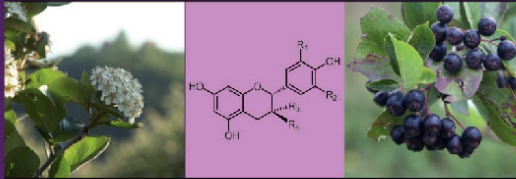




Tuba Esatbeyoglu (Autor)

Analyse wertgebender Inhaltsstoffe von *Aronia melanocarpa* sowie Charakterisierung und Isolierung von Proanthocyanidinen

Analyse wertgebender Inhaltsstoffe
von *Aronia melanocarpa*
sowie Charakterisierung und Isolierung
von Proanthocyanidinen



Tuba Esatbeyoglu

 Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/476>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

2 Grundlagen und Kenntnisstand

2.1 Sekundäre Pflanzenstoffe: Polyphenole

2.1.1 Klassifizierung der Polyphenole

Die Polyphenole werden zu den sekundären Pflanzenstoffen gezählt. Sie dienen im Gegensatz zu den primären Pflanzenstoffen wie den Lipiden, Kohlenhydraten und Proteinen nicht dem Wachstum der Pflanze, sondern der Fortpflanzung und Verteidigung. Sie sind Farb-, Gift-, Geruchs- oder Geschmacksstoffe, die entweder „Schädlinge“ vertreiben (Fraßschutz) oder Insekten für die Fortpflanzung anlocken. Weiterhin bieten sie Schutz vor UV-Strahlung. Demgemäß befinden sie sich vermehrt in äußeren Pflanzenteilen wie Schalen und Rinden. In vielen Obst- und Gemüsesorten tragen sie zum Geschmack und zur Farbe bei (WATZL und RECHKEMMER 2001b; MANACH et al. 2004; BELITZ et al. 2008).

Abgeleitet von ihrem Grundkörper lassen sich Polyphenole in mindestens fünf Gruppen einteilen, die Hydroxybenzoesäuren (C_6-C_1 -Grundgerüst), Hydroxyzimtsäuren (C_6-C_3 -Grundgerüst), Flavonoide ($C_6-C_3-C_6$ -Grundgerüst), Stilbene ($C_6-C_2-C_6$ -Grundgerüst) und Lignane ($(C_6-C_3)_2$ -Grundgerüst) (Abb. 2.1) (MANACH et al. 2004; BELITZ et al. 2008).

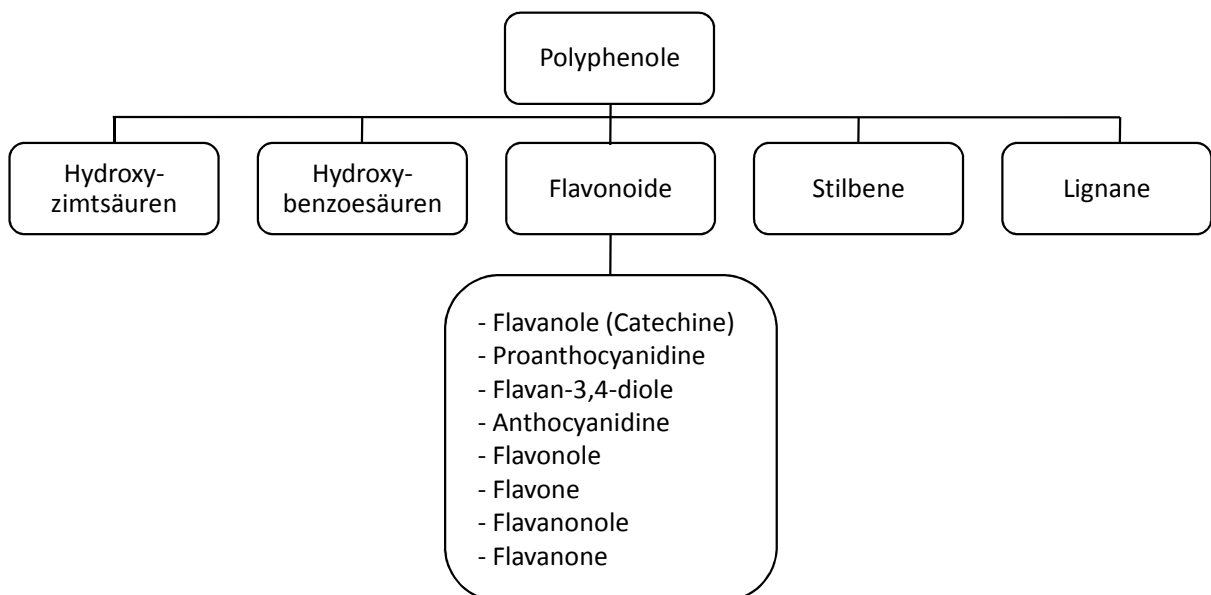


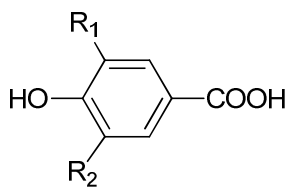
Abb. 2.1: Klassifizierung der Polyphenole nach MANACH et al. (2004).

Der Begriff „Polyphenole“ wird in der Literatur uneinheitlich verwendet. So wird in einigen Literaturstellen die Bezeichnung „Polyphenole“ auf Verbindungen beschränkt, die mindestens zwei aromatische Ringe besitzen, von denen jeder mindestens eine Hydroxylgruppe trägt. Hydroxybenzoesäuren und Hydroxyzimtsäuren zählen demnach zu den „einfachen Phenolen“. Die „Polyphenole“ werden in Flavonoide und Tannine

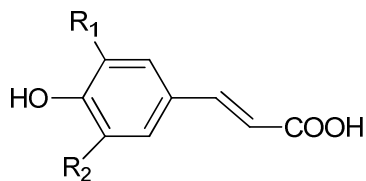
(hydrolysierbare Tannine und kondensierte Tannine bzw. Proanthocyanidine) aufgegliedert. „Polyphenole“ und „einfache Phenole“ werden unter dem Begriff „Phenole“ zusammengefasst (ROBBINS und BEAN 2004).

2.1.2 Phenolsäuren: Hydroxybenzoesäure, Hydroxyzimtsäure

Nach den Flavonoiden sind Phenolsäuren die zweitgrößte Gruppe an phenolischen Verbindungen in Lebensmitteln. Die Abb. 2.2 zeigt einige in Lebensmitteln vorkommende Hydroxybenzoesäuren und Hydroxyzimtsäuren (FABRE et al. 2001; MONAGAS et al. 2005).



Hydroxybenzoesäure	R ₁	R ₂
<i>p</i> -Hydroxybenzoesäure	H	H
Protocatechusäure	OH	H
Vanillinsäure	OCH ₃	H
Gallussäure	OH	OH



Hydroxyzimtsäure	R ₁	R ₂
<i>p</i> -Cumarsäure	H	H
Kaffeesäure	OH	H
Ferulasäure	OCH ₃	H
Sinapinsäure	OCH ₃	OCH ₃

Abb. 2.2: Chemische Strukturen einiger Hydroxybenzoesäuren und Hydroxyzimtsäuren.

Verschiedene Beeren wie Himbeeren, Brombeeren sowie Aroniabeeren, Kirschen und Weintrauben enthalten Hydroxyzimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren. In hohen Mengen sind Hydroxybenzoesäuren in Kastanien, Himbeeren und Granatapfelsaft zu finden (PÉREZ-JIMÉNEZ et al. 2010). Protocatechusäure kommt zum einen natürlich vor und stellt zum anderen ein Abbauprodukt der Cyanidine dar (MARKAKIS 1974). Des Weiteren ist Gallussäure Bestandteil der hydrolysierbaren Tannine. Hydroxyzimtsäuren kommen in Kartoffeln, Brokkoli, Pflaumen, Oliven, Spinat und Kopfsalat vor, die meist mit verschiedenen Säuren gebunden vorliegen (WATZL und RECHKEMMER 2001a; MANACH et al. 2004; MATTILA et al. 2006; BELITZ et al. 2008; PÉREZ-JIMÉNEZ et al. 2010). Der am häufigsten vorkommende Hydroxyzimtsäureester ist Chlorogensäure, die aus Kaffeesäure und Chinasäure gebildet wird. Bekannt ist ihr Vorkommen u. a. in Kaffeebohnen, Äpfeln, Aroniabeeren und Kartoffeln. Ein Teil der anregenden Wirkung des Kaffees soll auf sie zurückgehen (MACHEIX et al. 1990; WATZL und RECHKEMMER 2001a; Clifford et al. 2003). Darüber hinaus sind Chlorogensäuren an Copigmentierungsreaktionen beteiligt, die die Farbstabilität der Anthocyane beeinflussen (MAZZA und BROUILLARD 1990; MAZZA und MINIATI 1993).

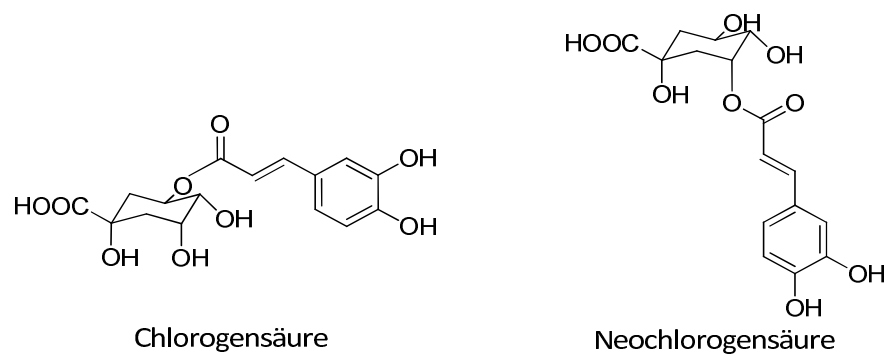


Abb. 2.3: Chemische Struktur einiger Chlorogensäuren.

2.1.3 Flavonoide

Die größte Bedeutung in Pflanzen haben die Flavonoide. Sie stellen gleichzeitig auch die umfangreichste Gruppe der Polyphenole dar. Derzeit sind etwa 6500 verschiedene Flavonoide bekannt (WATZL und RECHKEMMER 2001b). Ihren Namen tragen sie nach der gelben (lat. *flavus* = gelb) Farbe mehrerer Vertreter. Die Grundstruktur der Flavonoide besteht aus drei Kohlenstoffringen mit zwei aromatischen (A- und B-Ring) und einem zentralen heterozyklischen Ring (C-Ring). In Abb. 2.4 ist das Grundgerüst (2-Phenylbenzopyran) der Flavonoide dargestellt (MANACH et al. 2004).

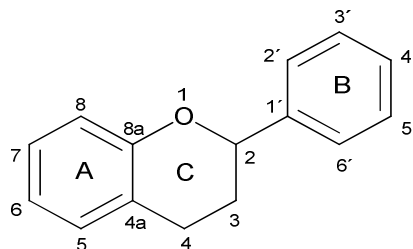
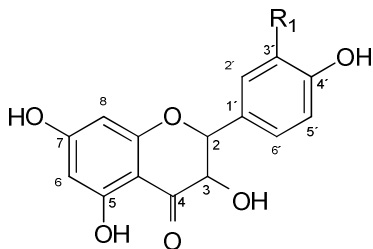
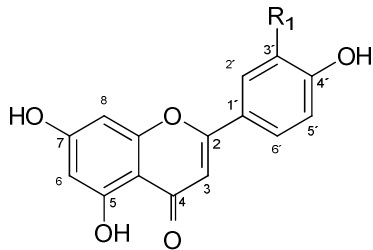
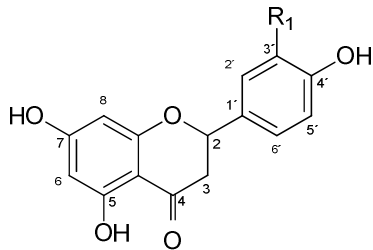
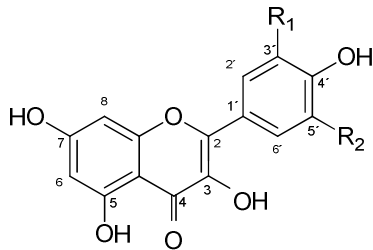


Abb. 2.4: Grundgerüst der Flavonoide.

Nach dem Oxidationsgrad des C-Rings (Pyran-Ring) können die Flavonoide in mehrere Unterklassen aufgliedert werden: Flavanole (Catechine), Proanthocyanidine, Flavan-3,4-diole (Leucoanthocyanidine), Anthocyanidine, Flavonole, Flavone, Flavanonole, Flavanone (HARBORNE 1993; WATZL und RECHKEMMER 2001b). Innerhalb der Klassen unterscheiden sich die Flavonoide in der Substitution der A- und B-Ringe. Die Hauptsubstituenten sind Hydroxylgruppen, die mit Zuckerresten glykosidische Bindungen eingehen können. Ebenso sind Methylierungen bekannt. Die Flavonoide kommen in der Natur nicht frei vor (Aglykon), sondern liegen als Flavonoidglykoside vor, während die Flavanole meist als Aglykon vorliegen. Jedoch sind ebenso Flavanolglykoside bekannt (PORTER 1988; GU et al. 2003). Die Zuckerreste werden an den Hydroxylgruppen des A-Rings (Position 5 und 7) und überwiegend an der Position 3 des C-Rings gebunden.

2.1.3.1 Flavonole, Flavanone, Flavone und Flavanonole

Die chemische Struktur der Flavonole, Flavanone, Flavone und Flavanonole ist in Abb. 2.5 zu sehen (FABRE et al. 2001; MONAGAS et al. 2005).



Flavonole	R ₁	R ₂
Myricetin	OH	OH
Quercetin	OH	H
Kämpferol	H	H
Isorhamnetin	OCH ₃	H

Flavanone	R ₁
Eriodictyol	OH
Naringenin	H

Flavone	R ₁
Luteolin	OH
Apigenin	H

Flavanonole	R ₁
Taxifolin	OH

Abb. 2.5: Chemische Struktur der Flavonole, Flavanone, Flavone und Flavanonole.

Flavonole sind die am meisten verbreiteten Flavonoide in Nahrungsmitteln. Sie kommen in großen Mengen in Zwiebeln, Brokkoli und Blaubeeren vor. Sie verleihen Pflanzen, insbesondere den Blüten, eine gelbe Farbe. Häufig kommen die Aglykone Quercetin und Kämpferol vor, die meist an der C3-Position glykosidisch gebunden sind (WATZL und RECHKEMMER 2001b; MANACH et al. 2004). Weiterhin leistet Quercetin einen wichtigen Beitrag zur antioxidativen Aktivität in Nahrungsmitteln. In höheren Konzentrationen ist es z. B. in Quitten, Holunderbeeren und Äpfeln enthalten (BELITZ et al. 2008).

Flavanone, wie Naringenin und Hesperetin, sind hauptsächlich als Glykoside (Position 7) in großen Mengen in Zitrusfrüchten wie Grapefruit, Zitrone und Orange oder Tomaten zu finden. Sie sind für den bitteren Geschmack verantwortlich (WATZL und RECHKEMMER 2001b; MANACH et al. 2004).

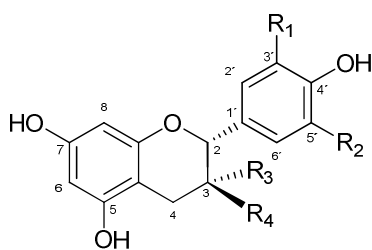
Flavone und Flavanonole sind in Gemüse und Obst weniger verbreitet. Flavone, die hauptsächlich glykosyliert vorliegen, sind in Sellerie und Petersilie enthalten (MANACH et al. 2004). Flavanonole kommen als Aglykone verbreitet in Holz vor (MONAGAS et al. 2005).

2.1.3.2 Flavan-3-ole (Catechine)

Flavan-3-ole, auch Catechine genannt, kommen in der Regel in Früchten sowie anderen Lebensmitteln frei vor oder sind mit Gallussäure verestert (3-*O*-gallate). Selten liegen sie glykosidisch gebunden vor. Gute Quellen für Flavan-3-ole stellen Traubenkerne, Kakao, Schokolade, Wein, Tee und Äpfel dar (ARTS et al. 2000a; ARTS et al. 2000b; GU et al. 2004).

Die heute gebräuchliche Nomenklatur der Flavan-3-ole und Proanthocyanidine, neben der von Weinges (WEINGES et al. 1968a; WEINGES et al. 1969), geht auf einen Vorschlag von HEMINGWAY et al. (1982) zurück, welcher von HASLAM (1982) und PORTER (1988; 1994) fortgesetzt und erweitert wurde. Unter dem Begriff „Leucocyanidine“ (leuco = farblos) werden heute die Flavan-3,4-diole und Flavan-4-ole verstanden (PORTER 1988; FERREIRA et al. 2010).

Je nach Hydroxylierungsmuster der A- und B- Ringe sind 16 verschiedene Flavan-3-ole bekannt. Die wichtigsten Vertreter der Flavan-3-ole sind die Diastereomerenpaare (+)-Catechin und (–)-Epicatechin, (+)-Gallocatechin und (–)-Epigallocatechin, (+)-Afzelechin und (–)-Epiafzelechin sowie ihre 3-*O*-gallate. Diese sind *trans* (2*R*, 3*S*) oder *cis* (2*R*, 3*R*) konfiguriert und unterscheiden sich lediglich in ihrer Stereochemie an Position 3 im C-Ring (Abb. 2.6). Das Präfix „Epi“ bezieht sich auf das Epimer (2*R*, 3*R*-Konfiguration) (PORTER 1988; MACHEIX et al. 1990; HARBORNE 1993; FERREIRA et al. 2010).



Flavan-3-ol	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(+)-Afzelechin (2 <i>R</i> , 3 <i>S</i>)	H	H	H	OH
(–)-Epiafzelechin (2 <i>R</i> , 3 <i>R</i>)	H	H	OH	H
(+)-Catechin (2 <i>R</i> , 3 <i>S</i>)	OH	H	H	OH
(–)-Epicatechin (2 <i>R</i> , 3 <i>R</i>)	OH	H	OH	H
(+)-Gallocatechin (2 <i>R</i> , 3 <i>S</i>)	OH	OH	H	OH
(–)-Epigallocatechin (2 <i>R</i> , 3 <i>R</i>)	OH	OH	OH	H

Abb. 2.6: Wichtigste Vertreter der Flavan-3-ole.

Bei 2*S*-konfigurierten Flavan-3-olen wird zusätzlich das Präfix „ent“ eingefügt. Sie kommen in der Natur nur sehr selten vor. Dies hängt offensichtlich mit der Biosynthese zusammen. So sind z. B. (+)-Catechin (2*R*, 3*S*) und ent-Catechin (oder (–)-Catechin; 2*S*, 3*R*) Enantiomere und (+)-Catechin (2*R*, 3*S*) und ent-Epicatechin (oder (+)-Epicatechin; 2*S*, 3*S*) Epimere.

2.1.3.3 Proanthocyanidine

Da ein Großteil der Arbeit sich mit der Darstellung, Isolierung und Strukturaufklärung der Proanthocyanidine beschäftigt, werden sie in diesem Kapitel näher erläutert.

Bei Proanthocyanidinen handelt es sich um oligomere oder polymere Kondensationsprodukte aus Flavan-3-olen. Unter der Bezeichnung „kondensierte Tannine“ oder „Gerbstoffe“ sind sie ebenfalls geläufig, da sie in der Lage sind, tierische Haut in Leder umzuwandeln (PORTER 1989; PORTER 1994). Weiterhin gibt es hydrolysierbare Tannine, die aus Gallussäure (Gallotannine) und Hexahydroxydiphensäure (Ellagitannine) zusammengesetzt sind. Proanthocyanidine, die aus 2 bis 7 Flavan-3-ol-Einheiten aufgebaut sind, werden als oligomere bzw. niedermolekulare Proanthocyanidine und die aus über 7 Einheiten bestehenden als polymere bzw. höhermolekulare Proanthocyanidine bezeichnet (GUYOT et al. 2001; LI und DEINZER 2007). Sie kommen in vielen Lebensmitteln wie verschiedenen Früchten, Getreidekörnern, Nüssen, Schokolade oder auch Getränken wie Tee, Wein, Kakao und Bier vor (HASLAM 1989; GU et al. 2003; PÉREZ-JIMÉNEZ et al. 2010). Unter den Früchten weisen Aroniabeeren sehr hohe Proanthocyanidingehalte mit 2050 mg/100g Frischgewicht auf (HELLSTRÖM et al. 2009). In Gemüse kommen sie weniger vor (GU et al. 2003; GU et al. 2004). Die Proanthocyanidine sind für den adstringierenden Charakter vieler Lebensmittel wie Wein sowie für den bitteren Geschmack verantwortlich. Der adstringierende Sinneseindruck kommt durch ihre Komplexbildung mit Speichelproteinen zustande (SANTOS-BUELGA und SCALBERT 2000; MA et al. 2000; MANACH et al. 2004; KOERNER et al. 2009) und nimmt mit steigender Kettenlänge der Proanthocyanidine und dem Galloylierungsgrad zu (VIDAL et al. 2003). Während der Reifung nimmt die Adstringenz ab (HASLAM 1989). Aufgrund ihres Gerbstoffcharakters kommt es zur Trübung von Fruchtsäften, da sie die Proteine ausfällen (WEINGES et al. 1968a). Des Weiteren gehen die farblosen Proanthocyanidine durch enzymatische Dehydrierung (Polyphenoloxidase) in Gegenwart von Luftsauerstoff in rotbraune Polymerisate über, wodurch die Farbe von Früchten oder Säften verändert wird (WEINGES et al. 1968a).

Die auffallendste Eigenschaft der Proanthocyanidine, die auch für den Namen verantwortlich ist, ist ihre Hydrolyse zu den roten Anthocyanidinen beim Erwärmen mit Mineralsäuren in Gegenwart von Sauerstoff (Kap. 2.4.5). Rötliche Verfärbungen z. B. beim Kochen werden darauf zurückgeführt (PORTER et al. 1986; BELITZ et al. 2008). Die Nomenklatur der Proanthocyanidine orientiert sich jeweils an dem durch die säurekatalytische Spaltung entstehenden Anthocyanidin. Das Präfix „Pro“ weist dabei auf die farblose Vorstufe von Anthocyanidinen hin. So werden Proanthocyanidine, die aus (+)-Catechin und oder (-)-Epicatechin-Einheiten aufgebaut sind, Procyanidine genannt. Sie sind die am häufigsten in der Natur vorkommenden Verbindungen dieser Klasse. Prodelphinidine bestehen aus (+)-Gallocatechin- und (-)-Epigallocatechin-Einheiten und Propelargonidine aus

(+)-Afzelechin- und (-)-Epiafzelechin-Einheiten. Die Art und Richtung der Verknüpfung der Flavan-3-ole wird analog der IUPAC-Nomenklatur (International Union of Pure and Applied Chemistry) für Polysaccharide angegeben. Dabei werden die Verknüpfungsstellen (4-8 und 4-6), die Bindungsrichtungen (in Form von Pfeilen: \rightarrow) und die Orientierung der Interflavanoidbindung am chiralen C4-Atom (α , β) in Klammern gesetzt.

Proanthocyanidine des B-Typs:

Beim B-Typ sind die Diastereomerenpaare, wie (+)-Catechin und (-)-Epicatechin, durch kovalente Bindungen verknüpft, die durch interflavanoide Kondensation (enzymatisch oder chemisch) gebildet werden, so dass dimere, oligomere bzw. polymere Proanthocyanidine entstehen. Dabei ist die C4-Position der oberen Einheit entweder mit der C6- oder der C8-Position der unteren Einheit verknüpft. Diese Verknüpfung ergibt an der C4-Position der oberen Einheit ein neues Stereozentrum. Die C4-C6 verknüpften Procyanidine kommen in der Natur seltener vor als ihre C4-C8 verknüpften Isomere, ca. im Verhältnis 1:10, da das nukleophile Zentrum an der C6-Position sterisch schlechter zugänglich ist (HEMINGWAY et al. 1982; VIVIERS et al. 1983; BALDÉ et al. 1991a). Die C4-C8 und C4-C6 verknüpften dimeren Procyanidine mit denselben Flavan-3-ol-Einheiten wie z. B. B1 und B7 sind Strukturisomere (THOMPSON et al. 1972). In der Natur liegen nur 3,4-*trans* konfigurierte Proanthocyanidine vor. Hierbei ist die Position 4 zur Hydroxylgruppe am C3-Atom *trans*-ständig (FLETCHER et al. 1977). Aufgrund der unterschiedlichen Verknüpfungsmöglichkeiten und in Anbetracht der Kombinationsmöglichkeiten der verschiedenen Flavan-3-ole mit zunehmendem Polymerisationsgrad wird deutlich, wie komplex diese Stoffklasse ist. Die Anzahl der möglichen Isomere steigt exponentiell mit dem Polymerisationsgrad. Allein für das dimere Procyanidin des B-Typs gibt es acht verschiedene Isomere (Abb. 2.7). Für das trimere Procyanidin bestehend aus (+)-Catechin- und/oder (-)-Epicatechin-Einheiten gibt es bereits 32 verschiedene Isomere.