Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Kenntnisstand ... 1

1.1. Polyphenole ... 3

1.1.1. Allgemeine Klassifizierung der Polyphenole ... 3

1.1.1.1. Anthocyanidine ... 3

1.1.1.2. Flavan-3-ole (Catechine) ... 4

1.1.1.3. Proanthocyanidine (kondensierte Tannine) ... 5

1.1.1.3.1. Allgemeines ... 5

1.1.1.3.2. Procyanidine (B-Typ Procyanidine) ... 6

1.1.1.3.3. A-Typ Procyanidine ... 8

1.1.1.3.4. Reaktionen von Proanthocyanidinen im sauren Milieu ... 9

1.1.1.3.5. Epimerisierungen ... 10

1.1.1.4. Vorkommen von Proanthocyanidinen ... 10

1.1.1.4.1. Vorkommen von Proanthocyanidinen in Nahrungsmitteln ... 10

1.1.1.4.2. Vorkommen von Proanthocyanidinen in ausgewählten Naturstoffen ... 12

1.1.1.4.2.1. Traubenkernextrakte (*Vitis vinifera*) ... 12

1.1.1.4.2.2. Kakaobohnen (*Theobroma cacao*) ... 12

1.1.1.4.2.3. Kastanien (*Aesculus hippocastanum*) ... 12

1.1.2. Biosynthese von Polyphenolen ... 13

1.1.2.1. Biosynthese der Flavanoide ... 13

1.1.2.2. Biosynthese der Proanthocyanidine ... 13

1.1.3. Physiologische Wirkungen von Proanthocyanidinen ... 16

1.1.3.1. Gesundheitsfördernde Wirkungen von Proanthocyanidinen ... 16

1.1.3.2. Bioverfügbarkeit von Proanthocyanidinen ... 16

1.2. Countercurrent Chromatography (CCC) ... 18

1.2.1. Einleitung ... 18

1.2.2. Historische Entwicklung ... 18

1.2.3. Prinzipien der Gegenstromverteilungschromatographie ... 24

1.2.3.1. Hydrostatisches Prinzip ... 24

1.2.3.2. Hydrodynamisches Prinzip ... 25

1.2.4. High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC) ... 27

1.2.4.1. Planetares Prinzip ... 27

1.2.4.2. Trennleistung der HSCCC ... 30

1.2.4.3. Aufbau einer CCC-Anlage ... 31

1.2.4.4. Auswahl der Fließmittelsysteme ... 32

1.2.4.5. Berechnung der Retention an stationärer Phase (R_s) und des Verteilungskoeffizienten (K) ... 35

1.2.5. Low Speed Rotary Countercurrent Chromatography (LSRCCC) ... 37

1.2.5.1. Das Prinzip der LSRCCC ... 38

1.2.6. Cross-Axis CCC ... 40

1.2.7. Spiral-Disk für die HSCCC ... 41

1.2.8. Weitere Anwendungsmethoden in der modernen CCC ... 42

1.2.8.1. pH-Zone Refining CCC ... 42

1.2.8.2. Kopplung der CCC mit der Massenspektrometrie ... 43

1.2.8.3. Chirale Trennungen ... 43
1.2.8.4. Centrifugal Precipitation Chromatography ... 43
1.2.8.5. Multidimensionale CCC ... 44
1.2.9. Anwendung der Gegenstromverteilungschromatographie in der Naturstoff- und Lebensmittelchemie ... 45

1.3. Zielsetzung ... 51

2. Ergebnisse und Diskussion ... 52

2.1. Analytik von Procyanidinen ... 52
2.1.1. Allgemeines ... 52
2.1.2. Reversed Phase HPLC ... 52
2.1.3. Normalphasen-HPLC ... 53
2.1.4. Dünnschichtchromatographie ... 54
2.1.5. Strukturaussagen über die Messung des UV-Spektrums ... 55
2.1.6. HPLC-MS-Kopplung ... 55
2.1.7. Phloroglucinolyse ... 56
2.1.7.1. Mechanismus und Prinzip der Phloroglucinolyse ... 56
2.1.7.2. Isolierung von Standardsubstanzen mittels HSCCC ... 57
2.1.7.3. Nebenprodukte der Phloroglucinolyse ... 59
2.1.7.4. Aussagekraft der Phloroglucinolyse ... 61
2.1.7.5. Phloroglucinolyse von kommerziellen Traubenkernextrakten ... 62
2.1.8. Zusammenfassung der Analytik von Procyanidinen ... 62

2.2. Isolierung von Procyanidinen ... 63
2.2.1. Isolierungsstrategie ... 63
2.2.2. Pentanfällung ... 64
2.2.3. Isolierung von Procyanidinen mittels HSCCC ... 67
2.2.3.1. Probenaufarbeitung durch Pentanfällung ... 67
2.2.3.2. Polyamid Fraktionierung ... 70
2.2.3.3. Isolierung von Procyanidinen (B-2, B-5 und C-1) aus Kakaosamen ... 72
2.2.3.4. Isolierung von A-Typ Procyanidinen aus Kastanienschalen ... 74
2.2.3.5. Fazit ... 75
2.2.4. Präparative Darstellung von Procyanidinen ... 76
2.2.4.1. Reaktionsmechanismus ... 76
2.2.4.2. Optimierung der Synthesebedingungen ... 77
2.2.4.3. Isolierung der Reaktionsprodukte der Semisynthese mittels HSCCC ... 86
2.2.4.3.1. Semisynthese mit Catechin ... 86
2.2.4.3.2. Semisynthese mit Epicatechin ... 90
2.2.4.3.3. Semisynthese mit Catechin und anschließender Pentanfällung ... 92
2.2.4.3.4. Semisynthese mit Epicatechin und anschließender Pentanfällung ... 94
2.2.4.4. Zusammenfassung der Procyanidin Semisynthese ... 95

2.3. Strukturaufklärung der isolierten Procyanidine ... 97
2.3.1. LC-MS-Untersuchungen ... 97
2.3.1.1. Procyanidine vom B-Typ ... 97
2.3.1.2. Procyanidine vom A-Typ ... 98
2.3.1.3. Flavan-3-ol-Phloroglucinol-Addukte ... 100
2.3.1.4. Nebenprodukte der Phloroglucinolyse ... 103

2.3.1.4.1. Chalcan-Phloroglucinol [1,3-Di-(2,4,6-trihydroxyphenyl)-1-(3,4-dihydroxy-phenyl)-propan-2-ol] ... 103
2.3.1.4.2. Dimere Procyanidin-Phloroglucinol-Addukte ... 105
2.3.1.5. Die Chalcan-Flavan-3-ol-Dimere (Gambiriine) ... 107
2.3.1.6. Die Chalcan-Flavan-3-ol-Phloroglucinol-Addukte ... 109
2.3.2. NMR-Spektroskopie ... 111
2.3.3. Phloroglucinolyse ... 117
2.3.4. Circulardichroismus (CD) ... 118
2.3.5. Strukturaufklärung isolierter Verbindungen ... 119
2.3.5.1. Charakterisierung der Flavan-3-ol-Phloroglucinol-Addukte ... 119
2.3.5.2. Charakterisierung der Nebenprodukte der Phloroglucinolyse ... 121
2.3.5.3. Charakterisierung der Procyanidine ... 122
2.3.5.3.1. Procyanidin B1 (13) ... 122
2.3.5.3.2. Procyanidin B7 (21) ... 123
2.3.5.3.3. Procyanidin B2 (15) ... 125
2.3.5.3.4. Procyanidin B5 (20) ... 125
2.3.5.3.5. Procyanidin B3 (16) ... 127
2.3.5.3.6. Procyanidin B4 (17) ... 128
2.3.5.3.7. Procyanidin C1 (14) ... 130
2.3.5.3.8. EC-4β→6-EC-4β→8-EC (32) ... 130
2.3.5.3.9. EC-4β→6-EC-4β→6-C (36) ... 130
2.3.5.3.10. Cinnamtannin A_2 (18) ... 131
2.3.5.3.11. (-)Epicatechin-3O-gallat-4β→8-(-)epicatechin (ECG-4β→8-EC) (33) ... 131
2.3.5.3.12. (-)Epicatechin-4β→8-(-)epicatechin-3O-gallat (EC-4β→8-ECG) (28) ... 131
2.3.5.3.13. (-)Epicatechin-4β→8-(-)epicatechin-3O-gallat (EC-4β→8-ECG) (28) und (-)Epicatechin-3O-gallat-4β→6-(-)epicatechin (ECG-4β→6-EC) (27) ... 132
2.3.5.3.14. (-)Epicatechin-3O-gallat-4β→6-(+)catechin (ECG-4β→8-C) (19) ... 132
2.3.5.3.15. (-)Epicatechin-2β→O7, 4β→8-(-)catechin (Procyanidin A4) (26) ... 133
2.3.5.3.16. (-)Epicatechin-2β→O7, 4β→8-(-)epicatechin (Procyanidin A2) (25) ... 133
2.3.5.4. Charakterisierung der Chalcan-Flavan-3-ol-Dimere (Gambiriine) ... 133

2.4. Entwicklung neuer leistungsstarker präparativer CCC-Prototypen ... 137
2.4.1. Low Speed Rotary Countercurrent Chromatography (LSRCCC) ... 137
2.4.1.1. Der LSRCCC-Prototyp ... 137
2.4.1.2. Durchführung von Retentionsstudien ... 137
2.4.1.2.1. Fließmittelsystemvalidierung zur Isolierung von Procyanidinen ... 138
2.4.1.2.2. Fraktionierung von Procyanidinen ... 140
2.4.1.3. Testung weiterer Fließmittelsysteme ... 142
2.4.1.4. Hydrodynamisches Fließverhalten in der LSRCCC ... 146
2.4.1.5. Applikationen der LSRCCC ... 149
2.4.1.5.1. Isolierung von Cyanidin-3-glucosid aus Brombeersaftkonzentrat ... 149
2.4.1.5.2. Isolierung von Anthocyanen aus Schwarzem Johannisbeer-Konzentrat ... 150
2.4.1.5.3. Fraktionierung von Anthocyanen aus Blutorange ... 151
2.4.1.5.4. Fraktionierung von Anthocyanen der roten Süßkartoffel ... 154
2.4.1.6. Schlussfolgerung zur Anwendung der LSRCCC ... 155
2.4.2. Spiral-Coil Assembly für die LSRCCC ... 156
2.4.2.1. Einführung ... 156
2.4.2.2. Entwicklung eines ersten Prototypen ... 156

2.4.2.2.1. Der Spiral-Effekt ... 157
2.4.2.2.2. Elutionsmodi ... 157
2.4.2.3. Retentionsstudien ... 158
2.4.2.3.1. Fließmittelsystem $CHCl_3$/ Wasser (1: 1, v/v) ... 158
2.4.2.3.2. Fließmittelsystem *n*-Butanol/ Essigsäure/ Wasser (4:1:5, v/v/v) ... 159
2.4.2.4. Untersuchung der Trennbedingungen ... 160
2.4.2.4.1. $CHCl_3$-Wasser-System ... 160
2.4.2.4.2. Butanol-Essigsäure-Wasser-System ... 162
2.4.2.4.3. Schlussfolgerungen zur Entwicklung der Spiral-Coil LSRCCC ... 163
2.4.2.5. Neuer Prototyp mit variablem Volumen ... 164
2.4.2.5.1. Fließmittelsystem TBME/ *n*-Butanol/ Wasser (4,3:0,7:5, v/v/v) ... 164
2.4.2.5.2. Einfluss der Fließgeschwindigkeit ... 165
2.4.2.6. Fazit ... 167

3. Zusammenfassung ... 168

4. Material und Methoden ... 171

4.1. Proben und Chemikalien ... 171
4.1.1. Probenmaterial ... 171
4.1.2. Chemikalien ... 171

4.2. Präparative Methoden ... 172
4.2.1. Extraktionen ... 172
4.2.1.1. Herstellung des Kakaoextraktes ... 172
4.2.1.2. Herstellung des Kastanienschalenextraktes ... 173
4.2.2. Pentanfällung ... 173
4.2.2.1. Fraktionierte Pentanfällung des Traubenkernextraktes ... 173
4.2.2.2. Fällung des Traubenkernextraktes (Präparativer Maßstab) ... 173
4.2.2.3. Fällung des Kastanienextraktes ... 173
4.2.2.4. Fällung des Kakaoextraktes ... 173
4.2.2.5. Fällung des Reaktionsgemisches der Semisynthese (HSCCC) ... 174
4.2.2.6. Fällung des Reaktionsgemisches der Semisynthese (LSRCCC) ... 174
4.2.3. Polyamid-Festphasenextraktion ... 174
4.2.4. Phloroglucinolyse zur Isolierung der Spaltprodukte ... 174
4.2.5. Semisynthetische Darstellung von Procyanidinen ... 174
4.2.5.1. Optimierung der Reaktionsbedingungen ... 174
4.2.5.2. Reaktionsansatz zur Isolierung von Procyanidinen mittels CCC ... 175
4.2.6. Amberlite® XAD-7 Festphasenextraktion ... 176
4.2.7. High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC) ... 176
4.2.8. Low Speed Rotary Countercurrent Chromatography (LSRCCC) ... 180
4.2.9. Spiral-Coil LSRCCC ... 182
4.2.9.1. Erster Prototyp ... 182
4.2.9.2. Zweiter Prototyp ... 182
4.2.10. HPLC ... 182

4.3. Analytische Methoden ... 183
4.3.1. Dünnschichtchromatographie ... 183
4.3.1.1. Dünnschichtchromatographie für die Analytik von Procyanidinen ... 183
4.3.1.2. Dünnschichtchromatographie für die Analytik von Anthocyanen ... 183

4.3.2. HPLC ... 183
4.3.2.1. System I ... 183
4.3.2.2. System II (Normal Phasen HPLC) ... 183
4.3.2.3. HPLC-MS ... 184
4.3.2.4. HPLC Methoden ... 184
4.3.3. Phloroglucinolyse ... 185
4.3.3.1. Phloroglucinolyse zur Analyse von procyanidinhaltigen Extrakten ... 185
4.3.3.2. Phloroglucinolyse zur Strukturaufklärung isolierter Verbindungen ... 185
4.3.4. NMR ... 185
4.3.5. Circulardichroismus ... 185
4.3.6. Bestimmung der Verteilungskoeffizienten von Procyanidinen ... 185
4.3.7. Physikochemische Eigenschaften der Fließmittelsysteme ... 186
4.3.7.1. Bestimmung der Dichte ... 186
4.3.7.2. Bestimmung der Viskosität ... 186
4.3.7.3. Bestimmung der Grenzflächenspannung ... 186

5. Literatur ... 187

6. Anhang ... 195

6.1. Zusammenfassung aller charakterisierten Verbindungen ... 195

6.2. Retentionsstudien ... 211
6.2.1. FS-XI: Chloroform/ Wasser (1: 1, v/v) ... 211
6.2.2. FS-XII: Hexan/ Methanol (2: 1, v/v) ... 212
6.2.3. FS-XIII: Hexan/ Ethylacetat/ Methanol/ Wasser (1: 1: 1: 1, v/v/v/v) ... 212
6.2.4. FS-XIV: Hexan/ Ethylacetat/ Methanol/ Wasser (2: 5: 2: 5, v/v/v/v) ... 213
6.2.5. FS-XV: Hexan/ Ethylacetat/ Methanol/ Wasser (1: 5: 1: 5, v/v/v/v) ... 213
6.2.6. FS-III: Hexan/ Ethylacetat/ Methanol/ Wasser (1: 10: 1: 10, v/v/v/v) ... 214
6.2.7. FS-V: Ethylacetat/ 2-Propanol/ Wasser (20: 1: 20, v/v/v) ... 214
6.2.8. FS-VI: Ethylacetat/ *n*-Butanol/ Wasser (14: 1: 15, v/v/v) ... 215
6.2.9. FS-X: TBME/ *n*-Butanol/ Wasser (4,3: 0,7: 5, v/v/v) ... 215
6.2.10. FS-XVI: TBME/ *n*-Butanol/ MeCN/ Wasser (3: 1: 1: 5, v/v/v/v) ... 216
6.2.11. FS-XVII: TBME/ *n*-Butanol/ MeCN/ Wasser (2: 2: 1: 5, v/v/v/v) ... 216
6.2.12. FS-XVIII: TBME/ *n*-Butanol/ MeCN/ Wasser (1: 3: 1: 5, v/v/v/v) ... 217
6.2.13. FS-XIX: *n*-Butanol/ Essigsäure/ Wasser (4: 1: 5, v/v/v) ... 217