

Heike Scharnhop

Anwendung der
High-Speed Countercurrent Chromatography
zur Fraktionierung und Isolierung von
Kaffeinhaltsstoffen

 Cuvillier Verlag Göttingen



**Anwendung der
High-Speed Countercurrent Chromatography
zur Fraktionierung und Isolierung von
Kaffeinhaltsstoffen**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Heike Scharnhop
aus Uelzen

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2007

Zugl.: (TU) Braunschweig, Univ., Diss., 2007

978-3-86727-417-3

1. Referent:	Prof. Dr. P. Winterhalter
2. Referent:	apl. Prof. Dr. U. H. Engelhardt
eingereicht am:	18.06.2007
mündliche Prüfung (Disputation) am:	29.08.2007
Druckjahr 2007	

Dissertation an der Technischen Universität Braunschweig, Fakultät für Lebenswissenschaften

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2007

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2007

Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86727-417-3

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Wünnecke, H., Winterhalter, P.; Isolation of the diterpene 16-O-Methylcafestol from *Coffea Canephora* var. *Robusta* by High Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC), (Poster) 20th International Conference on Coffee Science, Bangalore, Indien, 2004

Wünnecke, H., Winterhalter, P.; Isolierung von 16-O-Methylcafestol aus *Coffea Canephora* var. *Robusta* mittels High Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC), (Poster) 33. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Bonn, 2004, Abstract veröffentlicht in: Lebensmittelchemie, 58, 150, 2004

Wünnecke, H., Bonnländer, B., Winterhalter, P.; Charakterisierung verschiedener Dichlorigensäuren in geröstetem Kaffee, (Poster) 35. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Dresden, 2006, Abstract veröffentlicht in: Lebensmittelchemie 61, 79, 2007

Bonnländer, B., Wünnecke, H., Winterhalter, P.; Rapid and sensitive detection of Robusta traces in coffee blends of raw and roasted coffee, (Poster) 35. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Dresden, 2006, Abstract veröffentlicht in: Lebensmittelchemie, 61, 79, 2007

Wünnecke, H., Winterhalter, P.; Kaffeequalität - Differenzierung von Robusta und Arabica Kaffee, (Vortrag) Braunschweiger Kaffeekolloquium „Kaffee im Spiegel der Wissenschaft“ im Rahmen des bundesweiten „Tag des Kaffees“, Landesmuseum Braunschweig, 2006

DANKSAGUNG

An dieser Stelle sei all denen gedankt, die mich bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben. Einige möchte ich dennoch persönlich nennen:

Zunächst möchte ich Herrn Professor Winterhalter für die Bereitstellung des Themas und den mir gewährten Freiraum bei der Umsetzung meiner Ideen danken.

Ein Dank geht auch an Herrn Professor Engelhardt für die Übernahme des Koreferates und an Herrn Professor Selmar und Herrn Professor Cammenga für ihr Mitwirken in der Prüfungskommission.

Für die Betreuung während meiner Zeit bei Illycaffè in Trieste, die vielen Anregungen und die stetige Diskussionsbereitschaft bedanke ich mich bei Dr. Bernd Bonnländer. Außerdem danke ich Illycaffè für die finanzielle Unterstützung.

Frau Balcke möchte ich besonders danken für die vielen Korrekturen im Laufe der Jahre. Ihren Adleraugen entgehen keine Zahlendreher oder falsche Literaturzitate.

Mit ihrer Diplomarbeit hat Stephanie Gröll einen großen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet. Vielen Dank dafür.

Ein Großteil der Arbeit beruht auf sensorischen Daten. Das dazu notwendige Sensorikpanel musste dafür einige Male ihr Können unter Beweis stellen. Ein großes Dankeschön geht daher an Susanne Baldermann, Peter Quast, Micheal Rentzsch, Melanie Stürtz, Stefanie Stoll, Andrea Wilkens und Jens Witte. Ohne Eure Hilfe wäre es nicht gegangen.

Das nette Klima am Institut hat auch in den frustrierensten Momenten dazu beigetragen, dass ich mich immer wohl gefühlt habe. Besonders hervorzuheben sind dabei Peter als langjähriger Laborpartner, Steffi, Jens und Andrea als langjährige Tee-, Kaffee- Sport- usw. -partner. Danke für die Ablenkung.

Meiner Familie danke ich für das entgegengebrachte Vertrauen und die Freiheiten, die sie mir gewährt hat.

Der letzte Dank geht an Helge. Dein Verständnis und Rückhalt helfen mir jeden Tag.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

br	breit
BuOH	Butanol
Caf.tryp	Caffeoyltryptophan
CCC	Countercurrent Chromatography (Gegenstromverteilungschromatographie)
CDQA	Caffeoyl-dimethoxycinnamoylchinasäure
CFQA	Caffeoyl-feruloylchinasäure
Cum.tryp	<i>p</i> -Cumaroyltryptophan
CuQA	<i>p</i> -Cumaroylchinasäureester
CuQL	<i>p</i> -Cumaroylchinasäurelacton
CQA	Caffeoylchinasäureester
CQL	Caffeoylchinasäurelacton
d	Dublett
DAB	Deutsches Arzneibuch
DAD	Diode Array Detector
DC	Dünnschichtchromatographie
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
diCQA	Dicaffeoylchinasäureester
diCQL	Dicaffeoylchinasäurelacton
DIN	Deutsche Industrienorm
DQA	Dimethoxycinnamoylchinasäure
δ	chemische Verschiebung [ppm]
ES	Erkennungsschwelle
ESI	Elektrospray-Ionisation
FDQA	Feruloyl-dimethoxycinnamoylchinasäure
FQA	Feruloylchinasäureester
FQL	Feruloylchinasäurelacton
FS	Fettsäure
GC	Gaschromatographie
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSCCC	High-Speed Countercurrent Chromatography
(M)Hz	(Mega)Hertz
Ile	Isoleucin
i.Tr.	in der Trockenmasse
J	Kopplungskonstante [Hz]

lb	englisches Pfund (Kaffeestandardgewicht)
LC	Liquid Chromatography
Leu	Leucin
LFBG	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch
λ	Wellenlänge [nm]
m	Multipllett
M	molare Masse
max	maximal
min	Minuten
MS	Massenspektrometrie
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
n.b.	nicht bestimmt
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernresonanzspektroskopie)
NN	Normal null
n.n.	nicht nachweisbar
16-OMC	16-O-Methylcafestol
p.A.	per Analysis
Phe	Phenylalanin
Pro	Prolin
R_f	retention factor (charakteristische Größe bei der Dünnschichtchromatographie)
RS	Reizschwelle
R_t	retention time (charakteristische Größe bei der HPLC)
s	Singulett
t	Tripllett
tBME	tert.-Butylmethylether
TFA	Trifluoressigsäure
TM	Trockenmasse
TS	Trockensubstanz
U	Umdrehungen
UV	Ultraviolett
Val	Valin

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	KAFFEEPFLANZE UND IHR ANBAU	1
1.2	IM URSPRUNGSLAND: ERNTE UND AUFBEREITUNG	3
1.2.1	Nasse Aufbereitung	4
1.2.2	Trockene Aufbereitung	4
1.2.3	Weitere Aufbereitungsmethoden	5
1.3	IM VERBRAUCHERLAND: RÖSTUNG, BEHANDLUNG UND KONSUM	5
1.3.1	Röstung	5
1.3.2	Veränderungen während der Röstung	7
1.3.2.1	Maillard-Reaktion	9
1.3.3	Behandlung von Röstkaffee	10
1.3.3.1	Entkoffeinierung	10
1.3.3.2	Löslicher Kaffee	11
1.3.3.3	Schonkaffee	12
1.4	AUSGEWÄHLTE ANALYTISCHE METHODEN ZUR TRENNUNG UND CHARAKTERISIERUNG VERSCHIEDENER KAFFEEFRAKTIONEN	12
1.4.1	Gegenstromverteilungschromatographie	12
1.4.2	LC-NMR/MS-Kopplung	15
1.5	ZIELSETZUNG	18
2	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	19
2.1	UNTERSUCHUNG UND ISOLIERUNG VON LIPIDBESTANDTEILEN AUS KAFFEE	19
2.1.1	Allgemeines	19
2.1.2	Diterpene	19
2.1.3	Isolierung von 16-O-Methylcafestol aus Robustakaffee	23
2.1.4	Isolierung weiterer Diterpene aus Arabikakaffee	31
2.1.4.1	Isolierung von Röstprodukten aus Arabikakaffee	37
2.1.4.2	Spektroskopische Analyse der isolierten Diterpene	39
2.1.4.2.1	Charakterisierung eines weiteren Diterpens aus grünem und geröstetem Kaffee	43
2.1.4.3	Charakterisierung weiterer Substanzen aus dem unverseifbaren Anteil	52
2.1.4.4	Isolierung von Carbonsäure-5-hydroxytryptamiden	55
2.1.4.5	Quantifizierung von Diterpenen und Carbonsäure-5-hydroxytryptamiden in ausgewählten Kaffeesorten	56
2.2	FRAKTIONIERUNG VON ESPRESSO IN BEZUG AUF BITTERKEIT	62
2.2.1	Allgemeines	62
2.2.2	Bitterkeit von Kaffeegetränken	64
2.2.3	Aufbau und Training eines Sensorikpanels	66
2.2.3.1	Messbarkeit von Geschmacksarten	68
2.2.4	Fraktionierung von Espresso	69
2.2.4.1	Spektrometrische Untersuchung getrennter Fraktionen (HSCCC E-I)	73

2.2.4.2	Sensorische Analyse getrennter Fraktionen (HSCCC E-I)	77
2.2.5	Gelchromatographische Trennung der HSCCC E-I Fraktionen E1 – E5	80
2.2.5.1	Gelchromatographische Trennung von Fraktion E1	80
2.2.5.2	Gelchromatographische Trennung von Fraktion E2	86
2.2.5.3	Gelchromatographische Trennung von Fraktion E3	87
2.2.5.4	Gelchromatographische Trennung von Fraktion E4	88
2.2.5.5	Gelchromatographische Trennung von Fraktion E5	89
2.2.6	Sensorische Analyse der erhaltenen Sephadex-Fraktionen	89
2.2.7	Fraktionierung der Fraktion Ec mittels HSCCC	92
2.2.7.1	Sensorische Analyse getrennter Fraktionen (HSCCC E-II)	97
2.2.8	Messung einer Espressoportion mittels LC-NMR/MS	101
2.3	VERTEILUNGSCROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG EINES EXTRAKTES AUS KAFFEEKIRSCHEN	104
2.3.1	Allgemeines	104
2.3.2	Fraktionierung eines Extraktes aus Kaffeekirschen	106
2.3.2.1	Untersuchung des Hexanrückstands der Kaffeekirschen	106
2.3.2.2	Untersuchung des XAD-7 Extrakts von Kaffeekirschen	107
3	ZUSAMMENFASSUNG	117
4	SUMMARY	119
5	MATERIAL UND METHODEN	120
5.1	KAFFEETROBEN	120
5.2	VERWENDETE CHEMIKALIEN UND LÖSUNGSMITTEL	120
5.3	GERÄTE UND PARAMETER	122
5.3.1	Gelchromatographie	122
5.3.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	122
5.3.3	LC-MS-System	123
5.3.3.1	Verwendete Säulen für die HPLC und LC-MS	123
5.3.3.2	Verwendete Fließmittelsysteme und Gradienten	123
5.3.4	High Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC)	125
5.3.4.1	Verwendete Fließmittelsysteme für die HSCCC	126
5.4	ANGEWANDTE METHODEN	127
5.4.1	Bestimmung der Trockenmasse	127
5.4.2	Verteilungsversuche für die HSCCC	127
5.4.3	Fraktionierung des Unverseifbaren Anteils von Kaffee	128
5.4.3.1	Isolierung des Unverseifbaren Anteils	128
5.4.3.1.1	Fettextraktion	128
5.4.3.1.2	Verseifung	128
5.4.3.1.3	Extraktion des Unverseifbaren Anteils	128
5.4.3.2	Dünnschichtchromatographie	128
5.4.4	Quantifizierung der Diterpene des Unverseifbaren Anteils	129
5.4.5	Isolierung der Carbonsäure-5-hydroxytryptamide	129
5.4.6	Quantifizierung der Carbonsäure-5-hydroxytryptamide	129

5.4.7	Fraktionierung von Espresso	129
5.4.7.1	Extraktion mit Wasser – Erster und zweiter Aufguss	129
5.4.7.2	Extraktion mit <i>n</i> -Butanol / Ethylacetat	130
5.4.7.3	Gelchromatographie isolierter Espresso-Fractionen	130
5.4.8	Sensorische Analysen	130
5.4.8.1	Panel-schulung	130
5.4.8.2	Erkennen der vier Grundgeschmacksarten	130
5.4.8.3	Bestimmung der Geschmacksempfindlichkeit	131
5.4.8.4	Triangel Test	131
5.4.9	Sensorische Analyse von isolierten Espresso-Fractionen	132
5.4.9.1	Geschmacksschwellenwerte	132
5.4.9.2	Farbaktivität	132
5.4.10	Fraktionierung des XAD-7 Extraktes von Kaffeekirschen	133
5.4.10.1	Extraktion mit Hexan	133
5.4.10.2	Extraktion mit Methanol / Essigsäure (19/1, v/v)	133
5.4.10.3	Adsorptionschromatographie an Amberlite® XAD-7	133
5.5	PHYSIKALISCH-CHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG ISOLIERTER REINSUBSTANZEN	134
5.5.1	LC-NMR/MS	139
6	LITERATUR	141
7	ANHANG	150
7.1	QUANTIFIZIERUNG	150
7.1.1	Trockenmassen verschiedener Kaffeesorten	150
7.1.2	Kalibriergraden der Diterpen-Quantifizierung	150
7.1.3	Kalibriergraden der Carbonsäure-5-hydroxytryptamid-Quantifizierung	151
7.1.4	Quantifizierung der Diterpene	152
7.1.5	C-5-HT-Gehalte [mg/100g] und Röstverluste verschiedener Kaffeesorten	152
7.1.6	C-5-HT-Gehalte [mg/100g] im unbehandelten Pulver sowie im unverseifbaren Anteil verschiedener Kaffeesorten	153
7.2	ESPRESSO-FRAKTIONIERUNG	153
7.2.1	Sephadex Trennung der Fraktion E1	153
7.2.2	Sephadex Trennung der Fraktion E2	154
7.2.3	Sephadex-Trennung der Fraktion E3	154
7.2.4	Sephadex-Trennung der Fraktion E4	154
7.2.5	Sephadex-Trennung der Fraktion E5	155
7.3	TABELLARISCHE AUFSTELLUNG NICHT CHARAKTERISierter SUBSTANZEN	155
7.4	TABELLARISCHE AUFLISTUNG DURCHGEFÜHRTER CHROMATOGRAPHISCHER TRENNUNGEN	157

KAFFEE, m. franz. *café*, engl. *coffee*, nl. *koffij*, *koffi*, eins der letzten
Culturgeschenke des Orients an den Occident [...]

Deutsches Wörterbuch von Jacob Grimm und Wilhelm Grimm

1 EINLEITUNG

Coffea L. ist eine Gattung aus der Familie der *Rubiaceae* (Rötegewächse). Von den ca. 70 bekannten *Coffea*-Arten sind nur zwei von wirtschaftlicher Bedeutung: *Coffea arabica* liefert etwa zwei Drittel der Weltproduktion und *Coffea canephora* var *robusta* (kurz: Robusta) rund ein Drittel. Andere Arten wie z.B. *Coffea liberica* machen weniger als 1 % der weltweiten Produktion aus (MAIER, 1981; VON BRUCHHAUSEN ET AL., 1999). Die Heimat von *Coffea* L. ist Afrika (Äthiopien, Abessinien). Von dort aus kam er über Arabien und Konstantinopel nach Venedig und verbreitete sich trotz zahlreicher behördlicher Verbote und ärztlicher Warnungen seit Mitte des 17. Jahrhunderts über ganz Europa (BELITZ ET AL., 2001).

Unter dem Begriff Kaffee (Bohnenkaffee) versteht man die von der Fruchtschale vollständig und von der Samenschale (Silberhaut) soweit möglich befreiten, rohen oder gerösteten, ganzen oder zerkleinerten Samen der Kaffeepflanze, sowie auch das daraus bereitete Getränk.

1.1 KAFFEEPFLANZE UND IHR ANBAU

Als Strauch oder Baum kann die Kaffeepflanze je nach Art eine Höhe von 3 – 12 m erreichen. Zur Erleichterung der Ernte wird sie aber meist auf 2 m gestutzt. Der Kaffeebaum besitzt lederartige, immergrüne, kurzstielige, gegenständige Blätter. Die 1 – 2 cm langen weißen Blüten duften jasminartig. Aus ihnen entwickeln sich kirschenähnliche Steinfrüchte. Diese so genannten Kaffeekirschen (Abbildung 1) färben sich mit zunehmender Reife von grün über rot bis violett und enthalten normalerweise 2 Samen, die Kaffeebohnen. Sie liegen, mit ihren Innenseiten flach aneinander gepresst, im süßen, weißgelblichen Fruchtfleisch (Mesokarp, Pulpa). Charakteristisch ist die Furche an der flachen Seite der Bohne. Jeder Samen wird von einer dünnen, fest anhaftenden Schale, dem Silberhäutchen, geschützt. Beide Kaffeebohnen sind weiterhin von einer locker aufsitzenden, dünnen und blass gelben Hülle, der Pergamenthaut, umgeben (BELITZ ET AL., 2001; DEUTSCHER KAFFEEVERBAND, 2004).



Abbildung 1: Morphologische Zeichnung einer Kaffeepflanze (KÖHLER, 1890) und Aufbau einer Kaffeekirsche (DEUTSCHER KAFFEEVERBAND, 2004)

Der Anbau von Kaffee ist praktisch nur in den Tropen möglich, weil Kaffeepflanzen frostempfindlich sind. Am günstigsten sind mittlere Jahrestemperaturen zwischen 15 und 25° C. Temperaturen unter 11° C sind auf längere Zeit kritisch, nahe dem Gefrierpunkt wird die Pflanze dauerhaft geschädigt (MAIER, 1981). Arabica-Kaffees sind auch empfindlich gegenüber großer Hitze, zu viel Feuchtigkeit und Wind. Daher liegen die idealen Anbauggebiete in den Hochlagen ab 900 m über NN. Robusta-Sorten sind weniger anspruchsvoll in ihren Wachstumsbedingungen. Sie vertragen mehr Hitze und Feuchtigkeit, was sich auch in der Namensgebung widerspiegelt. Folgende Tabelle zeigt die Anbaubedingungen der beiden Sorten im Vergleich:

Tabelle 1: Anbaubedingungen im Vergleich

	Arabica	Robusta
Anbauggebiet	25° N - 23° S Breite 900-2000 m 15-24 °C	10° N - 10° S Breite 0-800 m 26 °C
Niederschlag pro Jahr	1500-2000 mm	2200-3000 mm
Reifung	6-8 Monate	9-11 Monate
Erntedauer	7-9 Monate	9-11 Monate
Anteile an Weltproduktion ¹	64 %	36 %
Erlös (2006)	114 US-cts/lb	68 US-cts/lb

¹(2006: 122 Millionen Säcke à 60 kg)

1.2 IM URSPRUNGSLAND: ERNTE UND AUFBEREITUNG

Die Ernte der Kaffeekirschen erfolgt meist per Hand. Nur auf den großen Kaffeefarmen in Brasilien machen die Geländeform und die Bepflanzung der Plantagen eine maschinelle Ernte möglich. Die Pflückung kann auf zwei verschiedene Weisen erfolgen und ist meist eng auf die vorgesehene Nacherntebehandlung abgestimmt. Für die nasse Aufbereitung, die vornehmlich bei Arabicasorten angewandt wird, werden ausschließlich die reifen Früchte von Hand gepflückt („picking“). Die zweite Methode ist das so genannte „stripping“. Hierbei werden die Kaffeefrüchte unabhängig ihres Reifegrades komplett vom Ast abgestreift. Diese inhomogene Mischung aus unreifen, reifen und überreifen Früchten kann zur Qualitätssteigerung noch weiter sortiert werden. Anschließend erfolgt eine trockene Aufbereitung der Kaffeekirschen. Diese Art der Ernte und Aufbereitung wird in erster Linie für Robusta und einige brasilianische und äthiopische Arabicakaffees durchgeführt. Abbildung 2 zeigt die nasse und die trockene Aufbereitung schematisch gegenübergestellt.

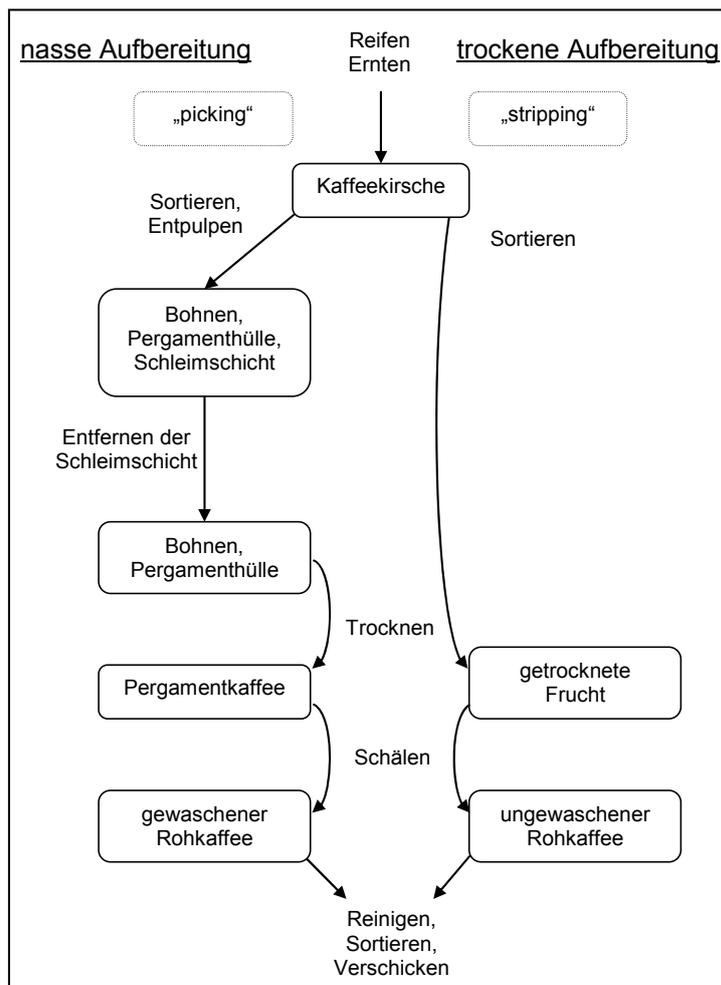


Abbildung 2: Technologie des Rohkaffees nach MAIER (1981)