

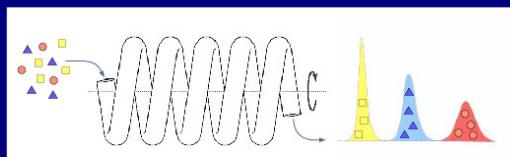


Nils Köhler (Autor)

Entwicklung und Anwendung leistungsfähiger präparativer gegenstromverteilungschromatographischer Trenntechniken

Nils Köhler

**Entwicklung und Anwendung
leistungsfähiger
präparativer
gegenstromverteilungs-
chromatographischer
Trenntechniken**



Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/2081>

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>

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.	Traubengerkerextrakte (<i>Vitis vinifera</i>)	12
1.1.1.4.2.2.	Kakaobohnen (<i>Theobroma cacao</i>).....	12
1.1.1.4.2.3.	Kastanien (<i>Aesculus hippocastanum</i>).....	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 Traubengerkerextrakten.....	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.	Chalcon-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 Chalcon-Flavan-3-ol-Dimere (Gambiriine)	107
2.3.1.6.	Die Chalcon-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 \rightarrow 6-EC- 4β \rightarrow 8-EC (32)	130
2.3.5.3.9.	EC- 4β \rightarrow 6-EC- 4β \rightarrow 6-C (36).....	130
2.3.5.3.10.	Cinnamtannin A ₂ (18)	131
2.3.5.3.11.	(-)Epicatechin-3O-gallat- 4β \rightarrow 8-(-)epicatechin (ECG- 4β \rightarrow 8-EC) (33).....	131
2.3.5.3.12.	(-)Epicatechin- 4β \rightarrow 8-(-)epicatechin-3O-gallat (EC- 4β \rightarrow 8-ECG) (28).....	131
2.3.5.3.13.	(-)Epicatechin- 4β \rightarrow 8-(-)epicatechin-3O-gallat (EC- 4β \rightarrow 8-ECG) (28) und (-)Epicatechin-3O-gallat- 4β \rightarrow 6-(-)epicatechin (ECG- 4β \rightarrow 6-EC) (27).....	132
2.3.5.3.14.	(-)Epicatechin-3O-gallat- 4β \rightarrow 6-(+)catechin (ECG- 4β \rightarrow 8-C) (19)	132
2.3.5.3.15.	(-)Epicatechin- 2β \rightarrow O ₇ , 4β \rightarrow 8-(-)catechin (Procyanidin A4) (26).....	133
2.3.5.3.16.	(-)Epicatechin- 2β \rightarrow O ₇ , 4β \rightarrow 8-(-)epicatechin (Procyanidin A2) (25).....	133
2.3.5.4.	Charakterisierung der Chalcon-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 Anthocyhanen aus Schwarzem Johannisbeer-Konzentrat.....	150
2.4.1.5.3.	Fraktionierung von Anthocyhanen aus Blutorange	151
2.4.1.5.4.	Fraktionierung von Anthocyhanen 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 <i>n</i> -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 LSRC <small>C</small> CC	163
2.4.2.5.	Neuer Prototyp mit variablem Volumen	164
2.4.2.5.1.	Fließmittelsystem TBME/ <i>n</i> -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 Traubengerkerextraktes	173
4.2.2.2.	Fällung des Traubengerkerextraktes (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 (HSC <small>C</small> CC)	174
4.2.2.6.	Fällung des Reaktionsgemisches der Semisynthese (LSRC <small>C</small> CC)	174
4.2.3.	Polyamid-Festphasenextraktion	174
4.2.4.	Phloroglucinolyse zur Isolierung der Spaltprodukte	174
4.2.5.	Semisynthetische Darstellung von Procyanoindinen	174
4.2.5.1.	Optimierung der Reaktionsbedingungen	174
4.2.5.2.	Reaktionsansatz zur Isolierung von Procyanoindinen mittels CCC	175
4.2.6.	Amberlite® XAD-7 Festphasenextraktion	176
4.2.7.	High-Speed Countercurrent Chromatography (HSC <small>C</small> CC)	176
4.2.8.	Low Speed Rotary Countercurrent Chromatography (LSRC <small>C</small> CC)	180
4.2.9.	Spiral-Coil LSRC <small>C</small> CC	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 Procyanoindinen	183
4.3.1.2.	Dünnschichtchromatographie für die Analytik von Anthocyanaen	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 procyanolinhaltigen 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 Procyanolinen	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/ <i>n</i> -Butanol/ Wasser (14: 1: 15, v/v/v)	215
6.2.9.	FS-X: TBME/ <i>n</i> -Butanol/ Wasser (4,3: 0,7: 5, v/v/v)	215
6.2.10.	FS-XVI: TBME/ <i>n</i> -Butanol/ MeCN/ Wasser (3: 1: 1: 5, v/v/v/v)	216
6.2.11.	FS-XVII: TBME/ <i>n</i> -Butanol/ MeCN/ Wasser (2: 2: 1: 5, v/v/v/v)	216
6.2.12.	FS-XVIII: TBME/ <i>n</i> -Butanol/ MeCN/ Wasser (1: 3: 1: 5, v/v/v/v)	217
6.2.13.	FS-XIX: <i>n</i> -Butanol/ Essigsäure/ Wasser (4: 1: 5, v/v/v).....	217