

# 1. Einleitung und Kenntnisstand

Eine ausgewogene Ernährung, die reich an Obst und Gemüse ist, kann vorbeugend gegen viele Volkskrankheiten, wie z. B. Krebs oder koronare Herz-Kreislauf-Erkrankungen wirken. Dies wird zumindest in vielen epidemiologischen Studien dargestellt, die eine inverse Korrelation zwischen der täglichen Zufuhr von potentiellen Wirksubstanzen mit der Nahrung und dem Auftreten von Krankheiten nachweisen. Die Ergebnisse dieser Studien stehen oft im Einklang mit in-vitro Versuchen und Tierexperimenten. Sie belegen eine anticancerogene Wirkung (Dickdarm-, Brust- und Hautkrebs) von polyphenolischen Inhaltsstoffen. Diese ist unter anderem auf eine antioxidative Schutzwirkung vor Lipidoxidationen durch Abfangen von Superoxidanionen und Hydroxylradikalen sowie vor DNA-Schädigungen zurückzuführen.

Das wohl bekannteste Ergebnis einer epidemiologischen Studie spiegelt sich im „French Paradoxon“ wieder (LEGER ET AL., 1979; RENAUD und DE LORGERIL, 1992). Trotz einer relativ fettreichen Ernährung tritt in der französischen Bevölkerung paradoxerweise eine statistisch niedrige Zahl an koronaren Herz-Kreislauf-Erkrankungen auf. Die Ursache sehen Wissenschaftler in dem hohen Konsum an Rotwein, dessen Inhaltsstoffe ein präventives Potential aufweisen und gegen koronare Herz-Kreislauf-Erkrankungen vorbeugend wirken (RENAUD und DE LORGERIL, 1992). Im Mittelpunkt stehen die zahlreich enthaltenen Polyphenole, z. B. die für die Farbgebung der Weine verantwortlichen Anthocyane, phenolische Säuren oder aber die Proanthocyanidine (Tannine) (KANNER ET AL., 1994; TEISSEDRE ET AL., 1996; SHRIKHANDE, 2000).

Weininhaltsstoffe (Polyphenole) sind aber nur ein Beispiel. Auch von anderen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen (Glucosinolaten, Carotinoiden und Chlorophyllen) soll generell ein positiver Beitrag für die Gesundheit des Menschen ausgehen. Diese Verbindungen sind ubiquitär in unseren Nahrungsmitteln vertreten, insbesondere in Obst und Gemüse. Moderne Essgewohnheiten stehen oft im Widerspruch mit der Empfehlung einer ausgewogenen Ernährung. Oft stehen Fast-Food- und Tiefkühlkostgerichte auf dem Speiseplan. Parallel dazu ist der Trend feststellbar, Defizite im Speiseplan durch sogenannte „Nahrungsergänzungsmittel“ auszugleichen. Die Nahrungsmittel- und Nahrungsergänzungsmittelindustrie setzt schon seit geraumer Zeit auf solche Produkte, die enorme Zuwachsraten aufweisen. Durch Zusatz von Naturstoffextrakten wie Traubenkern- oder Kakaoextrakte sollen die ernährungsphysiologischen Eigenschaften diverser Produkte aufgewertet werden. Eine zunehmende Zahl von Naturstoffpräparaten, die polyphenolreiche Extrakte enthalten, überschwemmen derzeit den Markt. Oft geschieht dies allerdings ohne genaue Hintergrundinformationen über die Wirkungsmechanismen und Metabolisierungswege der jeweiligen Wirksubstanzen im menschlichen Körper. Der Beweis einer Wirksamkeit und die genaue physiologische Bewertung kann nur über Bioverfügbarkeits- und weitere in-vivo Studien erbracht werden. Diese aufwendigen Untersuchungen (Fäzes-, Blut- und Urinuntersuchungen) erfordern aber die Bereitstellung großer Mengen der Zielverbindungen, die den Probanden verabreicht werden. Da Standardverbindungen kommerziell meist nicht zur Verfügung stehen, müssen die Verbindungen im präparativen Maßstab aus Nahrungsmitteln isoliert werden.

## 2

Die vorliegende Arbeit zeigt die Anwendung der Gegenstromverteilungschromatographie zur präparativen Isolierung von Naturstoffen, um auf diesem Wege eine Bereitstellung dieser Wirksubstanzen zu ermöglichen.

## 1.1. Polyphenole

### 1.1.1. Allgemeine Klassifizierung der Polyphenole

Polyphenole sind eine weit verbreitete Stoffklasse des sekundären Pflanzenstoffwechsels. In vielen Obst- und Gemüsesorten tragen sie zur Farbe und zum Geschmack bei (BELITZ ET AL., 2001). Ihre genaue Funktion ist Gegenstand andauernder Untersuchungen. Man geht heute davon aus, dass sie als Gerüstsubstanzen, zum Schutz gegen Pilz- und Bakterieninfektionen (Fraßschutz) und als Signalsubstanzen dienen sowie in die Regelung des Pflanzenhormonhaushaltes eingreifen (MATERN und GRIMMIG, 1993; RHODES, 1998). Die Einteilung der Polyphenole kann generell in die drei Gruppen erfolgen, die sich aus ihrem Grundkörper ableiten:

- Niedermolekulare Phenole
- Phenolcarbonsäuren und ihre Derivate (Nichtflavonoide)
- Flavonoide und ihre Derivate

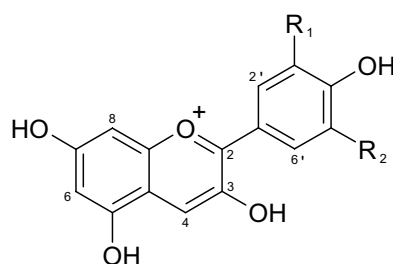
Die Phenolcarbonsäuren und ihre Derivate lassen sich aufgrund ihres molekularen Aufbaus in Hydroxybenzoesäuren ( $C_6-C_1$  Grundkörper) und in Hydroxyzimtsäuren ( $C_6-C_3$  Grundkörper) unterteilen (RECHNER, 2000).

Die Flavonoide umfassen die umfangreichste Gruppe der Polyphenole und haben die größte Bedeutung in Pflanzen. Sie sind charakteristisch für das  $C_6-C_3-C_6$  Grundgerüst, den Flavan-Grundkörper. Es werden die folgenden Untergruppen unterschieden: Flavan-3-ole, Flavan-3,4-diole, Flavone, Flavonole, Flavanonone, Dihydrochalcone, Proanthocyanidine und Anthocyanidine.

#### 1.1.1.1. Anthocyanidine

Die Anthocyanidine kommen im Pflanzenreich nur glykosidisch gebunden vor und haben eine hervorgehobene Bedeutung, da sie für die Farbgebung von Früchten und Blättern verantwortlich sind. Einige Anthocyanidine sind in Abb. 1-1 dargestellt. Die Glykosidierung erfolgt hauptsächlich in der Position 3. Es kommen aber auch Glykosidierungen in Position 5 und 7 vor (CLIFFORD, 2000; WATZEL und BRIVIBA, 2002).

Als Zuckerbausteine kommen neben den Monosacchariden (Glucose, Galactose, Arabinose oder Rhamnose) auch Disaccharide (Rutinose, Sambubiose und Sophorose) vor. Weiterhin gibt es die Möglichkeit der Acylierung von Anthocyanen durch *p*-Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure, Essigsäure oder Malonsäure (HILLEBRAND, 2004).



|              | R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub>   |
|--------------|------------------|------------------|
| Cyanidin     | OH               | H                |
| Delphinidin  | OH               | OH               |
| Pelargonidin | H                | H                |
| Malvidin     | OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> |
| Peonidin     | OCH <sub>3</sub> | H                |
| Petunidin    | OH               | OCH <sub>3</sub> |

Abb. 1-1 Grundstruktur der wichtigsten Anthocyanidine

Charakteristisch für die Anthocyane ist ihre pH-Wert abhängige Färbung. Je nach pH-Wert verschiebt sich das Gleichgewicht der vorliegenden Moleküle (Abb. 1-2). Im stark sauren Milieu (pH Wert  $\leq 1$ ) herrscht das rotgefärbte Flavylumkation vor. Bei pH-Werten zwischen 4 und 5 überwiegt die farblose Carbinolbase. Im alkalischen pH-Bereich (7-8) liegt die Anhydrobase (tiefblaue Färbung) vor, die durch Ringöffnung in das gelblich gefärbte Chalcon übergehen kann (BELITZ ET AL., 2001).

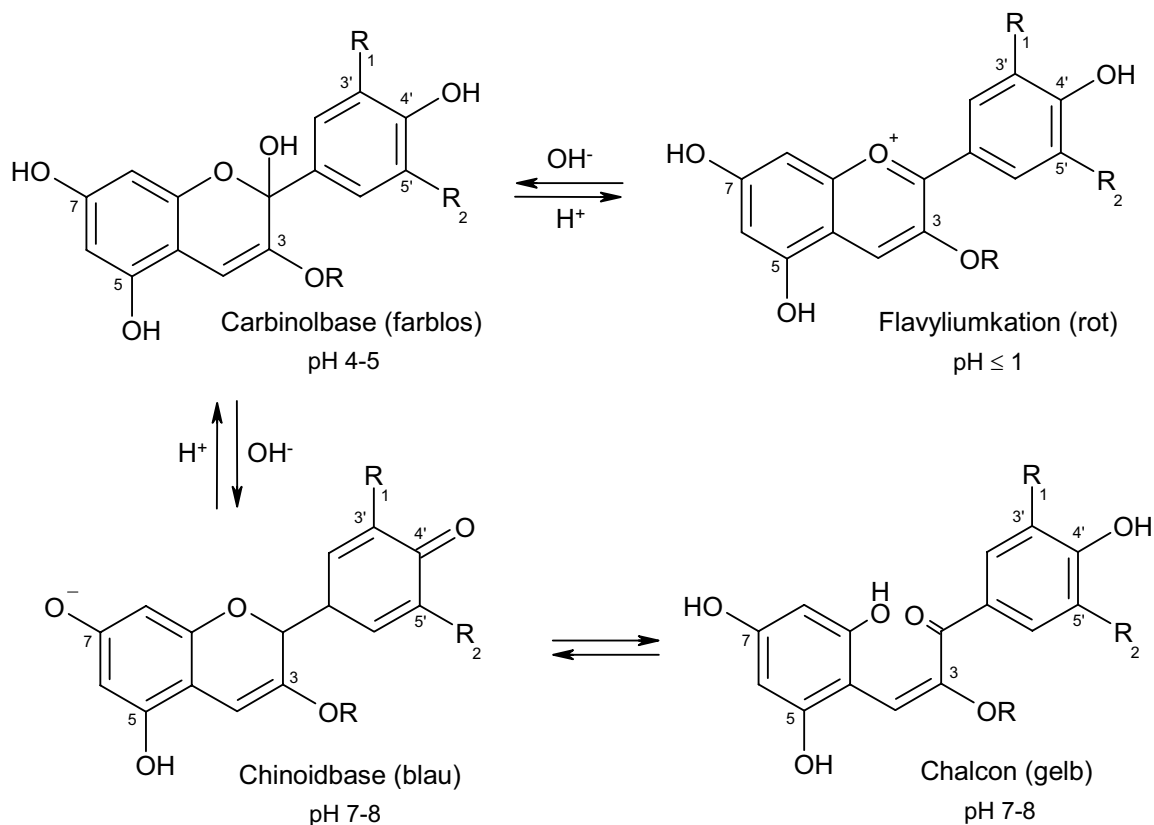


Abb. 1-2 Anthocyanidin-Strukturen in Abhängigkeit vom pH-Wert.

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

Catechine sind Flavan-3-ole, die sich in ihrem Hydroxylierungsmuster am A- und B-Ring unterscheiden (Abb. 1-3).

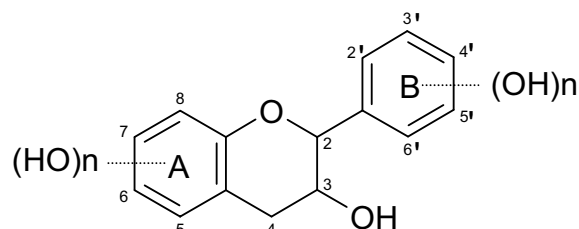
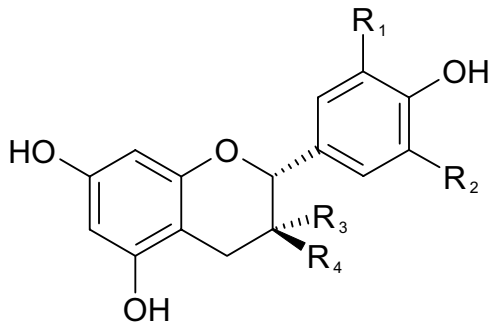


Abb. 1-3 Flavan-3-ol Grundgerüst.

Die wichtigsten Vertreter sind das (+)Catechin, (-)Epicatechin, (+)Gallocatechin, (-)Epigallocatechin, (+)Afzelechin und (-)Epiafzelechin sowie ihre 3-O-Gallate (Abb. 1-4).



| Flavan-3-ol       | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> | R <sub>4</sub> |
|-------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Catechin          | OH             | H              | H              | OH             |
| Epicatechin       | OH             | H              | OH             | H              |
| Epicatechingallat | OH             | H              | OG             | H              |
| Gallocatechin     | OH             | OH             | H              | OH             |
| Epigallocatechin  | OH             | OH             | OH             | H              |
| Afzelechin        | H              | H              | H              | OH             |
| Epiafzelechin     | H              | H              | OH             | H              |

G: Gallat

**Abb. 1-4 Strukturen der wichtigsten Flavan-3-ole (Catechine).**

### 1.1.1.3. Proanthocyanidine (kondensierte Tannine)

#### 1.1.1.3.1. Allgemeines

Die Proanthocyanidine sind kondensierte Tannine, die auch unter dem Begriff Gerbstoffe bekannt sind. Sie wurden schon früher zum Gerben von Fellen ausgenutzt, wobei es zu einer Präzipitationsreaktion aus Collagen und hydroxylgruppenreichen Proanthocyanidinen kommt (PORTER, 1989; CHARLTON ET AL., 2002).

Unter Erhitzen mit Säure und in Gegenwart von Sauerstoff setzen sie farbige Verbindungen, die Anthocyanidine, frei, was unter anderem zum qualitativen Nachweis (Bate-Smith-Assay) genutzt werden kann (PORTER ET AL., 1986). Diese Eigenschaft begründet auch die Bezeichnung der Stoffklasse, deren Verbindungen ursprünglich als Prekursoren der Anthocyanidine angesehen wurden und dementsprechend mit dem Präfix pro ausgestattet wurden. Ursprünglich wurden sie auch als Leucoanthocyanidine bezeichnet (leuco = farblos). Heute versteht man darunter die Flavan-3,4-diole (HASLAM, 1998).

Sensorisch tragen die Proanthocyanidine wesentlich zum Geschmack in Früchten, Gemüse und Getränken (z. B. Tee, Bier oder Wein) bei (BROSSAUD ET AL., 2001; VIDAL ET AL., 2004). Genauer genommen handelt es sich dabei nicht um eine Geschmackswahrnehmung, sondern um einen Sinneseindruck, der ebenfalls durch Präzipitationsreaktionen mit Proteinen in der Mundschleimhaut (DE FREITAS und MATEUS, 2001) bzw. durch starke Wechselwirkungen mit Proteinen herbeigeführt wird (PELEG ET AL., 1999).

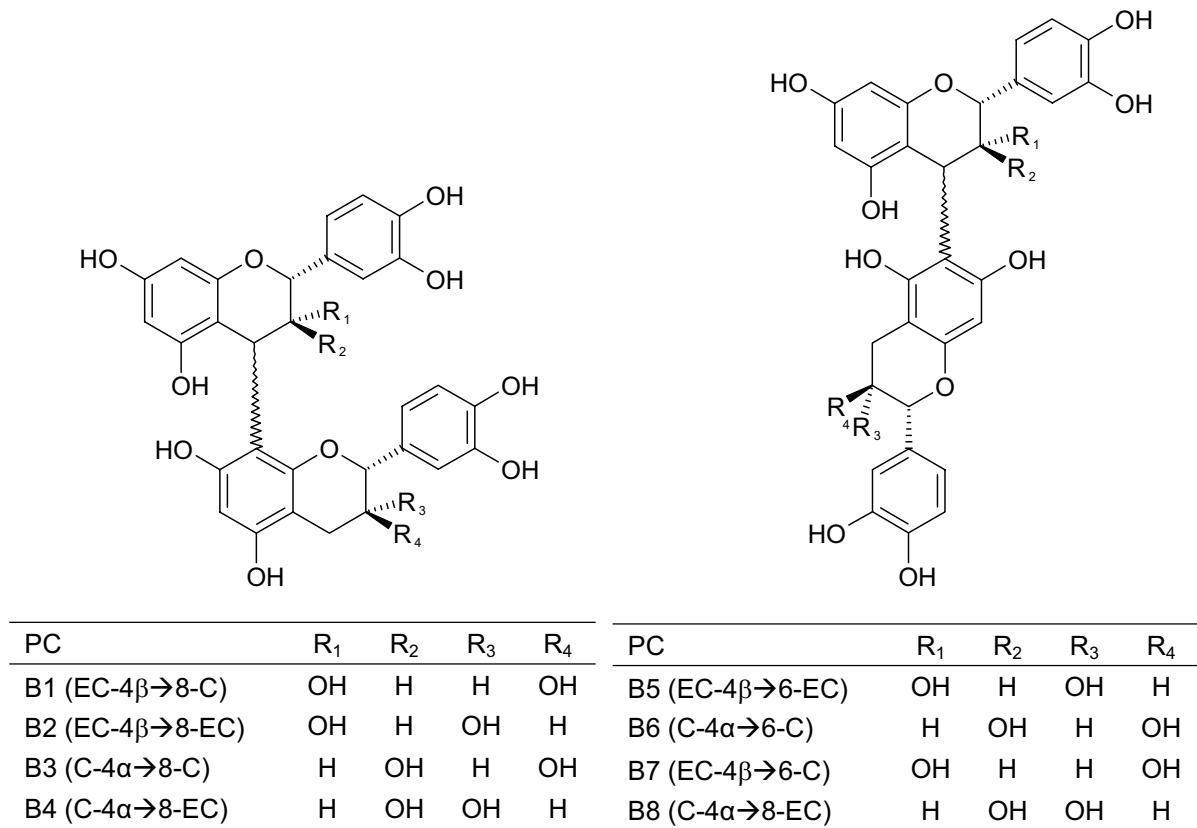
Nicht zu verwechseln mit den Proanthocyanidinen sind die hydrolysierbaren Tannine, die sich aus Estern der Gallussäure (Gallotannine) und der Hexahydroxydiphensäure (Ellagitannine) zusammensetzen.

Die Proanthocyanidine sind aus Flavan-3-ol-Bausteinen aufgebaut und bilden oligomere und polymere Verbindungen. Eine Unterteilung erfolgt nach dem Hydroxylisierungsmuster am A- und B-Ring (Abb. 1-3). Die weiteste Verbreitung finden die Procyanidine (3, 5, 7, 3', 4' Pentahydroxyflavan-3-ole), die z. B. in Traubenkernextrakten oder Kakaobohnen vorkommen. Ebenfalls häufig vertreten sind die Prodelphinidine (3, 5, 7, 3', 4', 5' Hexahydroxyflavan-3-ole) und Propelargonidine (3, 5, 7, 4' Tetrahydroxyflavan-3-ole). Zu nennen sind aber auch exotischere Proanthocyanidin-Arten, wie die Profisetidine (3, 7, 3', 4' Tetrahydroxyflavan-3-ole), Prorobinetine (3, 7, 3', 4', 5' Pentahydroxyflavan-3-ole), Proteracanine (3, 7, 8, 4' Tetrahydroxyflavan-3-ole) und Promelacacanine (3, 7, 8, 3', 4' Penta-

hydroxyflavan-3-ole). Die Procassinidine (7, 4' Dihydroxyflavane) und Probutinidine (7,3',4' Trihydroxyflavane), sind ebenfalls zu nennen, fallen aber etwas aus der Reihe, da es sich bei ihnen um hydroxylierte Flavanderivate handelt (STEYNBERG ET AL., 1995; COETZEE ET AL., 1999; COETZEE ET AL., 2000; MATHISEN ET AL., 2002; FERREIRA und SLADE, 2002; BENNIE ET AL., 2002a; BENNIE ET AL., 2002b).

#### **1.1.1.3.2. Procyanidine (B-Typ Procyanidine)**

Die Procyanidine stellen selbst als Unterklasse der Proanthocyanidine eine sehr komplexe Stoffgruppe dar, da durch unterschiedliche Stereochemie eine Vielzahl von Verbindungen resultiert, die sich mit steigendem Polymerisationsgrad exponentiell erhöht. Grund hierfür sind die Diastereomerenpaare Catechin (C) und Epicatechin (EC), die durch interflavanoide Kondensationen kovalente Bindungen ausbilden und die Procyanidine vom B-Typus bilden, dem am weitesten verbreiteten Procyanidin-Typ. Ausgehend von der C4-Position der oberen Einheit kann entweder die C8- oder C6-Position der unteren Flavan-3-ol-Einheit überbrückt werden. Es soll zwar die C4→C8 Verknüpfung gegenüber der C4→C6 Verknüpfung überwiegen (PORTER, 1989), allerdings wird sehr schnell ersichtlich, dass unter Berücksichtigung aller Kombinationsmöglichkeiten der Flavan-3-ole sowie der unterschiedlichen Verknüpfungen eine komplexe Stoffklasse mit vielen isomeren Verbindungen vorliegt. Für die dimeren Verbindungen liegen bereits acht Stereoisomere vor (Abb. 1-5). Obwohl an Position 4 der Obereinheit nach Kondensation ein weiteres Stereozentrum entsteht, erhöht sich die Isomerenanzahl nicht. Es wird beschrieben, dass in der Natur nur die 3,4-*trans* konfigurierten Procyanidine vorliegen. Man geht dabei von einer sterisch kontrollierten Kondensation aus (HASLAM, 1998).



**Abb. 1-5 Strukturen der B-Typ Procyanidin Dimere B1 bis B8**

Ebenfalls beschrieben ist die Möglichkeit einer Galloylierung des Epicatechins am C3-Kohlenstoffatom (RICARDO DA SILVA ET AL., 1991; PRIEUR ET AL., 1994; LABARBE ET AL., 1999), was zusätzlich zu einer Zunahme der Isomerenzahl führt. Nach der folgenden allgemeinen Formel lassen sich die theoretisch möglichen Isomere eines bestimmten Polymerisationsgrades berechnen:

$$I = 2 \cdot 4^{n-1} \quad \text{Anzahl der Isomere (I) für den Polymerisationsgrad } n \text{ (unter Berücksichtigung der Bausteine C und EC)}$$

$$I = 3 \cdot 6^{n-1} \quad \text{Anzahl der Isomere (I) für den Polymerisationsgrad } n \text{ (unter Berücksichtigung der Bausteine C, EC und ECG)}$$

Ein hypothetischer Ausschnitt aus einem Procyanidinpolymer ist in Abb. 1-6 dargestellt. In der Natur kommen die Isomere in sehr unterschiedlichen Verhältnissen vor. Meist liegen einige Isomere in höheren Konzentrationen vor, was einfach durch die zur Kondensation zur Verfügung stehenden Monomere bedingt ist. In vielen Fällen dominiert z. B. das Dimer B2. Genauere Rückschlüsse über die Procyanidinzusammensetzung werden in Abschnitt 1.1.2 (Biosynthese) erläutert.

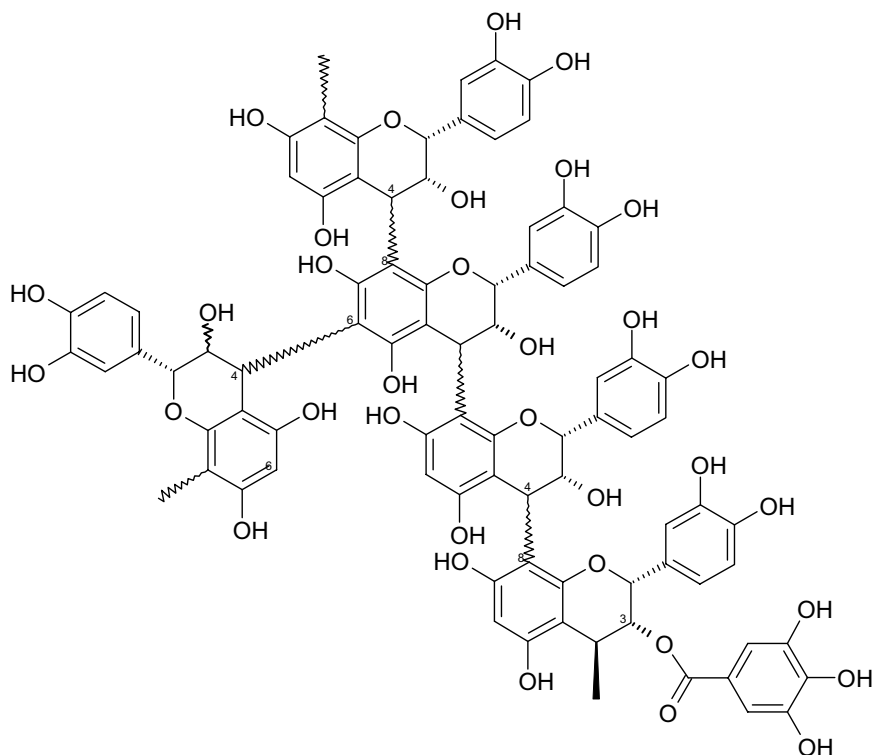


Abb. 1-6 Ausschnitt eines Procyanidinpolymers

#### 1.1.1.3.3. A-Typ Procyanidine

Eine weitere Gruppe der Procyanidine bilden die Procyanidine vom A-Typ, die zusätzlich zur interflavanoiden Bindung eine Etherbrücke zwischen dem C2-Atom des oberen Flavan-3-ols und dem Sauerstoffatom in Position 7 der Untereinheit aufweisen (Abb. 1-7). Bekannte Vertreter sind das Procyanidin A2, das z. B. in Samenschalen der Kastanie (*Aesculus hyppocastanum*) vorkommt und das A1, das in Cranberries (*Vaccinium vitis idaea*) und der Betelnuss gefunden wurde. Weiterhin kommen A-Typ Procyanidine in Erdnüssen (*Arachis hypogaea*), Schlehen (*Prunus spinosa*) und Avokadokernen (*Persea gratissima*) vor (JACQUES ET AL., 1973 und 1974; NONAKA ET AL., 1987; KOLODZIEJ ET AL., 1991; LOU ET AL., 1999; GU ET AL., 2003).

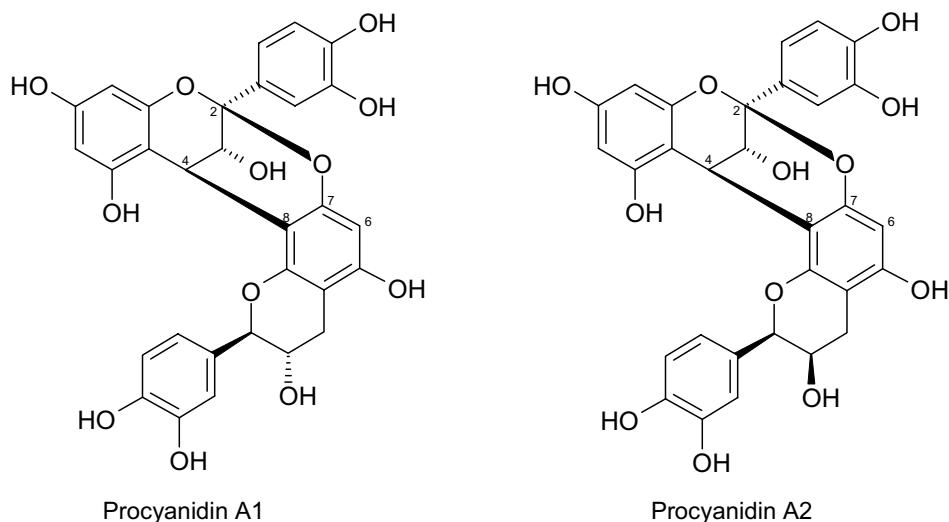


Abb. 1-7 Struktur der Procyanidine des A-Typs.

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

Der eingehend beschriebene qualitative Nachweis von Proanthocyanidinen beruht auf einer charakteristischen Reaktion unter sauren Bedingungen (Abb. 1-8). Die interflavanoide Bindung der Proanthocyanidine wird unter diesen Bedingungen gespalten, wobei für die oberen Monomerbausteine nach Abspaltung ein Gleichgewicht zwischen Carbokation und Chinonmethid vorliegt. Die terminale Einheit der Proanthocyanidine bleibt dabei unverändert (PORTER, 1989). Dieses Verhalten kann zur Strukturanalyse von Proanthocyanidinen genutzt werden. Bei thermischer Umsetzung unter Anwesenheit von Sauerstoff reagieren die Intermediate zu Anthocyanidinen und können anhand der roten Farbentwicklung im Porter- bzw. Bate-Smith-Assay für qualitative und semiquantitative Nachweise genutzt werden. Detailliertere Informationen erhält man nach Reaktion mit Nukleophilen (z. B. Phloroglucinol oder Benzylmercaptan), die zu charakteristischen Addukten führt. Die Stereochemie der Flavan-3-ole bleibt dabei erhalten. Hierdurch erhält man zwei wesentliche Aussagen, und zwar über den mittleren Polymerisationsgrad sowie die Gesamtflavan-3-ol-Zusammensetzung der Proanthocyanidine (MATTHEWS ET AL., 1997; GUYOT ET AL., 2001; KENNEDY und JONES, 2001).

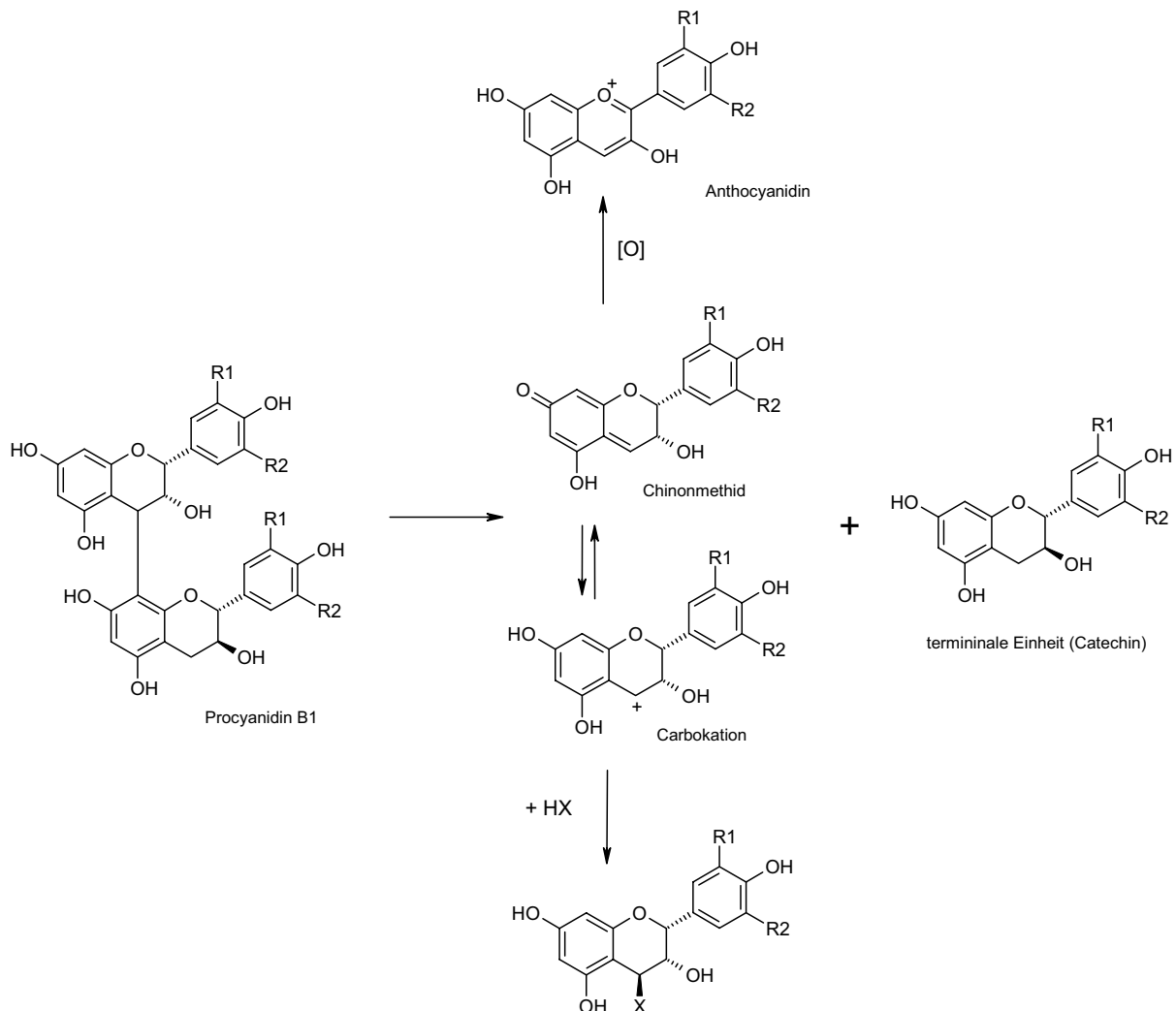


Abb. 1-8 Säurekatalysierte Degradationsreaktionen von Proanthocyanidinen unter Anwesenheit von Sauerstoff bzw. Nukleophilen.