 9 \times bitterer als AS^[64]).^[63] In der folgenden Tab. 3-7 sind die Löslichkeiten von Humulon und Isohumulon in Würze bei Raumtemperatur und unterschiedlichen pH-Werten aufgelistet.^[65] Dabei ist zu beachten, dass der durchschnittliche tatsächliche Würze-pH-Wert beim Bierbrauen 5,4 bis 5,6 beträgt.^[23]

Tab. 3-7: Löslichkeiten von Humulon und Isohumulon in Würze bei Raumtemperatur und unterschiedlichen pH-Werten.^[65]

pH-Wert	α -Säure [mg/L]	Iso- α -Säure [mg/L]
4,2	≤ 2	≥ 500
4,8	≤ 21	≥ 1700
5,0	40	2000
5,2	84	≥ 2400
5,9	480	---

* 90- bis 120-minütiger (Normalkochung bei 100 °C) Vorgang, bei dem die durch den Maisch- bzw. Läuterprozess gewonnene Würze unter Zugabe von Hopfen gekocht wird.^[23]

Bei der Isomerisierung handelt es sich um eine temperaturabhängige intramolekulare Umwandlung, bei der aus dem 6-gliedrigen Humulon-Ring ein 5-gliedriger Ring wird. Diese Ringkontraktion kommt durch eine sog. α -Ketol-Umlagerung^[63,66] (*acyloin-type ring contraction*^[20,67]) zustande. Dabei entstehen aus jedem der Humulon-Homologen jeweils zwei epimere Isohumulone, nämlich das *cis*- und das *trans*-Isomer. *Cis* und *trans* bezieht sich dabei auf die jeweilige Stellung der 3-Methyl-2-Butenyl-Seitenkette (Prenyl-Seitenkette) am C-5-Atom bezüglich der OH-Gruppe am C-4-Atom des jeweiligen Isohumulons.^[63] Über den genauen Reaktionsmechanismus der Isomerisierung herrscht in der Literatur Unklarheit.^[68] Allerdings wurde bereits im Jahr 1971 von D. DE KEUKELEIRE & M. VERZELE^[69] ein Mechanismus vorgeschlagen, der weitgehende Akzeptanz fand^[63,67], heute allerdings nicht mehr den aktuellen Erkenntnissen^[20] entspricht. URBAN ET AL. klärten in ihrer Veröffentlichung nicht nur die absolute Konfiguration (*S*) von (-)-Humulon auf (s. oben), sondern auch die Konfigurationen an den Stereozentren der durch die Isomerisierung entstehenden *cis*- und *trans*-Isohumulone.^[20] Auch hierbei gelangten sie zu vollkommen neuen Erkenntnissen bezüglich der Konfigurationen der Isohumulone und des zu Grunde liegenden Isomerisierungsmechanismus. So zeigten sie, dass, entgegen bisheriger Annahmen, nicht die Konfiguration am C-5-Atom (Abb. 3-15, Isohumulon) fix ist, sondern diejenige am C-4-Atom. Folglich hängt das Zustandekommen der *cis*- und *trans*-Isomere von der Konfiguration am C-5-Atom ab. Der entsprechende Reaktionsmechanismus ist in Abb. 3-15 dargestellt. Hierbei wird davon ausgegangen, dass die Konfiguration am C-6-Atom des Humulons ((*S*), Abb. 3-15, Humulon) diejenige am C-4-Atom der entsprechenden Isohumulone (*S*) bestimmt. Dies ist nach URBAN ET AL. die Folge einer Chelatisierung der negativ geladenen Sauerstoffatome durch zweiwertige Metallkationen (Me^{++}).^[20] Je nachdem, von welcher Seite der Ringebene das Wasserstoffatom im abschließenden Protonierungsschritt (Abb. 3-15) am C-5-Atom angreift, entsteht entweder *cis*- oder *trans*-Isohumulon. Da bei der *cis*-Form die beiden großen sperrigen Seitenketten auf verschiedenen Seiten liegen (C-4- und C-5-Atom, Abb. 3-15, Isohumulon), ist diese Form thermodynamisch stabiler und wird demzufolge bevorzugt gebildet.^[19,63,69] Unter den üblichen Braubedingungen entsteht dabei ein *cis:trans*-Verhältnis (*C/T*) von 68 : 32. Das Verhältnis von *cis*- zu *trans*-Isohumulon ist jedoch stark abhängig davon, unter welchen Bedingungen die Isomerisierung durchgeführt wird. In Tab. 3-8 sind einige verschiedene Reaktionsbedingungen samt den dabei beobachteten prozentualen Anteilen von *cis*- und *trans*-Isohumulon aufgeführt.^[19]

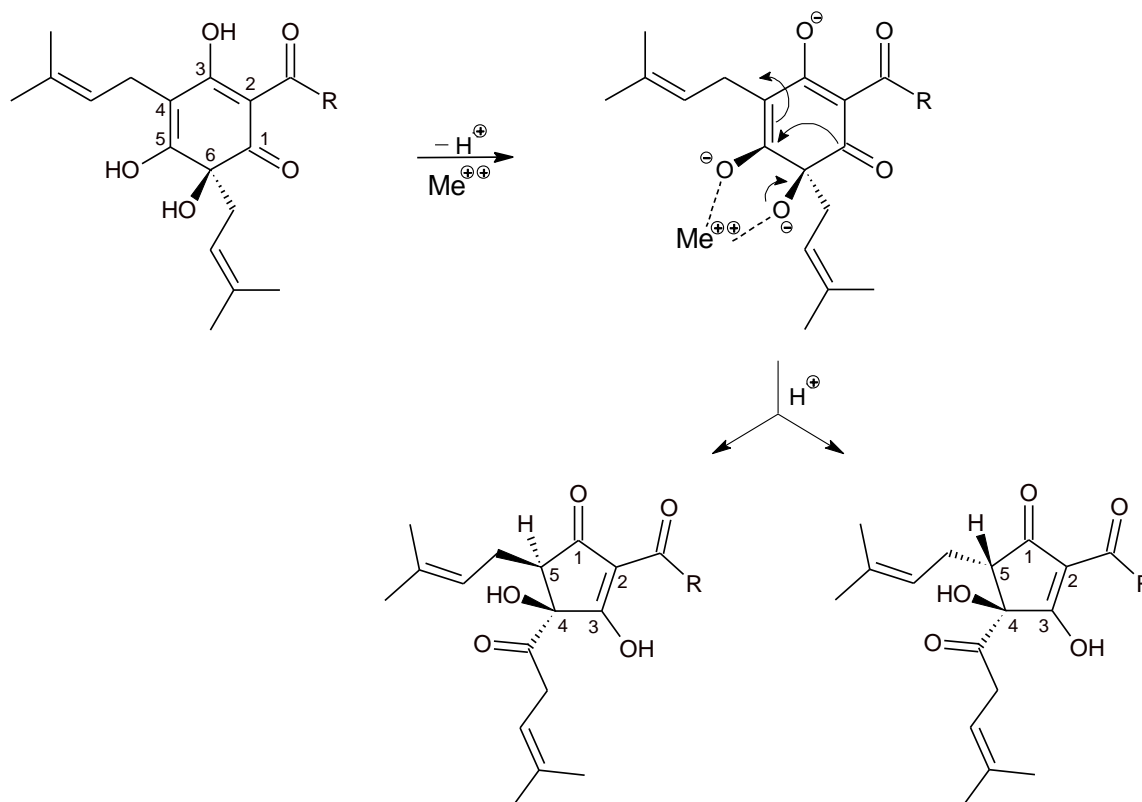


Abb. 3-15: Mechanismus der Isomerisierung von Humulon (oben) zu *cis*-Isomulon (unten links) und *trans*-Isomulon (unten rechts) nach URBAN ET AL..^[20]

Tab. 3-8: Prozentuale Anteile von *cis*- und *trans*-Isomulon bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen.^[19,70]

Reaktionsbedingung	<i>cis</i> -Isomulon [%]	<i>trans</i> -Isomulon [%]
pH 5,5	68	32
pH 7,0	68	32
pH 9,3	66	34
pH 11,05	64	36
NaOH 0,1 M	59	41
NaOH 2 M (92 °C)	55	45
NaOH 2 M (50 °C)	51	49
NaOH 1 M + MgSO ₄	55	45
<i>iso</i> -Octan : Na ₂ CO ₃ 0,3 M	70	30
Photochemisch: 350 nm ^[70]	0	100

In Deutschland wird größtenteils sowohl beim Bierbrauen als auch bei einer etwaigen Vorbehandlung der Rohstoffe auf den Zusatz jeglicher chemischer oder anderweitiger Stoffe verzichtet. Dies beruht auf dem Bayerischen Reinheitsgebot von 1516, welches beinhaltet, dass

zum Bierbrauen ausschließlich (Gersten*-)-Malz, Wasser, Hopfen[†] und Hefe[‡] verwendet werden darf.^[71,72] Trotz des Reinheitsgebots wird bereits seit Jahrzenten an Möglichkeiten zur Steigerung der Isomerisierungsrate – d.h. die Erhöhung der absoluten Ausbeute an Isohumulon sowie eine Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit – von Humulon geforscht. Ende der 1960er Jahre beschrieb H. KÖLLER eine katalytische Wirkung von zweiwertigen Metallkationen hinsichtlich einer beschleunigten und ertragsreicheren Isomerisierung. Er erreichte mit Magnesium (Mg^{2+}) als Katalysator eine quantitative Isomerisierung bei 70 °C innerhalb 10 min. Das *cis:trans*-Verhältnis betrug hierbei 45 : 55. Andere zweiwertige Metallkationen (Ca^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+}) beschleunigten bei diesen Untersuchungen die Isomerisierung ebenso, wobei hierbei sowohl unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeiten als auch differierende *cis:trans*-Verhältnisse beobachtet wurden. Die entsprechenden Halbwertszeiten bzw. Geschwindigkeitskonstanten sind samt den Reaktionsbedingungen in Tab. 3-9 aufgeführt. Eine genaue Angabe der entstehenden *cis:trans*-Verhältnisse erfolgte in der Literatur nicht.^[73,74] Laut KÖLLER bilden bei der katalytischen Umsetzung von Humulon die Metallkationen (Me^{2+}) mit dem deprotonierten Humulation (H^-) einen einfach positiv geladenen Komplex ($[H-Me]^+$). Nach der Isomerisierung zum Isohumulation (IH^-) werden die Me^{2+} -Ionen wieder abgespalten und es entsteht nach Protonierung das Isohumulon (IH).^[73,75] In der folgende Abbildung ist dieser Vorgang schematisch dargestellt.

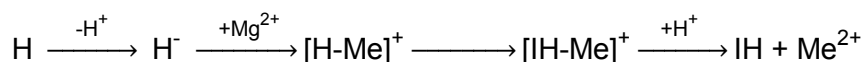


Abb. 3-16: Reaktionsschema der Isomerisierung von Humulon zu Isohumulon unter katalytischem Einfluss von Metallionen.^[73,75]

Tab. 3-9: Reaktionsbedingungen, Halbwertszeiten und Geschwindigkeitskonstanten der durch zweiwertige Metallkationen katalysierten Isomerisierung in Natriumacetatlösung (0,1 M) unter N_2 .^[73]

Metallsalz	pH-Wert	Temperatur	Halbwertszeit	Geschwindigkeitskonstante ($k \cdot 10^3 \cdot s^{-1}$)
---	5,5	98,5 °C	2 h	$0,09 \pm 0,01$
---	7,0	80 °C	6 h	$0,018 \pm 0,005$
$CaCl_2 (10^{-2} M)$	8,0	80 °C	22 min	$0,53 \pm 0,03$
$MgCl_2 (10^{-2} M)$	7,0	80 °C	25 min	$0,47 \pm 0,03$
$MgCl_2 (10^{-2} M)$	7,2	80 °C	-***	$0,70 \pm 0,05$
$MgCl_2 (10^{-2} M)$	7,5	80 °C	7,3 min	$1,59 \pm 0,03$

* Bei bestimmten Biersorten dürfen auch Malze aus anderen Getreiden, z.B. Weizen oder Roggen verwendet werden.

† Seit den 1960er Jahren dürfen statt dem Doldenhopfen auch die damals neu entwickelten, aus reinem Hopfen bestehenden Hopfenpulver und -extrakte verwendet werden.

‡ Im Jahre 1516 war die Rolle der Hefe noch nicht bekannt – diese wurde erst später in das Gesetz aufgenommen.

Metallsalz	pH-Wert	Temperatur	Halbwertszeit	Geschwindigkeitskonstante ($k \cdot 10^3 \cdot s^{-1}$)
MgCl ₂ (10 ⁻² M)	8,0	80 °C	2,6 min	4,40 ± 0,3
MgCl ₂ (5·10 ⁻³ M)	7,5	80 °C	-***	0,67 ± 0,03
MgCl ₂ (10 ⁻³ M)	7,5	80 °C	-***	0,14 ± 0,02
CdCl ₂ (10 ⁻² M)	7,0	70 °C	5,9 min	1,96 ± 0,03
MnCl ₂ (10 ⁻² M)	6,5	70 °C	10 min	1,15 ± 0,04
MnCl ₂ (10 ⁻² M)	6,75	70 °C	-***	1,40 ± 0,07
MnCl ₂ (10 ⁻² M)	7,0	70 °C	6 min	1,9 ± 0,1
MnCl ₂ (10 ⁻² M)	7,22	70 °C	-***	2,50 ± 0,05
MnCl ₂ (10 ⁻² M)	7,5	70 °C	3,2 min	3,60 ± 0,2
NiSO ₄ (10 ⁻² M)	6,5	70 °C	2,5 min	4,50 ± 0,1

** Reaktion in Phosphatpuffer (0,1 M) ohne Zusatz von Natriumacetat.

*** keine Angabe in der Literatur

Eine Steigerung der Isomerisierungsrate durch Hinzufügen von Katalysatoren ist aufgrund der Tatsache, dass die meisten deutschen Brauereien nach wie vor nach dem Reinheitsgebot brauen, vor allem für das Ausland interessant. In diesem Zusammenhang gibt es stabilisierte und isomerisierte Pellets. Bei den stabilisierten Pellets wird das gemahlene Hopfenpulver vor dem Pelletieren mit Magnesiumoxid (MgO) gemischt. Hierbei reagieren die α -Säuren mit dem MgO und bilden Magnesiumsalze, welche eine bessere Lagerstabilität besitzen als das Humulon in herkömmlichen Pellets. Außerdem isomerisieren die α -Säuren hier schneller und ergeben eine um ca. 10 % bessere Ausbeute der Iso- α -Säuren. Zusätzlich erfolgt bereits während der Lagerung der stabilisierten Pellets eine langsame Isomerisierung, wodurch ebenfalls eine höhere Iso- α -Säuren-Ausbeute bei gleicher Würzekochzeit erreicht wird.^[23] Bei den isomerisierten Pellets werden stabilisierte Pellets thermisch behandelt um so eine Isomerisierung zu bewirken. Der Zusatz an MgO darf höchstens 2 % betragen, um beim Pelletieren eine Temperaturerhöhung über 60 °C und somit unerwünschte Abbaureaktionen zu vermeiden. Bei der anschließenden 10 – 14 Tage dauernden Lagerung bei 45 – 55 °C erfolgt eine mindestens 90 %ige Umwandlung der α -Säuren in Iso- α -Säuren. Isomerisierte Pellets ergeben bereits nach zehn Minuten Kochzeit ein Maximum an Isohumulon (45 %).^[23]

Neben den isomerisierten Pellets gibt es auch isomerisierte Extrakte, welche jedoch in Deutschland nach dem Reinheitsgebot ebenfalls nicht zugelassen sind. Der meistverbreitete isomerisierte Extrakt wird dabei durch Erhitzen von Reinharzextrakt mit wässriger Kaliumcarbonat-Lösung gewonnen, wodurch die Iso- α -Säuren als Kaliumsalze vorliegen. Isome-

risierte Extrakte werden üblicherweise, zumindest Großteils, erst dem fertigen Bier als sog. *Downstreamprodukte* zugesetzt.^[23,76]

Der Zusatz verschiedener Katalysatoren führt zu unterschiedlichen *cis:trans*-Verhältnissen. *Cis*- und *trans*-Isohumulon unterscheiden sich aufgrund der sterischen Anordnung der Seitenketten am C-4- und C-5-Atom (vgl. Abb. 3-15, Isohumulon) deutlich hinsichtlich ihrer Stabilitäten. So wird *trans*-Isohumulon fünfmal schneller abgebaut als *cis*-Isohumulon.^[62] Eine entsprechende Untersuchung des alterungsbedingten Iso- α -Säuren-Abbaus in Bier wurde beispielsweise von L. DE COOMAN ET AL. durchgeführt.^[77] Um einen Iso- α -Säuren-Abbau so gering wie möglich zu halten, ist aufgrund der deutlich geringeren Stabilität der *trans*-Isomere ein hohes *cis:trans*-Verhältnis (C/T) erstrebenswert.^[62,77] Die Abhängigkeit des C/T von der Temperatur und der Reaktionszeit wurde im Jahr 2008 von B. JASKULA ET AL. durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass dieses zum einen umso höher ist, je höher die Temperatur ist (80 °C, 90 °C, 100 °C). Zum anderen wurde ersichtlich, dass das C/T über den beobachteten Zeitraum von 5 bis 90 min ansteigt. Zu Beginn werden aufgrund der geringeren Aktivierungsenergie zwar mehr *trans*-Iso- α -Säuren gebildet. Allerdings werden diese wegen ihrer geringeren thermodynamischen Stabilität auch wieder rascher abgebaut.^[67]

Um einen Abbau der Iso- α -Säuren gering zu halten oder gar zu verhindern, ist neben der Möglichkeit eines hohen *cis:trans*-Verhältnisses auch der Einsatz von reduzierten Iso- α -Säuren in Form von lichtstabilen Hopfenextrakten möglich. Durch die Verwendung von Extrakten mit reduzierten Iso- α -Säuren (*Rho*-, Tetrahydro- und Hexahydro-Iso- α -Säuren) wird die Bildung des sog. Lichtgeschmackes (*Lightstruck Flavour*, Bildung von 3-Methyl-2-Buten-1-Thiol aus Isohumulon) weitgehend verhindert.^[62,78-81] *Rho*-Iso- α -Säuren werden durch Reduktion der Carbonylgruppe an der C4-Seitenkette von Iso- α -Säuren mittels Natriumborhydrid erhalten. Tetrahydro-Iso- α -Säuren entstehen durch Hydrierung der Doppelbindungen an den beiden Seitenketten (C4 und C5) und Hexahydro-Iso- α -Säuren durch Kombination der beiden Prozesse (Hydrierung und Reduktion).^[62] In der folgenden Abbildung sind die Strukturformeln von *Rho*-Iso- α -Säure, Tetrahydro-Iso- α -Säure und Hexahydro-Iso- α -Säure zu sehen (Abb. 3-17).

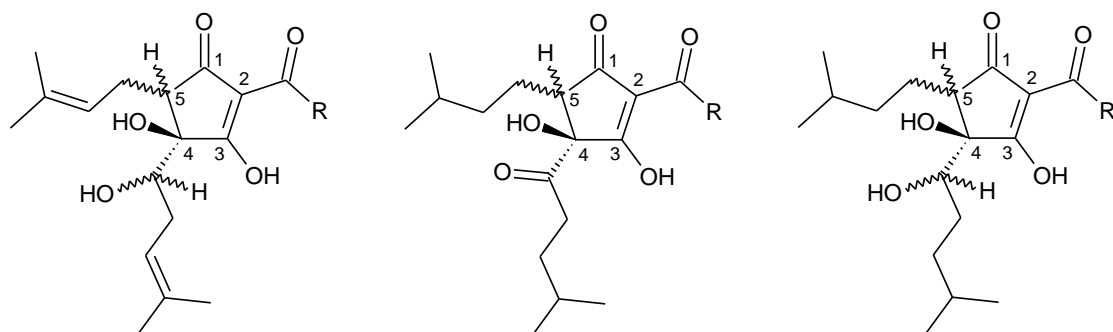


Abb. 3-17: Strukturformeln von *Rho*- (links), Tetrahydro- (mitte) und Hexahydro-Iso- α -Säure (rechts).

3.5 Racemisierung von Humulon

Unter dem Begriff Racemisierung versteht man den Vorgang, bei dem ein stereogenes Element in einer Verbindung, das in einer einheitlichen Konfiguration vorliegt, vollständig oder teilweise in die beiden möglichen Konfigurationen übergeht. Bei vollständiger Racemisierung entsteht aus einer Verbindung (z.B. (S)-Konfiguration) das Racemat, d.h. ein 1:1-Gemisch aus sich selbst und seinem Spiegelbild. Dabei geht die optische Aktivität vollständig verloren. Entsteht nicht das 1:1-Gemisch, sondern bleibt ein Überschuss eines Enantiomers, spricht man von partieller Racemisierung.^[82]

Eine partielle Racemisierung von Humulon ist z.B. durch Destillation bei 150 – 160 °C/0,2 mm aufgetreten.^[22] Eine vollständige Racemisierung wurde durch Rückflusskochen in Toluol für 18 Stunden^[22] (111 °C) bzw. in Dioxan für 48 Stunden^[22] (101 °C) erreicht. Grundsätzlich ist gemäß G. A. HOWARD ET AL. die Racemisierungsrate stark temperaturabhängig, wobei die Racemisierung erst ab einer Temperatur von über 80 °C auftritt. So konnte z.B. in kochendem Benzol (80 °C) keine Racemisierung von (-)-Humulon beobachtet werden.^[22] Eine ca. 50 %ige Racemisierung erfolgte durch 11-stündiges Kochen in *iso*-Octan (99 °C), während die komplette Racemisierung sechs Tage^[21] beanspruchte. Unter Druck bzw. höheren Temperaturen ging die Racemisierung laut M. ANTEUNIS & M. VERZELE zwar schneller von statten, allerdings wurden hier bei zu extremen Bedingungen nur sehr geringe Ausbeuten von racemischem (\pm)-Humulon erhalten, während die Abbauprodukte immer mehr zunahmten und es schließlich zur Bildung einer harzigen dunkelbraunen Substanz kam.^[21] Eine Trennung des Racemats in die beiden optisch aktiven Enantiomere ist bisher noch nicht gelungen.^[83,84] Dadurch war eine separate Analyse des (+)-Humulons hinsichtlich seiner Eigenschaften und etwaiger Unterschiede zum (-)-Humulon bisher noch nicht möglich.

Im Allgemeinen treten Racemisierungen z.B. dann ein, wenn das Stereozentrum einer optisch aktiven Substanz während einer Reaktion zwischenzeitlich in ein Carbeniumion, ein Radikal oder ein Carbanion übergeht. Dadurch ist die folgende Addition an das Zwischenprodukt von beiden Seiten her möglich, wodurch das Racemat entsteht.^[82] Im Falle der Racemisierung von Humulon wurde der Reaktionsverlauf über ein intermediäres freies Radikal bereits 1959 von ANTEUNIS & VERZELE ausgeschlossen. Der Grund hierfür war, dass die Anwesenheit von Diphenylamin, welches als möglicher Inhibitor zugesetzt wurde, die Racemisierung in keiner Weise beeinflusste. Stattdessen wurde von ANTEUNIS & VERZELE ein kryptoionischer^[85] Reaktionsmechanismus vorgeschlagen. Hierbei spielt der induktive Effekt der Isopentenyl-Seitenkette am chiralen Zentrum die entscheidende Rolle.^[21] Es ent-

stehen instabile Kationen und Anionen als kurzlebige Intermediate.^[86] Sowohl das Humulon-Rest-Carbanion als auch das Isopentenylcarbeniumion sind resonanzstabilisiert, was eine Herabsetzung der Aktivierungsenergie zur Folge hat.^[21] Der zunächst im Übergangszustand (Kryptoionen) abgespaltene und positiv geladene Isopentenylrest greift anschließend elektrophil wieder am Humulon-Rest (negativ geladen) an. Da dieser planar ist (sp^2 -hybridisiertes C-Atom), kann der Angriff von beiden Seiten der Ringebene her erfolgen, wodurch es zur Ausbildung beider Enantiomere ((S)- und (R)-Humulon) kommt.

3.6 Chirale Trennung

Aufgrund der potenziell unterschiedlichen physiologischen Eigenschaften von Enantiomeren ist es in einigen Industriebereichen erstrebenswert, enantiomerenreine Verbindungen einzusetzen. So betrifft dies sowohl die Pharmaindustrie als auch die Biotechnologie und viele weitere Branchen, die sich z.B. mit Nahrungsmitteln, Duftstoffen und Agrochemikalien befassen.^[87,88] Um enantiomerenreine Verbindungen zu erhalten, gibt es zwei Möglichkeiten: Zum einen die asymmetrische Synthese ausschließlich des gewünschten Enantiomers und zum anderen die Trennung der Enantiomere nach vorangegangener Herstellung des Racemats.^[87] Doch nicht nur die präparative Herstellung enantiomerenreiner Verbindungen zur industriellen Verwendung spielt eine Rolle, auch die genaue Analyse und Erforschung der Eigenschaften der einzelnen Enantiomere eines racemischen Gemisches kann von Nöten sein. Hierzu müssen diese getrennt und isoliert werden. Dieser Vorgang wird als Racemattrennung (Enantiomerentrennung) bezeichnet und hatte seinen historischen Anfang im Jahr 1848, als L. PASTEUR erstmals beide Enantiomere aus einem racemischen Gemisch isolieren konnte. So trennte er manuell unter dem Mikroskop die zueinander spiegelbildlichen (enantiomorphen) Kristalle von (+)- und (-)-Natrium-Ammonium-Tartrat, welche sich bei der Kristallisation von racemischen (\pm)-Natrium-Ammonium-Tartrat bildeten, in zwei Gruppen. Die jeweiligen wässrigen Lösungen der Kristalle beider Gruppen drehten polarisiertes Licht in entgegengesetzte Richtungen, wodurch die erfolgreiche Racemattrennung bewiesen werden konnte.^[87,89,90] Zehn Jahre später, im Jahr 1858, beschrieb wiederum L. PASTEUR erstmals die unterschiedlichen biologischen Eigenschaften von Enantiomeren. Er fand heraus, dass der Schimmelpilz *Penicillium glaucum* wesentlich schneller das (+)-Ammonium-Tartrat verstoffwechselte als das entsprechende (-)-Isomer.^[87,88] Neben der Entdeckung dieser biologischen Enantioselektivität stellte dies eine weitere Möglichkeit der Racemattrennung dar – wobei hierbei allerdings nur ein Enantiomer erhalten wurde und das andere verloren ging.

Ab diesem Zeitpunkt erlangte die Rolle der Chiralität in biologischen Systemen mehr und mehr Aufmerksamkeit und damit verbunden stieg auch das Interesse an einer Enantiome-

rentrennung. Im Laufe der Jahre entwickelten sich die folgenden Techniken der Racemattrennung:^[87,91,92]

- Trennung durch Kristallisation
- kinetische Trennung durch Enzyme
- indirekte (achirale) chromatographische Trennung nach einer vorangegangenen Umwandlung der Enantiomere in Diastereomere mit optisch aktiven Reagenzien
- direkte (chirale) chromatographische Trennung durch Benutzung von chiralen stationären Phasen (CSPs, mit achiralen Lösemitteln) oder chiralen mobilen Phasen (mit achiralen stationären Phasen)

Aus diesen Methoden entwickelte sich die direkte HPLC mit chiralen stationären Phasen als die dominierende und heutzutage meist verwendete Vorgehensweise bei der analytischen und präparativen Trennung von racemischen chiralen Verbindungen.^[87,93] Auch die Reinheit chiraler Verbindungen (Enantiomerenüberschuss) wird heutzutage zu über 50 % mittels CSP-basierter HPLC ermittelt, wodurch diese Technik die beiden hierbei noch anderen Möglichkeiten, die NMR Spektroskopie sowie die Gaschromatographie in den Hintergrund stellt.^[87] Verunreinigungen eines Enantiomers durch dessen Partner können heute dadurch routinemäßig bis auf eine Genauigkeit von 0,01 % nachgewiesen werden – enantiomere Verunreinigungen bei Aminosäuren sogar bis in den ppm-Bereich.^[94-96] Die ehemalige Ermittlung des Enantiomerenüberschusses durch die relativ unempfindliche Messung mittels eines Polarimeters wurde inzwischen fast vollständig abgelöst.^[87] Der Enantiomerenüberschuss (*enantiomeric excess* (ee)) berechnet sich nach der folgenden Formel.^[97]

$$ee [\%] = \frac{|S - R|}{|S + R|} \times 100$$

Formel 3-1: Berechnung des Enantiomerenüberschusses (ee); *S* = Masse des Enantiomers mit (*S*)-Konfiguration, *R* = Masse des Enantiomers mit (*R*)-Konfiguration.^[97]

Die Trennung von Enantiomeren mittels CSP-basierter HPLC beruht auf den unterschiedlichen Wechselwirkungen beider Enantiomere mit der CSP. Die qualitative und quantitative Beurteilung des Trennungsvermögens einer chiralen HPLC-Säule kann – äquivalent zur herkömmlichen Normalphasen- oder Umkehrphasen-HPLC – mit den folgenden drei Kenngrößen ausgedrückt werden:

- *k'*: Retentionsfaktor (oder Kapazitätsfaktor)
- α : Selektivitätsfaktor (oder Trennfaktor)
- *R_s*: Auflösung

Diese drei Parameter werden nach den folgenden Formeln berechnet.^[87,98] Dabei beziehen sich die Ziffern 1 und 2 stets auf die Reihenfolge der im Chromatogramm getrennten Peaks. Peak 1 stellt dabei den zuerst eluierten und Peak 2 den später eluierten Peak dar.*

$$k'_1 = \frac{(t_R)_1 - t_0}{t_0} \quad ; \quad k'_2 = \frac{(t_R)_2 - t_0}{t_0}$$

Formel 3-2: Berechnung der Retentionsfaktoren k' zweier Peaks 1 und 2 in einem Chromatogramm; t_R = Retentionszeit, t_0 = Totzeit.

$$\alpha = \frac{(t_R)_2 - t_0}{(t_R)_1 - t_0} = \frac{k'_2}{k'_1}$$

Formel 3-3: Berechnung des Selektivitätsfaktors α zweier Peaks 1 und 2 in einem Chromatogramm; t_R = Retentionszeit, t_0 = Totzeit.

$$R_S = \frac{2 [(t_R)_2 - (t_R)_1]}{W_1 + W_2} = \frac{1.18 [(t_R)_2 - (t_R)_1]}{\frac{1}{2}W_1 + \frac{1}{2}W_2}$$

Formel 3-4: Berechnung der Auflösung R_S zweier Peaks 1 und 2 in einem Chromatogramm; t_R = Retentionszeit, W = Peakbreite, $\frac{1}{2}W$ = Peakbreite bei halber Peakhöhe.

Bei einer chiralen chromatographischen Trennung entspricht k' dem Grad der Wechselwirkung des Analyts mit der CSP. α spiegelt die Fähigkeit der chiralen Erkennung der CSP wider und R_S ist sowohl von der chiralen Erkennung der CSP als auch von der Anzahl der theoretischen Böden der HPLC-Säule abhängig.^[87]

Die erste CSP-basierte Säule, mit der eine basisliniengetrennte Enantiomertrennung gelang, wurde im Jahr 1971 von V. A. DAVANKOV & S. V. ROGOZHIN beschrieben.^[99] Hierbei handelte es sich um eine sog. Liganden-Austausch Chromatographie, wobei diese auf der Ausbildung von diastereomeren Metall-Chelaten beruhte.^[91] In den darauf folgenden Jahrzehnten wurden zahlreiche weitere CSP-basierte Säulen entwickelt und im Jahr 2008 waren über 100 CSP-Säulen kommerziell verfügbar.^[87] Die Einteilung der CSP-basierten HPLC-Säulen gestaltet sich aufgrund der Vielzahl und der großen Variation an den verschiedenen Arten schwierig und kann auf unterschiedliche Weise erfolgen.^[96] Eine Möglichkeit ist im Folgenden dargestellt (Abb. 3-18) und basiert auf einer Einteilung von Y. OKAMOTO & T. IKAI:^[87]

* Im Ergebnisteil werden die Ziffern 1 und 2 durch die Stereodeskriptoren (R)- und (S)- ersetzt.

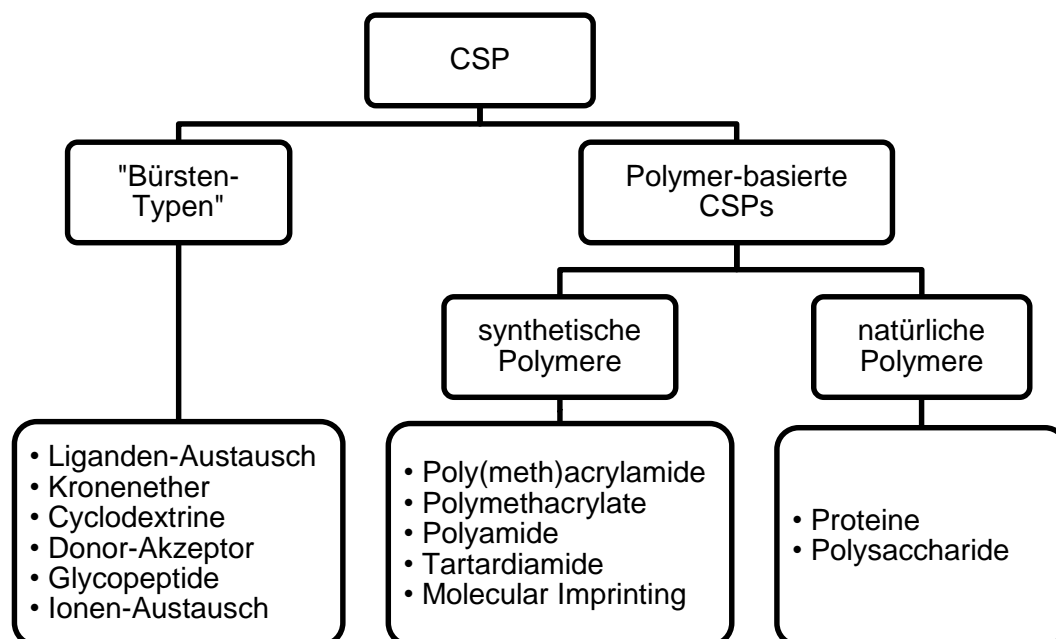


Abb. 3-18: Einteilung der chiralen stationären Phasen (CSPs) nach Y. OKAMOTO & T. IKAI.^[87]

Mit über 90 % aller durchgeführten chromatographischen Enantiomertrennungen verzeichnen dabei die Polysaccharid-basierten CSPs den weitaus größten Anteil. Sie entwickelten sich zu den eindeutig leistungsfähigsten CSPs, sowohl in der analytischen als auch in der präparativen Trennung von Enantiomergemischen.^[87] Laut T. ZHANG ET AL. können mehr als 95 % aller racemischen Verbindungen durch mindestens eine der momentan kommerziell erhältlichen Polysaccharid-basierten CSPs erfolgreich chromatographisch getrennt werden.^[100]

Zwar werden auch andere Polysaccharide, wie z.B. Chitin, Chitosan, Xylan, Curdlan, Dextran und Inulin verwendet, allerdings stellen Cellulose und Amylose aufgrund ihrer besseren enantioselektiven Eigenschaften den Großteil der verwendeten Polysaccharide bei der Herstellung von CSPs dar. Bereits die nativen Polysaccharide sind in der Lage, als CSP zu agieren und besitzen die Fähigkeit, manche Enantiomere zu erkennen sowie chromatographisch zu trennen. Allerdings ist diese Fähigkeit bei den nativen Polysacchariden zu gering, als dass sie in der Praxis Verwendung finden würden. Daher werden die Polysaccharide chemisch modifiziert, um so weitaus bessere chromatographische und enantioselektivere Eigenschaften zu erlangen.^[87,93] Die erste derartige Cellulose-Derivatisierung führten 1973 G. HESSE & R. HAGEL^[101] durch, indem sie Cellulose mit Essigsäure (und Perchlorsäure sowie Acetanhydrid) versetzten.^[87] Das hierbei synthetisierte Cellulose-triacetat zeigte als Säulenmaterial erstaunliche Enantioselektivität und ermöglichte eine basisliniengetrennte Separation des Racemats der sog. Trögerschen Base. Die beiden Forscher schrieben diese gute Fähigkeit der Enantiomererkennung der kristallinen Struktur des Cellulosederivats zu.^[87,101] Im Laufe der folgenden Jahre wurde eine große Reihe von Cellulose- und Amyloseestern

sowie Cellulose- und Amylosecarbamaten entwickelt und als CSPs verwendet. Unter den Celluloseestern zeigten vor allem die Benzoate – und unter ihnen in erster Linie das Cellulose-tris(4-Methylbenzoat) – besonders hohe Enantioselektivitäten.^[87] Die chirale Erkennung und somit die Fähigkeit Enantiomere chromatographisch zu trennen kann durch die Wahl der Substituenten an den Phenylgruppen von Benzoaten bzw. Phenylcarbamaten beeinflusst werden. So besteht die Möglichkeit durch die richtige Position (*ortho*, *meta*, *para*) und Art des Substituenten – entweder elektronenschiebende wie Alkylgruppen oder elektronenziehende wie Halogene – die Enantioselektivität drastisch zu erhöhen.^[87,93,102] Die hinsichtlich der Enantiomerentrennung leistungsfähigsten CSPs sind heute die 3,5-Dimethylphenylcarbamate von Cellulose und Amylose. Die folgende Abb. 3-19 zeigt die beiden sog. chiralen Selektoren Cellulose-triacetat und Cellulose-tris(4-Methylbenzoat).^[87]

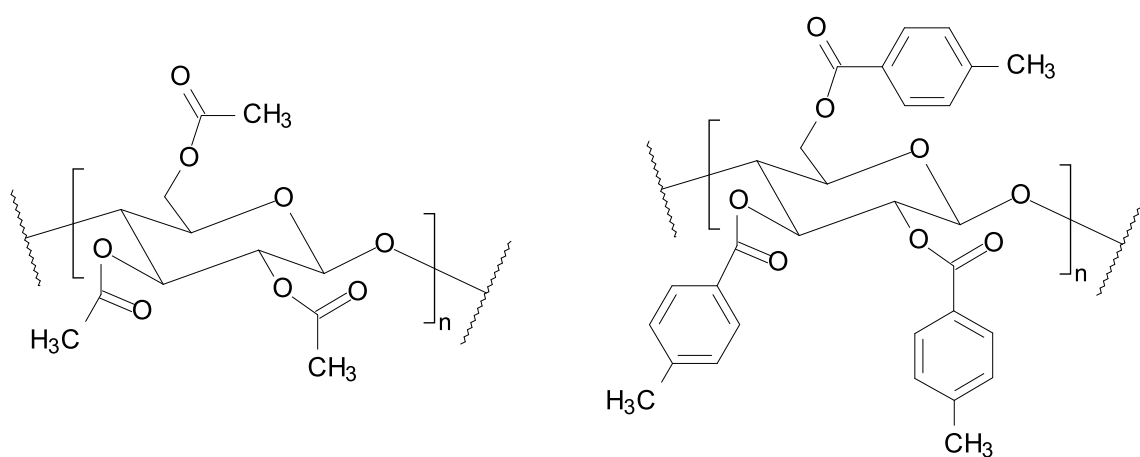


Abb. 3-19: Strukturformeln von Cellulose-triacetat (links) und Cellulose-tris(4-Methylbenzoat) (rechts).

Zu Beginn der Ära der Polysaccharid-basierten CSPs wurden makroporöse Kieselgelpartikel mit den entsprechenden Polysaccharid-Derivaten (Ester, Benzoate, Carbamate) lediglich beschichtet (*coating*). Zwar ist diese Form der CSPs auch heute noch verfügbar, jedoch werden mehr und mehr CSP-Säulen verwendet, bei denen die Polysaccharid-Derivate an den Kieselgelpartikeln immobilisiert (kovalent gebunden) vorliegen.^[93] Der Grund dafür ist, dass die lediglich beschichteten CSPs nur mit einer geringen Auswahl an Lösungsmitteln kompatibel sind und somit die Wahl der mobilen Phase bei der HPLC stark limitiert ist. So können derartige HPLC-Säulen lediglich im Normalphasenmodus mit Alkanen und Alkoholen (z.B. Hexan/2-PrOH) sowie im Umkehrphasenmodus mit Wasser und Alkohol (z.B. MeOH) oder Acetonitril betrieben werden. Da jedoch für viele chirale Trennungen andere Lösemittel, wie z.B. Chloroform, Dichlormethan, Tetrahydrofuran, Ethylacetat, Dioxan, Aceton oder Toluol nötig sind oder bereits funktionierende Trennungen durch Zusatz dieser Lösemittel noch verbessert werden können, müssen die CSPs resistent gegen diese Lösemittel sein. Eine derartige universelle Lösemittelkompatibilität wird in der Praxis durch Immobilisierung

der Polysaccharid-Derivate an die Kieselgelpartikel realisiert.^[87,93,103,104] Hierbei haben sich im Laufe der Jahre verschiedenste Immobilisierungsmethoden entwickelt, wovon einige im Folgenden aufgeführt sind:^[87,93]

- Immobilisierung von Polysaccharid-Derivaten mit Hydroxygruppen mittels Diisocyanaten
- Chemische Bindung von Amylose-Derivaten an ein aktiviertes Kettenende
- Photochemisches Vernetzen (*cross-linking*)
- Enzym-katalysierte Polymerisation
- Immobilisierung von Polysaccharid-Derivaten mit Vinylgruppen durch Radikal-Polymerisation
- Immobilisierung von Polysaccharid-Derivaten mit Alkoxysilylgruppen via intermolekularer Polykondensation

Die chromatographische Enantiomerentrennung ist ein thermodynamisch kontrollierter Prozess. Dabei beruht die Enantioselektivität auf den unterschiedlichen Stabilitäten der vorübergehend gebildeten diastereomeren Komplexen zwischen den beiden Enantiomeren mit optisch aktiven chiralen Selektoren (z.B. Cellulose-tris(4-Methylbenzoat), Abb. 3-19, rechts).^[105] Abgesehen von den thermodynamischen Einflüssen kann der Mechanismus der chiralen Erkennung auch auf molekularer Ebene betrachtet werden. Ein einfaches, jedoch – trotz der heutigen technischen Möglichkeiten und der daraus resultierenden Erweiterungen^[106,107] – nach wie vor allgemein gültiges und anerkanntes Modell stellt hierbei das sog. 3-Punkte-Modell dar. Dieses, im Jahr 1952 von C. E. DALGLIESH^[108] vorgeschlagene Modell ist in Abb. 3-20 schematisch dargestellt. Die auf der CSP aufgebrachten sog. chiralen Selektoren (hier willkürlich (S)-konfiguriert) bilden mit den sich in Lösung befindlichen Enantiomeren ((S)- bzw. (R)-konfiguriert) einer chiralen Verbindung mehr oder weniger stabile Komplexe. Der Unterschied in der Stabilität dieser Komplexe resultiert idealerweise in die gewünschte Enantiomerentrennung.^[91]

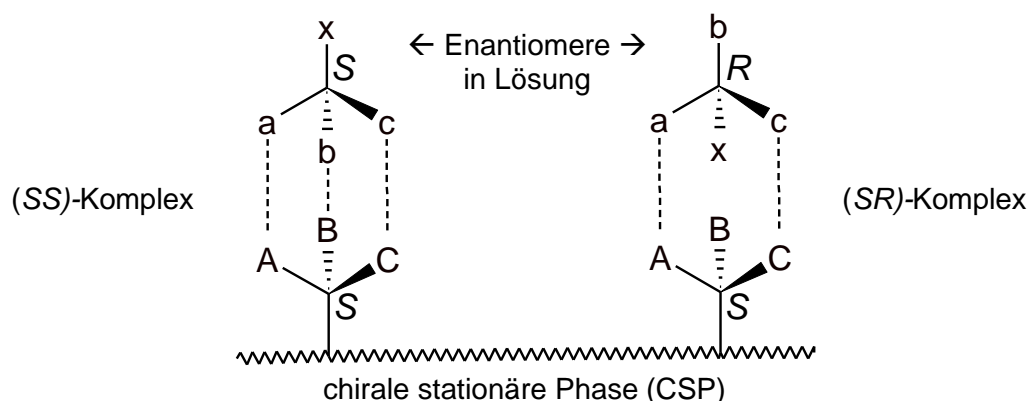


Abb. 3-20: Prinzip der chiralen Erkennung: 3-Punkte-Modell.^[108]

Um stabile Molekülkomplexe ausbilden zu können, müssen gleichzeitig drei intermolekulare Donor- oder Akzeptor-Wechselwirkungen auftreten. Unter solchen Wechselwirkungen versteht man z.B. Wasserstoffbrücken (H-Brückenbindungen), π - π -, Dipol/Dipol- und hydrophobe Wechselwirkungen, sterische Abstoßung usw.. Von diesen Donor- oder Akzeptor-Wechselwirkungen muss mindestens eine stereospezifisch das Asymmetriezentrum involvieren. In dem in Abb. 3-20 gezeigten Fall ist der (*SR*)-Komplex weniger stabil und wird deshalb während der HPLC zuerst eluiert.^[91]

Dieses 3-Punkte-Modell ist grundsätzlich bei allen CSP-Arten – zumindest in Ansätzen – eine Möglichkeit, den Mechanismus der chiralen Erkennung zu erklären. Allerdings wird es in dieser Form hauptsächlich für die „Bürsten-Typen“ angewendet. Bei den heutzutage bedeutungsvollsten, den Polysaccharid-basierten CSPs, kommen zusätzlich zu der Bildung von diastereomeren Komplexen noch zwei weitere wichtige Aspekte hinzu. Zum einen werden diese Komplexe durch den Einschluss (eines Teils) der Analyten in chirale Hohlräume und/oder Hohlwege der CSP mehr oder weniger stabilisiert. Zum anderen spielt bei der Enantiomerentrennung der Unterschied des räumlichen Sitzes der zu trennende Enantiomere in diesen Hohlräumen eine Rolle.^[92,102] Dass die Enantioselektivität unter anderem mit der höheren Strukturordnung^[87,93] der Polysaccharid-Derivate zusammen hängt, wurde vorher bereits von G. HESSE & R. HAGEL beschrieben.^[101] Sie kamen während ihren Forschungsarbeiten mit Cellulosetriacetat als chiraler Selektor zu der Erkenntnis, dass die Sorption eines Analyten „nicht durch Auflage auf eine Glucoseestereinheit erfolgt, sondern eher durch Einklemmen zwischen zwei solchen Einheiten, die in der Sekundärstruktur eine geeignete Lage einnehmen.“^[101] B. H. SHAO ET AL. stellten auch bezüglich des Mechanismus der äußerst effizienten CSP Cellulose-tris(4-Methylbenzoat) fest, dass hier weniger die polaren Wechselwirkungen, als vielmehr die Einschlusskomplexe in die chiralen Hohlräume und Vertiefungen der CSP eine Rolle spielen. So bezeichneten sie sowohl die Größe und daraus folgend eine möglichst gute Einpassung in diese Hohlräume als auch die sterische Struktur der Analyten als die ausschlaggebenden Faktoren bei der chiralen Erkennung von Cellulose-tris(4-Methylbenzoat).^[109] Trotzdem sind hierbei jedoch grundsätzlich die H-Brückenbindungen, sowie die Dipol/Dipol- und π - π -Wechselwirkungen nicht zu vernachlässigen.^[93]

Vergleicht man die zwei wichtigsten Vertreter der Polysaccharid-basierten CSPs (Cellulose- und Amylose-basierte CSPs), so werden hier trotz identischer Derivatisierung (z.B. mit 3,5-Dimethylcarbammat) oftmals unterschiedliche Erfolge in der Enantiomerenerkennung beobachtet.^[87,93] Ein Grund hierfür ist die unterschiedliche räumliche Struktur beider Polysaccharidketten. Während Amylose eine helikale Struktur aufweist, bildet Cellulose gerade lineare Polymerketten. Dieser Unterschied kommt durch die verschiedenartige Verknüpfung der Mo-

nomeren zustande, wobei es sich hierbei beide Male um Glucoseeinheiten handelt. Während diese bei der Amylose $\alpha(1\rightarrow4)$ glycosidisch, also axial-äquatorial verknüpft sind und dadurch die spiralförmige Struktur entsteht, sind die Glucosemonomeren bei der Cellulose $\beta(1\rightarrow4)$ verlinkt (äquatorial-äquatorial), was eine lineare Struktur zur Folge hat (Abb. 3-21).^[110-112]

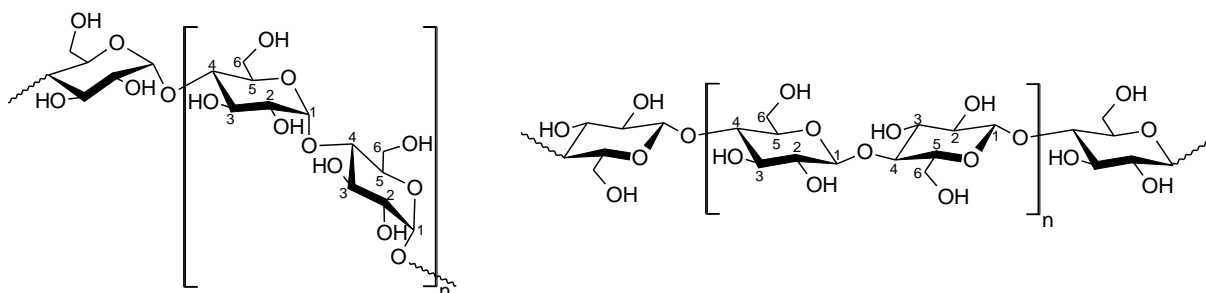


Abb. 3-21: Struktur von Amylose (links) und Cellulose (rechts).

Trotz einiger Fortschritte in den letzten Jahren durch chromatographische^[113], rechenbetonte^[114,115] sowie spektroskopische^[116,117] Studien^[87,93,102], sind die Fragen über das quantitative Verständnis von chiralen Trennmechanismen noch immer nicht vollständig geklärt. Aufgrund dieser Tatsache sowie der Existenz vieler verschiedenartiger CSPs und folglich unterschiedlichster Trennmechanismen ist die Suche nach der richtigen chiralen Säule für ein vorliegendes Trennproblem schwierig und nach wie vor oftmals nur durch empirisches Testen von Erfolg gekrönt.^[91,93]

3.7 Chirale Detektoren für die HPLC

Aufgrund der Vielzahl unterschiedlichster Trennprobleme (Art des Analyten, Zweck der Trennung etc.) existiert eine große Reihe verschiedener HPLC-Detektoren mit den entsprechenden Leistungseigenschaften, um den unterschiedlichsten Anforderungen gerecht zu werden. Eine wichtige Entwicklung haben in den letzten Jahren die chiralen Detektoren genommen.^[118,119] Diese werden im Folgenden – insbesondere aufgrund der Relevanz im Bezug auf die in der vorliegenden Arbeit zu untersuchende Chiralität der Hopfenbitterstoffe – genauer erläutert: Die Polarimetrie, d.h. die Messung der optischen Rotation, hatte ihre Anfänge zu Beginn des 19. Jahrhunderts. Hier machten die drei französischen Wissenschaftler MALUS, ARAGO und BIOT v.a. von 1808 bis 1812 wichtige Entdeckungen im Bezug auf polarisiertes Licht. Die Folge war die Entwicklung einfacher und später immer ausgereifterer entsprechender Messgeräte, sog. Polarimeter.¹²⁰ Allerdings waren bis Anfang der 1980er Jahre die herkömmlichen Polarimeter als HPLC-Detektoren aufgrund ihrer geringen Sensitivität nicht geeignet.^[121] Erst durch ein von E. S. YEUNG ET AL. entwickeltes Laser-basiertes Pola-

rimeter änderte sich dieser Sachverhalt.^[119,122] Zwar hatten bereits im Jahre 1976 G. HESSE & R. HAGEL einen sog. Drehwertschreiber als Zweitdetektor neben einem herkömmlichen UV-Detektor verwendet und waren somit die Pioniere auf diesem Gebiet^[123,124]; jedoch schafften es E. S. YEUNG ET AL. im Jahr 1980 erstmalig, einen auf optischer Aktivität basierenden Detektor zu installieren, der für die HPLC eine ausreichende Sensitivität aufwies.^[119,121,122] Im Jahr 1982 setzten W. BOEHME ET AL. eine Kombination aus UV- und Polarimeterdetektor ein, wobei beide Detektoren in Serie installiert wurden. Dadurch war die Ermittlung des Enantiomerenverhältnisses mittels HPLC möglich, ohne eine Enantiomertrennung durchführen zu müssen.^[125] Auch in den darauf folgenden Jahren wurde die Kombination aus UV- und Polarimeterdetektor immer wieder in der Literatur beschrieben.^[126-129] Diese Kombination vereint die Vorteile beider Detektoren. Zum einen die Universalität und hohe Sensitivität eines UV-Detektors. Und zum anderen die enorme Selektivität eines chiralen Detektors (Polarimeters), wodurch seine nach wie vor eher geringe Sensitivität kompensiert wird.^[125,127,130,131] Heute existieren im Wesentlichen drei Arten von chiroptischen Detektoren:^[132]

- Polarimeter
- ORD-Detektoren (optische Rotationsdispersion)
- CD-Detektoren (Circulardichroismus)

Hierbei können jedoch die beiden erstgenannten zusammengefasst werden, da sowohl Polarimeter als auch ORD-Detektoren die Rotation der Schwingungsebene von linear polarisiertem Licht durch chirale Moleküle erfassen.^[130] In Abb. 3-22 ist diese Drehung der Schwingungsebene schematisch dargestellt.^[133]

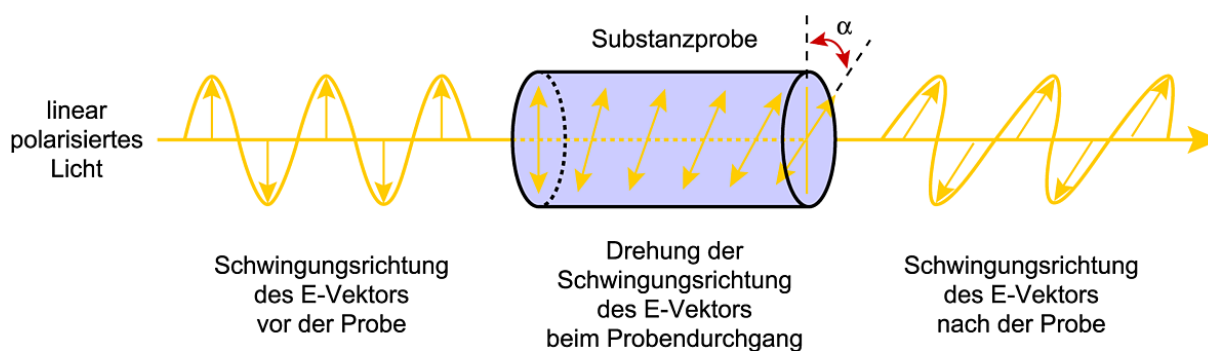


Abb. 3-22: Drehung der Polarisationsebene von linear polarisiertem Licht um den Winkel α ; E-Vektor = Vektor des elektrischen Feldes.^[133]

Ein zunächst unpolarisierter (in sämtliche Ebenen schwingender) Lichtstrahl wird durch einen sog. Polarisator (Polarisationsfilter) linear polarisiert, so dass das Licht nur noch in einer bestimmten Ebene schwingt. Anschließend passiert dieses Licht eine Flusszelle (bzw. Küvette) mit der zu analysierenden Probe. Enthält diese eine optisch aktive Substanz, so dreht sich die Schwingungsebene um einen bestimmten Winkel α . Dieser Winkel ist von mehreren Faktoren abhängig.^[130,132-134]

- Struktur der chiralen Verbindung: α ist für jede Verbindung eine charakteristische Größe.
- Konzentration der Verbindung in Lösung: Je höher die Konzentration, desto größer ist $|\alpha|$.
- Schichtdicke, d.h. die Weckstrecke die das Licht durch die Probe zurücklegt: Je größer diese ist, desto größer ist $|\alpha|$.
- Wellenlänge des Lichts: $|\alpha|$ nimmt im Allgemeinen mit sinkender Wellenlänge λ zu, wobei der sog. Cotton-Effekt eine Anomalie in der Nähe einer Absorptionsbande darstellt. Dieser Zusammenhang wird durch die sog. *Drude-Gleichung* beschrieben:

$$[\alpha]_{\lambda} = \frac{A_i}{\lambda^2 - \lambda_i^2}$$

Formel 3-5: *Drude-Gleichung:* Zusammenhang von $[\alpha]$ und λ (außerhalb von Absorptionsbanden); A_i = Konstante, λ_i = konstante Wellenlänge.^[134]

- Temperatur
- Lösemittel

Aus der folgenden Gleichung ist der Zusammenhang des Drehwinkels α mit der Konzentration (c) und der Schichtdicke (l) ersichtlich. Wird α mittels eines Polarimeters gemessen, kann gemäß dem *Biotschen Gesetz* (Formel 3-6) die spezifische Drehung $[\alpha]$ errechnet werden.^[133,135]

$$[\alpha]_{\lambda}^T = \alpha_{\text{gemessen}} \cdot \frac{100}{l \cdot c} \quad [^{\circ}]$$

Formel 3-6: Berechnung der spezifischen Drehung $[\alpha]$ gemäß dem *Biotschen Gesetz*; l = Schichtdicke [dm], c = Konzentration [g/100 mL].^[133,135]

Enantiomere drehen die Schwingungsebene um den gleichen Betrag, jedoch in entgegengesetzte Richtungen.^[135] Dabei wird α mit einem positiven Vorzeichen (+) angegeben, wenn die Ebene im Uhrzeigersinn gedreht wird. Umgekehrt erhält α bei Drehung der Ebene entgegen dem Uhrzeigersinn ein negatives Vorzeichen (-).^[133]

Der Unterschied zwischen Polarimeter und ORD-Detektoren besteht darin, dass ORD-Detektoren die Rotationen über einen definierten Wellenlängenbereich erfassen und somit die Abhängigkeit der Rotation von der Wellenlänge λ demonstrieren. Dagegen messen Pola-

rimeter die Rotation nur bei einer (bzw. bestenfalls mehreren) bestimmten Wellenlänge(n).^[136]

Optisch aktive Verbindungen absorbieren links- und rechtszirkular polarisiertes Licht in unterschiedlichem Ausmaß. Dieses Phänomen wird als Circular dichroismus (CD) bezeichnet. Mittels eines CD-Detektors wird die entsprechende Absorptionsdifferenz in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ gemessen. Dabei entspricht die Differenz der unterschiedlichen Absorptionen der Differenz der molaren Extinktionskoeffizienten ϵ bei links- bzw. rechtszirkular polarisiertem Licht ($\Delta\epsilon$). In einem CD-Diagramm wird $\Delta\epsilon$ gegen λ aufgetragen, wobei bei zwei Enantiomeren spiegelbildliche Spektren entstehen.^[130] Im Allgemeinen besitzen CD-Detektoren im Vergleich zu Polarimeter- und ORD-Detektoren sowohl eine höhere Sensitivität als auch eine höhere Genauigkeit und Linearität. Dies zeigte unter anderem eine Evaluierung der entsprechenden Detektoren von L. KOTT ET AL. im Jahr 2007.^[134]

4 Ergebnisse und Diskussion

Die im Folgenden durchnummerierten HPLC-Anlagen (1 und 2) und Säulen (1 – 22) sind in den Kapiteln 6.3.1 und 6.3.2 aufgeführt. Bei den mobilen Phasen, bei denen lediglich die Säure angegeben ist (z.B. 0,015 % H₃PO₄), war die jeweilige Säure in den angegebenen Konzentrationen stets in ddH₂O gelöst.

4.1 Analytische RP-HPLC

Die Analyse der Hopfenbitterstoffe erfolgt herkömmlicherweise mittels HPLC gemäß den etablierten EBC (*European Brewery Convention*)^[137] Methoden 7.7 – 7.9, 7.11 und 9.47 bzw. den ASBC (*American Society of Brewing Chemists*)^[138] Hopfen-Methoden 9C, 9D und 14. Hierbei werden die α - und β -Säuren in Hopfen und Hopfenprodukten (Pellets und Extrakte) bzw. die Iso- α -Säuren in Bier^[139] aufgetrennt und spezifisch bestimmt. Gemäß den EBC- und ASBC-Methoden erfolgt keine Separierung von n- (NH) und ad-Humulon (AH) (bzw. n- [NL] und ad-Lupulon [AL]) (s. Chromatogramm im Anhang 1). Daher sollte in der vorliegenden Arbeit eine optimierte Methode zur kompletten Auftrennung der α -Säuren (AS) entwickelt werden. Auch die Trennung der *cis*- und *trans*-Isomere von Iso-co- (ICH), Iso-n- (INH) und Iso-ad-Humulon (IAH) gelingt bei den herkömmlichen EBC- und ASBC-Methoden nicht. Zwar wurden derartige Trennungen von anderen Arbeitsgruppen bereits realisiert^[77,140-144], dennoch sollten in der vorliegenden Arbeit entsprechende Methoden dahingehend optimiert werden, *cis:trans*-Verhältnisse der Iso- α -Säuren in möglichst kurzer Zeit und mit möglichst geringem Lösemittelverbrauch analysieren zu können. Das Hauptproblem lag hierbei vor allem an der Verwendung von Acetonitril – welches sich der Literatur^[77,140,141] und ersten Tests zufolge besonders gut zur IAS-Trennung eignete – als Hauptbestandteil der mobilen Phase. Aufgrund der zu Beginn dieser Forschungsarbeit (Frühjahr 2009) herrschenden globalen Automobilkrise kam es auf dem Markt zu einer drastischen Verknappung von Acetonitril. Das bei der Herstellung des Kunststoffes Polyacrylnitril anfallende „Abfallprodukt“ Acetonitril konnte daher nur noch zu deutlich erhöhten Preisen erworben werden. Daher wurde in einigen Industriebranchen nach Möglichkeiten gesucht, dieses durch günstigere Lösemitteln, wie z.B. Methanol, zu ersetzen.^[145] Dies war zunächst auch in der vorliegenden Forschungsarbeit das Ziel. Da sich jedoch die Lage am Markt relativ schnell wieder entspannte (Herbst 2009), konnte schließlich uneingeschränkt auf Acetonitril zurückgegriffen werden. Es wurden elf RP-HPLC-Säulen und eine Vielzahl mobiler Phasen getestet. Die Säulen basierten allesamt auf Kieselgel, welches unterschiedlich derivatisiert war: Bei neun Säulen durch C18-Ketten und bei jeweils einer Säule durch Pentafluorphenyl- (PFP) bzw. Biphenyl-Reste.

Die mobilen Phasen wurden teils aus der Literatur^[67,77,139-141,146-158] übernommen, teils, basierend auf diesen, modifiziert. Bei der Suche nach den geeigneten Bedingungen wurde v.a. auf kurze Retentionszeiten, hohe Selektivitätsfaktoren, hohe Auflösungen und auf die Form der Peaks (möglichst kein *Tailing* bzw. *Fronting*) geachtet. Um eine Methode für die Trennung von *cis*- und *trans*-IAS zu entwickeln, wurde ein eigenhändig isomerisierter Hopfenextrakt (aus ICE-2, Kap. 6.5.1) verwendet, da dieser, im Gegensatz zum Standard ICS-I2, neben den TIAS auch die CIAS enthielt. Durch Variation von Säule und/oder mobiler Phase konnten sukzessive Fortschritte hinsichtlich der Trennung sowohl der *n*- und *ad*-Homologen als auch der *cis*- und *trans*-Isomere erzielt werden.

Im Unterschied zu den am weitverbreitetsten RP-HPLC-Säulen, den C18-Säulen, ist das Basismaterial Kieselgel bei der Säule 9 (Restek, Ultra II Biphenyl 3-100, 150 × 4,6 mm) nicht mit C18-Ketten, sondern mit Biphenyl-Resten modifiziert. Dies soll nach Literaturangaben zu einer erhöhten Selektivität bei dipolaren, ungesättigten, konjugierten sowie aromatischen Analyten führen.^[159,160] Dieser Sachverhalt konnte bestätigt werden: Mit einer Mischung aus 0,025 % H₃PO₄/ACN = 65/35 (Flussgeschwindigkeit 2,0 mL/min) fand auf Säule 9 eine relativ gute IAS-Trennung statt – lediglich TINH und CINH konnten nicht basisliniengetrennt werden – während alle anderen bisher getesteten Säulen bei vergleichbaren Bedingungen deutlich schlechtere Ergebnisse lieferten.

Die Säulen 10 (Phenomenex, Kinetex PFP, 2,6-100, 100 × 4,6 mm) und 11 (Phenomenex, Kinetex C18, 2,6-100, 100 × 4,6 mm) besaßen im Vergleich zu den bisher beschriebenen Säulen einen großen Unterschied. Im Gegensatz zu herkömmlichen Säulen, welche mit vollporösem Partikelmaterial gefüllt sind, basieren die Partikel der Kinetex-Säulen auf der neuartigen sog. *Core-Shell Technologie*. Hierbei wird ein fester Kern aus Kieselgel (Durchmesser: 1,9 µm) mit einer nur 0,35 µm dünnen porösen Hülle überzogen. Neben einer engen Partikelgrößenverteilung und dem dadurch reduzierten Mehrwegeffekt (*Eddy-Diffusion*) wird durch die, im Vergleich zu vollporösen Partikeln, nur sehr dünne poröse Hülle ein schnellerer Massentransfer gewährleistet. Beides führt gemäß der *van-Deemter-Gleichung* zu einer Reduzierung der Bodenhöhe und damit zu einer Erhöhung der Bodenzahl. Die in dieser Arbeit verwendeten Kinetex 2,6-µm-Partikel sind hinsichtlich ihrer Leistung mit sub-2-µm-Partikeln der herkömmlichen Technologie (vollporöse Partikel) vergleichbar. Da bei Kinetex-Säulen allerdings ein deutlich geringerer Rückdruck herrscht, können diese Säulen auf herkömmlichen HPLC-Anlagen verwendet werden.^[161,162] Säule 10 wurde aufgrund ihrer PFP-derivatisierten Phase eine erhöhte Fähigkeit zur Trennung der Hopfensäuren in Aussicht gestellt. Dies war in der möglichen Ausbildung verschiedener Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen, Dipol-Dipol-, aromatischen und hydrophoben Wechselwirkungen

begründet. Allerdings zeigte die Säule 10 mit keiner der getesteten mobilen Phasen eine akzeptable IAS-Trennung, weshalb sie letztlich als ungeeignet eingestuft wurde. Im Gegensatz zu Säule 10 (PFP) handelte es sich bei Säule 11 wiederum um ein C18-Material (Kieselgel mit C18-Ketten derivatisiert; vgl. Säule 1 – Säule 8). Die IAS-Trennung mittels einer Mischung aus 0,025 % $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{ACN} = 65/35$ ergab ein Chromatogramm, welches mit dem von Säule 9 zu vergleichen war. Der Vorteil gegenüber Säule 9 lag in einer besseren Trennung von TINH und CINH. Allerdings schlug sich dies auch auf längere Retentionszeiten nieder ($t_R = 37$ min bei CIAH). Durch Tests weiterer mobiler Phasen, die allesamt die Güte der Trennung mittels 0,025 % $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{ACN}$ nicht erreichten, konnte geschlossen werden, dass bei Säule 9 und Säule 11 für eine gute *cis/trans*-Isomerentrennung eine mobile Phase nötig war, die lediglich aus ACN und angesäuertem H_2O (H_3PO_4) bestand.

In der Folge wurden die pH-Werte (2,0 – 7,0) der wässrigen Anteile und die prozentualen Zusammensetzungen der mobilen Phasen ($\text{H}_2\text{O}-\text{H}_3\text{PO}_4/\text{ACN}$) sowie die Flussgeschwindigkeiten (0,5 – 2,0 mL/min) und die Säulenofentemperatur (25 °C – 45 °C) variiert und mittels der Säulen 9 und 11 getestet. Die Variation des pH-Wertes bestätigte die aus der Literatur^[157] bekannte These: Je saurer die mobile Phase, d.h. je höher die Säurekonzentration (H_3PO_4) war, desto höher war die Auflösung. Allerdings hatten niedrigere pH-Werte auch längere Retentionszeiten zur Folge. Der optimale pH-Wert lag bei 2,5 ($\pm 0,025$ % H_3PO_4). Die Mischungsverhältnisse der mobilen Phasen (0,025 % $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{ACN}$) lagen bei 65/35 (Säule 9, IAS), 60/40 (Säule 9, AS), 62/38 (Säule 11, IAS) und 50/50 (Säule 11, AS). Die Flussgeschwindigkeit betrug stets 2,0 mL/min. Eine Temperaturerhöhung um 10 °C hatte eine Druckerniedrigung (verringerte Lösemittelviskosität) um 16 % zur Folge (25 °C: 4550 psi, 35 °C: 3920 psi, 45 °C: 3300 psi). Schließlich wurde eine Temperatur von 45 °C gewählt. Dieser Wert wurde als Limit gesetzt, um die Säulen sowie die Proben zu schonen.

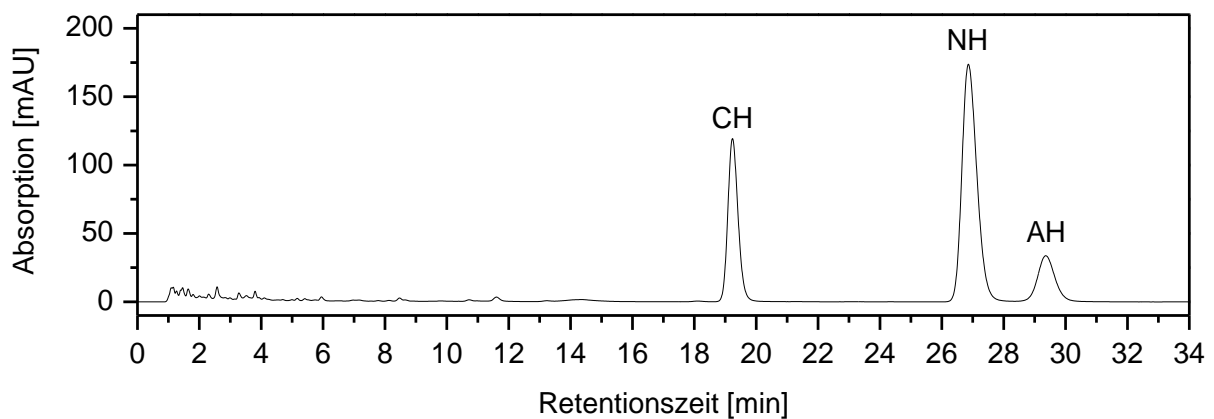
Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Säulen 9 und 11 hinsichtlich der IAS- und AS-Trennung die besten Ergebnisse der in dieser Forschungsarbeit getesteten RP-HPLC-Säulen erreichten. Eine Gegenüberstellung beider Säulen ist in Tab. 4-1 aufgeführt. Hierbei wurde der Schwerpunkt auf die Ergebnisse der IAS-Trennung gelegt, da die analytische RP-HPLC während der Forschungsarbeiten hauptsächlich der *cis/trans*-Isomeren-Bestimmung der IAS diente. Angesichts der Ergebnisse aus Tab. 4-1 wurde letztendlich die Säule 11 als die geeignetste Säule bei der RP-HPLC von IAS (und AS) eingestuft und daher größtenteils* für die RP-HPLC-Messungen während der vorliegenden Arbeit verwendet.

* Messungen vor dieser endgültigen Evaluierung wurden teils mit Säule 9, teils mit Säule 11 durchgeführt.

Tab. 4-1: Vergleich der Chromatogramme von Säule 9 und Säule 11 bei der RP-HPLC von IAS.

Säule 9	Säule 11
längere Retentionszeiten (-)	kürzere Retentionszeiten (+)
TINH / CINH nicht basisliniengetrennt (-)	TINH / CINH basisliniengetrennt (+)
Selektivitätsfaktor von CINH und TIAH höher (+)	Selektivitätsfaktor von CINH und TIAH gering, aber ausreichend (±)
Peaks z.T. mit minimalem Tailing (±)	Peaks z.T. mit minimalem Tailing (±)
Rückdruck: 3330 psi (45 °C) (+)	Rückdruck: 3880 psi (45 °C), akzeptabel (±)

Etwa zur Hälfte der Forschungsdauer wurden aufgrund von systembedingten Problemen bei der HPLC-Anlage 1 einige Filter und Verbindungsstücke ausgetauscht. Dadurch kam es zu deutlich verbesserten Chromatogrammen im Vergleich zu äquivalenten Messungen vor den Umbaumaßnahmen. Es entstanden deutlich schärfere Peaks mit höherer Auflösung, woraufhin die HPLC-Bedingungen neu angepasst wurden. Entsprechendes Chromatogramme für die AS- bzw. IAS-Trennungen mittels Säule 11, welche mit den fortan verwendeten Bedingungen (HPLC-Methode-1 [AS] und HPLC-Methode-2 [IAS], Tab. 6-4) erzielt wurden, sind in Abb. 4-1 (AS) und Abb. 4-2 (IAS) zu sehen.

**Abb. 4-1:** HPLC Chromatogramm (UV: 290 nm) von *AS-pur* ($c = 50 \text{ g/L}$, $0,2 \mu\text{L}$ injiziert), Anlage 1, Säule 11, $T = 45 \text{ °C}$, Fluss: 1 mL/min , mobile Phase: $0,025 \text{ \% H}_3\text{PO}_4/\text{ACN} = 50/50$ (isokratisch, HPLC-Methode-1).

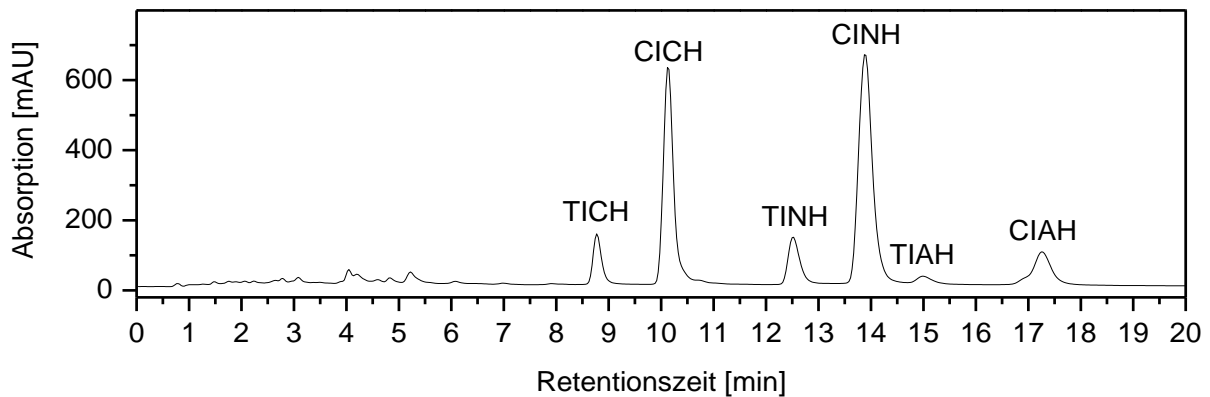


Abb. 4-2: HPLC Chromatogramm (UV: 260 nm) einer IAS-Probe der Firma Hopsteiner ($c = 3,5 \text{ g/L}$, $3 \mu\text{L}$ injiziert), Anlage 1, Säule 11, $T = 45 \text{ }^\circ\text{C}$, Fluss: 1 mL/min , mobile Phase: $0,025 \text{ } \%$ $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{ACN} = 55/45$ (isokratisch, HPLC-Methode-2).

Selbstverständlich konnte die IAS-Methode (HPLC-Methode-2: isokratisch $0,025 \text{ } \%$ $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{ACN} = 55/45$) auch für die Analyse von Proben, die sowohl IAS als auch AS enthielten (z.B. bei Isomerisierungsversuchen), verwendet werden. Da die Analysenzeiten hier allerdings aufgrund der geringeren Polarität der AS relativ lang waren, wurde eine Gradientenmethode entwickelt. Das entsprechende Chromatogramm ist in Abb. 4-3 zu sehen.

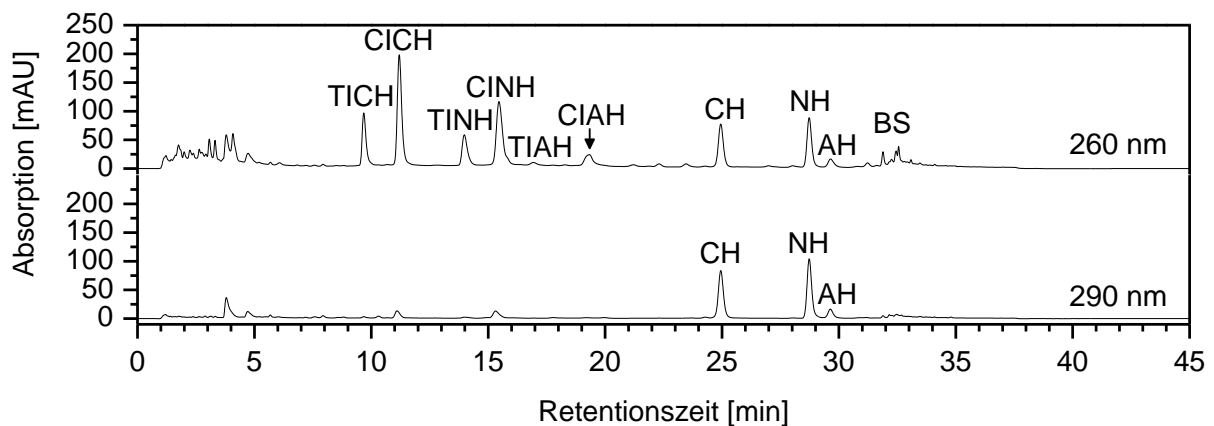


Abb. 4-3: HPLC Chromatogramm (UV: 260 nm und 290 nm) einer selbst isomerisierten Hopfenprobe (3 mg zerkleinerte Pellets Hallertauer Magnum in 5 mL Würze 1 h gekocht); $c_{\text{AS/IAS}} \approx 2 \text{ g/L}$, $5 \mu\text{L}$ injiziert, Anlage 2 (ohne MS), Säule 11, $T = 45 \text{ }^\circ\text{C}$, Fluss: 1 mL/min , HPLC-Methode-10 (Gradient).

In der folgenden Abb. 4-4 ist zum Vergleich ein Chromatogramm einer IAS- bzw. AS-Trennung aus der Literatur^[141] abgebildet. Da in diesem die IAS und AS bereits basisliniengetrennt waren, konnte erwartungsgemäß hinsichtlich der allgemeinen Güte der Trennung kaum eine Verbesserungen erzielt werden (Abb. 4-3). Allerdings besaßen die Peaks in der vorliegenden Arbeit deutlich höhere Auflösungen. Außerdem konnte im Vergleich zur Trennung von JASKULA ET AL.^[141] eine drastische Lösemittlersparnis verzeichnet werden. So be-

nötigte man für die IAS-Trennung aufgrund des niedrigeren Flusses (1,0 mL/min anstatt 1,8 mL/min^[141]) rund 30 % weniger Lösemittel, was beim relativ kostenintensiven Acetonitril von hoher Bedeutung ist. Auch die Gesamtanalysezeit der IAS- und AS-Trennung konnte erheblich reduziert werden (ca. 30 min anstatt ca. 43 min^[141]).

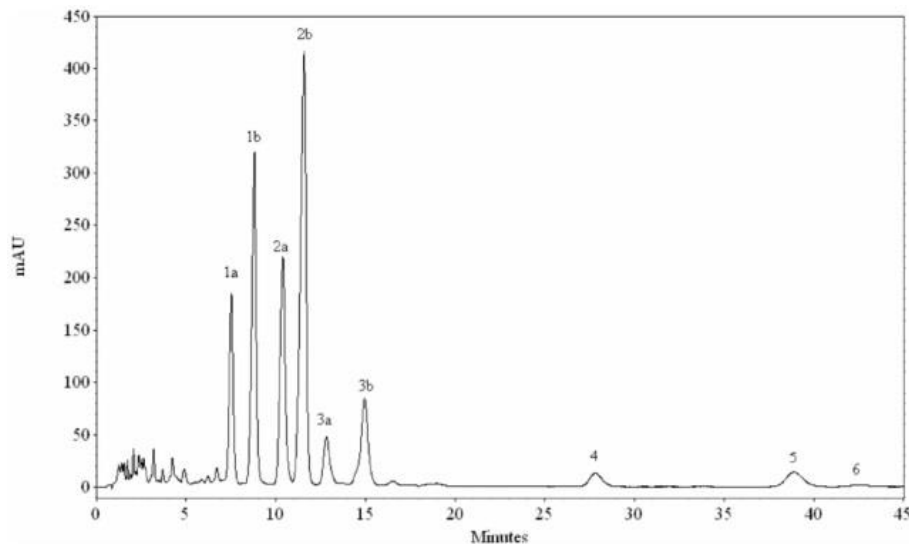


Abb. 4-4: Vergleichschromatogramm einer IAS- bzw. AS-Trennung nach JASKULA ET AL.^[141]; UV: 270 nm, H₂O(pH 2,80 mit H₃PO₄)/ACN = 48/52, Fluss: 1,8 mL/min, Säule: Alltima C18 5 μ m (150 mm \times 4,6 mm, Alltech Associates, Deerfield, IL, USA); 1a: TICH, 1b: ClCH, 2a: TINH, 2b: ClNH, 3a: TIAH, 3b: CIAH, 4: CH, 5: NH, 6: AH.

Da bei der Verwendung des Massenspektrometers (als zusätzlicher Detektor bei HPLC-Anlage 2) keine H₃PO₄ verwendet werden durfte, musste hierfür eine andere Säure zur Ansäuerung der mobilen Phase gefunden werden. Hierbei kam lediglich eine leichtflüchtige organische Säure wie HCOOH, CH₃COOH oder TFA in Frage. Zur Ermittlung der am besten geeigneten Bedingungen wurden die Art der Säure sowie die Säurekonzentration variiert. Dabei lieferte 0,03 % TFA als wässriger Anteil der mobilen Phase bei der AS- bzw. IAS-Trennung auf Säule 11 die besten Ergebnisse. TIAH konnte dabei jedoch nicht aufgelöst werden (Coelution mit ClNH). Abb. 4-5 zeigt eine entsprechende Trennung mit UV- und MS-Detektion (HPLC-Methode-7 bzw. -8, Tab. 6-4).

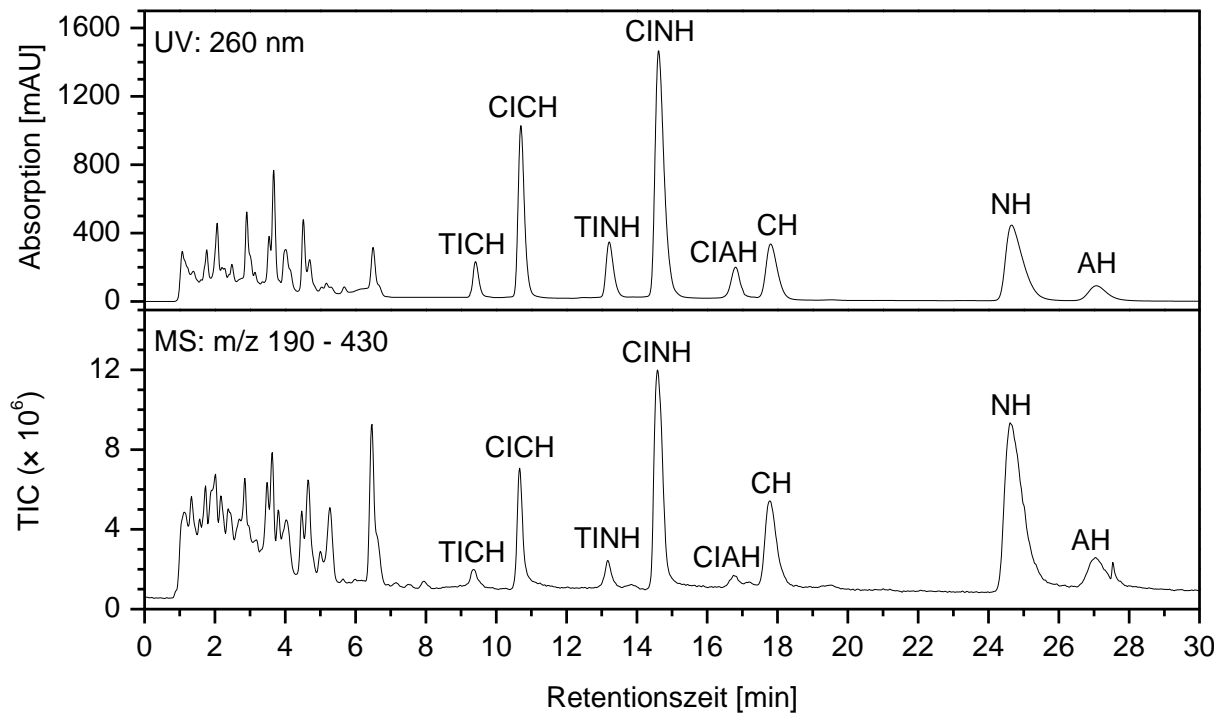


Abb. 4-5: HPLC Chromatogramme von IAS und AS ($c_{IAS} = 10 \text{ g/L}$, $c_{AS} = 10 \text{ g/L}$, $5 \mu\text{L}$ injiziert); oben: UV-Detektion, unten: MS-Detektion; Anlage 2, Säule 11, $T = 45 \text{ }^\circ\text{C}$, Fluss: 1 mL/min , mobile Phase: $0,03 \text{ \% TFA/ACN} = 50/50$ (isokratisch, HPLC-Methode-7 bzw. -8).

Im Folgenden sind die UV-Spektren der AS (Abb. 4-6) und IAS (Abb. 4-7), die in den nach der jeweils abgeschlossenen Methodenentwicklung verwendeten mobilen Phasen aufgenommen wurden (Anlage 1), sowie die m/z -Spektren (Anlage 2, Abb. 4-8 und Tab. 4-2 [AS] bzw. Abb. 4-9 und Tab. 4-3 [IAS]) abgebildet. Die AS zeigen dabei Absorptionsmaxima bei 239 nm und 293 nm (CH und AH) bzw. 239 nm und 301 nm (NH). Die Verschiebung des zweiten Maximums in den längerwelligen Bereich bei NH ist durch den Eintritt der Methylengruppe in der C-2-Seitenkette zu erklären. Bei den IAS liegen die Maxima bei 260 bzw. 261 nm . In den m/z -Spektren der AS stellen die Peaks bei 349 (CH) bzw. 363 (NH und AH) die Molekülpeaks (einfach positiv geladen ($[M+H]^+$)) dar. Darüber hinaus kommt es zu unterschiedlichen Fragmentenabspaltungen. Die Ionen $[M-154]$ (NH, AH) bzw. $[M-140]$ (CH), $[M-139]$ (NH, AH) bzw. $[M-125]$ (CH) und $[M-98]$ (NH, AH) bzw. $[M-84]$ (CH) unterscheiden sich jeweils um 14 Da . Dies lässt darauf schließen, dass hier jeweils die C-2-Seitenkette involviert ist. Es werden also unterschiedliche Fragmente abgespalten ($[\text{Fragment}]$ und $[\text{Fragment}+14]$), wodurch gleiche Reste ($m/z = 208, 223$ und 264) zurück bleiben. $[M-123]$, $[M-82]$, $[M-67]$, $[M-55]$, $[M-26]$ und $[M-14]$ sind sowohl bei CH als auch NH und AH vorhanden. Die Fragmentierung ist von der C-2-Seitenkette unabhängig, d.h. es werden bei CH, NH und AH gleiche Fragmente abgespalten, wobei die C-2-Seitenkette nicht involviert ist. Es bleiben unterschiedliche Reste ($[\text{Rest}]$ bei CH und $[\text{Rest}+14]$ bei NH und AH) zurück. $[M+23]$ und $[M+64]$ stellen Addukte mit Na^+ bzw. ACN und Na^+ dar und sind bei jeder AS vorhanden. Die m/z -Spektren der IAS zeigen stets Ionen bei $[M-35]$ und $[M-17]$. Diese kommen durch

Abspaltung von zwei bzw. einem Wassermolekül zustande. Die Peaks bei 349 (ICH) bzw. 363 (INH und IAH) stellen entsprechend der AS die Molekülpeaks ($[M+H]^+$) dar. $[M+24]$ sind lediglich bei den TIAS vorhanden, was darauf schließen lässt, dass diese im Gegensatz zu den CIAS ein bestimmtes Addukt bilden. Bei CICH können die Peaks bei $[M-43]$ und $[M+61]$ nicht plausibel erklärt werden. Die weiteren, in Abb. 4-9 detektierten und in Tab. 4-3 aufgeführten Peaks, stammen von coeluiierenden Substanzen und nicht von der jeweiligen IAS.

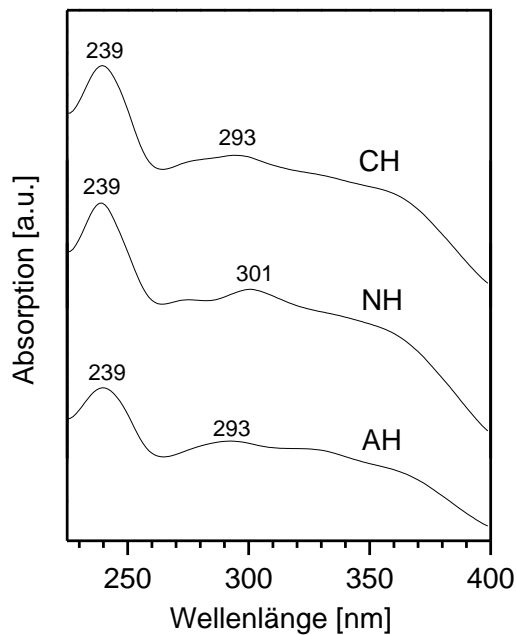


Abb. 4-6: UV-Spektren: AS in 0,025 % $H_3PO_4/ACN = 50/50$, $\lambda = 225 - 400$ nm.

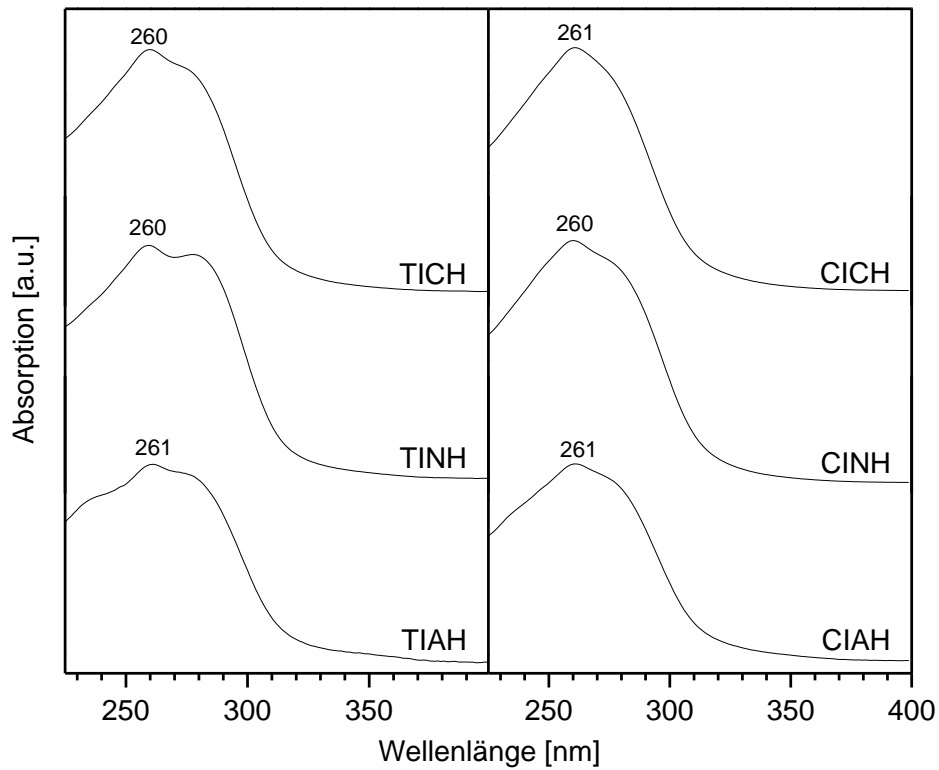


Abb. 4-7: UV-Spektren: IAS in 0,025 % H₃PO₄/ACN = 55/45, $\lambda = 225 - 400$ nm.

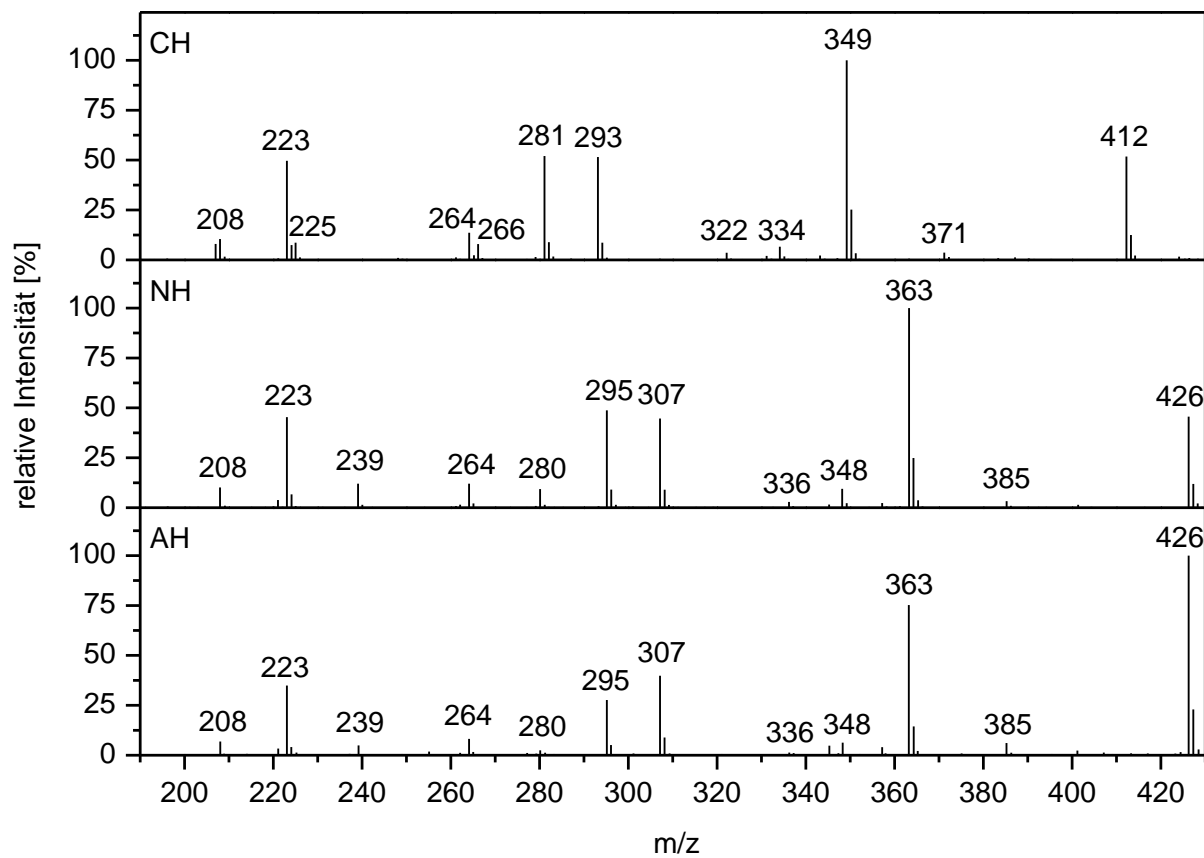


Abb. 4-8: m/z-Spektren: AS in 0,03 % TFA/ACN = 50/50, TIC: m/z 190 - 430.

Tab. 4-2: Peaks der m/z-Spektren mitsamt den entsprechenden Ionen; Probe: *AS-pur*.

m/z	Ion (ggf. Addukt)	m/z	Ion (ggf. Addukt)
CH (M = 348 Da)		NH (M = 362 Da)	
208	[M-140]	208	[M-154]
223	[M-125]	223	[M-139]
225	[M-123]	239	[M-123]
264	[M-84]	264	[M-98]
266	[M-82]	280	[M-82]
281	[M-67]	295	[M-67]
293	[M-55]	307	[M-55]
322	[M-26]	336	[M-26]
334	[M-14]	348	[M-14]
349	[M+1] \triangleq [M+H] ⁺	363	[M+1] \triangleq [M+H] ⁺
371	[M+23] \triangleq [M+Na] ⁺	385	[M+23] \triangleq [M+Na] ⁺
412	[M+64] \triangleq [M+ACN+Na] ⁺	426	[M+64] \triangleq [M+ACN+Na] ⁺
AH (M = 362 Da)			
208	[M-154]	307	[M-55]
223	[M-139]	336	[M-26]
239	[M-123]	348	[M-14]
264	[M-98]	363	[M+1] \triangleq [M+H] ⁺
280	[M-82]	385	[M+23] \triangleq [M+Na] ⁺
295	[M-67]	426	[M+64] \triangleq [M+ACN+Na] ⁺

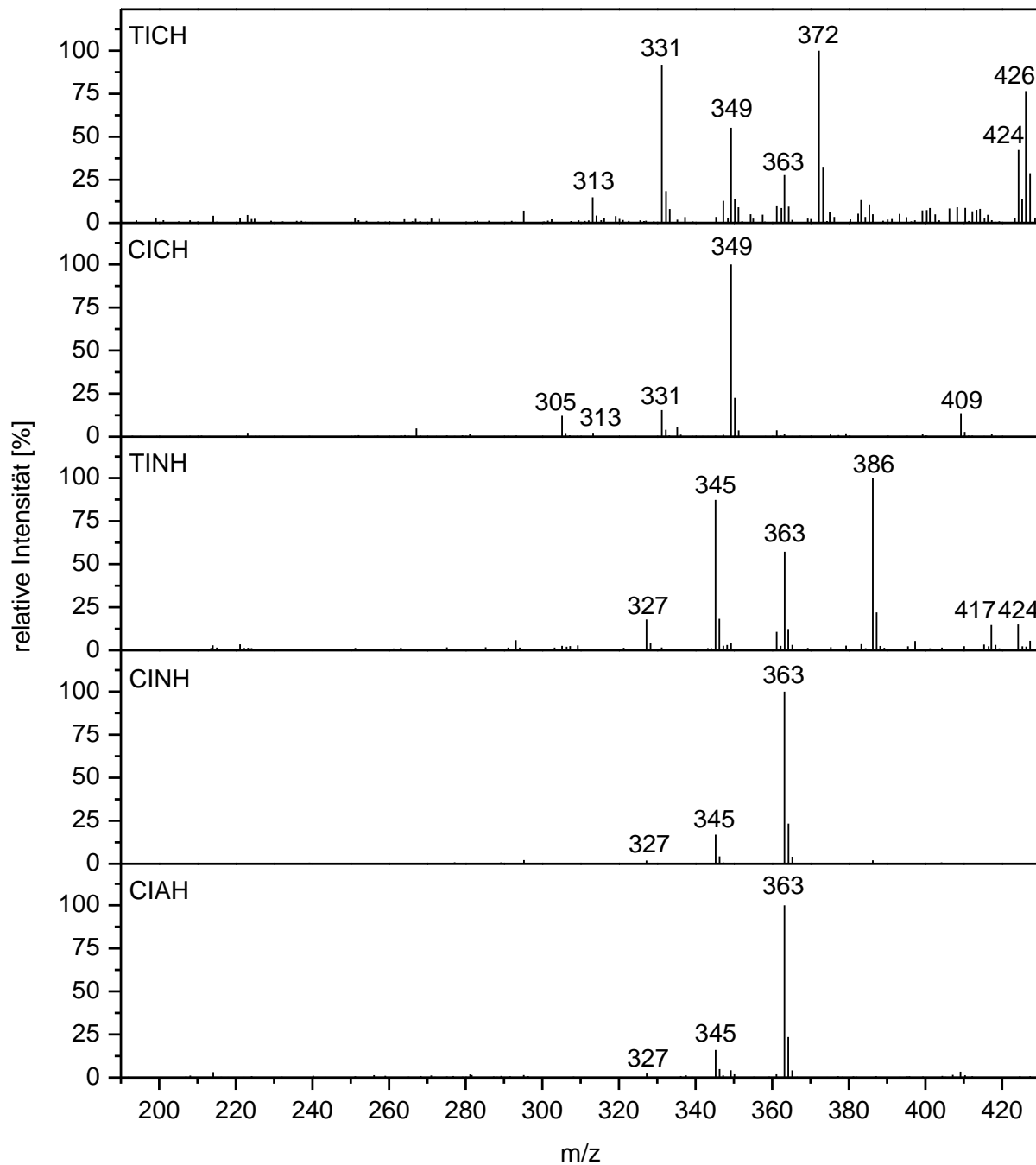


Abb. 4-9: m/z-Spektren: IAS in 0,03 % TFA/ACN = 50/50, TIC: m/z 190 – 430 (TIAH konnte bei der chromatographischen Trennung nicht aufgelöst werden).

Tab. 4-3: Peaks der m/z-Spektren mitsamt den entsprechenden Ionen; Probe: *Iso-90*.

m/z	Ion (ggf. Addukt)	m/z	Ion (ggf. Addukt)
TICH (M = 348 Da)		CICH (M = 348 Da)	
313	$[M-35] \triangleq [M-2H_2O+H]^+$	305	$[M-43]$
331	$[M-17] \triangleq [M-H_2O+H]^+$	313	$[M-35] \triangleq [M-2H_2O+H]^+$
349	$[M+1] \triangleq [M+H]^+$	331	$[M-17] \triangleq [M-H_2O+H]^+$
363	kein TICH-Peak, Coelution	349	$[M+1] \triangleq [M+H]^+$

m/z	Ion (ggf. Addukt)	m/z	Ion (ggf. Addukt)
372	[M+24]	409	[M+61]
424	kein TICH-Peak, Coelution		
426	kein TICH-Peak, Coelution		CINH (M = 362 Da)
	TINH (M = 362 Da)	327	[M-35] \triangleq [M-2H ₂ O+H] ⁺
327	[M-35] \triangleq [M-2H ₂ O+H] ⁺	345	[M-17] \triangleq [M-H ₂ O+H] ⁺
345	[M-17] \triangleq [M-H ₂ O+H] ⁺	363	[M+1] \triangleq [M+H] ⁺
363	[M+1] \triangleq [M+H] ⁺		CIAH (M = 362 Da)
386	[M+24]	327	[M-35] \triangleq [M-2H ₂ O+H] ⁺
417	kein TINH-Peak, Coelution	345	[M-17] \triangleq [M-H ₂ O+H] ⁺
424	kein TINH-Peak, Coelution	363	[M+1] \triangleq [M+H] ⁺

4.2 Präparative RP-HPLC

Da für die präparative RP-HPLC die Übernahme der in Kap. 4.1 (analytische RP-HPLC) ermittelten optimalen Bedingungen und die einfache Anpassung der Flussgeschwindigkeit nicht ausreichte (keine zufriedenstellende Trennung), war hier eine separate Methodenentwicklung nötig. Diese erfolgte zeitlich parallel zu derjenigen im analytischen Maßstab. Aus diesem Grund wurden auch hier mobile Phasen getestet, die entsprechend der bereits in Kap.4.1 beschriebenen Ergebnisse als weniger geeignet eingestuft wurden und daher hier nicht weiter beschrieben werden.

Bei Säule 12 (Knauer, LiChrospher-60 RP select B (C8) 60-5, 250 × 8,0 mm) betrug die maximale Flussrate 4 mL/min. Neben dem im Vergleich zur weiter unten beschriebenen Säule 13 kleineren Säulendurchmesser (8 mm) war dies vermutlich auch im Alter der Säule begründet.

Aus diesem Grund wurde eine neue semi-präparative Säule getestet. Bei der hierbei verwendeten Säule 13 (Macherey-Nagel, Nucleodur C18 ec 100-5, 250 × 10,0 mm) handelte es sich um die gleiche stationäre Phase wie bei Säule 1. Im Vergleich zu Säule 12 konnte mit Säule 13 aufgrund des größeren Säulendurchmessers ein deutlich höherer Probendurchsatz erzielt werden. Zum einen konnte mehr Probe auf die Säule aufgetragen und zum anderen konnte ein deutlich höherer Fluss (bis zu 10 mL/min) gefahren werden, ohne dass der Maximaldruck der HPLC-Anlage überschritten wurde.

Ebenso wie bei der analytischen RP-HPLC wurden auch auf Säule 13 die besten AS- und IAS-Trennungen mittels einer Mischung aus angesäuertem H₂O (H₃PO₄) und ACN erzielt. Durch Variation der Säurekonzentration, d.h. des pH-Werts und des Mischungsverhältnisses konnten schließlich die optimalen Bedingungen für die AS- und IAS-Trennung ermittelt werden. Diese sind im Folgenden aufgeführt (HPLC-Methode-3 [AS] und HPLC-Methode-4 [IAS], Tab. 6-4). Darunter ist jeweils ein entsprechendes Chromatogramm abgebildet (Abb. 4-10 und Abb. 4-11). Aufgrund der Tatsache, dass sowohl bei der AS- als auch bei der IAS-Trennung stets eine Basislinientrennung vorlag, konnten die entsprechenden Einzelsubstanzen auf einfache Weise isoliert werden. Dies gelang mittels des nach dem UV-Detektor installierten Fraktionensammlers. Bei der IAS- bzw. AS-Trennung wurden sowohl unterschiedlich stark angesäuerte mobile Phasen (IAS: 0,015 % H₃PO₄, AS: 0,075 % H₃PO₄), als auch unterschiedliche Mischungsverhältnisse der mobilen Phasen (H₂O[H₃PO₄]/ACN; IAS: 45/55, AS: 40/60) verwendet. Ersteres hatte chromatographische Gründe, da bei der jeweiligen Säurekonzentration die jeweils beste Trennung erfolgte. Die unterschiedlichen Mischungsverhältnisse wurden aus Gründen der Zeitersparnis – die AS würden bei 45/55 deutlich später eluieren – und somit des erhöhten Probendurchsatzes gewählt.

AS: Temperatur: 45 °C
Isokratisch: 0,075 % H₃PO₄/ACN = 40/60
Fluss: 10 mL/min

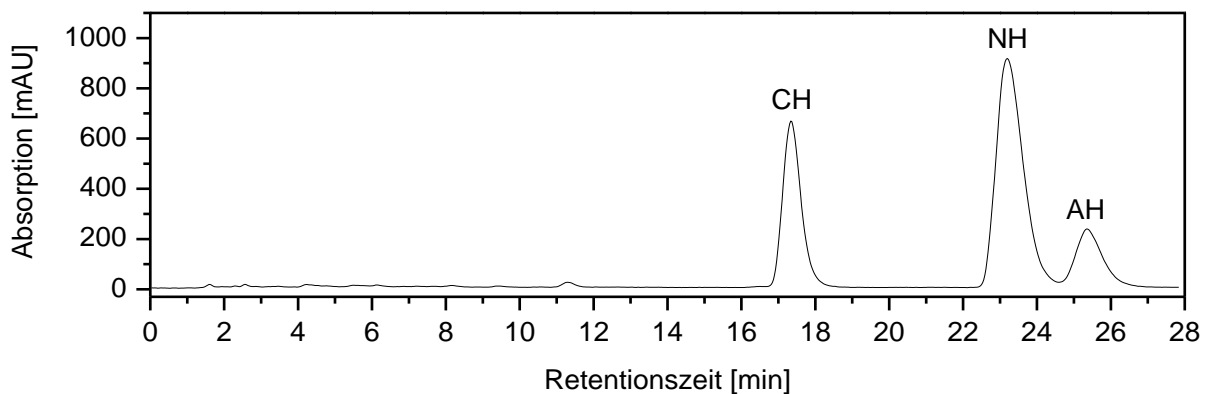


Abb. 4-10: HPLC Chromatogramm der präparativen AS-Trennung (UV: 290 nm), $c_{AS-pur} = 100 \text{ g/L} \hat{=} 89 \text{ g/L AS}$, 10 μL injiziert, Anlage 1, Säule 13, $T = 45 \text{ }^\circ\text{C}$, Fluss: 10 mL/min, mobile Phase: 0,075 % H₃PO₄/ACN = 40/60 (isokratisch, HPLC-Methode-3).

Bei der präparativen AS-Trennung konnten bis zu 2 mg AS aufgetragen werden, ohne dass es zu einer Verschlechterung der Trennung kam. Eine weitere Steigerung der Probenmenge erhöhte zwar den Durchsatz, ging allerdings auf Kosten der Auflösung, was sich insbesondere bei AH in der Reinheit der isolierten Fraktion negativ widerspiegelte. Daher wurde bevorzugt mit geringeren Mengen (bis zu 2 mg AS) gearbeitet, um so eine optimale Peaktrennung und folglich möglichst reine Fraktionen zu erhalten.

IAS: Temperatur: 45 °C

Isokratisch: 0,015 % H₃PO₄/ACN = 45/55

Fluss: 10 mL/min

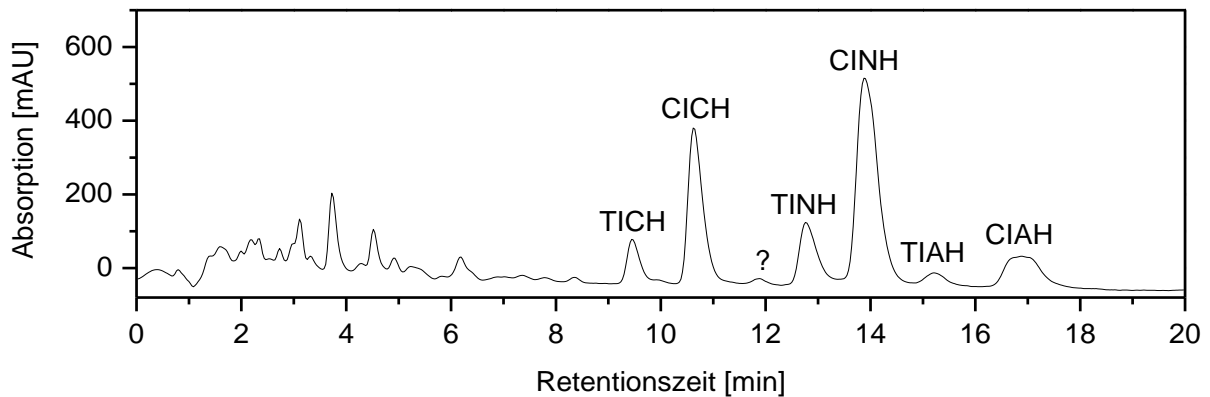


Abb. 4-11: HPLC Chromatogramm der präparativen IAS-Trennung (UV: 260 nm), $c_{Iso-90} = 10 \text{ g/L} \triangleq 9 \text{ g/L}$ IAS, 40 μL injiziert, Anlage 1, Säule 13, $T = 45 \text{ }^\circ\text{C}$, Fluss: 10 mL/min, mobile Phase: 0,015 % H₃PO₄/ACN = 45/55 (isokratisch, HPLC-Methode-4).

Die Peaks im vorderen Teil des Chromatogramms stellen Abbauprodukte der IAS in der zum Injektionszeitpunkt bereits fünf Monate alten *Iso-90*-Lösung dar. Bei der präparativen IAS-Trennung betrug die maximale Injektionsmenge 750 μg IAS. Eine weitere Erhöhung der Probenmenge führte wie bei den AS zu einer Verringerung der Auflösung, sodass die Fraktionen nicht mehr im Reinzustand isoliert werden konnten. Dabei wurde die maximale Probenmenge v.a. durch die geringen Selektivitätsfaktoren von TINH-CINH und CINH-TIAH limitiert. Im Vergleich zur präparativen IAS-Trennung durch VERZELE ET AL.^[140] (Abb. 4-4) konnte jedoch eine deutlich erhöhte Peakaufklärung erreicht werden. So konnte im Gegensatz zu oben genannter Trennung^[140] auch TIAH isoliert werden. Die drastische Reduzierung der Analysezeit (18 min anstatt 120 min^[140]) hing mit dem geringeren Säulendurchmesser (10 mm anstatt 22 mm^[140]) zusammen. Dies allerdings ging auf Kosten der Injektionsmenge und somit des Probendurchsatzes.

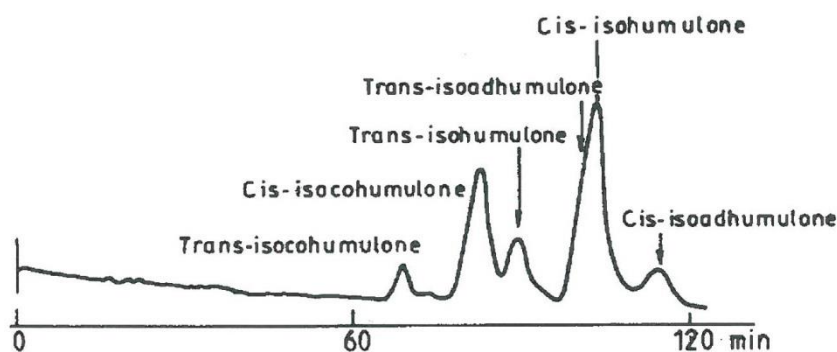


Abb. 4-12: Vergleichschromatogramm einer präparativen IAS-Trennung nach VERZELE ET AL.^[140]; UV: 270 nm, ACN/H₂O/H₃PO₄ = 50/50/2 + 6 g/L MgSO₄, Fluss: 10 mL/min, Säule: RoSil-C₁₈ (RSL) 10 μm (250 mm \times 22 mm, RSL, Eke, Belgien).

4.3 Chirale HPLC

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Methodenentwicklung der chiralen HPLC von AS und IAS beschrieben. Die chiralen Selektoren der getesteten Säulen (Säule 14 – Säule 22) sind dabei im Anhang 3 als Übersicht dargestellt.

Bei Säule 14 (Macherey-Nagel, Nucleosil-Chiral-1 120-5, 250 × 4,0 mm) handelte es sich um eine Liganden-Austausch-Technologie basierte Säule. Das Basismaterial dieser Säule war Kieselgel und als chiraler Selektor fungierte L-Hydroxyprolin. Die Hauptwechselwirkung, auf der die chirale Erkennung dieser Säule basiert, ist die Bildung von Cu(II)-Komplexen mit den chiralen Analyten. Dabei ist die Verwendung von wässriger Cu(II)-Lösung als mobile Phase nötig.^[163] Wie bereits im theoretischen Teil erklärt, bewirken dabei die Stabilitätsunterschiede der diastereomeren Komplexe die chromatographische Trennung.^[163] Die in der Literatur angegebene empfohlene Anwendung für diese Säule bezieht sich v.a. auf Enantiomere mit zwei polaren funktionellen Gruppen im passenden Abstand, wie z.B. α -Aminosäuren oder α -Hydroxycarbonsäuren.^[163] Theoretisch trifft dieser Sachverhalt sowohl auf Humulon als auch auf Isohumulon zu, da sich beide Male an jeweils zwei benachbarten C-Atomen Sauerstoffgruppen befinden. Da dabei jedes Mal ein Stereozentrum (AS: C-6-Atom, IAS: C-4-Atom) involviert ist, sollte theoretisch eine Enantiomerentrennung möglich sein. Zunächst wurden mobile Phasen getestet, welche zu 100 % aus wässriger CuSO₄·5H₂O-Lösung bestanden. Dabei wurden die CuSO₄-Konzentrationen im Bereich von 0,5 mM – 5,0 mM variiert und deren Einfluss auf die chromatographische Trennung ermittelt. Ebenso wurde mittels verschiedener Mischungen aus 1 mM CuSO₄·5H₂O in ddH₂O und MeOH (80/20 – 50/50) ein eventueller Einfluss von organischen Lösemitteln getestet. Insgesamt entstand bei keinem der mit Säule 14 durchgeführten Tests ein Chromatogramm, bei dem ein eindeutig zuordenbarer IAS- bzw. AS-Peak, geschweige denn eine Enantiomerentrennung, zu sehen war. Daher wurde letztlich die Säule 14 für die Enantiomerentrennung von AS bzw. IAS als ungeeignet eingestuft.

Säule 15 (Macherey-Nagel, Nucleocel Alpha-RP S 5, 250 × 4,6 mm) basierte auf der Polysaccharid-Derivat-Technologie, wobei als chiraler Selektor Amylose-tris(3,5-Dimethylphenylcarbammat) fungierte. Als mobile Phasen wurden Mischungen aus angesäuertem H₂O (H₃PO₄) und ACN verwendet, wobei sowohl die Säurekonzentration (0 %, 0,025 %, 0,075 %) als auch das Mischungsverhältnis (60/40 – 45/55) variiert wurde. Bei diesen Bedingungen wurden Enantiomerentrennungen bei rac-CH und rac-NH erkennbar. Allerdings konnten die jeweiligen (S)- und (R)-Formen nicht basisliniengetrennt werden. S/R-CH und S/R-NH konnten gut voneinander getrennt werden, während zwischen NH und AN keinerlei Trennung

erfolgte. Insgesamt wurde deutlich, dass eine bessere Trennung zu Stande kam, je höher die Säurekonzentration war. Diese war allerdings durch den von der Säule minimal tolerierten pH-Wert von 2,0 ($\pm 0,075\%$ H_3PO_4) limitiert. Logischerweise führten höhere H_2O -Anteile zu besseren Trennungen. Bei deutlich längeren Retentionszeiten brachte dies allerdings nur relativ geringe Verbesserungen hinsichtlich der Auflösung, sodass die weiter unten aufgeführten Bedingungen nicht weiter optimiert werden konnten. In Abb. 4-13 (oben) ist das entsprechende Chromatogramm dargestellt. Ein Zusatz von MeOH bzw. EtOH (10 – 20 %) zur mobilen Phase (als dritte Komponente neben ACN und H_2O - H_3PO_4) führte zu einer deutlich schlechteren Trennung. Rac-IAS konnten ebenfalls mittels Säule 15 getrennt werden. Allerdings waren diese großteils nur angetrennt oder als Schulterpeaks zu sehen, weshalb sie schwer zu identifizieren waren. Mehr als sieben IAS (markiert mit «|») waren hierbei nicht zu erkennen (Abb. 4-13, unten).

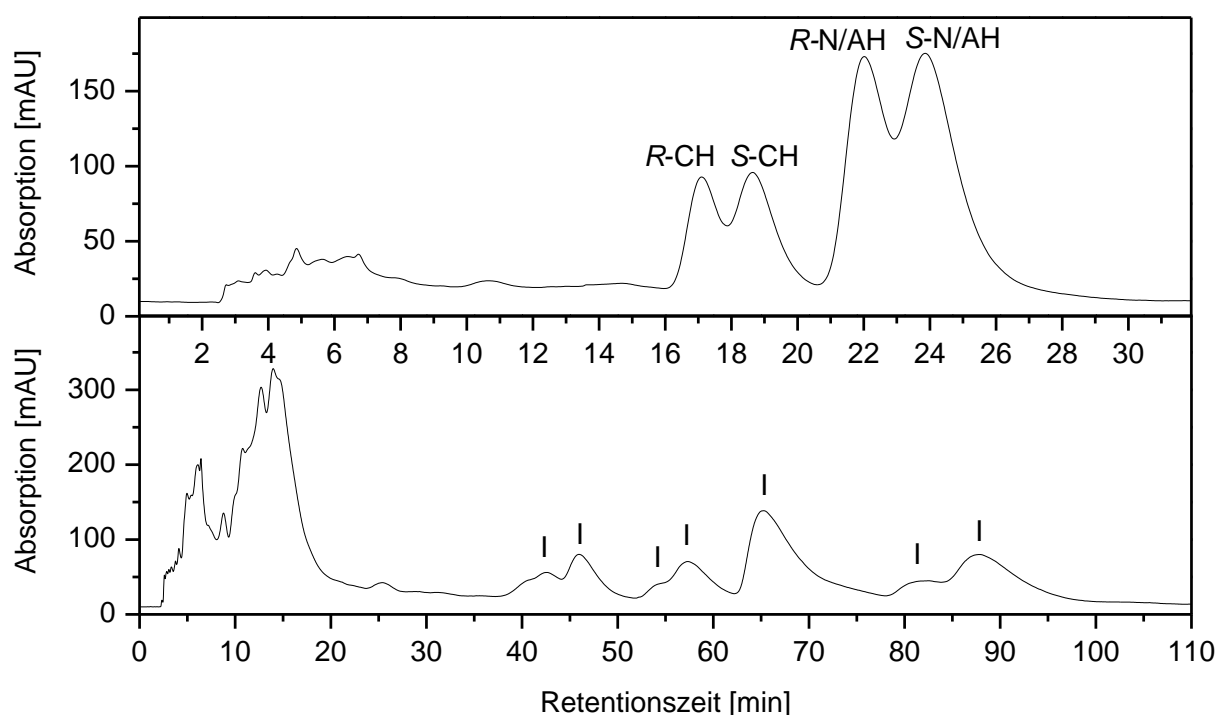


Abb. 4-13: HPLC Chromatogramme von rac-AS (oben, UV: 290 nm) und rac-IAS (unten, UV: 260 nm), Anlage 1, Säule 15, T = 35 °C, Fluss: 1 mL/min, mobile Phasen: rac-AS: 0,075 % H_3PO_4 /ACN = 50/50 (isokratisch), rac-IAS: 0,075 % H_3PO_4 /ACN = 60/40 (isokratisch).

Auch die Säule 16 (Knauer, Europak 01 5, 250 × 4,6 mm) basierte auf der Polysaccharid-Derivat-Technologie und trug als chiralen Selektor Amylose-tris(3,5-Dimethylphenyl-carbammat). Nach Variation des pH-Werts (2,0 – 2,7) bzw. des ACN-Anteils (35 – 60 %) der mobilen Phase ließ sich folgende Erkenntnis feststellen: Wie sich bereits bei Säule 15 angedeutet hatte, sind Polysaccharid-Derivat basierte chirale HPLC-Säulen in der Lage, die (künstlich) racemisierten AS aufzutrennen. So gelang mittels Säule 16 und dem geeigneten Mischungsverhältnis der mobilen Phase (0,075 % H_3PO_4 /ACN = 60/40) sogar eine Basislini-

entrennung der Enantiomerenpaare von *R*-CH und *S*-CH bzw. *R*-N/AH und *S*-N/AH. Eine Trennung von NH und AH war jedoch auch hier nicht möglich (Abb. 4-15, oben). Die einzelnen Enantiomere wurden mit Hilfe eines Vergleichschromatogramms von nat-AS (enthielten nur die (*S*)-Formen) identifiziert. Dass es sich dabei jeweils um ein Enantiomerenpaar handelte, wurde durch Vergleich der UV-Spektren bewiesen (vgl. Abb. 4-20, S. 63). Mit Säule 16 gelang ebenso wie mit Säule 15 eine Trennung der rac-IAS. Allerdings auch hier nicht basisliniengenrennt (Abb. 4-15, unten). Auch hier erfolgte die Peakzuordnung mittels eines Vergleichschromatogramms (*Iso-90* \cong nat-IAS) sowie eines Vergleichs der UV-Spektren. Bei der Peakzuordnung bedeutete die Ziffer 1 (*S*)-Konfiguration am C-4-Atom und die Ziffer 2 (*R*)-Konfiguration am C-4-Atom (vgl. Abb. 4-14). Dabei wurde die Ziffernreihenfolge 1 und 2 aus folgendem Grund gewählt: (*S*)-Konfiguration am C-4-Atom entsteht bei der Isomerisierung von (natürlichem) (*S*)-Humulon, während die (*R*)-Konfiguration am C-4-Atom bei der Isomerisierung von (*R*)-Humulon entsteht.

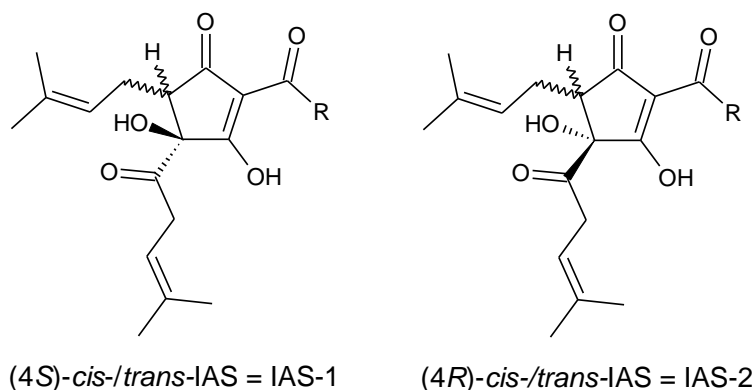


Abb. 4-14: Strukturformeln von IAS-1 und IAS-2 bei rac-IAS.

Da man auf Säule 16 laut Hersteller auch Normalphasen-HPLC (NP-HPLC) betreiben konnte, wurde trotz der relativ guten Ergebnisse bei der RP-HPLC auch der NP-Modus getestet. So wurden diverse Hexan/2-Propanol-Mischungen (100/0 – 50/50) mit unterschiedlichen TFA-Konzentrationen (0 %, 0,1 %, 0,5 %) hinsichtlich ihres Trennungsvermögens von rac-AS untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die NP-Bedingungen allesamt deutlich schlechtere Ergebnisse lieferten, als die zuvor beschriebenen RP-Bedingungen. Somit wurde wieder auf den RP-HPLC-Modus umgestellt. Leider wurde die Säule 16 dadurch scheinbar derart irreversibel beschädigt, dass die im Weiteren mit dieser Säule durchgeführten Messungen deutlich schlechtere Trennungen (breitere Peaks, geringere Auflösung) ergaben als vor der NP-Umstellung. Trotzdem mussten diverse Messungen bis zum Erhalt einer neuen geeigneten Säule mit der „beschädigten“ Säule 16 durchgeführt werden.

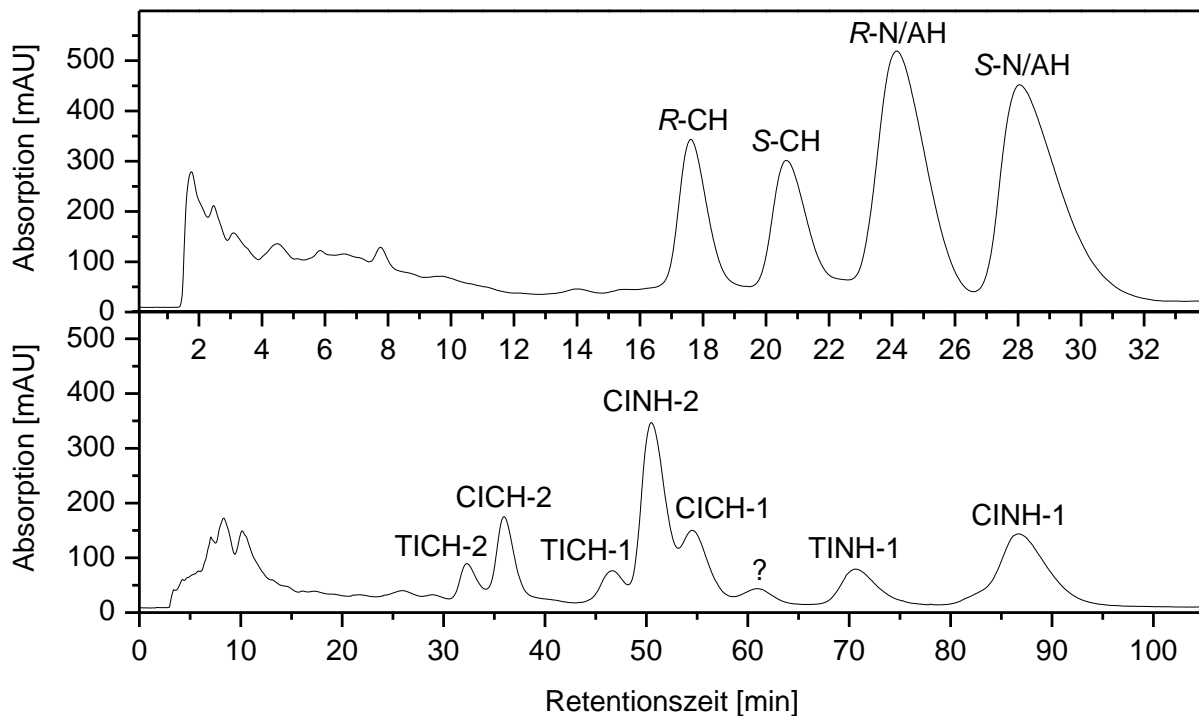


Abb. 4-15: HPLC Chromatogramme von rac-AS (oben, UV: 290 nm) und rac-IAS (unten, UV: 260 nm), Anlage 1, Säule 16, T = 35 °C, Fluss: 2 mL/min, mobile Phasen: rac-AS: 0,025 % H₃PO₄/ACN = 60/40 (isokratisch), rac-IAS: 0,075 % H₃PO₄/ACN = 60/40 (isokratisch); zu rac-IAS: 1 \triangle (S)-Konfiguration am C-4-Atom der IAS, 2 \triangle (R)-Konfiguration am C-4-Atom der IAS.

Die ebenfalls Polysaccharid-Derivat basierte und Amylose-tris(3,5-Dimethylphenylcarbammat) modifizierte Säule 17 (Daicel, Chiralpak-IA 5, 250 × 4,6 mm) brachte deutliche Verbesserungen hinsichtlich der Trennung von rac-AS. So konnten durch Variation des pH-Werts sowie des ACN-Anteils relativ scharfe Peaks und eine akzeptable Auflösung (*S/R* nicht komplett basisliniengetrennt) bei deutlich kürzeren Retentionszeiten im Vergleich zu Säule 15 erreicht werden. Allerdings fand auch hier keine Trennung von NH und AH statt. Die vom Hersteller vorgeschlagene Verwendung von HCOOH statt H₃PO₄ brachte keine Verbesserung hinsichtlich der Trennung, wobei jedoch eine leichte Verringerung der Retentionszeiten erkennbar war. Eine mit Säule 16 vergleichbar gute IAS-Trennung konnte mit Säule 17 nicht erreicht werden. Ebenso wie mit Säule 16 wurde auch mit Säule 17 die AS-Trennung im NP-Modus (Hexan 80 – 100 %, 2-Propanol 0 – 20 %, TFA 0 – 0,5 %) getestet, wobei jedoch keine guten Trennergebnisse erzielt werden konnten. Da dies auch bei Säule 16 der Fall war, konnte darauf geschlossen werden, dass sich der NP-Modus allgemein nicht für die AS-Trennung (CH, NH, AH), geschweige denn für die Enantiomerentrennung (*S/R*), eignete. In der folgenden Abb. 4-16 ist das Chromatogramm der rac-AS-Trennung mittels Säule 17 zu sehen.

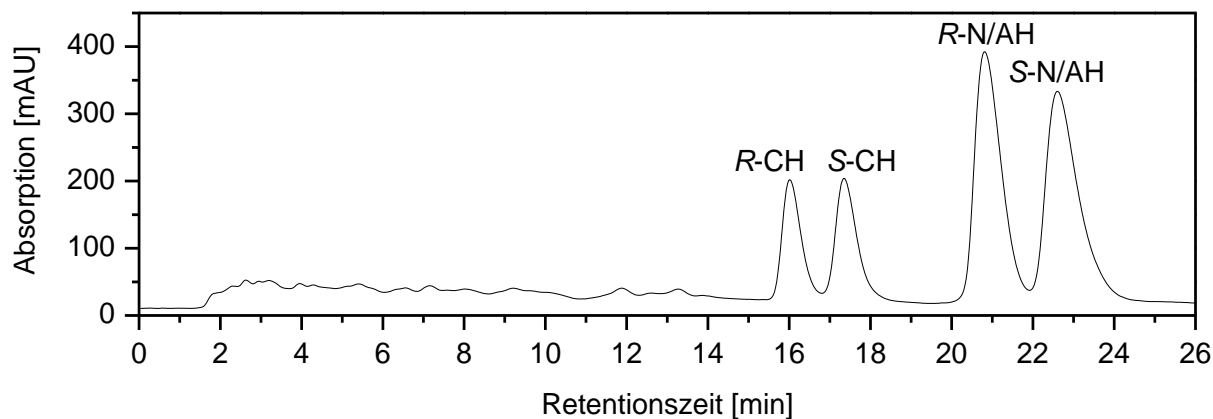


Abb. 4-16: HPLC Chromatogramm von rac-AS (UV: 290 nm), Anlage 1, Säule 17, T = 35 °C, Fluss: 2 mL/min, mobile Phase: 0,075 % H₃PO₄/ACN = 55/45 (isokratisch).

Säule 18 (Daicel, Chiralpak-IB 5, 250 × 4,6 mm) entsprach Säule 17 mit dem einzigen Unterschied, dass es sich beim chiralen Selektor um Cellulose-tris(3,5-Dimethylphenylcarbamate) handelte. Sowohl die AS- als auch die IAS-Trennungen waren allesamt deutlich schlechter im Vergleich zur Amylose-basierten Säule 17.

Bei der wiederum Polysaccharid-Derivat basierten Säule 19 (Daicel, Chiralpak-IC 5, 250 × 4,6 mm) fungierte als chiraler Selektor Cellulose-tris(3,5-Dichlorphenylcarbamate). Bei der rac-AS-Trennung wurden sowohl mit H₃PO₄ als auch mit HCOOH deutlich schlechtere Enantiomertrennungen im Vergleich zu Säule 17 erhalten. Allerdings konnte mit der Säule 19 eine relativ gute rac-IAS-Trennung erzielt werden. Durch Verwendung von HCOOH statt H₃PO₄ beim Ansäuern der mobilen Phase und dem richtigen Mischungsverhältnis von H₂O und ACN konnten erstmals 9 der theoretisch zu erwartenden 16 rac-IAS detektiert werden. Ein weiterer Grund für die Steigerung der Auflösung war eine Temperaturerhöhung auf 40 °C, sodass eine weitere IAS (TINH-1) als Schulterpeak zu sehen war (insgesamt zehn IAS). Eine vom Hersteller empfohlene Temperaturniedrigung zur Steigerung der Selektivitätsfaktoren konnte nicht beobachtet werden. Bei der Variation der Flussgeschwindigkeit (1,0 – 2,5 mL/min) stellte sich 2,0 mL/min als die geeignetste heraus. Ein Test mit EtOH statt ACN bestätigte die bereits weiter oben festgestellte These, dass zur Trennung von IAS (und AS) unbedingt eine Mischung aus (angesäuertem) H₂O und ACN nötig ist. Im Folgenden ist das Chromatogramm einer entsprechenden rac-IAS-Trennung abgebildet (Abb. 4-17). Die Peakzuordnung erfolgte mittels eines Vergleichschromatogramms von nat-IAS (*Iso-90*) sowie durch Vergleich der UV-Spektren. Die Bezifferung der einzelnen IAS erfolgte gemäß der weiter oben beschriebenen Vorgehensweise (s. S. 58, vgl. Abb. 4-14).

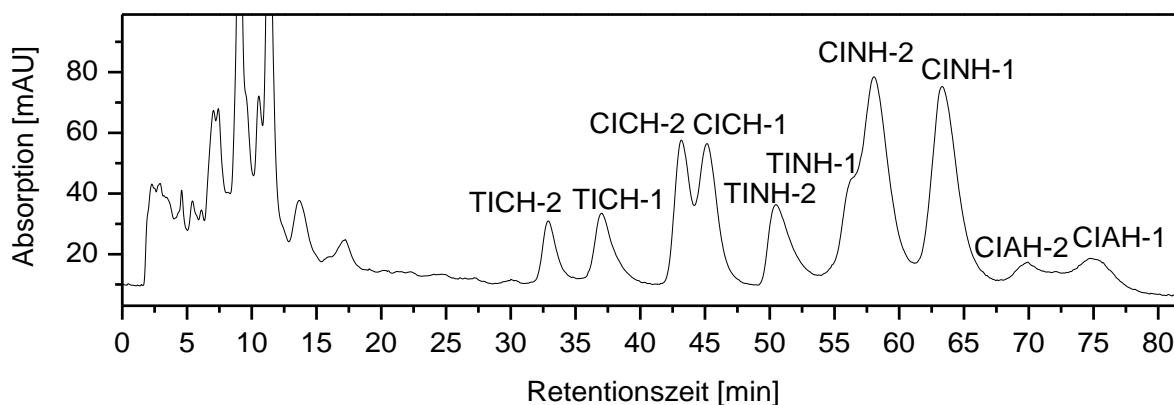


Abb. 4-17: HPLC Chromatogramm von rac-IAS (UV: 260 nm), Anlage 1, Säule 19, T = 40 °C, Fluss: 2 mL/min, mobile Phase: 2,5 % HCOOH/ACN = 72/28 (isokratisch).

Die Säule 20 (Phenomenex, Lux Amylose-2 1000-5, 250 × 4,6 mm) war ebenfalls Polysaccharid-Derivat basiert und trug als chiralen Selektor Amylose-tris(5-Chlor-2-Methylphenyl-carbammat). Unter den chiralen Säulen gelang hiermit erstmals eine Antrennung von NH und AH, was einen erheblichen Fortschritt gegenüber den bisher beschriebenen chiralen Säulen bedeutete. Allerdings gelang hier, auch bei relativ hohem H₂O-Anteil, noch keine Basislinientrennung von NH und AH. Durch Variation des pH-Wertes (2,0 – 3,0), der Säure (H₃PO₄, H₃CCOOH) und des ACN-Anteils (30 – 40 %) konnten die am besten geeigneten Bedingungen für die rac-AS-Trennung ermittelt werden. Das entsprechende Chromatogramm ist in Abb. 4-18 aufgeführt. Eine Temperaturerhöhung von 40 °C auf 50 °C hatte eine Retentionszeitenverkürzung um 20 % zur Folge. Allerdings ging diese deutlich auf Kosten der Enantioselektivität der Säule. Auf der anderen Seite wurden bei einer Temperaturerniedrigung auf 30 °C um 15 % längere Retentionszeiten erhalten. Außerdem wurde die Enantioselektivität zwar erhöht, jedoch die Trennung von NH und AH minimiert. Somit stellte eine Temperatur von 40 °C einen guten Kompromiss zwischen der S/R- und NH/AH-Trennung dar. Die rac-IAS-Trennung mit Säule 20 ergab im Vergleich mit Säule 19 etwas schlechtere Ergebnisse, sodass hierbei auf eine weitere Ausführung verzichtet wird.

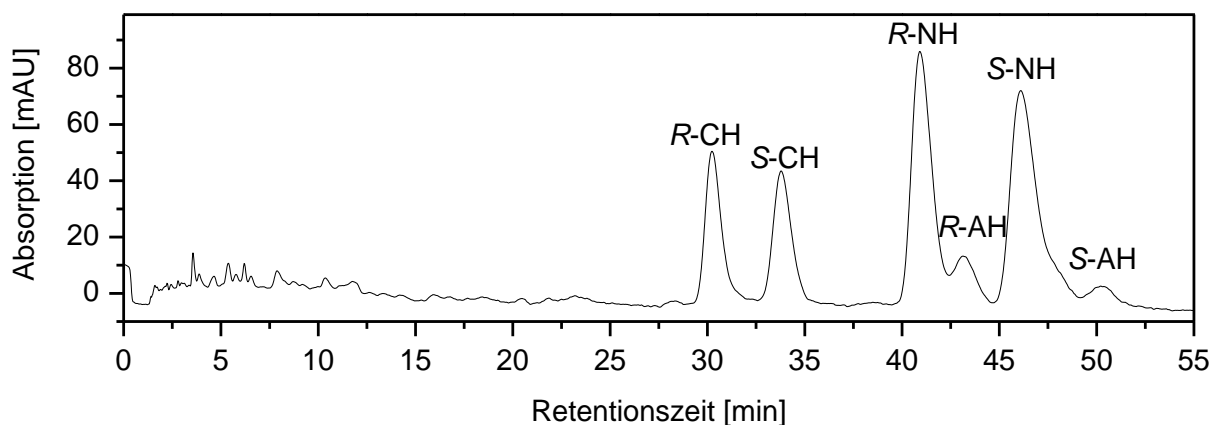


Abb. 4-18: HPLC Chromatogramm von rac-AS (UV: 290 nm), Anlage 1, Säule 20, T = 40 °C, Fluss: 2 mL/min, mobile Phase: 0,075 % H₃PO₄/ACN = 65/35 (isokratisch).

Säule 21 (Phenomenex, Lux Cellulose-2 1000-5, 250 × 4,6 mm) mit dem chiralen Selektor Cellulose-tris(3-Chlor-4-Methylphenylcarbamat) ergab sowohl bei der rac-AS- als auch bei der rac-IAS-Trennung deutlich schlechtere Ergebnisse als Säule 20 bzw. Säule 19, sodass diese Säule als ungeeignet eingestuft wurde.

Bei Säule 22 (Phenomenex, Lux Cellulose-3 1000-5, 250 × 4,6 mm) fungierte als chiraler Selektor das Polysaccharid-Derivat Cellulose-tris(4-Methylbenzoat). Mittels dieser Säule war es erstmals möglich, sowohl die (*S*)- und (*R*)-Enantiomere von (\pm)-Humulon als auch die drei unterschiedlichen Humulone (CH, NH und AH) voneinander zu trennen. Damit stellte sie die optimale Säule zur chiralen Trennung von rac-AS dar. So wurden scharfe Peaks bei relativ kurzen Retentionszeiten erhalten. Da AH neben dem C-6-Atom des Rings auch in seiner Carbonyl-Seitenkette ein Stereozentrum (C-2') besitzt, liegt dieses in vier stereoisomeren Formen vor (AH-1, AH-2, AH-3 und AH-4; vgl. Abb. 4-40, S. 90). Allerdings konnten bei der simultanen Trennung von rac-CH, rac-NH und rac-AH nur drei AH-Peaks aufgelöst werden. Dadurch waren im Chromatogramm von rac-AS (Abb. 4-19, oben) insgesamt sieben Peaks zu sehen. Auf das Vorhandensein von zwei Stereozentren im AH und die daraus folgende Existenz von insgesamt vier AHs wird weiter unten im Text nochmals genauer eingegangen (s. Kap. 4.5.1, S. 90). Auch die Trennung von rac-IAS brachte mit Säule 22 die besten Ergebnisse. Durch Variation verschiedener Parameter (pH-Wert: 1,85 – 7,0, verwendete Säure: H₃PO₄, TFA, ACN-Anteil: 30 – 40 %, Flussgeschwindigkeit: 1 – 2 mL/min, Säulentemperatur: 30 – 50 °C) konnten die optimalen Trennungsbedingungen empirisch ermittelt werden. Sowohl bei rac-AS als auch bei rac-IAS wurden die besten Ergebnisse bei einer Temperatur von 45 °C und einer Flussgeschwindigkeit von 2,0 mL/min erzielt. Die ACN-Anteile betrugen 40 % (rac-AS) bzw. 30 % (rac-IAS), während die wässrige Phase in beiden Fällen aus 0,075 % H₃PO₄ bestand. Die entsprechenden Chromatogramme sind in Abb. 4-19 zu sehen. Die Peakzuordnung erfolgte anhand von Vergleichschromatogrammen von nat-AS (*AS-pur*) bzw. nat-IAS (*Iso-90*) sowie mittels Vergleich der UV-Spektren (Abb. 4-20). Hierbei zeigten die (*S*)- und (*R*)-Formen von CH und NH bzw. AH-1, AH-2 und AH-3 jeweils einen identischen Kurvenverlauf, während die Intensitäten konzentrationsbedingt (*R* > *S*, vgl. Chromatogramm, Abb. 4-19, oben) kleine Unterschiede aufwiesen. Bei „S-AH“ handelt es sich um das im natürlichen Hopfen hauptsächlich vorkommende (6*S*,2'*S*)-AH^[61]. Bei den durch die künstliche Racemisierung entstandenen „AH-2“ und „AH-3“ (sowie das im Chromatogramm nicht aufgelöste „AH-4“) waren die genauen Konfigurationen weder am C-6- noch am C-2'-Atom eindeutig bestimmbar. Bei rac-IAS konnten die Peaks 1 – 10 eindeutig zugeordnet werden. Auch die restlichen fünf Peaks (11 – 15), die mit anderen Peaks coeluierten, konnten anhand von weiteren Messungen (s. Kap. 4.4.1) eindeutig zugewiesen werden. Einzig CIAH-4 konnte nicht identifiziert werden.

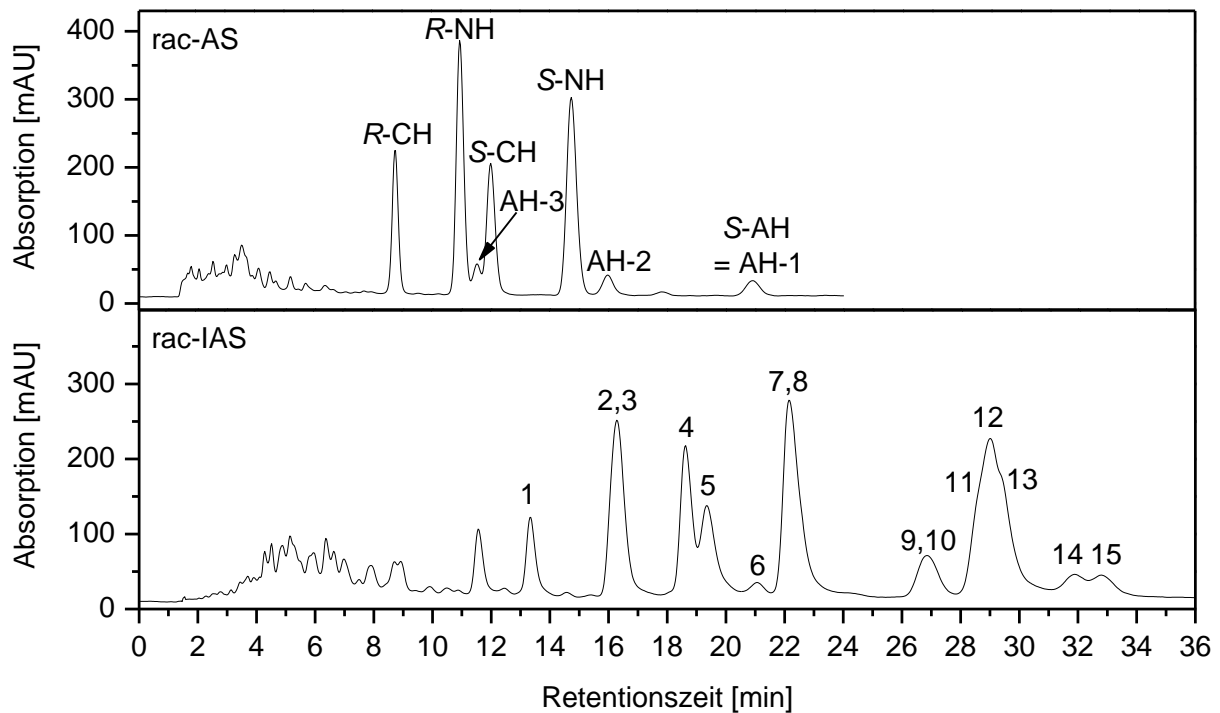


Abb. 4-19: HPLC Chromatogramme von rac-AS (oben, UV: 290 nm) und rac-IAS (unten, UV: 260 nm), Anlage 1, Säule 22, T = 45 °C, Fluss: 2 mL/min, mobile Phasen: rac-AS: 0,075 % H₃PO₄/ACN = 60/40 (isokratisch, HPLC-Methode-5), rac-IAS: 0,075 % H₃PO₄/ACN = 70/30 (isokratisch, HPLC-Methode-6), zu rac-AS: AH-2 und AH-3: durch die künstliche Racemisierung entstandene AHs (Konfigurationen am C-6- und C-2'-Atom nicht genau zu bestimmen); zu rac-IAS: 1: TICH-2, 2: TICH-1, 3: CICH-2, 4: CICH-1, 5: TINH-2, 6: TIAH-4, 7: CINH-2, 8: TIAH-3, 9: CIAH-3, 10: TIAH-2, 11: TINH-1, 12: CINH-1, 13: TIAH-1, 14: CIAH-2, 15: CIAH-1.

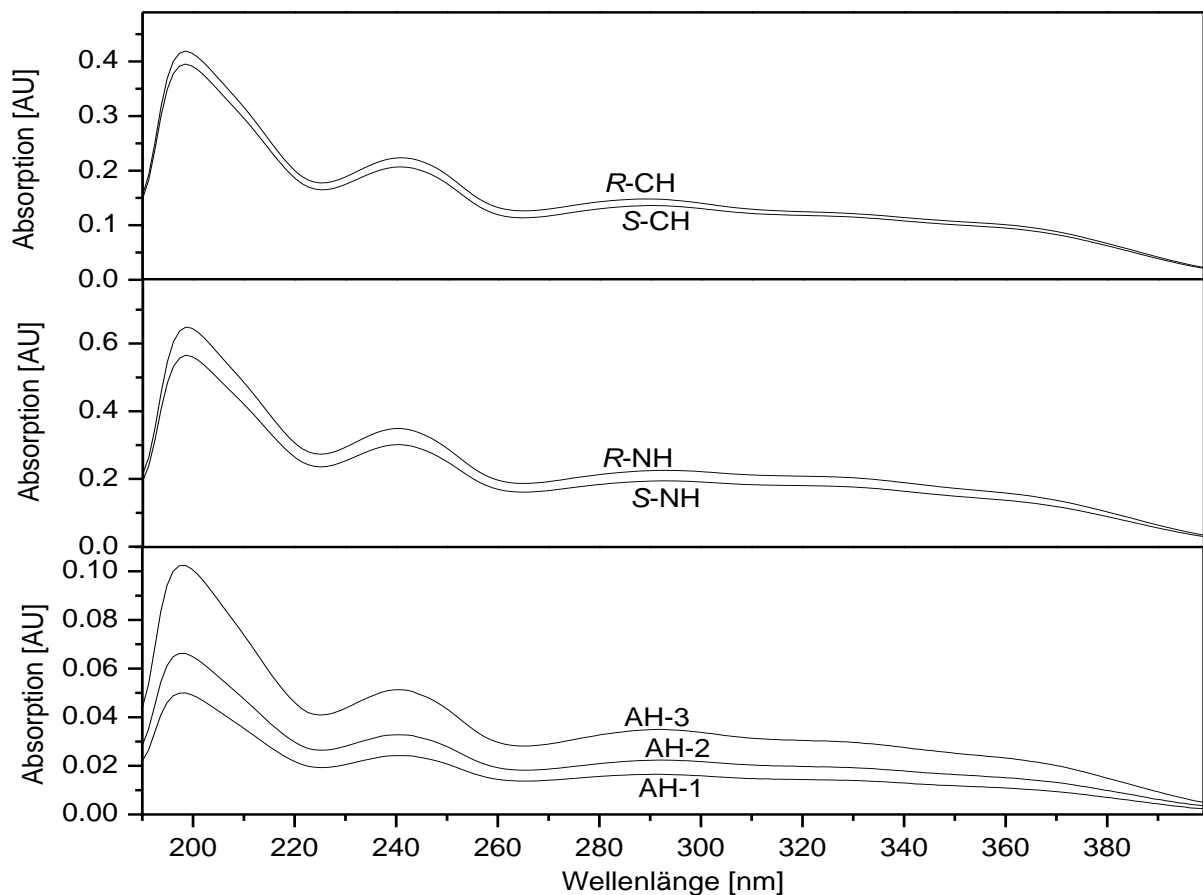


Abb. 4-20: UV-Spektren von S/R-CH, S/R-NH und AH-1/-2/-3 in 0,075 % H₃PO₄/ACN = 60/40.

In den folgenden zwei Tabellen sind die Werte der drei wichtigen Kenngrößen (k' , α und R_s) der chromatographischen rac-AS- bzw. rac-IAS-Trennung mittels Säule 22 aufgeführt. α und R_s bezieht sich dabei jeweils auf das entsprechende Enantiomerenpaar («*R-S*» bei rac-AS bzw. «1-2» bei rac-IAS). Sowohl die α -Werte (1,40 und 1,44 bei AS; 1,15 – 1,53 bei IAS) als auch die R_s -Werte (6,81 und 7,02 bei AS; 2,55 – 7,88 bei IAS) zeugen von einer exzellenten Basislinientrennung. Betrachtet man die Werte der Enantiomerenpaare separat (z.B. *R-CH*, *S-CH*: $\alpha = 1,44$ und $R_s = 7,02$), wird deutlich, dass die chromatographische Trennung durch Erhöhung des organischen Anteils in der mobilen Phase sogar noch beschleunigt hätte werden können. Allerdings war dies aufgrund der gewünschten simultanen Messung aller (iso-)Humulon-Homologen und dem damit einhergehenden Vorhandensein weiterer Substanzen im Chromatogramm nicht möglich. So ließe sich z.B. das *S-CH* ($k' = 7,02$) bei einer weiteren Erhöhung des organischen Anteils nicht mehr vom *R-NH* ($k' = 6,32$) trennen. Auch das zwischen *R-NH* und *S-CH* eluierende AH-3 ($k' = 6,71$) würde in diesem Fall nicht mehr aufgelöst detektiert werden können.

Tab. 4-4: k' , α und R_s bei der chromatographischen rac-AS-Trennung mittels Säule 22 ($t_0 = 1,5$ min).

AS	k'	$\alpha_{(S-R)}$	$R_{s(S-R)}$
<i>R-CH</i>	4,86	1,44	7,02
<i>S-CH</i>	7,02		
<i>R-NH</i>	6,32	1,40	6,81
<i>S-NH</i>	8,84		
AH-3*	6,71	---	---
AH-2*	9,66		
(AH-1) S-AH*	12,93		

* Bei AH konnten die vier stereoisomeren Formen den Peaks AH-1 – AH-3(4) nicht exakt zugewiesen werden (vgl. S. 90). Da das Hauptaugenmerk auf der Enantiomertrennung lag, wurde deshalb hier auf α und R_s verzichtet.

Tab. 4-5: k' , α und R_s bei der chromatographischen rac-IAS-Trennung mittels Säule 22 ($t_0 = 1,5$ min).

IAS	k'^{**}	$\alpha_{(1-2)}^{**}$	$R_{s(1-2)}^{**}$
TICH-2	7,00	1,24	3,66
TICH-1	8,66		
CICH-2	9,22	1,15	2,55
CICH-1	10,64		

IAS	k'^{**}	$\alpha_{(1-2)}^{**}$	$R_{S(1-2)}^{**}$
TINH-2	11,44	1,53	7,88
TINH-1	17,46		
CINH-2	13,37	1,34	5,34
CINH-1	17,88		
TIAH-4*	12,97	---	---
TIAH-3*	13,70		
TIAH-2*	16,96		
TIAH-1*	18,65		
CIAH-4*	---	---	---
CIAH-3*	16,81		
CIAH-2*	20,20		
CIAH-1*	20,79		

* Bei IAH konnten die jeweils vier stereoisomeren Formen den Peaks TIAH-1 – TIAH-4 bzw. CIAH-1 – CIAH-4 nicht exakt zugewiesen werden (vgl. AH). Da das Hauptaugenmerk auf der Enantiomertrennung lag, wurde deshalb hier auf α und R_S verzichtet.

** Da in Abb. 4-19 die Peaks nicht alle einzeln aufgelöst sind, stammen die hier ermittelten Werte aus den Chromatogrammen der chirale Trennung von isolierten rac-IAS-Fractionen (Abb. 4-23).

Für die MS-Detektion (Anlage 2) musste statt H_3PO_4 eine leichtflüchtige organische Säure verwendet werden. Wie bei der RP-HPLC (Säule 11) lieferte auch bei der chiralen HPLC (Säule 22) TFA die besten Ergebnisse (HPLC-Methode-9, Tab. 6-4). In der folgenden Abb. 4-21 ist das Chromatogramm der rac-AS-Trennung mittels Säule 22 zu sehen. IAS und damit auch rac-IAS konnten auf Säule 22 mit TFA als mobile-Phase-Modifier nicht ausreichend getrennt werden. Dadurch war, im Gegensatz zu den AS-Enantiomeren, keine massenspektrometrische Detektion der separierten IAS-Enantiomere (IAS-1 und IAS-2) möglich.

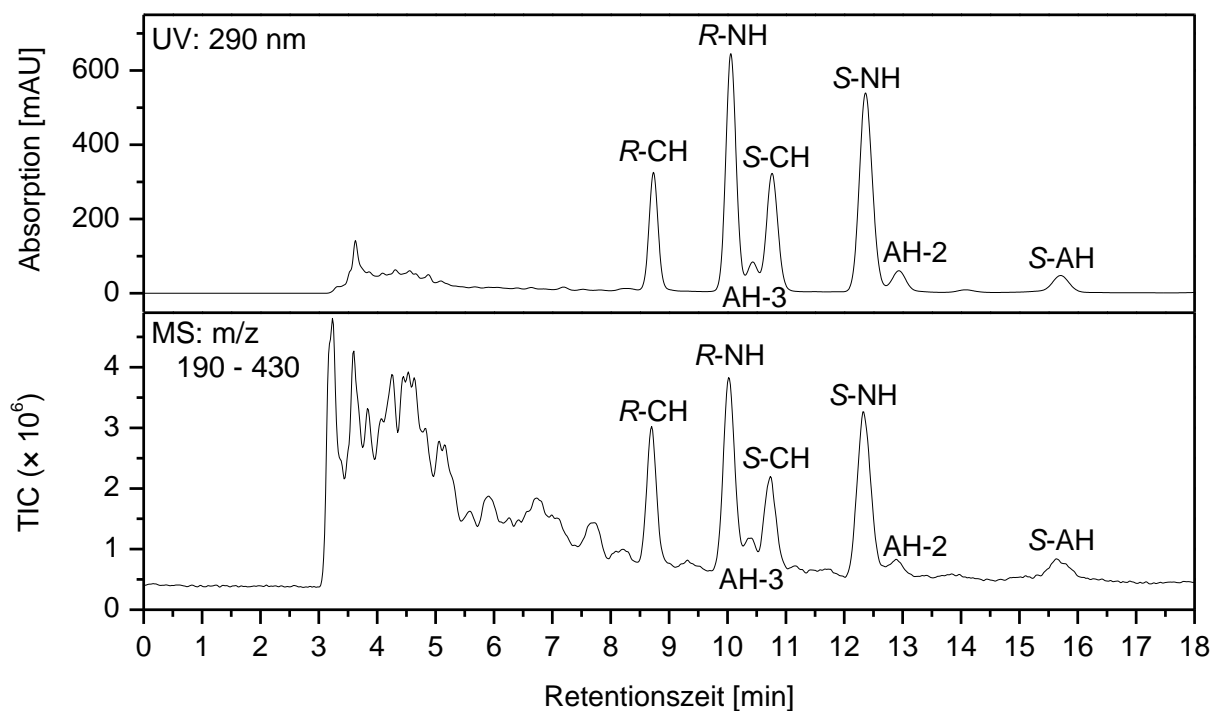


Abb. 4-21: HPLC Chromatogramm von rac-AS; oben: UV-Detektion, unten: MS-Detektion; Anlage 2, Säule 22, T = 45 °C, Fluss: 1 mL/min, mobile Phase: 0,3 % TFA/ACN = 52/48 (isokratisch, HPLC-Methode-9).

4.4 Isomerisierung von Humulon zu Isohumulon

4.4.1 Isomerisierung von racemisiertem Humulon (rac-AS) zu rac-IAS

Es konnten trotz intensiver Literaturrecherchen keine Informationen darüber gefunden werden, ob bereits in der Vergangenheit racemisierte AS einer Isomerisierung unterzogen wurden. In der vorliegenden Forschungsarbeit wurde daher zum ersten Mal der Versuch unternommen, racemisiertes Humulon zu isomerisieren, um so racemisierte IAS zu erhalten. Zwar dürfte es chemisch gesehen bei der Isomerisierung von (*R*)- bzw. (*S*)-Humulon keine Unterschiede geben, jedoch konnten nur auf diese Weise racemisierte IAS für die spätere Untersuchung der einzelnen IAS-Enantiomere (jeweils IAS-1 und IAS-2 bei ICH und INH bzw. IAS-1 – IAS-4 bei AH) hinsichtlich ihrer eventuellen Unterschiede hergestellt werden. Wie in Abb. 4-19 (unten) und Abb. 4-22 zu sehen ist, konnte die Isomerisierung von «rac-AS» zu «rac-IAS» in einem MeOH-H₂O-NaOH-Gemisch in Gegenwart des als Katalysator dienenden MgCl₂·6H₂O (Kap. 6.5.2) erfolgreich durchgeführt werden. Auf der RP-C18-Säule (Säule 11) waren erwartungsgemäß sechs Peaks (keine Enantiomerentrennung) zu sehen (Abb. 4-22), während mittels der chiralen Säule 22 eine Auftrennung der jeweiligen IAS-Enantiomere erfolgte (Abb. 4-19, unten). Die Isomerisierung ergab einen Umsatz (U) von 78,6 % und folgende C/T:

$C/T_{(ICH)}$: 2,32

$C/T_{(INH)}$: 2,46

$C/T_{(IAH)}$: 3,13

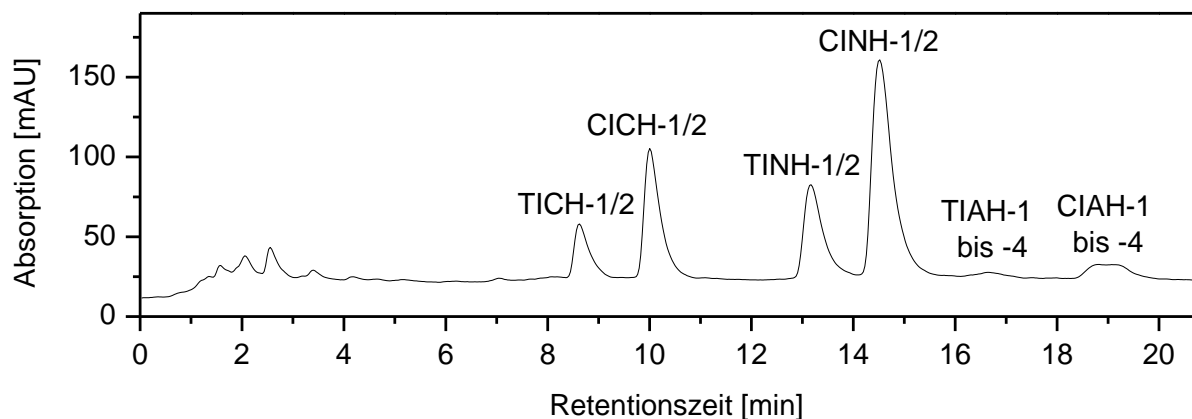


Abb. 4-22: Isomerisierung von «rac-AS» zu «rac-IAS».; RP-HPLC: Säule 11, HPLC-Methode-2*.

Theoretisch sollten bei der Isomerisierung von rac-AS insgesamt 16 IAS (vier INHs: (4*S*,5*R*)-INH, (4*S*,5*S*)-INH, (4*R*,5*S*)-INH, (4*R*,5*R*)-INH; vier ICHs: (4*S*,5*R*)-ICH, (4*S*,5*S*)-ICH, (4*R*,5*S*)-ICH, (4*R*,5*R*)-ICH und acht IAHs: (4*S*,5*R*,2'*S*)-IAH, (4*S*,5*S*,2'*S*)-IAH, (4*S*,5*R*,2'*R*)-IAH, (4*S*,5*S*,2'*R*)-IAH, (4*R*,5*S*,2'*S*)-IAH, (4*R*,5*S*,2'*R*)-IAH, (4*R*,5*R*,2'*S*)-IAH, (4*R*,5*R*,2'*R*)-IAH [aus vier AHs: (6*S*,2'*S*)-AH, (6*S*,2'*R*)-AH, (6*R*,2'*S*)-AH, (6*R*,2'*R*)-AH, s. S. 90], vgl. Übersicht im Anhang 2) entstehen. Da es, wie aus Abb. 4-19 (unten) ersichtlich, nicht möglich war, alle 16 IAS aufzutrennen, wurden die einzelnen rac-IAS (sechs Fraktionen: TINH-1/TINH-2, CINH-1/CINH-2, TICH-1/TICH-2, CICH-1/CICH-2, TIAH-1 – TIAH-4 und CIAH-1 – CIAH-4) zunächst durch präparative RP-HPLC (Kap. 6.11) isoliert. Anschließend wurden die einzelnen IAS-Enantiomere mittels Säule 22 aufgetrennt (Kap. 6.5.2). Dadurch konnte die Existenz von 15 IAS (bei CIAS konnte eine IAS nach wie vor nicht aufgelöst werden, Abb. 4-23) eindeutig bewiesen werden.

* Die leicht abweichenden Retentionszeiten im Vergleich zu Abb. 4-2 lagen im systembedingten Fehler der HPLC-Anlage 1 begründet (vgl. Kap. 6.3.1).

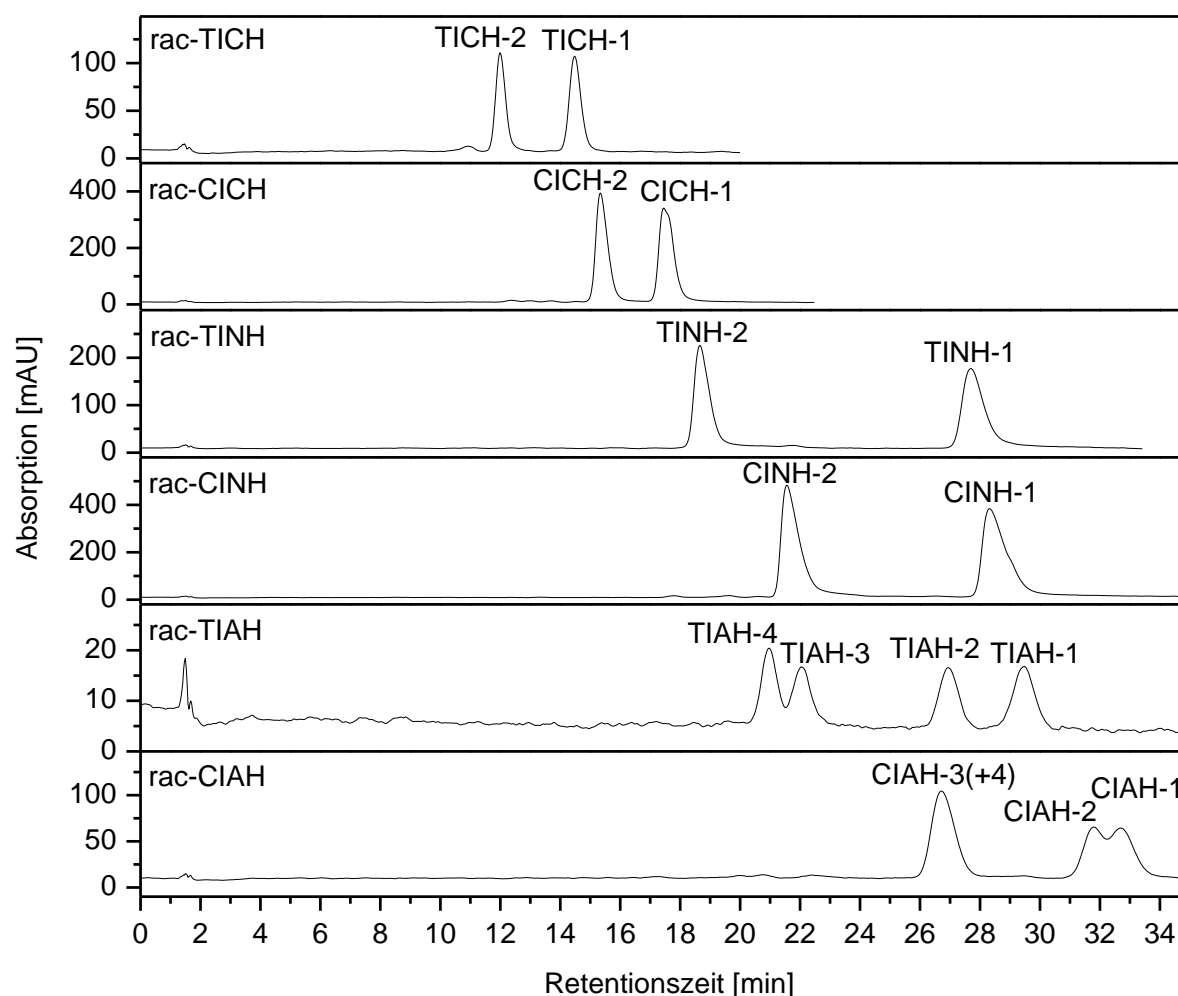


Abb. 4-23: HPLC-Chromatogramme; chirale Trennung von isolierten rac-IAS-Fractionen: rac-TICH (0,2 g/L), rac-CICH (0,9 g/L), rac-TINH (0,7 g/L), rac-CINH (1,7 g/L), rac-TIAH (0,1 g/L), rac-CIAH (0,4 g/L); jeweils 25 μ L injiziert, Anlage 1, Säule 22, HPLC-Methode-6.

4.4.2 Isomerisierung an fester Phase

Bei diesen Tests wurde untersucht, ob und wie weit die Isomerisierung durch feste Substanzen katalytisch beeinflusst wird. Dieses Prinzip ist durch Verreibung von Hopfenpulver mit MgO bereits bekannt^[23] und sollte nun auch mit anderen Festsubstanzen, welche in Chemielaboratorien üblicherweise als Adsorptionsmittel dienen, getestet werden.

Bei der Isomerisierung an saurem, neutralem und basischem Al_2O_3 (Kap. 6.5.3.1) zeigte sich, dass nach dem 2-stündigen Erhitzen bei 100 °C keine AS mehr vorhanden waren. Bei saurem Al_2O_3 erfolgte eine Isomerisierung zu IAS, während beim neutralen und v.a. beim basischen Al_2O_3 nur noch (polare) Abbauprodukte zu sehen waren (Abb. 4-24). Ob bei den beiden letztgenannten allerdings – so wie es der neutrale Ansatz vermuten ließ – zuvor IAS entstanden waren, die dann bereits wieder abgebaut wurden oder die AS direkt degradieren, konnte hier nicht zweifelsfrei ermittelt werden. Auffällig waren jedoch die relativ hohen

C/T, insbesondere beim sauren Al_2O_3 (Tab. 4-6) – das C/T bei der Würzekochung beträgt üblicherweise durchschnittlich $2,13^{[19]}$. Die allgemein sehr niedrigen Umsätze sprechen jedoch dafür, dass es sich beim Al_2O_3 um keinen sonderlich geeigneten Katalysator handelt. Allerdings wurden die Versuche auch bei relativ hohen Temperaturen durchgeführt (100 °C), währenddessen bei der Herstellung von isomerisierten Pellets eine Temperatur von 60 °C sowie ein prozentualer Gehalt von 2% MgO nicht überschritten werden darf, um ungewünschte Abbaureaktionen zu vermeiden. Aus diesem Grund sollten zur genaueren Untersuchung der katalytischen Wirkung von Al_2O_3 weitere Tests bei geringeren Temperaturen und deutlich niedrigeren Al_2O_3 -Gehalten durchgeführt werden.

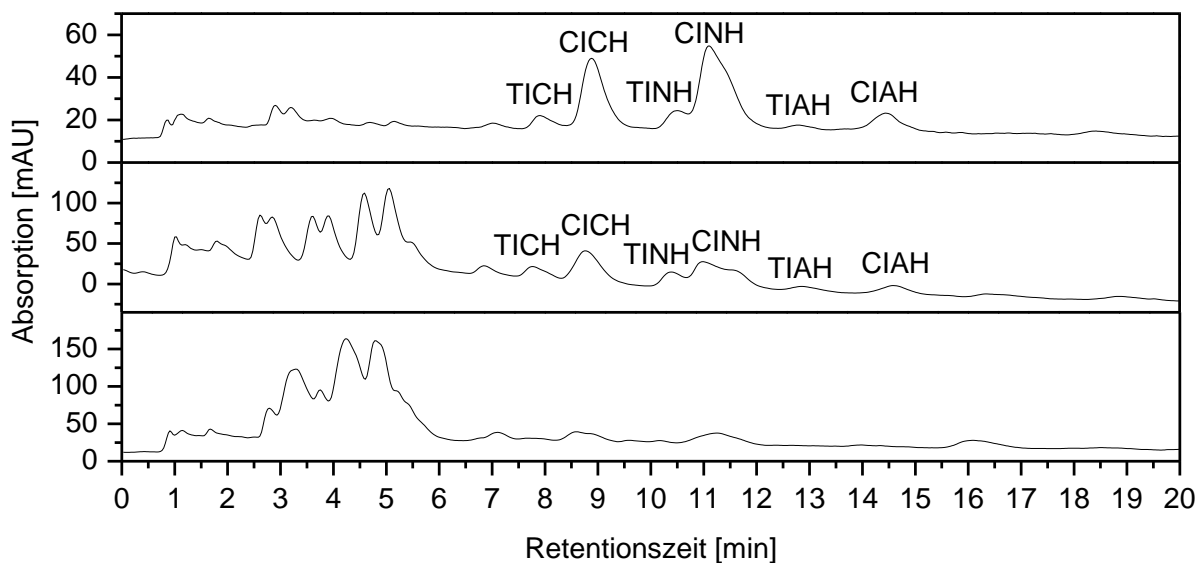


Abb. 4-24: Isomerisierung an Al_2O_3 ; oben: sauer, mitte: neutral, unten: basisch; Anlage 1, Säule 9.

Tab. 4-6: Isomerisierung an saurem, neutralem und basischem Al_2O_3 : C/T und U.

Al_2O_3	C/T _(ICH)	C/T _(INH)	C/T _(IAH)	U
sauer	6,25	7,69	4,22	2,3 %
neutral	3,61	3,84	2,26	2,6 %
basisch	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Beim sauren Al_2O_3 (100 °C , Kap. 6.5.3.1) wurden nach 120 min selbstverständlich identische Ergebnisse erzielt, wie die bereits oben beschriebenen (Abb. 4-24 und Tab. 4-6). Nach 30 bzw. 60 min waren relativ zum 120-min-Ansatz weniger IAS und entsprechend mehr AS vorhanden. Dies ließ darauf schließen, dass die IAS-Menge während den hier beobachteten 120 min kontinuierlich anstieg und die IAS nicht bereits wieder abgebaut wurden.

Der Kieselgel-Ansatz (100 °C, Kap. 6.5.3.1) ließ ebenfalls eine Isomerisierung erkennen. Dabei stieg die IAS-Menge relativ zur AS-Menge kontinuierlich von 30 bis 120 min an. Allerdings entstanden bereits nach 30 min (polare) Abbauprodukte, die logischerweise beim 60- bzw. 120-min-Ansatz weiter anstiegen. Jedoch waren selbst nach 120 min noch 64,2 % AS (bezogen auf die eingesetzte Menge) vorhanden. Der Umsatz betrug 20,3 % (bei 120 min).

Bei der Kieselgur (100 °C, Kap. 6.5.3.1) fand keinerlei Isomerisierung statt. Neben einer Vielzahl von (polaren) Abbauprodukten waren auch nach 120 min immer noch rund 18 % AS (bezogen auf die eingesetzte Menge) vorhanden. Der Großteil des AS-Verlustes war hierbei jedoch nicht auf den AS-Abbau, sondern vielmehr auf Verluste bei der Elution zurückzuführen, da die AS durch das Schütteln mit MeOH nicht gänzlich von der Kieselgur gelöst werden konnten.

Beim Florisil® (Kap. 6.5.3.1) war bereits nach 30 min eine deutliche Isomerisierung erkennbar (100 °C). Die IAS-Menge konnte nach 60 min nicht mehr gesteigert werden, stattdessen kam es zu einem leichten Anstieg der Abbauprodukte. Es waren zu diesem Zeitpunkt keine AS mehr vorhanden. Die extrem gute katalytische Wirkung von Florisil® ist vermutlich auf die chemische Zusammensetzung zurückzuführen. Es handelt sich dabei um ein Magnesiumsilikat mit der chemischen Formel MgSiO_3 . Anders ausgedrückt lautet die Formel dieses sog. Kieselsäure-Magnesiumsalzes $[\text{SiO}_3^{2-}\text{Mg}^{2+}]$. Hierbei bewirken vermutlich die Mg^{2+} -Ionen die beschleunigte Isomerisierung der AS zu den IAS, wobei durch die Oberflächenvergrößerung durch das Silikat eine zusätzliche katalytische Wirkung denkbar wäre. In Abb. 4-25 ist das Chromatogramm des Ansatzes «Florisil®, 60 min» zu sehen. Daraus ließen sich die relevanten Werte von U und C/T berechnen. Der Umsatz U stellte dabei mit 64,7 % einen zufriedenstellenden Wert dar, während die C/T mit 2,78 (ICH), 3,14 (INH) und 3,96 (IAH) geringfügig höher waren als bei der üblichen Würzekochung (2,13). Da Magnesiumsilikat auch als Lebensmittelzusatzstoff (Füllstoff und Trennmittel) Verwendung findet^[164], wäre diese Substanz auch bei einer praktischen Verwendung in der Brauindustrie – abgesehen vom Reinheitsgebot (s. S. 26) – unbedenklich und als Katalysator zur Beschleunigung der Isomerisierung durchaus denkbar.

Beim Erhitzen von Hopfenextrakt-beschichteter Aktivkohle (100 °C; 30, 60, 120 min, Kap. 6.5.3.1) wurden weder nach 30, 60 oder 120 min IAS detektiert. Der AS-Gehalt nahm mit fortschreitender Reaktionsdauer ab, während die (polaren) Abbauprodukte anstiegen. Es erfolgte jedoch keine Isomerisierung.

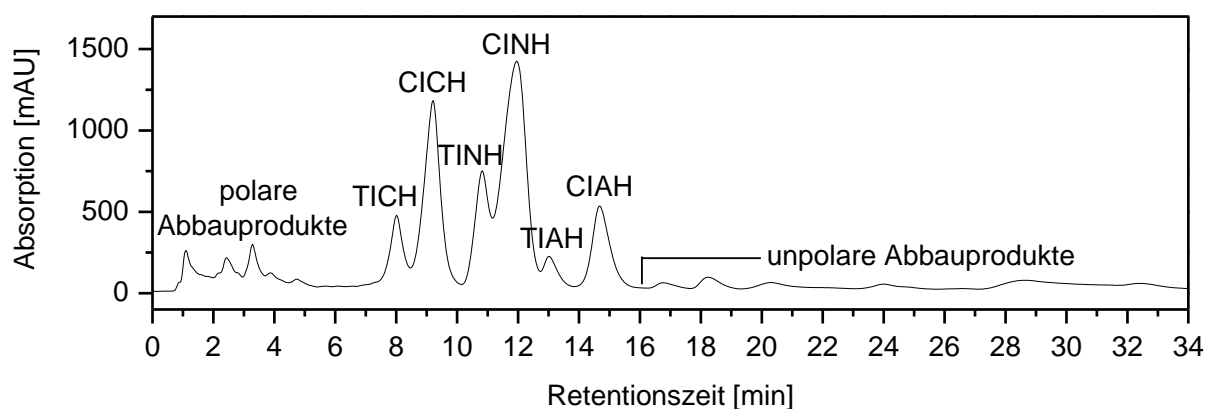


Abb. 4-25: Isomerisierung an Florisil[®], 100 °C, 60 min; Anlage 1, Säule 9.

Die Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Isomerisierung an Florisil[®] (50 – 300 °C, 30 min, Kap. 6.5.3.2) ergab folgende Ergebnisse: Bei 50 °C konnte nur eine sehr geringe Menge an IAS nachgewiesen werden ($U = 0,8 \%$), während die AS im Vergleich zur Kontrollprobe noch nahezu unverändert vorlagen. Bei 100 °C wurden die eben ausführlich beschriebenen Ergebnisse bestätigt (vgl. S. 70 bzw. Abb. 4-25). Der 150-°C-Ansatz war bezüglich des Umsatzes mit dem 100-°C-Ansatz vergleichbar, wobei hier bereits etwas mehr sowohl polare als auch unpolare Abbauprodukte entstanden. Ab einer Temperatur von 200 °C konnten keine IAS mehr nachgewiesen werden, da diese bereits komplett degradierten. Die entsprechenden Werte für 50 – 150 °C sind in Tab. 4-7 aufgeführt. Dabei sind die Werte des 50 °C-Ansatzes aufgrund der geringen Mengen und der damit verbundenen schwierigen Auswertung mit Vorsicht zu genießen. Während bei ICH das C/T mit ansteigender Temperatur in Übereinstimmung mit der Literatur^[67] zunimmt (die Bildung von *cis*-Isomeren benötigt eine höhere Aktivierungsenergie als die Bildung von *trans*-Isomeren), ist das Absinken der C/T bei INH und insbesondere bei IAH mit steigender Temperatur verwunderlich. Verglichen mit den Ergebnissen von JASKULA ET AL.^[67] (Isomerisierung in 3,3-Dimethylglutarsäure/NaOH-Pufferlösung, 0,1 M, pH 5,2) wurden deutlich höhere C/T ($C/T = 1,1$ bei 100 °C und 30 min^[67]) erhalten. Auch der Umsatz war mit 65,6 % deutlich höher als bei JASKULA ET AL.^[67] (13,0 %). Die Isomerisierung mittels Florisil als Katalysator bringt also sowohl eine hohe IAS-Ausbeute als auch relativ hohe C/T mit sich.

Tab. 4-7: Temperaturabhängigkeit der 30-minütigen Isomerisierung an Florisil[®]: 50 – 150 °C: C/T und U.

Temperatur	C/T _(ICH)	C/T _(INH)	C/T _(IAH)	U
50 °C	1,70	4,49	TIAH n.d.	0,8 %
100 °C	2,78	3,29	4,18	65,6 %
150 °C	3,45	3,26	1,79	54,7 %

Bei der mehrtägigen Isomerisierung an Florisil® bei geringeren Temperaturen (40 °C, Kap. 6.5.3.2) konnte ein eindeutiger Anstieg der IAS-Menge relativ zur AS-Menge nachgewiesen werden. Da es bei der Aufarbeitung mehrere Proben zu Verlusten kam, ist ein quantitativer Vergleich der Umsätze der einzelnen Ansätze nicht möglich. Allerdings lässt sich durch Plotten der Peakflächen-Verhältnisse von IAS und AS („IAS:AS-Verhältnis“ \triangleq Verhältnis der Peakflächen von IAS und AS bei 260 nm – dieses entspricht nicht direkt den Massenverhältnissen!) die fortschreitende Isomerisierung gut darstellen. Dabei ist mit Ausnahme von wenigen Ausreißern ein eindeutiger Anstieg des „IAS:AS-Verhältnisses“ zu erkennen. Das entsprechende Diagramm ist in Abb. 4-26 dargestellt. Das durchschnittliche C/T betrug 3,75 und lag somit höher als das bei der üblichen Würzekochung (2,13). Sämtliche Chromatogramme sind im Anhang 4 abgebildet. Die IAS-Ausbeute, welche bei der Herstellung von isomerisierten Hopfenpellets (MgO-Zusatz, 45 – 55 °C, 10 – 14 Tage) erzielt wird (ca. 90 %^[23]), konnte allerdings nicht erreicht werden.

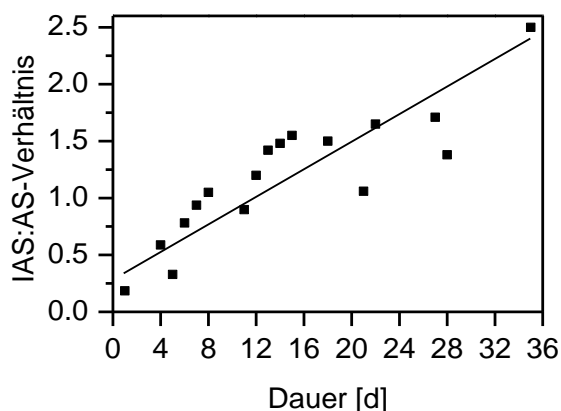


Abb. 4-26: Peakflächen-Verhältnisse von IAS:AS bei der Isomerisierung an Florisil® (40 °C).

Auf die gleiche Weise wurde die Isomerisierung an Florisil® auch bei 25 °C im Ofen bzw. bei Raumtemperatur (RT < 25 °C, Kap. 6.5.3.2) verfolgt. Das Plotten der Peakflächen-Verhältnisse von IAS und AS ergab die in Abb. 4-27 – Abb. 4-30 dargestellten vier Diagramme. Durch das Ansteigen der Kurven wurde deutlich, dass auch hier eine Isomerisierung stattfand. Dabei zeigten die RT-Ansätze deutlich weniger IAS, was auf eine geringere Durchschnittstemperatur als die im Ofen exakt eingestellte Temperatur von 25 °C hinwies. Eine weitere Erklärung für den geringeren IAS-Anteil in den RT-Proben (Fensterbank) ist ein höherer IAS-Abbau durch die Sonneneinstrahlung. Dies wurde durch das Vorhandensein von deutlich mehr Abbauprodukten bestätigt. Beim Vergleich von Extrakt-1 und Extrakt-2 wurden die nicht erklärbaren Unregelmäßigkeiten hinsichtlich der Isomerisierungsverhalten von unterschiedlichen Hopfenprodukten deutlich. Die C/T lagen bei einem Durchschnittswert von 3,75, wobei sie mit zunehmender Reaktionsdauer leicht anstiegen. Ob dies allerdings mit

den geringeren Stabilitäten der TIAS und dem damit verbundenen rascheren Abbau oder mit einer späteren Bildung der CIAS zusammenhing, konnte nicht eindeutig festgestellt werden.

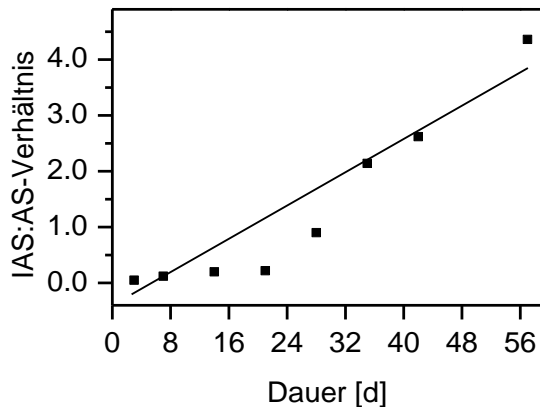


Abb. 4-27: Peakflächen-Verhältnisse von IAS:AS bei der Isomerisierung an Florisil® (25 °C): Extrakt-1, Ofen.

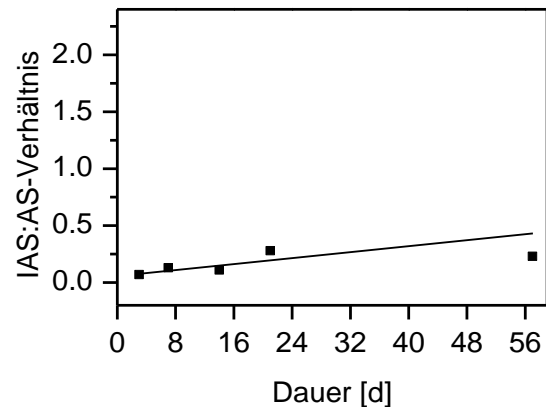


Abb. 4-28: Peakflächen-Verhältnisse von IAS:AS bei der Isomerisierung an Florisil® (RT): Extrakt-1, Fensterbank.

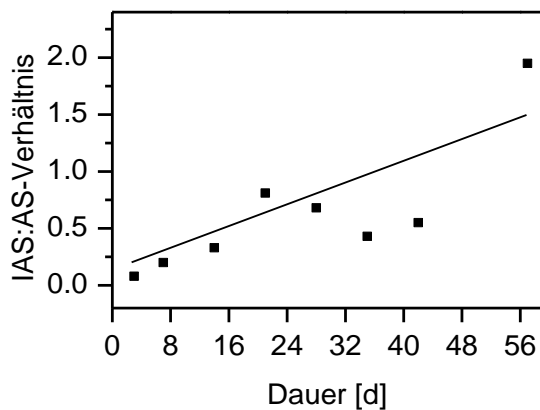


Abb. 4-29: Peakflächen-Verhältnisse von IAS:AS bei der Isomerisierung an Florisil® (25 °C): Extrakt-2, Ofen.

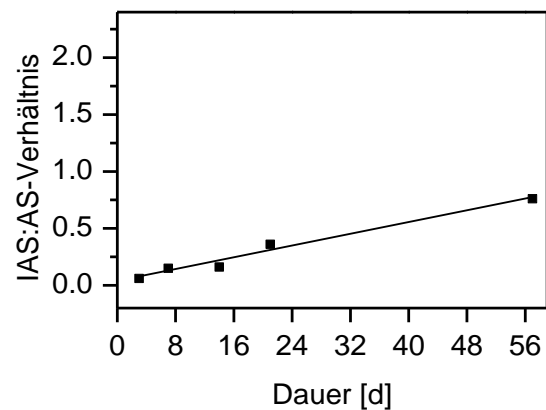


Abb. 4-30: Peakflächen-Verhältnisse von IAS:AS bei der Isomerisierung an Florisil® (RT): Extrakt-2, Fensterbank.

4.4.3 Isomerisierung in Lösung

Auch bei der Isomerisierung in KOH- bzw. NaOH-Lösung (100 °C, Kap. 6.5.4) wurde ein Anstieg des C/T im Verlauf der 1- bzw. 2-stündigen Kochzeit festgestellt (Abb. 4-31 und Abb. 4-33). Auffallend war bei ICH und INH, dass die C/T in NaOH zunächst niedriger ($t = 5$ min) und später höher ($t \geq 30$ min) waren als in KOH zu entsprechenden Zeiten. Bei IAH wiederum waren die C/T zu jedem Zeitpunkt in NaOH höher als in KOH. Die Werte für $t = 5, 30$ und 60 min sind in Tab. 4-8 aufgeführt. In NaOH wurden die IAS wieder schneller abgebaut, so dass der Umsatz nicht über 50 % stieg (Abb. 4-34). Im Gegensatz dazu wurden bei KOH Umsätze zwischen 60 und 70 % beobachtet (Abb. 4-32, U bei $t = 30$ min stellt höchstwahrscheinlich einen Ausreißer dar).

Tab. 4-8: Isomerisierung in KOH bzw. NaOH: C/T und U.

Lösemittel	Zeitpunkt	C/T _(ICH)	C/T _(INH)	C/T _(IAH)	U [%]
KOH	5 min	2,09	2,61	1,08	48,2
NaOH	5 min	1,97	2,37	2,30	47,3
KOH	30 min	2,83	2,99	2,05	82,3
NaOH	30 min	2,93	3,24	2,51	41,0
KOH	60 min	2,96	3,20	2,32	62,4
NaOH	60 min	3,39	3,74	2,86	34,6

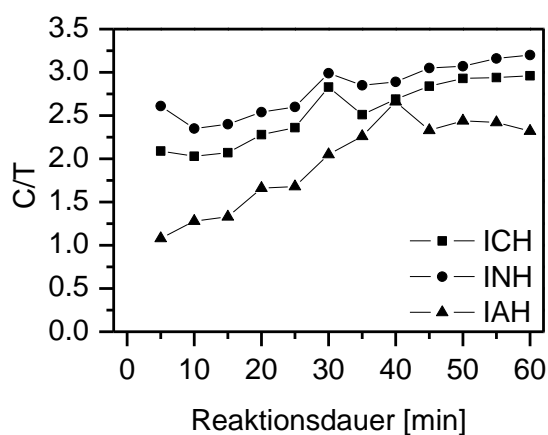


Abb. 4-31: Isomerisierung in KOH-Lösung, C/T.

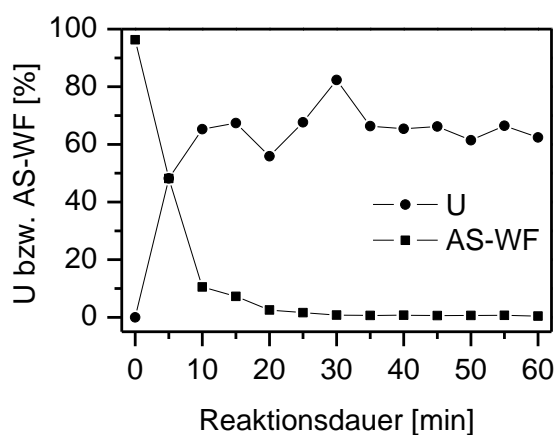


Abb. 4-32: Isomerisierung in KOH-Lösung, U bzw. AS-WF.

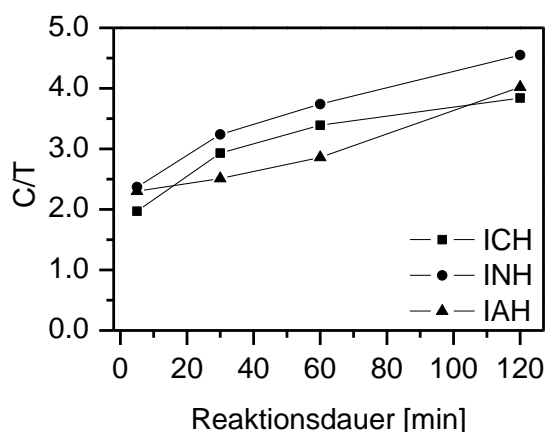


Abb. 4-33: Isomerisierung in NaOH-Lösung, C/T.

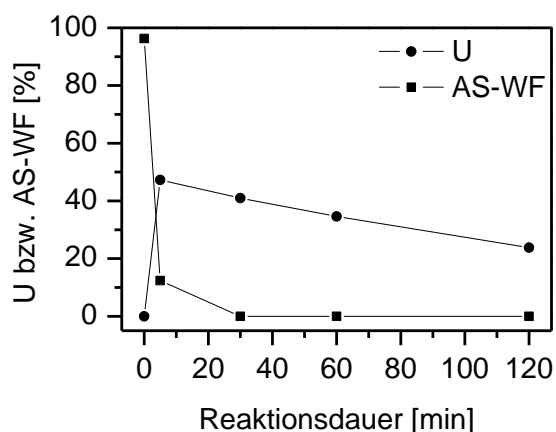


Abb. 4-34: Isomerisierung in NaOH-Lösung, U bzw. AS-WF.

Um vorisomerisierte Hopfenprodukte (z.B. *Isomerisierter Kettle Extrakt als Kaliumsalz (PI-KE)*^[165]) herzustellen, wird die Isomerisierung in basischem Milieu (z.B. wässrige KOH-Lösung) durchgeführt. Aufgrund dessen wurden auch basische organische Lösemittel hinsichtlich ihres Einflusses auf die Isomerisierung getestet (Kap. 6.5.4). Allerdings wurde weder in Pyridin noch in Triethylamin eine Isomerisierung beobachtet.

Der Einfluss auf die Isomerisierung wurde auch in anderen organischen Lösemitteln untersucht (ebenfalls jeweils bei 100 °C, Kap. 6.5.4). Während in den unpolaren organischen Lösemitteln Toluol, 1,4-Dioxan, *n*-Hexan und *iso*-Octan keinerlei Isomerisierung von Humulon zu Isohumulon stattfand, konnte bei den polaren organischen Lösemitteln MeOH, EtOH und 1-PrOH eine geringe Isomerisierung beobachtet werden. Hierbei war die Isomerisierungsrate umso höher, je polarer der Alkohol war. Allgemein war jedoch bei den Alkoholen aufgrund der Vielzahl an undefinierbaren Nebenprodukten eine genaue quantitative Auswertung von U und C/T nur wenig sinnvoll. Bei der Kontrollprobe (neutrales H₂O) fand keine Isomerisierung statt. Dies war in der schlechten Löslichkeit des Hopfenextraktes in H₂O begründet.

Bei der Untersuchung, inwieweit eine Isomerisierung (100 °C, Kap. 6.5.4) in Diethylenglykol möglich ist, wurden sowohl bei reinem Diethylenglykol (Ansatz B) als auch beim 1:1-Gemisch mit H₂O (Ansatz A) nur sehr geringe Mengen IAS beobachtet (die TIAS lagen gar unter der Nachweisgrenze), sodass auch hier eine quantitative Auswertung von U und C/T nicht möglich war.

4.4.4 Einfluss von Katalysatoren auf die Isomerisierung

Das folgende Kapitel widmet sich der Untersuchung des Einflusses diverser (anorganischer) Salze bzw. Oxide auf die Isomerisierung. Gemäß Variante 1^[158] (MeOH : H₂O : NaOH = 15 : 4,7 : 1; $n_{\text{Salz}} = 2 \times n_{\text{AS}}$, 70 °C, 45 min, Kap. 6.5.5.1) wurden hierbei sieben unterschiedliche bivalente Salze (Tab. 6-8) getestet und einer Kontrollprobe ohne Salzzugabe gegenüber gestellt. Bei Zugabe von CuSO₄·5H₂O wurde keine Isomerisierung festgestellt. Hier wurden nach der Reaktion lediglich noch geringe Mengen AS nachgewiesen, während bei der gewählten Detektionswellenlänge von 260 nm sonst keinerlei Substanzen mehr detektiert wurden. Beim Ca(OH)₂-Ansatz kam es ebenfalls zu keiner Isomerisierung. Hier waren ausschließlich (polare) Abbauprodukte vorhanden. Bei allen fünf weiteren Salzen kam es zu einer mehr oder weniger starken Isomerisierung. Auffallend hierbei war, dass sich die C/T beim Co- und Mn-Ansatz (außer bei IAH) nur wenig von der Kontrollprobe unterschieden. Dagegen zeigten die MgCl₂- und CaCl₂-Ansätze deutlich höhere *trans*-Anteile, während das Fe-Salz in etwa doppelt so hohe C/T (ICH und INH) als die Kontrollprobe zur Folge hatte. Die entsprechenden Werte sind in Tab. 4-9 aufgeführt. Auch bei den Umsätzen zeigten sich deutliche Unterschiede. Zwar zeigten alle Salz-Ansätze, bei denen eine Isomerisierung beobachtet werden konnte, höhere Umsätze als die Kontrollprobe, allerdings variierten diese untereinander stark. So besaßen das MgCl₂ und CaCl₂ die besten katalytischen Wirkungen, während die Co- und Mn-Salze deutlich niedrigere Umsätze aufwiesen. Das FeSO₄·7H₂O nahm hier einen Mittelwert ein. Auch diese Werte sind in Tab. 4-9 aufgeführt.

Tab. 4-9: Einfluss bivalenter Salze auf die Isomerisierung (Variante 1^[158]: MeOH : H₂O : NaOH = 15 : 4,7 : 1; n_{Salz} = 2 × n_{AS}, 70 °C, 45 min): C/T und U.

Salz*	C/T _(ICH)	C/T _(INH)	C/T _(IAH)	U [%]
Kontrolle (ohne Salz)	2,22	2,19	1,85	23,6
FeSO ₄ ·7H ₂ O	4,90	4,36	n.d.	48,1
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	2,17	2,16	1,69	38,5
MnSO ₄ ·H ₂ O	2,18	2,44	2,46	33,2
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1,62	1,71	1,08	76,5
CaCl ₂	1,54	1,60	1,36	73,5

* Bei CuSO₄·5H₂O und Ca(OH)₂ kam es zu keiner Isomerisierung.

Es wurden weitere sieben bivalente Salze (alles Chloride) hinsichtlich ihrer eventuellen katalytischen Wirkungen auf die Isomerisierung getestet (Variante 2: MeOH : H₂O : NaOH = 14,7 : 14,7 : 1; n_{Salz} = 3 × n_{AS}, 80 °C, 60 min, Kap. 6.5.5.1). Auch hier zeigten sich sowohl hinsichtlich U als auch C/T deutliche Unterschiede. Bei CuCl₂, NiCl₂, PbCl₂ und SnCl₂ konnte keine Isomerisierung beobachtet werden. Dass jedoch ein anderweitiger AS-Abbau stattgefunden haben musste, zeigen die unterschiedlichen AS-Mengen nach den Reaktionen. Die hierbei ebenfalls denkbare Bildung unlöslicher AS-Salze (z.B. Pb(Hu)₂) wurde nicht beobachtet. Beim Ba-, Sr- und Zn-Chlorid erfolgte dagegen eine Isomerisierung. Die Umsätze waren dabei allesamt höher als bei der Kontrollprobe (s. Tab. 4-9), d.h. die Salze zeigten die gewünschte katalytische Wirkung. Bei den C/T wurden wieder deutliche Unterschiede beobachtet. Während beim Ba-Ansatz ähnliche Werte wie bei der Kontrollprobe ohne Salz erhalten wurden, hatte das SrCl₂·6H₂O niedrigere Werte zur Folge. Im Gegensatz dazu wurden beim ZnCl₂ deutlich höhere C/T erhalten. Die relevanten U- und C/T-Werte sind in Tab. 4-10 aufgeführt. Polare, undefinierbare Abbauprodukte in den vorderen Teilen der Chromatogramme sowohl beim Ba- als auch beim Sr-Ansatz – im Zn-Ansatz waren diese in deutlich geringerem Maße vertreten – ließen ebenfalls darauf schließen, dass die Salze unterschiedliche Einflüsse auf das Verhalten der Hopfeninhaltsstoffe bei deren Erhitzung hatten.

Tab. 4-10: Einfluss bivalenter Salze auf die Isomerisierung (Variante 2: MeOH : H₂O : NaOH = 14,7 : 14,7 : 1; n_{Salz} = 3 × n_{AS}, 80 °C, 60 min): C/T und U.

Salz*	C/T _(ICH)	C/T _(INH)	C/T _(IAH)	U [%]
BaCl ₂ ·2H ₂ O	2,18	2,20	1,48	33,1
SrCl ₂ ·6H ₂ O	1,81	1,44	0,95	39,0
ZnCl ₂	3,30	3,06	3,18	45,1

* Bei CuCl₂, NiCl₂, PbCl₂ und SnCl₂ kam es zu keiner Isomerisierung.

Ebenso wie die Salze zeigten auch die getesteten Oxide (Variante 2: MeOH : H₂O : NaOH = 14,7 : 14,7 : 1; $n_{\text{Oxid}} = 3 \times n_{\text{AS}}$, $[n_{\text{CuO}} = 3,75 \times n_{\text{AS}}; n_{\text{FeO}(2)} = 30 \times n_{\text{AS}}]$, 80 °C, 60 min, Kap. 6.5.5.1) unterschiedliche Einflüsse auf die Isomerisierung. Bei CaO und PbO waren nach den Reaktionen keine IAS zu sehen. Stattdessen wurden hier (polare) Abbauprodukte detektiert. Bei CuO konnte lediglich ICH detektiert werden, wobei die entsprechenden Peaks starkes Tailing aufwiesen. Bei allen anderen sieben Oxiden fand eine Isomerisierung statt, wobei auch hier höhere Umsätze als bei der Kontrollprobe ohne Zusatz eines Katalysators (s. Tab. 4-9) erhalten wurden (außer bei Fe₃O₄ – wobei es sich hier auch um einen Messfehler bei der HPLC handeln könnte). MgO zeigte hierbei den mit Abstand größte katalytische Wirkung (Tab. 4-11). Außer dem MgO-Ansatz zeigten alle Ansätze, bei denen eine Isomerisierung stattfand, leicht höhere C/T als die Kontrollprobe. Wie schon bei den Salzen (FeSO₄·7H₂O) waren hierbei, neben NiO, die der Fe-Oxide am höchsten.

Tab. 4-11: Einfluss diverser Oxide (Variante 2: MeOH : H₂O : NaOH = 14,7 : 14,7 : 1; $n_{\text{Oxid}} = 3 \times n_{\text{AS}}$, $[n_{\text{CuO}} = 3,75 \times n_{\text{AS}}; n_{\text{FeO}(2)} = 30 \times n_{\text{AS}}]$, 80 °C, 60 min) auf die Isomerisierung: C/T und U.

Oxid*	C/T _(ICH)	C/T _(INH)	C/T _(IAH)	U [%]
CuO	3,00	n.d.	n.d.	24,1
FeO (0,24 mmol)	2,62	2,24	2,00	47,3
FeO (2,4 mmol)	2,64	2,45	2,30	59,3
Fe ₂ O ₃	2,60	2,52	2,02	51,6
Fe ₃ O ₄	3,43	2,79	4,39	18,8
MgO	2,21	2,06	1,78	75,5
NiO	2,63	2,85	3,70	33,5
TiO ₂	2,47	2,38	1,83	54,3
ZnO	2,64	2,34	2,12	55,0

* Bei CaO und PbO kam es zu keiner Isomerisierung.

Um die katalytische Wirkung von FeO nochmals genauer zu testen, wurde eine FeO-haltige Probe sowie eine Kontrollprobe ohne FeO bei 100 °C für 60 min erhitzt (MeOH : H₂O : NaOH = 7,6 : 7,6 : 1; Kap. 6.5.5.1). Bei Betrachtung der beiden Chromatogramme in Abb. 4-35 sowie der relevanten Werte aus Tab. 4-12 zeigt sich die deutliche katalytische Wirkung von FeO. Auch die C/T waren sowohl gegenüber der Kontrollprobe (Tab. 4-9) als auch gegenüber der Isomerisierung mit FeO bei 80 °C deutlich erhöht. Der niedrige Umsatz der Kontrollprobe (Tab. 4-12) im Vergleich zur Kontrollprobe von oben (Variante 1, 70 °C: U = 23,6 %, vgl. Tab. 4-9) ist vermutlich die Folge des bereits weiter vorgeschrittenen IAS-Abbaus aufgrund der um 30 °C höheren Temperatur.

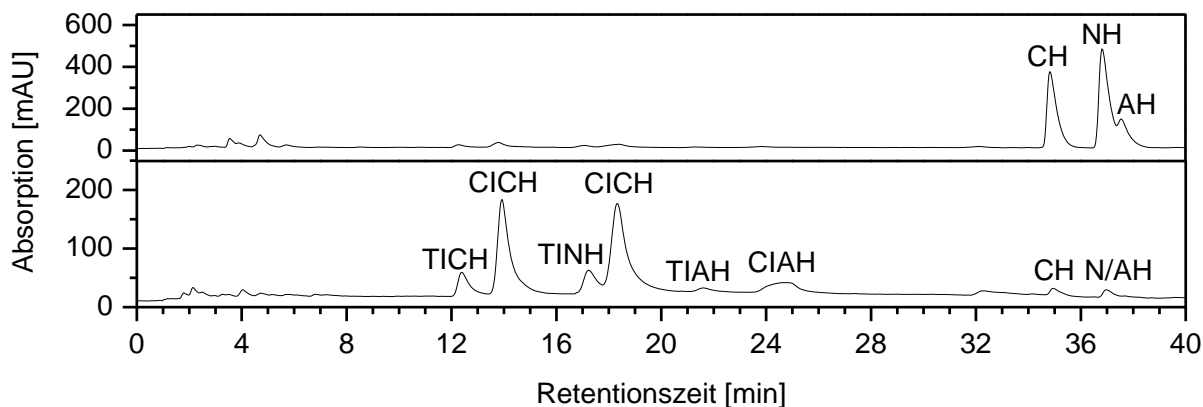


Abb. 4-35: Einfluss von FeO auf die Isomerisierung (bei 100 °C), oben: ohne FeO, unten: mit FeO; Anlage 1, Säule 9.

Tab. 4-12: Einfluss von FeO auf die Isomerisierung (bei 100 °C): C/T und U.

Oxid	C/T _(ICH)	C/T _(INH)	C/T _(IAH)	U [%]
FeO	4,44	5,06	5,85	55,9
ohne	1,99	2,40	2,02	8,0

Bei der Isomerisierung ohne NaOH-Zugabe (mit und ohne $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Kap. 6.5.5.1) zeigte sich ebenfalls sowohl die katalytische Wirkung von $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (U) als auch die Tendenz von Fe-Verbindungen, höhere C/T zu generieren. Die entsprechenden Werte sind in Tab. 4-13 aufgeführt. Die im Vergleich zu den in Tab. 4-9 aufgeführten niedrigeren Umsätze liegen in der schlechteren Löslichkeit des Hopfenextraktes infolge des Fehlens von NaOH begründet.

Tab. 4-13: Einfluss von $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ auf die Isomerisierung (ohne NaOH): C/T und U.

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	C/T _(ICH)	C/T _(INH)	C/T _(IAH)	U [%]
mit	5,36	4,33	7,06	11,1
ohne	n.d.	n.d.	n.d.	0,2

Beim Test von $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (dreiwertiges Fe^{3+}) bzw. $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ (vierwertiges Ce^{4+}) (Kap. 6.5.5.1) hinsichtlich ihrer katalytischen Wirkungen wurden keine Isomerisierungen beobachtet.

Bei der Isomerisierung unter Zugabe von NaCl bzw. KCl (Kap. 6.5.5.1) zeigte sich im Rahmen der Messgenauigkeit keine katalytische Wirkung der Salze. Die Umsätze entsprachen in etwa den Werten ohne Salz-Zugabe (60 min: 0,5 – 0,7 %, 120 min: 1,1 – 1,5 %) Auch hinsichtlich der C/T konnten keine klaren Tendenzen ausgemacht werden.

Mittels unterschiedlich hoher Zugaben an $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Kap. 6.5.5.1) wurde überprüft, inwieweit die Menge an Fe^{2+} -Ionen die Isomerisierung beeinflusste. Es zeigte sich, dass es eine optimale Fe^{2+} -Ionenmenge gab, bei der der Umsatz am höchsten war. In diesem Fall war es ein molares Verhältnis (Fe^{2+} -Ionen : AS) von 2 ($U = 6,2\%$, Tab. 4-14). Sowohl bei geringerer Fe^{2+} -Ionenmenge (hier waren noch AS vorhanden) als auch bei höherer Fe^{2+} -Ionenmenge (hier waren keine AS mehr vorhanden, stattdessen viele Abbauprodukte) waren die Umsätze niedriger. Die allgemein niedrigen Umsätze liegen daran, dass während den Isomerisierungsreaktionen kein NaOH zugegeben wurde. Auch die C/T stiegen mit zunehmender Fe^{2+} -Ionenmenge zunächst an ($1,0 \times - 3,0 \times$). Bei weiterer Fe^{2+} -Erhöhung sanken diese Werte wieder, wobei die Richtigkeit aufgrund der geringen IAS-Mengen (nahe an der unteren Nachweisgrenze) nicht zu 100 % gewährleistet ist. Allgemein konnte auch bei diesem Versuch die oben bereits erwähnte C/T-Erhöhung durch Fe^{2+} -Ionen (gegenüber Proben ohne Fe^{2+} : $C/T \approx 2$) bestätigt werden.

Tab. 4-14: Einfluss der Fe^{2+} -Ionenmenge auf die Isomerisierung: C/T und U.

molares Verhältnis (Fe^{2+} :AS)	C/T _(ICH)	C/T _(INH)	C/T _(IAH)	U [%]
0,5 x	TICH n.d.	TINH n.d.	TIAH n.d.	0,2
1,0 x	4,61	5,84	4,35	3,0
2,0 x	4,90	6,00	4,51	6,2
3,0 x	6,18	6,60	TIAH n.d.	0,5
4,0 x	4,99	5,51	TIAH n.d.	1,2
5,0 x	5,90	TINH n.d.	TIAH n.d.	0,7

Beim Test bezüglich der Lösemittelabhängigkeit der Isomerisierung (MeOH vs. 1-PrOH: mit und ohne $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $T = 70\text{ }^\circ\text{C}$, Alkohol : Wasser = 1 : 1, Kap. 6.5.5.1) wurden folgende Ergebnisse erhalten: In den 1-PrOH/ H_2O -Ansätzen erfolgte keine Isomerisierung – weder mit noch ohne Zugabe von $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Bei MeOH/ H_2O ohne $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ wurde lediglich eine geringe Isomerisierung beobachtet ($U = 0,2\%$), während durch Zugabe von $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ eine deutliche Umsatzsteigerung erzielt wurde ($U = 5,8\%$). Der Zusatz von $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ bewirkte außerdem eine deutliche Erhöhung des C/T (ICH: 3,14 [ohne] bzw. 4,98 [mit $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$]; INH: 2,16 [ohne] bzw. 5,50 [mit $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$]; IAH konnte bei dem Ansatz ohne $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ nicht detektiert werden, weshalb ein Vergleich des C/T hier nicht möglich war).

Bei der Isomerisierung von Hopfenextrakt an diversen Festsubstanzen (Salze, Oxide, eisenhaltige Verbindungen, sonstige Verbindungen) ohne Lösemittel ($T = 100\text{ }^\circ\text{C}$, 60 min,

Kap. 6.5.5.2) kamen die in Tab. 4-15 aufgeführten Ergebnisse zustande. Hierbei sind lediglich diejenigen Substanzen berücksichtigt, bei denen eine Isomerisierung erfolgte. Bei NiCl_2 und Kieselgel fand zwar eine Isomerisierung statt, allerdings konnten die IAS aufgrund zu vieler störender Nebenprodukte nicht quantitativ ausgewertet werden.

Tab. 4-15: Isomerisierung an diversen Festsubstanzen ohne Lösemittel ($T = 100\text{ °C}$, 60 min): C/T, U und IAS-Anteile.

Ansatz-Nr.	Substanz*	C/T _(ICH)	C/T _(INH)	C/T _(IAH)	U [%]	ICH [%]	INH [%]	IAH [%]
3	CaCl_2	2,39	2,29	1,27	4,4	39,4	50,7	9,9
5	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,19	3,43	3,86	2,3	43,0	50,2	6,8
10	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,19	2,25	1,65	3,7	40,3	53,1	6,1
14	NiCl_2^{**}	n.d.**	n.d.**	n.d.**	n.d.**	n.d.**	n.d.**	n.d.**
19	CaO	2,33	2,46	1,97	79,5	39,9	50,1	10,0
21	MgO	3,04	2,88	2,22	92,8	38,6	50,1	11,3
25	ZnO	3,08	3,65	2,25	65,7	38,7	49,5	11,7
28	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,08	4,77	4,04	12,4	49,0	44,4	6,7
30	FeO	5,22	4,44	n.d.*	19,1	50,5	44,4	5,1
32	Fe_3O_4	4,85	6,14	n.d.	3,4	49,5	46,3	4,2
33	Kieselgel**	n.d.**	n.d.**	n.d.**	n.d.**	n.d.**	n.d.**	n.d.**
34	Florisil®	3,22	3,79	2,72	66,4	38,7	49,5	11,8
35	Florisil® (nicht verrührt)	2,76	3,48	2,47	20,8	38,5	48,9	12,5
36	Pd/BaSO_4	2,98	2,90	n.d.	2,0	47,9	46,7	5,5

* Bei der Kontrollprobe, $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, CuCl_2 , KCl , K_2CO_3 , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, NaCl , Na_2CO_3 , PbCl_2 , SnCl_2 , $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , CuO , NiO , PbO , TiO_2 , Fe , FeCl_2 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ und Fe_2O_3 kam es zu keiner Isomerisierung.

** Isomerisierung hat zwar stattgefunden, aber aufgrund zu vieler Nebenprodukte ist eine quantitative Auswertung nicht möglich.

Bei den Salzen wurde lediglich bei zweiwertigen Salzen und hier wiederum nur bei CaCl_2 , $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ und $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ eine Isomerisierung beobachtet. Alle drei Ansätze zeigten jedoch sehr geringe Umsätze. Deutlich höhere Umsätze wurden bei den Oxiden erhalten – voraus gesetzt es kam überhaupt eine Isomerisierung zustande. Bei den eisenhaltigen Verbindungen – aufgrund ihrer interessanten und bereits weiter oben beschriebenen Neigung, hohe C/T zu generieren, werden diese separat aufgeschlüsselt – zeigte sich ein weiterer bemerkenswerter Aspekt: Während bei allen anderen Isomerisierungen das Verhältnis von INH:ICH in etwa dem des ursprünglichen Verhältnis von NH:CH entsprach, drehte sich bei den Fe-induzierten Isomerisierungen das INH:ICH-Verhältnis um. D.h. eisenhaltige Verbin-

dungen begünstigten die Bildung von ICH. Bei sämtlichen Ansätzen, die eine Isomerisierung zur Folge hatten, waren die IAH-Anteile verhältnismäßig zur Gesamt-IAS-Menge geringer als der ursprüngliche Anteil von AH im Verhältnis zur Gesamt-AS-Menge. Dies bedeutet, dass AH im Verhältnis zu CH und NH weniger stark isomerisierten. Die prozentuale AS-Zusammensetzung des bei dieser Versuchsreihe verwendeten Extrakt-1 betrug:

CH: 36,7 %

NH: 48,3 %

AH: 15,0 %

Bei den sonstigen Verbindungen zeigte im Gegensatz zum reinen Kieselgel das Magnesiumsilikat (Florisil®) eine starke katalytische Wirkung. Dies wurde bereits während der in Kap. 4.4.2 beschriebenen Isomerisierungen beobachtet. Aufgrund der geringeren Mg-Konzentration im Vergleich zur gleichen Menge reinen MgO waren die Umsätze hier allerdings niedriger als bei MgO. Deutlich erkennbar ist der Einfluss einer guten Durchmischung des Hopfenextraktes mit dem Florisil® (Ansatz 34 bzw. 35): Sowohl die C/T als auch der Umsatz wurde durch eine gute Durchmischung gesteigert, während sie auf die prozentuale Zusammensetzung der IAS keinen Einfluss hatte. Auch beim Pd/BaSO₄-Ansatz konnte eine Isomerisierung beobachtet werden, wobei der Umsatz relativ gering war. Ähnlich wie bei den eisenhaltigen Verbindungen wurde auch hier die Isomerisierung von CH zu ICH begünstigt. Die HPLC Chromatogramme aus dieser Versuchsreihe sind allesamt im Anhang 5 dargestellt (Abb. 8-3 – Abb. 8-6).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Isomerisierung von mehreren Faktoren abhängig ist. Abgesehen von den bei dieser Versuchsreihe nicht untersuchten Parametern Zeit und Temperatur spielt sowohl die Menge als auch die Oberfläche (möglichst feines Material ist günstiger) der Substanzen eine Rolle. Außerdem werden die Isomerisierungen sowohl vom Anion als auch vom Kation beeinflusst:

- Anion, z.B.:
 - FeCl₂: keine Isomerisierung
 - FeSO₄·7H₂O: Isomerisierung
 - Beide Verbindungen enthalten Fe²⁺-Kationen, die Isomerisierung findet jedoch nur beim Sulfat statt. Ein Einfluss des Kristallwassers ist hier allerdings ebenfalls denkbar.
- Kation, z.B.:
 - FeCl₂: keine Isomerisierung
 - MgCl₂·6H₂O oder CaCl₂: Isomerisierung
 - Beide Verbindungen enthalten Cl¹⁻-Anionen, die Isomerisierung findet jedoch nur beim Mg-Salz statt.

- Wertigkeit der Kationen, z.B.:
 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ oder Fe_2O_3 : Fe^{3+} -Kationen: keine Isomerisierung
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ oder FeO : Fe^{2+} -Kationen: Isomerisierung
 → Beide Verbindungen enthalten Fe-Kationen, die Isomerisierung findet jedoch nur bei den Zweiwertigen statt.

Die Untersuchung der Temperatur- und Zeitabhängigkeit der Isomerisierung an FeO (50 bzw. 100 °C, 1 h – 24 h, Kap. 6.5.5.3) führte zu dem interessanten Ergebnis, dass niedrigere Temperaturen die C/T-Verhältnisse noch weiter erhöhen. Um allerdings einen annähernd gleichen Umsatz zu erreichen musste hier naturgemäß deutlich länger erwärmt werden (> 24 h). Die entsprechenden Werte sind in Tab. 4-16 aufgeführt. Die C/T bei Ansatz 1 entsprechen zwar nicht exakt denen des FeO-Ansatzes aus Tab. 4-15, liegen jedoch im Rahmen der Messgenauigkeit in etwa im gleichen Bereich ($C/T \approx 5$).

Tab. 4-16: Isomerisierung an FeO: Untersuchung der Temperatur- und Zeitabhängigkeit: C/T und U.

Ansatz-Nr.	Substanz	Temperatur, Zeit	C/T _(ICH)	C/T _(INH)	C/T _(IAH)	U [%]
1	FeO	100 °C, 1 h	4,98	5,59	5,00	6,7
2	FeO	50 °C, 6 h	TICH n.d.	TINH n.d.	TIAH n.d.	1,3
3	FeO	50 °C, 24 h	6,99	8,76	9,08	5,0

4.4.5 Isomerisierung in MeOH/H₂O/NaOH unter Zugabe von β -Cyclodextrin (β -CD)

Beim β -CD handelt es sich um ein cyclisches Oligosaccharid, bei dem sieben Glucosemoleküle $\alpha(1 \rightarrow 4)$ glycosidisch miteinander verbunden sind (Abb. 4-36).^[166] In die dabei gebildeten (unpolaren, hydrophoben) Hohlräume können hydrophobe organische Gastmoleküle eingeschlossen werden, wodurch stabile Komplexe entstehen. So kann β -CD unter anderem zur Trennung von CIAS und TIAS verwendet werden. Diese Trennung beruht auf der von A. KHATIB ET AL. gefundenen bevorzugten Bindung von β -CD mit den *trans*-Isomeren.^[158] Bei dem

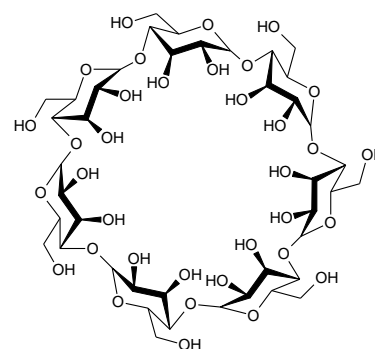


Abb. 4-36: Struktur von β -Cyclodextrin (β -CD).

folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob β -CD eventuell auch bereits während des Isomerisierungsprozesses einen Einfluss auf das C/T hat (Kap. 6.5.6). Es wurden die in Tab. 4-17 aufgeführten Ergebnisse erhalten. Anhand der niedrigen Umsätze wird ersichtlich,

dass das β -CD keine katalytische Wirkung auf die Isomerisierung besitzt (verglichen mit z.B. MgO oder FeO). Allerdings ist im Laufe der Reaktionszeit eine deutliche Steigerung der C/T erkennbar. Ob die TIAS jedoch tatsächlich Einschlusskomplexe mit dem β -CD bildeten und somit nicht mehr in der Lösung vorhanden waren oder ob von Anfang an weniger *trans*-Isomere gebildet wurden, konnte nicht zweifelsfrei ermittelt werden. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die TIAS bereits wieder rascher abgebaut wurden als die entsprechenden CIAS. Einschlusskomplexe (TIAS- β -CD) stellen jedoch eine durchaus denkbare Möglichkeit dar. In Abb. 4-37 sind die erhaltenen Chromatogramme dargestellt. Allgemein wurden relativ niedrige Umsätze erhalten, was mit der geringen Isomerisierungstemperatur von 70 °C zusammenhing. Allerdings konnte aufgrund des niedrigen Siedepunkts von MeOH (65 °C) nicht bei höheren Temperaturen gearbeitet werden.

Tab. 4-17: Isomerisierung in MeOH/H₂O/NaOH bei 70 °C unter Zugabe von β -Cyclodextrin (β -CD): C/T und U.

Zeit	C/T _(ICH)	C/T _(INH)	C/T _(IAH)	U [%]
30 min	2,49	3,87	3,29	1,5
60 min	2,68	3,88	4,94	2,4
120 min	19,57	27,27	31,05	2,7

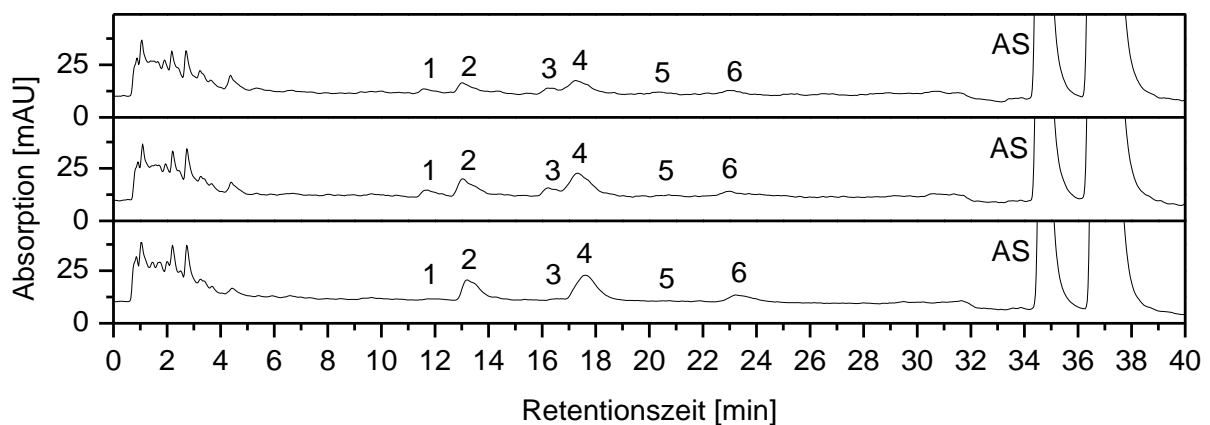


Abb. 4-37: Isomerisierung in MeOH/H₂O/NaOH bei 70 °C unter Zugabe von β -Cyclodextrin (β -CD), oben: t = 30 min, mitte: t = 60 min, unten: t = 120 min, 1: TICH, 2: CICH, 3: TINH, 4: CINH, 5: TIAH, 6: CIAH; Anlage 1, Säule 9.

4.4.6 Isomerisierung im Specksteingefäß

Auf die Zugabe von Katalysatoren beim Bierbrauen zur Steigerung der Isomerisierungsrate wird – zumindest in Deutschland – aufgrund des Reinheitsgebots (s. S. 26) größtenteils verzichtet. Daher wurde in der vorliegenden Forschungsarbeit nach einer Möglichkeit gesucht, die-

ses Gesetz zu umgehen und dennoch die Isomerisierung katalytisch steigern zu können. Da das Verbot explizit nur für die Zugabe eines Stoffes (Zutat) gilt, besteht theoretisch die Möglichkeit, den Brauvorgang – d.h. insbesondere das Kochen der Würze mit Hopfen – getreu dem Reinheitsgebot lediglich in einem Behältnis durchzuführen, dessen Material die Isomerisierung katalytisch beeinflussen könnte. Theoretisches Potential dazu besitzt das Mineral Speckstein. Dabei handelt es sich um ein Magnesiumsilikathydrat mit der chemischen Formel $\text{Mg}_3\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$.^[167] Hierbei kann theoretisch davon ausgegangen werden, dass die Mg^{2+} -Ionen die Fähigkeit zur katalytischen Beeinflussung der Isomerisierung besitzen. Aufgrund dessen wurde Speckstein, der in reiner Form zu 100 % aus Talk^{*[167,168]} besteht, als Gefäßmaterial gewählt und hinsichtlich seiner katalytischen Wirkung zur Steigerung der Isomerisierungsrate getestet.

Beim Kochen von Hopfenpellets in reinem H_2O unter Rückfluss zeigte sich im Specksteingefäß eine deutlich höhere Isomerisierung als im Glaskolben (Kap. 6.5.7). Somit bestätigte sich die erwünschte und theoretisch zu erwartende katalytische Steigerung der Isomerisierung durch das Specksteingefäß. Der Umsatz erreichte bereits nach 60 min sein Maximum (ca. 50 %), danach stellte sich ein Plateau ein. Die C/T der Isomerisierung im Specksteingefäß entsprachen mit einem Durchschnittswert von 3,25 in etwa den Werten der Isomerisierung mit Florisil® (MgSiO_3 , s. S. 70). Die entsprechenden Werte sind in Tab. 4-18 aufgeführt. Darunter befinden sich die dazugehörigen Chromatogramme (Abb. 4-38). Auffällig war außerdem, dass unter gleichen Bedingungen im Specksteingefäß deutlich weniger (polare) Abbauprodukte ($t_R = 0 - 6$ min) entstanden als im Glaskolben. Dies lässt darauf schließen, dass im Glaskolben auch bei längerer Isomerisierung die absolute IAS-Menge, die im Specksteingefäß erhalten wurde, nicht erreicht worden wäre. Somit war die Isomerisierung im Specksteingefäß nicht nur schneller, es wurden darüber hinaus auch höhere absolute IAS-Mengen erhalten.

Tab. 4-18: Isomerisierung in H_2O unter Rückfluss; Speckstein vs. Glas: 30 – 120 min: C/T und U.

Material	Zeit	C/T _(ICH)	C/T _(INH)	C/T _(IAH)	U [%]
Speckstein	30 min	TICH n.d.	TINH n.d.	IAH n.d.	9,7
Speckstein	60 min	3,12	3,72	3,24	50,4
Speckstein	120 min	3,01	3,36	3,05	49,0
Glas	30 min	TICH n.d.	TINH n.d.	IAH n.d.	2,2

* Weitere mögliche Bestandteile sind Magnesit (MgCO_3 , 40 – 50 %), Chlorit ($\text{H}_4(\text{Mg,Fe})_2\text{Al}_2\text{SiO}_{11}$, 2 – 10 %) und Magnetit (Fe_3O_4 , 0 – 15 %).

Material	Zeit	C/T _(ICH)	C/T _(INH)	C/T _(IAH)	U [%]
Glas	60 min	TICH n.d.	TINH n.d.	IAH n.d.	6,1
Glas	120 min	TICH n.d.	TINH n.d.	IAH n.d.	9,3

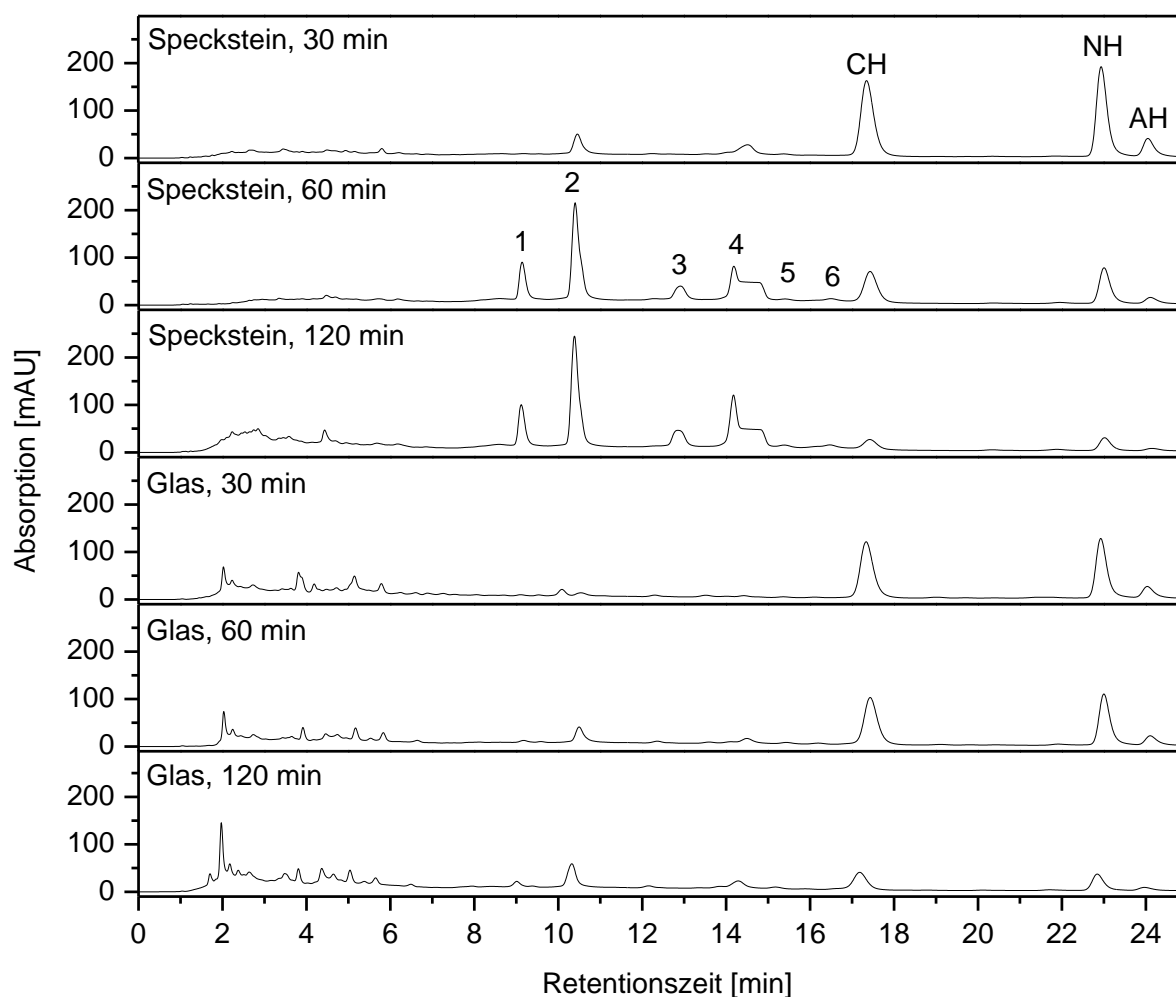


Abb. 4-38: Isomerisierung in H₂O unter Rückfluss; Speckstein vs. Glas: 30 – 120 min, 1: TICH, 2: CICH, 3: TINH, 4: CINH, 5: TIAH (nicht aufgelöst, Coelution mit CINH), 6: CIAH; Anlage 2, Säule 11, mobile Phase: 0,03 % TFA/ACN, Gradient: 0 – 18 min 50 % ACN, 18 – 25 min 50 % – 60 % ACN.

Die Mg²⁺-Ionen des Specksteins beeinflussten also die Isomerisierung in entionisiertem H₂O erheblich. Diesbezüglich wurde in einer weiteren Studie untersucht, ob die sich in der Gefäßwand befindlichen Mg²⁺-Ionen auch bei der dem Realfall entsprechenden Verwendung von (hierbei zweckdienlich ungehopfter) Bierwürze eine Rolle spielten (Kap. 6.5.7). Magnesium ist in der Würze in einer Menge von 80 – 100 mg/L vorhanden und stammt in erster Linie vom verwendeten Brauwasser sowie den gelösten Stoffen des Malzes (die vom Hopfen stammende Mg-Menge ist hier vernachlässigbar gering).^[23] Daher war zu testen, ob dieser relativ hohe Mg-Gehalt der (ungehopften) Würze den Einfluss des Specksteins vernachlässigbar macht oder ob sich dieser weiterhin katalytisch auf die Isomerisierung auswirkt. Die

Ergebnisse sowie die entsprechenden Chromatogramme sind in Tab. 4-19 bzw. Abb. 4-39 aufgeführt. Wie bei der Isomerisierung in H₂O war auch in der Würze eine deutliche Steigerung des Umsatzes durch die Verwendung des Specksteingefäßes erkennbar. Die C/T beim Speckstein-Ansatz waren etwas höher als bei der Isomerisierung in H₂O. Außerdem war die Isomerisierungsrate (U) sowohl im Specksteingefäß als auch im Glaskolben in der Würze merklich höher als in reinem H₂O (vgl. Tab. 4-18 bzw. Abb. 4-38). Ein Grund hierfür ist neben katalytisch wirkender Substanzen (Mg²⁺-Ionen etc.) unter anderem der etwas niedrigere pH-Wert der Würze (pH = 5,4 – 5,6^[169]) im Vergleich zu reinem Wasser.

Tab. 4-19: Isomerisierung in (ungehopfter) Würze unter Rückfluss; Speckstein vs. Glas: 60 min: C/T und U.

Material	Zeit	C/T _(ICH)	C/T _(INH)	C/T _(IAH)	U [%]
Speckstein	60 min	3,50	3,79	3,88	80,0
Glas	60 min	2,78	2,76	IAH n.d.	38,4

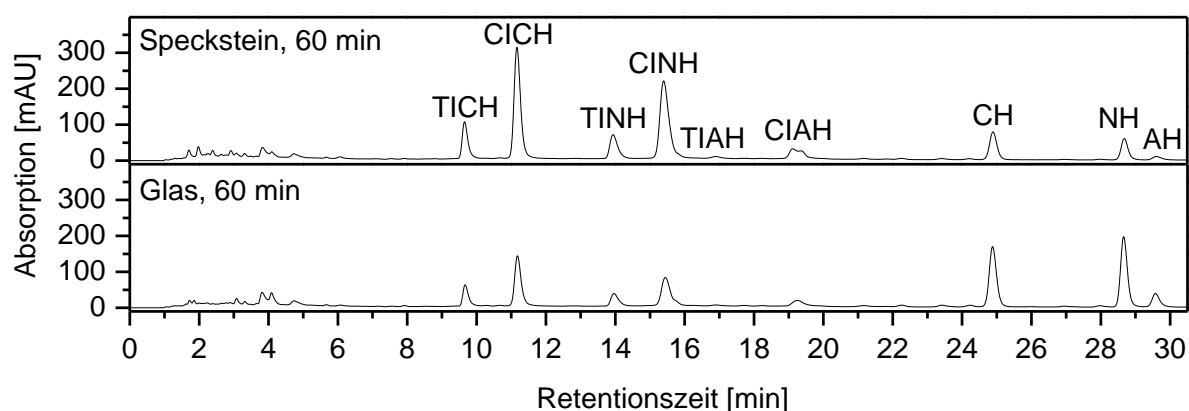


Abb. 4-39: Isomerisierung in (ungehopfter) Würze unter Rückfluss; Speckstein vs. Glas: 60 min; Anlage 2, Säule 11.

Zusammenfassend lässt sich anhand dieser Versuche festhalten, dass die Verwendung von speziellen Materialien, wie z.B. dem hier verwendete Speckstein, eine interessante Möglichkeit darstellt, ohne Verletzung des Reinheitsgebots eine katalytische Steigerung der Isomerisierungsrate zu erreichen. Neben der Verwendung von Gefäßen aus speziellen Materialien wäre auch der Einsatz von Rührwerken, welche aus den entsprechenden Materialien bestehen, denkbar.

Bei der Katalyse der Isomerisierung im Specksteingefäß waren zwei Fälle denkbar: Zum einen, dass die Isomerisierungskatalyse ausschließlich an der Oberfläche der Gefäßinnenwand stattfand. Zum anderen, dass die Reaktion durch eine gewisse Menge aus dem Speckstein gelöster Mg²⁺-Ionen beeinflusst wurde. Die Überprüfung, ob und wie viel Mg sich

beim Kochen von H₂O (je 10 mL, Kap. 6.5.7) aus dem Speckstein löst, ergab die in Tab. 4-20 aufgeführten Ergebnisse. Zur Kontrolle wurden die gleichen Ansätze zusätzlich in Glaskolben durchgeführt.

Tab. 4-20: ICP-OES; Test hinsichtlich des Herauslösens von Mg²⁺-Ionen aus dem Speckstein.

Ansatz-Nr.	Material	Hopfenzugabe (gemahlene Pellets)	C _{Mg}
1	Speckstein	ohne	2,04 mg/L
2	Glas	ohne	0,10 mg/L
3	Speckstein	mit (5,7 mg)	6,12 mg/L
4	Glas	mit (5,7 mg)	1,88 mg/L

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass sich beim Kochen von H₂O ein geringer Anteil Mg aus dem Speckstein löste (Ansatz 1 > Ansatz 2 bzw. Ansatz 3 > Ansatz 4). Allerdings war diese Menge angesichts der im Realfall in der verwendeten Würze herrschenden Mg-Konzentrationen von 80 – 100 mg/L vernachlässigbar. Daraus kann geschlossen werden, dass die Isomerisierung an der Oberfläche des Specksteingefäßes stattgefunden haben muss. Die jeweils erhöhten Mg-Konzentrationen in Ansatz 3 und 4 (bezogen auf Ansatz 1 bzw. 2) waren auf die Hopfenzugaben zurückzuführen. Warum jedoch bei Zugabe gleicher Mengen Hopfen die Mg²⁺-Ionen-Konzentration im Speckstein mehr ansteigt als im Glaskolben, kann nicht begründet werden.

4.4.7 Vergleich der unterschiedlichen Isomerisierungsversuche

In der folgenden Tabelle sind die wichtigsten Ergebnisse der Isomerisierungsversuche zusammengefasst:

Tab. 4-21: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der Isomerisierungsversuche.

Art der Isomerisierung	Verwendete Substanzen	Bemerkung	Relevante Werte
an fester Phase*	Aluminiumoxid, Aktivkohle, Kieselgel, Kieselgur, Aktivkohle, Florisil®	lediglich Florisil® zeigt gute katalytische Eigenschaften, bereits nach 30 min (bei 100 °C) maximaler Umsatz, relativ hohe C/T, auch bei niedrigeren Temperaturen deutliche Isomerisierung erkennbar	Florisil®: U = ca. 65 % C/T = 2,8 – 4,0 (100 °C)

Art der Isomerisierung	Verwendete Substanzen	Bemerkung	Relevante Werte	
in Lösung	wässrige Lösungen anorganischer Basen (KOH, NaOH)	KOH zeigt bessere katalytische Wirkung als NaOH	KOH: U = 60 – 70 % (100 °C, 30 – 60 min)	
	organische basische Lösemittel	kaum nennenswerte Isomerisierung	---	
	sonstige organische Lösemittel	leichte Isomerisierung in niedrigen Alkoholen (je unpolarer der Alkohol, desto weniger Isomerisierung)	---	
Zusatz etwaiger Katalysatoren**	a) in Lösung (Mischung aus MeOH, H ₂ O und NaOH)	alle Substanzen, die grundsätzlich zu einer Isomerisierung führen, erhöhen den Umsatz gegenüber einer Kontrollprobe mehr oder weniger stark	Kontrollprobe: U = 23,6 % C/T = ca. 2,2 (70 °C, 45 min)	
		anorganische Salze	Mg- und Ca-Salze besitzen die größte katalytische Wirkung hinsichtlich der Isomerisierung, verringern jedoch die C/T	U = ca. 75 % C/T = 1,6 – 1,7 (70 °C, 45 min)
		Eisenverbindungen haben erhöhte C/T zur Folge	U = 48,1 % C/T = 4 – 5 (70 °C, 45 min)	
	anorganische Oxide	lediglich zweiwertige Salze zeigen nennenswerte katalytische Wirkung	---	
		MgO mit der größten katalytischen Wirkung, aber Verringerung der C/T	U = 75,5 % C/T = 2,1 – 2,2 (80 °C, 60 min)	
		Fe-Oxide wiederum mit den höchsten C/T	C/T = 2,0 – 4,4 (80 °C, 60 min)	
b) ohne Lösemittel	anorganische Salze und Oxide	Oxide katalysieren auf diese Weise deutlich besser als Salze	---	
		Die größte katalytische Wirkung zeigten MgO, CaO und ZnO	MgO: U = 92,8 % C/T = 2 – 3 CaO: U = 79,5 % ZnO: U = 65,7 % (100 °C, 60 min)	
		Eisenverbindungen haben auch hier erhöhte C/T zur Folge	C/T = 4 – 6	
Sonstiges	Mischung aus MeOH, H ₂ O und NaOH unter Zugabe von β -CD	β -CD besitzt keine katalytische Wirkung; Gegenüber Kontrollproben sind die C/T erhöht – dies ist jedoch nicht eindeutig auf eine Komplexbildung von β -CD und TIAS zurückzuführen.	U = 2,4 % C/T = 2,7 – 4,9 (70 °C, 60 min)	

Art der Isomerisierung	Verwendete Substanzen	Bemerkung	Relevante Werte
	Speckstein	Speckstein katalysiert die Isomerisierung und wäre somit als Material zum Einsatz in der Brauerei – das Reinheitsgebot würde hierbei nicht verletzt werden – denkbar.	Speckstein: U = 80,0 % Glas: 38,4 % (60 min Kochen in ungehopfter Würze)

* Die verwendeten Substanzen dienen üblicherweise als Adsorptionsmaterialien.

** Hierbei handelte es sich um anorganische Salze und Oxide.

Wie aus den Werten ersichtlich ist, besitzen Magnesiumverbindungen im Allgemeinen die größten katalytischen Wirkungen (höchste U). Dieser Befund wurde bereits in der Literatur^[23,73] beschrieben und wird bei der Herstellung von isomerisierten Pellets ausgenutzt. In der vorliegenden Arbeit wurde bei der Isomerisierung mit MgO (ohne Lösemittel) der höchste Umsatz erzielt (92,8 %). Allerdings entstehen, wie aus den Ergebnissen zu entnehmen ist, niedrigere C/T als bei der Isomerisierung mit Florisil®. Während der Arbeit wurde, neben hohen Ausbeuten, auch auf möglichst hohe C/T geachtet (TIAS sind instabiler und werden im Bier schneller abgebaut). Daher wurde letztlich, insbesondere bei den später folgenden Isomerisierungen der isolierten AS-Fraktionen, Florisil® als Katalysator eingesetzt. Zudem wird Florisil® – genau wie MgO – in der Industrie als Lebensmittelzusatzstoff eingesetzt und ist daher unbedenklich. Isomerisierungen in Lösung lieferten erstens geringere Ausbeuten, zweitens war hier die Probenaufreinigung aufwendiger als bei der Isomerisierung an fester Phase.

4.5 Racemisierung von (6S)-Humulon

4.5.1 Racemisierung in Toluol unter Rückfluss (Referenzversuch)^[22]

Die Racemisierung von AS-*pur* in Toluol unter Rückfluss (Kap. 6.6.1) wurde gemäß G. A. HOWARD ET AL.^[22] durchgeführt und diente als Referenzversuch, mit dessen Ergebnis sämtliche andere Racemisierungen hinsichtlich der Ausbeute (Wiederfindung der AS (WF)) und Racemisierungsrate (Enantiomerenüberschuss (ee)) verglichen wurden. Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei dieser Racemisierungsart um ein in der Literatur beschriebenes Verfahren handelte, wurden die entstandenen rac-AS (\triangleq «rac-AS») auch für sämtliche weiterführende Versuche (z.B. Isomerisierung von rac-AS etc.) sowie bei der Suche nach der optimalen chiralen Säule verwendet. Das HPLC Chromatogramm von «rac-AS», welches die erfolgreiche vollständige Racemisierung zu (6S)/(6R)-CH (= rac-CH), (6S)/(6R)-NH

(= rac-NH) und (6*S*,2'*S*)/(6*S*,2'*R*)/(6*R*,2'*S*)/(6*R*,2'*R*)-AH (= rac-AH) zeigt, ist auf S. 63 in Abb. 4-19 (oben) zu sehen. Durch Vergleich der Proben, die nach 5 min und am Ende der Reaktion gezogen wurden, wurde deutlich, dass die AS während des 18-stündigen Kochens neben der Racemisierung auch insgesamt stark abgebaut wurden. Die ermittelte AS-Konzentration von «rac-AS» betrug 28 g/L, was einer Wiederfindung von 35,4 % entsprach. Da es sich um eine vollständige Racemisierung handelte, betrug der Enantiomerenüberschuss (ee) sowohl bei rac-CH als auch bei rac-NH 0,0 %. Der ee von rac-AH konnte aufgrund von Peaküberlagerungen (Abb. 4-19) nicht bestimmt werden.

Die aus «rac-AS» isolierten (Kap. 6.11) einzelnen Fraktionen rac-CH, rac-NH und rac-AH wurden mittels Säule 22 in ihre stereoisomeren Formen getrennt. Die entsprechenden Chromatogramme sind in Abb. 4-41 (B – D) abgebildet. Darüber (A) befindet sich zum Vergleich das Chromatogramm einer unbehandelten AS-Probe (nat-AS). In den Chromatogrammen von rac-CH und rac-NH sind die jeweils zwei Enantiomere, nämlich (6*S*)-AS und (6*R*)-AS erkennbar. Bei den restlichen kleinen Peaks handelt es sich um undefinierbare, entweder bei der präparativen HPLC mitgeschleppte Substanzen oder um Abbauprodukte der jeweiligen AS. Auffällig ist beim rac-AH-Chromatogramm das Vorhandensein von vier Peaks. Dabei handelt es sich bei allen vier Peaks um AH. Da das AH, anders als das CH und NH, zwei Stereozentren besitzt (C-6- und C-2'-Atom, Abb. 4-40), existieren nach der (künstlichen) Racemisierung insgesamt vier stereoisomere Formen (AH-1, AH-2, AH-3 und AH-4). Hierbei handelt es sich bei AH-1 um das natürlich vorkommende (6*S*,2'*S*)-AH^[61], während bei AH-2 – AH-4 die Konfigurationen an den beiden Stereozentren nicht zugeordnet werden können ((6*S*,2'*R*)-, (6*R*,2'*S*)-, (6*R*,2'*R*)-AH). Hierfür wären u.a. NMR-Analysen oder Röntgenstrukturanalysen nach einer vorhergehenden Kristallisation nötig, was jedoch im Rahmen dieser Forschungsarbeit nicht möglich war. Allerdings steht zweifelsfrei fest, dass es sich beim Peak AH-1 um das in natürlichem Hopfen (in dominierender Menge) vorliegende AH handelt. Daher wird dieses während dieser Forschungsarbeit, gemäß S-CH und S-NH, auch als S-AH bezeichnet.

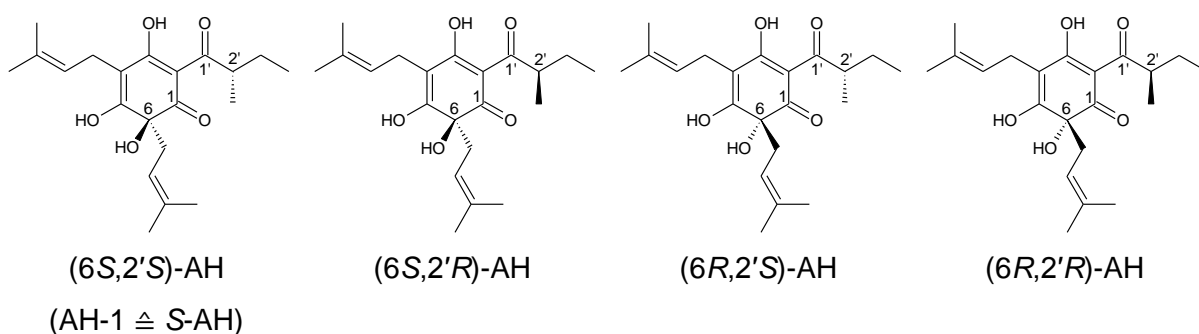


Abb. 4-40: ad-Humulon (AH) mit zwei Stereozentren: Vier stereoisomere Formen (AH-1, AH-2, AH-3, AH-4).

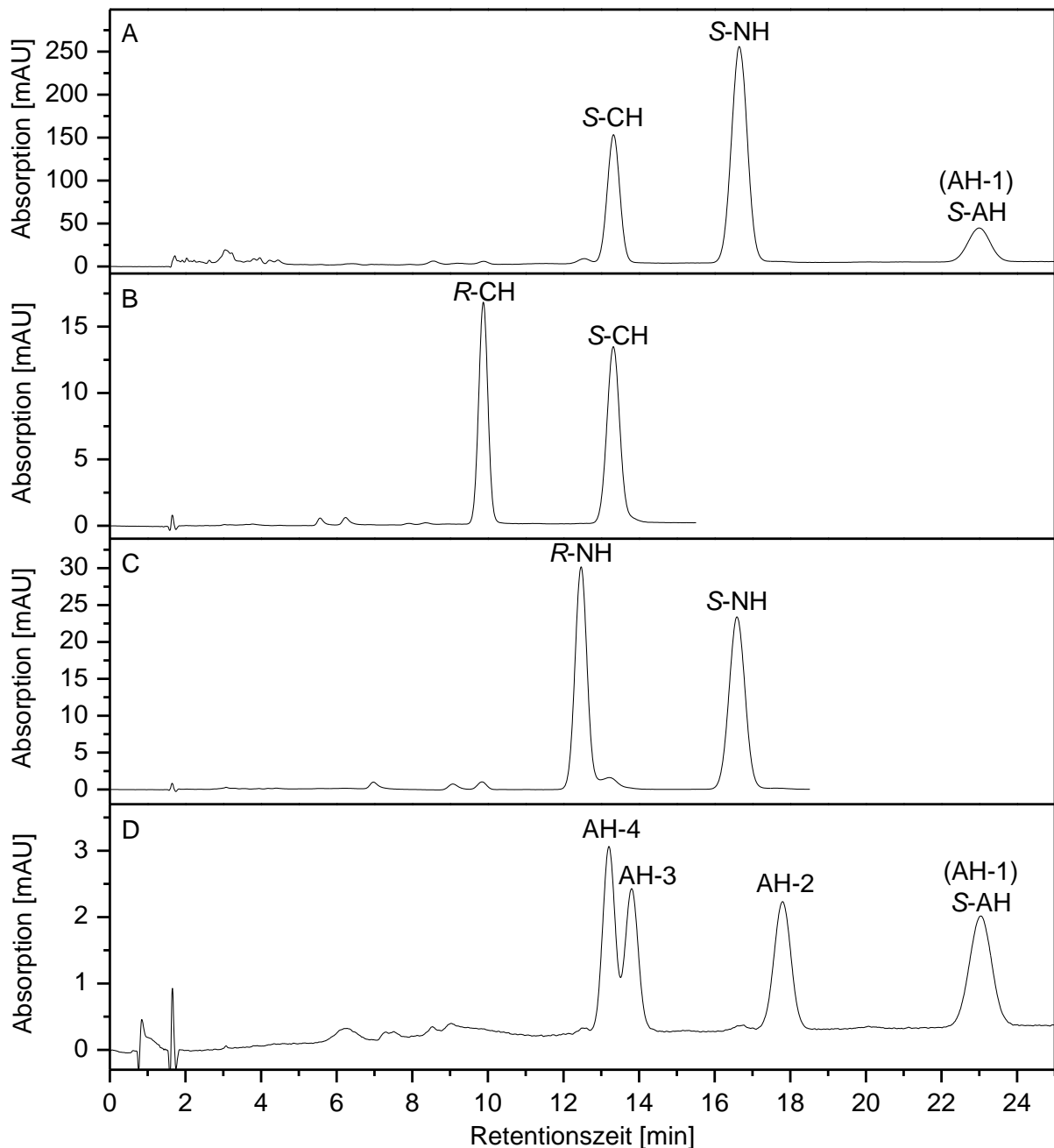


Abb. 4-41: HPLC Chromatogramme; chirale Trennung von (A) nat-AS (2 g/L), (B) rac-CH (0,4 g/L), (C) rac-NH (0,8 g/L) und (D) rac-AH (0,2 g/L), jeweils 5 μ L injiziert, Anlage 2, Säule 22, HPLC-Methode-5.

Der Test der 1-stündigen Racemisierung von gemahlenden Pellets in Toluol unter Rückfluss (Kap. 6.6.1) ergab folgendes Chromatogramm (Abb. 4-42). Die dabei bereits stattgefundenene Racemisierung konnte durch das deutliche Vorhandensein der (*R*)-Enantiomere von CH und NH gezeigt werden. Es lagen nach 60 min folgende Enantiomerenüberschüsse vor:

$$ee_{(S-CH)} = 82,2 \%$$

$$ee_{(S-NH)} = 84,3 \%$$

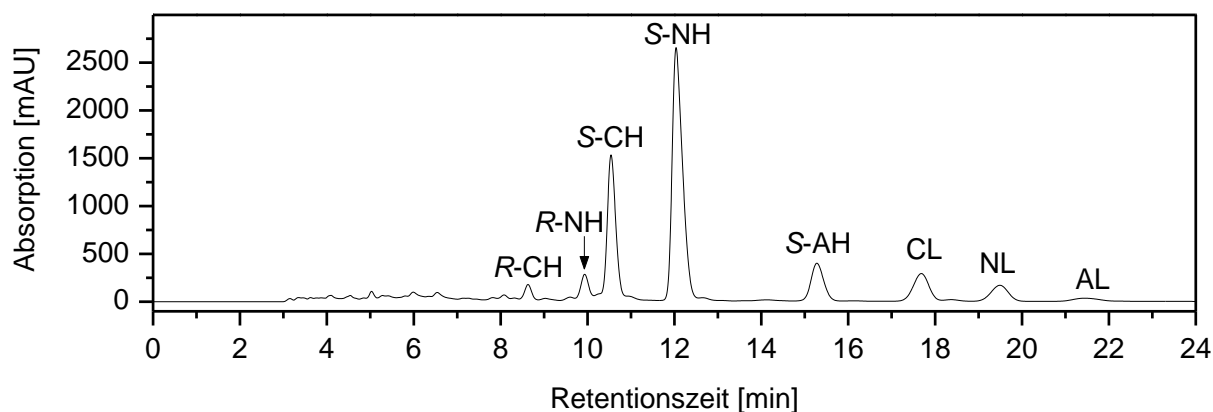


Abb. 4-42: 1-stündige Racemisierung von Pellets in Toluol unter Rückfluss; Anlage 2, Säule 22, HPLC-Methode-9.

Durch diesen Versuch konnte zweifelsfrei gezeigt werden, dass es sich bei den Peaks mit $t_R = 8,6$ und $9,9$ min um die (*R*)-Enantiomere von CH und NH handelte. Konnten diese bei AS aus unbehandeltem Hopfen (\triangleq nat-AS) aufgrund ihrer geringen Menge noch nicht zweifelsfrei als AS identifiziert werden, so waren die Peaks nun nach 1-stündiger Racemisierung groß genug. Dass es sich dabei um die jeweils gleiche Substanz handelte und nicht durch die Wärmebehandlung gänzlich neue Peaks entstanden, zeigten sowohl die exakt identischen Retentionszeiten als auch die Massenspektren mit Hauptmassen bei $m/z = 349$ (CH) bzw. $m/z = 363$ (NH) (vgl. Abb. 4-8).

4.5.2 Temperaturabhängigkeit der Racemisierungs-Geschwindigkeit

Die Geschwindigkeit der Racemisierung von AS-*pur* in Lösung wurde bei vier verschiedenen Temperaturen ($120\text{ °C} - 150\text{ °C}$, Kap. 6.6.2) untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass sich die Zeit bis zur vollständigen Racemisierung bzw. bis zu dem Zeitpunkt, ab dem sich die prozentualen Anteile der jeweiligen Enantiomere von CH, NH und AH nicht mehr änderten, bei Erhöhung der Temperatur um 10 °C jeweils halbierte (Tab. 4-22). Die entsprechenden Diagramme befinden sich im Anhang 6 (Abb. 8-7 – Abb. 8-10). Die Wiederfindungswerte (WF) der Gesamt-AS-Menge zu den Zeitpunkten der vollständigen Racemisierung lagen im Bereich des Referenzversuchs (Toluol, unter Rückfluss, 111 °C , 18 h: 35,4 %) (Tab. 4-22), wengleich aufgrund der höheren Temperaturen ein etwas stärkerer Abbau erfolgte. Bei einer z.B. 16-fachen Reaktionszeitverkürzung bei 150 °C (vs. 111 °C) ist eine derartige Verringerung der Wiederfindung jedoch durchaus annehmbar und einem Kochen in Toluol vorzuziehen. Beim 140 °C -Ansatz traten höchstwahrscheinlich Verdünnungs- oder andere, systembedingte Fehler auf, sodass der viel zu hohe WF-Wert nicht aussagekräftig ist.

Tab. 4-22: Zeit bis zur vollständigen Racemisierung bei unterschiedlichen Temperaturen (*AS-pur* in Xylol: 120 – 150 °C).

Temperatur	Zeit bis zur vollständigen Racemisierung	WF (AS-Menge relativ zur Ausgangsmenge)
120 °C	8 h	32,3 %
130 °C	4 h	27,5 %
140 °C	2 h	63,4 %*
150 °C	1 h	23,9 %

* Wert höchstwahrscheinlich fehlerbehaftet.

4.5.3 Racemisierung von Hopfenextrakt bei 32 °C

Bei der Erwärmung von Hopfenextrakt auf 32 °C (Kap. 6.6.3) sollte untersucht werden, ob auch bei tiefen Temperaturen eine Racemisierung der AS auftritt. Diese Temperatur wurde gewählt, um eine ungekühlte Hopfenlagerung bei sommerlichen Temperaturen zu simulieren. Nach Auswertung der Chromatogramme wurden die in Tab. 4-23 aufgeführten Ergebnisse erhalten. Darunter sind diese nochmals graphisch dargestellt (Abb. 4-43). Beispielhaft sind in Abb. 4-44 das UV- bzw. die MS-Chromatogramme der letzten Probe (78 d) abgebildet. Es ist eindeutig ein stetiger Zuwachs der (*R*)-Enantiomere von CH und NH erkennbar (sinkende $ee_{(S)}$ -Werte). Die neugebildeten AHs lagen aufgrund der geringen Menge unter der Nachweisgrenze und konnten deshalb nicht detektiert werden. Es konnte im Rahmen der Messgenauigkeit kein signifikanter AS-Abbau festgestellt werden. Während in der Literatur^[22] davon ausgegangen wird, dass eine Racemisierung erst bei höheren Temperaturen stattfindet ($T > 80$ °C), konnte anhand dieses Versuches bewiesen werden, dass die AS auch bei niedrigeren Temperaturen racemisieren.

Tab. 4-23: Racemisierung von Hopfenextrakt bei 32 °C (7 – 78 d): $ee_{(S)}$.

Zeit	$ee_{(S-CH)}$	$ee_{(S-NH)}$
0 d	99,4 %	99,5 %
7 d	96,1 %	96,3 %
15 d	94,2 %	95,5 %
21 d	92,4 %	95,1 %
29 d	91,8 %	94,6 %
35 d	90,9 %	93,9 %
50 d	89,5 %	92,8 %

Zeit	$ee_{(S-CH)}$	$ee_{(S-NH)}$
57 d	89,4 %	92,5 %
64 d	88,7 %	92,2 %
78 d	88,0 %	91,6 %

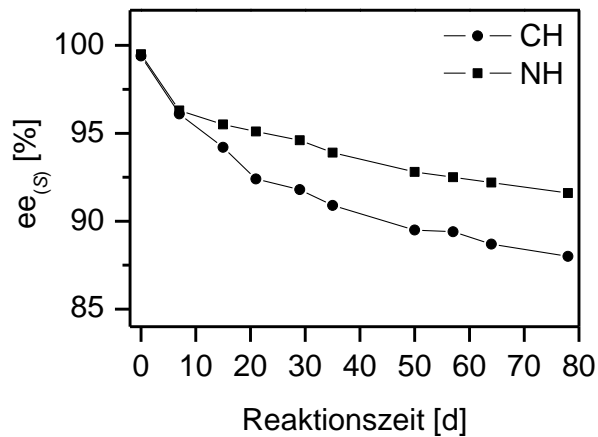


Abb. 4-43: Racemisierung von Hopfenextrakt bei 32 °C (7 – 78 d): $ee_{(S)}$.

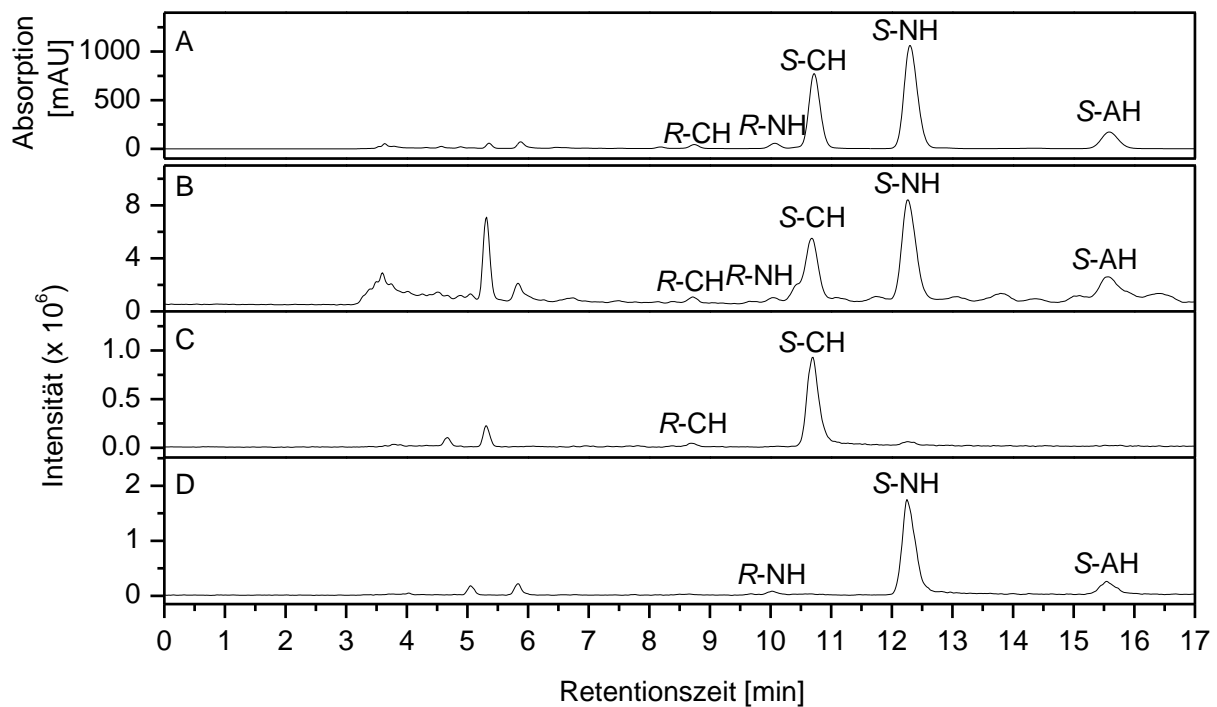


Abb. 4-44: Racemisierung von Hopfenextrakt bei 32 °C (78 d), HPLC Chromatogramme; (A) UV (290 nm), (B) MS (TIC), (C) MS ($m/z = 349$), (D) MS ($m/z = 363$); Anlage 1, Säule 22.

4.5.4 Racemisierung von Hopfenpellets in Wasser

In der Literatur^[21,22] wird ausschließlich von einer Humulon-Racemisierung in organischen Lösemitteln berichtet. Um zu testen, ob dies auch in Wasser der Fall ist, wurden Hopfenpellets für zwei Stunden in Wasser bei 100 °C erhitzt (Kap. 6.6.4). Parallel dazu wurde zum Vergleich ein Referenzversuch in Toluol durchgeführt. Die Ergebnisse sind im Folgenden tabellarisch zusammengefasst (Tab. 4-24). In Abb. 4-45 sind die entsprechenden Chromatogramme zu sehen. Demnach findet auch in Wasser – zwar in geringerem Ausmaß als in Toluol, allerdings dennoch offenkundig ($ee_{(S)}$ ca. 92 %) – durchaus eine Racemisierung statt. Allerdings ist hier erwartungsgemäß auch eine Isomerisierung zu IAS eingetreten. Im Realfall des Bierbrauens wäre diese aufgrund der Tatsache, dass anstelle des hier verwendeten Wassers in Würze gekocht wird, noch deutlich weiter voran geschritten, sodass die Racemisierung während des Bierbrauens nur marginale Bedeutung findet.

Tab. 4-24: 2-stündige Racemisierung von Hopfenpellets in Toluol bzw. H₂O bei 100 °C: Erkenntnisse, WF und $ee_{(S)}$.

Lösemittel	Toluol	H ₂ O
Racemisierung	deutliche Racemisierung bereits nach 2 h	geringe Racemisierung nach 2 h
Geschwindigkeit der Racemisierung	CH racemisiert rascher als NH	CH racemisiert gleich schnell bis langsamer als NH
Isomerisierung	keine Isomerisierung zu IAS	deutliche Isomerisierung zu IAS Isomerisierungsrate: (12,0 %)
allgemeiner AS-Abbau	hoher allgemeiner AS-Abbau zu undefinierbaren (polaren) Abbauprodukten	relativ wenig allgemeiner AS-Abbau
WF der AS (bezogen auf t = 0)	37,9 %	35,4 %*
$ee_{(S-CH)}$	76,6 %	92,5 %
$ee_{(S-NH)}$	84,0 %	92,3 %

* die Wiederfindung bei H₂O ist nicht aufgrund des allgemeinen AS-Abbaus derart gering, sondern hauptsächlich infolge der Isomerisierung zu IAS.

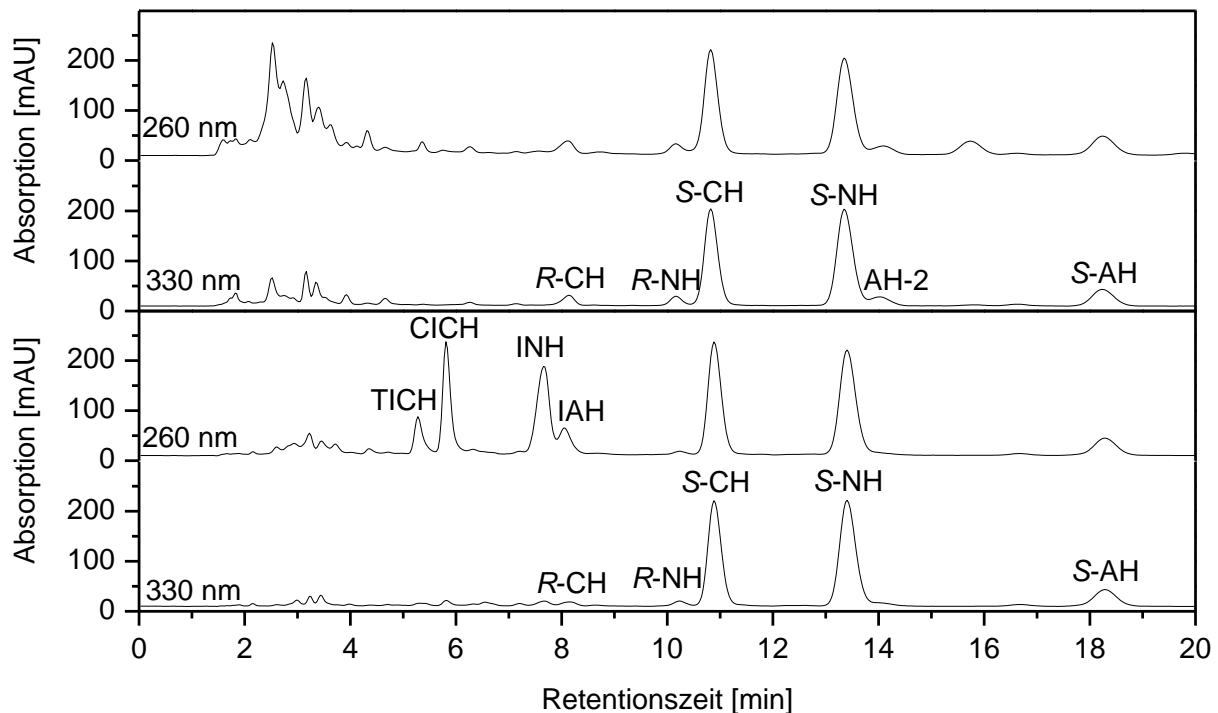


Abb. 4-45: 2-stündige Racemisierung von Hopfenpellets in Toluol (oben) bzw. H₂O (unten) bei 100 °C im Temperierbad; Anlage 1, Säule 22, HPLC-Methode-5.

4.5.5 Racemisierung von Iso- α -Säuren

Bei diesem Versuch sollte getestet werden, ob auch die IAS – äquivalent zu den AS – durch 18-stündiges Kochen in Toluol racemisieren (Kap. 6.6.5). Zwar waren nach dem Kochen noch sämtliche IAS vorhanden, d.h. es hat kein IAS-Abbau stattgefunden, allerdings war auch keinerlei Racemisierung der IAS festzustellen. Der Grund dafür ist, dass der bei der AS-Racemisierung vorgeschlagene kryptoionische Mechanismus^[21] bei den IAS nicht möglich ist: Während bei den AS am kryptoionischen Racemisierungmechanismus eine Isopentenyl-Seitenkette (am C-6-Atom, vgl. Abb. 3-12) beteiligt ist, liegt bei den IAS am C-4-Atom, welches bei einer etwaigen Racemisierung das entscheidende stereogene C-Atom wäre, eine Isohexenoyl-Seitenkette vor (Abb. 4-46).

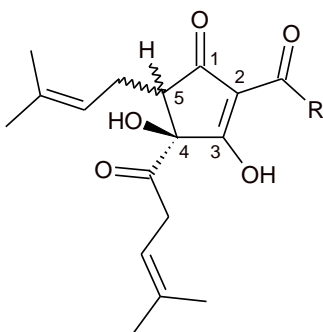


Abb. 4-46: Strukturformel von (4S)-*cis*/*trans*-IAS.

4.6 Detektion mittels des Polarimeters (OR-Detektion)

Mittels des in Serie zum UV-Detektor installierten Polarimeters MCP 500 konnten in der vorliegenden Studie erstmals die durch chirale HPLC getrennten AS-Enantiomere hinsichtlich ihrer optischen Rotation online detektiert werden. Dazu musste am Polarimeter aus den sieben möglichen Wellenlängen zunächst die geeignete Wellenlänge ermittelt werden, bei der die optische Rotation einen maximalen Betrag einnahm (Kap. 6.7). Durch empirisches Testen wurde schließlich $\lambda = 404 \text{ nm}$ als die dabei geeignetste Wellenlänge ausgemacht. Diese Wellenlänge stimmt von den möglichen sieben am besten mit dem Minimum der optischen Rotationsdispersionskurve von Humulon überein und ergab somit erwartungsgemäß die höchsten Signale. In Tab. 4-25 bzw. Abb. 4-47 sind die entsprechenden Werte aufgeführt. Diese bestätigen das Vorhandensein eines negativen Cotton-Effekts.

Tab. 4-25: OR in Abhängigkeit der Wellenlänge (λ); Probe: AS-pur, 100 mg/L in MeOH.

Wellenlänge (λ)	optische Rotation (OR)
880 nm	-0,0080 °
589 nm	-0,0135 °
578 nm	-0,0216 °
546 nm	-0,0247 °
435 nm	-0,0770 °
404 nm	-0,1700 °
365 nm	Wert nicht messbar, da nicht konstant**

** 365 nm liegt bereits sehr nahe an dem Nulldurchgang der optischen Rotationsdispersionskurve.

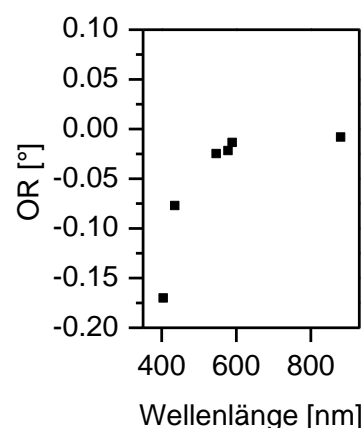


Abb. 4-47: OR in Abhängigkeit der Wellenlänge (λ); Probe: AS-pur, 100 mg/L in MeOH.

Für die Messungen wurden die Säulen intendiert überladen (v.a. ersichtlich aus dem jeweiligen UV-Chromatogramm [UV-C]*), um ausreichend hohe Signale bei der OR-Detektion zu erhalten.

α -Säuren:

Bei den Proben handelte es sich um AS-pur (unbehandelte AS) bzw. um «rac-AS» (künstlich racemisierte AS). Die entstandenen Chromatogramme mit UV- bzw. OR-Detektion sind in Abb. 4-48 – Abb. 4-51 zu sehen.

* Hier wurde zum Teil der maximal detektierbare Wert von 1500 mAU überschritten (s. z.B. Abb. 4-48), wodurch ein Rückschluss der Peakhöhen auf die Substanzmenge nicht möglich ist.

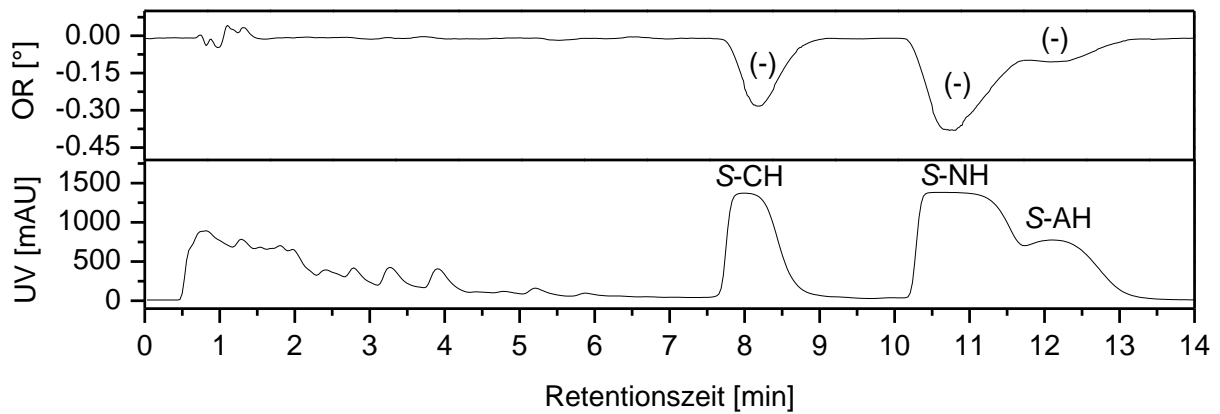


Abb. 4-48: OR-Messungen von *AS-pur* (nat-AS) auf Säule 11 (C-18); unten: UV-Detektion, oben: OR-Detektion.

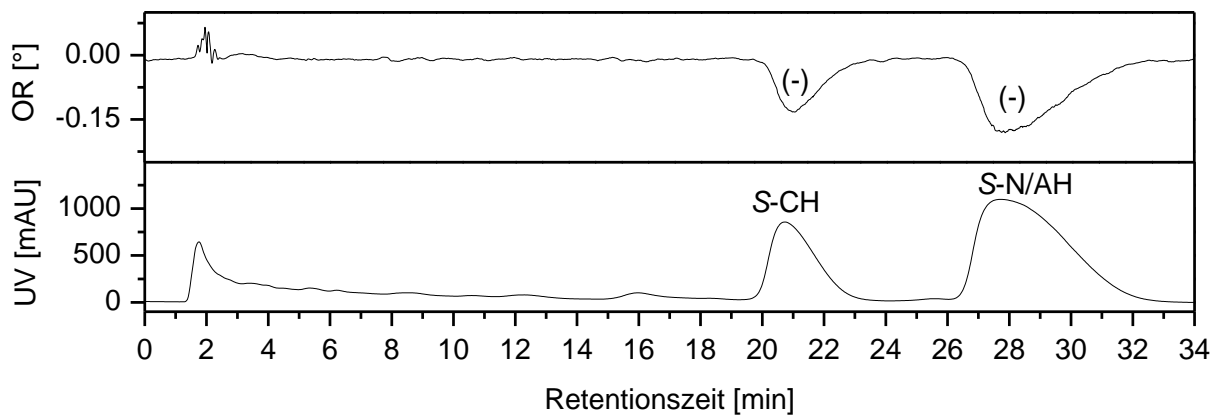


Abb. 4-49: OR-Messungen von *AS-pur* (nat-AS) auf Säule 16 (chiral); unten: UV-Detektion, oben: OR-Detektion.

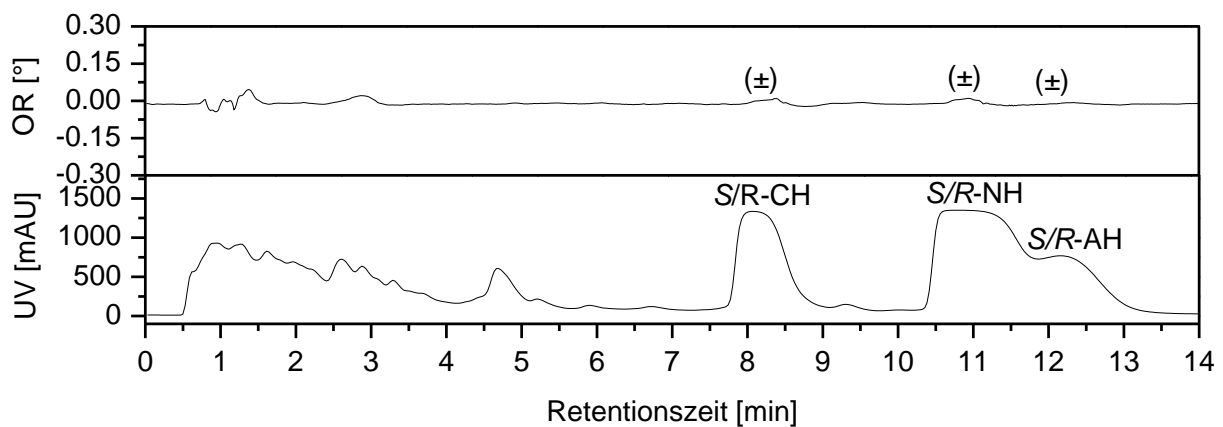


Abb. 4-50: OR-Messungen von *rac-AS* auf Säule 11 (C-18); unten: UV-Detektion, oben: OR-Detektion.

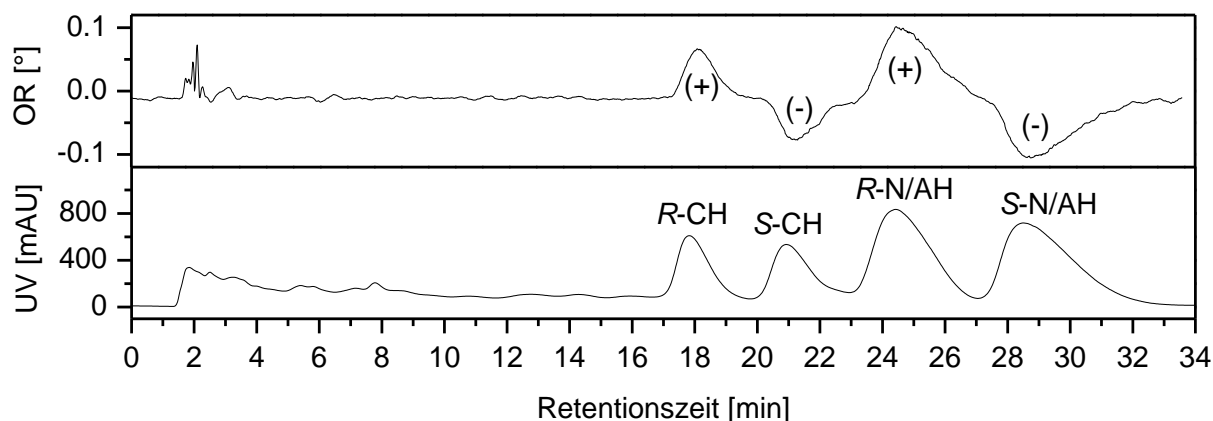


Abb. 4-51: OR-Messungen von rac-AS auf Säule 16 (chiral); unten: UV-Detektion, oben: OR-Detektion.

Zusammenfassend kann hinsichtlich der online-OR-Detektion von AS festgehalten werden, dass der qualitative Nachweis der einzelnen AS-Enantiomere hervorragend gelang. Wie aus der Literatur bekannt ist, drehen die in unbehandeltem Hopfen überwiegend vorkommenden S-AS^[20] polarisiertes Licht nach links (-)^[19] (Abb. 4-48 und Abb. 4-49), während die (durch künstliche Racemisierung entstehenden) R-AS rechtsdrehend (+) sind (Abb. 4-51). Allerdings war auf diese Art und Weise kein quantitativer Nachweis der AS möglich. Eine Kalibrierung konnte nicht durchgeführt werden, da die Daten der OR-Chromatogramme (OR-C) lediglich als Textdatei vorlagen (XY-Daten) und keine Integration der Peakflächen möglich war. Aufgrund der Tatsache, dass die genaue AS-Konzentration in der Probenzelle unbekannt war, konnte deren spezifische Drehung nicht ermittelt werden. Eine Möglichkeit zur weiteren Signalsteigerung wäre die Verringerung des Probenzellenvolumens durch Verkleinerung des Innendurchmessers. Dadurch würde die AS-Konzentration im Inneren der Probenzelle ansteigen, was eine Erhöhung der optischen Rotation zur Folge hätte. Vergleicht man die Peaks im OR-C allerdings relativ zueinander (Abb. 4-51), so lässt sich erkennen, dass die Drehwerte der beiden N/AH-Enantiomere jeweils höher sind als die der CH-Enantiomere. Äquivalent zum UV-C entspricht dies einer höheren N/AH-Menge im Vergleich zu CH. Auch die jeweilige (R)-Form scheint ein höheres Signal zu besitzen als das entsprechende (S)-Enantiomer. Dies liegt in der kürzeren t_R und dem folglich leicht schärferen Peak begründet. Abb. 4-50 zeigt im OR-C einen nahezu linearen Verlauf. Dies zeigt, dass sich die optischen Rotationen der linksdrehenden S-AS mit denen der rechtsdrehenden R-AS gegenseitig aufheben, da hier keine Enantiomertrennung erfolgt (RP-HPLC C-18). Die kleinen Erhebungen im OR-C von Abb. 4-50 (mit \pm) gekennzeichnet zeigen jedoch, dass die rechtsdrehenden R-(+)-AS in geringem Überschuss vorliegen müssen.

Iso- α -Säuren:

Bei den Proben handelte es sich um *Iso-90* (unbehandelte IAS, nat-IAS) bzw. um «rac-IAS» (Isomerisierung von künstlich racemisierten AS). Während die online-Detektion bei den AS sehr gut gelang, funktionierte dies bei den IAS nur bedingt. Hier war – trotz einer im Vergleich zu den AS 100-fach konzentrierteren Lösung – keine optische Rotationsdispersionskurve erstellbar, da sich die OR-Werte bei variierenden Wellenlängen nicht sonderlich unterschieden; $\lambda = 435 \text{ nm}$ ergab schließlich die höchsten Signale. Im Allgemeinen waren jedoch deutlich niedrigere Signale als bei den AS zu beobachten, was auf eine deutlich geringere Drehung von polarisiertem Licht durch IAS im Vergleich zu AS zurückzuführen war. Dennoch konnte der aus der Literatur^[20] bekannte Sachverhalt bestätigt werden, dass die drei *cis*-IAS-1 ((4*S*,5*R*)-IAS, von *S*-AS stammend) positiv drehend (+) sind (Abb. 4-52 und Abb. 4-53), während die *cis*-IAS-2 ((4*R*,5*S*)-IAS, von *R*-AS stammend) polarisiertes Licht in negative Richtung (–) drehen (Abb. 4-53). Die *trans*-IAS konnten mittels des Polarimeters nicht detektiert werden, da sie in zu geringen Konzentrationen vorlagen. Genau wie bei den AS waren auch hier keine quantitativen Aussagen möglich. Die einzelnen IAS konnten lediglich relativ zueinander betrachtet werden. Wie aus den folgenden beiden Abb. 4-52 und Abb. 4-53 ersichtlich ist, gelang es dennoch, die optischen Rotationen, zumindest der mengenmäßig dominierenden IAS, online zu detektieren.

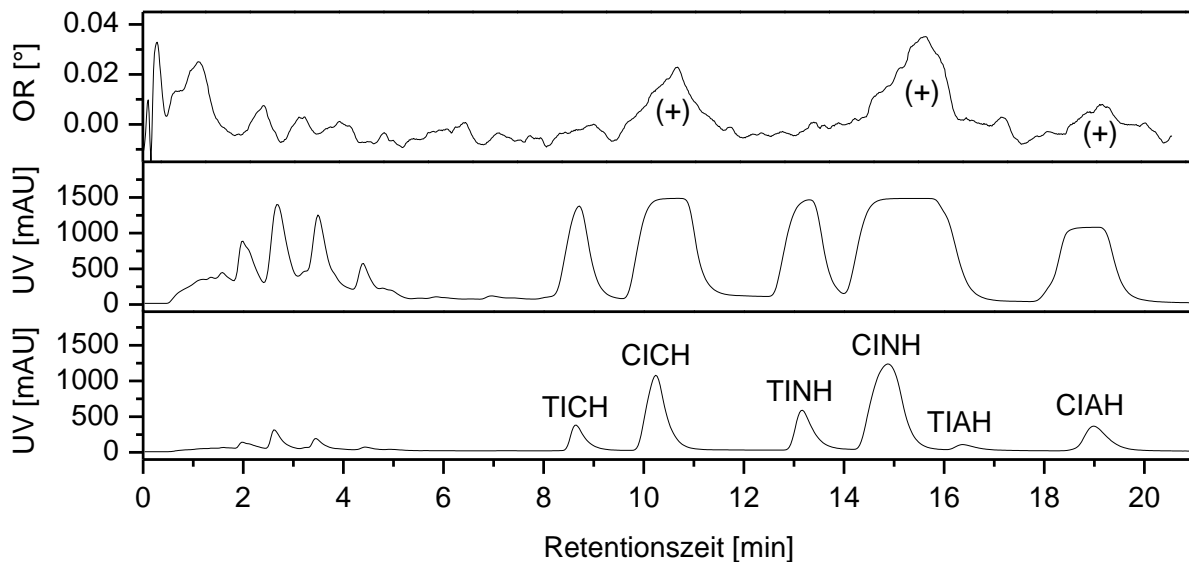


Abb. 4-52: OR-Messungen von *Iso-90* (nat-IAS) auf Säule 11 (C-18); unten: UV-Detektion (Kontrolle), mitte: UV-Detektion (intendierte Überladung der Säule), oben: OR-Detektion.

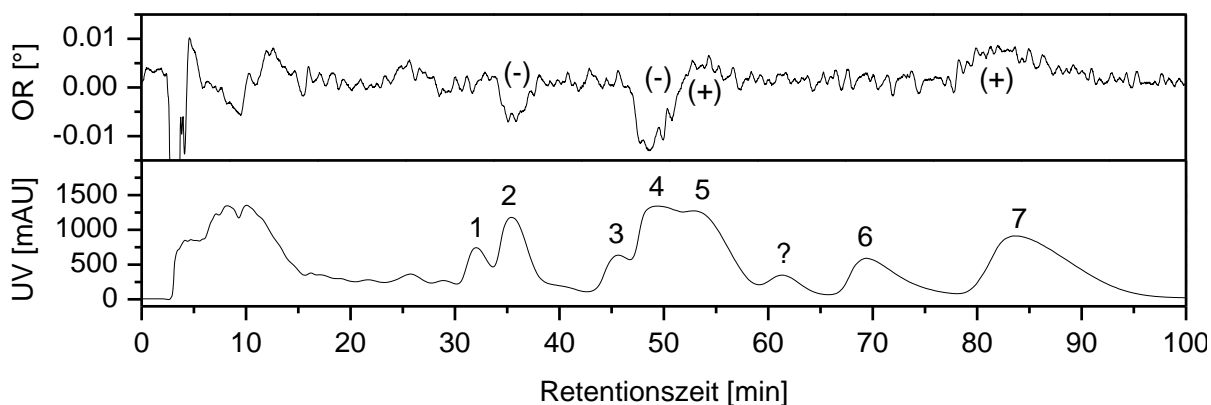


Abb. 4-53: OR-Messungen von «rac-IAS» (rac-IAS) auf Säule 16 (chiral); unten: UV-Detektion, oben: OR-Detektion; 1: TICH-2, 2: CICH-2, 3: TICH-1, 4: CINH-2, 5: CICH-1, 6: TINH-1, 7: CINH-1.

Die OR-Detektion konnte leider nur in Verbindung mit der chiralen Trennung auf Säule 16 durchgeführt werden. Da es sich beim Polarimeter lediglich um ein Leihgerät der Firma Anton Paar handelte, war dieses während der Verwendung der deutlich effizienteren Säule 22 nicht mehr vorrätig. Dennoch konnte auf diese Weise die Existenz der Enantiomere (gleiche t_R auf C-18-Säulen, unterschiedliche t_R auf chiralen Säulen) aufgrund der gegensätzlichen optischen Rotationen von (*S*)- und (*R*)-Humulon bewiesen werden.

4.7 Analyse verschiedener Hopfensorten hinsichtlich der AS-Enantiomere

Die Analyse verschiedener Hopfensorten aus Deutschland, Polen und Slowenien (Kap. 6.1 und 6.8) ergab die im Anhang 7 abgebildeten Chromatogramme (Abb. 8-11 und Abb. 8-12). Hierbei konnte die Existenz von (*R*)-Enantiomeren zunächst aufgrund coelulierender Substanzen – diese waren in den Chromatogrammen bei 290 nm zwar kaum detektierbar, erschwerten allerdings einen genauen Vergleich der UV-Spektren etwaiger *R*-AS mit den *S*-AS – nicht verifiziert werden. Dennoch kann aufgrund ähnlicher Kurvenverläufe der UV-Spektren etwaiger *R*-AS und *S*-AS (v.a. bei CH) durchaus von einem Vorhandensein der (*R*)-Enantiomere ausgegangen werden. In Tab. 4-26 sind die prozentualen Anteile von *S*- und *R*-CH aufgeführt. Aufgrund der schwierigen quantitativen Auswertung sollten diese Werte allerdings mit Vorsicht betrachtet werden. Bei NH wurde auf eine exakte Auswertung verzichtet, da *R*-NH noch mehr durch coelulierende Substanzen beeinflusst wurde als dies bei *R*-CH der Fall war. Auffallend war beim Vergleich der verschiedenen Sorten, dass die Menge an *R*-AS genetisch bedingt ist und die prozentualen Anteile von Sorte zu Sorte variieren. Pellets und Rohhopfen ergaben hinsichtlich der Mengen an *R*-AS vergleichbare Ergebnisse. Dadurch kann die Pelletierung als Ursache der Bildung von (*R*)-Enantiomeren (Racemisierung) ausgeschlossen werden. Weder die US-amerikanischen noch die neuseeländischen Hopfensor-

ten (Kap. 6.1 und 6.8), welche naturgemäß anderen klimatischen Bedingungen als die heimischen Sorten ausgesetzt sind, zeigten Auffälligkeiten hinsichtlich der prozentualen Anteile der (*R*)-Enantiomere (Tab. 4-26). Lediglich die englische Hopfensorte Target wies einen etwas höheren (*R*)-Anteil auf, als alle anderen getesteten Sorten. Ob dies jedoch genetisch (Target) oder klimatisch (England) bedingt ist, müsste anhand anderer Ernte-Jahre von Target bzw. weiterer englischer Sorten getestet werden. Im Anhang 7 sind die entsprechenden Chromatogramme abgebildet (Abb. 8-13).

Tab. 4-26: Prozentualen Anteile von *S*- und *R*-CH in verschiedenen Hopfensorten (jeweils Pellets und Rohhopfen).

Pellets			Rohhopfen		
Hopfensorte*	<i>R</i> -CH [%]	<i>S</i> -CH [%]	Hopfensorte*	<i>R</i> -CH [%]	<i>S</i> -CH [%]
Apollo (USA)	2,8	97,2	kein Rohhopfen der Sorte Apollo vorhanden		
Aurora (Slowenien)	2,5	97,5	Aurora (Slowenien)	2,1	97,9
Green Bullet (Neuseeland)	1,2	98,8	kein Rohhopfen der Sorte Green Bullet vorhanden		
Hallertauer Magnum	1,6	98,4	Hallertauer Magnum	1,5	98,5
Hallertauer Taurus	3,0	97,0	Hallertauer Taurus	3,1	96,9
Hallertauer Tradition	2,0	98,0	Hallertauer Tradition	2,0	98,0
Herkules	1,3	98,7	Herkules	1,5	98,5
Marynka (Polen)	2,6	97,4	Marynka (Polen)	2,7	97,3
Nelson Sauvín (Neuseeland)	1,9	98,1	kein Rohhopfen der Sorte Nelson Sauvín vorhanden		
Northern Brewer	2,1	97,9	Northern Brewer	1,9	98,1
Nugget	1,2	98,8	Nugget	1,1	98,9
Pacific Gem (Neuseeland)	1,1	98,9	kein Rohhopfen der Sorte Pacific Gem vorhanden		
Pacific Jade (Neuseeland)	1,9	98,1	kein Rohhopfen der Sorte Pacific Jade vorhanden		
Perle	2,2	97,8	kein Rohhopfen der Sorte Perle vorhanden		
Select	1,2	98,8	Select	1,3	98,7
Target (England)	4,7	95,3	kein Rohhopfen der Sorte Target vorhanden		
Zeus (USA)	1,8	98,2	kein Rohhopfen der Sorte Zeus vorhanden		

* Die Hopfensorten, bei denen kein Land angegeben ist, stammen aus Deutschland.

Da die direkte Überprüfung der Existenz von (*R*)-Humulon in unbehandeltem Hopfen aufgrund der Vielzahl an vorhandenen und möglicherweise störenden Substanzen erschwert ist,

wurden in einer weiteren Studie aus Pellets der Sorte Hallertauer Magnum zunächst die einzelnen (nat-)AS (nat-CH, nat-NH und nat-AH) mittels präparativer RP-HPLC isoliert (Kap. 6.8 und 6.11). Die anschließende chirale HPLC der einzelnen nat-AS-Fractionen ergab die in Abb. 4-54 (total) und Abb. 4-55 (vergrößert) abgebildeten Chromatogramme. Darunter befindet sich zum Vergleich nochmals ein Chromatogramm von künstlich racemisierten AS («rac-AS», Abb. 4-56)

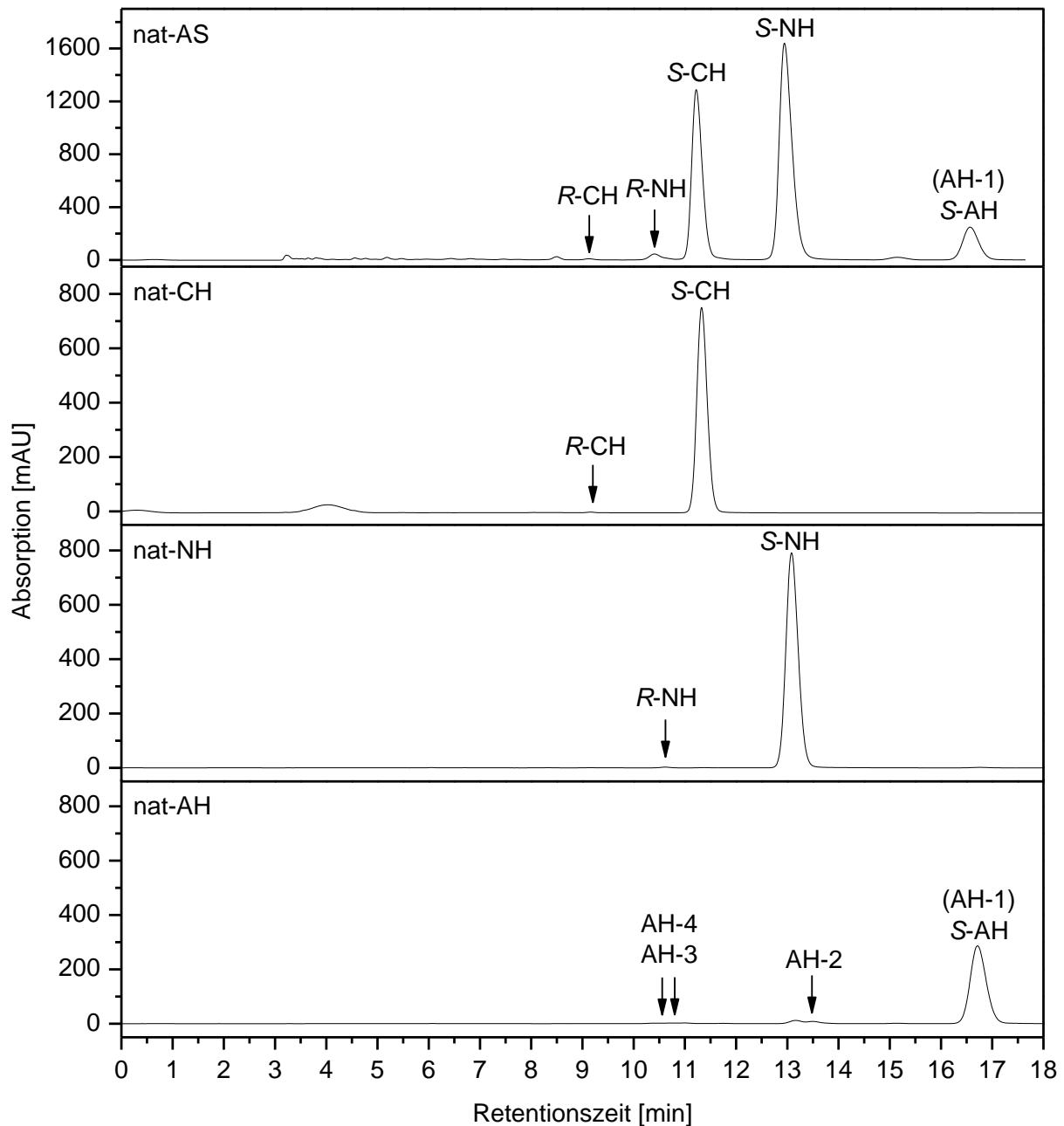


Abb. 4-54: Isolierung von CH, NH und AH aus Hallertauer Magnum und Untersuchung hinsichtlich der Existenz von (*R*)-Enantiomeren; Anlage 2, Säule 22, T = 45 °C, Fluss: 1 mL/min, mobile Phase: 0,3 % TFA/ACN = 52,5/47,5 (isokratisch).

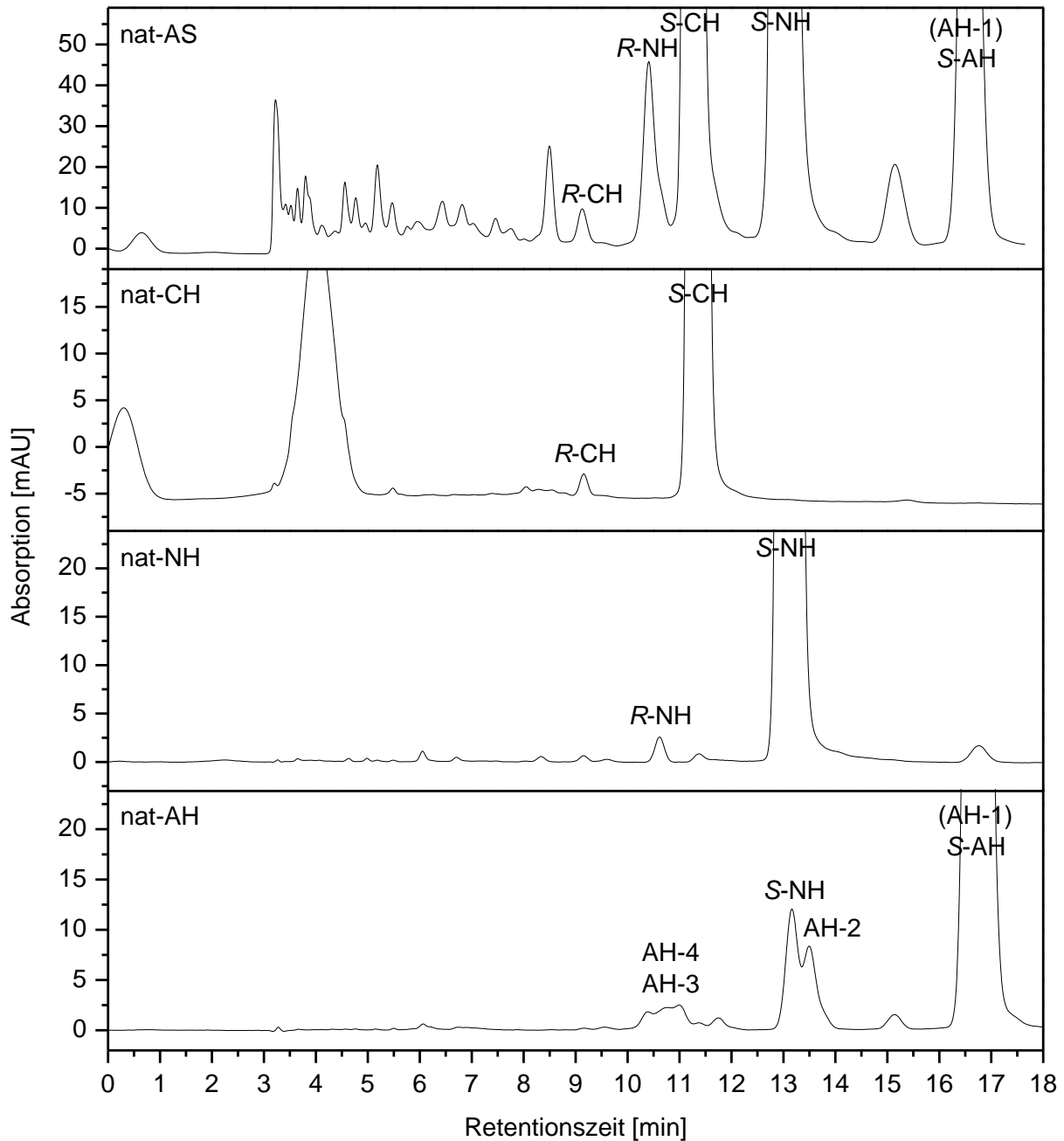


Abb. 4-55: Vergrößert: Isolierung von CH, NH und AH aus Hallertauer Magnum und Untersuchung hinsichtlich der Existenz von (*R*)-Enantiomeren (Bedingungen wie bei Abb. 4-54).

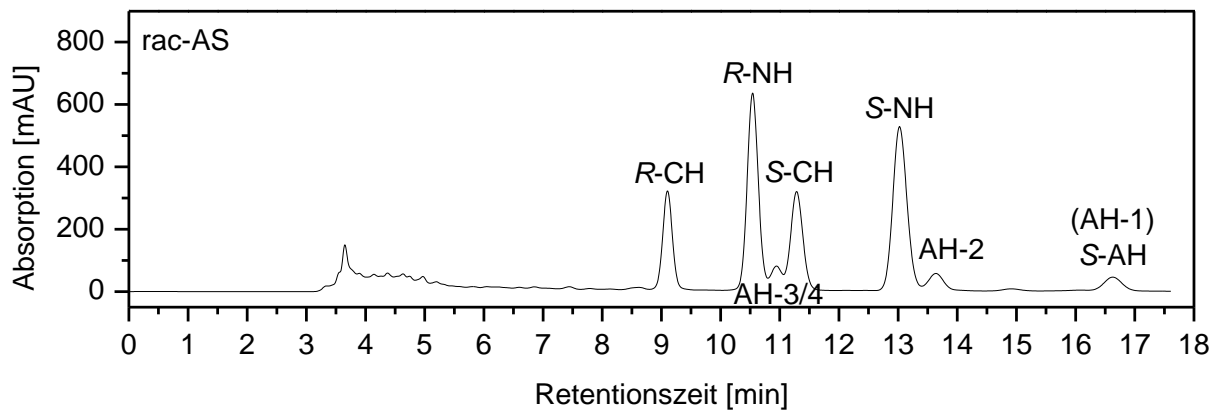


Abb. 4-56: HPLC Chromatogramm von «rac-AS» (28 g/L, 1 μ L injiziert); Anlage 2, Säule 22, T = 45 $^{\circ}$ C, Fluss: 1 mL/min, mobile Phase: 0,3 % TFA/ACN = 52,5/47,5 (isokratisch).

Aus den Chromatogrammen und dem Vergleich der jeweiligen UV-Spektren (Abb. 4-57) wird eindeutig ersichtlich, dass auch in unbehandeltem Hopfen (*R*)-Enantiomere der AS vorliegen. Diese sind vermutlich während der Hopfenverarbeitung nach der Ernte (Trocknung, Lagerung etc. – die Pelletierung kann als Ursache ausgeschlossen werden, da zwischen Pellets und Rohhopfen keine gravierenden Unterschiede erkennbar sind) entstanden. Da hier jedoch generell auf niedrige Temperaturen geachtet wird, besteht auch durchaus die Möglichkeit, dass die AS – entgegen der in der Literatur^[19,20] gängigen Meinung – in natürlichem Hopfen nicht ausschließlich in der (*S*)-Form vorliegen, sondern in geringen Mengen auch *R*-AS präsent sind. Die hier ermittelten Anteile von *R*-CH und *R*-NH betragen 0,29 % (bezogen auf *R/S*-CH) bzw. 0,26 % (bezogen auf *R/S*-NH). Die entsprechenden Enantiomenüberschüsse ($ee_{(S)}$) der (*S*)-Formen beliefen sich auf 99,42 % (*S*-CH) bzw. 99,49 % (*S*-NH). Die Abweichungen im Vergleich zu den oben erhaltenen Werten (vgl. Tab. 4-26: Hallertauer Magnum Pellet: 1,6 % *R*-CH) liegen an der schwierigen und dadurch vermutlich leicht fehlerbehafteten quantitativen Auswertung bei der direkten Analyse. Bei AH war eine derartige ee -Bestimmung aufgrund der Existenz von vier stereoisomeren Formen nicht möglich.

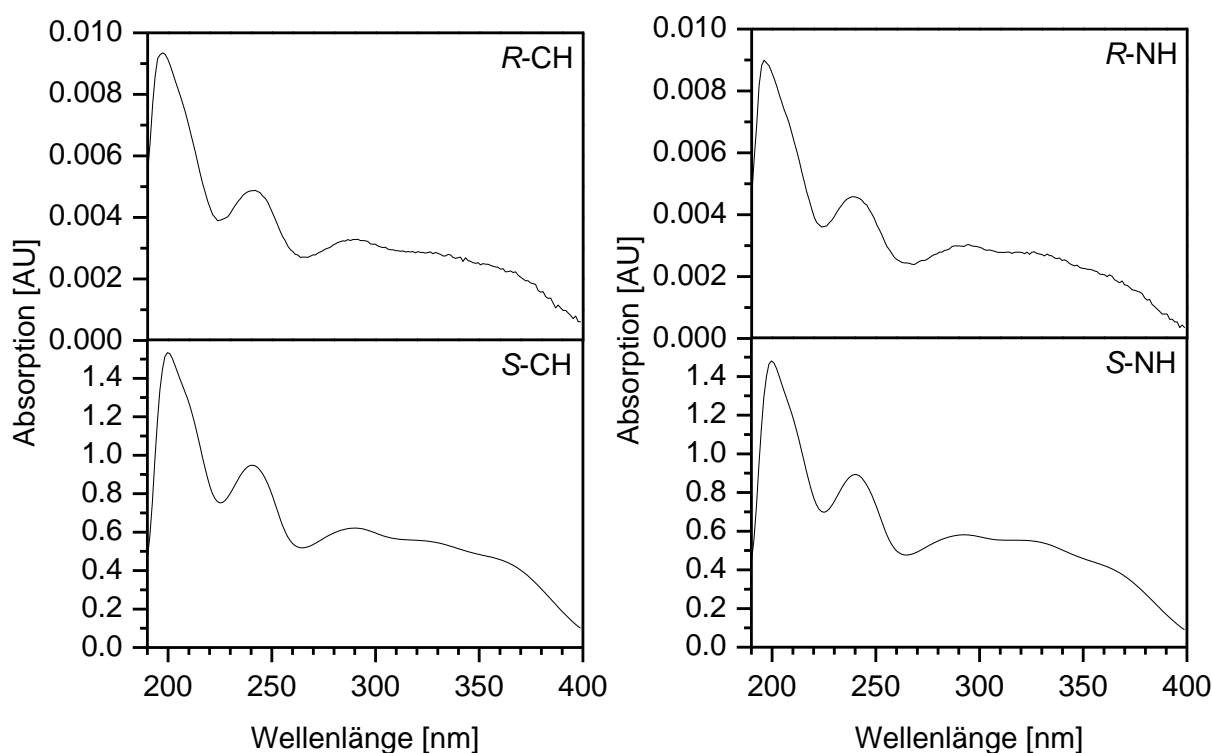


Abb. 4-57: UV-Spektren von *R/S*-CH (links) bzw. *R/S*-NH (rechts) in 0,075 % $H_3PO_4/ACN = 60/40$.

Wie aus den Chromatogrammen (Abb. 8-11 – Abb. 8-13) ersichtlich wird, eignet sich die chirale Säule 22 auch hervorragend zur klassischen (RP-HPLC)-Trennung der drei AS (CH, NH, AH).

4.8 Test von ICE-3 hinsichtlich der Enantiomere

Auch beim Kalibrierstandard ICE-3 konnten die (*R*)-Enantiomere der AS detektiert werden (Kap. 6.9). Mit prozentualen Anteilen von 5,1 % (*R*-CH) bzw. 5,4 % (*R*-NH) waren diese in verhältnismäßig großen Mengen vertreten. Dies könnte auf eine längere Lagerung bei zu warmen Temperaturen (Herstellungsjahr des ICE-3: 2008) sowie auf die nötige Erwärmung zur Homogenisierung des ICE-3 vor dessen Benutzung zurückzuführen sein. Andererseits könnten die *R*-AS auch bereits bei der Herstellung des ICE-3 durch das Labor Veritas entstanden sein. In den folgenden Abb. 4-58 und Abb. 4-59 sind die UV- (UV-C) und MS-Chromatogramme (MS-C: TIC und SIM) sowie die *m/z*-Spektren der fünf detektierbaren AS zu sehen. Die jeweils dominierenden Peaks der einzelnen *m/z*-Spektren sind mitsamt den entsprechenden Ionen in Tab. 4-27 aufgeführt. Die Peaks bei 349 (CH) bzw. 363 (NH und AH) stellen die Molekülpeaks ($[M+H]^+$) dar. Die Ionen $[M-154]$ (NH) bzw. $[M-140]$ (CH), $[M-139]$ (NH, AH) bzw. $[M-125]$ (CH) und $[M-98]$ (NH) bzw. $[M-84]$ (CH) unterscheiden sich jeweils um 14 Da, was darauf schließen lässt, dass hier bei der Fragmentierung jeweils die C-2-Seitenkette involviert ist. $[M-67]$, $[M-55]$ und $[M-14]$ sind sowohl bei CH als auch NH (bei AH ist $m/z = 348$ ($[M-14]$) nur äußerst gering und deshalb in Tab. 4-27 nicht aufgeführt) vorhanden. Diese Fragmente stammen aller Voraussicht nach von Abspaltungen der kompletten bzw. von Teilen der Isoprenyl-Seitenketten. $[M-82]$ wurde nur bei NH detektiert. $[M+64]$ stellt ein Addukt mit ACN und Na^+ dar und ist bei jeder AS vorhanden. Die weiteren, in Abb. 4-59 detektierten und in Tab. 4-27 aufgeführten Peaks, stammen von coeluiierenden Substanzen und nicht von der jeweiligen AS.

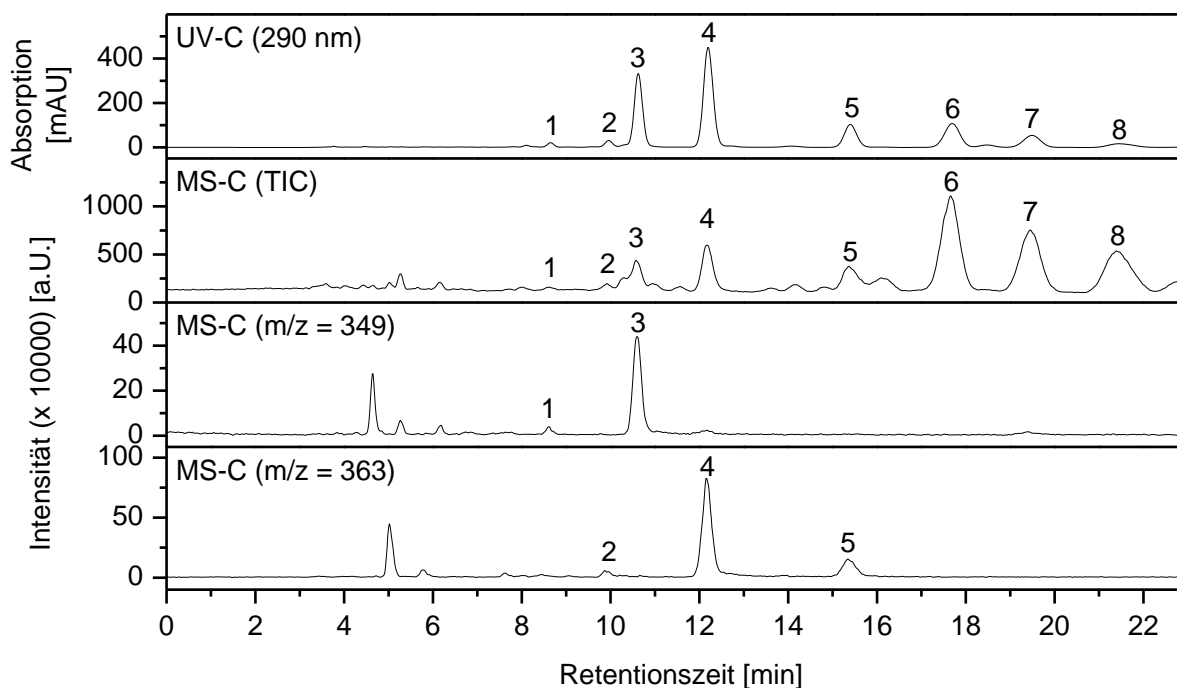


Abb. 4-58: HPLC Chromatogramme von ICE-3 (22,4 g/L in MeOH \pm 10 g/L AS, 1 μ L injiziert): UV- und MS-Detektion, 1: R-CH, 2: R-NH, 3: S-CH, 4: S-NH, 5: S-AH, 6: CL, 7: NL, 8: AL; Anlage 2, Säule 22, HPLC-Methode-9.

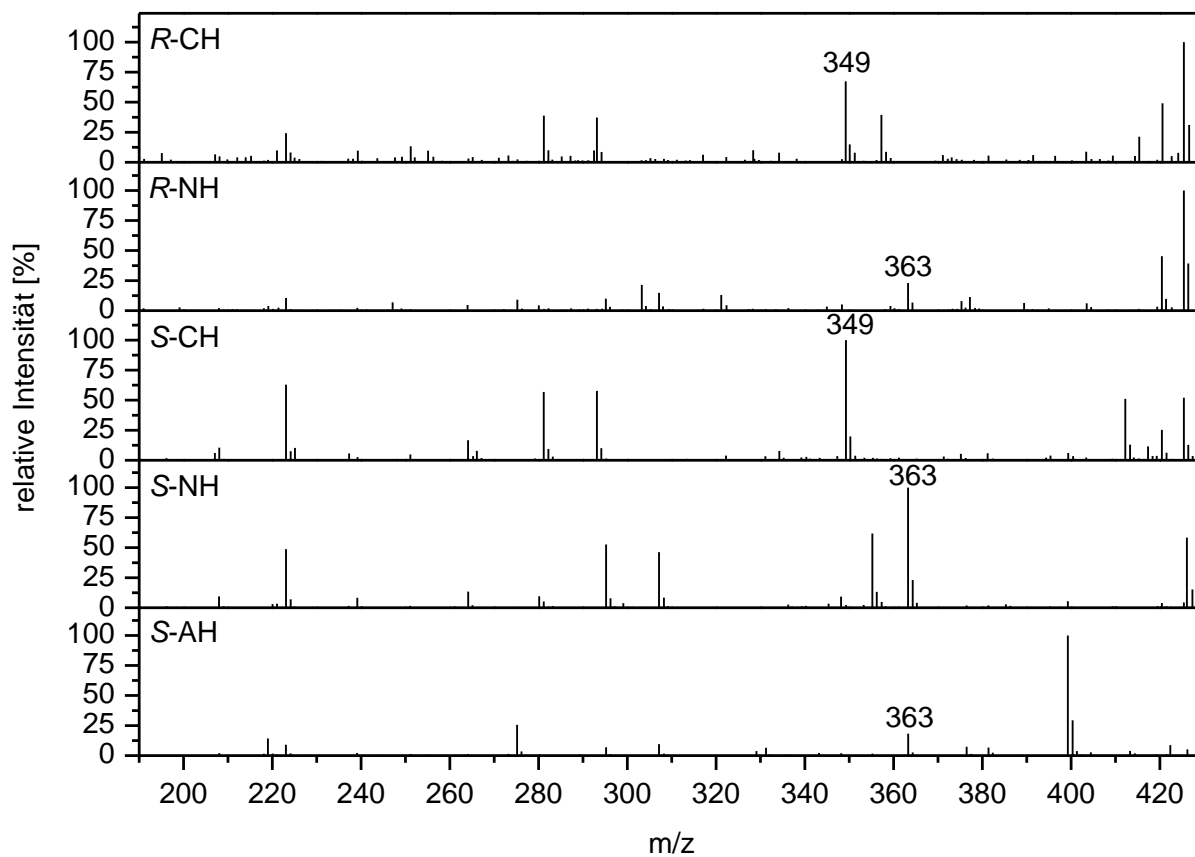


Abb. 4-59: m/z-Spektren von R-CH, R-NH, S-CH, S-NH und S-AH; TIC: m/z 190 – 430.

Tab. 4-27: Peaks der m/z-Spektren mitsamt den entsprechenden Ionen; Probe: ICE-3.

m/z	Ion (ggf. Addukt)	m/z	Ion (ggf. Addukt)
R-CH (M = 348 Da)			
208	[M-140]	334	[M-14]
223	[M-125]	349	[M+1] \triangleq [M+H] ⁺
281	[M-67]	412	[M+64] \triangleq [M+ACN+Na] ⁺
293	[M-55]	420	kein S-CH-Peak, Coelution
334	[M-14]	425	kein S-CH-Peak, Coelution
349	[M+1] \triangleq [M+H] ⁺	S-NH (M = 362 Da)	
357	kein R-CH-Peak, Coelution	208	[M-154]
415	kein R-CH-Peak, Coelution	223	[M-139]
420	kein R-CH-Peak, Coelution	264	[M-98]
425	kein R-CH-Peak, Coelution	280	[M-82]
R-NH (M = 362 Da)		295	[M-67]
208	[M-154]	307	[M-55]
223	[M-139]	348	[M-14]
264	[M-98]	355	kein S-NH-Peak, Coelution
280	[M-82]	363	[M+1] \triangleq [M+H] ⁺
295	[M-67]	426	[M+64] \triangleq [M+ACN+Na] ⁺
303	kein R-NH-Peak, Coelution	S-AH (M = 362 Da)	
307	[M-55]	219	kein S-AH-Peak, Coelution
321	kein R-NH-Peak, Coelution	223	[M-139]
348	[M-14]	275	kein S-AH-Peak, Coelution
363	[M+1] \triangleq [M+H] ⁺	295	[M-67]
420	kein R-NH-Peak, Coelution	307	[M-55]
425	kein R-NH-Peak, Coelution	363	[M+1] \triangleq [M+H] ⁺
426	[M+64] \triangleq [M+ACN+Na] ⁺	399	kein S-AH-Peak, Coelution
S-CH (M = 348 Da)		422	kein S-AH-Peak, Coelution
208	[M-140]	426	[M+64] \triangleq [M+ACN+Na] ⁺
223	[M-125]		
264	[M-84]		

4.9 Test von Iso-90 hinsichtlich der Enantiomere

Im unbehandelten IAS-Standard (*Iso-90*) konnten neben den bekannten IAS (IAS-1) auch die entsprechenden Enantiomere (IAS-2) detektiert werden. Dazu wurden die sechs IAS-Fractionen (TICH, CICH, TINH, CINH, TIAH, CIAH) zunächst isoliert (präparative RP-HPLC, Kap. 6.10 und Kap. 6.11). Anschließend wurden diese mittels Säule 22 chiral getrennt (Kap. 6.10). Die entsprechenden Chromatogramme sind in Abb. 4-60 dargestellt.

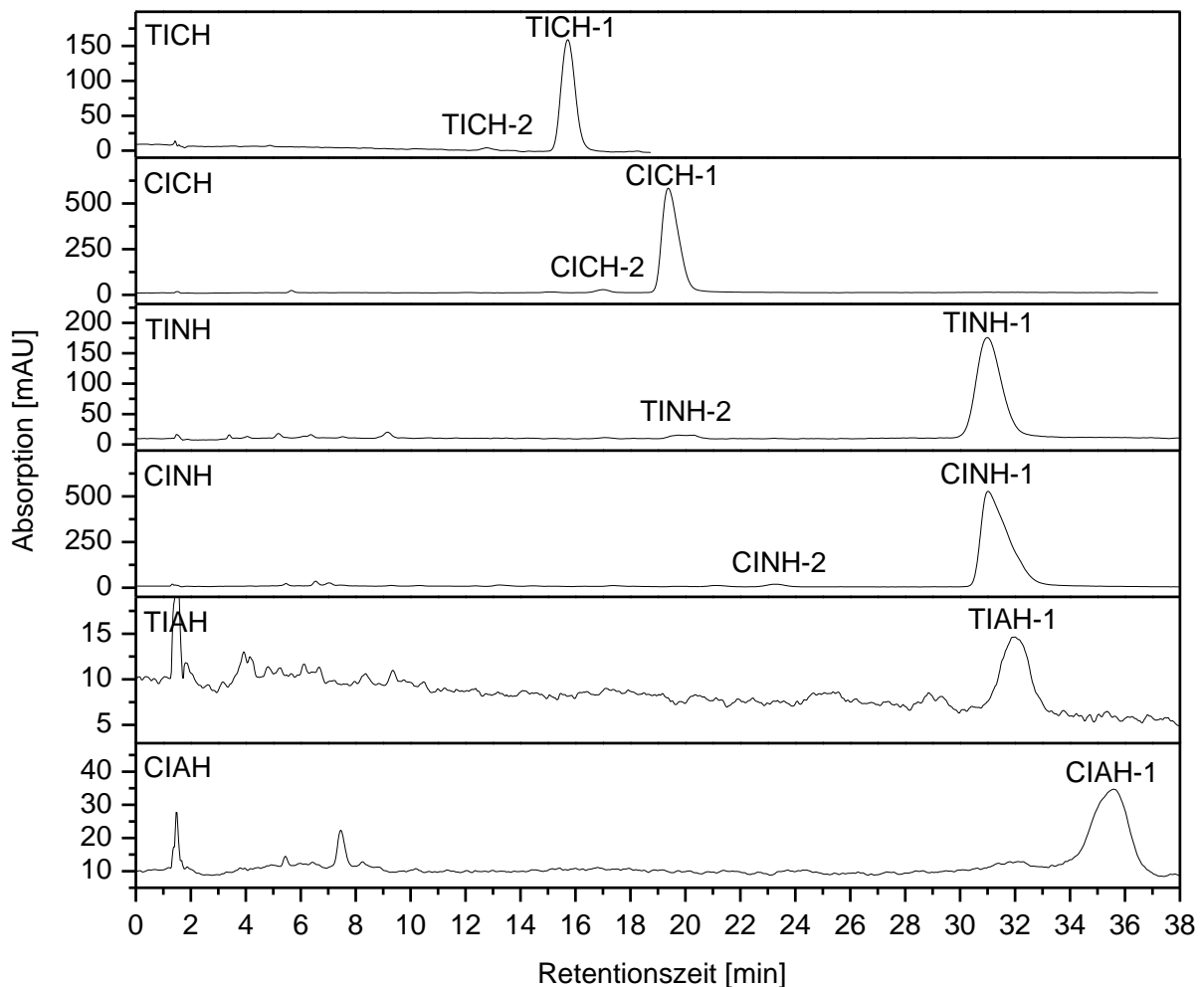
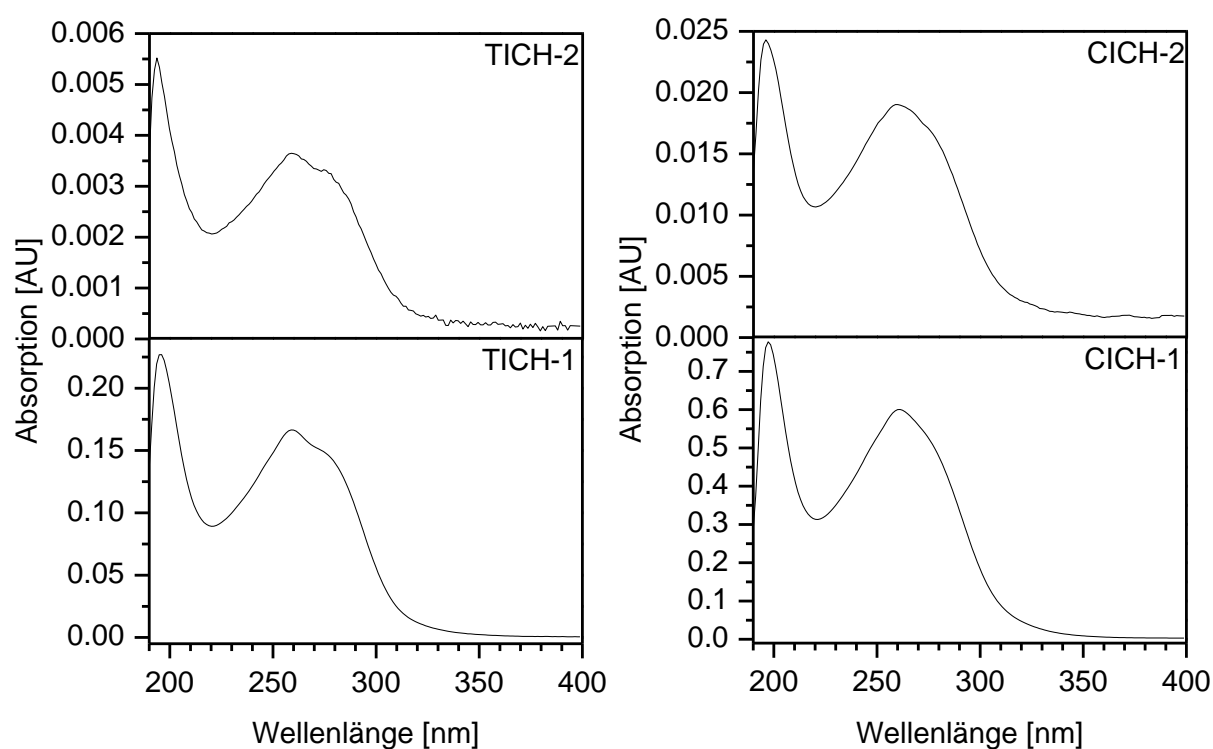


Abb. 4-60: HPLC Chromatogramme von isolierten IAS (aus *Iso-90*); TICH (0,12 g/L), CICH (0,50 g/L), TINH (0,22 g/L), CINH (1,48 g/L), TIAH (0,03 g/L), CIAH (0,10 g/L), jeweils 50 μ L injiziert; Anlage 1, Säule 22, HPLC-Methode-6.

Die Enantiomerenüberschüsse ($ee_{(IAS-1)}$) sind in Tab. 4-28 aufgeführt. Dabei sind lediglich die ICH und INH berücksichtigt, da bei den IAHs aufgrund zu geringer Mengen keine IAH-2 detektiert werden konnten. In Abb. 4-61 und Abb. 4-62 befinden sich die dazugehörigen UV-Spektren. Durch diese konnte die Existenz der Enantiomere (IAS-2 identisch mit der entsprechenden IAS-1) belegt werden.

Tab. 4-28: Enantiomerenüberschüsse ($ee_{(IAS-1)}$) und prozentuale Anteile der IAS-1 bzw. IAS-2 in *Iso-90*.

IAS	$ee_{(IAS-1)}$	IAS-1	IAS-2
TICH	96,5 %	98,2 %	1,8 %
CICH	95,4 %	97,7 %	2,3 %
TINH	96,6 %	98,3 %	1,7 %
CINH	96,4 %	98,2 %	1,8 %

**Abb. 4-61:** UV-Spektren von TICH-1 und -2 (links) bzw. CICH-1 und -2 (rechts) in 0,075 % $H_3PO_4/ACN = 70/30$.

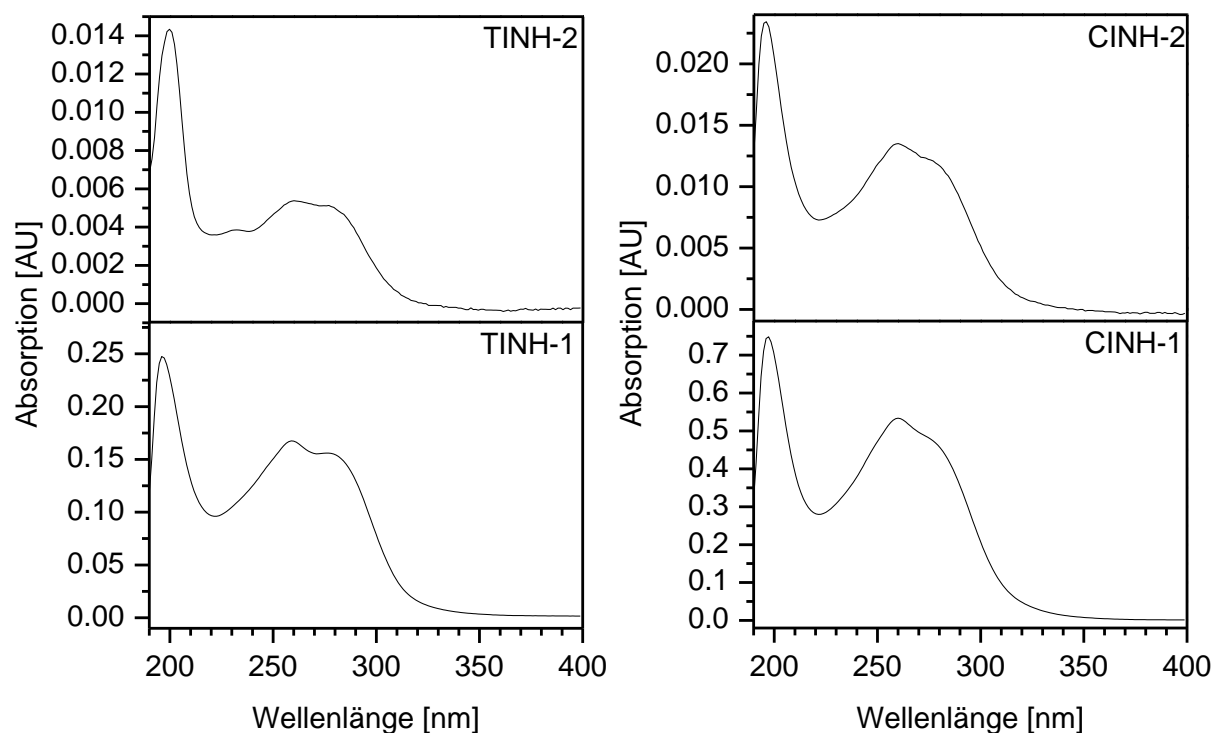


Abb. 4-62: UV-Spektren von TINH-1 und -2 (links) bzw. CINH-1 und -2 (rechts) in 0,075 % $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{ACN} = 70/30$.

Die Existenz der IAS-2 in *Iso-90* ist ein weiterer Hinweis darauf, dass auch in unbehandeltem Hopfen in geringen Mengen *R-AS* vorhanden sind. IAS-2 entstehen nämlich, entsprechend des in der Literatur^[20] beschriebenen Isomerisierungs-Mechanismus, aus *R-AS* (*S-AS* isomerisieren ausschließlich zu IAS-1). Allerdings bedeutet dies keinen zweifelsfreien Beweis für die Existenz von *R-AS*, da die IAS-2 theoretisch auch durch Isomerisierung von *S-AS* entstanden sein können. Hierbei würde jedoch der in der Literatur^[20] beschriebene Mechanismus in Frage gestellt werden, der beinhaltet, dass die Konfiguration am C-6-Atom des Humulons diejenige am C-4-Atom des Isohumulons bestimmt ((6*S*)-Humulon führt ausschließlich zu (4*S*)-*cis/trans*-IAS [IAS-1] – und (6*R*)-Humulon zu (4*R*)-*cis/trans*-IAS [IAS-2]). Somit gibt es zwei Möglichkeiten, wie die IAS-2 in *Iso-90* entstanden sein könnten: Zum einen durch Isomerisierung von *R-AS* (getreu des vorgeschlagenen Mechanismus, allerdings entgegen der Behauptung, dass in natürlichem Hopfen keine *R-AS* vorhanden sind). Zum anderen durch Isomerisierung von *S-AS* (entgegen des vorgeschlagenen Mechanismus). Eine weitere theoretische Möglichkeit, die schlichte Racemisierung von IAS-1 zu IAS-2, ist nach den in dieser Forschungsarbeit erlangten Ergebnissen, zumindest durch thermische Einwirkung, auszuschließen.

4.10 Isolierung der Enantiomere und sensorische Tests

Bei den sensorischen Tests (Kap. 6.12) sollte untersucht werden, ob die Bitterkeit bei den *R*-AS (bzw. aus *R*-AS stammenden IAS-2) im Vergleich zu den bekannten *S*-AS (bzw. aus *S*-AS stammenden IAS-1) verstärkt oder verringert ist oder ob sie gar eine komplett andere Geschmacksrichtung, wie z.B. süß, aufweisen.

4.10.1 α -Säuren

Die olfaktorischen Tests der reinen AS-Proben (*R*-CH, *S*-CH, *R*-NH, *S*-NH) zeigten, dass alle vier getesteten AS einen süßlichen, honigartigen Geruch besaßen. Dabei war bei gleicher Konzentration die Intensität von *R*-NH höher als die von *S*-NH. Bei CH konnte hinsichtlich der Enantiomere kein Unterschied festgestellt werden. Allgemein besaßen die NHs jedoch einen intensiveren Geruch als die CHs. Bei den Geschmackstests stellte sich als wichtigstes Ergebnis heraus, dass die (*R*)-Enantiomere, genau wie die bekannten *S*-AS, einen bitteren Geschmack besaßen. Allerdings konnten bei den jeweiligen enantiomeren Formen trotzdem geschmackliche Unterschiede beobachtet werden. So wurde die Bitterkeit der *R*-AS sowohl bei CH als auch bei NH als spürbar „stechender und beißender“ beschrieben. Den (*R*)-Enantiomeren wurde von den drei unabhängigen Testpersonen auch eine erhöhte Bitterintensität zugeschrieben, wobei dies jedoch auch auf den „kratzigeren“ und etwas „unangenehmeren“ Geschmack zurückgeführt werden könnte. Ob sich das Vorhandensein von (*R*)-Enantiomeren auch negativ auf die Bierqualität auswirkt bzw. eine andere Bittere hervorruft, müsste in weiterführenden Untersuchungen eruiert werden.

4.10.2 Iso- α -Säuren

Die zunächst isolierten (*S*)- und (*R*)-Enantiomere von CH und NH wurden separat isomerisiert. Dabei sollte zum einen analysiert werden, ob die Isomerisierung von isolierten AS-Enantiomeren grundsätzlich gelingt, zum anderen sollten etwaige Unterschiede hinsichtlich der Umsätze bzw. *cis:trans*-Verhältnisse untersucht werden. Im Folgenden sind die dabei entstandenen Chromatogramme abgebildet (Abb. 4-63 und Abb. 4-64). Es wurde bei der Isomerisierung auf Florisil® als Katalysator zurückgegriffen und hierbei ein 500-facher molarer Überschuss bezüglich der eingesetzten AS-Menge verwendet, da dies bei einer vorangegangenen Untersuchung^[75] die besten Ergebnisse hinsichtlich der Isomerisierungsrate lieferte.

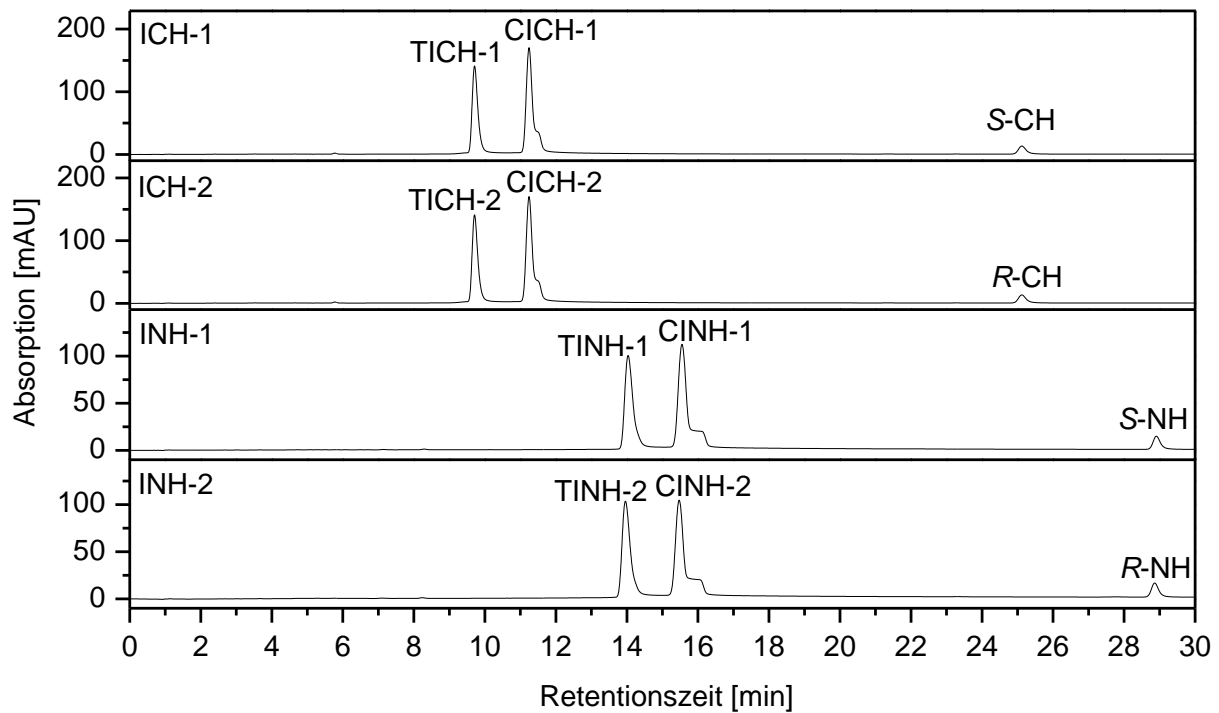


Abb. 4-63: Isomerisierung von isolierten *S*- und *R*-AS: ICH-1, ICH-2, INH-1 und INH-2 (jeweils 1 g/L und 2 μ L injiziert), Anlage 2, Säule 11.

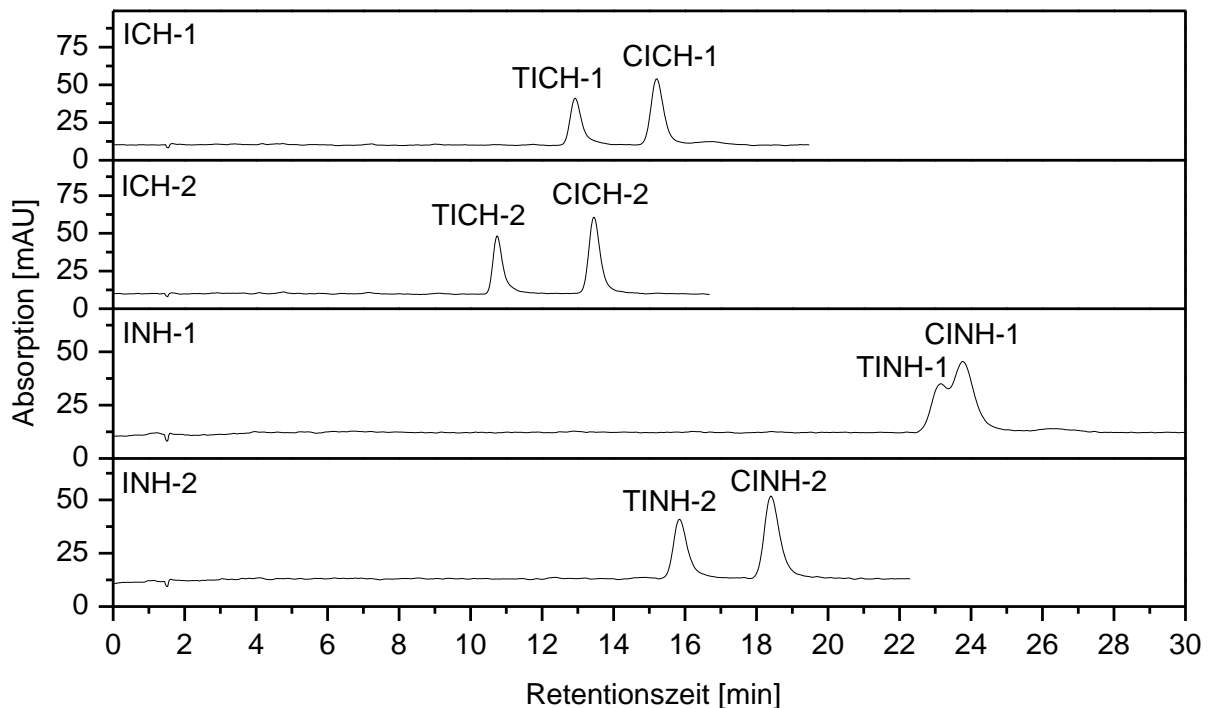


Abb. 4-64: Isomerisierung von isolierten *S*- und *R*-AS: ICH-1, ICH-2, INH-1 und INH-2 (jeweils 1 g/L und 2 μ L injiziert), Anlage 2, Säule 22.

Wie aus den Chromatogrammen in Abb. 4-63 und Abb. 4-64 deutlich wird, war die Isomerisierung von isolierten AS-Enantiomeren erfolgreich. Aus Abb. 4-64 geht hervor, dass die unterschiedlichen *cis-trans*-Paare eines IAS-Homologen zum Teil erheblich unterschiedliche Selektivitätsfaktoren (α) besitzen. Dies wird v.a. bei INH-1 und INH-2 deutlich. Bezüglich der

Umsätze sowie der *cis:trans*-Verhältnisse gab es im Rahmen der Messgenauigkeit keine Unterschiede zwischen der Isomerisierung von *S*- und *R*-AS.

Tab. 4-29: Isomerisierung von isolierten *S*- und *R*-AS: C/T und U.

IAS	C/T	U [%]
ICH-1 (aus <i>S</i> -CH)	1,61	62,7
ICH-2 (aus <i>R</i> -CH)	1,57	64,9
INH-1 (aus <i>S</i> -NH)	1,47	62,4
INH-2 (aus <i>R</i> -NH)	1,39	62,7

Äquivalent zu den AS ergaben die olfaktorischen Tests auch bei den IAS einen leicht intensiveren Geruch der IAS-2 im Vergleich zu IAS-1. Auch hier konnte dies jedoch nur bei INH, nicht aber bei ICH festgestellt werden. Wie die AS besaßen auch die IAS einen süßlichen Geruch. Die geschmacklichen Unterschiede waren bei den IAS zwischen IAS-2 und IAS-1 nicht so ausgeprägt wie bei *R*-AS und *S*-AS. Dennoch war eine leicht intensivere Bitterkeit der IAS-2 wahrnehmbar.

Zusammenfassend lässt sich über die sensorischen Tests der AS und IAS festhalten, dass während dieser Forschungsarbeit durchaus die ersten Erkenntnisse über die sensorischen Eigenschaften der unterschiedlichen Enantiomere gezogen werden konnten. Da es sich jedoch bei den Testpersonen allesamt um ungeschultes Personal handelte, müssten weiterführende sensorische Tests von trainierten Personen durchgeführt werden. Allerdings wären hierzu weitaus größere Mengen der einzelnen AS-Enantiomere vonnöten. Dies ließe sich jedoch nur mit einer finanziell aufwendigen präparativen Enantiomerentrennung im größeren Maßstab realisieren. Neben den sensorischen Analysen könnten die AS-Enantiomere dann aber auch hinsichtlich weiterer eventueller Unterschiede, z.B. in ihren sedativen Wirkungen oder den antibiotischen, entzündungs- und krebshemmenden, antimykotischen sowie antioxidativen Eigenschaften untersucht werden. Andererseits wurde in Anbetracht der Tatsache, dass während dieser Forschungsarbeit die einzelnen AS-Enantiomere erstmalig isoliert werden konnten, hinsichtlich der Untersuchung etwaiger unterschiedlicher Eigenschaften wertvolle Pionierarbeit geleistet.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Isomerisierung an fester Phase entsprach der in der Realität angewandten Herstellung von isomerisierten Hopfenpellets. Während hier das Hopfenpulver mit MgO gemischt wird, wurden in der vorliegenden Arbeit auch andere Substanzen verwendet und hinsichtlich ihrer katalytischen Wirkungen getestet. Mit 92,8 % – entspricht in etwa dem Literaturwert (90 %) – und 79,5 % wurden mittels MgO bzw. CaO die höchsten Umsatzraten erzielt. Auch ZnO (U = 65,7 %) und das Magnesiumsilikat Florisil® (U = 66,4 %) zeigten gute katalytische Eigenschaften. Neben der Isomerisierung an fester Phase wurden auch in unterschiedlichen Lösungen (anorganische Laugen, organische [basische] Lösemittel) Isomerisierungstests durchgeführt. Während in organischen Lösemitteln höchstens bei den niedrigen Alkoholen aufgrund ihres polaren Charakters eine leichte Isomerisierung stattfand, wurden in KOH-Lösung die besten Ergebnisse (U = 60 – 70 %) erzielt. Durch Zusatz von unterschiedlichen Salzen bzw. Oxiden wurde sich eine katalytische Wirkung auf die Isomerisierung erhofft. MgCl₂·6H₂O, CaCl₂ und MgO lieferten hierbei die höchsten IAS-Ausbeuten (73,5 – 76,5 %). Wie bereits bekannt, sind die *cis:trans*-Verhältnisse (C/T) der IAS stark von den Bedingungen während der Isomerisierung abhängig. So beeinflussen auch unterschiedliche Substanzen, die als etwaige Katalysatoren zugegeben wurden, die C/T mehr oder weniger stark. Insbesondere bei Eisenverbindungen konnten allgemein höhere C/T beobachtet werden.

Eine Möglichkeit, die Zugabe eines Oxides oder Salzes als möglichen Katalysator zu umgehen und so getreu des deutschen Reinheitsgebotes zu arbeiten, bietet die Verwendung von Gefäßen aus geeigneten Materialien. Hierbei eignet sich nach den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit Speckstein, chemisch gesehen Magnesiumsilikathydrat, besonders gut. Durch Verwendung eines Behälters aus Speckstein konnte der Isomerisierungsvorgang also ohne Zusatz anderer Substanzen positiv beeinflusst werden. Im Vergleich zu einem Ansatz in einem Glasgefäß (U = 6,1 %) konnte die Umsatzrate auf über 50 % (60 min, Rückflussskochen in H₂O) bzw. 80,0 % (60 min, Rückflussskochen in Würze) gesteigert (Glasgefäß: U = 38,4 %) werden. Neben der Verwendung eines Specksteingefäßes wäre für den Zweck der katalytischen Umsatzsteigerung auch ein aus Speckstein bestehendes Rührwerk vorstellbar. Hierbei wäre eine möglichst große Oberfläche des Rührers erstrebenswert, um den Umsatz bei der Isomerisierung in möglichst hohem Maße zu steigern. Diese Möglichkeit sollte in Zukunft untersucht werden.

Es ist seit Jahrzehnten bekannt, dass (S)-(-)-Humulon durch Erhitzen (> 80 °C) in organischen Lösemitteln (partiell) racemisiert. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob auch bereits in unbehandeltem Hopfen das Enantiomer ((R)-(+)-Humulon) vorliegt,

und/oder ob (S)-Humulon auch bei anderen Bedingungen (vor allem geringeren Temperaturen) racemisiert. Das Hauptziel der Arbeit, nämlich die Auftrennung der Enantiomere der einzelnen AS- und IAS-Homologen konnte erfolgreich verwirklicht werden. Dies gelang mittels der chiralen HPLC-Technologie. So wurde aus dem Pool der kommerziell erhältlichen chiralen HPLC-Säulen eine Säule gefunden, mit der es möglich war, sowohl die (6R-) und (6S)-Isomere der α -Säuren als auch die Enantiomere der *cis*- (4R,5S- und 4S,5R) bzw. *trans*- (4R,5R- und 4S,5S) -Iso- α -Säuren voneinander zu trennen. Dies gelang sowohl im analytischen als auch im (semi-)präparativen Maßstab. Die entsprechende Säule (Firma Phenomenex, Lux Cellulose-3, 250 × 4,6 mm, 5 μ m Partikel) trug als chiralen Selektor das Polysaccharid-Derivat Cellulose-tris(4-Methylbenzoat). Die dabei verwendete mobile Phase bestand bei alleiniger UV-Detektion aus einer Acetonitril/0,075 % H₃PO₄- (40/60 bei AS; 30/70 bei IAS) und bei UV/MS-Detektion aus einer Acetonitril/0,3 %TFA- (48/52 bei AS) Mischung (bei der IAS-Enantiomerentrennung wurde keine UV/MS-Detektion durchgeführt). Da in unbehandeltem Hopfen die AS nahezu enantiomerenrein ($ee_{(S)\text{-Humulon}} > 99\%$) vorliegt, musste zur Findung der geeigneten Säule bzw. zur Entwicklung der entsprechenden HPLC-Methode ein Probengemisch von künstlich racemisiertem Humulon (rac-AS) bzw. isomerisierter rac-AS (rac-IAS) verwendet werden. Erst aufgrund der auf diese Weise entwickelten Trennmethode konnten unbehandelte (d.h. kein Erhitzen über 80 °C in organischen Lösemitteln) Hopfenproben (Dolden und Pellets) hinsichtlich der Existenz von (R)-Humulon untersucht werden. Dabei wurde herausgefunden, dass, entgegen der in der Literatur gültigen Annahme einer alleinigen Existenz von (S)-Humulon, zu geringen Anteilen (ca. 0,3 %) auch die (R)-Enantiomere zugegen sind. Diese wurden mittels UV-Detektion (Vergleich der UV-Absorptionsspektrum der jeweiligen (R)- und (S)-Enantiomere) sowie massenspektrometrisch nachgewiesen. Allerdings ist dabei nicht auszuschließen, dass die (R)-Enantiomere erst nach der Hopfenernte, also während der Verarbeitung, der Lagerung oder des Transports bzw. während der Probenaufbereitung im Labor, entstanden sind. Dies lässt zwei mögliche Schlüsse zu:

1. Da bei der Hopfenverarbeitung generell auf niedrige Temperaturen geachtet wird und die Racemisierung ein thermisch induzierter Vorgang ist, lässt durchaus die Vermutung zu, dass bereits in natürlichem Hopfen zu geringen Anteilen auch (R)-Humulon vorliegt. Eindeutige klima- oder regional bedingte Unterschiede hinsichtlich des (R)-Humulonanteils konnten nicht festgestellt werden.
2. Die zweite und wohl wahrscheinlichere Möglichkeit ist, dass im natürlichen Hopfen tatsächlich ausschließlich (S)-Humulon vorliegt. Darauf lassen die sehr geringen Anteile von (R)-Humulon (ca. 0,3 %) schließen. Jedoch beginnt das (S)-Humulon direkt nach der Ernte partiell zu racemisieren.

Auch in unbehandelten Standardproben (AS: ICE-3 Extrakt; IAS: Iso-90 Extrakt) konnten sowohl (*R*)-Humulon (5,1 – 5,4 %) als auch die IAS-2 ((*4R,5R*)-*trans*- [1,7 – 1,8 %] und (*4R,5S*)-*cis*-IAS [1,8 – 2,3 %]) nachgewiesen werden. Die relativ hohen Anteile (insbesondere bei (*R*)-Humulon) sind vermutlich dem Alter der Proben, bzw. dem nötigen Erwärmen vor Verwendung der Proben geschuldet. Ob ein frischer ICE-3 Standardextrakt ebenfalls derart hohe (*R*)-Humulon-Werte aufweist, muss in zukünftigen Messungen untersucht werden.

Mittels des Polarimeters MCP 500 (Messung der optischen Aktivität) konnten die AS bzw. IAS online detektiert werden. Das Polarimeter wurde in Serie zum UV-Detektor installiert, sodass die chromatographisch getrennten chiralen Hopfenbitterstoffe aufgrund ihrer optischen Aktivität nachgewiesen werden konnten. Dabei wurde die Wellenlänge auf 404 nm (AS) bzw. 435 nm (IAS) eingestellt. Vor allem bei den AS konnten so die unterschiedlichen Drehrichtungen von eingestrahlt polarisiertem Licht ((*S*)-(-)- bzw. (*R*)-(+)-) durch die chiralen Moleküle (AS und IAS) gezeigt werden. Der Nachweis der AS und IAS war jedoch auf diese Weise nur qualitativ möglich.

Während in der Literatur berichtet wird, dass die Racemisierung von (-)-Humulon erst ab einer Temperatur von über 80 °C einsetzt, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass auch bei deutlich niedrigeren Temperaturen eine (partielle) Racemisierung stattfindet. So liegen beispielsweise im Hopfenextrakt nach 50 Tagen bei 32 °C rund 5 % des co-Humulons in der (*R*)-Konfiguration vor. Der Nachweis dieser relativ geringen Mengen wurde durch die Entwicklung einer Methode zur Enantiomerentrennung mittels chiraler HPLC ermöglicht. Im Vergleich dazu waren die Polarimeter in den 1950er Jahren, als die ersten Versuche bezüglich der Chiralität der AS gemacht wurden, vermutlich zu unempfindlich, um derart geringe Mengen an (+)-Humulon nachzuweisen.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass kein organisches Lösemittel notwendig ist, damit die AS racemisieren. So findet auch in Wasser, aber auch in reiner Form (z.B. Hopfenextrakt) eine partielle Racemisierung statt.

Zuvor künstlich racemisierte AS konnten in der vorliegenden Arbeit erfolgreich zu IAS isomerisiert werden. Anschließend wurden 15 der theoretisch 16 zu erwartenden IAS mittels chiraler HPLC getrennt und identifiziert.

Durch die Entwicklung einer geeigneten HPLC-Methode konnten die einzelnen AS-Enantiomere isoliert und hinsichtlich ihres Geschmackes getestet werden. Dabei stellte sich heraus, dass die (*R*)-Enantiomere, genau wie ihre Partner, bitter sind. Jedoch besitzen sie einen etwas intensiveren, vor allem aber unangenehmeren Geschmack. Auch bei den IAS

wurde bei den nicht-natürlichen IAS-2 (aus (*R*)-Humulon) eine intensivere Bitterkeit festgestellt als bei den IAS-1 (aus (*S*)-Humulon). Die Auswirkung einer Präsenz von (*R*)-Humulon bzw. IAS-2 auf die Bierqualität bzw. auf dessen Geschmack muss in Zukunft bei weiteren Tests untersucht werden. Genauso müssen die etwaigen Unterschiede der Enantiomere in ihren weiteren physiologischen Eigenschaften eruiert werden. Hierzu werden allerdings deutlich größere Mengen isolierter AS- bzw. IAS-Enantiomere nötig sein, als es während dieser Forschungsarbeit möglich war zu produzieren.

6 Experimenteller Teil

6.1 Verwendete Hopfenprodukte

Sämtliche Hopfenprodukte wurden – sofern nichts Anderes angegeben ist – von der Firma Hopsteiner (Simon H. Steiner, Hopfen, GmbH, Mainburg, Deutschland) erhalten.^[170] Alle Produkte wurden bei -24 °C gelagert und waren so über die gesamte Dauer der Forschungsarbeit stabil.

- Rohhopfen (ganze Hopfendolden, getrocknet und gepresst):
 - Aurora, Ernte 2010 (Slowenien)
 - Hallertauer Magnum, Ernte 2010 (Deutschland)
 - Hallertauer Taurus, Ernte 2010 (Deutschland)
 - Hallertauer Tradition, Ernte 2010 (Deutschland)
 - Herkules, Ernte 2010 (Deutschland)
 - Marynka, Ernte 2010 (Polen)
 - Northern Brewer, Ernte 2010 (Deutschland)
 - Nugget, Ernte 2010 (Deutschland)
 - Select, Ernte 2010 (Deutschland)
- Pellets (zylindrisch, aus getrocknetem, gemahlenem und gepresstem Rohhopfen):
 - Apollo, Typ 90, Ernte 2011 (USA)
 - Aurora, Typ 90, Ernte 2010 (Slowenien)
 - Green Bullet, Typ 90, Ernte 2011 (Neuseeland)
 - Hallertauer Magnum, Typ 90, Ernte 2010 (Deutschland)
 - Hallertauer Magnum, Typ 90, α -Säure 13,0 % (w/w), Ernte 2008 (Deutschland)
 - Hallertauer Taurus, Typ 90, Ernte 2010 (Deutschland)
 - Hallertauer Tradition, Typ 90, Ernte 2010 (Deutschland)
 - Hallertauer Tradition, Typ 45, α -Säure 10,0 % (w/w), β -Säure 7,0 % (w/w) (Deutschland)
 - Herkules, Typ 90, Ernte 2010 (Deutschland)
 - Marynka, Typ 90, Ernte 2010 (Polen)
 - Nelson Sauvin, Typ 90, Ernte 2011 (Neuseeland)
 - Northern Brewer, Typ 90, Ernte 2010 (Deutschland)
 - Nugget, Typ 90, Ernte 2010 (Deutschland)
 - Pacific Gem, Typ 90, Ernte 2011 (Neuseeland)
 - Pacific Jade, Typ 90, Ernte 2011 (Neuseeland)

Perle, Typ 90, Ernte 2010 (Deutschland)
 Select, Typ 90, Ernte 2010 (Deutschland)
 Target, Typ 90, Ernte 2010 (England)
 Zeus, Typ 90, Ernte 2011(USA)

- CO₂-Extrakt (goldgrün- bis bernsteinfarbener, zähflüssiger Extrakt bei Raumtemperatur):
 Extrakt-1: Herkules, 58,0 % α -Säuren
 Extrakt-2: Hallertauer Magnum, 49,3 % α -Säuren, Ernte 2008 (Joh. Barth & Sohn GmbH)
- α -Säuren, genannt *AS-pur**, gelbe klebrige Substanz, aufgereinigt durch die Firma Hopsteiner aus einer Mischung aus 90 % Nugget CO₂-Extrakt und 10 % Zeus CO₂-Extrakt, Reinheit 88,6 %, Jahrgang unbekannt
- *Iso-90*, orange-gelber viskoser Extrakt bei Raumtemperatur, enthält ca. 90 % Iso- α -Säuren

Die folgenden Kalibrierstandards für die HPLC-Analysen wurden von Labor Veritas AG (Zürich, Schweiz) bezogen.^[171]

- *International Calibration Extract* (ICE-3 bzw. ICE-2 bis September 2010): Kalibrierstandard für α - und β -Säuren

α -Säure:	44,64 % (w/w)	β -Säure:	24,28 % (w/w)
	(49,39 % (w/w))		(24,94 % (w/w))
co-Humulon:	13,88 % (w/w)	co-Lupulon:	13,44 % (w/w)
	(14,45 % (w/w))		(12,92 % (w/w))
n-+ad-Humulon:	30,76 % (w/w)	n-+ad-Lupulon:	10,84 % (w/w)
	(34,94 % (w/w))		(12,02 % (w/w))

- *International Calibration Standard* (ICS-13 bzw. ICS-12): Kalibrierstandard für Iso- α -Säuren (DCHA-Iso)

Iso- α -Säuren: 62,3 % (w/w) (ICS-12: 64,3 % (w/w))
 (enthält ausschließlich die *trans*-Formen von Iso-co-, Iso-n- und Iso-ad-Humulon
 → 3 IAS)

* Der Name *AS-pur* wird ausschließlich vom Autor in der vorliegenden Forschungsarbeit verwendet und wurde nicht von der Firma Hopsteiner vergeben.

6.2 Chemikalien und Lösemittel

Acetonitril, LC-MS Chromasolv[®], ≥ 99,9 % (34967, Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Acetonitril Gradient Grade HiPerSolv CHROMANORM[®] für die HPLC (20060.320, BDH Prolabo, VWR, Darmstadt)

Aktivkohle, 0,3 – 0,5 mm (35 – 50 mesh ASTM), für die Gas-Chromatographie (9631, Merck, Darmstadt)

Aluminiumoxid 90 aktiv, basisch (Aktivitätsstufe I), Korngröße 0,063 – 0,200 mm, (70 – 230 mesh ASTM), für die Säulen-Chromatographie (1076, Merck, Darmstadt)

Aluminiumoxid 90 aktiv, neutral (Aktivitätsstufe I), Korngröße 0,063 – 0,200 mm, (70 – 230 mesh ASTM), für die Säulen-Chromatographie (1077, Merck, Darmstadt)

Aluminiumoxid 90 aktiv, sauer (Aktivitätsstufe I), Korngröße 0,063 – 0,200 mm, (70 – 230 mesh ASTM), für die Säulen-Chromatographie (101078, Merck, Darmstadt)

Ameisensäure, EMSURE[®], 98 – 100 %, zur Analyse (1.00264, Merck, Darmstadt)

Ammoniaklösung, reinst, 32 %, (1.05426, Merck, Darmstadt)

Ammoniumacetat, ROTIPURAN[®], ≥ 98 %, p.a. (7869.1, Roth, Karlsruhe)

Bariumchlorid-dihydrat, ≥ 99 % (217565, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Bierwürze, ungehopft (Bayerische Staatsbrauerei Weihenstephan, Freising)

Blei(II)-chlorid, 98 % (268690, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Blei(II)-oxid, Pulver 10 MU, 99,9+% (21,190-7, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Calciumchlorid, gekörnt, etwa 5 – 15 mm (2389, Merck, Darmstadt)

Calciumhydroxid, zur Analyse (102047, Merck, Darmstadt)

Calciumoxid, 97+%, zur Analyse (422830010, Acros Organics, New Jersey, USA)

Cer(IV)-sulfat (35,900-9, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Cobalt(II)-nitrat-Hexahydrat, zur Analyse (102536, Merck, Darmstadt)

β-Cyclodextrin, minimum 98 % (C4767, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Diethylenglykol, puriss. p. a., > 99,0 % (32160, Fluka, Buchs, Schweiz)

Diethylether, zur Analyse (1.00921, Merck, Darmstadt)

Diethylether, p.a. 99,5+% (CL00-0405, Chem-Lab NV, Zedelgem, Belgien)

Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, zur Analyse (6580, Merck, Darmstadt)

1,4-Dioxan, 99+% (D201863, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Eisen, puriss. p. a., ≥ 99,5 % (44890, Fluka, Buchs, Schweiz)

Eisen(II)-oxid, – 10 mesh, 99,9 % (40,086-6, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Eisen(II,III)-oxid, nanopowder, < 50 nm, 98+% (637106, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Eisen(III)-oxid, Pulver, < 5 micron, ≥ 99 % (31,005-0, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat, p.a. (unbekannt)

Eisen(III)-sulfat-Pentahydrat, p.a. (unbekannt)

Essigsäure, 100 %, zur Analyse (1.00063, Merck, Darmstadt)

Ethanol, LiChrosolv®, Gradient Grade für die Flüssigkeitschromatographie, > 99,9 % (1.11727, Merck, Darmstadt)

Florisil®, 0,150 – 0,250 mm, für die Säulen-Chromatographie (112518, Merck, Darmstadt)

n-Hexan, Picograde®, für die Rückstandsanalyse (SO-1244-B025, Promochem®, LGC Standards, Wesel)

n-Hexan, Optigrade®, für die HPLC (SO-5167-B025, Promochem®, LGC Standards, Wesel)

Kaliumcarbonat, zur Analyse (104928, Merck, Darmstadt)

Kaliumdihydrogenphosphat, zur Analyse (4873, Merck, Darmstadt)

Kaliumhydroxid Plätzchen, zur Analyse (105033, Merck, Darmstadt)

Kieselgel 60, 0,063 – 0,200 mm, für die Säulen-Chromatographie (107734, Merck, Darmstadt)

Kieselgur (unbekannt)

Kupfer(II)-chlorid, 97 % (22,201-1, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Kupfer(II)-oxid, 99+% (2212810000, New Jersey, USA)

Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat, zur Analyse (102790, Merck, Darmstadt)

Magnesiumchlorid-Hexahydrat, zur Analyse (5833.0250, Merck, Darmstadt)

Magnesiumsulfat, anhydrous, 99,5 % min. (33337, Alfa Aesar, Karlsruhe)

Magnesiumoxid, 98 %, extra pure, Pulver, Partikelgröße: 99 % <150 µm (– 100 mesh) (263835000, Acros Organics, New Jersey, USA)

Mangan(II)-sulfat-Monohydrat, sprühgetrocknet zur Analyse (105941, Merck, Darmstadt)

Methanol, HPLC Gradient Grade (8402, J. T. Baker, Deventer, Niederlande)

Natriumcarbonat, zur Analyse (106392, Merck, Darmstadt)

Natriumchlorid, puriss. p. a, ≥ 99,5 % (71380, Fluka, Buchs, Schweiz)

Natriumhydroxid Plätzchen, zur Analyse (6498.1000, Merck, Darmstadt)

Nickel(II)-chlorid, 98 % (33,935-0, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Nickel(II)-oxid, black 76 % Ni (223120050, Acros Organics, New Jersey, USA)

iso-Octan, zur Analyse (1.04727, Merck, Darmstadt)

Palladium, 5 wt. % on barium sulfate, reduced (277991, Sigma-Aldrich, Steinheim)

n-Pentan, Picograde®, für die Rückstandsanalyse (SO-1282-B025, Promochem®, LGC Standards, Wesel)

ortho-Phosphorsäure, 85 %, zur Analyse (1.00573, Merck, Darmstadt)

1-Propanol (82091, Fluka, Buchs, Schweiz)

2-Propanol, Optigrade®, für die HPLC (SO-3043-B025, Promochem®, LGC Standards, Wesel)

Pyridin (unbekannt)

Reinstwasser (TKA Wasseraufbereitungssysteme, GenPure, Niederelbert)

Salzsäure, 32 %, zur Analyse (1.00319, Merck, Darmstadt)
Schwefelsäure, 95 – 97 %, zur Analyse ISO (1.00731, Merck, Darmstadt)
Strontiumchlorid-Hexahydrat, 99 % A.C.S. reagent (255521, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Titan(IV)-oxid (unbekannt)
Toluol Optigrade® für die HPLC (SO-4483-B025, Promochem®, LGC Standards, Wesel)
Triethanolamin, puriss. p.a., ≥ 98,5 % (GC) (90280, Fluka, Buchs, Schweiz)
Triethylamin, puriss. p.a., ≥ 99,5 % (GC) (90340, Fluka, Buchs, Schweiz)
Trifluoressigsäure ≥ 99 % (302031, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Xylol (Isomerengemisch aus *ortho*-, *meta*- und *para*-Xylol), reinst (8685, Merck, Darmstadt)
Zinkchlorid, Reagent Grade, ≥ 98 % (20,808-6, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Zinkoxid, 99+%, A.C.S. reagent (251607, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Zinn(II)-chlorid, 98 %, anhydrous (196980250, Acros Organics, New Jersey, USA)
Zitronensäure-Monohydrat, EMSURE®, zur Analyse (1.00244, Merck, Darmstadt)

6.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

6.3.1 HPLC-Anlagen

Die folgenden beiden HPLC-Anlagen wurden während den Forschungsarbeiten verwendet. Dabei kam Anlage 1 seit Beginn an zum Einsatz, während Anlage 2 erst gegen Ende der Arbeiten zur Verfügung stand. Aufgrund mehrerer Vorzüge von Anlage 2 (v.a. qualitativ hochwertigere Chromatogramme und höhere Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten aufgrund einer stabileren Pumpleistung*) wurde schließlich vermehrt mit dieser gearbeitet. Anlage 1 wurde letztlich nur mehr dazu benutzt, um bei Bedarf einen höheren Probendurchsatz zu erzielen bzw. um UV-Spektren aufzunehmen, da dies mit Anlage 2 nicht möglich war. Die mittels Anlage 1 und 2 erhaltenen chromatographischen Daten wurden mit dem Programm Origin (Version 7.5, OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts, USA) bearbeitet und graphisch dargestellt.

HPLC-Anlage 1 (Perkin Elmer):

Pumpe:	Series 200 Pump (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA)
Entgaser:	Series 200 Vacuum Degasser (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA)

* Immer wieder auftretende Probleme mit der Pumpe und/oder Ventilen bei HPLC-Anlage 1 führten zum Teil zu abweichenden Retentionszeiten gleicher Substanzen. Dennoch konnten bei den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Chromatogrammen die Peaks eindeutig zugewiesen werden.

Injektor: Series 200 Autosampler (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA)
Säulenofen: Series 200 Column Oven (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA)
Detektoren: Standarddetektor: Series 200 Diode Array Detector, UV/Vis, zwei Kanäle
(Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA)

zeitweilig zusätzlich verwendeter Detektor:

Polarimeter MCP 500 (Anton Paar, Ostfildern)

- Optische Rotation bei 589 nm: Messbereich: $\pm 89^\circ$, Auflösung: $0,0001^\circ$,
Genauigkeit: $\pm 0,002^\circ$, Reproduzierbarkeit: $\pm 0,001^\circ$, Ansprechzeit: 15 s,
mögliche Wellenlängen: 365 nm, 404 nm, 435 nm, 546 nm, 578 nm,
589 nm, 880 nm, Wolfram Halogen Lampe

- Temperatur Interface: Einstellbereich: $15^\circ\text{C} - 45^\circ\text{C}$, Auflösung: $0,01^\circ\text{C}$,
Genauigkeit: $\pm 0,03^\circ\text{C}$

- Benutzte Wellenlängen: 404 nm (AS),
435 nm (IAS)

- Probenzelle: $L \times ID = 100 \times 3$ mm, Volumen:
0,7 mL (wurde durch Rücksprache mit der
Firma Anton Paar für die hier durchgeführ-
ten Messungen maßangefertigt)

- Temperierung der Probenzelle: $20,0^\circ\text{C}$

- Software: LabData, Version 2.0 (Anton Paar,
Ostfildern)



Abb. 6-1: Probenzelle;
1: Eingang, 2: Ausgang

Software: TotalChrom Version 6.3.2 (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA)
Iris (für Spektren) Version 1.2.0.84 (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA)
TurboScan 200 (für Spektren) Version 1.02 (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA)

HPLC-Anlage 2 (Shimadzu):

Reglereinheit: CBM-20A, System Controller, Prominence Communications Bus Module
(Shimadzu Europa, Duisburg)

Pumpe: LC-20AB, Prominence Liquid Chromatograph (Shimadzu Europa, Duisburg)

Entgaser: DGU-20A3, Prominence On-line Degasser (Shimadzu Europa, Duisburg)

Injektor: SIL-20AC, Prominence Auto Sampler (Shimadzu Europa, Duisburg)

Säulenofen: CTO-20A, Prominence Column Oven (Shimadzu Europa, Duisburg)

- Detektoren: Standarddetektor: SPD-20A, Prominence UV/Vis Detector, zwei Kanäle
(Shimadzu Europa, Duisburg)
- weitgehend zusätzlich verwendeter Detektor mit den verwendeten Einstellungen:
LCMS-2010EV Liquid Chromatograph Mass Spectrometer (Shimadzu Europa, Duisburg)
- Vakuumsystem: Kombination aus einer Drehschieberpumpe E2M28 (Edwards, Crawley, West Sussex, UK) und zwei Turbomolekularpumpen
 - Stickstoffgenerator: NGM, Membrantechnologie, maximale Reinheit 99,7 % (cmc Instruments, Eschborn)
 - Elektronenquelle: ESI, positive Ionisierung
 - Interface-Spannung: +4,5 kV
 - CDL-Spannung: 0,0 kV
 - Zerstäubungsgas: 1,5 L/min
 - Trocknungsgas: 0,15 MPa
 - CDL Temperatur: 250 °C
 - Heizblock: 200 °C
 - Massenanalysator: Quadrupol (Molybdän)
 - Detektor: Sekundärelektronenvervielfacher
 - Detektorspannung: 1,5 kV
- Software: LabSolutions, LCMSsolution Version 3.41.324 (Shimadzu Europa, Duisburg)

6.3.2 HPLC-Säulen

In der folgenden Tabelle sind die Vorsäulen bzw. Filter aufgelistet, die während der Säulenscreenings bzw. der Forschungsarbeiten verwendet wurden. Bei den fehlenden Säulen (bzgl. Tab. 6-2) waren keine Vorsäulen vorhanden.

Tab. 6-1: Verwendete Vorsäulen.

Nr.	Phase (vgl. Tab. 6-2)	Vorsäule
(1)	Nucleodur C18 ec (analytisch)	CC 8/4Nucleodur 100-5 C18 ec
(2)	Nucleosil C18	CC 8/4 Nucleosil 120-5 C18
(3)	LiChrospher C18 RP ec	CC 8/4 Lispher 100 RP 18 ec, 5 µm
(10,11)	Kinetex PFP / Kinetex C18	HPLC Krudkatcher Ultra Column In-Line Filter 0,5 µm Porosity x 0,004 inch ID

Nr.	Phase (vgl. Tab. 6-2)	Vorsäule
(13)	Nucleodur C18 ec (präparativ)	VP 10/8, 8 mm Vorsäulenkartusche
(20)	Lux Amylose-2	SecurityGuard Cartridge Lux Amylose-2, 4 × 3,0 mm
(22)	Lux Cellulose-3	SecurityGuard Cartridge Lux Cellulose-3, 4 × 3,0 mm

Die in Tab. 6-2 aufgeführten HPLC-Säulen wurden im Rahmen dieser Arbeit getestet bzw. verwendet.

Tab. 6-2: Verwendete HPLC-Säulen.

Nr.	HPLC-Modus	Firma	Dimension (L x ID) [mm]	Phase	Partikel- größe [µm]	Poren- größe [Å]
(1)	RP-HPLC (analytisch)	Macherey-Nagel	125 x 4,0	Nucleodur C18 ec	5	100
(2)	RP-HPLC (analytisch)	Macherey-Nagel	250 x 4,0	Nucleosil C18	5	120
(3)	RP-HPLC (analytisch)	Macherey-Nagel	250 x 4,0	LiChrospher C18 RP ec	5	100
(4)	RP-HPLC (analytisch)	Thermo Scientific	250 x 4,6	ODS Hypersil (C18)	3	120
(5)	RP-HPLC (analytisch)	Macherey-Nagel	250 x 4,0	Nucleodur C18 Isis	3	110
(6)	RP-HPLC (analytisch)	Varian	150 x 4,0	Pursuit XRs 18	3	100
(7)	RP-HPLC (analytisch)	YMC	100 x 4,0	YMC-Pack ProC18	3	120
(8)	RP-HPLC (analytisch)	Macherey-Nagel	250 x 4,0	Nucleosil C18 Hop	5	100
(9)	RP-HPLC (analytisch)	Restek	150 x 4,6	Ultra II Biphenyl	3	100
(10)	RP-HPLC (analytisch)	Phenomenex	100 x 4,6	Kinetex PFP	2,6	100
(11)	RP-HPLC (analytisch)	Phenomenex	100 x 4,6	Kinetex C18	2,6	100
(12)	RP-HPLC (präparativ)	Knauer	250 x 8,0	LiChrospher-60 RP select B (C8)	5	60
(13)	RP-HPLC (präparativ)	Macherey-Nagel	250 x 10,0	Nucleodur C18 ec	5	100
(14)	Chiral (analytisch)	Macherey-Nagel	250 x 4,0	Nucleosil-Chiral-1	5	120
(15)	Chiral (analytisch)	Macherey-Nagel	250 x 4,6	Nucleocel Alpha-RP S	5	---
(16)	Chiral (analytisch)	Knauer	250 x 4,6	Europak 01	5	---
(17)	Chiral (analytisch)	Daicel	250 x 4,6	Chiralpak-IA	5	---
(18)	Chiral (analytisch)	Daicel	250 x 4,6	Chiralpak-IB	5	---
(19)	Chiral (analytisch)	Daicel	250 x 4,6	Chiralpak-IC	5	---
(20)	Chiral (analytisch)	Phenomenex	250 x 4,6	Lux Amylose-2	5	1000
(21)	Chiral (analytisch)	Phenomenex	250 x 4,6	Lux Cellulose-2	5	1000
(22)	Chiral (analytisch)	Phenomenex	250 x 4,6	Lux Cellulose-3	5	1000

6.3.3 Arbeits- und Messgeräte

Analysenwaage TP-214, Wägebereich 210 g, Ablesbarkeit 0,1 mg (Denver Instrument, Göttingen)

Fraktionensammler Isco Cygnet (Knauer, Berlin)

Heizmagnetrührer MR 2002 (Heidolph, Schwabach)

Heizhaube PILZ® Typ 618, 220 V, 80 W (Heraeus-Wittmann, Heidelberg)

ICP-OES: Optima 5300 DV Optical Emission Spectrometer, AS 90 plus Autosampler, Quarz Sprühkammer – mit Wasser auf 15 °C gekühlt, Microzerstäuber, Aluminiumoxidinjektor, Software: WinLab 32 (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA)

Ofen, Gaschromatograph GC 86.10 (DANI Instruments S.p.A., Cologno Monzese, Italien)

pH-Meter pH 340, pH-Elektrode SenTix 61 (WTW, Weilheim)

Pipette, Eppendorf Research® (variabel), 0,5 – 10 µL (Eppendorf, Hamburg)

Pipette, Eppendorf Research® (variabel), 10 – 100 µL (Eppendorf, Hamburg)

Pipette, Eppendorf Research® (variabel), 100 – 1000 µL (Eppendorf, Hamburg)

Pipette, Eppendorf Research® (variabel), 500 – 5000 µL (Eppendorf, Hamburg)

Rotor, isolierte Rotationseinheit des Rotationsverdampfers VV2011 (Heidolph, Schwabach)

Rotationsverdampfer Laborota 4002 – control (Heidolph, Schwabach)

Schüttler HS 501 digital (IKA Labortechnik, Staufen)

Temperierbad TER 2, gefüllt mit handelsüblichem Speiseöl (IKA Labortechnik, Staufen)

Trockenschrank (Mettler, Schwabach)

Ultraschallbad Sonorex Super RK 514 (Bandelin, Berlin)

Umlaufkühler RK 20 (Lauda, Lauda-Königshofen)

Universal Zerkleinerer, Speedy Pro Typ 720 (Krups, Offenbach)

Vakuumpumpe (für Entgasung am Ultraschallbad) Aero Mat VDE 0530 (KNF Neuberger, Freiburg)

Vakuumpumpe (für Rotationsverdampfer) Rotavac valve control (Heidolph, Schwabach)

Vortex-Genie (Scientific Industries, Bohemia, New York, USA)

Vortex Mixer ZX Classic (Velp Scientifica, Usmate, Italien)

Waage isoCal, Wägebereich 0,5 – 6200 g, Ablesbarkeit 0,01 g (Sartorius, Göttingen)

Wasseraufbereitungsanlage GenPure (TKA Wasseraufbereitungssysteme, Niederelbert)

Zentrifuge Universal 320 (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)

6.3.4 Verbrauchs- und sonstiges Labormaterialien

Bechergläser, diverse Größen

- Bördelkappen N 11 (für 1,5-mL-Probengläser), TB/oA-1.3, Aluminium silber, mit Loch, Naturkautschuk/Butyl rot-orange / TEF farblos (70231, Macherey-Nagel, Düren)
- Bördelkappen N 20 (für 20-mL-Probengläser), oA, Aluminium silber, mit Loch, ohne Dichtscheibe (702804, Macherey-Nagel, Düren)
- Chromatographiesäulen aus Glas, mit Fritte, diverse Größen
- Einmalspritzen, 1 mL, Luer-Slip-Spitze (6120106, Terumo, VWR, Darmstadt)
- Einmalspritzen, 2 mL, Omnifix[®], Luer (04616022, B. Braun, Melsungen)
- Einmalspritzen, 5 mL, Luer-Slip-Spitze (6131599, Terumo, VWR, Darmstadt)
- Einmalspritzen, 10 mL, Omnifix[®], Luer-Lok Tip (4616103V, B. Braun, Melsungen)
- Einmalspritzen, 20 mL exzentrische Luer-Spitze (6135402, Terumo, VWR, Darmstadt)
- Einmalspritzen, 50 mL, exzentrische Luer-Spitze (6134902, Terumo, VWR, Darmstadt)
- Erlenmeyerkolben, diverse Größen
- Filterpapier, vliesverstärkt, Porengröße 0,45 µm, ID = 50 mm (18406--50-----N, Sartorius, Göttingen)
- Gummistopfen (für 20-mL-Probengläser), N 20, Butyl grau (702931, Macherey-Nagel, Düren)
- Kunststofffolienstücke, Kantenlängen 5 – 10 mm, benötigt zum Extrahieren von Bierwürze
- Küvetten, aus Kunststoff für den Einmalgebrauch, geeignet für den UV/Vis-Bereich, mikro, z = 8,5 mm, Inhalt 70 – 850 µL, Schichtdicke 10 mm (6125686, VWR, Darmstadt)
- Magnetrührstäbchen, diverse Größen und Formen
- Messkolben, diverse Größen
- Micro-Einsätze (für 1,5-mL-Probengläser), Inhalt 0,10 mL, 31 x 6 mm, Klarglas mit Spitze 15 mm (Z.0400907, ZEFA Laborservice, Harthausen)
- Pasteur-Pipetten, Glas, Volumen 2 mL, Länge 230 mm, Kapillarspitze Länge 140 mm (6121702, VWR, Darmstadt)
- Pipettenspitzen Plastibrand[®], transparent, 0,5 – 20 µL (702526, Brand, Wertheim)
- Pipettenspitzen Universal, gelb, 2 – 200 µL (6125755, VWR, Darmstadt)
- Pipettenspitzen Universal, blau, 50 – 1000 µL (6125756, VWR, Darmstadt)
- Pipettenspitzen, Macro, graduert, transparent, 1 – 5 mL (6130339, VWR, Darmstadt)
- Probengläser, (Kurzgewinde ND 9) 1,5 mL, Klarglas, 11,6 x 32 mm (10024363, ZEFA Laborservice, Harthausen)
- Probengläser N 11 (Bördelverschluss), 1,5 mL, Klarglas, 11,6 x 32 mm (70201HP, Macherey-Nagel, Düren)
- Probengläser (Schraubverschluss), 4 mL, Klarglas, 15 x 45 mm, Gewinde: 13-425 mm (34013-1545, JG Finneran, Vineland, New Jersey, USA)
- Probengläser G 12, 12 mL, Klarglas, 19 x 66 mm, Gewinde: 15-425 mm (300135, CS Chromatographie Service, Langerwehe)

Probengläser (Bördelverschluss), 20 mL, Klarglas, 22,5 × 75,5 mm (SU860051, Supelco, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Probenröhrchen, 15 mL, graduert, Polypropylen, blauer Schraubverschluss, konischer Boden, steril, 17,0 × 120 mm (K140072, ZEFA Laborservice, Harthausen)

Probenröhrchen, 50 mL, graduert, Polypropylen, blauer Schraubverschluss, konischer Boden, mit Stehrand, steril, 30,0 × 115 mm (K140071, ZEFA Laborservice, Harthausen)

Reagenzgläser, mit Schraubdeckelverschluss, Inhalt 100 mL, L × ID = 133,5 × 40 mm

Reagenzgläser, mit Schraubdeckelverschluss, Inhalt 15 mL, L × ID = 125 × 15,7 mm

Reagenzgläser, mit Schraubdeckelverschluss, Inhalt 20 mL, L × ID = 160 × 16 mm

Reagenzgläser, mit Rand, Inhalt 20 mL, L × ID = 130 × 16 mm, Wanddicke 0,5 – 0,6 mm (für Fraktionensammler)

Reagenzgläser, mit Schliff, spitzer Boden, graduert, Inhalt 10 mL, L × ID = 120 × 17 mm

Rollrandgläser, 5 mL, mit zugehörigen Schnappdeckeln (unbekannt)

Rundkolben, diverse Größen

Rückflusskühler

Scheidetrichter, diverse Größen

Schott-Flaschen, aus DURAN®-Klarglas, diverse Größen

Schraubkappen (für 1,5-mL-Probengläser) mit Loch 6 mm, blau mit Dichtung Naturkautschuk rot-orange / TEF transparent, Stärke 1,0 mm, für Kurzgewinde 9 mm (10024340, ZEFA Laborservice, Harthausen)

Schraubkappen G 15 mit eingelegter Dichtscheibe G 15 (für 12-mL-Probengläser) (300330, CS Chromatographie Service, Langerwehe)

Schraubverschlüsse (für 4-mL-Probengläser), ohne Loch, schwarz, Polypropylen, ohne Dichtung, Gewinde: 13-425 mm (5320-13, JG Finneran, Vineland, New Jersey, USA)

Septen (für 4-mL-Probengläser), 13 mm × 0,060", rot, PTFE/Silikon (606050-13, JG Finneran, Vineland, New Jersey, USA)

Specksteingefäß, Snapsikivi, Inhalt 40 mL, 6,1 × 4,5 cm (Hukka Design Oy, Tuupovaara, Finnland)

Spitzkolben, diverse Größen

Spritzenkanülen, Standard Luer, 20 G × 2³/₄ ", 0,9 × 70 mm (6120130, Terumo, VWR, Darmstadt)

Spritzenvorsatzfilter Rotilabo®, PTFE, steril, Porengröße 0,45 µm, ID = 15 mm (PA54.1, Roth, Karlsruhe)

Spritzenvorsatzfilter, PTFE, Porengröße 0,45 µm, ID = 25 mm (5140071, VWR, Darmstadt)

Vakuumfiltrationsgerät, Filtereinsatz für 50-mm-Filterpapiere (0,45 µm), Aufsatz 250 mL, Auffangflasche 1000 mL

Zweihalskolben, 100 mL

6.4 HPLC-Methoden

In Tab. 6-4 (nächste Seite) sind diejenigen HPLC-Methoden summarisch aufgeführt, die sich für die unterschiedlichen Trennprobleme als die jeweils geeignetsten erwiesen und dementsprechend nach den Methodenentwicklungen / -optimierungen verwendet wurden.

Zur simultanen Analyse von IAS und AS (RP-HPLC, analytisch) – die BS wurden aufgrund ihrer geringen Bedeutung bei den Analysen als Ganzes von der Säule gewaschen – wurde der folgende Gradient verwendet (HPLC-Methode-10, Tab. 6-3):

Tab. 6-3: Gradientenprogramm (HPLC-Methode-10) zur simultanen Trennung von IAS und AS (RP-HPLC mit Säule 11).

Zeit [min]	0,025 % H ₃ PO ₄	ACN
0 – 15	55 %	45 %
15 – 30	55 – 40 %	45 – 60 %
30 – 31	40 – 10 %	60 – 90 %
31 – 36	10 %	90 %
36 – 37	10 – 55 %	90 – 45 %
37 – 45	55 %	45 %

Die weiteren Parameter waren: Anlage 2 (ohne MS)
Säule 11
Temperatur: 45 °C
Fluss 1,0 mL/min
UV-Detektion: $\lambda = 260$ und 290 nm

Tab. 6-4: Übersicht über die verwendeten HPLC-Methoden.

Trennproblem (HPLC-Methode)	Säule	T [°C]	Mobile Phase	Zusammen- setzung	Fluss [mL/min]	UV (λ) [nm]	MS
	nur UV-Detektion (Anlage 1 oder 2)						
AS, RP-HPLC, analytisch (HPLC-Methode-1)	11	45	0,025 % H ₃ PO ₄ /ACN	50/50	1,0	290	---
IAS, RP-HPLC, analytisch (HPLC-Methode-2)	11	45	0,025 % H ₃ PO ₄ /ACN	55/45	1,0	260	---
AS, RP-HPLC, präparativ (HPLC-Methode-3)	13	45	0,075 % H ₃ PO ₄ /ACN	40/60	10,0	290	---
IAS, RP-HPLC, präparativ (HPLC-Methode-4)	13	45	0,015 % H ₃ PO ₄ /ACN	45/55	10,0	260	---
AS, chirale HPLC, analytisch/präparativ (HPLC-Methode-5)	22	45	0,075 % H ₃ PO ₄ /ACN	60/40	2,0	290	---
IAS, chirale HPLC, analytisch (HPLC-Methode-6)	22	45	0,075 % H ₃ PO ₄ /ACN	70/30	2,0	260	---
	simultane UV- und MS-Detektion (Anlage 2)						
AS, RP-HPLC, analytisch (HPLC-Methode-7)	11	45	0,03 % TFA/ACN	50/50	1,0	290	positiv, TIC
IAS, RP-HPLC, analytisch (HPLC-Methode-8)	11	45	0,03 % TFA/ACN	50/50	1,0	260	positiv, TIC
AS, chirale HPLC, analytisch (HPLC-Methode-9)	22	45	0,3 % TFA/ACN	52/48	1,0	290	positiv, TIC

6.5 Isomerisierung von Humulon

In den Auswertungen und Beurteilungen der Isomerisierungs-Versuche (Kap. 4.4) wurde neben einer generell erfolgreichen Isomerisierung insbesondere auf die IAS-Ausbeute (Umsatz (U), Isomerisierungsrate) sowie auf das jeweils entstandene *cis:trans*-Verhältnis (C/T) geachtet. Dabei wurden die im Folgenden aufgeführten Formeln verwendet. Die entsprechenden Peaks aus den Chromatogrammen wurden hierzu über ihre Peakflächen integriert (dies gilt auch für sämtliche andere Auswertungen dieser Forschungsarbeit).

$$C/T_{IAS} = \frac{m_{CIAS}}{m_{TIAS}}$$

Formel 6-1: Berechnung des *cis:trans*-Verhältnisses (C/T).

$$U [\%] = \frac{m_{IAS_1}}{m_{AS_0}} \cdot 100$$

Formel 6-2: Berechnung des Umsatzes (U); IAS_1 = Masse IAS nach der Reaktion, AS_0 = Masse AS vor der Reaktion.

$$WF [\%] = \frac{AS_1}{AS_0} \cdot 100$$

Formel 6-3: Berechnung der Wiederfindung (Isomerisierung); AS_1 = Masse AS nach der Reaktion, AS_0 = Masse AS vor der Reaktion.

In sämtlichen Versuchen wurde bei der Umrechnung zwischen Masse und Stoffmenge und umgekehrt von der Molekülmasse 362 Da ausgegangen. Dies entspricht dem (gerundeten) Wert von *n*- und *ad*-Humulon, die zusammen durchschnittlich etwa 70 % (ICE) des Gesamt- α -Säuregehalts ausmachen. Aufgrund der minoren Anteile von *co*-, *post*-, *prä*- und *adprä*-Humulon wurden diese der Einfachheit halber bei den Umrechnungen vernachlässigt. Das gleiche gilt auch bei den *Iso- α* -Säuren sowie bei sämtlichen Racemisierungs- und sonstigen Versuchen (Kap. 6.6 ff).

6.5.1 Isomerisierung von Hopfenextrakt in Phosphatpuffer

Zu 200 mL Phosphatpuffer (66,7 mM, bestehend aus KH_2PO_4 und $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) wurden 2 mL einer Lösung von ICE-2 in MeOH (30 g/L, d.h. 30 mg AS, 0,08 mmol AS) zugegeben und für 2 h unter Rückfluss gekocht (750 rpm). Anschließend wurden 20 mL abgenommen, das Wasser am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 1 mL MeOH gelöst. Die grüne Lösung (3 g/L IAS, bei einem theoretischen Umsatz von 100 %) wurde vom Phosphat abgenommen und zur weiteren Verwendung bei -24 °C gelagert.

6.5.2 Isomerisierung von racemisiertem Humulon (rac-AS)

1 mL der methanolischen Lösung «rac-AS» ($c_{AS} = 28 \text{ g/L}$, $0,08 \text{ mmol AS}$) wurde in ein 20-mL-Reagenzglas mit Schraubdeckel vorgelegt und mit 1 mL einer $0,25 \text{ M}$ wässrigen Lösung von $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ versetzt. Der nun trüben Lösung wurden $140 \mu\text{L}$ 1 M NaOH zugefügt, wodurch die Lösung wieder fast klar wurde. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Temperierbad bei $80 \text{ }^\circ\text{C}$ für 1 h gerührt (800 rpm). Nach der Extraktion gemäß *Extraktionsmethode 3* (Kap 6.13) wurde die organische Phase isoliert und das Hexan am Rotationsverdampfer entfernt. Schließlich wurde der Rückstand in $1,5 \text{ mL}$ eines Gemisches aus $\text{ACN}/0,025 \text{ } \%$ H_3PO_4 ($67/33$) aufgenommen und mittels HPLC analysiert (Anlage 1, Säule 11 + Säule 22, $1 \mu\text{L} + 5 \mu\text{L}$) (= «rac-IAS»).

Die sechs rac-IAS-Fractionen ($\text{rac-TICH} \triangleq \text{TICH-1/TICH-2}$, $\text{rac-CICH} \triangleq \text{CICH-1/CICH-2}$, $\text{rac-TINH} \triangleq \text{TINH-1/TINH-2}$, $\text{rac-CINH} \triangleq \text{CINH-1/CINH-2}$, $\text{rac-TIAH} \triangleq \text{TIAH-1} - \text{TIAH-4}$, $\text{rac-CIAH} \triangleq \text{CIAH-1} - \text{CIAH-4}$) wurden anschließend durch präparative RP-HPLC (Kap. 6.11) isoliert. Dazu wurden dreimal jeweils $40 \mu\text{L}$ der rac-IAS-Lösung injiziert. Nach Vereinigung der entsprechenden Fraktionen wurde gemäß *Extraktionsmethode 4* (Kap 6.13) extrahiert und die Rückstände in jeweils $500 \mu\text{L}$ MeOH aufgenommen. Anschließend wurden die sechs Lösungen (rac-TICH : $0,2 \text{ g/L}$, rac-CICH : $0,9 \text{ g/L}$, rac-TINH : $0,7 \text{ g/L}$, rac-CINH : $1,7 \text{ g/L}$, rac-TIAH : $0,1 \text{ g/L}$, rac-CIAH : $0,4 \text{ g/L}$) mittels chiraler HPLC hinsichtlich der Enantiomere analysiert (Anlage 1, Säule 22, $25 \mu\text{L}$).

6.5.3 Isomerisierung an fester Phase

6.5.3.1 Isomerisierung an Aluminiumoxid (sauer, neutral und basisch), Kieselgel, Kieselgur, Florisil® und Aktivkohle

Es wurden in drei Bechergläsern je $5,0 \text{ g}$ saures, neutrales und basisches Al_2O_3 eingewogen. Anschließend wurden je 5 mL einer Lösung ($c_{\text{ICE-2}} = 100 \text{ g/L}$) von ICE-2 in Et_2O ($\triangleq 223 \text{ mg AS}$, $0,62 \text{ mmol AS}$) zugegeben und gut durchmischt. Die Lösemittel wurden bei Raumtemperatur verdunstet und die nun gelben Feststoffe in drei Chromatographiesäulen (mit Fritte) überführt. Daraufhin wurden die Säulen mitsamt dem jeweiligen AS-beschichteten Al_2O_3 (sauer, neutral und basisch) für 2 h bei $100 \text{ }^\circ\text{C}$ im Ofen erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde mit je 10 mL MeOH eluiert und die Proben mittels HPLC hinsichtlich der AS-Isomerisierung untersucht (Anlage 1, Säule 9, $20 \mu\text{L}$).

Je 3,0 g saures Al_2O_3 , Kieselgel und Florisil[®] sowie 1,5 g Kieselgur wurden in vier 50-mL-Rundkolben vorgelegt und mit je 6 mL einer ICE-2-Lösung (in Et_2O , $c_{\text{ICE-2}} = 50 \text{ g/L}$, $\triangleq 134 \text{ mg AS}$, $0,37 \text{ mmol AS}$) versetzt. Nach guter Durchmischung wurden den vier Ansätzen die Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und die zurückbleibenden Feststoffe (Al_2O_3 , Kieselgel, Florisil[®] und Kieselgur) in je drei 4-mL-Probengläser aufgeteilt. Anschließend wurden die zwölf Proben im Ofen bei $100 \text{ }^\circ\text{C}$ für 30, 60 und 120 min erhitzt. Nach der Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Substanzen mit je 3 mL MeOH versetzt und kräftig geschüttelt (vortex). Daraufhin wurde bei 5000 rpm für 3 min zentrifugiert und die jeweiligen Überstände zusätzlich filtriert (5-mL-Spritze, Porengröße: $0,45 \text{ }\mu\text{m}$, ID: 15 mm). Schließlich wurden HPLC-Analysen (Anlage 1, Säule 9, $20 \text{ }\mu\text{L}$) der zwölf Proben durchgeführt.

In eine Hopfenextrakt-Lösung (320 mg Extrakt-1 in 6 mL Et_2O) wurden 1,8 g Aktivkohle eingebracht (50-mL-Rundkolben) und gut durchmischt. Nach dem Entfernen des Lösemittels am Rotationsverdampfer wurde die Hopfenextrakt-beschichtete Aktivkohle auf drei 4-mL-Probengläser aufgeteilt und bei $100 \text{ }^\circ\text{C}$ im Ofen für 30, 60 und 120 min erhitzt. Anschließend wurde gemäß Abb. 6-2 aufgearbeitet und analysiert.

6.5.3.2 Temperaturabhängigkeit der Isomerisierung an Florisil[®]

6,0 g Florisil[®] wurden in einem 50-mL-Rundkolben in einer etherischen Hopfenextrakt-Lösung (Extrakt-2, 12 mL, $c_{\text{Extrakt-2}} = 50 \text{ g/L}$, $\triangleq 296 \text{ mg AS}$, $0,82 \text{ mmol AS}$) suspendiert und anschließend am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit. Das nun mit Hopfenextrakt beschichtete Florisil[®] wurde in 1-g-Portionen in sechs Pasteur-Pipetten überführt und diese mittels eines Bunsenbrenners oben und unten zugeschmolzen. Der Rest wurde als Kontrollprobe aufbewahrt. Daraufhin wurden die Proben für jeweils 30 min im Ofen bei 50, 100, 150, 200, 250 und $300 \text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt. Aufgrund dieser hohen Temperaturen ($\geq 200 \text{ }^\circ\text{C}$) musste auf die zugeschmolzenen Pasteur-Pipetten zurückgegriffen werden. Die Pipetten wurden mittels eines Glasschneiders geöffnet und die Proben sowie die Kontrolle in 5-mL-Spritzen, welche bereits mit Spritzenvorsatzfiltern ($0,45 \text{ }\mu\text{m}$, 15 mm) und mit je 3 mL MeOH versehen waren, überführt. Anschließend wurde für je 1 min gevortext, die Lösungen eluiert und diese HPLC-analytisch untersucht (Anlage 1, Säule 9, $20 \text{ }\mu\text{L}$). Die folgende Abbildung zeigt schematisch die einzelnen Schritte der Probenaufarbeitung:

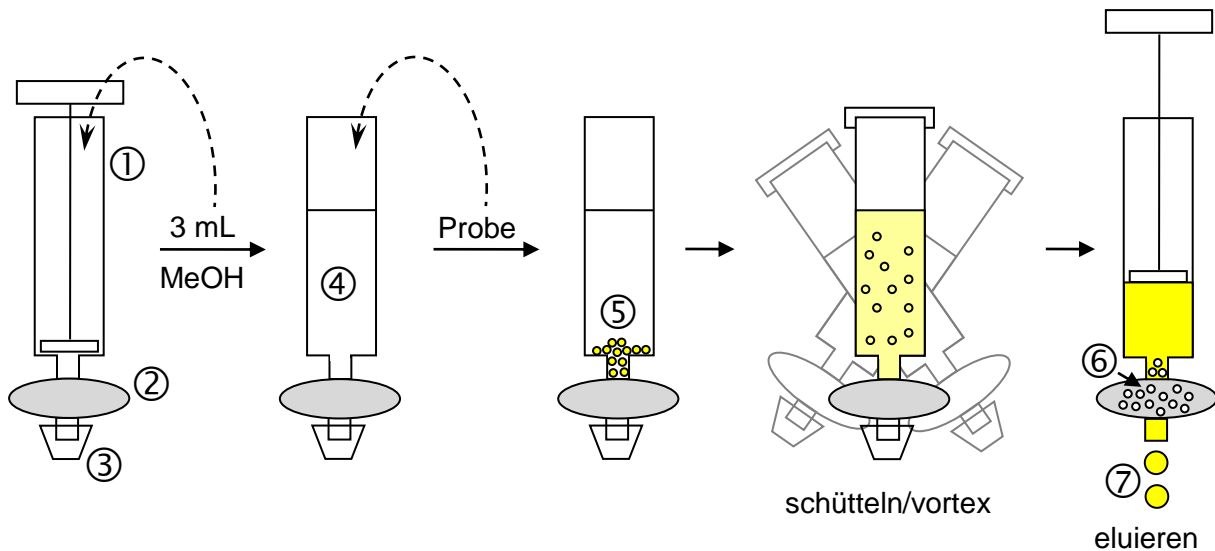


Abb. 6-2: Aufarbeitung der Proben nach der Isomerisierung an fester Phase; 1: 5-mL-Spritze mit Stempel, 2: Spritzenvorsatzfilter (0,45 µm, 15 mm), 3: Verschlusskappe, 4: MeOH, 5: Probe, 6: Festsubstanz (Florisil®) bleibt zurück, 7: Eluat mit AS bzw. IAS.

In einem 250-mL-Rundkolben wurden 20,0 g Florisil® mit einer etherischen Hopfenextrakt-Lösung (Extrakt-2, 40 mL, $c_{\text{Extrakt-2}} = 50 \text{ g/L}$) versetzt und gut durchmischt. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das mit Hopfenextrakt beschichtete Florisil® auf 20 4-mL-Probengläser à 1 g aufgeteilt. Der Rest diente als Kontrolle ($\triangleq t = 0$). Die Probengläser wurden anschließend bei 40 °C im Ofen erwärmt und nach bestimmten Zeiten wieder entnommen (Tab. 6-5). Schließlich wurden die Proben – zum Teil direkt, zum Teil nach mehrtägiger Lagerung bei 4 °C – sowie die Kontrolle gemäß Abb. 6-2 aufgearbeitet und analysiert.

Tab. 6-5: Zeiten der Probennahme bei der Isomerisierung an Florisil® bei 40 °C.

Ansatz-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Zeit [d]	1	4	5	6	7	8	11	12	13	14
Ansatz-Nr.	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Zeit [d]	15	18	19	21	22	25	26	27	28	35

Jeweils 1,5 g Hopfenextrakt (Extrakt-1 bzw. Extrakt-2) wurden in je 30 mL Et₂O gelöst ($c_{\text{Extrakt}} = 50 \text{ g/L}$) und zu je 15 g Florisil® gegeben (100-mL-Rundkolben). Die Ansätze wurden gut durchmischt und die Lösemittel anschließend am Rotationsverdampfer wieder entfernt. Daraufhin wurden die mit Extrakt-1 (E1) bzw. Extrakt-2 (E3) beschichteten Florisil®-Fraktionen auf jeweils 13 Probengläser (4 mL) aufgeteilt und gemäß Tab. 6-6 für unterschiedliche Zeiten an zwei verschiedenen Orten (Ofen, 25 °C bzw. Fensterbank, RT) aufbewahrt. Die beiden Reste wurden jeweils als Kontrolle ($\triangleq t = 0$) verwendet und, genau wie die Proben, gemäß Abb. 6-2 aufgearbeitet und analysiert.

Tab. 6-6: Isomerisierung an Florisil® bei 25 °C bzw. Raumtemperatur.

Ansatz-Nr.	Extrakt-1	Extrakt-2
1-E1 bzw. 1-E3	Ofen, 25 °C, 3 d	Ofen, 25 °C, 3 d
2-E1 bzw. 2-E3	Ofen, 25 °C, 7 d	Ofen, 25 °C, 7 d
3-E1 bzw. 3-E3	Ofen, 25 °C, 14 d	Ofen, 25 °C, 14 d
4-E1 bzw. 4-E3	Ofen, 25 °C, 21 d	Ofen, 25 °C, 21 d
5-E1 bzw. 5-E3	Ofen, 25 °C, 28 d	Ofen, 25 °C, 28 d
6-E1 bzw. 6-E3	Ofen, 25 °C, 35 d	Ofen, 25 °C, 35 d
7-E1 bzw. 7-E3	Ofen, 25 °C, 42 d	Ofen, 25 °C, 42 d
8-E1 bzw. 8-E3	Ofen, 25 °C, 57 d	Ofen, 25 °C, 57 d
9-E1 bzw. 9-E3	Fensterbank, RT, 3 d	Fensterbank, RT, 3 d
10-E1 bzw. 10-E3	Fensterbank, RT, 7 d	Fensterbank, RT, 7 d
11-E1 bzw. 11-E3	Fensterbank, RT, 14 d	Fensterbank, RT, 14 d
12-E1 bzw. 12-E3	Fensterbank, RT, 21 d	Fensterbank, RT, 21 d
13-E1 bzw. 13-E3	Fensterbank, RT, 57 d	Fensterbank, RT, 57 d

6.5.4 Isomerisierung in Lösung (KOH- bzw. NaOH-Lösung, basische und sonstige organische Lösemittel)

100 mg *AS-pur* (\cong 89 mg AS, 0,24 mmol AS) wurden in einem 20-mL-Probenglas mit Bördelverschluss und Septum in 20 mL 0,025 M KOH-Lösung gelöst ($c_{AS} = 0,012$ M). Anschließend wurde im Temperierbad bei 100 °C für insgesamt 60 min erhitzt. Dabei wurden mittels 1-mL-Spritzen ca. alle 5 min 150- μ L-Proben entnommen und diese dann direkt mittels HPLC analysiert (Anlage 1, Säule 9, 5 μ L).

In 10 mL 0,025 M NaOH-Lösung wurden 50 mg *AS-pur* (\cong 44 mg AS, 0,12 mmol AS) gelöst ($c_{AS} = 0,012$ M). Die Lösung wurde auf vier Schraubdeckelreagenzgläser (20 mL) à 2,5 mL aufgeteilt und im Temperierbad bei 100 °C für 5, 30, 60 und 120 min erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die Proben direkt einer HPLC-Analyse unterzogen (Anlage 1, Säule 9, 5 μ L).

Jeweils 40 mg *AS-pur* (\cong 35 mg AS, 0,10 mmol AS) wurden in je 8 mL Pyridin bzw. Triethylamin gelöst. Die Proben wurden in Schraubdeckelreagenzgläsern zu je 2 mL aufgeteilt und bei 100 °C (Pyridin) bzw. 90 °C (Triethylamin) im Ofen für je 30, 60 und 120 min erhitzt. Die jeweiligen Reste dienten als Kontrollproben ($\cong t = 0$) und blieben unbehandelt. Es folgte die

direkte HPLC-analytische Untersuchung der Proben bzw. der Kontrollen (Anlage 1, Säule 9, 5 μ L).

In sieben 20-mL-Schraubdeckelreagenzgläsern wurden jeweils 50 mg Hopfenextrakt (Extrakt-2, \cong 25 mg AS, 0,07 mmol AS) in 10 mL folgender Lösemittel (Tab. 6-7) gelöst. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz auch in H₂O (anorganisch) gelöst. Da der Extrakt vor allem im H₂O nicht komplett in Lösung ging, wurden, um gleiche Bedingungen zu gewährleisten, alle Ansätze für 15 min im Ultraschallbad deponiert. Nach der Entnahme von 150- μ L-Proben (\cong t = 0) wurden die Reagenzgläser im Temperierbad bei 100 °C für 120 min gerührt (800 rpm). Anschließend wurden die insgesamt 16 Proben (t = 0 bzw. t = 120) mittels HPLC analysiert (Anlage 1, Säule 9, 5 μ L).

Tab. 6-7: Reaktionsansätze: Isomerisierung in sonstigen (organischen) Lösemitteln.

Ansatz-Nr.	Lösemittel
1	MeOH
2	EtOH
3	1-PrOH
4	Toluol
5	1,4-Dioxan
6	<i>n</i> -Hexan
7	<i>iso</i> -Octan
8	H ₂ O (Kontrollprobe)

Jeweils 80 mg Hopfenextrakt (Extrakt-1, \cong 46 mg AS, 0,13 mmol AS) wurden in zwei Schraubdeckelreagenzgläsern (20 mL) in je 3,5 mL Diethylenglykol gelöst. Anschließend wurde Ansatz A mit 3,5 mL H₂O und Ansatz B mit 3,5 mL Diethylenglykol versetzt. Beide Ansätze wurden daraufhin im Temperierbad bei 100 °C und 800 rpm für 60 min erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die viskosen Lösungen im Verhältnis 1 : 1 mit MeOH versetzt, wodurch sie klar und flüssig wurden. Schließlich wurde bei beiden Proben eine HPLC-Analyse durchgeführt (Anlage 1, Säule 9, 100 μ L).

6.5.5 Einfluss von Katalysatoren auf die Isomerisierung

6.5.5.1 Isomerisierung in flüssiger Phase: Diverse Salze und Oxide als Katalysator

Variante 1^[158]:

Die Isomerisierung mit Verbindungen zweiwertiger Kationen als Katalysatoren in flüssiger Phase wurde gemäß der Vorschrift von KHATIB ET AL. durchgeführt.^[158] Dabei wurde jeweils 1/18 des Literatur-Ansatzes verwendet und das Magnesiumsulfat-Heptahydrat durch andere Salze ersetzt. Jeweils 100 mg *AS-pur* (\cong 89 mg AS, 0,24 mmol AS) wurden in einem Gemisch aus 2,778 mL MeOH und 0,297 mL 1 M NaOH gelöst (20-mL-Schraubdeckelreagenzglas). Zu dieser AS-Lösung wurden 3,055 mL eines MeOH/H₂O-Gemisches (1,2 : 1) mit 0,48 mmol ($n_{\text{Salz}} = 2 \times n_{\text{AS}}$) eines bestimmten Salzen (Tab. 6-8) zugefügt. Zur Kontrolle diente eine weitere Probe ohne Salz-Zugabe. Die acht Ansätze wurden anschließend bei 70 °C im Temperierbad unter Rühren (800 rpm) für 45 min erhitzt. Es folgte jeweils eine zweimalige Extraktion (*Extraktionsmethode 3*) sowie die Analyse mittels HPLC (Anlage 1, Säule 9 [Säule 11 bei der Kontrollprobe], 5 μ L)

Variante 2:

In einer, im Vergleich zu der Methode von KHATIB ET AL., leicht abgewandelten Form, in der das Verhältnis MeOH : H₂O = 1 : 1 gesetzt und 3,3 % (v/v) 1 M NaOH zugegeben wurde, wurde der Einfluss diverser Salze und Oxide auf die Isomerisierung systematisch untersucht. Hierbei wurden in 18 20-mL-Schraubdeckelreagenzgläsern diverse Substanzen als eventuelle Katalysatoren vorgelegt (Tab. 6-8). Dazu wurden jeweils 2,5 mL H₂O sowie eine Lösung aus 50 mg Hopfenextrakt (Extrakt-1, \cong 29 mg AS, 0,08 mmol AS) in 2,5 mL MeOH gegeben. Letztlich wurden noch 170 μ L 1 M NaOH zugefügt und die Ansätze für 60 min im Temperierbad bei 80 °C und 800 rpm gerührt. Anschließend wurden die Proben extrahiert (*Extraktionsmethode 3*) und die Hexan-Phasen in 10-mL-Spitzkolben überführt. Die Lösemittel wurden am Rotationsverdampfer entfernt und die Rückstände in jeweils 1 mL MeOH gelöst, bevor sie HPLC-analytisch untersucht wurden (Anlage 1, Säule 11, 1 μ L).

Tab. 6-8: Reaktionsansätze: Isomerisierung in flüssiger Phase: Diverse Salze und Oxide als Katalysator.

		Ansatz-Nr.	Substanz	m _{Substanz} [mg]	n _{Substanz} [mmol]
Variante 1	Salze	1 (Kontrolle)	---	---	---
		2	CuSO ₄ ·5H ₂ O	120	0,48
		3	FeSO ₄ ·7H ₂ O	133	0,48
		4	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	140	0,48
		5	MnSO ₄ ·H ₂ O	81	0,48
		6	MgCl ₂ ·6H ₂ O	98	0,48
		7	Ca(OH) ₂	36	0,48
		8	CaCl ₂	53	0,48
Variante 2	Salze	1	BaCl ₂ ·2H ₂ O	58,6	0,24
		2	CuCl ₂	32,3	0,24
		3	NiCl ₂	31,1	0,24
		4	PbCl ₂	66,7	0,24
		5	SnCl ₂	45,5	0,24
		6	SrCl ₂ ·6H ₂ O	64,0	0,24
		7	ZnCl ₂	32,7	0,24
	Oxide	8	CaO	13,5	0,24
		9	CuO	23,9	0,30
		10	FeO	172,4	0,24
		11	FeO	172,4	2,40
		12	Fe ₂ O ₃	38,3	0,24
		13	Fe ₃ O ₄	55,6	0,24
		14	MgO	9,7	0,24
		15	NiO	17,9	0,24
		16	PbO	53,6	0,24
		17	TiO ₂	19,2	0,24
		18	ZnO	19,5	0,24

Jeweils 500 µL einer methanolischen Hopfenextrakt-Lösung (Extrakt-1, c_{Extrakt-1} = 100 g/L, ≙ 29 mg AS, 0,08 mmol AS) wurden zu 500 µL H₂O bzw. 500 µL H₂O mit FeO (140 mg, 1,9 mmol; n_{FeO} = 24 × n_{AS}) pipettiert. Außerdem wurden jeweils 66 µL 1 M NaOH zugegeben und beide Ansätze im Temperierbad bei 100 °C und 800 rpm für 60 min gerührt (20-ml-

Schraubdeckelreagenzgläser). Nach dem Abkühlen wurde gemäß *Extraktionsmethode 3* extrahiert. Die Hexan-Phasen wurden abgenommen und am Rotationsverdampfer getrocknet. Die Rückstände wurden in jeweils 1 mL MeOH aufgenommen, die Lösungen filtriert (1-mL-Spritzen, 0,45 μm , 15 mm) und schließlich mittels HPLC analysiert (Anlage 1, Säule 9, 3 μL)

Die Isomerisierung in flüssiger Phase unter Zusatz von Katalysatoren wurde neben der Methode nach KHATIB ET AL. auch ohne Zugabe von NaOH durchgeführt:

Hierbei wurden 88 mg Hopfenextrakt (Extrakt-1, \cong 51 mg AS, 0,14 mmol AS) in 4,4 mL MeOH gelöst und auf zwei 15-mL-Schraubdeckelreagenzgläser à 2,2 mL aufgeteilt (0,07 mmol AS pro Ansatz). Anschließend wurde Ansatz A mit 2,2 mL H_2O und Ansatz B mit einer Lösung aus 68 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in 2,2 mL H_2O (0,24 mmol $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) versetzt. Beide Ansätze wurden im Temperierbad bei 70 °C und 800 rpm für 60 min erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde gemäß *Extraktionsmethode 3* extrahiert und die Hexan-Lösungen direkt mittels HPLC analysiert (Anlage 1, Säule 9, 20 μL).

In 2,7 mL MeOH wurden 54 mg Hopfenextrakt (Extrakt-1, \cong 31 mg AS, 0,09 mmol AS) gelöst (15-mL-Schraubdeckelreagenzglas). Dazu wurde eine Lösung aus 75 mg $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,15 mmol) in 2,7 mL H_2O gegeben und im Temperierbad bei 70 °C für 60 min gerührt (800 rpm). Es folgte die Extraktion (*Extraktionsmethode 3*) sowie die Analyse mittels HPLC (Anlage 1, Säule 9, 20 μL). Zur Kontrolle ($\cong t = 0$) wurde vor dem Erhitzen eine 150- μL -Probe entnommen und direkt analysiert.

60 mg Hopfenextrakt (Extrakt-1, \cong 35 mg AS, 0,10 mmol AS) wurden in 3,0 mL MeOH gelöst. Nach Zugabe von 55 mg $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ (0,17 mmol) in 3,0 mL H_2O wurde die Mischung auf zwei Schraubdeckelreagenzgläser (15 mL) aufgeteilt. Beide Ansätze wurden bei 70 °C im Temperierbad (800 rpm) für 45 bzw. 120 min erhitzt und anschließend gemäß *Extraktionsmethode 3* extrahiert. Schließlich wurden die Proben mittels HPLC analysiert (Anlage 1, Säule 9, 20 μL).

Jeweils 50 mg Hopfenextrakt (Extrakt-1, \cong 29 mg AS, 0,08 mmol AS) wurden in drei 20-mL-Schraubdeckelreagenzgläser in je 5 mL MeOH gelöst. Dazu wurden jeweils 5 mL H_2O mit je 0,16 mmol NaCl (9,4 mg) bzw. KCl (11,9 mg) gegeben. Der dritte Ansatz blieb ohne Salz. Alle drei Ansätze wurden halbiert und für 60 bzw. 120 min bei 70 °C im Temperierbad gerührt (800 rpm). Vor dem Erhitzen entnommene Proben (150 μL) dienten der Kontrolle

($\triangleq t = 0$). Die sechs Ansätze sowie die drei Kontrollproben wurden anschließend direkt HPLC-analytisch untersucht (Anlage 1, Säule 9, 50 μL).

In sechs 20-mL-Schraubdeckelreagenzgläser wurden bestimmte Mengen $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Tab. 6-9) in jeweils 2,5 mL H_2O gelöst. Anschließend wurden je 2,5 mL einer Hopfenextrakt-Lösung (Extrakt-1 in MeOH, $c_{\text{Extrakt-1}} = 20 \text{ g/L}$, $\triangleq 29 \text{ mg AS}$, 0,08 mmol AS) zugegeben und im Temperierbad bei 70 °C für 60 min gerührt. Die sechs Ansätze wurden gemäß *Extraktionsmethode 3* extrahiert und direkt mittels HPLC analysiert (Anlage 1, Säule 9, 20 μL).

Tab. 6-9: Reaktionsansätze: Abhängigkeit der Isomerisierung von der Fe^{2+} -Ionenmenge.

Ansatz-Nr.	$m_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}}$	$n_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}}$	n_{AS}	$(n_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}})/(n_{\text{AS}})$
1	11,12 mg	0,04 mmol	0,08 mmol	0,5 x
2	22,24 mg	0,08 mmol	0,08 mmol	1,0 x
3	44,48 mg	0,16 mmol	0,08 mmol	2,0 x
4	66,72 mg	0,24 mmol	0,08 mmol	3,0 x
5	88,96 mg	0,32 mmol	0,08 mmol	4,0 x
6	111,20 mg	0,40 mmol	0,08 mmol	5,0 x

In vier 20-mL-Schraubdeckelreagenzgläsern wurden die in Tab. 6-10 aufgeführten Ansätze gemischt. Dabei wurde jeweils zunächst, wenn vorhanden, das $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in H_2O gelöst und dann der in Alkohol gelöste Hopfenextrakt zugegeben. Anschließend wurden die Proben im Temperierbad bei 70 °C unter Rühren (800 rpm) erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die vier Ansätze gemäß *Extraktionsmethode 3* extrahiert und die Hexan-Lösungen direkt mittels HPLC analysiert (Anlage 1, Säule 9, 20 μL).

Tab. 6-10: Reaktionsansätze: Isomerisierung in flüssiger Phase: Unterschiedliche Lösemittelmischungen aus H_2O und MeOH bzw. 1-PrOH – mit und ohne Zusatz von $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Ansatz-Nr.	$m_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}}$ [mg]	$n_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}}$ [mmol]	$V_{\text{H}_2\text{O}}$ [mL]	$m_{\text{Extrakt-1}}$ [mg]	n_{AS} [mmol]	V_{Alkohol} [mL]
1	68,6	0,247	2,20	44,0	0,070	1-PrOH: 2,20
2	---	---	2,20	44,0	0,070	1-PrOH: 2,20
3	68,6	0,247	2,20	44,0	0,070	MeOH: 2,20
4	---	---	2,20	44,0	0,070	MeOH: 2,20

6.5.5.2 Isomerisierung an Festsubstanzen ohne Lösemittel

Jeweils 50 mg Hopfenextrakt (Extrakt-1, \cong 29 mg AS, 0,08 mmol AS) wurden in 36 4-mL-Probengläser eingewogen. Anschließend wurden bestimmte Mengen diverser Substanzen (eventuelle Katalysatoren, Tab. 6-11) zugegeben und gründlich mittels eines Glasstabes mit dem Extrakt verrührt, sodass eine homogene Masse entstand. Um die Isomerisierung von geschmolzenem Hopfenextrakt ohne Zugabe eines Katalysators zu testen, wurde zur Kontrolle bei einer Probe nichts zugegeben. Es folgte ein 60-minütiger Aufenthalt der Proben bei 100 °C im Ofen. Daraufhin wurden sie mit jeweils 1 mL MeOH versetzt und 30 s gevortext, um den Hopfenextrakt wieder von den Festsubstanzen zu lösen. Schließlich wurde mittels 1-mL-Spritzen filtriert (0,45 μ m, 15 mm) und die erhaltenen Lösungen HPLC-analytisch untersucht (Anlage 1, Säule 9 bzw. Säule 11, 3 μ L).

Tab. 6-11: Reaktionsansätze: Isomerisierung an Festsubstanzen ohne Lösemittel.

	Ansatz-Nr.	Substanz	m _{Substanz} [mg]	n _{Substanz} [mmol]
	1	Kontrolle (ohne)	---	---
Salze	2	BaCl ₂ ·2H ₂ O	244,3	1,0
	3	CaCl ₂	111,0	1,0
	4	Ca(OH) ₂	74,1	1,0
	5	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	291,0	1,0
	6	CuSO ₄ ·5H ₂ O	249,7	1,0
	7	CuCl ₂	134,5	1,0
	8	KCl	149,1	2,0
	9	K ₂ CO ₃	138,2	1,0
	10	MgCl ₂ ·6H ₂ O	203,3	1,0
	11	MnSO ₄ ·H ₂ O	169,0	1,0
	12	NaCl	116,9	2,0
	13	Na ₂ CO ₃	106,0	1,0
	14	NiCl ₂	129,6	1,0
	15	PbCl ₂	217,0	0,8
	16	SnCl ₂	189,6	1,0
	17	SrCl ₂ ·6H ₂ O	266,6	1,0
	18	ZnCl ₂	136,3	1,0

	Ansatz-Nr.	Substanz	m _{Substanz} [mg]	n _{Substanz} [mmol]
Oxide	19	CaO	112,2	2,0
	20	CuO	159,1	2,0
	21	MgO	80,6	2,0
	22	NiO	149,4	2,0
	23	PbO	174,0	0,8
	24	TiO ₂	79,9	1,0
	25	ZnO	81,4	1,0
eisenhaltige Verbindungen	26	Fe	300,0	5,4
	27	FeCl ₂	126,8	1,0
	28	FeSO ₄ ·7H ₂ O	300,0	1,1
	29	Fe ₂ (SO ₄) ₃ ·5H ₂ O	300,0	0,6
	30	FeO	143,7	2,0
	31	Fe ₂ O ₃	159,7	1,0
	32	Fe ₃ O ₄	231,5	1,0
sonstige Verbindungen	33	Kieselgel	300,0	5,0
	34	Florisil®	300,0	3,0
	35	Florisil® (nicht verrührt)	300,0	3,0
	36	Pd/BaSO ₄	100,0	---

6.5.5.3 Isomerisierung an Eisenoxid: Temperatur- und Zeitabhängigkeit

In drei 4-mL-Probengläser wurden jeweils 50 mg Hopfenextrakt (Extrakt-1, \approx 29 mg AS, 0,08 mmol AS) eingewogen. Dazu wurden je 71 mg FeO gegeben und sorgfältig mit dem Extrakt verrührt. Anschließend wurden die Proben im Ofen für unterschiedliche Zeiten und Temperaturen (Tab. 6-12) erhitzt. Um den Hopfenextrakt wieder von den Festsubstanzen zu lösen, wurden sie mit jeweils 1 mL MeOH versetzt und 30 s gevortext. Nach dem Filtrieren (1-mL-Spritzen, 0,45 μ m, 15 mm) wurden die Proben mittels HPLC analysiert (Anlage 1, Säule 9, 3 μ L).

Tab. 6-12: Isomerisierung an Eisenoxid: Untersuchung der Temperatur- und Zeitabhängigkeit.

Ansatz-Nr.	Substanz x	m _x [mg]	n _x [mmol]	Temperatur [°C]	Zeit
1	FeO	71,0	1,0	100	1 h

Ansatz-Nr.	Substanz x	m _x [mg]	n _x [mmol]	Temperatur [°C]	Zeit
2	FeO	71,0	1,0	50	6 h
3	FeO	71,0	1,0	50	24 h

6.5.6 Isomerisierung in MeOH/H₂O/NaOH unter Zugabe von β -Cyclodextrin (β -CD)

In einer Mischung aus je 4,445 mL MeOH und H₂O sowie 0,297 mL 1 M NaOH-Lösung wurden 100 mg *AS-pur* (\cong 89 mg AS, 0,24 mmol AS) gelöst (vgl. Kap. 6.5.5.1; die etwas höhere H₂O-Menge war der Löslichkeit des später zugegebenen β -CD geschuldet). Es wurden 278 mg β -CD (0,24 mmol) zugefügt und die Mischung auf drei 20-mL-Schraubdeckelreagenzgläser aufgeteilt. Anschließend wurden die drei Ansätze im Temperierbad bei 70 °C und 800 rpm für 30, 60 und 120 min erhitzt. Nach der Abkühlung, währenddessen sich Bodensätze gebildet hatten, wurden von den Überständen Proben für die direkte HPLC-Analyse entnommen (Anlage 1, Säule 9, 5 μ L).

6.5.7 Isomerisierung im Specksteingefäß

Die Isomerisierungsversuche im Specksteingefäß wurden unter Rückfluss durchgeführt. Dazu wurde der Becher (3) mit einer Gummimanschette (2) verschlossen und in dieser der Rückflusskühler (1) angebracht. Das Gefäß wurde auf einen Heizmagnetrührer (4) platziert, wobei darauf geachtet werden musste, dass der Becher völlig plan auf der Heizplatte stand. Der Magnetrührer wurde auf eine Temperatur von 150 °C und eine Rührgeschwindigkeit von 500 rpm eingestellt. Der entsprechende Versuchsaufbau ist in Abb. 6-3 (schematisch) bzw. Abb. 6-4 dargestellt. Bei Kontrollansätzen wurde anstatt des Specksteingefäßes samt Gummimanschette ein 50-mL-Erlenmeyerkolben (Weithals-Schliff) verwendet (Abb. 6-4). In sämtlichen Ansätzen wurde die entsprechende Flüssigkeit, in der die Versuche durchgeführt wurden (H₂O bzw. Würze), für 10 min vorgeheizt und zum Kochen gebracht. Erst dann wurde die jeweilige Hopfenprobe zugegeben.

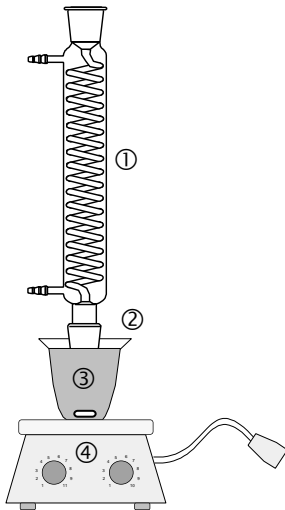


Abb. 6-3: Schematischer Versuchsaufbau der Isomerisierung im Specksteingefäß;
 1: Rückflusskühler,
 2: Gummimanschette,
 3: Specksteingefäß mit Magnetührstäbchen,
 4: Heizmagnetrührer.



Abb. 6-4: Versuchsaufbau der Isomerisierung im Specksteingefäß;
 links: Specksteingefäß, rechts: Erlenmeyerkolben (Kontrolle).

Es wurden jeweils 5,7 mg fein gemahlene Hopfenpellets (Hallertauer Magnum, 2010; \approx ca. 0,8 mg AS, $2,2 \cdot 10^{-3}$ mmol AS) zu 10 mL kochendem H_2O bzw. kochender Würze ($c_{\text{AS}} = 80$ mg/L) gegeben und für 30, 60 und 120 min (H_2O) bzw. 60 min (Würze) gerührt (jeweils Specksteingefäß und Kontrolle). Nach der jeweiligen Kochzeit wurden die Gemische in 100-mL-Schraubdeckelreagenzgläser überführt und gemäß *Extraktionsmethode 3* (H_2O) bzw. *Extraktionsmethode 2* (Würze, Kap. 6.13) extrahiert. Anschließend wurden jeweils 18 mL (H_2O) bzw. 10 ml (Würze) der Hexan-Phasen in 25-mL-Spitzkolben überführt und die Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Rückstände wurden in je 200 μL MeOH gelöst und mittels HPLC analysiert (Anlage 2, Säule 11, 3 μL [H_2O] bzw. 5 mL [Würze]).

Um zu testen, ob und wie viel Magnesium sich beim Kochen aus dem Specksteingefäß löste, wurden mittels ICP-OES Metallbestimmungen durchgeführt. Hierzu wurden in zwei Specksteingefäßen jeweils 10 mL H_2O – einmal mit (5,7 mg fein gemahlene Hopfenpellets; Hallertauer Magnum, 2010; \approx ca. 0,8 mg AS, $2,2 \cdot 10^{-3}$ mmol AS) und einmal ohne Hopfen – für 60 min unter Rückfluss gekocht (500 rpm). Zur Kontrolle wurden die Versuche in Erlenmeyerkolben wiederholt. Nach dem jeweiligen Kochvorgang wurden die vier Lösungen filtriert (10-ml-Spritze, 0,45 μm , 25 mm). Anschließend wurde jeweils eine 2-mL-Probe in ein 15-mL-Probenröhrchen überführt und nach Zugabe eines internen Standards sowie einer Gesamtverdünnung von 1 : 5 vermessen.

6.6 Racemisierung von Humulon

Im Folgenden sind die für die Auswertungen in Kap. 4.5 verwendeten Formeln aufgeführt.

$$\text{WF [\%]} = \frac{\text{AS}_1}{\text{AS}_0} \cdot 100$$

Formel 6-4: Berechnung der Wiederfindung (Racemisierung); AS_1 = Masse AS nach der Reaktion, AS_0 = Masse AS vor der Reaktion.

$$\text{ee}_{\text{S-AS}} [\%] = \frac{\text{S-AS} - \text{R-AS}}{\text{S-AS} + \text{R-AS}} \cdot 100$$

Formel 6-5: Berechnung des Enantiomerenüberschusses (ee) des (S)-Enantiomers; S/R-AS = Masse des (S/R)-Enantiomers der entsprechenden AS.

$$\text{S-AS [\%]} = \frac{\text{S-AS}}{\text{S-AS} + \text{R-AS}} \cdot 100 \quad ; \quad \text{R-AS [\%]} = \frac{\text{R-AS}}{\text{S-AS} + \text{R-AS}} \cdot 100$$

Formel 6-6: Berechnung der prozentualen Anteile des (S)- bzw. (R)-Enantiomers; S-/R-AS = Masse des (S-/R)-Enantiomers der entsprechenden AS.

6.6.1 Racemisierung in Toluol unter Rückfluss

Die Racemisierung erfolgte gemäß einer von G. A. HOWARD ET AL.^[22] beschriebenen Methode. Hierbei wurden in einem 100-mL-Rundkolben 500 mg AS-pur (\cong 443 mg AS, 1,22 mmol AS) in 25 mL Toluol gelöst. Die hervorgegangene gelbe Lösung wurde unter Rückfluss und kräftigem Rühren (750 rpm) für 18 h gekocht, wobei die Lösung eine deutlich dunklere Farbe annahm. Anschließend wurde das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und der orangefarbene Rückstand in 5 mL MeOH aufgenommen. Diese Lösung (= «rac-AS») wurde in ein 12-mL-Probenglas überführt und bei 4 °C für die weitere Verwendung gelagert. Es wurden während der Reaktion nach 5 min und am Ende jeweils eine 500- μ L-Probe sowie von «rac-AS» eine 1-mL-Probe für die HPLC-Analyse entnommen (Anlage 1, Säule 11 bzw. 16, 1 bzw. 3 μ L).

In einem 100-mL-Zweihalskolben wurden zunächst 50 mL Toluol unter Rückfluss zum Kochen gebracht (500 rpm). Anschließend wurden 4 g gemahlene Hopfenpellets (Zeus, \cong 500 mg AS, 1,38 mmol AS [bei Annahme von 12,5 % AS]) zugefügt und das Gemisch weiter gekocht. Nach 1 h wurde eine 1-mL-Probe entnommen, in einen 10-mL Spitzkolben überführt und das Toluol am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in 1 mL MeOH

aufgenommen, im Ultraschallbad in Lösung gebracht und filtriert (1-mL-Spritze, 0,45 µm, 13 mm). Schließlich folgte die Analyse mittels HPLC (Anlage 2, Säule 22, 5 µL).

6.6.2 Temperaturabhängigkeit der Racemisierungsgeschwindigkeit

Die Geschwindigkeit der Racemisierung von (S)-Humulon wurde bei vier verschiedenen Temperaturen (120 °C – 150 °C) untersucht, wobei jeweils analog vorgegangen wurde (Tab. 6-13). Eine definierte Menge *AS-pur* wurde in einer Konzentration von 10 g/L in Xylol gelöst und in Schliff-Reagenzgläsern (spitzer Boden) zu je 1 mL aufgeteilt. Die Reagenzgläser wurden anschließend mit je einer Ausnahme ($\pm t = 0$ min) im Temperierbad erhitzt (das Arbeiten in geschlossenen Reaktionsgefäßen verhinderte dabei das Sieden des Xylols [Siedepunkte von *para*-, *meta*- und *ortho*-Xylol: 138 – 144 °C] bei 140 °C bzw. 150 °C) und nacheinander zu bestimmten Zeiten wieder entnommen. Nach dem Entfernen des Xylols am Rotationsverdampfer wurden die Rückstände in je 1 mL MeOH aufgenommen und HPLC-analytisch untersucht (Anlage 1, Säule 22, 5 µL). Im Folgenden sind die vier unterschiedlichen Reaktionsansätze tabellarisch aufgeführt.

Tab. 6-13: Reaktionsansätze: Temperaturabhängigkeit der Racemisierungsgeschwindigkeit.

Ansatz-Nr.	Temperatur [°C]	Masse <i>AS-pur</i> [mg] (m_{AS} [mg])	Volumen Xylol [mL]	Probenanzahl	Zeiten der Probenahme [min]
1	120	126,5 (112,1)	12,650	11	0, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480
2	130	122,2 (108,3)	12,220	10	0, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420
3	140	110,5 (97,9)	11,050	11	0, 10, 20, 40, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360
4	150	114,0 (101,0)	11,400	7	0, 5, 12, 20, 30, 45, 60

6.6.3 Racemisierung von Hopfenextrakt bei 32 °C

In neun 20-mL-Probengläser wurden jeweils 250 mg Hopfenextrakt (Extrakt-1, ± 145 mg AS, 0,400 mmol AS) eingewogen und im Trockenschrank bei 32 °C für 7 – 78 Tage erwärmt. Zu bestimmten Zeitpunkten (Tab. 6-14) wurde jeweils eine Probe entnommen und gemäß der

Extraktionsmethode 1 (Kap. 6.13, 2 mL MeOH, 10 mL Et₂O, 4 mL 0,1 M HCl; Schüttler: 300 rpm, 60 min) extrahiert. Eine weitere Probe ($\triangleq t = 0$) wurde ohne Erwärmung direkt extrahiert. Nach der Extraktion wurden 2 mL der Et₂O-Phase in ein 5-mL-Probenglas überführt. Anschließend wurde das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und der trockene Rückstand bis zur HPLC-Analyse im Eisfach bei -24 °C gelagert. Nach der Fertigstellung von Ansatz 9 wurden alle zehn Proben zunächst auf Raumtemperatur gebracht und dann in je 1 mL MeOH gelöst. Schließlich wurden die Proben mittels 1-mL-Spritzen filtriert (0,45 μ m, 15 mm) und analysiert (Anlage 2, Säule 22, 1 μ L).

Tab. 6-14: Zeitpunkte der Probennahmen bei der Racemisierung von Extrakt-1 bei 32 °C für 7 – 78 Tage.

Ansatz-Nr.	Zeitpunkt der Probennahme
1	7 d
2	15 d
3	21 d
4	29 d
5	35 d
6	50 d
7	57 d
8	64 d
9	78 d

6.6.4 Racemisierung von Hopfenpellets in Toluol bzw. H₂O

Je 1 g (\triangleq ca. 150 mg AS, 0,41 mmol AS [bei Annahme von 15 % AS]) fein gemahlene Hopfenpellets (Hallertauer Magnum, 2010) wurde in zwei Schraubdeckelreagenzgläser (100 mL) vorgelegt und mit je 10 mL Toluol bzw. H₂O versetzt. Anschließend wurde für 2 h bei 100 °C und 350 rpm gerührt. Nach dem Abkühlen wurden jeweils 20 mL H₂O zugefügt und beide Ansätze gemäß *Extraktionsmethode 4* (1,5 mL HCl und 50 mL Hexan) extrahiert. Daraufhin wurden jeweils 30 mL organische Phase in einen 50-mL-Rundkolben überführt und die Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Rückstände wurden in je 5 mL MeOH aufgenommen und nach dem Filtrieren (5-mL-Spritze, 0,45 μ m, 15 mm) HPLC-analytisch untersucht (Anlage 1, Säule 22, 2 μ L).

6.6.5 Racemisierung von Iso- α -Säuren

In einem 100-mL-Rundkolben, ausgestattet mit Rückflusskühler und Magnetrührstäbchen, wurden 500 mg Iso-90 (\cong 450 mg IAS, 1,24 mmol IAS) in 25 mL Toluol gelöst und für 18 h gekocht (750 rpm). Die zunächst hell-gelbe Lösung wurde mit zunehmender Zeit dunkler, bis am Ende eine orangefarbene Lösung vorlag. Das Lösemittel wurde anschließend am Rotationsverdampfer abgezogen. Der Rückstand in Form eines braunen Öles wurde daraufhin in 10 mL MeOH aufgenommen und mittels HPLC analysiert (Anlage 1, Säule 16, 4 μ L).

6.7 Detektion mittels des Polarimeters (OR-Detektion)

Abb. 6-5 zeigt den Aufbau des HPLC Systems (Anlage 1) während den OR-Messungen. Dabei wurde das Polarimeter MCP 500 in Serie zum UV-Detektor installiert. Der schematische Aufbau ist in Abb. 6-6 zu sehen.



Abb. 6-5: Links: HPLC-Anlage 1 mit Polarimeter als zusätzlichen Detektor; rechts: Nahaufnahme des Polarimeters MCP 500 (Firma Anton Paar), verbunden mit dem Ausgang des UV-Detektors (⊗).

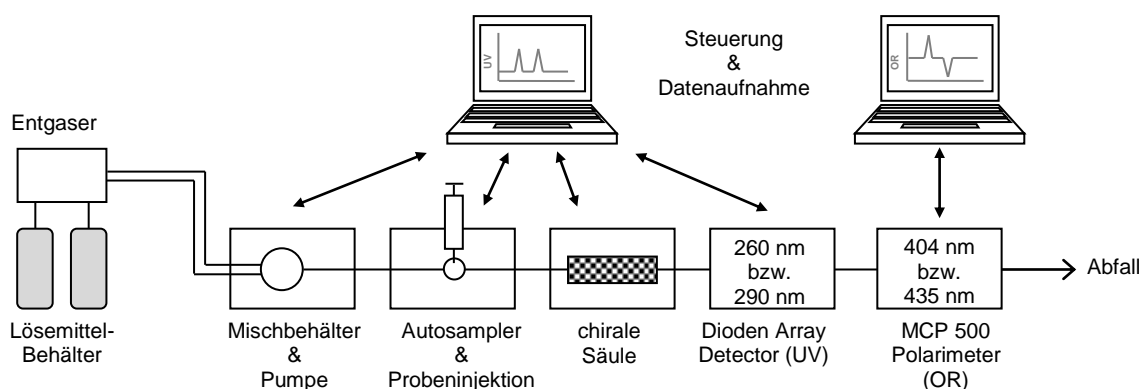


Abb. 6-6: Schematischer Aufbau der HPLC-Anlage 1 während der OR-Messungen.

Zur Ermittlung der optimalen Polarimeter-Wellenlänge wurden nacheinander jeweils 1 mL einer AS-Lösung (AS-pur in 0,025 % H₃PO₄/ACN = 50/50, c_{AS-pur} = 100 mg/L) bzw. einer IAS-

Lösung (*Iso-90* in 0,025 % $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{ACN} = 50/50$, $c_{\text{Iso-90}} = 10 \text{ g/L}$) mittels 1-mL-Spritzen direkt in die Probenzelle des Polarimeters eingespritzt (\otimes in Abb. 6-5, rechts). Dabei wurde die Wellenlänge variiert (880, 589, 578, 546, 435, 404 und 365 nm) und die entsprechenden OR-Werte am PC abgelesen.

Für die OR-Messungen der α -Säuren bzw. *Iso- α* -Säuren wurden die im Folgenden aufgeführten Parameter verwendet:

α -Säuren:

RP-HPLC: HPLC-Anlage 1
Säule 11
Temperatur: 45 °C
Isokratisch: 0,025 % $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{ACN} = 50/50$
Fluss: 2 mL/min
Proben: - *AS-pur* (50 g/L in MeOH \triangleq 44,3 g/L AS)
- «rac-AS» (28 g/L in MeOH)
Injektionsvolumen: 20 μL
UV-Detektion: 290 nm; OR-Detektion: 404 nm

Chirale HPLC: HPLC-Anlage 1
Säule 16
Temperatur: 35 °C
Isokratisch: 0,075 % $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{ACN} = 60/40$
Fluss: 2 mL/min
Proben: - *AS-pur* (50 g/L in MeOH \triangleq 44,3 g/L AS)
- «rac-AS» (28 g/L in MeOH)
Injektionsvolumen: 20 μL
UV-Detektion: 290 nm; OR-Detektion: 404 nm

Iso- α -Säuren:

RP-HPLC: HPLC-Anlage 1
Säule 11
Temperatur: 45 °C
Isokratisch: 0,025 % $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{ACN} = 50/50$
Fluss: 2 mL/min
Proben: *Iso-90* (33 g/L in MeOH \triangleq 29,7 g/L AS)
Injektionsvolumen: 15 μL

UV-Detektion: 260 nm; OR-Detektion: 435 nm

Chirale HPLC: HPLC-Anlage 1

Säule 16

Temperatur: 35 °C

Isokratisch: 0,075 % H₃PO₄/ACN = 60/40

Fluss: 2 mL/min

Proben: «rac-IAS» (14 g/L in MeOH)

Injektionsvolumen: 70 µL

UV-Detektion: 260 nm; OR-Detektion: 435 nm

6.8 Analyse verschiedener Hopfensorten hinsichtlich der AS-Enantiomere

Sämtliche Pellets und Rohhopfenproben wurden gemäß *Extraktionsmethode 1* extrahiert. Den organischen Phasen wurde das Lösemittel (Et₂O) am Rotationsverdampfer entfernt und die erhaltenen Rückstände für die HPLC-Analysen in MeOH gelöst.

Zur Isolierung der einzelnen (nativen) AS wurde zunächst 1 g gemahlene Hopfenpellets (Hallertauer Magnum [Typ 90, Ernte 2010]) gemäß *Extraktionsmethode 1* extrahiert. Nach der Entfernung des Lösemittels (Et₂O) wurde der Rückstand in einer Konzentration von 35 g/L in MeOH wieder gelöst. Anschließend wurde eine dreimalige präparative HPLC mit jeweils 50 µL Injektionsvolumen durchgeführt. Die isolierten Fraktionen von nat-CH, nat-NH und nat-AH wurden vereinigt und gemäß *Extraktionsmethode 4* extrahiert. Nach dem Abrotieren des Hexans wurden die Rückstände in Konzentrationen von 9,98 g/L (CH), 13,13 g/L (NH) und 2,89 g/L (AH) in MeOH wieder gelöst und mittels HPLC hinsichtlich der Enantiomere analysiert (Anlage 1 und Anlage 2, Säule 22, 1 µL [CH und NH], 2 µL [AH]).

6.9 Test von ICE-3 hinsichtlich der Enantiomere

In einem 10-mL-Messkolben wurden 224 mg ICE-3 (\cong 100 mg AS, 0,28 mmol AS) eingewogen und in MeOH gelöst ($c_{AS} = 10$ g/L). Anschließend wurde 1 mL der Probe filtriert (1-mL-Spritze, 0,45 µm, 15 mm) und HPLC-analytisch untersucht (Anlage 2, Säule 22, 1 µL).

6.10 Test von Iso-90 hinsichtlich der Enantiomere

Zunächst wurden die sechs IAS-Fractionen (TICH, CICH, TINH, CINH, TIAH, CIAH) durch präparative RP-HPLC (Kap. 6.11) isoliert. Dazu wurde eine methanolische *Iso-90*-Lösung mit einer Konzentration von 50 g/L ($c_{IAS} = 45$ g/L) verwendet. Das Injektionsvolumen betrug jeweils 15 μ L und es wurden insgesamt fünf Läufe durchgeführt. Nach der Extraktion gemäß *Extraktionsmethode 4* wurden die Rückstände in jeweils 1 mL MeOH aufgenommen. Anschließend wurden die sechs Lösungen (TICH: 0,12 g/L, CICH: 0,50 g/L, TINH: 0,22 g/L, CINH: 1,48 g/L, TIAH: 0,03 g/L, CIAH: 0,10 g/L) mittels chiraler HPLC hinsichtlich der Enantiomere analysiert (Anlage 1, Säule 22, 50 μ L).

6.11 Präparative HPLC

Die Isolierung einzelner AS- bzw. IAS-Fractionen (sowohl nat- als auch rac-) erfolgte mittels Säule 13. Anhand des nach dem UV-Detektor installierten Fraktionensammlers wurden die entsprechenden Einzelsubstanzen in 20-ml-Reagenzgläsern aufgesammelt. Anschließend wurde gemäß *Extraktionsmethode 4* extrahiert. Nach der Isolierung der organischen Phase wurde das Hexan abrotiert und die Rückstände in geeigneten Lösemitteln (MeOH oder EtOH) wieder aufgenommen. Anschließend wurden die getrennten Einzelsubstanzen zur weiteren Verwendung bei -24 °C aufbewahrt. Die verwendeten Methoden der präparativen HPLC sind im Kap. 6.4 (Tab. 6-4) aufgeführt.

6.12 Isolierung der Enantiomere und sensorische Tests

6.12.1 α -Säuren

Zur Durchführung der sensorischen Tests der einzelnen AS-Enantiomere wurden aus «rac-AS» ($c_{rac-AS} = 28$ g/L in MeOH) zunächst via präparativer RP-HPLC (16 mal, jeweils 50 μ L injiziert) die drei rac-AS-Fractionen (rac-CH, rac-NH und rac-AH) isoliert. Nach der Extraktion gemäß *Extraktionsmethode 4* wurden die erhaltenen 3,6 mg rac-CH und 10,3 mg rac-NH in je 100 μ L MeOH aufgenommen und mittels Säule 22 (chiral) präparativ getrennt. Dabei wurden im Fall von rac-CH sechs Läufe mit einem jeweiligen Injektionsvolumen von 10 μ L durchgeführt. Bei rac-NH betrug die Volumina je 5 μ L und es wurde 18 Mal injiziert. Da sich zunächst auf die mengenmäßig dominierenden CH und NH konzentriert wurde und weil rac-AH (2,1 mg) aus insgesamt vier stereoisomeren Formen bestand, wurde dieses hierbei

vernachlässigt. Nach der jeweiligen Extraktion (*Extraktionsmethode 4*) wurden die vier Einzelsubstanzen (*R*-CH: 0,4 mg, *S*-CH: 0,5 mg, *R*-NH: 2,8 mg, *S*-NH: 3,1 mg) in je 100 μL EtOH aufgenommen. Anschließend wurden 26,4 μL (*R*-CH), 21,8 μL (*S*-CH), 3,6 μL (*R*-NH) und 3,2 μL (*S*-NH) der ethanolischen Lösungen (mit je 100 μg AS) in 10-mL-Probengläser pipettiert und das jeweilige EtOH am Rotationsverdampfer entfernt, sodass die AS in reiner fester Form vorlagen. Von diesen wurden von drei unabhängigen Testpersonen olfaktorische Tests durchgeführt. Nach den Geruchstests wurden die Rückstände in je 5 mL H_2O ($c_{\text{AS}} = 20 \text{ mg/L}$) aufgenommen. Daraufhin wurden sie durch einen 60-minütigen Aufenthalt im Ultraschallbad in Lösung gebracht und anschließend hinsichtlich ihrer Geschmacksrichtung bzw. -intensität analysiert.

6.12.2 Iso- α -Säuren

In vier Schraubdeckelreagenzgläsern (15 mL) wurden jeweils 22,2 mg (0,22 mmol) Florisil[®] vorgelegt und mit je 2 mL H_2O versetzt. Dazu wurde jeweils eine bestimmte Menge ethanolische AS-Lösung mit je 160 μg (= 0,44 μmol) *R*-CH (42,2 μL), *S*-CH (34,9 μL), *R*-NH (5,7 μL) und *S*-NH (5,2 μL) (aus Kap. 6.12.1) pipettiert. Anschließend wurde im Temperierbad bei 100 °C für 60 min gerührt (800 rpm). Daraufhin wurde gemäß *Extraktionsmethode 4* extrahiert. Die Rückstände (IAS-1, aus *S*-AS: (4*S*,5*R*)-CIAS und (4*S*,5*S*)-TIAS; IAS-2, aus *R*-AS: (4*R*,5*S*)-CIAS und (4*R*,5*R*)-TIAS) wurden in jeweils 100 μL EtOH aufgenommen und mittels HPLC analysiert (Anlage 1 und 2, Säule 22 und Säule 11, 2 μL). Die restlichen Lösungen (jeweils 90 μL mit 144 μg IAS) wurden in 10-mL-Probengläser überführt und jeweils am Rotationsverdampfer getrocknet. Nach einer olfaktorischen Analyse der vier Rückstände (ICH-1, ICH-2, INH-1 und INH-2) wurden diese in 10 mL H_2O wiederaufgenommen ($c_{\text{IAS}} = 14,4 \text{ mg/L}$) und durch kurzes Vortexen gelöst. Schließlich folgte der Geschmackstest von ICH-1, ICH-2, INH-1 und INH-2.

6.13 Extraktionsmethoden

Bei allen vier Extraktionsmethoden wurden nach dem Schütteln bzw. Rotieren die jeweiligen organischen Phasen isoliert, die Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und die Rückstände in geeigneten Lösemitteln (MeOH, EtOH, ACN) wieder aufgenommen.

Extraktionsmethode 1 (vgl. EBC-METHODE 7.7^[155]):

Um α - (und β -)Säuren aus **Hopfenpellets**, **Rohhopfenproben** und **Hopfenextrakt** zu extrahieren wurde zunächst eine definierte Menge fein gemahlene (Krupps Speedy Pro) Pel-

lets/Rohhopfenproben bzw. Extrakt in ein geeignetes Glasgefäß mit Schraubdeckel eingewogen. Dann wurden pro Gramm Hopfenprobe 2 mL MeOH, 10 mL Et₂O und 4 mL 0,1 M HCl zugefügt und auf dem Schüttler bei 300 rpm für 40 min geschüttelt.

Extraktionsmethode 2 (vgl. EBC-METHODE 9.8^[172]):

Für die Konzentrationsbestimmung von IAS und AS in **Würze** wurde diese in ein geeignetes Schraubdeckel-Glasgefäß überführt und mit 6 M HCl (1/20 des Volumens) sowie Hexan (2-faches Volumen) versetzt. Nach dem Hinzufügen mehrerer Kunststofffolienstücke (ca. zehn Stück pro 10 mL Würze) wurde am Rotor für 30 min bei 50 rpm rotiert. Das Zufügen der Kunststofffolienstücke ist ein an der Fakultät (*Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt*) entwickeltes Verfahren zur Sicherstellung einer optimalen Phasentrennung. Ohne der Kunststofffolienstücke entwickelte sich während des Rotierens ein gallertartiges Gemisch an der Phasengrenze sowie in der Hexanphase. Dieses konnte durch die Kunststofffolienstücke vermieden und so die organische Phase problemlos abgenommen werden.

Extraktionsmethode 3 (vgl. KHATIB ET AL.^[158]):

Die Extraktion nach einer Isomerisierungsreaktion erfolgte gemäß einer leicht modifizierten Methode von KHATIB ET AL.. Hierbei wurde das entsprechende Volumen des Reaktionsansatzes mit 30 %iger H₂SO₄ (1/5 des Volumens) und der 2-fachen Menge Hexan versetzt. Anschließend wurde auf dem Schüttler für 30 min bei 300 rpm geschüttelt.

Extraktionsmethode 4 (vgl. EBC-METHODE 9.8^[172]):

Bei der Extraktion aus dem **Eluat der präparativen HPLC** bzw. bei **Versuchen in wässrigem Milieu** (außer Würze) wurde ähnlich vorgegangen wie bei der *Extraktionsmethode 2*. Das entsprechende Volumen wurde in einem geeigneten Schraubdeckel-Glasgefäß mit 6 M HCl (1/20 des Volumens) und der 1,5-fachen Menge Hexan versetzt. Die eigentliche Extraktion erfolgte durch 60-minütiges Schütteln bei 300 rpm auf dem Schüttler.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Internettauftritt: Universität Würzburg, Stand: 27. 02. 2012.
<http://www.uni-wuerzburg.de/sonstiges/meldungen/single/artikel/hopfen-ist-1/>
- 2 Biendl, M.: Hops: Medicinal Plant of the Year 2007. *Brauwelt International*, **2008**, 274 – 277.
- 3 Biendl, M.: Chancen für eine Zweite Karriere des Hopfens. *Brauwelt*, **2011**, 70 – 74.
- 4 Piendl, A., Schneider G.: Über die Physiologischen Eigenschaften des Hopfens: Ein Überblick. *Brauwelt*, **1981**, 600 – 608.
- 5 Simpson, W. J., Smith, A. R. W.: Factors Affecting Antibacterial Activity of Hop Compounds and their Derivatives. *J. Appl. Bacteriol.*, **1992**, 72, 327 – 334.
- 6 Yasukawa, K., Yamaguchi, A., Arita, J., Sakurai, S., Ikeda, A., Takido, M.: Inhibitory Effect of Edible Plant Extracts on 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced Ear Oedema in Mice. *Phytotherapie Research*, **1993**, 7, 185 – 189.
- 7 Yasukawa, K., Takeuchi, M., Takido, M.: Humulon, a Bitter in the Hop, Inhibits Tumor Promotion by 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate in Two-Stage Carcinogenesis in Mouse Skin. *Oncology*, **1995**, 52, 156 – 158.
- 8 Shimamura, M., Hazato, T., Ashino, H., Yamamoto, Y., Iwasaki, E., Tobe, H., Yamamoto, K., Yamamoto, S.: Inhibition of Angiogenesis by Humulone, a Bitter Acid from Beer Hop. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2001**, 289, 220 – 224.
- 9 Mizobuchi, S., Sato, Y.: Antifungal Activities of Hop Bitter Resins and Related Compounds. *Agric. Biol. Chem.*, **1985**, 49, 399 – 403.
- 10 Tagashira, M., Watanabe, M., Uemitsu, N.: Antioxidative Activity of Hop Bitter Acids and their Analogues. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1995**, 59, 740 – 742.

- 11 Van Hoyweghen, L., Biendl, M., Heyerick, A.: Radical Scavenging Capacity of Hop-Derived Products. *BrewingScience*, **2010**, 63, 1 – 5.
- 12 Piendl, A., Schneider G.: Über die Physiologischen Eigenschaften des Hopfens: Ein Überblick. *Brauwelt*, **1981**, 724 – 734.
- 13 Piendl, A., Biendl, M.: Über die Physiologische Bedeutung der Polyphenole und Hopfenbitterstoffe des Bieres. *Brauwelt*, **2000**, 526, 539 – 544.
- 14 Biendl, M.: Hops and Health. *MBAA TQ*, **2009**, 46, 2-0416-01, 1 – 7.
- 15 Römpp-Online, Version 3.21, Stand: 14. 03. 2012.
<http://www.roempp.com/prod/> (Stichwort: Chiralität)
- 16 Römpp-Online, Version 3.22, Stand: 30. 03. 2012.
<http://www.roempp.com/prod/> (Stichwort: Carvon)
- 17 Wermuth, C. G., Ganellin, C. R., Lindberg, P., Mitscher, L. A.: Glossary of Terms Used in Medicinal Chemistry. *Pure & Appl. Chem.*, **1998**, 70, 1129 – 1143.
- 18 Gübitz, G., Schmid, M. G.: Chiral Separation Principles in Chromatographic and Electromigration Techniques. *Mol. Biotechnol.*, **2006**, 32, 159 – 179.
- 19 Verzele, M., De Keukeleire, D.: Chemistry and Analysis of Hop and Beer Bitter Acids. Elsevier, Amsterdam, Niederlande, **1991**.
- 20 Urban, J., Dahlberg, C. J., Carroll, B. J., Kaminsky, W.: Absolute Configuration of Beer's Bitter Compounds. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 52, 1553 – 1555.
- 21 Anteunis, M., Verzele, M.: Racemic Tetrahydrohumulone. *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **1959**, 68, 705 – 710.
- 22 Howard, G. A., Slater, C. A., Tatchell, A. R.: Chemistry of Hop Constituents. XI. Some Observations on the Isomerization of Humulone. *J. Inst. Brew.*, **1957**, 63, 237 – 248.

- 23 Narziss, L., Back, W.: Die Bierbrauerei: *Band 2: Die Technologie der Würzebereitung*. Wiley-VCH, Weinheim, 8. Auflage, **2009**.
- 24 Römpp-Online, Version 3.22, Stand: 02. 04. 2012.
<http://www.roempp.com/prod/> (Stichwort: Hopfen)
- 25 Barth, H. J., Klinker, C., Schmidt, C.: Der Grosse Hopfenatlas: *Geschichte und Geographie einer Kulturpflanze*. Carl, Getränke-Fachverlag, Nürnberg, 1. Auflage, **1994**.
- 26 Biendl, M., Pinzl, C.: Arzneipflanze Hopfen: *Anwendungen – Wirkungen – Geschichte*. Deutsches Hopfenmuseum Wolnzach, Wolnzach, **2007**.
- 27 Internetauftritt: Hopsteiner, Ernteschätzungen, Stand: 14. 11. 2013.
<http://www.hopsteiner.de/neuigkeiten-und-berichte-marktberichte-und-ernteschaetzungen-hopsteiner.html>
- 28 Internetauftritt: Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Pflanzenbau, Hopfen, Internationale Sortenliste – Hopfen-Zertifizierung, Stand: 25. 06. 2013.
http://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/ipz/dateien/ihg_list_2_2012.pdf
- 29 Brunner, W.: Flächenveränderungen in den Deutschen Hopfenanbaugebieten 2013. *Hopfen-Rundschau*, **2013**, 64, 188 – 189.
- 30 Internetauftritt: Wikipedia – Bilder, Stand: 04. 04. 2012.
<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Hopfendolde-mit-hopfengarten.jpg>
- 31 Internetauftritt: Schweizer Brauerei-Verband, Stand: 04. 04. 2012.
<http://www.bier.ch/deu/bier-brauen-rohstoffe.html>
- 32 Ives, A. W.: An Experimental Inquiry in the Chemical Properties and Economical and Medicinal Virtues of the Humulus Lupulus, or Common Hop. *Annals of Philosophy*, **1821**, 194 – 202.
- 33 Lermer, J. C.: Der Bitterstoff des Hopfens, Krystallinisch Rein Dargestellt. *Dinglers polytechn. Journ.*, **1863**, 169, 54 – 65.

- 34 Bungener, H.: Beitrag zur Kenntnis der Bitterstoffe des Hopfens. *Zeitschr. ges. Brauw.*, **1884**, 93 – 96.
- 35 Wöllmer, W.: Über die Bitterstoffe des Hopfens. *Ber. d. Deutschen Chem. Ges.*, **1916**, 49, 780 – 794.
- 36 Hayduck, M.: Ueber die Bitteren und Harzigen Bestandtheile des Hopfens. *Wochenschrift für Brauerei*, **1888**, 5, 937 – 947.
- 37 Lintner, C. J., Bungener, A.: Zur Chemie des Hopfens. *Zeitschr. ges. Brauw.*, **1891**, 357 – 358.
- 38 Barth, G.: Chemische Studien über die Bitterstoffe des Hopfens. *Zeitschr. ges. Brauw.*, **1900**, 23, 594 – 599.
- 39 Barth, G., Lintner, C. J.: Zur Kenntnis der Lupulinsäure (β -Hopfenbittersäure). *Ber. d. Deutschen Chem. Ges.*, **1898**, 31, 2022 – 2025.
- 40 Bamberger, M., Landsiedl, A.: Beiträge zur Chemie des Hopfens. *Zeitschr. ges. Brauw.*, **1902**, 25, 461 – 464.
- 41 Lintner, C. J., Schnell, J.: Zur Kenntnis der Bitterstoffe des Hopfens. *Zeitschr. ges. Brauw.*, **1904**, 27, 666 – 669.
- 42 Wieland, H.: Über die Chemische Natur der Hopfenharz-Säuren (I.). *Ber. d. Deutschen Chem. Ges.*, **1925**, 58, 102 – 112.
- 43 Wieland, H.: Über die chemische Natur der Hopfenharz-Säuren (II.). *Ber. d. Deutschen Chem. Ges.*, **1925**, 58, 2012 – 2017.
- 44 Cook, A. H., Harris, G.: The Chemistry of Hop Constituents. Part I. Humulinone, a New Constituent of Hops. *J. Chem. Soc.*, **1950**, 1873 – 1876.
- 45 David, S., Imer, C.: Hop Constituents. I. *Bull. Soc. Chim. France*, **1951**, 634 – 637.

- 46 Carson, J. F.: The Structure of Humulone and Lupulone as Revealed by Ozonization. *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, 73, 4652 – 4654.
- 47 Verzele, M., Depoorter, H.: Ozonization of Humulone. *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **1959**, 68, 85 – 88.
- 48 De Keukeleire, D., Verzele, M.: The Structure and the Absolute Configuration of (-)Humulone. *Tetrahedron*, **1970**, 26, 385 – 393.
- 49 De Keukeleire, D., Verzele, M.: The Stereochemistry of (-)Humulone. *J. Inst. Brew.*, **1970**, 76, 265 – 266.
- 50 Howard G. A.: The Configuration of Humulones. *Chem. Ind.*, **1956**, 1504.
- 51 Anteunis, M., Verzele, M.: Observations on the Optical Rotation of Humulon. *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **1956**, 65, 620 – 626.
- 52 Römpp-Online, Version 3.23, Stand: 08. 05. 2012.
<http://www.roempp.com/prod/> (Stichwort: Oktantenregel)
- 53 Moffitt, W., Woodward, R. B., Moscovitz, A., Klyne, W., Djerassi, C.: Structure and the Optical Rotatory Dispersion of Saturated Ketones. *J. Am. Chem. Soc.*, **1961**, 83, 4013 – 4018.
- 54 Internetauftritt: Vorlesung Stereochemie, Prof. Thomas Carell, LMU München, Stand: 07. 05. 2012.
http://www.cup.uni-muechen.de/oc/carell/teaching/stereochemie/kap%204_chir-optische%20eigenschaften%20chiraler%20verbindungen.pdf
- 55 Cahn, R. S., Ingold, C.: Specification of Configuration about Quadricovalent Asymmetric Atoms. *J. Chem. Soc.*, **1951**, 612 – 622.
- 56 Cahn, R. S., Ingold, C., Prelog, V.: The Specification of Asymmetric Configuration in Organic Chemistry. *Experientia*, **1956**, 12, 81 – 94.

- 57 Cahn, R. S., Ingold, C., Prelog, V.: Spezifikation der Molekularen Chiralität. *Angew. Chem.*, **1966**, 78, 413 – 447.
- 58 Rigby, F. L., Bethune J. L.: Countercurrent Distribution of Hop Constituents. *Proc. Am. Soc. Brewing Chemists*, **1952**, 18, 98 – 105.
- 59 Rigby, F. L., Bethune J. L.: Counter Current Distribution of Hop Constituents The Isolation and Properties of Cohumulone. *Proc. Am. Soc. Brewing Chemists*, **1953**, 19, 119 – 129.
- 60 Verzele, M.: Sur la Séparation du Complexe "Humulone" Par Chromatographie de Partage. *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **1955**, 64, 70 – 86.
- 61 Intelmann, D., Kummerlöwe, G., Haseleu, G., Desmer, N., Schulze, K., Fröhlich, R., Frank, O., Luy, B., Hofmann, T.: Structures of Storage-Induced Transformation Products of the Beer's Bitter Principles, Revealed by Sophisticated NMR Spectroscopic and LC–MS Techniques. *Chem. Eur. J.*, **2009**, 15, 13047 – 13058.
- 62 De Keukeleire, D.: Fundamentals of Beer and Hop Chemistry. *Quim. Nova*, **2000**, 23, 108 – 112.
- 63 Roth, K.: Hopfen und Malz... Die Oktoberfest-Umlagerung. *Chem. Unserer Zeit*, **2006**, 40, 338 – 346.
- 64 Peacock, V.: Fundamentals of Hop Chemistry. *MBAA TQ*, **1998**, 35, 4 – 8.
- 65 Hertel, M., Dillenburger, M.: Möglichkeiten zur Erhöhung der Bitterstoffausbeute bei der Bierbereitung (Teil 2). *Brauwelt*, **2009**, 394 – 398.
- 66 Smith, M. B., March, J.: *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*. Wiley-Interscience, New York, NY, USA, 5. Auflage, **2001**.
- 67 Jaskula, B., Kafarski, P., Aerts, G., De Cooman, L.: A Kinetic Study on the Isomerization of Hop α -Acids. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56, 6408 – 6415.

- 68 Cortacero-Ramírez, S., De Hernáinz-Bermúdez Castro, M., Segura-Carretero, A., Cruces-Blanco, C., Fernández-Gutiérrez, A.: Analysis of Beer Components by Capillary Electrophoretic Methods. *Trends Anal. Chem.*, **2003**, 22, 440 – 455.
- 69 De Keukeleire, D., Verzele, M.: The Absolute Configuration of the Isohumulones and the Humulinic Acids. *Tetrahedron*, **1971**, 27, 4939 – 4945.
- 70 De Keukeleire, D., Blondeel, G. M.: The Mechanism of the Regio- and Stereospecific Photorearrangement of Humulone to the Beer Bitter Component Trans Isohumulone. *Tetrahedron Lett.*, **1979**, 15, 1343 – 1346.
- 71 Internetauftritt: Deutscher Brauer-Bund, Stand: 15. 05. 2012.
<http://www.brauer-bund.de/bier-ist-rein/reinheitsgebot.html>
- 72 Römpp-Online, Version 3.23, Stand: 15. 05. 2012.
<http://www.roempp.com/prod/> (Stichwort: Reinheitsgebot)
- 73 Köller, H.: Die Katalytische Beschleunigung der Isomerisierung von Humulon zu Isohumulonen durch Metallionen. *Tetrahedron Lett.*, **1968**, 40, 4317 – 4320.
- 74 Köller, H.: Magnesium Ion Catalysed Isomerization of Humulone: A New Route to Pure Isohumulones. *J. Inst. Brew.*, **1969**, 75, 175 – 179.
- 75 Mühlberger, K.: Einfluss von Katalysatoren auf die Isomerisierung von Hopfenbitterstoffen. Bachelorarbeit, Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität, Technische Universität München, **2012**.
- 76 Internetauftritt: Hopsteiner, Hopfenprodukte, Iso-Pellets, Stand: 21. 05. 2012.
http://www.hopsteiner.de/images/stories/downloads/Produkte/04_07_isopellets.pdf
- 77 De Cooman, L., Aerts, G., Overmeire, H.: Alterations of the Profiles of Iso- α -acids During Beer Ageing, Marked Instability of *Trans*-Iso- α -Acids and Implications for Beer Bitterness Consistency in Relation to Tetrahydroiso- α -Acids. *J. Inst. Brew.*, **2000**, 106, 169 – 178.

- 78 Burns, C. S., Heyerick, A., De Keukeleire, D., Forbes, M. D. E.: Mechanism for Formation of the Lightstruck Flavor in Beer Revealed by Time-Resolved Electron Paramagnetic Resonance. *Chem. Eur. J.*, **2001**, 7, 4553 – 4561.
- 79 Heyerick, A., Zhao, Y., Sandra, P., Huvaere, K., Roelens, F., De Keukeleire, D.: Photolysis of Hop-Derived Trans-Iso- α -Acids and Trans-Tetrahydroiso- α -Acids Product Identification in Relation to the Lightstruck Flavour of Beer. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2003**, 2, 306 – 314.
- 80 Internetauftritt: Hopsteiner, Hopfenprodukte, konzentriertes *Rho*, Stand: 21. 05. 2012.
http://www.hopsteiner.de/images/stories/downloads/Produkte/18_07_konzentriertesrho.pdf
- 81 Internetauftritt: Hopsteiner, Hopfenprodukte, konzentriertes Tetra, Stand: 21. 05. 2012.
http://www.hopsteiner.de/images/stories/downloads/Produkte/20_07_konzentriertestetra.pdf
- 82 Römpp-Online, Version 3.19, Stand: 18. 01. 2012.
<http://www.roempp.com/prod/> (Stichwort: Racemisierung)
- 83 Stevens, R.: The Chemistry of Hop Constituents. *Chem. Rev.*, **1967**, 67, 19 – 71.
- 84 Hough, J. S., Briggs, D. E., Stevens, R., Young, T. W.: Malting and Brewing Science: *Volume II Hopped Wort and Beer*. Chapman and Hall, London, GB, Ney York, NY, USA, 2. Auflage, **1982**.
- 85 Hückel, W.: Kryptoionen-Reaktionen: „Klassische“ und „nichtklassische“ Ionen. *Liebigs Ann. Chem.*, **1968**, 711, 1 – 18.
- 86 Römpp-Online, Version 3.22, Stand: 02. 04. 2012.
<http://www.roempp.com/prod/> (Stichwort: Kryptoionen)
- 87 Okamoto, Y., Ikai, T.: Chiral HPLC for Efficient Resolution of Enantiomers. *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, 37, 2593 – 2608.

- 88 Subramanian, G.: *Chiral Separation Techniques: A Practical Approach*. Wiley-VCH, Weinheim, 3. Auflage, **2007**.
- 89 Breitmaier, E., Jung, G.: *Organische Chemie: Grundlagen, Stoffklassen, Reaktionen, Konzepte, Molekülstruktur*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, NY, USA, 4. Auflage, **2001**.
- 90 Roth, K., Hoeft-Schleeh, S.: Pasteur und die Weinsäure. *Chem. Unserer Zeit*, **1995**, 29, 338 – 344.
- 91 Rüedi, P.: Enantiomertrennung mit HPLC; Eine Allgemeine Übersicht. *Schweizerische Laboratoriums-Zeitschrift*, **1992**, 49, 87 – 93.
- 92 Wainer, I. W.: Proposal for the Classification of Highperformance Liquid Chromatographic Chiral Stationary Phases: How to Choose the Right Column. *Trends Anal. Chem.*, **1987**, 6, 125 – 134.
- 93 Chen, X., Yamamoto, C., Okamoto, Y.: Polysaccharide Derivatives as Useful Chiral Stationary Phases in High-Performance Liquid Chromatography. *Pure Appl. Chem.*, **2007**, 79, 1561 – 1573.
- 94 Armstrong, D. W., Lee, J. T., Chang, L. W.: Enantiomeric Impurities in Chiral Catalysts, Auxiliaries and Synthons Used in Enantioselective Synthesis. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998**, 9, 2043 – 2064.
- 95 Armstrong, D. W., He, L., Yu, T., Lee, J. T., Liu, Y.: Enantiomeric Impurities in Chiral Catalysts, Auxiliaries, Synthons and Resolving Agents. Part 2. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, 10, 37 – 60.
- 96 Armstrong, W., Zhang, B.: Chiral Stationary Phases for HPLC. *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 557 A - 561 A.
- 97 Römpp-Online, Version 3.24, Stand: 05. 06. 2012.
<http://www.roempp.com/prod/> (Stichwort: ee)

- 98 Skoog, D. A., Leary J. J.: *Instrumentelle Analytik: Grundlagen - Geräte - Anwendungen*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, NY, USA, 4. Auflage, **1996**.
- 99 Davankov, V. A., Rogozhin, S. V.: Ligand Chromatography as a Novel Method for the Investigation of Mixed Complexes: Stereoselective Effects in α -Amino Acid Copper(II) Complexes. *J. Chromatogr.*, **1971**, 60, 280 – 283.
- 100 Zhang, T., Kientzy, C., Franco, P., Ohnishi, A., Kagamihara, Y., Kurosawa, H.: Solvent Versatility of Immobilized 3,5-Dimethylphenylcarbamate of Amylose in Enantiomeric Separations by HPLC. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1075, 65 – 75.
- 101 Hesse, G., Hagel, R.: Eine Vollständige Racemattrennung durch Elutions-Chromatographie an Cellulose-Tri-Acetat. *Chromatographia*, **1973**, 6, 277 – 280.
- 102 Wainer, I. W., Stiffin, R. M., Shibata, T.: Resolution of Enantiomeric Aromatic Alcohols on a Cellulose Tribenzoate High-Performance Liquid Chromatography Chiral Stationary Phase: A Proposed Chiral Recognition Mechanism. *J. Chromatogr.*, **1987**, 411, 139 – 151.
- 103 Franco, P., Senso, A., Oliveros, L., Minguillón, C.: Covalently Bonded Polysaccharide Derivatives as Chiral Stationary Phases in High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 906, 155 – 170.
- 104 Ikai, T., Yamamoto, C., Kamigaito, M., Okamoto, Y.: Immobilized Polysaccharide-Based Chiral Stationary Phases for HPLC. *Polym. J.*, **2006**, 38, 91 – 108.
- 105 Jiang, Z., Schurig, V.: Existence of a Low Isoenantioselective Temperature in Complexation Gas Chromatography Profound Change of Enantioselectivity of a Nickel(II) Chiral Selector Either Bonded to, or Dissolved in, Poly(dimethylsiloxane). *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1186, 262 – 270.
- 106 Booth, T. D., Wahnou, D., Wainer, I. W.: Is Chiral Recognition a Three-Point Process? *Chirality*, **1997**, 9, 96 – 98.
- 107 Davankov, V. A.: The Nature of Chiral Recognition: Is it a Three-Point Interaction? *Chirality*, **1997**, 9, 99 – 102.

- 108 Dalgliesh, C. E.: The Optical Resolution of Aromatic Amino-Acids on Paper Chromatograms. *J. Chem. Soc.*, **1952**, 3940 – 3942.
- 109 Shao, B. H., Xu, X. Z., Zou, L., Fu, X. Y.: Enantioseparation of Racemic Naproxen Esters on Cellulose Tris(4-methylbenzoate) Chiral Stationary Phase. *Chin. Chem. Lett.*, **2002**, *13*, 151 – 152.
- 110 Winger, M., Christen, M., van Gunsteren, W. F.: On the Conformational Properties of Amylose and Cellulose Oligomers in Solution. *Int. J. Carbohydr. Chem.*, **2009**, (307695) 1-8.
- 111 Römpp-Online, Version 3.24, Stand: 29. 05. 2012.
<http://www.roempp.com/prod/> (Stichwort: Amylose)
- 112 Römpp-Online, Version 3.24, Stand: 29. 05. 2012.
<http://www.roempp.com/prod/> (Stichwort: Cellulose)
- 113 Okamoto, Y., Kawashima, M., Hatada, K.: Chromatographic Resolution: XI. Controlled Chiral Recognition of Cellulose Triphenylcarbamate Derivatives Supported on Silica Gel. *J. Chromatogr.*, **1986**, *363*, 173 – 186.
- 114 Yashima, E., Yamada, M., Kaida, Y., Okamoto, Y.: Computational Studies on Chiral Discrimination Mechanism of Cellulose Trisphenylcarbamate. *J. Chromatogr. A*, **1995**, *694*, 347 – 354.
- 115 Yamamoto, C., Yashima, E., Okamoto, Y.: Computational Studies on Chiral Discrimination Mechanism of Phenylcarbamate Derivatives of Cellulose. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1999**, *72*, 1815 – 1825.
- 116 Okamoto, Y., Yashima, E., Yamamoto, C.: NMR Studies of Chiral Discrimination by Phenylcarbamate Derivatives of Cellulose. *Macromol. Symp.*, **1997**, *120*, 127 – 137.
- 117 Yamamoto, C., Yashima, E., Okamoto, Y.: Structural Analysis of Amylose Tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) by NMR Relevant to its Chiral Recognition Mechanism in HPLC. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 12583 – 12589.

- 118 Fielden, P. R.: Recent Developments in LC Detector Technology. *J. Chromatogr. Sci.*, **1992**, 30, 45 – 52.
- 119 Bobbitt, D. R., Linder, S. W.: Recent Advances in Chiral Detection for High Performance Liquid Chromatography. *Trends Anal. Chem.*, **2001**, 20, 111 – 123.
- 120 Lloyd, D. K., Goodall, D. M.: Polarimetric Detection in High-Performance Liquid Chromatography. *Chirality*, **1989**, 1, 251 – 264.
- 121 Yeung, E. S., Synovec, R. E.: Detectors for Liquid Chromatography. *Anal. Chem.*, **1986**, 58, 1237 A – 1256 A.
- 122 Yeung, E. S., Steenhoek, L. E., Woodruff, S. D. K. J. C.: Detector Based on Optical Activity for High Performance Liquid Chromatographic Detection of Trace Organics. *Anal. Chem.*, **1980**, 52, 1399 – 1402.
- 123 Hesse, G., Hagel, R.: Die Chromatographische Racemattrennung. *Liebigs Ann. Chem.*, **1976**, 996 – 1008.
- 124 Mannschreck, A., Andert, D., Eiglsperger, A., Gmahl, E., Buchner, H.: Chiroptical Detection. Novel Possibilities of its Application to Enantiomers. *Chromatographia*, **1988**, 25, 182 – 188.
- 125 Boehme, W., Wagner, G., Oehme, U.: Spectrophotometric and Polarimetric Detectors in Liquid Chromatography for the Determination of Enantiomer Ratios in Complex Mixtures. *Anal. Chem.*, **1982**, 54, 709 – 711.
- 126 Meinard, C., Bruneau, P., Perronnet, J.: High-Performance Liquid Chromatograph Coupled with Two Detectors: A UV Spectrometer and a Polarimeter - Example in the Field of Pyrethroids: Identification of Enantiomers. *J. Chromatogr.*, **1985**, 349, 109 – 116.
- 127 Meinard, C., Bruneau, P.: Separation and Identification of Enantiomers by High-Performance Liquid Chromatography with a Chiral Column and a Polarimetric Detector as Applied to Deltamethrin. *J. Chromatogr.*, **1988**, 450, 169 – 174.

- 128 Wu, Z., Goodall, D. M., Lloyd, D. K.: Determination of Enantiomeric Purity of Ephedrine and Pseudoephedrine by High-Performance Liquid Chromatography with Dual Optical Rotation/UV Absorbance Detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1990**, 8, 357 – 364.
- 129 Yamamoto, A., Kawai, M., Miwa, T., Tsukamoto, T., Kodama, S., Hayakawa, K.: Determination of Adulteration in Apple Juice by HPLC with Novel Optical Rotation Detector. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56, 7302 – 7304.
- 130 Aboul-Enein, H. Y., Al-Duraibi, I. A.: Optical Activity Detectors, in: *Encyclopedia of Chromatography, Volume III*. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA, London, GB, New York, NY, USA, **2010**, 1637 – 1639.
- 131 Sims, J. L., Carreira, J. A., Bragg, R. A.: Optical Rotation Detection for Reversed Phase HPLC: Investigation of Solvent Effects. *Chirality*, **1997**, 9, 122 – 125.
- 132 Swartz, M.: Innovations in HPLC - Seeing is Believing: Detectors for HPLC. *LCGC North America (www.chromatographyonline.com)*, **2010**, 28, 880 – 889.
- 133 Römpp-Online, Version 3.24, Stand: 18. 06. 2012.
<http://www.roempp.com/prod/> (Stichwort: optische Aktivität)
- 134 Kott, L., Holzheuer W. B., Wong, M. M., Webster, G. K.: An Evaluation of Four Commercial HPLC Chiral Detectors: A Comparison of Three Polarimeters and a Circular Dichroism Detector. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2007**, 43, 57 – 65.
- 135 Breitmaier, E., Jung, G.: Organische Chemie: *Grundlagen, Stoffklassen, Reaktionen, Konzepte, Molekülstruktur*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, NY, USA, 4. Auflage, **2001**.
- 136 Purdie, N., Swallows, K. A.: Analytical Applications of Polarimetry, Optical Rotatory Dispersion, and Circular Dichroism. *Anal. Chem.*, **1989**, 61, 77 A – 89 A.
- 137 European Brewery Convention (EBC): Analytica-EBC. Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, **2007**.

- 138 American Society of Brewing Chemists (ASBC): Methods of Analysis of the American Society of Brewing Chemists. American Society of Brewing Chemists, St. Paul, MN, USA, 8. Auflage, **1992**.
- 139 European Brewery Convention: *Analytica-EBC, Section 9 Beer, Method 9.47. Iso- α -Acids and Reduced Iso- α -Acids (Rho, Tetra, Hexa) in Beer by HPLC*. Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, **2010**.
- 140 Verzele, M., Steenbeke, G., Verhagen, L. C., Strating, J.: Preparative Liquid Chromatography of Hop and Beer Bitter Acids. *J. Chromatogr.*, **1989**, *484*, 361 – 368.
- 141 Jaskula, B., Goiris, K., De Rouck, G., Aerts, G., De Cooman, L.: Enhanced Quantitative Extraction and HPLC Determination of Hop and Beer Bitter Acids. *J. Inst. Brew.*, **2007**, *113*, 381 – 390.
- 142 Harms, D., Nitzsche, F.: Neue Wege der Bestimmung von Bitterstoffen in Bier und Würze. *Monatsschr. Brauwiss.*, **2000**, 143 – 146.
- 143 Harms, D., Nitzsche, F.: High-Performance Separation of Unmodified and Reduced Hop and Beer Bitter Compounds by a Single High-Performance Liquid Chromatography Method. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *59*, 28 – 31.
- 144 Harms, D., Nitzsche, F., Hoffmann, A., David, F., Sandra, P.: The Analysis of the Bitter and Other Flavour Compounds in Beer and Wort by Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) Followed by HPLC. *AppNote*, **2001**, 1 – 6.
- 145 Internetauftritt: GMP-Navigator, Stand: 20. 11. 2013.
http://www.gmp-navigator.com/nav_news_1467_5945,5942,6022,6086,6036.html
- 146 Danenhower, T. M., Force, L. J., Petersen, K. J., Betts, T. A., Baker, G. A.: HPLC Analysis of α - and β -Acids in Hops. *J. Chem. Educ.*, **2008**, *85*, 954 – 956.
- 147 Hermans-Lokkerbol, A. C. J., Verpoorte, R.: Development and Validation of a High-Performance Liquid Chromatography System for the Analysis of Hop Bitter Acids. *J. Chromatogr. A*, **1994**, *669*, 65 – 73.

- 148 Harms, D., Nitzsche, F.: Separation of Enantiomers of Hop Constituents in Beer. *Ma-cherey-Nagel Application 117412*.
- 149 EBC-Analytica-Nachtrag, 7.4.2 Iso-Alpha-, Alpha- and Beta-Acids in Hop and Isomerised Hop Extracts (HPLC Method). *Monatsschr. Brauwiss.*, **1992**, Heft 3, 129 – 131.
- 150 Hay, B. A., Homiski, J. W., Howie, J. L.: Differences in Ultraviolet Absorbance of Tetrahydroiso- α -Acid Components. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **1994**, 52, 54 – 56.
- 151 Intelmann, D., Haseleu, G., Hofmann, T.: LC-MS/MS Quantitation of Hop-Derived Bitter Compounds in Beer Using the ECHO Technique. *J. Agric. Food Chem.*, **2009**, 57, 1172 – 1182.
- 152 Hofta, P., Dostálek, P., Sýkora, D.: Liquid Chromatography-Diode Array and Electrospray High-Accuracy Mass Spectrometry of Iso- α -Acids in DCHA-Iso Standard and Beer. *J. Inst. Brew.*, **2007**, 113, 48 – 54.
- 153 Hughes, P. S.: Preparative Regime for the Purification of Bitter Acids Derived From Hops (*Humulus Lupulus* L.). *J. Chromatogr. A*, **1996**, 731, 327 – 330.
- 154 European Brewery Convention: *Analytica-EBC, Section 7 Hops and Hop Products, Method 7.8. Iso- α -, α - and β -Acids in Hop and Isomerised Hop Extracts by HPLC*. Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, **2005**.
- 155 European Brewery Convention: *Analytica-EBC, Section 7 Hops and Hop Products, Method 7.7. α - and β -Acids in Hop and Hop Products by HPLC*. Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, **2005**.
- 156 Vanhoenacker, G., De Keukeleire, D., Sandra, P.: Analysis of Iso- α -Acids and Reduced Iso- α -Acids in Beer by Direct Injection and Liquid Chromatography with Ultraviolet Absorbance Detection or with Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1035, 53 – 61.
- 157 Khatib, A., Kim, H. K., Wilson, E. G., Verpoorte, R.: High Performance Liquid Chromatographic Method for Iso- α -Acids. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **2006**, 29, 293 – 302.

- 158 Khatib, A., Wilson, E. G., Supardi, M., Verpoorte, R.: Isolation of Individual Hop Iso- α -Acids Stereoisomers by β -Cyclodextrin. *Food Chem.*, **2010**, 119, 354 – 357.
- 159 Internetauftritt: Restek, Produkte, Stand: 10. 07. 2012.
<http://www.restek.com/biphenyl/>
- 160 Internetauftritt: BGB Analytik, Stand: 10. 07. 2012.
<http://www.bgb-analytik.de/pdf/Restek/LC/Biphenyl.pdf>
- 161 Internetauftritt: Phenomenex, Produkte, Stand: 06. 07. 2012.
<http://www.phenomenex.com/Products/Detail/Kinetex>
- 162 Internetauftritt: *Core-Shell Technologie*, Stand: 07. 05. 2013.
<http://www.lc-ms.de/pdf/PDF2010/PhenomenexCoreShellTechnology.pdf>
- 163 Internetauftritt: Macherey Nagel, Nucleosil-Chiral-1, Stand: 18. 07. 2012.
<http://www.mn-net.com/tabid/6150/default.aspx>
- 164 Internetauftritt: [zusatzstoffe-online.de](http://www.zusatzstoffe-online.de), E 553 a Magnesiumsilikat, Stand: 09. 08. 2012.
http://www.zusatzstoffe-online.de/zusatzstoffe/237.e553a_magnesiumsilikat.html
- 165 Internetauftritt: Hopsteiner, Hopfenprodukte, Isomerisierter Kettle Extrakt als Kaliumsalz (PIKE), Stand: 18. 06. 2013.
www.hopsteiner.de/pdf/hopfenprodukte/brauereien-produkte/08_07_pike.pdf
- 166 Römpp-Online, Version 3.26, Stand: 22. 08. 2012.
<http://www.roempp.com/prod/> (Stichwort: Cyclodextrine)
- 167 Internetauftritt: Mineralienatlas, Speckstein, Stand: 22. 08. 2012.
<http://www.mineralienatlas.de/lexikon/index.php/MineralData?mineral=Speckstein>
- 168 Internetauftritt: Tulikivi, Speckstein, Stand: 22. 08. 2012.
http://www.tulikivi.com/de/Produkte/Specksteinofen_Info_Zusammensetzung_von_Speckstein
- 169 Narziß, L.: Abriss der Bierbrauerei. Wiley-VCH, Weinheim, 7. Auflage, **2008**.

-
- 170 Internetauftritt: Hopsteiner, Startseite, Stand: 05. 01. 2012.
<http://www.hopsteiner.de/index.php>
- 171 Internetauftritt: Labor Veritas AG, Produkte, Stand: 04. 01. 2012.
<http://www.laborveritas.ch/produkte.php>
- 172 European Brewery Convention: *Analytica-EBC, Section 9 Beer, Method 9.8. Bitterness of Beer (IM)*. Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, **2007**.

8 Anhang

Anhang 1: HPLC-Chromatogramm nach EBC-Methode 7.8^[154]

In der folgenden Abbildung ist ein typisches, nach EBC-Methode 7.8 erhaltenes HPLC-Chromatogramm von Iso- α -, α - und β -Säuren zu sehen.^[154] Dabei erfolgt weder eine Trennung der *cis/trans*-Isomere der IAS noch eine Trennung der n- und ad-Homologen der AS und BS. Bei der verwendeten Säule handelt es sich um eine Nucleodur 5-100 C18 ec Säule mit einer Länge von 125 mm und einem Durchmesser von 4 mm (Macherey Nagel).^[154]

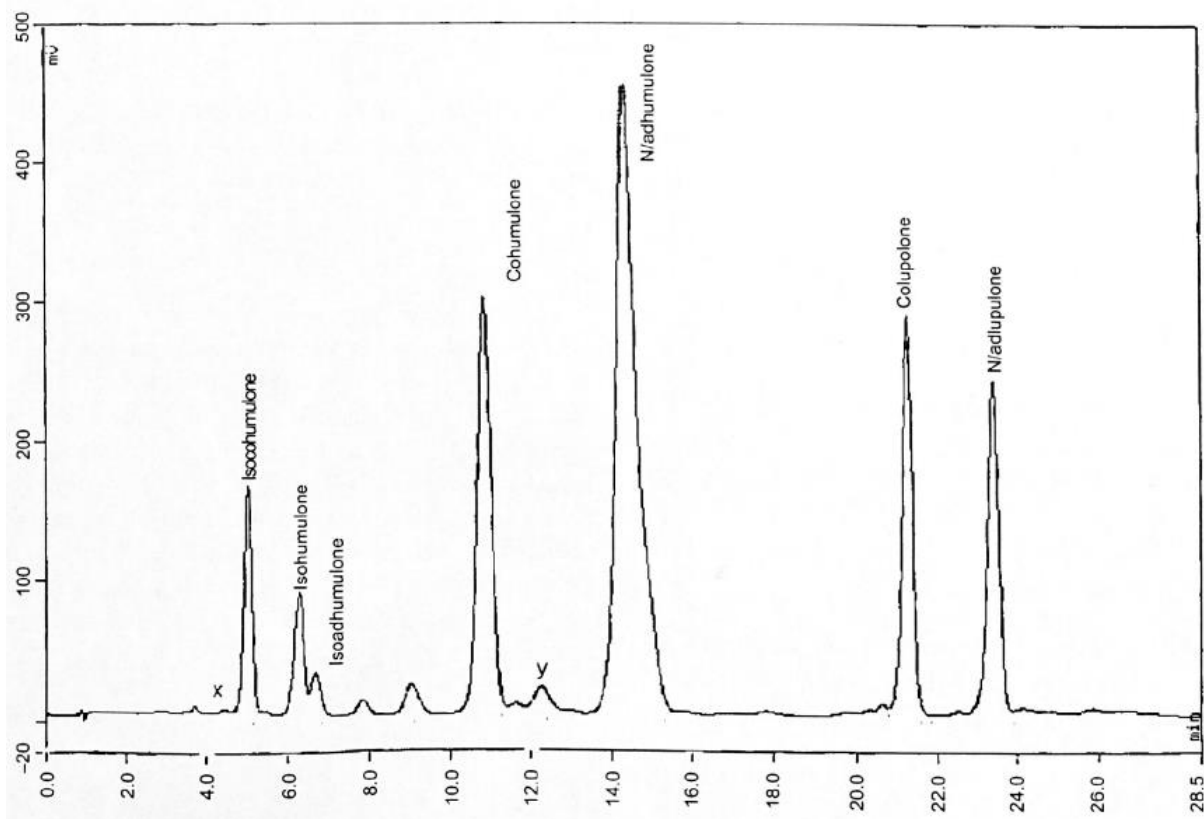


Abb. 8-1: Typisches HPLC-Chromatogramm von Iso- α -Säuren, α -Säuren und β -Säuren; Kopie aus EBC-Methode 7.8.^[154]

Anhang 2: Strukturformeln von *rac*-Humulon und *rac*-Isohumulon

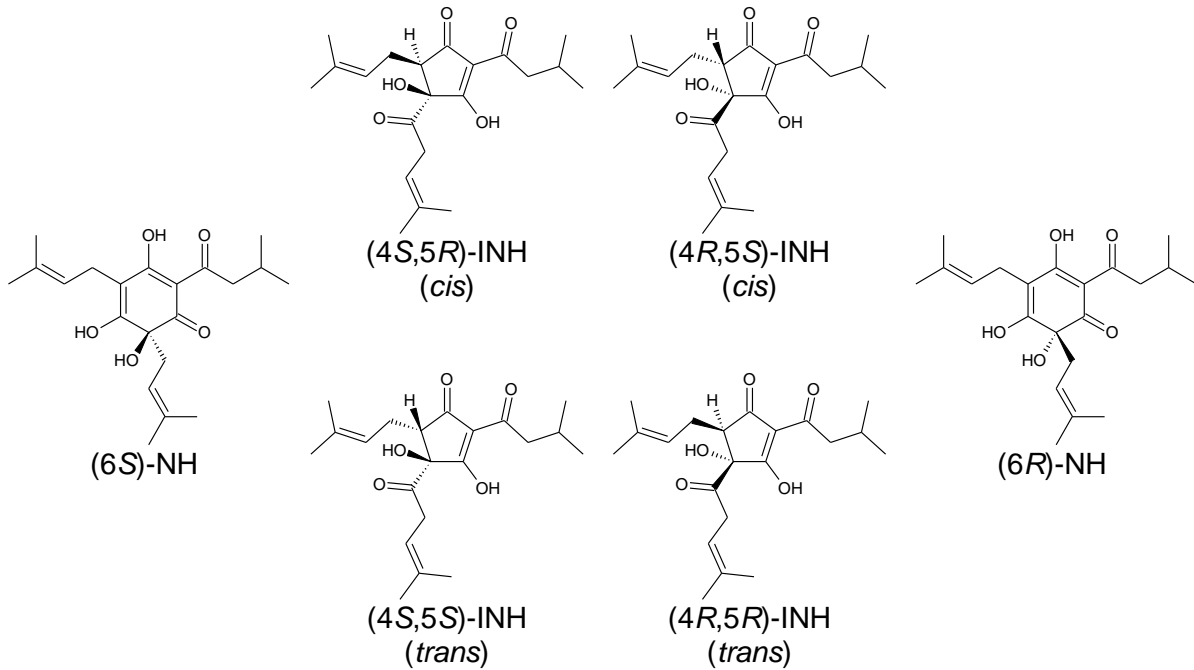
S-AS

IAS-1

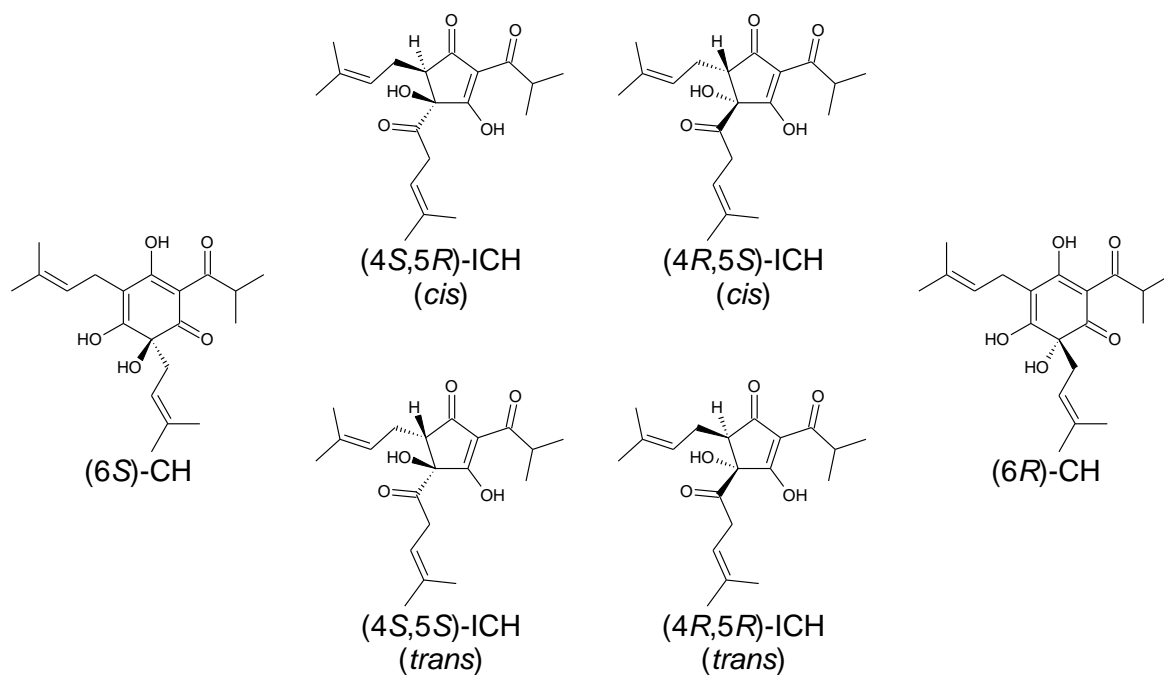
IAS-2

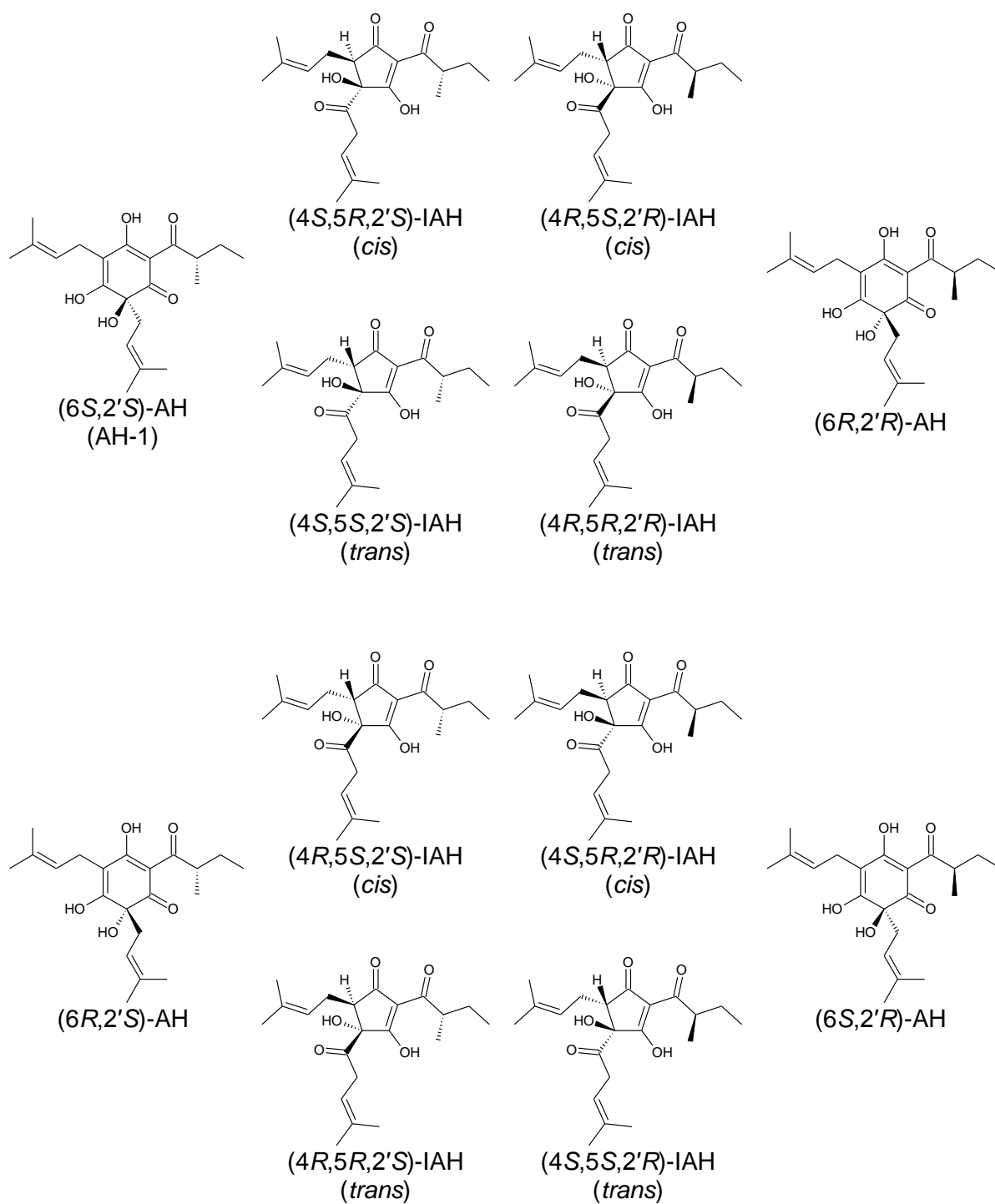
R-AS

n-Homologe



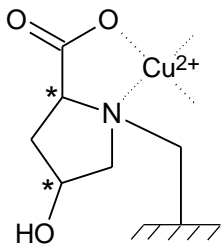
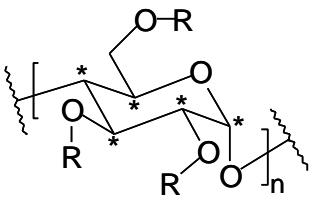
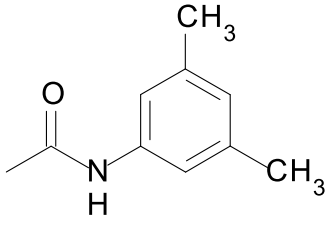
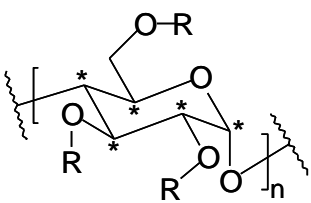
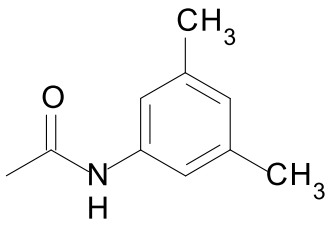
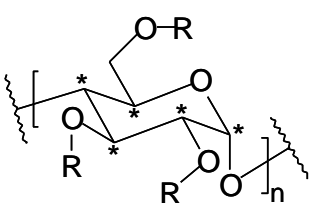
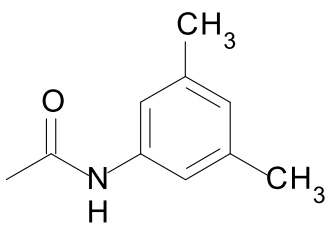
co-Homologe

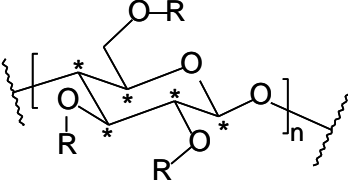
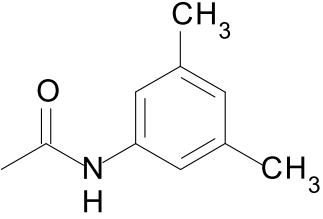
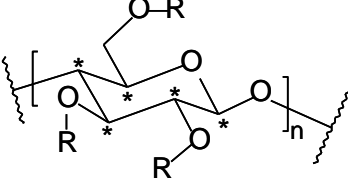
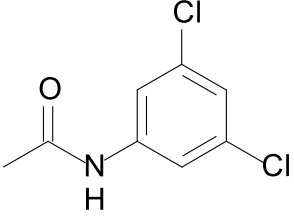
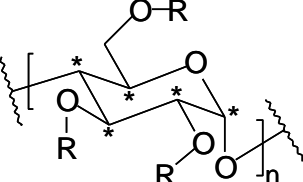
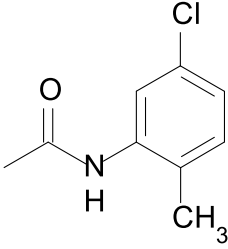
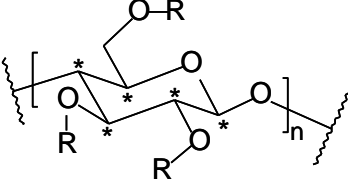
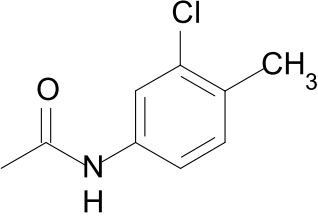
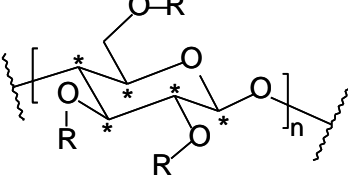
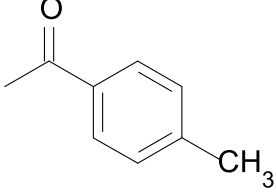


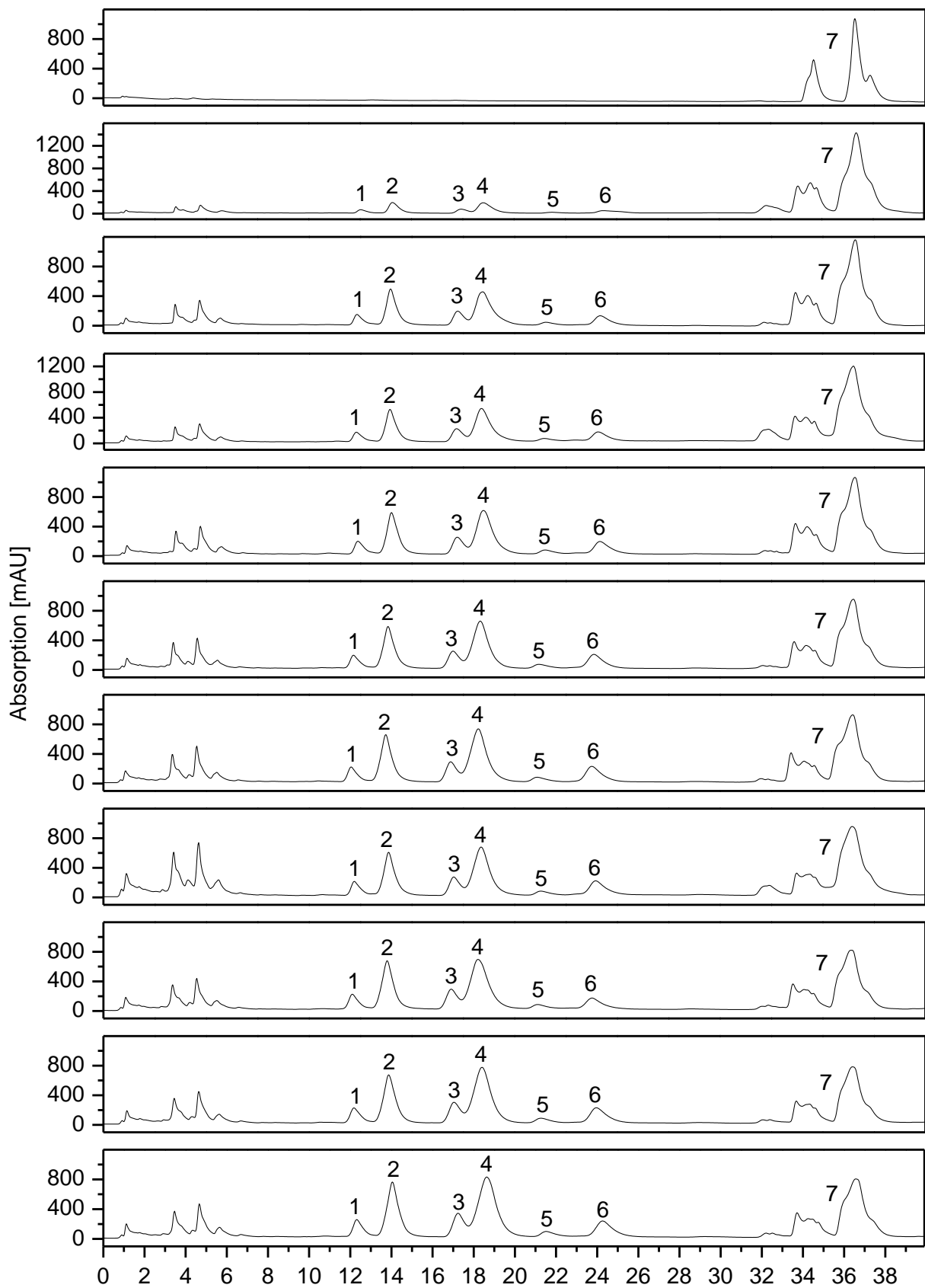
ad-Homologe

Anhang 3: Chirale HPLC-Säulen

Tab. 8-1: Chirale Selektoren der chiralen HPLC-Säulen.

Säule (Nr.)	Chiraler Selektor	
Macherey-Nagel Nucleosil-Chiral-1 (14)	 <p>L-Hydroxyprolin</p>	
	Zucker	Rest (-R)
Macherey-Nagel Nucleocel-Alpha- RP S (15)	 <p>Amylose</p>	 <p>3,5-Dimethylphenylcarbamate</p>
Knauer Europak-01 (16)	 <p>Amylose</p>	 <p>3,5-Dimethylphenylcarbamate</p>
Daicel Chiralpak-IA (17)	 <p>Amylose</p>	 <p>3,5-Dimethylphenylcarbamate</p>

Säule (Nr.)	Chiraler Selektor	
Daicel Chiralpak-IB (18)	 Cellulose	 3,5-Dimethylphenylcarbamate
Daicel Chiralpak-IC (19)	 Cellulose	 3,5-Dichlorophenylcarbamate
Phenomenex Lux Amylose-2 (20)	 Amylose	 5-Chlor-2-Methylphenylcarbamate
Phenomenex Lux Cellulose-2 (21)	 Cellulose	 3-Chlor-4-Methylphenylcarbamate
Phenomenex Lux Cellulose-3 (22)	 Cellulose	 4-Methylbenzoat

Anhang 4: Isomerisierung an Florisil® bei 40 °C: Chromatogramme

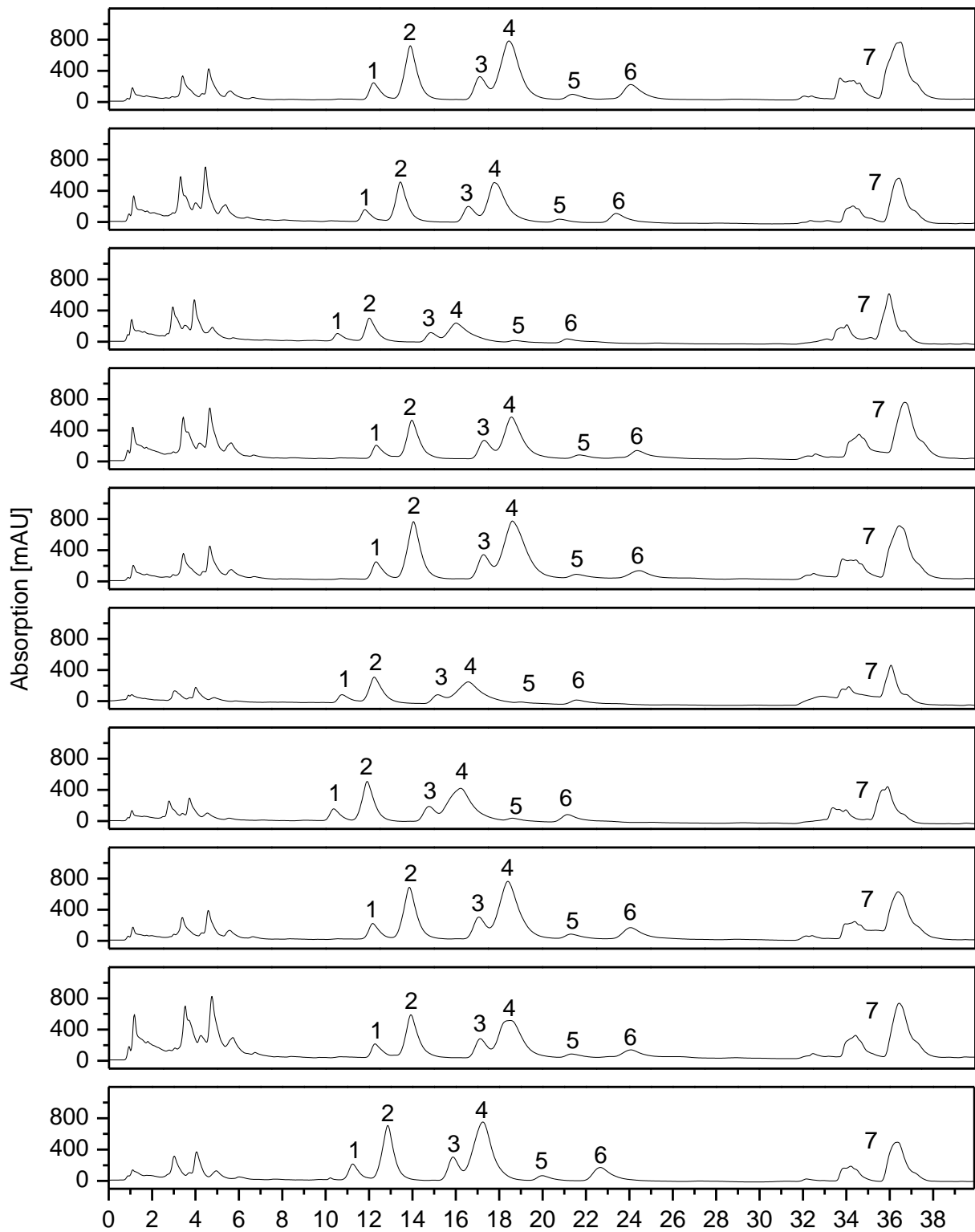


Abb. 8-2: Isomerisierung an Florisil® bei 40 °C; Tag 0 (oben) bis Tag 35 (unten); 1: TICH, 2: CICH, 3: TINH, 4: CINH, 5: TIAH, 6: CIAH, 7: AS; Anlage 1, Säule 9.*

* Die jeweils abweichenden Retentionszeiten lagen im systembedingten Fehler der HPLC-Anlage 1 begründet (vgl. Kap. 6.3.1).

Anhang 5: Isomerisierung an diversen Festsubstanzen ohne Lösemittel

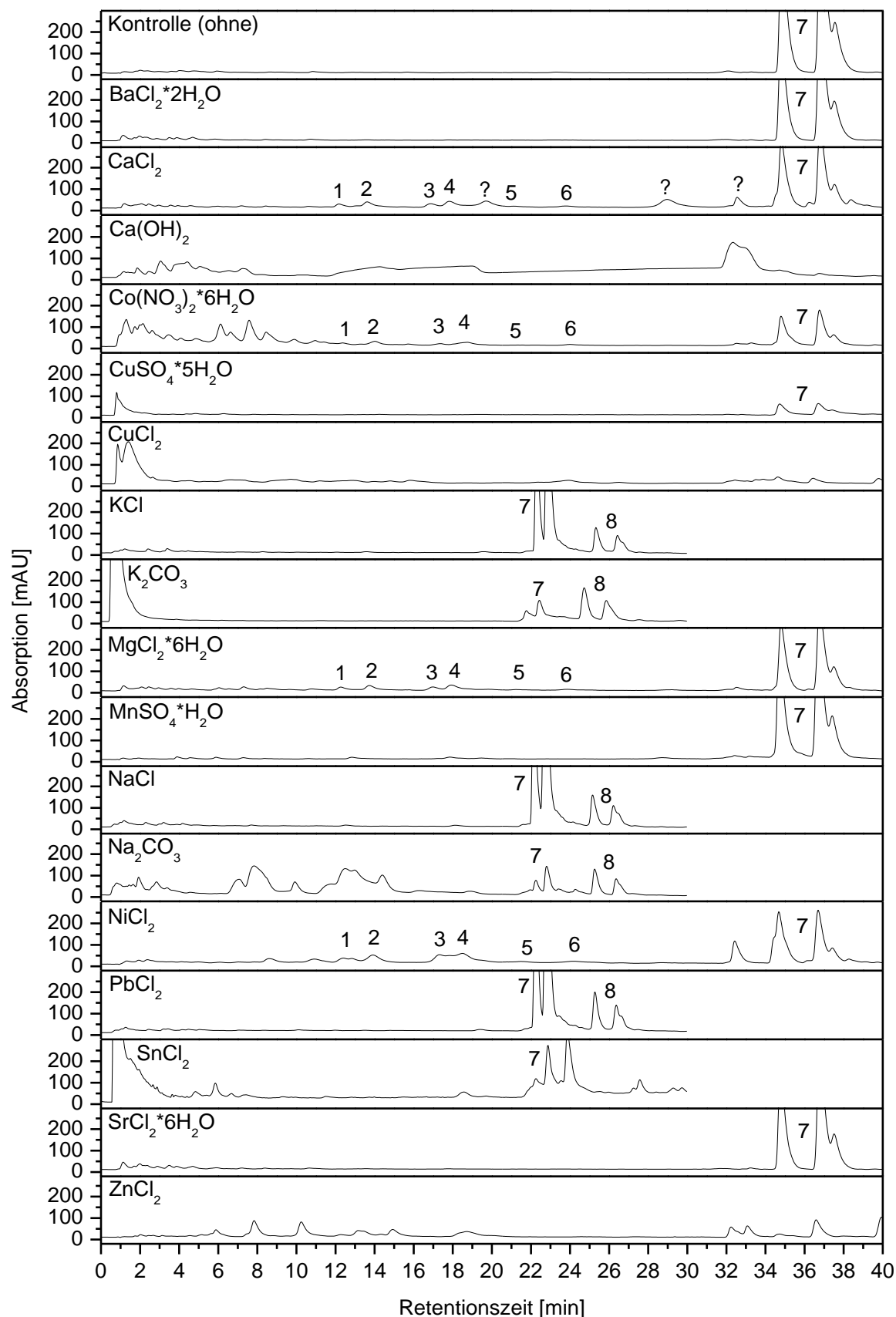


Abb. 8-3: Isomerisierung an diversen Festsubstanzen ohne Lösemittel; Kontrolle und Salze, 1: TICH, 2: CICH, 3: TINH, 4: CINH, 5: TIAH, 6: CIAH, 7: AS, 8: BS, ?: undefinierbar; Anlage 1, Säule 9 bzw. Säule 11 (KCl, K₂CO₃, NaCl, Na₂CO₃, PbCl₂, SnCl₂).

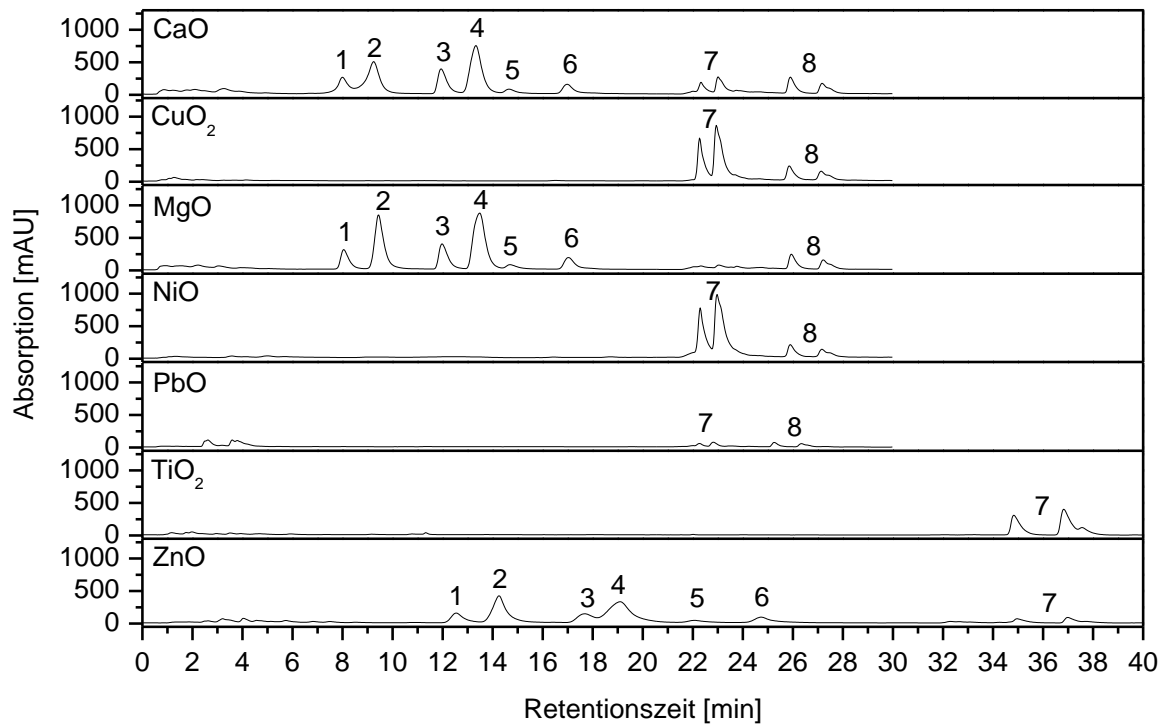


Abb. 8-4: Isomerisierung an diversen Festsubstanzen ohne Lösemittel; Oxide, 1: TICH, 2: CICH, 3: TINH, 4: CINH, 5: TIAH, 6: CIAH, 7: AS, 8: BS; Anlage 1, Säule 9 (TiO_2 , ZnO) bzw. Säule 11.

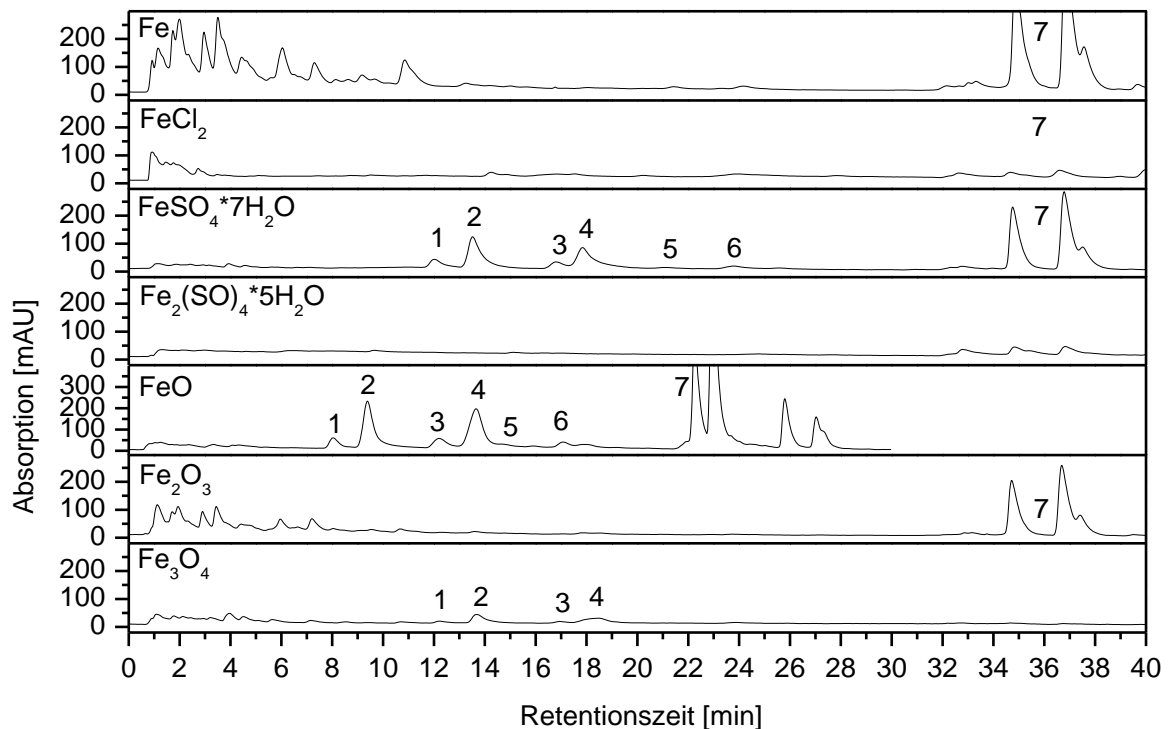


Abb. 8-5: Isomerisierung an diversen Festsubstanzen ohne Lösemittel; Eisenhaltige Verbindungen, 1: TICH, 2: CICH, 3: TINH, 4: CINH, 5: TIAH, 6: CIAH, 7: AS, 8: BS; Anlage 1, Säule 9 bzw. Säule 11 (FeO).

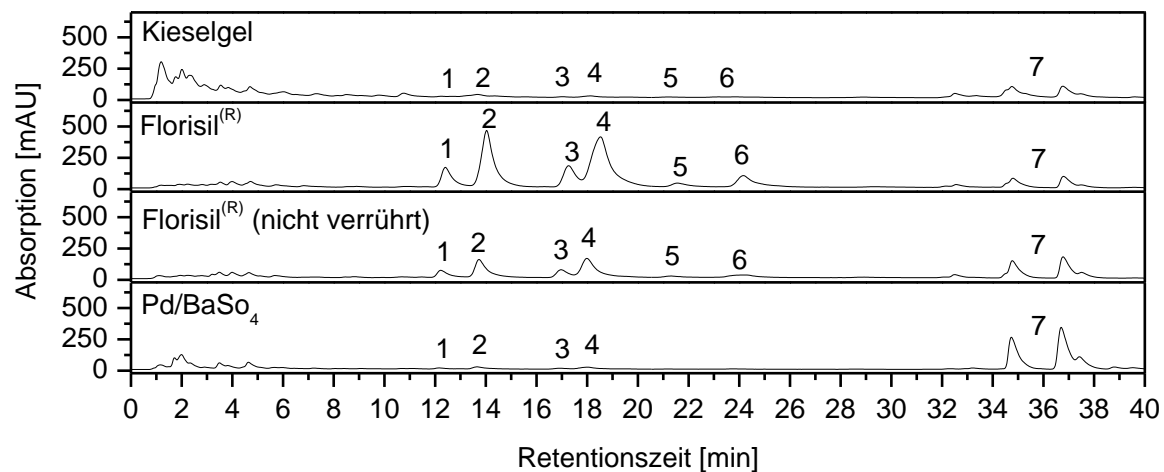


Abb. 8-6: Isomerisierung an diversen Festsubstanzen ohne Lösemittel; Sonstige Verbindungen, 1: TICH, 2: CICH, 3: TINH, 4: CINH, 5: TIAH, 6: CIAH, 7: AS; Anlage 1, Säule 9.

Anhang 6: Temperaturabhängigkeit der Racemisierungs-Geschwindigkeit: Diagramme

In den folgenden vier Diagrammen (Abb. 8-7 – Abb. 8-10) sind jeweils die prozentualen Anteile der einzelnen AS an der Gesamt-AS-Menge zum entsprechenden Zeitpunkt (oben) sowie die prozentuale AS-Menge relativ zur Ausgangsmenge ($t=0$) (unten) aufgeführt. Die Zeitpunkte der jeweils vollständigen Racemisierung sind dabei mit roten Kreisen markiert.

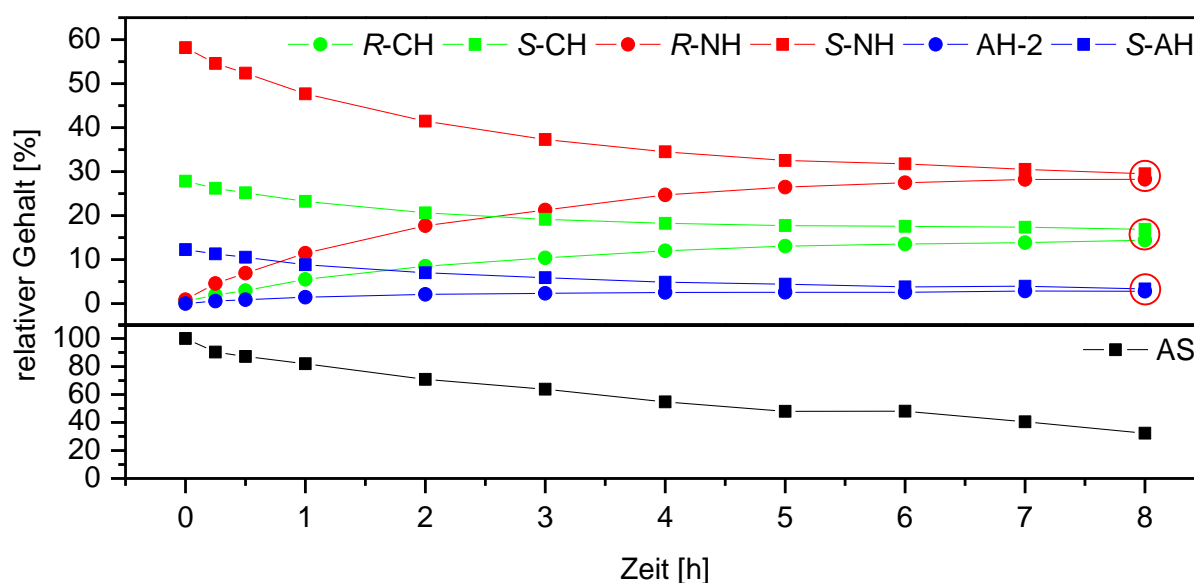


Abb. 8-7: Racemisierungs-Geschwindigkeit bei 120 °C (*AS-pur* in Xylol).

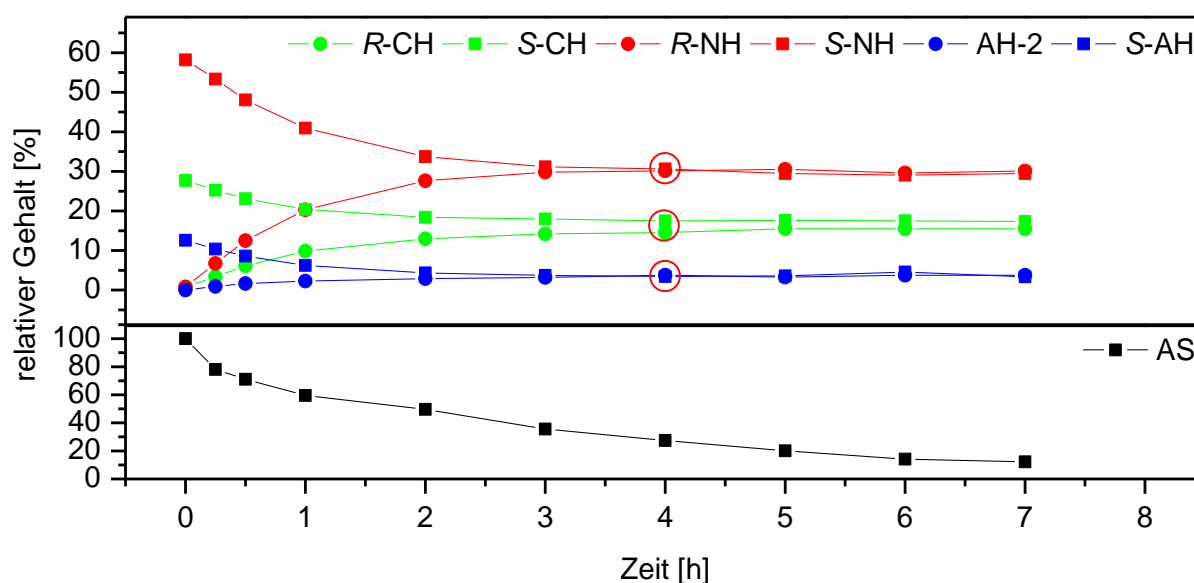


Abb. 8-8: Racemisierungs-Geschwindigkeit bei 130 °C (*AS-pur* in Xylol).

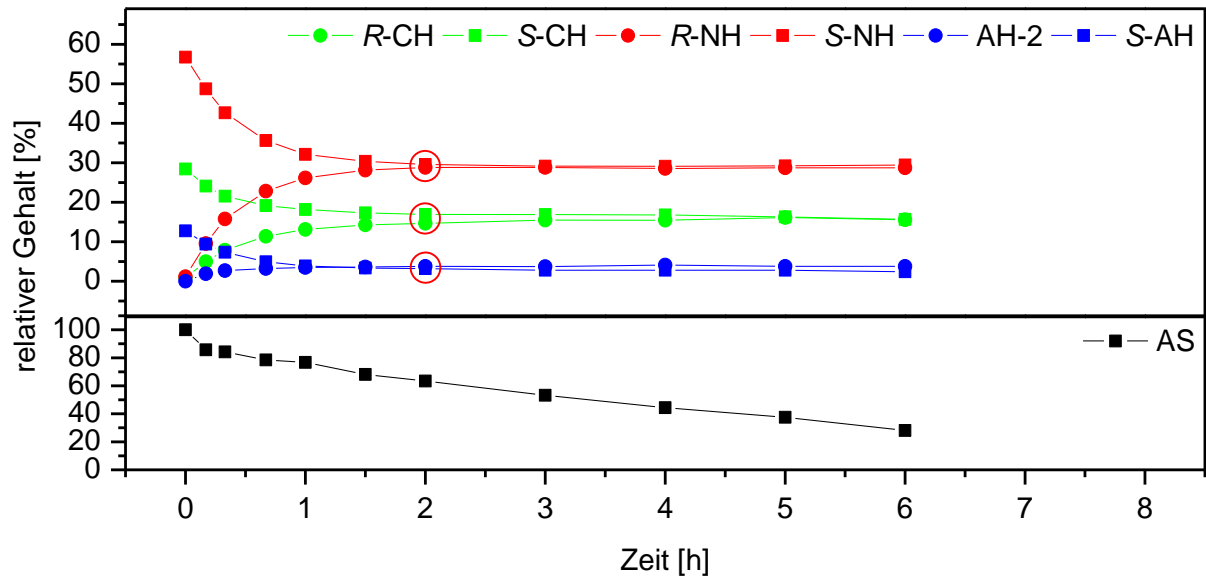


Abb. 8-9: Racemisierungsgeschwindigkeit bei 140 °C (*AS-pur* in Xylol).

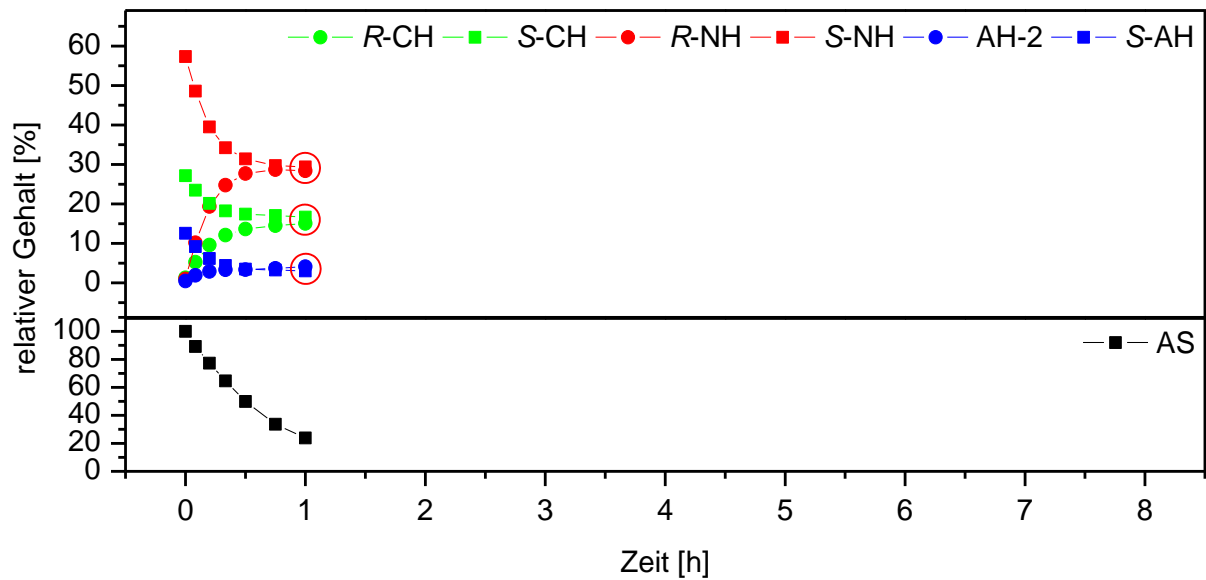


Abb. 8-10: Racemisierungsgeschwindigkeit bei 150 °C (*AS-pur* in Xylol).

Anhang 7: Diverse Hopfensorten aus Deutschland und Mitteleuropa bzw. England, Neuseeland und USA

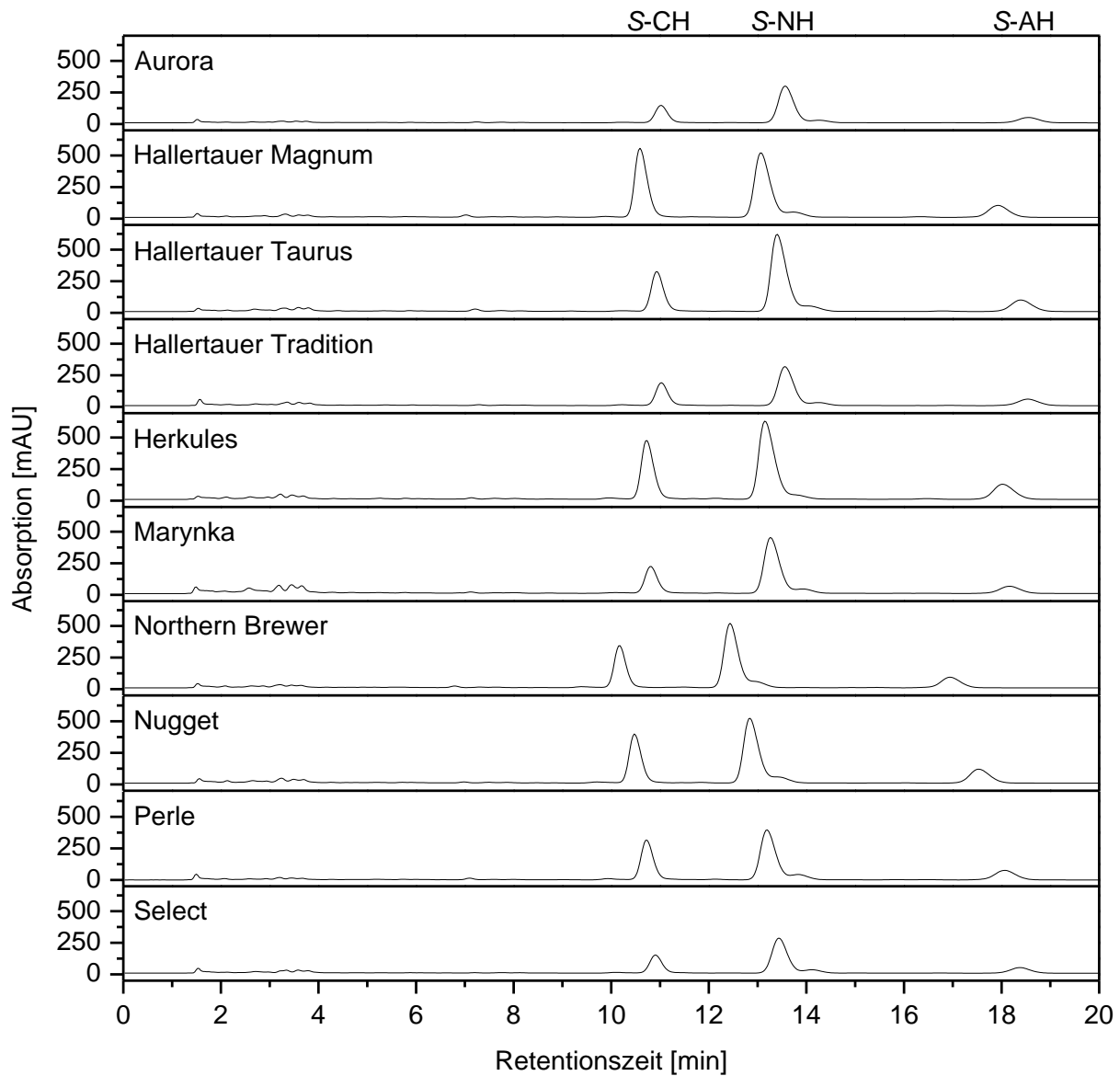


Abb. 8-11: HPLC Chromatogramme diverser Hopfensorten aus Deutschland und Mitteleuropa: Pellets, alphabetisch geordnet; Anlage 1, Säule 22, Injektionsvolumen: 2 μ L ($c_{AS} \approx 30$ g/L, je nach Sorte), HPLC-Methode-5.*,†

* Die jeweils abweichenden Retentionszeiten lagen im systembedingten Fehler der HPLC-Anlage 1 begründet (vgl. Kap. 6.3.1).

† Da die BS in der Forschungsarbeit nur eine untergeordnete Rolle spielten, wurden diese hier vernachlässigt. Sie wurden durch einen erhöhten ACN-Anteil (90 %) ab der 20. Minute gemeinsam eluiert und sind daher in den Chromatogrammen nicht aufgeführt.

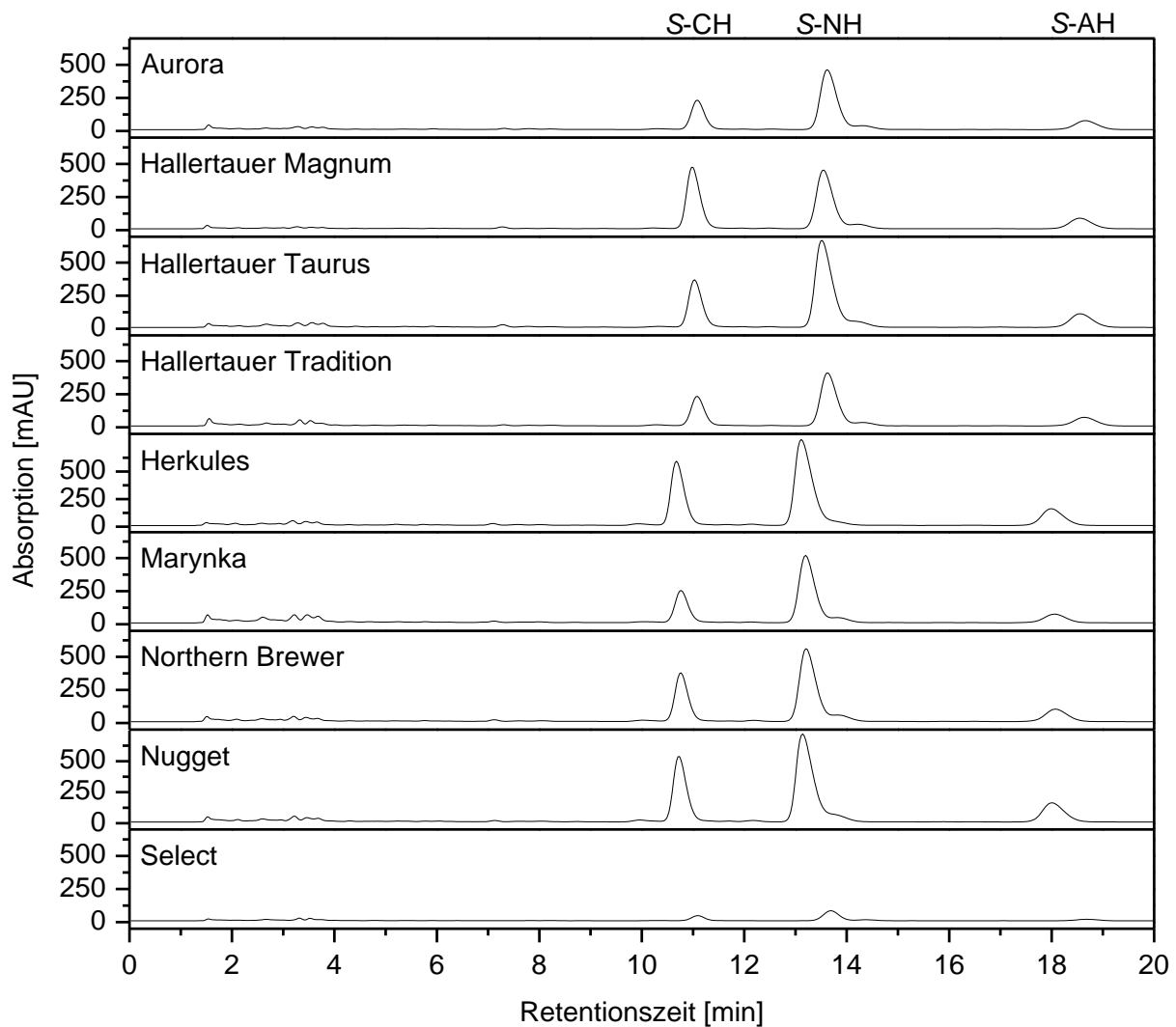


Abb. 8-12: HPLC Chromatogramme diverser Hopfensorten aus Deutschland und Mitteleuropa: Rohhopfen, alphabetisch geordnet; Anlage 1, Säule 22, Injektionsvolumen: 2 μ L ($C_{AS} \approx 30$ g/L, je nach Sorte), HPLC-Methode-5.*†

* Die jeweils abweichenden Retentionszeiten lagen im systembedingten Fehler der HPLC-Anlage 1 begründet (vgl. Kap. 6.3.1).

† Da die BS in der Forschungsarbeit nur eine untergeordnete Rolle spielten, wurden diese hier vernachlässigt. Sie wurden durch einen erhöhten ACN-Anteil (90 %) ab der 20. Minute gemeinsam eluiert und sind daher in den Chromatogrammen nicht aufgeführt.

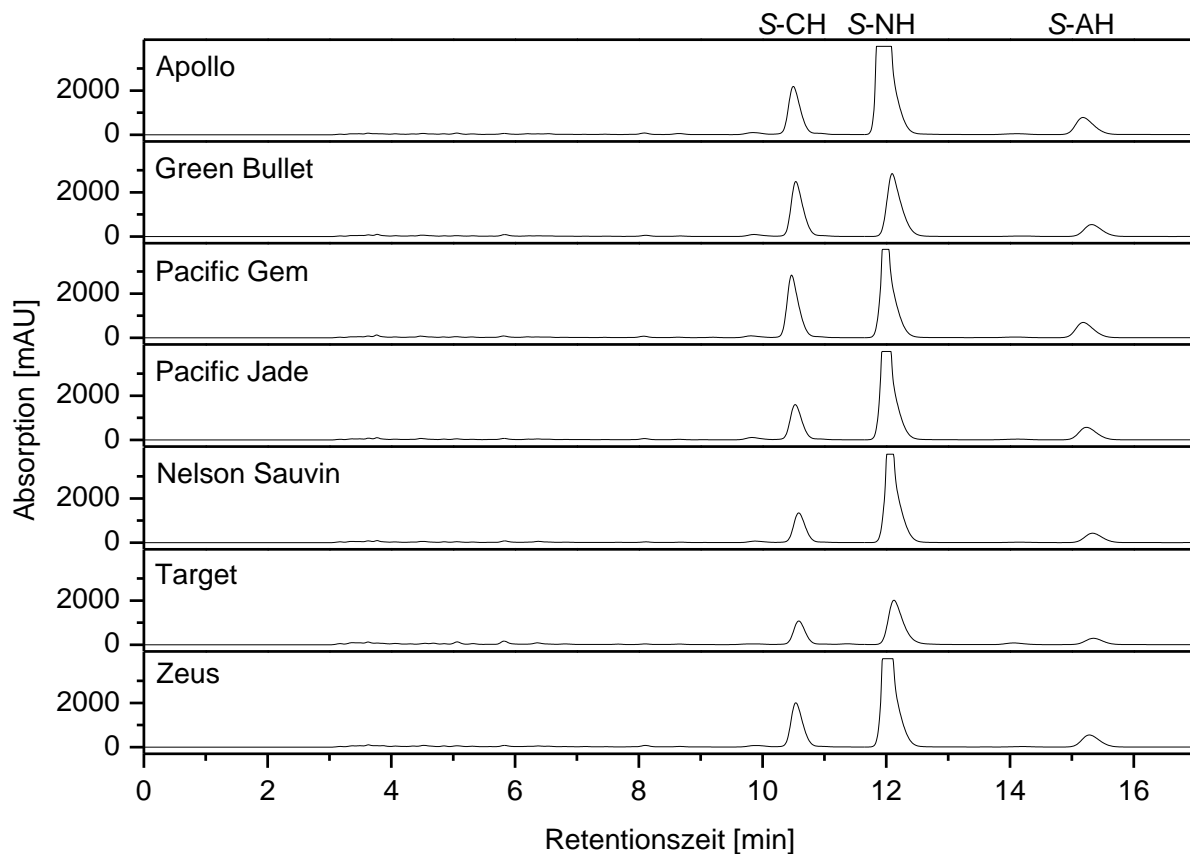


Abb. 8-13: HPLC Chromatogramme diverse Hopfsorten aus England, Neuseeland und USA: Pellets, alphabetisch geordnet; Anlage 2, Säule 22, Injektionsvolumen: 5 μ L ($c_{AS} \approx 15$ g/L, je nach Sorte), HPLC-Methode-9.*.†

* Um etwaige (*R*)-Enantiomere nachweisen zu können, wurde eine so große Menge auf die Säule aufgetragen, dass bei der UV-Detektion die maximal detektierbare Absorption von 4000 mAU überschritten wurden. Dadurch entstanden die zum Teil seltsamen Peakformen (v.a. bei S-NH).

† Da die BS in der Forschungsarbeit nur eine untergeordnete Rolle spielten, wurden diese hier vernachlässigt. Sie wurden durch einen erhöhten ACN-Anteil (90 %) ab der 17. Minute gemeinsam eluiert und sind daher in den Chromatogrammen nicht aufgeführt.

Lebenslauf

Richard Franz-Xaver Plapperer, M.Sc.

Persönliche Daten

Geburtsdatum/-ort: 17.10.1983, Fürstenfeldbruck
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Berufliche Erfahrung

- 09/2013 – heute **Dozent in der Erwachsenenbildung**, Fachbereiche Chemie und Biotechnologie bei Doemens e.V.
- 03/2009 – 08/2013 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter/Doktorand**, TU München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität; Thema: „Untersuchungen zur Chiralität und Isomerisierung von Hopfenbitterstoffen“; Angestrebter Abschluss: Dr. rer. nat.
- 10/2007 – 01/2008 **Wissenschaftliche Hilfskraft**, LMU München, Mitarbeit bei Biochemischen Tätigkeiten, Genexpression und Proteinaufreinigung
- 09/2006 – 03/2007 **Studentische Hilfskraft**, LMU München, Mitarbeit bei Biochemischen Tätigkeiten, Genexpression und Proteinaufreinigung

Studium/Schule

- 01/2007 – 12/2008 **Masterstudium Chemie**, LMU München, Bereiche: Organische Chemie, Anorganische Chemie, Analytische Chemie/Umweltanalytik, Abschluss: Master of Science, Masterarbeit zum Thema: „Entwicklung von multifunktionalen Antikörper-gekoppelten Nanopartikeln als MRI-aktive Substanzen“
- 10/2003 – 01/2007 **Bachelorstudium Chemie/Biochemie**, LMU München, Bereiche: Anorganische Chemie, Organische Chemie, Physikalische Chemie, Biochemie, Abschluss: Bachelor of Science, Bachelorarbeit zum Thema: „Klonierung, Expression und Untersuchung des Proteins *Rad14*“
- 09/1994 – 06/2003 Viscardi-Gymnasium, Fürstenfeldbruck, Abschluss: Abitur, Facharbeit in Chemie zum Thema: „Die Chemie beim Bierbrauen: Theorie und Praxis“

Kenntnisse und Erfahrungen

- Labor: Erfahrungen in der analytischen Chemie, insbesondere auf dem Gebiet der HPLC und LC-MS
- Sprachkenntnisse: Englisch: Fließend in Wort und Schrift
Französisch: Grundkenntnisse
- IT-Kenntnisse: MS Office: Sehr gute Kenntnisse

München, 14. März 2015