

**Synthese, Charakterisierung und Nachweis glycosidischer  
steroidaler Strukturen**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II

Chemie, Physik und Mathematik

der Martin-Luther-Universität

Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Philipp Heinz

geb. am 03.10.1990 in Erfurt

Halle (Saale), 02.01.2019

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Marcus A. Glomb (Halle)
2. Gutachter: PD Dr. Volker Böhm (Jena)

Halle (Saale), 02. Januar 2019  
Datum der Verteidigung: 05. Juni 2019



## I. Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde vom Mai 2014 bis Dezember 2017 an der Martin-Luther-Universität am Institut für Chemie, Fachbereich Lebensmittelchemie und Umweltchemie im Arbeitskreis von Prof. Dr. Marcus A. Glomb angefertigt.

Das Projekt wurde gefördert durch die Stiftung Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz Ettlingen.

Die Veröffentlichung der Forschungsergebnisse erfolgte in einer internationalen Fachzeitschrift.

### **TEILE DIESER ARBEIT WURDE BEREITS VERÖFFENTLICHT:**

#### **Veröffentlichungen**

Heinz, P.; Glomb, M. A. Characterization and Quantitation of Steryl Glycosides in *Solanum melongena*, *J. Agric. Food Chem.*, **2018**66 (43), 11398-11406

#### **Posterbeiträge**

Heinz P. Glomb M. A.

Bestimmung neuartiger Sterylglycoside in *Solanum melongena* (Aubergine)  
Deutscher Lebensmittelchemikertag der GDCh, Würzburg, 25.-28.09.2017

## II. Danksagung

Im Vorfeld möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Marcus Glomb, der mir die Möglichkeit gab dieses Thema zu bearbeiten und jederzeit bereitwillig für anregende Diskussionen zur Verfügung stand.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Volker Böhm für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.

Bei der Stiftung Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz Ettlingen bedanke ich mich für die Finanzierung des Projektes, ohne die die Bearbeitung nicht möglich gewesen wäre.

Ich möchte allen Mitarbeitern des Arbeitskreises der Lebensmittelchemie danken für fachlichen Austausch und die gute Gespräche. Insbesondere gilt mein Dank den Oberassistenten Dr. Thomas Heymann und Dr. Christian Henning, die eine große Hilfe bei vielen fachlichen oder technischen Problemen waren und generell immer ein offenes Ohr bei Problemen jeglicher Art hatten. Speziell möchte ich auch der Feinmechanischen Werkstatt und Glasbläserei des Institutes für Chemie danken, welche mich vor allem bei technischen Problemen zu diversen Apparaturen mit Rat und Tat unterstützt hat.

Ein ganz besonderer Dank gilt meine Familie und meinen Freunden, die mich während der Promotionszeit vor allem Mental unterstützt haben. Ein besonderer Dank geht an Andreas Sawall, der mir eine private Anbaufläche für die Goldhaferproben zur Verfügung gestellt hat um einen ausreichenden Probenpool zu generieren.

**Vielen Dank!**

## INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung .....	1
2	Theoretischer Teil .....	3
2.1	Sterole – Struktur, Eigenschaften, Synthese, Funktion .....	3
2.1.1	Allgemeine Struktur und Nomenklatur .....	3
2.1.2	Biosynthese von Sterolen .....	4
2.1.3	Funktion freier Sterole .....	6
2.1.4	Sterole als Provitamine.....	7
2.1.4.1	Vitamin D - Biosynthese, Funktion und Eigenschaften .....	8
2.1.4.2	Vitamin D in Pflanzen .....	11
2.2	Glycosilierte steroidale Strukturen in Pflanzen .....	12
2.2.1	SGs in Pflanzen .....	12
2.2.1.1	Vielfalt und Struktur der SGs in Pflanzen .....	13
2.2.1.2	Synthese von SGs in Pflanzen .....	14
2.2.1.3	Eigenschaften und Funktion von SGs.....	16
2.2.1.4	Glycosilierte Vitamin D-Strukturen .....	17
2.2.2	Glycoalkaloide und Saponine.....	19
2.2.3	SGs und Vitamin D-Strukturen in ausgewählten Pflanzen .....	21
2.2.3.1	Trisetum flavescens (Goldhafer) .....	21
2.2.3.2	Solanum melongena (Aubergine) .....	22
2.2.3.3	Cucurbita pepo (Zucchini) .....	23
2.3	Analytik glycosidisch gebundener steroidaler Strukturen.....	23
2.3.1	Anreicherung und Isolierung aus pflanzlichen Proben .....	24
2.3.1.1	Extraktion aus Pflanzenmaterial .....	24
2.3.1.2	Präparative Säulenchromatographie (SC).....	24
2.3.1.3	Festphasenextraktion (solid phase extraction, SPE).....	25
2.3.1.4	Dünnschichtchromatographie (DC).....	25
2.3.1.5	MLCCC (Gegenstromverteilungschromatographie) .....	26
2.3.2	Hydrolyse glycosidisch gebundener Sterole .....	27
2.3.2.1	Saure Hydrolyse.....	27
2.3.2.2	Enzymatische Hydrolyse .....	28
2.3.3	Quantifizierungsmethoden steroidaler Strukturen .....	29
2.3.3.1	GC-Methoden .....	29
2.3.3.2	HPLC-Methoden.....	30
2.3.3.3	Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS).....	31
2.3.3.4	Analytik des Zuckeranteils .....	31
3	Zielstellung.....	33

4	Ergebnisse und Diskussion.....	34
4.1	Synthese glycosilierter steroidal Strukturen.....	34
4.1.1	Synthesestrategie mittels Koenigs-Knorr Reaktion .....	35
4.1.2	<i>in vitro</i> Synthese des Cholecalciferol (Vitamin D <sub>3</sub> )- $\beta$ -D-Glucopyranosid aus 7-Dehydrocholesterol mittels UV-Bestrahlung .....	39
4.1.2.1	UV-Bestrahlung des ac. 7-DHC-Glc .....	40
4.1.2.2	UV-Bestrahlung des 7-DHC-Glc.....	42
4.1.3	Verifizierung der synthetisierten SGs mittels GC-FID .....	44
4.2	Hydrolyse glycosilierter steroidal Strukturen.....	45
4.2.1	Saure Hydrolyse .....	45
4.2.2	Enzymatische Hydrolyse.....	48
4.3	Methodenentwicklung .....	50
4.3.1	Optimierung der Anreicherungsmethode glycosilierter steroidal Strukturen .....	50
4.3.1.1	Probennahme und –aufarbeitung .....	50
4.3.1.2	Probenextraktion.....	50
4.3.1.3	MLCCC (Gegenstromverteilungschromatographie) .....	51
4.3.1.4	Lichoprep RP-18 Chromatographie.....	53
4.3.2	Zusammenfassung der Anreicherungsmethode .....	54
4.3.3	Methodenentwicklung zur Bestimmung des Aglykons und der freien Zucker nach Hydrolyse glycosidisch gebundener steroidal Strukturen .....	55
4.3.3.1	Entwicklung und Optimierung einer GC-FID/MS Methode zur Bestimmung freier Sterole .....	55
4.3.4	Entwicklung und Optimierung einer LC-MS/MS-Methode für SGs.....	59
4.3.4.1	Optimierung der HPLC Methode .....	59
4.3.4.2	Optimierung der massenspektrometrischen Detektion.....	61
4.3.4.3	Säulenrekonstitution .....	63
4.3.4.4	Entwicklung einer Quantifizierungsmethode für SGs .....	64
4.3.4.5	Nachweisgrenze/Bestimmungsgrenze .....	64
4.4	Vitamin D-Strukturen <i>Trisetum flavescenz</i> (Goldhafer) .....	65
4.4.1	Anreicherung glycosilierter Vitamin D-Strukturen.....	65
4.4.2	Quantifizierung freier Vitamin D-Strukturen.....	68
4.4.3	Ergebnisse der Identifizierung von Vitamin D-Strukturen .....	69
4.5	Glycosilierte steroidale Strukturen in pflanzlichen Proben.....	70
4.5.1	glycosilierte steroidale Strukturen in <i>Solanum melongena</i> (Aubergine) .....	70
4.5.1.1	Quantifizierung bekannter und neuartiger SGs in <i>Solanum melongena</i> (Aubergine).....	71

4.5.1.2	Identifizierung und strukturelle Aufklärung neuartiger SGs in <i>Solanum melongena</i> (Aubergine) .....	74
4.5.1.3	Glycosilierte Vitamin D-Strukturen in <i>Solanum melongena</i> (Aubergine) .....	77
4.5.1.4	Zusammenfassung neuartiger glycosilierter steroidaler Strukturen in <i>Solanum melongena</i> (Aubergine) .....	80
4.5.1.5	Freie Vitamin D-Strukturen .....	82
4.5.2	Glycosilierte steroidale Strukturen in <i>Trisetum flavescens</i> (Goldhafer) .....	82
4.5.3	Glycosilierte steroidale Strukturen in <i>Cucurbita pepo</i> (Zucchini).....	84
4.5.3.1	Freie Vitamin D-Strukturen .....	85
5	Zusammenfassung .....	86
6	Experimenteller Teil.....	90
6.1	Chemikalien und Materialien .....	90
6.1.1	Chemikalien .....	90
6.1.2	Laufmittel und Lösungen .....	91
6.1.2.1	Standard-Lösungen .....	91
6.1.2.2	DC-Laufmittel.....	92
6.1.2.3	Pufferlösungen .....	92
6.1.2.4	Weitere Lösungen .....	92
6.1.3	Geräte .....	93
6.1.4	sonstige Geräte und Materialien.....	94
6.2	Synthese glycosilierter steroidaler Strukturen .....	95
6.2.1	Synthese der Ausgangsstoffe zur Koenigs-Knorr Synthese.....	95
6.2.1.1	Silberoxid.....	95
6.2.1.2	2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranosylbromid ( $\alpha$ -Acetobromglucose) <sup>161,162</sup> .....	95
6.2.1.3	2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-galactopyranosylbromid ( $\alpha$ -Acetobromglactose) <sup>161,162</sup> .....	96
6.2.1.4	$\alpha$ -D-Glucopyranosylbromid, 4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-Glucopyranosyl)-, 2,3,6-Triacetat ( $\alpha$ -D-Cellobiosylbromid Heptaacetat) <sup>163</sup> ..	96
6.2.2	Cholesterol- $\beta$ -D-Glucopyranosid.....	97
6.2.3	Sterol- $\beta$ -D-Glucopyranoside.....	97
6.2.4	Sterol- $\beta$ -D-Galactopyranoside .....	98
6.2.5	Sterol-4-O- $\beta$ -D-Glucopyranosyl- $\beta$ -D-Glucopyranoside (Sterol- $\beta$ -D-Cellobioside).....	98
6.2.6	7-Dehydrocholesterol- $\beta$ -D-Glucopyranosid .....	99
6.2.7	Cholecalciferol- $\beta$ -D-Glucopyranosid (Vitamin D <sub>3</sub> - $\beta$ -D-Glucopyranosid).....	100
6.3	Methoden.....	100
6.3.1	Bestimmung freier und glycosidisch gebundener steroidaler Strukturen .....	100
6.3.1.1	Probenmaterial.....	100

6.3.1.2	Probenvorbereitung.....	100
6.3.1.3	Probenaufarbeitung.....	101
6.3.1.4	Qualifizierungsmethoden.....	104
6.3.1.5	Quantifizierung.....	105
6.4	Bestrahlungsexperimente der glycosilierten steroidalen Strukturen.....	106
6.4.1	Bestrahlung mittels CAMAG UV-Lampe 4 (8W).....	106
6.4.2	Bestrahlung mittels Narva UVS 125 Niederdruck Quecksilberdampfampe...	106
7	Literaturverzeichnis.....	107
8	Abbildungsverzeichnis.....	115
9	Tabellenverzeichnis.....	117
10	Abkürzungsverzeichnis.....	119
11	Anhang.....	123
11.1	Charakterisierung der synthetisierten glycosilierten steroidalen Strukturen.....	123
11.1.1	Chol-Glc.....	123
11.1.1.1	<sup>1</sup> H-NMR-Daten.....	123
11.1.1.2	<sup>13</sup> C-NMR-Daten.....	123
11.1.2	Sterol-Glcs.....	124
11.1.2.1	<sup>1</sup> H-NMR-Daten.....	124
11.1.2.2	<sup>13</sup> C-NMR-Daten.....	124
11.1.3	Sterol-Gals.....	125
11.1.3.1	<sup>1</sup> H-NMR-Daten.....	125
11.1.3.2	<sup>13</sup> C-NMR-Daten.....	126
11.1.4	Sterol-Cellos.....	126
11.1.4.1	<sup>1</sup> H-NMR-Daten.....	127
11.1.4.2	<sup>13</sup> C-NMR-Daten.....	127
11.1.5	7-DHC-Glc.....	128
11.1.5.1	<sup>1</sup> H-NMR-Daten.....	128
11.1.5.2	<sup>13</sup> C-NMR-Daten.....	129
11.1.6	D <sub>3</sub> -Glc.....	129
11.1.6.1	<sup>1</sup> H-NMR-Daten.....	129
11.1.6.2	<sup>13</sup> C-NMR-Daten.....	130
11.1.7	Hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS-Spektrometrie).....	131
11.2	Wellenlängenspektrum der NARVA UVS 125 W Quecksilberdampfampe.....	131
11.3	HPLC-UV Chromatogramm ausgewählter freier und glycosidisch gebundener Vitamin D-Strukturen.....	132
11.4	HPLC-DAD Chromatogramm der UV-Spur bei 202 nm ausgewählter SGs.....	132

11.5	Chromatographische Methoden.....	133
11.5.1	GC-FID-Methode zur Analytik freier Sterole.....	133
11.5.2	GC-MS-Methode zur Analytik freier Sterole.....	133
11.5.3	HPLC-UV/DAD-Identifizierungsmethode freier Sterole .....	134
11.5.4	HPLC-UV/DAD-Identifizierungsmethode glycosidisch gebundener steroidaler Strukturen .....	134
11.5.5	HPLC-UV/DAD-Anreicherungsmethode steroidaler Strukturen .....	134
11.5.6	LC-MS/MS-Identifizierungsmethode glycosidisch gebundener steroidaler Strukturen .....	135
11.5.6.1	MS/MS-Parameter .....	135
11.5.6.2	MS/MS-Übergänge der derivatisierten D-Vitamere.....	136
11.5.7	LC-MS/MS-Identifizierungsmethode für freie Vitamin D-Strukturen .....	137
11.5.7.1	PTAD-Derivatisierung.....	137
11.5.7.2	MS/MS-Parameter .....	137
11.5.7.3	LC-MS/MS-Identifizierungsmethode für Vitamin D-Strukturen .....	138
11.5.8	HPLC-FLD-Identifizierungsmethode freier Zucker .....	138
11.5.9	Anreicherungsmethode mittels MLCCC.....	139
11.5.10	Bestimmung von freiem Vitamin D in Lebensmitteln mittels LC-MS/MS .....	139
11.5.10.1	Lösungen.....	139
11.5.10.2	Probenvorbereitung.....	140
11.5.10.3	Probenaufarbeitung .....	140
12	Lebenslauf .....	142
13	Eigenständigkeitserklärung .....	143

## 1 Einleitung

Sterole und deren Derivate sind eine Gruppe fettlöslicher Substanzen, die allgegenwärtig in Pflanzen und Tieren vorkommen.<sup>1</sup> Ihr Grundgerüst ist das Steran, ein Triterpen, welches biosynthetisch aus dem Isopren hervorgeht und somit eine enge Verwandtschaft mit anderen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, wie Saponinen, Steroiden, Steroidalkaloiden, Cucurbitacinen und Steroidhormonen aufweist. Analog zu Phospholipiden sind Sterole hauptsächlich in Membranen in den unterschiedlichsten chemischen Variationen zu finden, wobei sie vor allem das Fließvermögen und die Durchlässigkeit regulieren.<sup>2</sup> Die Zusammensetzung und die Funktion freier steroidaler Strukturen verschiedener Pflanzen ist nahezu vollständig aufgeklärt und die Analytik dieser weitestgehend etabliert.<sup>3-5</sup> Eine spezielle Gruppener Sterole sind die Sterylglycoside (SGs), die allgegenwärtig in Gefäßpflanzen vorkommen.<sup>6</sup> Die Substanzklasse der SGs, die an der 3-Hydroxygruppe des jeweiligen Sterolgrundgerüsts eine Glycosilierung aufweist, ist hinsichtlich ihrer Varietät und Funktion bisher nicht so ausführlich beschrieben wie die der freien Sterole.<sup>6,7</sup> SGs sind durch die Funktionalisierung an der hydrophilen Kopfgruppe analytisch deutlich schlechter zugänglich.<sup>8,9</sup> Dabei erschweren vor allem ein fehlendes Chromophor und ihr tensidartiger Charakter die Detektion mit herkömmlichen chromatographischen Methoden. Daher erfolgt die Analytik von Aglykon und Zuckeranteil nach hydrolytischer Spaltung meist getrennt.<sup>9-11</sup>

Phytosterole und deren Konjugate, zu denen auch die SGs gehören, konnten in einer Vielzahl von Pflanzenfamilien nachgewiesen werden. Besonders in Nachtschattengewächsen und Kürbissen, wie der Aubergine bzw. der Zucchini, wurden hohe Gehalte von SGs bestimmt, bei welchen es sich fast ausschließlich um Mono-SGs mit einer Zuckereinheit, der Glucose, handelte.<sup>4,12-15</sup> In Auberginen überwiegen dabei die  $\Delta^5$ -Sterole, wogegen Kürbisgewächse reich an  $\Delta^7$ -Sterolen sind.<sup>4,15,16</sup> Das Glycosilierungsmuster anderer sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe wie Saponinen, Steroidalkaloiden oder Cucurbitacinen ist in beiden Pflanzen jedoch durchaus komplexer, was ein vielfältigeres Muster glycosilierter Sterole vermuten lässt.<sup>17-19</sup> Die Glycosilierung in der Pflanze erfolgt dabei enzymatisch mittels Glucosyltransferasen, welche sowohl Glucose- als auch Galactose-Einheiten übertragen können.<sup>6,7,20,21</sup> Galactoside und höhere Glycoside werden in der Literatur zwar für andere Pflanzenarten beschrieben, jedoch nicht in Auberginen und Zucchini.<sup>1,13,22,23</sup>

Physiologisch gesehen konnte Phytosterolen und vor allem den SGs ein cholesterinsenkender Effekt nachgewiesen werden, was unter anderem mit einer verringerten Gefahr für koronare Herzkrankheiten einhergeht.<sup>24-26</sup> Darüber hinaus wird eine anti-diabetische, anti-inflammatorische und anti-karzinogene Wirkung beschrieben.<sup>27</sup>

Die Biosynthese von Phytosterolen überschneidet sich mit der des Cholesterols, welches als typisches Zoosterol auch in vielen Pflanzen zu finden ist.<sup>28</sup> Eine Zwischenstufe der Cholesterolsynthese in Pflanzen ist das 7-Dehydrocholesterol. Dieses stellt die Vorstufe des Cholecalciferols (Vitamin D<sub>3</sub>) dar und kann daher auf Vitamin D-Aktivitäten in Pflanzen hinweisen.<sup>28,29</sup> So werden in einigen Pflanzenfamilien, vor allem der Nachtschattengewächse (*Solanaceae*) und Kürbisgewächse (*Cucurbitaceae*), neben den bereits nachgewiesenen SGs auch freie oder glycosidisch gebundene Vitamin D-Strukturen beschrieben und konnten darüber hinaus in ausgewählten Studien auch nachgewiesen werden.<sup>29-31</sup>

Um einen Einblick in die Vielfalt der SG in den genannten Pflanzenfamilien zu erhalten, ist die Entwicklung einer effizienten, reproduzierbaren Analytik für die Bestimmung von SGs in Lebensmitteln notwendig. Die Methoden sollen dabei neben den einfachen Mono-Glucosiden auch andersartige SGs erfassen, um die Komplexität und Vielfalt dieser Strukturklasse in verschiedensten Pflanzenfamilien aufklären zu können. Darüber hinaus soll die entwickelte Methode zur Anreicherung und Bestimmung von glycosilierten Vitamin D-Strukturen dienen, welche in der Literatur für diverse Pflanzenfamilien häufig beschrieben werden.<sup>29,30,32</sup> Eine kalzinogene Wirkung verschiedener Pflanzen wurde bereits mehrfach belegt und ist vor allem innerhalb der Familie der *Solanaceae* aber auch in ausgewählten *Gramineae* zu beobachten.<sup>30,33</sup> Eine typische in Mitteleuropa beheimatete kalzinogene Pflanze ist der Goldhafer (*Trisetum flavescens*), welcher schon lange für seine kalzinogene Wirkung bekannt ist. Die chemische Struktur, auf die die Vitamin D-Aktivität zurückzuführen ist, ist hingegen noch unbekannt, wobei glycosidisch gebundene Vitamin D-Strukturen vermutet werden.<sup>34,35</sup> Darüber hinaus konnten im Goldhafer zwar freie Sterole (FS) nachgewiesen werden, SGs wurden hingegen noch nicht untersucht.<sup>36</sup>

Dabei wurde eine Vitamin D-Aktivität sowohl in den Etherextrakten als auch in den wasserlöslichen Extrakten beobachtet, was zum einen auf freie als auch auf glycosidisch gebundene Strukturen mit Vitamin D-Aktivität zurückgeführt wurde.<sup>29,37</sup> Vitamin D-Glycoside sind pharmazeutisch vor allem in der Vitamin D-Supplementierung von Interesse, sodass Pflanzenextrakte als gut verträgliche und gut dosierbare Alternative anstelle von synthetischem Vitamin D gegeben werden können.<sup>38</sup>

Somit wird deutlich, dass zur sicheren Bestimmung von SGs und glycosilierten Vitamin D-Strukturen die Etablierung einer neuartigen selektiven Methode notwendig ist, um bekannte SGs sicher quantifizieren und unbekannte SGs sowie glycosilierte Vitamin D-Strukturen nachweisen zu können.

## 2 Theoretischer Teil

### 2.1 Sterole – Struktur, Eigenschaften, Synthese, Funktion

Sterole oder auch Sterine sind polycyclische Alkohole im unverseifbaren Anteil, welche sich vom  $5\alpha$ -Gonan ableiten. Sie sind ubiquitär in Tieren, Pflanzen und Pilzen zu finden und übernehmen mit ihren vielfältigen Eigenschaften die unterschiedlichsten Funktionen.<sup>39,40</sup> Im Folgenden sollen verstärkt die Phytosterole und steroidale Strukturen in Pflanzen betrachtet werden, welche für die dargestellten Forschungsergebnisse die größte Relevanz aufweisen.

#### 2.1.1 Allgemeine Struktur und Nomenklatur

Die Grundstruktur aller Sterole ist das cyclische Triterpen des Sterans, welches biosynthetisch aus dem Isoprenoidstoffwechsel gebildet wird und in Abbildung 1 dargestellt ist. Dieses setzt sich aus drei sechsgliedrigen und einem fünfgliedrigem Ringsystem zusammen, welches chemisch als Hexadecahydro-cyclopenta[a]phenanthren bezeichnet wird. Dabei sind die Ringe aller in der Natur vorkommenden Sterole *trans* verknüpft, was in der Struktur des  $5\alpha$ -Gonans resultiert (siehe Abbildung 1, rechts). Alle Sterole sind Abkömmlinge des  $5\alpha$ -Gonans, wobei eine Hydroxylgruppe am  $C_3$  charakteristisch ist. Zusätzlich sind Methylierungen, insbesondere am  $C_{10}$ ,  $C_{13}$ , seltener am  $C_4$ , und eine Seitenkette am  $C_{17}$  des Sterans zu finden.

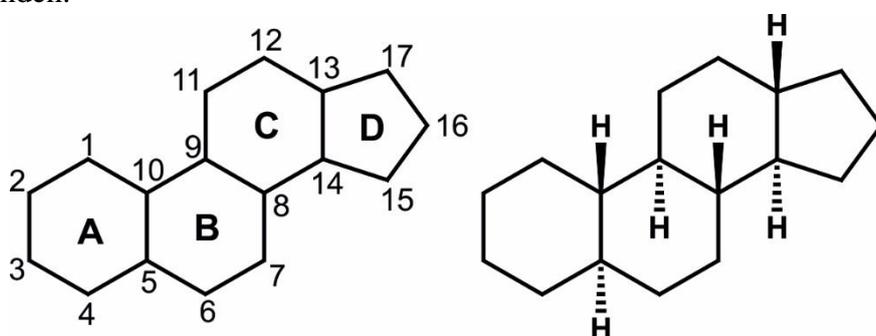


Abbildung 1: Grundstruktur des Sterans (links) und des  $5\alpha$ -Gonans (rechts)

Sterole können je nach Vorkommen in Zoosterole, Phytosterole und Mycoesterole eingeteilt werden. Dabei sind Zoosterole vor allem in Tieren, Phytosterole in Pflanzen und Mycoesterole in Pilzen zu finden. Das wichtigste Zoosterol ist das Cholesterol, welches jedoch auch in Pflanzen in geringen Konzentrationen zu finden ist und dort als Vorläuferstruktur für andere sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe dient.<sup>28</sup> Die wichtigsten Vertreter der Phytosterole stellen die 4-Desmethylsterole dar, welche keine Methylgruppen am  $C_4$  des Sterangrundgerüsts enthalten und aus insgesamt 27 Kohlenstoffatomen aufgebaut sind. Die meisten Sterole weisen eine Doppelbindung zwischen dem  $C_5$  und  $C_6$  des Ringsystems auf, weshalb diese als  $\Delta^5$ -Sterole bezeichnet werden. In einigen Pflanzenfamilien kommen dagegen bevorzugt 4-Desmethylsterole mit einer Doppelbindung zwischen  $C_7$  und  $C_8$  Atom, die  $\Delta^7$ -Sterole, vor. Die wichtigsten  $\Delta^5$ -Phytosterole sind  $\beta$ -Sitosterol, Stigmasterol und Campesterol. Bei den  $\Delta^7$ -Phytosterolen gehören Spinasterol und Avenasterol zu den bedeutendsten Vertretern.<sup>2,41</sup> In Pilzen sind hauptsächlich Fucosterol, Brassicasterol sowie Ergosterol (ein  $\Delta^{5,7}$ -Sterol) zu

finden.<sup>6</sup>Abbildung 2 fasst die wichtigsten Vertreter der einzelnen Gruppen zusammen, welche sich vor allem in der Seitenkette an Position C<sub>17</sub> unterscheiden. Dabei wurde die Nomenklatur nach den IUPAC-IUB Empfehlungen von 1976 gewählt, welche am häufigsten in der Literatur verwendet wird.

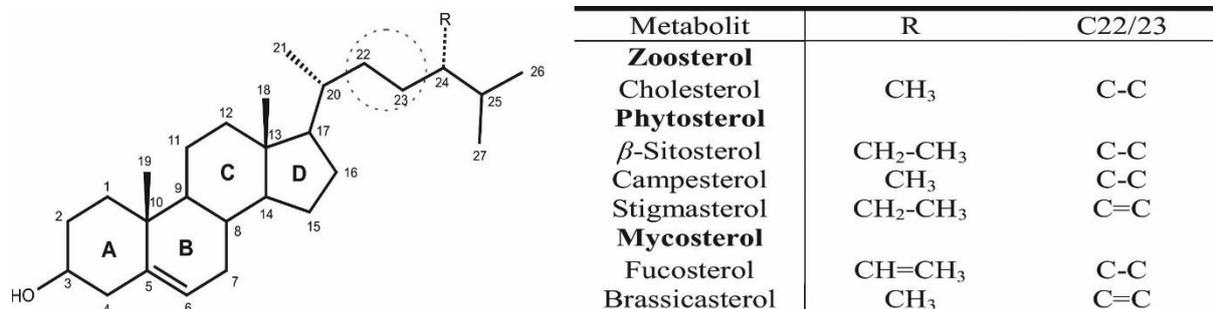


Abbildung 2: Übersicht über die wichtigsten  $\Delta^5$ -Sterole in Tieren (Zoosterole), Pflanzen (Phyosterole) und Pilzen (Mycosterole)

Die gesamte Vielfalt aller Sterole ist noch sehr viel größer, wobei vor allem im Pflanzenreich durch ein breiteres Enzymbesteck weitaus mehr unterschiedlichste Sterole synthetisiert werden als in der Tierwelt.<sup>42</sup> So werden mehr als 200 strukturell verschiedene Phyosterole und über 4000 verschiedene andere Triterpene beschrieben.<sup>43</sup>

### 2.1.2 Biosynthese von Sterolen

Die Synthese aller Triterpene geht von der Struktur des Acetyl-Coenzym A (Acetyl CoA) aus, welches im sogenannten Mevalonatweg über das 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A (HMG-CoA) zur Mevalonsäure reduziert wird. Aus diesem wird schlussendlich das Isopentenylpyrophosphat (IPP) und das Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) synthetisiert, welche zum Farnesylpyrophosphat (FPP) kondensieren. Mit Hilfe der Squalensynthase werden zwei FPP in einer weiteren Kondensationsreaktion in das Squalen umgewandelt. Anschließend katalysiert die Squalen-Monooxygenase die Epoxidierung zum Squalen-2,3-Epoxid, welches die Ausgangsverbindung für die Synthese von Sterolen in Tieren, Pflanzen oder Pilzen darstellt. Der Syntheseweg über den Mevalonatweg bis zum Squalen-2,3-Epoxid ist in allen Organismen identisch. Erst bei den weiteren Syntheseschritten wird in Tieren und Pilzen mittels Lanosterol-Synthase das Lanosterol gebildet, wogegen in Pflanzen das Cycloartenol, welches über die Cycloartenol-Synthase synthetisiert wird, als Ausgangsverbindung für die Synthese weiterer steroidaler Strukturen dient. Der vereinfachte Syntheseweg verschiedener Sterole mit den katalysierenden Enzymen ist in Abbildung 3 zusammengefasst.<sup>2</sup> Dieser ist bis hin zu den wichtigsten Endstrukturen des Cholesterol bei Tieren, des Ergosterols bei Pilzen und des Stigmasterols beziehungsweise des *β*-Sitosterols bei Pflanzen sehr vielschichtig und umfasst mehrere Zwischenstufen, welche alle über spezielle Enzymreaktionen katalysiert werden. Diese unterliegen einem komplexen Regulationsmechanismus, wobei die Hemmung einzelner Enzyme durch abiotische Faktoren oder durch spezielle Enzyminhibitoren erfolgen kann.<sup>2,44</sup> Bei unterschiedlichen Arten liegt auch ein verändertes Enzymbesteck vor, weshalb es zu leicht veränderten Synthesewegen kommt.

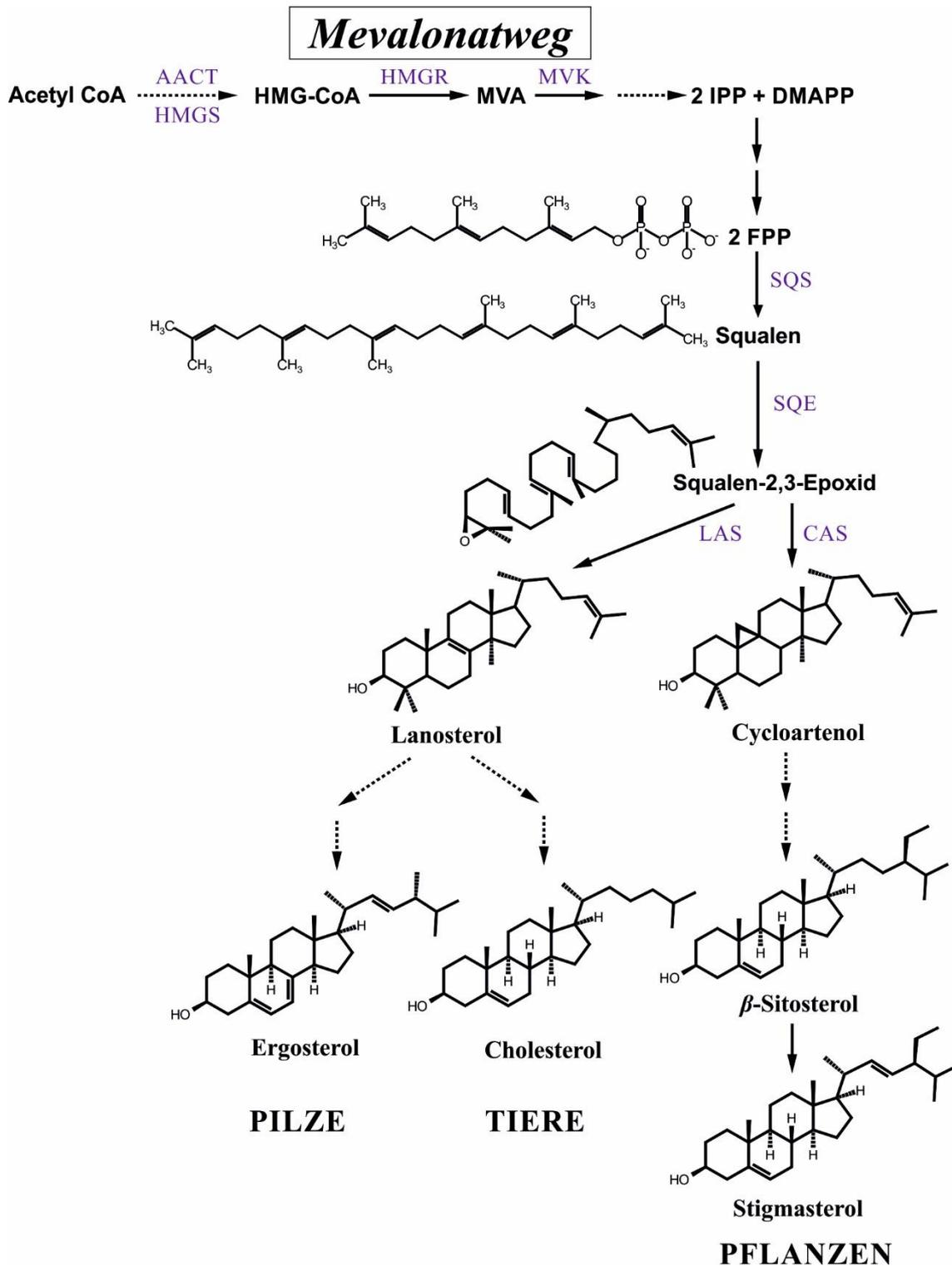


Abbildung 3: Vereinfachtes Biosyntheseschema von Sterolen in Pflanzen, Tieren und Pilzen. Die katalysierenden Enzyme AACT, Acetyl-CoA C-Acetyltransferase; HMGS, 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Synthase; HMGR, HMG-CoA-Reduktase; MVK, Mevalonat-Kinase; IPP, Isopentenylpyrophosphat; DMAPP, Dimethylallylpyrophosphat; FPP, Farnesylpyrophosphat; SQS, Squalen-Synthase; SQE, Squalenepoxidase; LAS, Lanosterol-Synthase und CAS, Cycloartenol-Synthase der Einzelreaktionen sind in blau dargestellt. Mehrstufige Reaktionen sind mit gestrichelten Pfeilen dargestellt.

Dies resultiert vor allem bei Pflanzen in einer enormen Variation an steroidal Strukturen, sodass verschiedenste Strukturen wie Campesterol, Brassicasterol, Isofucosterol oder Avenasterol bevorzugt synthetisiert werden.<sup>2</sup> Die Verteilung der wichtigsten Phytosterole in einzelnen Pflanzen ist dabei abhängig von der späteren Funktion des jeweiligen Phytosterols im pflanzlichen Organismus. Die Vielfalt an Sterolen ist insgesamt weitaus größer und soll daher nicht in seiner Gesamtheit diskutiert werden. Auch die Regulierung der einzelnen Synthesewege ist ein sehr komplexes Thema, das aktuell in anderen Arbeitsgruppen weiter erforscht wird.<sup>2,44,45</sup>

Insgesamt ist der Sterolstoffwechsel zum Großteil aufgeklärt und wird in der Literatur ausführlich beschrieben.<sup>2,42,44</sup> Dennoch ist der gesamte Syntheseweg der Sterole noch nicht vollständig verstanden. So kommt es auch in Pflanzen zum Teil zu Überlappungen mit dem Cholesterollowerstand, weshalb in einigen Arten auch signifikante Mengen an Cholesterol zu finden sind, welches spezielle Funktionen übernimmt oder als Ausgangsverbindung für weitere sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe dient.<sup>28</sup>

### 2.1.3 Funktion freier Sterole

Sterole übernehmen eine Vielzahl von Funktionen im pflanzlichen, tierischen und pilzlichen Organismus, wobei die meisten bereits bekannt sind. Dabei ist Cholesterol im menschlichen und tierischen Organismus essentiell für die Membranstabilität und die Signalübertragung.<sup>46</sup> Darüber hinaus dient es als Vorstufe verschiedenster Steroidhormone und Gallensäuren. Als Zwischenprodukt der Vitamin D-Synthese ist das 7-Dehydrocholesterol der biosynthetische Vorläufer des Vitamin D<sub>3</sub>, welches eine wichtige Substanz im Vitamin D-Stoffwechsel darstellt und durch UV-Licht in der menschlichen Haut synthetisiert wird. Somit ist Cholesterol indirekt auch an einem funktionierenden Knochenstoffwechsel beteiligt.<sup>47</sup>

In nahezu allen Pilzen ist als Hauptsterol Ergosterol mit einem Anteil von bis zu 80 % zu finden, welches vor allem für die Regulierung der Membranfluidität und -durchlässigkeit verantwortlich ist.<sup>48</sup> Neben strukturgebenden Eigenschaften ist Ergosterol sowie diverse andere Sterole auch für verschiedenste Wachstumseigenschaften von Bedeutung. Somit ist das Ergosterol und dessen biosynthetische Zwischenstufen essentiell für das Wachstum und die Zellproliferation von Pilzen. In Pflanzen, Tieren oder Bakterien spielt dieses hingegen nur eine untergeordnete Rolle.<sup>49</sup>

Im Gegensatz dazu ist die Funktion der Phytosterole deutlich vielfältiger, wobei noch vieles unerforscht ist. Eindeutig belegt ist die membranstabilisierende Wirkung, auf dieselbe Weise wie beim Cholesterol in tierischen Zellen, durch Interaktionen mit den Plasmalipiden und Sphingolipiden. So bewirken Phytosterole eine Abhängigkeit von Art und Struktur des Sterols, eine Herabsetzung in der Beweglichkeit der Plasmalipide, was unter anderem auch Einfluss auf die Durchlässigkeit der Pflanzenmembranen hat.<sup>41,50</sup> Im Zusammenhang mit der Pflanzenmembran spielen Phytosterole auch eine wichtige Rolle bei der Bildung von „Lipid Rafts“, welche Domänen mit Protein–Protein und Protein–Lipid Wechselwirkungen darstellen, die am Aufbau diverser Membranrezeptoren beteiligt sind und eine wesentliche Rolle in der Signaltransduktion spielen.<sup>51</sup> Ähnlich wie bei Pilzen wird ebenfalls das Wachstum von Pflanzen durch Sterole reguliert. So ist unter anderem bekannt, dass  $\beta$ -Sitosterol und Stigmasterol eine entscheidende Rolle bei der Zellteilung und Zelldifferenzierung spielen, wobei die Komposition der einzelnen Sterole eine entscheidende

Rolle spielt. So wurde bewiesen, dass es zu einem starken Anstieg der Sterolsynthese bei der Keimung kommt, wohingegen bei der Reifung ein rapider Rückgang der Syntheserate zu beobachten war.<sup>52,53</sup> Weiterhin sind Sterole zur Ausbildung der richtigen Zellpolarität bei der Endocytose von Bedeutung.<sup>41</sup> Auch an der Reaktion von Pflanzen auf unterschiedliche Stressbedingungen sind die Sterole beteiligt. So werden bei Verwundungen deutlich mehr Sterole synthetisiert, um eine höhere Membranfestigkeit zu erreichen. Eine spezielle Bedeutung auf eine Vielzahl der Eigenschaften scheinen auch die Verhältnisse zwischen den einzelnen Phytosterolen des  $\beta$ -Sitosterol, Stigmasterol und Campesterol, sowie zwischen den Sterolen und den Plasmalipiden zu haben. So zeigte sich bei Verwundungen ein verändertes Verhältnis von Stigmasterol zu den Plasmalipiden in der Art *Taxus chinensis*, was in einer veränderten Membrandurchlässigkeit resultierte.<sup>54</sup> In ähnlicher Weise regulieren Sterole die Anpassung an Kältebedingungen oder Hitzestress, um stabile Plasmamembranen auch bei Temperaturschwankungen gewährleisten zu können.<sup>41</sup> Sterolen, besonders dem  $\beta$ -Sitosterol, wird ebenfalls eine hohe antioxidative Wirkung zugeschrieben. Deshalb waren Mutanten mit höheren Gehalten an  $\beta$ -Sitosterol im Vergleich zum Wildtypen deutlich resistenter gegen oxidativen Stress, verursacht durch Trockenheit, Versalzung, Luftverunreinigungen, Schwermetalle oder ungünstige Temperaturen. Dabei ist die hohe antioxidative Wirkung auf die Fähigkeit zur Neutralisation freier Radikale zurückzuführen.<sup>55,56</sup> Insgesamt zeigte sich, dass Sterole neben strukturgebenden Funktionen weitaus mehr Funktionen in Pflanzenzellen übernehmen, wobei Interaktionen mit Membranlipiden, insbesondere zu Phospholipiden und Sphingolipiden, eine wesentliche Rolle spielt, um verschiedenste Anpassungs- und Regulationsmechanismen in der Pflanzenzelle zu gewährleisten.<sup>41</sup>

Ernährungsphysiologisch werden Phytosterole viele positive Eigenschaften zugeschrieben. So sollen sie die Absorption von Cholesterol hemmen und somit für die Blutfettwerte positiv beeinflussen. Darüber hinaus werden ihnen wachstumshemmende, krebsvorbeugende, entzündungshemmende und antidiabetische Eigenschaften zugeschrieben. Damit können Phytosterole effektiv das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, Krebserkrankungen und Diabetes senken, was sie interessant für die gezielte Anreicherung in diversen Lebensmitteln macht.<sup>48</sup>

Zusammenfassend zeigt sich, dass Phytosterole eine Vielzahl an Funktionen in Pflanzen übernehmen, von denen noch nicht alle vollständig verstanden wurden. Auch die gesamte strukturelle Vielfalt, sowie der Umfang an Funktionen ist bei Phytosterolen um einiges höher als bei Zoosterolen und Mycoosterolen, weshalb bei diesen noch viel Forschungsbedarf besteht, um sie in ihrer Gänze zu verstehen.

#### 2.1.4 Sterole als Provitamine

Biosynthetisch fallen sowohl in Tieren und Pilzen als auch in einigen Pflanzen steroidale Strukturen an, die als Vorstufen für die Substanzklasse der fettlöslichen Vitamin D-Strukturen dienen können.<sup>28,57</sup> Dazu zählen vor allem Ergosterol und 7-Dehydrocholesterol, welche hauptsächlich in Tieren und Pilzen zu finden sind und bei UV-Bestrahlung in die aktiven Metaboliten des Ergosterols (Vitamin D<sub>2</sub>) und Cholecalciferols (Vitamin D<sub>3</sub>) umgewandelt werden können (Abbildung 4).<sup>58,59</sup> Da der Phytosterolmetabolismus eng mit dem Cholesterolfstoffwechsel zusammenhängt kommt es zum Teil zu Überschneidungen beider Biosynthesewege. Daher ist das 7-Dehydrocholesterol als biosynthetische Zwischenstufe auch

in ausgewählten Pflanzen zu finden. Das Ergosterol ist in nahezu allen Pilzen enthalten.<sup>28</sup> Somit können Sterole biosynthetisch auch als Provitamin D-Strukturen betrachtet werden.

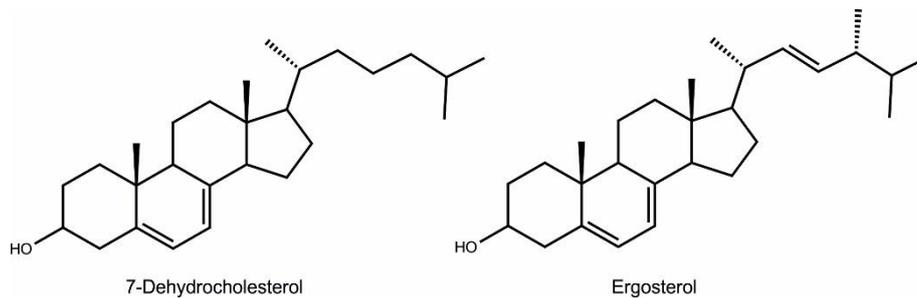


Abbildung 4: Struktur der Provitamine des 7-Dehydrocholesterols (links) und Ergosterols (rechts)

### 2.1.4.1 Vitamin D - Biosynthese, Funktion und Eigenschaften

D-Vitamine haben im menschlichen Organismus vielfältige physiologische Funktionen, müssen jedoch zunächst durch Hydroxylierung des Vitamin D<sub>3</sub>, über das 25-Hydroxycalciferol (25(OH)D<sub>3</sub>), in den aktiven Metaboliten des 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (Calcitriol, 1,25(OH)D<sub>3</sub>) umgewandelt werden.

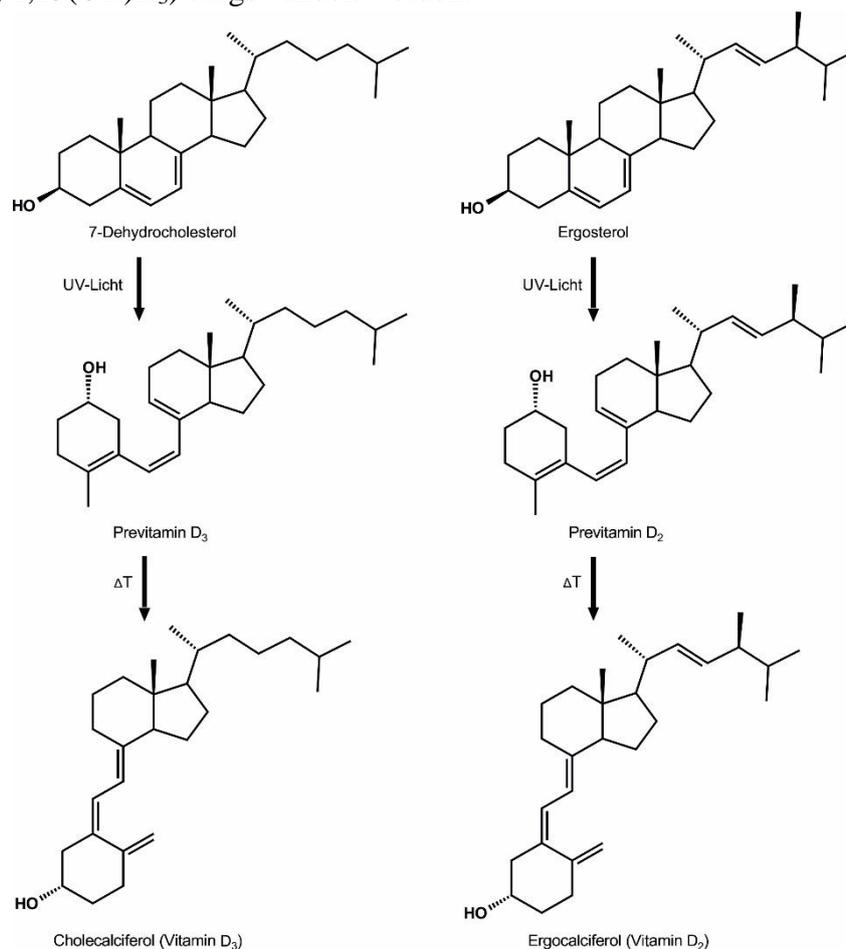


Abbildung 5: UV-Licht induzierte Umwandlung des 7-Dehydrocholesterols in Vitamin D<sub>3</sub>(links)<sup>40</sup>, sowie des Ergosterols in Vitamin D<sub>2</sub> (rechts)<sup>29</sup>

Der größte Teil des menschlichen Vitamin D-Bedarfs wird durch die endogene Synthese in der Haut gedeckt. Bei ausreichender Sonneneinstrahlung wird vor allem in den

Sommermonaten durch UV-B-Strahlung aus der Vorläuferstruktur des 7-Dehydrocholesterols das Vitamin D<sub>3</sub> gebildet.<sup>60</sup> Wie in Abbildung 5 dargestellt schließt sich an die lichtinduzierte Retro-Diels-Alder-Reaktion eine thermische [1,7]-sigmatrope antarafaciale Wasserstoffumlagerung des 7-Dehydrocholesterols in das Vitamin D<sub>3</sub> an. Analog erfolgt in Pilzen die Umlagerung des Ergosterols in das Vitamin D<sub>2</sub>.<sup>58,61,62</sup> Die Umwandlung der Vitamin D-Vorstufen in die jeweilige Metaboliten des Vitamin D<sub>3</sub> beziehungsweise Vitamin D<sub>2</sub> ist dabei stark von der Wellenlänge des eingestrahlt Lichtes und von der Temperatur abhängig. Dabei verläuft die Bildung des Previtamin D<sub>3</sub> über einen Gleichgewichtszustand mit den Ausgangsstoffen und den Photoisomeren des Tachysterols und Lumisterols (siehe Abbildung 6).<sup>63,64</sup> Folglich ist der erste Schritt der Photoisomerisierung nicht selektiv, weshalb das Previtamin D<sub>3</sub> nie vollständig in das Vitamin D<sub>3</sub> umgewandelt wird.

Bezüglich der optimalen Wellenlänge zur Bildung des Vitamin D<sub>3</sub> wurden verschiedene Experimente durchgeführt, wobei generell Wellenlängen des UV-B-Bereiches zwischen 290 nm und 315 nm nötig sind, um eine Photoisomerisierung in der menschlichen Haut zu gewährleisten.<sup>65</sup> *In vitro* Experimente haben darüber hinaus gezeigt, dass eine zweistufige Bestrahlung verschiedener Wellenlängen des UV-B- und UV-C-Bereiches, vor allem 254 nm gefolgt von 350 nm, zu deutlich höheren Ausbeuten an Previtamin D führt.<sup>64</sup> Unter natürlichen Bedingungen wird ein Großteil der relevanten Wellenlängen des Sonnenspektrums durch die Ozonschicht und die obersten Luftschichten der Erdatmosphäre absorbiert, womit dieses die Erdoberfläche nicht erreicht, weshalb oft ein Mangel an Vitamin D beim Menschen vorliegt.<sup>65</sup>

*In vivo* wird das aus 7-Dehydrocholesterol gebildete oder mit der Nahrung aufgenommene Vitamin D<sub>3</sub> an Vitamin D-bindende Proteine (DBP) gebunden und über die Blutbahn in die Zielgewebe, vor allem die Leber, transportiert. In der Leber erfolgt eine erste 25-Hydroxylierung des noch inaktiven Vitamin D<sub>3</sub> in die Speicher- und Transportform, das 25-Hydroxycalciferol (25(OH)D<sub>3</sub>).<sup>62</sup> Anschließend wird das an DBP gebundene 25(OH)D<sub>3</sub> zur Niere bzw. anderen Geweben transportiert, wo eine zweite Hydroxylierung an Position eins erfolgt. Dabei wird mit dem Calcitriol (1 $\alpha$ ,25(OH)D<sub>3</sub>) der eigentlich aktive Metabolit gebildet (siehe Abbildung 6). Die Bildung von 1 $\alpha$ ,25(OH)D<sub>3</sub> unterliegt strengen Regulationsmechanismen, wobei es bei einem starken Anstieg von 1 $\alpha$ ,25(OH)D<sub>3</sub> zur Aktivierung einer 24-Hydroxylase kommt, welche die Synthese des (24R)-24,25-Dihydroxycholecalciferol (24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) stimuliert und damit effektiv das 25(OH)D<sub>3</sub> deaktiviert.<sup>66,67</sup> Damit werden akute Vitamin D-Intoxikationen verhindert, welche sich durch Hyperkalzinose äußern, einhergehend mit gesteigerter Calciumaufnahme und Calciumablagerungen in Geweben wie Knochen, Niere, Herz und Blutgefäßen.<sup>29</sup>

Die Regulierung der Calcium- und Phosphat-Homöostase ist gleichzeitig auch die wichtigste Funktion des Vitamin D, speziell des 1 $\alpha$ ,25(OH)D<sub>3</sub>, im menschlichen und tierischen Organismus. Dadurch wird unter anderem ein ausgeglichener Knochenstoffwechsel gewährleistet. Darüber hinaus werden antiproliferative und immunregulatorische Funktionen beschrieben.<sup>68</sup> Ein Mangel an Vitamin D geht mit einer erhöhten Gefahr für Autoimmunerkrankungen, Bluthochdruck, Diabetes und Krebs einher.<sup>29</sup> Neben der Regulierung des Calcium- und Knochenstoffwechsels besitzt Vitamin D im menschlichen Körper viele weitere Funktionen und ist unter anderem an der Regulierung der Zellteilung, Proteinexpression, Immunantwort und Apoptose beteiligt, wobei noch nicht alle

Zusammenhänge vollständig verstanden wurden.<sup>69</sup> Dies verdeutlicht die Wichtigkeit dieser Struktur im gesamten Zellzyklus des menschlichen und tierischen Organismus als essentielles Vitamin, weshalb ein großer Wert auf neuartige Quellen von Vitamin D-Strukturen gelegt wird.<sup>30,70,71</sup>

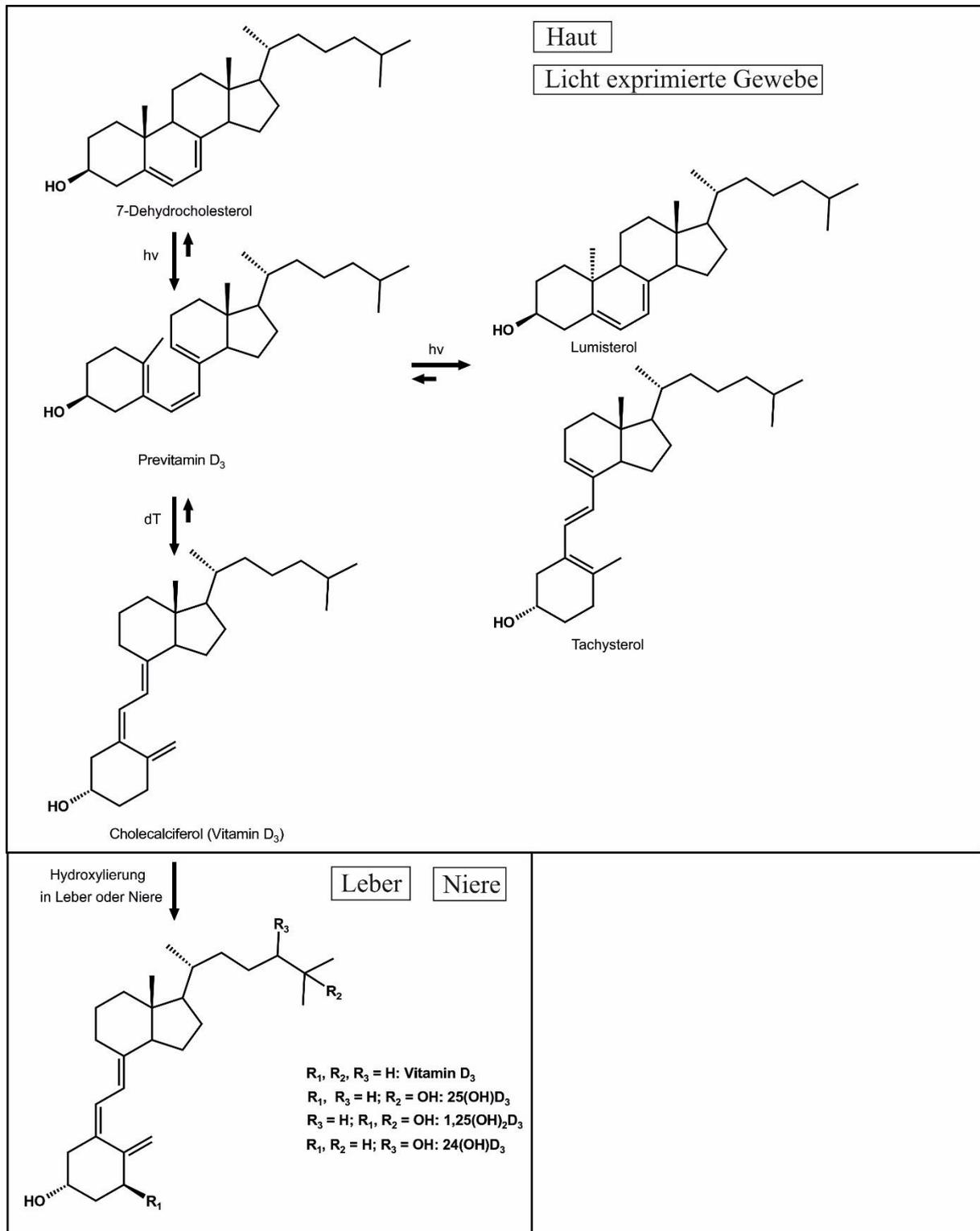


Abbildung 6: Metabolismus und Synthese des Vitamin D<sub>3</sub>

### 2.1.4.2 Vitamin D in Pflanzen

In der Regel ist das Vorkommen von Vitamin D-Strukturen auf Tiere und Pilze beschränkt, weshalb Vitamin D nur in wenigen ausgewählten Lebensmitteln vorkommt.<sup>66,72</sup> Daher ist eine ausreichende Versorgung für spezielle Bevölkerungsgruppen, wie zum Beispiel Veganer, oft nicht gewährleistet.<sup>73</sup> Auch deshalb rücken alternative pflanzliche Quellen für eine ausreichende Vitamin D-Versorgung in den Fokus. Dabei haben vorangegangene Studien gezeigt, dass auch in einigen Pflanzen nennenswerte Konzentrationen an Vitamin D-Strukturen zu finden sind. Bisher wurden jedoch nur in ausgewählten Pflanzenfamilien wie den *Solanaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae* und *Poaceae* freie Vitamin D-Strukturen nachgewiesen.<sup>29-31,74</sup> Wie Tabelle 1 verdeutlicht, nehmen die *Solanaceae* eine Ausnahmestellung in Bezug auf Vitamin D-Strukturen ein, wobei vor allem *Solanum glaucophyllum* Desf. außergewöhnlich hohe Gehalte an Vitamin D-Strukturen aufweist.<sup>75</sup> Darüber hinaus sind in *Solanaceae* ungewöhnlich hohe Konzentrationen der Zoosterole des Cholesterols und 7-Dehydrocholesterols zu finden, was unter anderem auf die Funktion des Cholesterols als Ausgangsverbindung für eine Vielzahl an Glycoalkaloiden zurückzuführen ist.<sup>28</sup> Aber auch in den anderen genannten Pflanzen sind verschiedene Vitamin D-Strukturen in nennenswerten Konzentrationen zu finden.<sup>76</sup> Da Vitamin D-Strukturen nahezu ausschließlich in den Blättern diverser Pflanzen nachgewiesen wurden, wird vermutet, dass aus dem 7-Dehydrocholesterol unter dem Einfluss von UV-Licht, wie auch in der menschlichen Haut, das Vitamin D<sub>3</sub> gebildet wird.<sup>65</sup> Durch den Nachweis von spezifischen Hydroxylasen wird die Bildung der hydroxylierten Strukturen des 25(OH)D<sub>3</sub> und des 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in einigen Pflanzen erklärt, wobei ein vergleichbarer Syntheseweg wie in Tieren anzunehmen ist.<sup>30</sup>

Tabelle 1: Gehalte von Vitamin D<sub>3</sub> (D<sub>3</sub>), 7-Dehydrocholesterol (7-DHC), 25-Hydroxycholecalciferol (25(OH)D<sub>3</sub>) und 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxycholecalciferol (1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) in ausgewählten Pflanzenarten<sup>29</sup>

Spezies	D <sub>3</sub>	7-DHC	25(OH)D <sub>3</sub>	1 $\alpha$ ,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	0,28 $\mu$ g/g TW <sup>77</sup> 1,1 $\mu$ g/g FW <sup>31</sup> 0,8 $\mu$ g/g TW <sup>78</sup>	0,61-0,76 $\mu$ g/g TW <sup>77</sup>	0,15 $\mu$ g/g FW <sup>31</sup> 0,022 $\mu$ g/g TW <sup>78</sup>	0,10 $\mu$ g/g TW <sup>78</sup>
<i>Solanum tuberosum</i> L.	0,15 $\mu$ g/g FW <sup>77</sup>	-	-	-
<i>Cucurbita pepo</i> L.	0,23 $\mu$ g/g FW <sup>77</sup>	-	-	-
<i>Solanum glaucophyllum</i> Desf.	0,21 $\mu$ g/g TW <sup>31</sup> 2,2-42,1 $\mu$ g/g FW <sup>75</sup>	5-58 $\mu$ g/g FW <sup>75</sup>	1,0 $\mu$ g/g FW <sup>75</sup>	0,1 $\mu$ g/g FW <sup>75</sup>
<i>Cestrum diurnum</i> L.	0,1 $\mu$ g/g FW <sup>79</sup>	-	0,102 $\mu$ g/g TW <sup>79</sup>	1,0 $\mu$ g/g TW <sup>79</sup>
<i>Medicago sativa</i> L.	0,00062-0,001 $\mu$ g/g TW <sup>80</sup>	-	-	-
<i>Trisetum flavescens</i> Beauv.	0,1 $\mu$ g/g TW <sup>81</sup>	-	-	-

TW: Trockengewicht; FW: Frischgewicht

Allerdings ist die genaue Bedeutung von Vitamin D-Strukturen in Pflanzen weitestgehend unbekannt.<sup>29</sup> Es wird jedoch ähnlich wie im tierischen Organismus eine regulatorische Wirkung von Vitamin D im Zusammenhang mit Calcium vermutet. So ist Calcium für die Initiierung des Wurzelwachstums sowie die weitere Proliferation verantwortlich, wobei Vitamin D-Strukturen den Calciumeinstrom in die Zelle bewirken und damit aktiv das Pflanzenwachstum anregen.<sup>82</sup>

Wie die Synthese der Vitamin D-Strukturen in Pflanzen erfolgt, ist bis heute noch nicht aufgeklärt.<sup>82</sup> Als bewiesen gilt jedoch, dass der Einfluss von UV-Licht den Gehalt an Vitamin D und damit die Vitamin D-Aktivität kalzinogener Pflanzen deutlich erhöht, was für eine lichtabhängige Synthese von Vitamin D-Strukturen spricht.<sup>71,83</sup> Jäpelt et al. (2011) haben gezeigt, dass sowohl 7-Dehydrocholesterol als auch das Vitamin D<sub>3</sub> in verschiedenen *Solanaceae* durch UV-Bestrahlung gebildet werden. Dagegen waren keine nennenswerten Unterschiede in den Gehalten der steroidalen Strukturen des Cholesterols und des Cycloartenols bei UV-Bestrahlung zu beobachten (siehe Tabelle 2).<sup>71</sup> Neben dem Einfluss von Licht bei der Synthese von Vitamin D-Strukturen konnte auch eine Temperaturabhängigkeit festgestellt werden, womit vermutlich eine Vielzahl von abiotischen Faktoren Auswirkungen auf den Steroidstoffwechsel und die Bildung von Vitamin D-Strukturen zu haben scheint.<sup>84</sup>

Tabelle 2: Gehalte von 7-Dehydrocholesterol (7-DHC), Vitamin D<sub>3</sub> (D<sub>3</sub>), Cholesterol und Cycloartenol abhängig von der UV-Bestrahlung in µg/g Frischgewicht<sup>71</sup>

Spezies	UV-Bestrahlung	7-DHC (µg/g FW)	D <sub>3</sub> (µg/g FW)	Cholesterol (µg/g FW)	Cycloartenol (µg/g FW)
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	+	1,26	0,21	68	57
	-	0,67	-	60	34
<i>Solanum glaucophyllum</i> Desf.	+	0,23	0,09	45	ql.
	-	0,47	-	56	ql.

FW: Frischgewicht; ql.: qualitativ

Freie Vitamin D-Strukturen können mit modernen und sensitiven Analysemethoden, wie der LC-MS/MS, auch im Spurenbereich nachgewiesen werden, weshalb freie Vitamin D-Strukturen in Pflanzen bereits in diversen Studien charakterisiert wurden.<sup>71,85</sup> Neben den freien Vitamin D-Strukturen, welche in organischen Pflanzenextrakten zu finden sind, konnten auch Vitamin D-Aktivitäten in wasserlöslichen Extrakten einiger Pflanzen nachgewiesen werden.<sup>38,81,86</sup> Diese sollen auf glycosidische steroidale Strukturen zurückzuführen sein, von denen bisher deutlich weniger bekannt ist und deren Analytik eine große Herausforderung darstellt.<sup>8</sup>

## 2.2 Glycosilierte steroidale Strukturen in Pflanzen

In Pflanzen existiert eine Vielzahl glycosilierter steroidaler Strukturen. Dazu zählen neben glycosilierten Sterolen, wie den SGs, auch diverse Glycoalkaloide und Saponine.<sup>17,87</sup> Dazu konnten in ausgewählten Pflanzenfamilien außergewöhnliche Strukturen wie Melongoside, Cucurbitacine und glycosilierte Vitamin D-Strukturen charakterisiert werden.<sup>19,29,88,89</sup>

### 2.2.1 SGs in Pflanzen

In Pflanzen sind neben den freien Sterolen (FS) auch diverse Konjugate steroidaler Strukturen zu finden. Dies sind vor allem Sterylester (SEs), Sterylglycoside (SGs) und acetylierte Sterylglycoside (ASGs).<sup>7</sup> Während die Sterole hinsichtlich der Variation und Funktion bereits ausführlich beschrieben wurden, besteht bei den Konjugaten noch Forschungsbedarf. Dabei weisen speziell die SGs durch ihre Glycosilierung einen stark amphiphilen Charakter auf, was in einer außergewöhnlichen Struktur mit vielfältigen Eigenschaften resultiert.<sup>6,2</sup>

### 2.2.1.1 Vielfalt und Struktur der SGs in Pflanzen

Die meisten Pflanzen, aber auch einige Pilze, Tiere und ausgewählte Bakterien synthetisieren SGs, welche im Gegensatz zu FS durch eine Glycosilierung an der 3-Hydroxylgruppe des Sterols aufweisen. Die Bindung ist dabei in Pflanzen in der Regel  $\beta$ -glycosidisch.  $\alpha$ -Glycoside wurden nur in einigen Ausnahmefällen, insbesondere in Tieren und Pilzen, nachgewiesen.<sup>6,5</sup>

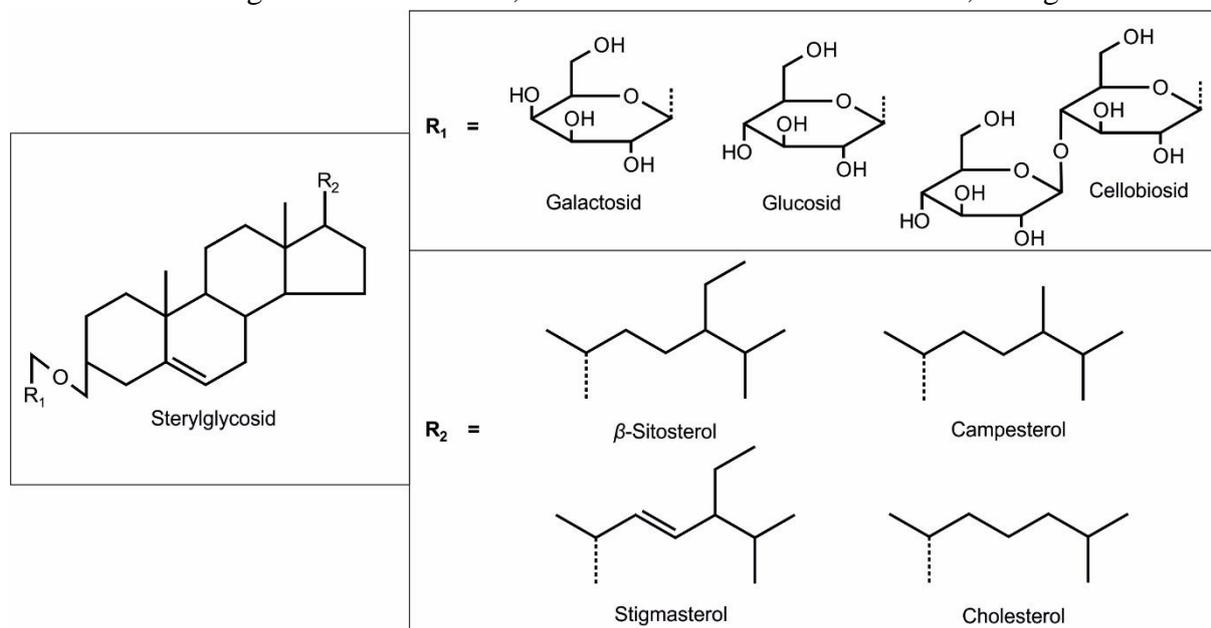


Abbildung 7: Strukturen der bedeutendsten SGs in Pflanzen

Dabei sind die Intermediate der Sterolbiosynthese schwache Substrate der Sterol Glycosyltransferasen (SGT), weshalb fast ausschließlich glycosilierte Strukturen von Endprodukten der Sterolbiosynthese zu finden sind.<sup>6,90</sup> Für gewöhnlich besteht der Zuckeranteil aus Monoglycosiden, welche den Hauptanteil aller SGs ausmachen. Aber es wurden auch Glucoside mit bis zu fünf linear verknüpften Zuckereinheiten in Reis (*Oryza sativa*) und Adzukibohnen (*Vigna angularis*) nachgewiesen.<sup>5,22</sup> Die wichtigsten Saccharide sind die  $\beta$ -D-Glucopyranoside, die in jeder Pflanze den größten Anteil aller SGs ausmachen.

Andere Saccharide, wie  $\beta$ -Galactopyranoside,  $\beta$ -D-Glucuronopyranoside,  $\alpha$ -D-Rhamnopyranoside oder  $\beta$ -D-Cellobioside sind dagegen nur in ausgewählten Pflanzen in Spuren zu finden.<sup>1,5</sup> Hinsichtlich des Sterolgrundgerüsts sind die bedeutendsten  $\Delta^5$ -Sterole das  $\beta$ -Sitosterol, Stigmasterol und Campesterol. Bezüglich der  $\Delta^7$ -Sterole sind vor allem das Spinasterol und das Avenasterol von Bedeutung. In speziellen Pflanzenfamilien, vor allem in den *Solanaceae*, ist auch das Cholesterol als Glucosid vertreten.<sup>6,7,4</sup> Die chemische Struktur der wichtigsten  $\beta$ -glycosidischen  $\Delta^5$ -Sterole in Pflanzen sind in Abbildung 7 zusammengefasst.

Quantitativ ist in fast allen Pflanzen das  $\beta$ -Sitosterol- $\beta$ -D-Glucopyranosid (Sito-Glc) das dominierende SG (siehe Tabelle 3). Danach folgen das Stigmasterol- $\beta$ -D-Glucopyranosid (Stigma-Glc) oder das Campesterol- $\beta$ -D-Glucopyranosid (Camp-Glc), wobei meist das Stigma-Glc in größeren Mengen zu finden ist. Eine Ausnahme stellen die *Brassicaceae* dar, welche reich an Camp-Glc sind, was mit Sicherheit auf die hohe Konzentration an Brassicasterolen zurückzuführen ist, die biosynthetisch aus dem Campesterol gebildet werden.<sup>91</sup> In den Gattungen der *Cucurbitaceae* und

*Amarantaceae* dominieren die Glucoside der  $\Delta^7$ -Sterole, wobei speziell in *Cucurbita pepo* (Zucchini) auch das Sito-Glc nachgewiesen wurde.<sup>92</sup> Genaue Studien und quantitative Aussagen zu  $\Delta^5$ -Sterolen in diesen Pflanzenfamilien sind bisher jedoch nicht zu finden. Prinzipiell zeigte sich jedoch, dass die Anteile der jeweiligen SGs mit denen der FS korrelieren.

Tabelle 3: Gehalte der wichtigsten SGs in verschiedenen Pflanzenfamilien; bestimmt nach Nyström et al. (2012) in  $\mu\text{g/g}$  Trockengewicht<sup>4</sup>

Gattung/Spezies	Gesamtgehalt [ $\mu\text{g/g}$ ] TW	Sito-Glc [ $\mu\text{g/g}$ ] TW	Stigma-Glc [ $\mu\text{g/g}$ ] TW	Camp-Glc [ $\mu\text{g/g}$ ] TW	andere SGs [ $\mu\text{g/g}$ ] TW
<i>Fabaceae</i>					
Adzukibohnen	43,8	15,7	20,5	1,1	6,5
Sojabohnen	89,2	50,0	13,5	23,4	2,3
<i>Brassicaceae</i>					
Broccoli	113,4	92,2	2,1	16,4	2,6
Senfsamen	58,6	39,0	0,1	13,4	6,0
<i>Solanaceae</i>					
Aubergine	67,6	48,3	12,7	4,2	2,5
Kartoffeln	44,0	28,6	1,9	0,5	13,0
Tomaten	50,5	20,2	17,1	6,0	7,3
<i>Poaceae</i>					
Weizenmehl	32,7	22,8	5,6	0,3	3,6
<i>Malvaceae</i>					
Kakaopulver	82,0	63,2	12,3	4,8	1,7
<i>Rosaceae</i>					
Mandeln	64,4	56,3	1,3	1,5	5,5
Gattung/Spezies	Gesamtgehalt [ $\mu\text{g/g}$ ] TW	Spinasterol-Glc [ $\mu\text{g/g}$ ] TW	andere $\Delta^7$ -Sterole [ $\mu\text{g/g}$ ] TW	Camp-Glc [ $\mu\text{g/g}$ ] TW	andere SGs [ $\mu\text{g/g}$ ] TW
<i>Cucurbitaceae*</i>					
Zucchini	231,0	118,9	49,8	2,9	58,5
<i>Amarantaceae*</i>					
Spinat	62,9	22,3	31,2	2,0	7,0

\*reich an  $\Delta^7$ -Sterolen, mit Sito-Glc:  $\beta$ -Sitosterol- $\beta$ -D-Glucopyranosid; Stigma-Glc: Stigmasterol- $\beta$ -D-Glucopyranosid; Camp-Glc: Campesterol- $\beta$ -D-Glucopyranosid; TW: Trockengewicht

Die Analysenergebnisse von Nyström et al. (2012) in Tabelle 3 verdeutlichen, dass nicht alle SGs in dieser Studie qualifiziert wurden, was unter anderem auch auf die genutzte Methode mittels saurer Hydrolyse zurückzuführen ist. Dies lässt darauf schließen, dass die Vielfalt an SGs noch um einiges größer ist als die der quantifizierten Strukturen.<sup>4</sup> Kovganko et al. (1999) fasst insgesamt 43 unterschiedliche SGs pflanzlicher Herkunft zusammen, die bisher qualifiziert werden konnten, wobei ungewöhnliche SGs meist auf ausgewählte Arten beschränkt und dort nur in geringen Konzentrationen zu finden sind.<sup>1</sup>

### 2.2.1.2 Synthese von SGs in Pflanzen

Die Synthese von SGs in Pflanzen erfolgt enzymatisch mittels Uridindiphosphat (UDP)-Zucker abhängigen Sterol-Glycosyltransferasen (SGTs). Dabei wird ein UDP-gebundener Zucker, wobei die UDP-Glucose den bevorzugten Donor des Sterols darstellt, auf die 3-Hydroxylgruppe des Sterols übertragen.<sup>7</sup> Die Umsetzung anderer Zucker der UDP-Galactose ist vermutlich auf eine UDP-Glucose/UDP-Galactose-Epimerase zurückzuführen, da *in vitro* für Auberginen die UDP-Galactose kein Substrat der SGTs darstellte und somit keine Übertragung des Zuckers auf das Sterol erfolgte.<sup>93</sup> Andere Autoren berichten jedoch,

dass auch andere Zucker wie Mannose, Xylose, Fructose oder Arabinose von spezifischen SGTs auf das Sterol übertragen werden können.<sup>94</sup> Auch zur Synthese von Mehrfachzuckern werden mehrere Synthesewege vorgeschlagen. In der Regel wird davon ausgegangen, dass die Pflanze die Enzyme der UDP-Glycosyltransferasen (UGTs) nutzt, um einen 5'-Diphosphozucker als Donor auf den bereits gebundenen Zucker zu übertragen.<sup>95</sup> In einem anderen möglichen Syntheseweg erfolgt die Glycosilierung mittels CesA1-Cellulose Synthase, welche eine  $\beta(1\rightarrow4)$ -glycosidische Bindung zwischen der ersten und zweiten Glucoseeinheit generiert (siehe Abbildung 8).<sup>6</sup>

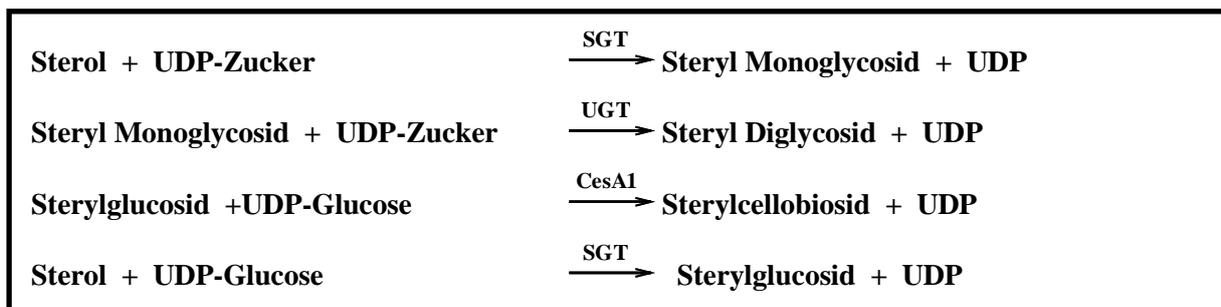


Abbildung 8: Allgemeine Reaktionsgleichung der SGT, UGT und CesA1 katalysierten Glycosilierung von Sterolen<sup>96</sup>

SGTs wurden in einer Vielzahl von Pflanzen charakterisiert, wo sie mit den Zellmembranen assoziiert sind.<sup>96,97</sup> Wie genau eine Aktivierung der SGTs in Pflanzen erfolgt, wurde bisher noch nicht aufgeklärt. Es wird jedoch angenommen, dass Veränderungen der Lipidumgebung eine wichtige Rolle spielen.<sup>7</sup>

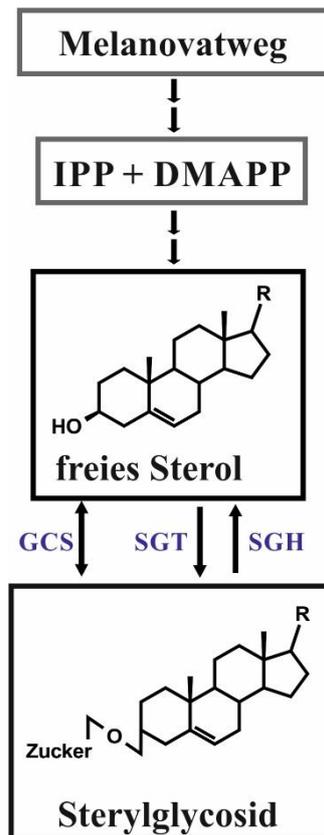


Abbildung 9: Syntheseweg von Sterylglycosiden in Pflanzen; Die katalysierenden Enzyme sind in blau dargestellt; GCS: Glucosylceramid-Synthase; SGT: Sterol-Glucosyltransferase; SGH: Sterol Glucosyl Hydrolase

Darüber hinaus wird eine alternative Synthese über die UDP-Glucose abhängige Glucosylceramid-Synthase (GCS) vermutet.<sup>98</sup> Generell wurde eine Vielzahl an SGTs mit unterschiedlichen Substratspezifitäten nachgewiesen, die alle unter der Enzym-Superfamilie der Glycosyltransferasen 1 („UGT Superfamilie“) zusammengefasst werden können.<sup>99</sup>

Die Hydrolyse von SG wird durch die membrangebundenen Steryl- $\beta$ -Glucosidasen (oder auch Sterol-Glucosyl-Hydrolasen, SGH), die in verschiedenen Pflanzen, wie vor allem dem weißen Senf (*Sinapis alba*) nachgewiesen wurden, katalysiert. Somit stellt die Glycosylierung eine reversible Reaktion dar, was für Pflanzen vor allem bei der Einstellung auf schwankenden Umweltbedingungen von Bedeutung ist (siehe Abbildung 9).<sup>7</sup> Pflanzliche SGTs sind sehr stark regio- und stereoselektiv und können eine Vielzahl von Substraten einschließlich unterschiedlichster Sterole erkennen. Dabei findet die Glycosylierung für gewöhnlich im Inneren des Cytoplasmas, der Plastiden und des endoplasmatischen Retikulums statt, wohingegen die Endprodukte in der Zellmembran zu finden sind. Wie die genaue Verteilung der SGs innerhalb der Zelle, sowie der genaue Ablauf der Glycosylierungsreaktionen verschiedener SGTs erfolgt ist bisher noch nicht bekannt. Daher sind auch Vielfalt und die genauen Funktionen der unterschiedlichen Glycosylierungsmuster bisher ungeklärt.<sup>94</sup>

### 2.2.1.3 Eigenschaften und Funktion von SGs

Die biologischen Funktionen von SGs in Pflanzen sind vielfältig und bisher noch nicht in ihrer Gesamtheit verstanden. Ihre Hauptaufgabe liegt jedoch unumstritten in der Regulation

der Fluidität und Permeabilität von Membranen, womit sie eine starke funktionelle Ähnlichkeit zu den FS aufweisen.<sup>6</sup> Durch den gebundenen Zucker an der 3-Hydroxygruppe des Sterols und des daraus resultierenden polareren Charakters tritt eine stärkere Wechselwirkung zwischen den Phospholipiden und Proteinen der Plasmamembran auf. Dennoch ist das genaue Zusammenwirken von SGs mit Membranlipiden, Membranproteinen, Phospholipiden und FS in der Plasmamembran noch nicht vollständig verstanden. Es wird vermutet, dass die vor allem in der Pflanzenmembran vorkommenden SGs im Rahmen adaptiver Prozesse z.B. bei Umweltveränderungen in der Pflanze gebildet werden. Des Weiteren wird eine Beteiligung am Transport von bioaktiven Molekülen, wie Lipidvorläuferstrukturen oder Zellwandpolymeren diskutiert. So wird vermutet, dass die Glycosilierung bestimmte Signaltransduktionswege in der Zellmembran aktiviert.<sup>6,7</sup> Weiterhin ist eine deutliche Veränderung der Anteile von SGs in der Plasmamembran bei starken Temperaturschwankungen sowie Hitze- und Kälteschocks zu beobachten. So werden bei Kälte verstärkt ASGs gebildet, wohingegen bei Hitzestress ein Zuwachs an SGs zu beobachten ist.<sup>6,100</sup> In einer weiteren wichtigen Funktion können SGs als Glucosedonor, vor allem für die Übertragung von Glucose auf Ceramide dienen. Darüber hinaus wird vermutet, dass SGs eine Funktion als Primer für die Initiation und anschließende Elongation bei der Cellulosesynthese haben. Dies gilt jedoch als umstritten und konnte noch nicht belegt werden. SGs, speziell die Glucoside des Cholesterols, sind darüber hinaus die wichtigsten steroidalen Vertreter im Phloemsaft von Pflanzen und dienen dort vermutlich zum Anlocken phloemfressender Insekten.<sup>7</sup>

Wie sich zeigt, sind die Funktionen von SGs in Pflanzen äußerst vielfältig und zum Großteil unbekannt oder noch nicht vollständig verstanden. In Pilzen wird unter anderem eine Funktion bei der Zelldifferenzierung oder der Metabolisierung von Alkanen vermutet. In Tieren konnten bis jetzt nur vereinzelt SGs, vor allem des Cholesterols, z.B. aus der Epidermis von Hühnern oder der Haut von Schlangen, isoliert werden.<sup>6,101</sup>

Ernährungsphysiologisch haben SGs seit neuester Zeit immer mehr Aufmerksamkeit erlangt. Eine gezielte Einnahme von SGs geht mit einer Reihe von positiven Effekten einher. So wie alle Phytosterole und deren Derivate senken auch SGs durch kompetitive Hemmung die Aufnahme von Cholesterol im menschlichen Darm und rücken als mögliches therapeutisches Mittel zur Behandlung von Fettstoffwechselstörungen in den Fokus der Medizin. Darüber hinaus konnte in ausgewählten Studien eine Wirkung auf die Immunfunktion gezeigt werden. Es wurde durch das Sito-Glc eine Verschiebung des Verhältnisses der T-Helfer Zellen  $T_{H1}/T_{H2}$  zu Gunsten von  $T_{H1}$  beobachtet, was mit einem positiven Effekt auf die Immunantwort im Organismus einhergeht. Im Gegensatz dazu wird jedoch auch ein neurodegenerativer Effekt von SGs und ein Einfluss der SGTs auf die Autophagie von Zellen vermutet, wobei hier genaue Zusammenhänge noch nicht aufgeklärt werden konnten.<sup>6</sup>

#### 2.2.1.4 Glycosilierte Vitamin D-Strukturen

Neben den klassischen SGs müssen im Zusammenhang mit glycosilierten, steroidalen Strukturen auch glycosilierte Vitamin D-Strukturen genannt werden. Diese weisen eine starke strukturelle und biosynthetische Ähnlichkeit mit den SGs auf und könnten daher die biosynthetischen Vorläuferstrukturen von glycosilierten Vitamin D-Strukturen darstellen. In der Literatur wird immer wieder von kalzinogenen Pflanzen berichtet, bei welchen deutliche

Vitamin D-Aktivitäten auch in wässrigen Extrakten zu beobachten sind.<sup>29,81</sup> Um aus den unpolaren Vitamin D-Strukturen eine wasserlösliche Form zu generieren, muss eine Derivatisierung erfolgen. Dabei wurde vermutet, dass eine Glycosilierung an den Hydroxylgruppen der verschiedenen D-Vitamine erfolgt, was eine einfache und oftmals genutzte Möglichkeit im pflanzlichen und tierischen Organismus darstellt, um die Wasserlöslichkeit und die Vielfalt von bioaktiven Strukturen zu erhöhen.<sup>94,102</sup> So konnte nachgewiesen werden, dass in angereicherten wässrigen Extrakten bekannter kalzinogener Pflanzen nach enzymatischen Inkubationen mit Glucosidasen Substanzen freigesetzt wurden, welche die Charakteristik des  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aufwiesen. Demzufolge wurde von glycosidisch gebundenen Strukturen ausgegangen.<sup>103,104</sup> Diese geraten durch veränderte chemische, ernährungsphysiologische und metabolische Eigenschaften, mit einer ähnlichen Wirksamkeit wie die freien Vitamin D-Strukturen, stark in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen.<sup>29</sup> So konnte von Rambeck et al.<sup>81</sup> gezeigt werden, dass die Mono-Glycoside des  $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$  und Vitamin  $\text{D}_3$  nahezu dieselbe biologische Aktivität aufwiesen wie die freien Strukturen.<sup>81</sup> In verschiedenen Bioassays konnte darüber belegt werden, dass die Glycosilierung im Vergleich zu den jeweiligen freien Vitamin D-Strukturen keinen Einfluss auf die Vitamin D-Aktivität hat. Feststellbar waren jedoch generelle Unterschiede der Vitamin D-Aktivität, sodass das  $\beta$ -D-Glucosid des  $1\alpha,25(\text{OH})\text{D}_3$  nur etwa 10 % der Aktivität des  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aufweist. In allen bisherigen Bioassays konnte darüber hinaus belegt werden, dass das Disaccharid  $1\alpha,25(\text{OH})\text{D}_3$ -3- $\beta$ -D-Cellobiosid keine Vitamin D-Aktivität aufweist. Andere Strukturen wurden bisher nicht getestet.<sup>29</sup>

Alle Pflanzen, in denen glycosilierte Vitamin D-Strukturen vermutet werden, enthalten auch freie Vitamin D-Strukturen. Bisher wurden vor allem *Solanum glaucophyllum*, *Cestrum diurnum*, *Nierembergia veitchii* und *Trisetum flavescens* aufgeführt.<sup>105,35,106,107</sup> In den Pflanzenfamilien der *Cucurbitaceae* (Kürbisgewächsen) und den *Fabaceae* (Schmetterlingsblütler) konnten darüber hinaus auch andere Secosteroide nachgewiesen werden, die strukturelle Ähnlichkeiten zum Vitamin  $\text{D}_3$  aufweisen.<sup>30</sup>

In den wasserlöslichen Extrakten der genannten Pflanzen wurden Vitamin D-Aktivitäten nach Inkubation mit Rinderpansensaft beobachtet, was für eine Freisetzung der glycosidisch gebundenen Vitamin D-Strukturen durch enthaltene Glucosidasen spricht und somit die Vitamin D-Aktivität erklären würde.<sup>107</sup> Die Strukturen in *Cestrum diurnum* waren deutlich unpolarer als die Strukturen in *Solanum glaucophyllum* und *Trisetum flavescens* und zeigten die beste Löslichkeit in einer Mischung aus Chloroform und Methanol.<sup>29</sup> Trotz allem konnte bisher nur von Zimmermann et al. (2015) in *Solanum glaucophyllum* eine glycosidisch gebundene Vitamin D-Struktur eindeutig mittels NMR charakterisiert werden, bei welcher es sich um das  $\beta$ -gebundene 1,3-Diglycosid des  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  handelt.<sup>105</sup> Vidal et al. (1985) berichtet von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , welches an verschiedene Fructoglucoside mit variablem Molekulargewicht gebunden sein soll.<sup>108</sup> Eine Charakterisierung der Gesamtstruktur erfolgte in dieser Studie nach partieller Oxidation der Fructoglucoside mit Periodsäure, womit gezeigt werden konnte, dass ein oder mehrere Fructosemoleküle an eine Disaccharideinheit gebunden sein müssen. Eine exakte Struktur wurde vom Autor jedoch nicht angegeben.<sup>108</sup> Prema et al. (1996)<sup>78</sup> berichtet von Vitamin  $\text{D}_3$ -Glucosiden in der Gattung *Solanum lycopersicum* (Tomate), spezifiziert diese jedoch nicht genauer.<sup>78</sup> In anderen Studien konnte in Tierversuchen nur eine Vitamin D-Aktivität anhand der Calcium- und Phosphataufnahme bestimmt werden, aber keine Aussage zu den Strukturen getroffen

werden.<sup>30,107</sup> So ist wie auch bei den SGs die Art und Position der Glycosilierung nicht eindeutig geklärt und die vollständige strukturelle Charakterisierung von glycosilierten Vitamin D-Strukturen in der Literatur ist selten.<sup>29</sup>

Alles in allem verdeutlichen die bisherigen Studien zu Vitamin D in Pflanzen, dass noch eine große Wissenslücke hinsichtlich glycosidisch gebundener Vitamin D-Strukturen besteht. Dabei muss zunächst eine Aufklärung der genauen Strukturen erfolgen, um die exakte Identität der Glucoside charakterisieren zu können. Im Gegensatz zur Bestimmung freier Vitamin D-Strukturen stellt die Analytik dieser jedoch eine große Herausforderung dar, was die strukturelle Aufklärung von Vitamin D-Metaboliten zusätzlich erschwert.<sup>82</sup> Als potentiell therapeutisches Mittel in der Tumorthherapie und als Supplement bei akutem Vitamin D-Mangel sind derartige Strukturen jedoch stark gefragt, da sie ähnlich wirksam, jedoch deutlich besser dosierbar als freie Vitamin D-Strukturen sind. So besteht bei oral verabreichten  $1\alpha(\text{OH})_2\text{D}_3$  eine große Gefahr der Überdosierung, einhergehend mit Hyperkalzinosen, welche durch die langsamere und gezielte Freisetzung der Glucoside in den jeweiligen Zielgeweben verhindert werden könnte.<sup>105</sup> Damit könnten glycosidisch gebundene Vitamin D-Strukturen eine einzigartige, neuartige Quelle für Vitamin D sein und für medizinische Anwendungen genutzt werden.

### 2.2.2 Glycoalkaloide und Saponine

Glycoalkaloide und Saponine zählen zu den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, welche von Pflanzen hauptsächlich als Schutz gegen Fraßfeinde und pathogene Mikroorganismen, wie Bakterien, Pilze oder Viren, synthetisiert werden.<sup>17</sup>

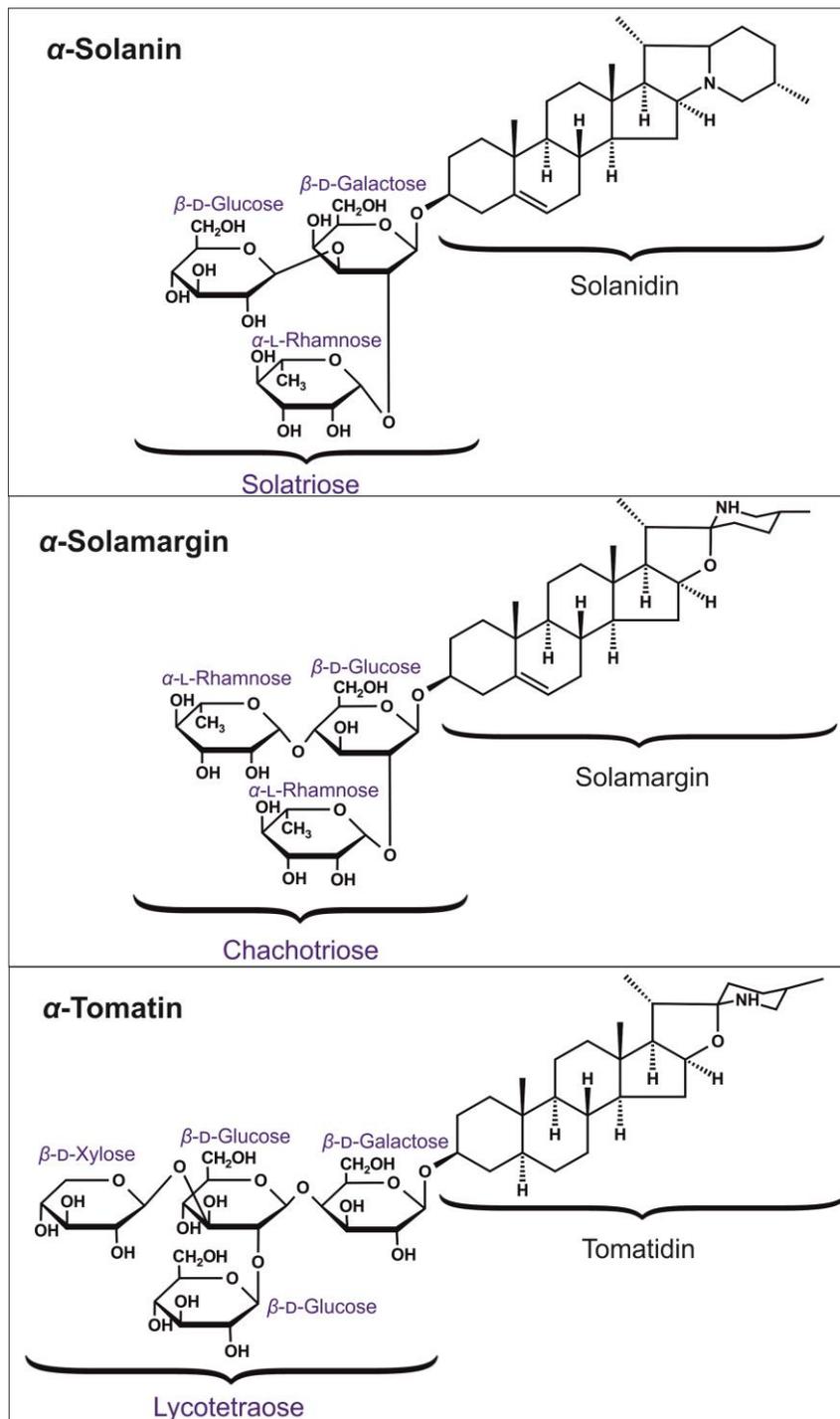


Abbildung 10: Übersicht der wichtigsten Glycoalkaloide in *Solanaceae*

Die Aglykone von Saponinen werden als Sapogenine bezeichnet und bestehen in der Regel aus stickstoffhaltigen Steroiden. Die Glycosilierung tritt in der Regel an der 3-Hydroxylgruppe des Sterols auf und umfasst eine Vielzahl an Kohlenhydratstrukturen, wobei häufig Tri- und Tetrasaccharide beobachtet werden.<sup>17</sup> Besonders reich an Glycoalkaloiden sind die Vertreter der *Solanaceae*, wobei vor allem die Tomate (*Lycopersicon esculentum*), Aubergine (*Solanum melongena*), Kartoffel (*Solanum tuberosum*) und die Gattung der Paprika (*Capsicum*) zu nennen sind.<sup>109</sup> Zu den wichtigsten Vertretern an Glycoalkaloiden zählen das  $\alpha$ -Solamargin und  $\alpha$ -Solasonin in Auberginen, das  $\alpha$ -Chaconin und  $\alpha$ -Solanin in Kartoffeln und das  $\alpha$ -Tomatin in Tomaten.<sup>110</sup> In Hinsicht auf

unbekannte glycosilierte steroidale Strukturen ist vor allem der Zuckeranteil der jeweiligen Strukturen von Bedeutung, wobei in der Regel die Monosaccharideinheiten aus den Zuckern der  $\beta$ -D-Glucose,  $\beta$ -D-Galactose,  $\beta$ -D-Xylose und  $\alpha$ -L-Rhamnose bestehen, welche (1 $\rightarrow$ 2), (1 $\rightarrow$ 3) oder (1 $\rightarrow$ 4) glycosidisch gebunden sind.<sup>17</sup> Die wichtigsten Zucker stellen dabei die Solatriose (bei  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Solasonin), die Chacotriose (bei  $\alpha$ -Solamargin und  $\alpha$ -Chaconine) und die Lycotetraose (bei  $\alpha$ -Tomatin) dar (siehe Abbildung 10).

### 2.2.3 SGs und Vitamin D-Strukturen in ausgewählten Pflanzen

Glycosilierte steroidale Strukturen wurden in diversen Pflanzen nachgewiesen. Vitamin D-aktive Substanzen sind in Pflanzen hingegen selten und häufig auf Pflanzen des amerikanischen Kontinents beschränkt. Mit dem Wiesen-Goldhafer (*Trisetum flavescens*) konnte speziell eine in Mitteleuropa beheimatete Pflanze identifiziert werden, die bei Weidenrindern, -ziegen und -schafen in Deutschland, Österreich und der Schweiz eine enzootische Kalzinose hervorruft und in derenwässrigen Extrakten Vitamin D-aktive Substanzen nachgewiesen werden konnten.<sup>107,111</sup> Darüber hinaus erobern mit *Solanum melongena* (Aubergine) und *Cucurbita pepo* (Zucchini) zwei Gemüsearten den deutschen Markt, in denen sowohl SGs nachgewiesen werden konnten, als auch Vitamin D-Metabolite diskutiert werden.<sup>4,31</sup>

#### 2.2.3.1 *Trisetum flavescens* (Goldhafer)

Der Goldhafer (*Trisetum flavescens*) ist die einzige in Europa beheimatete kalzinogene Pflanze und darüber hinaus die einzige bekannte, die der Pflanzenfamilie der *Poaceae* (Süßgräser) entstammt. Er ist bereits seit 1974 als Ursache für enzootische Kalzinosen bei grasenden Rindern, Schafen und Ziegen bekannt.<sup>112</sup> Erste Analysen zeigten, dass die Blätter der Pflanze zwar freies Vitamin D<sub>3</sub> enthalten, jedoch in einer nicht calcinogenen Konzentration von etwa 0,1 mg/kg Trockengewicht. Freies 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> wurde hingegen nicht berichtet.<sup>34</sup> Rambeck (1987) schlussfolgerte durch den Vergleich synthetischer Vitamin D-Strukturen mit Vitamin D-Metaboliten aus wässrigen Extrakten von *Trisetum flavescens* in verschiedenen Bioassays, dass in diesem das 25-Glucosid des 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> enthalten sein muss.<sup>111</sup> Bisher erfolgte jedoch weder eine Isolierung, noch eine eindeutige Strukturaufklärung dieser Verbindung in *Trisetum flavescens*. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Vitamin D-Aktivität des Goldhafers ausschließlich bei vorherigem Einfluss von UV-Licht zu beobachten war.<sup>83</sup> Auch ein Einfluss anderer klimatischer Bedingungen auf die kalzinogene Aktivität wurde belegt.<sup>84</sup>

Neben dem Vitamin D<sub>3</sub> konnten im Goldhafer bisher ausschließlich die steroidal Strukturen des Cholesterols,  $\Delta^7$ -Cholestenols, Campesterols, Stigmasterols,  $\beta$ -Sitosterols und des  $\Delta^{7,24}$ -Stigmastadienols nachgewiesen werden.<sup>36</sup> Zu glycosilierten Sterolen liegen bisher noch keine Daten vor. Es konnte jedoch das Phytoecdysteroid des 20-Hydroxyecdysone-3- $\beta$ -D-Glucopyranosid belegt werden, welches vermutlich von der Pflanze als Schutz gegen Fraßfeinde synthetisiert wird.<sup>113</sup>

Alles in allem wurde die kalzinogene Wirkung des Goldhafers zwar in diversen Studien belegt, der genaue Mechanismus und die verantwortlichen Strukturen konnten jedoch bis zum heutigen Zeitpunkt nicht geklärt werden.<sup>29,35,111,34</sup> Darüber hinaus existieren keine Studien zu

SGs, welche eine enge strukturelle Verwandtschaft mit den glycosilierten Vitamin D-Strukturen aufweisen.

### 2.2.3.2 *Solanum melongena* (Aubergine)

Aus der Pflanzenfamilie der *Solanaceae* stellt die Aubergine (*Solanum melongena*) eine Spezies dar, die reich an bioaktiven Substanzen ist. Zu denen zählen neben einer Vielzahl an Glycoalkaloiden und Saponinen auch diverse SGs, die bereits in vorherigen Studien charakterisiert wurden (siehe Tabelle 4).<sup>4,20,88,114</sup> Dabei wurden hauptsächlich die Monoglucoside von diversen Sterolen isoliert, wohingegen Glycoalkaloide und Saponine die unterschiedlichsten Glycosilierungsmuster aufweisen.<sup>4,17,115</sup> So werden verschiedenste Mono-, Di-, Tri- und Tetrasaccharide beschrieben.<sup>20</sup> Wie in Tabelle 4 zusammengefasst, konnten bisher in der Aubergine als intakte Strukturen die SGs des Sito-Glc, Stigma-Glc und das Poriferasterol-Glc ((24R)-Stigma-Glc) als  $\beta$ -Glucoside mittels NMR nachgewiesen werden.<sup>12,116</sup> Darüber hinaus wurden diverse SGs mittels Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC-MS) oder Flammenionisationsdetektor (GC-FID) nach Trimethylsilylierung quantifiziert. Die Quantifizierung erfolgte in diesen Studien nach Hydrolyse über das Aglykon, weshalb keine Aussage zum Zuckeranteil gemacht wurde und die einfachen Glucoside als Derivate angenommen wurden.<sup>4,13</sup>

Tabelle 4: Bisherige Studien qualitativer und quantitativer Nachweise von SGs in *Solanum melongena*

Autor/ Literaturstelle	Art des SGs	Gehalte der SGs	Pflanzen- teil	Nachweismethode/Charakterisierung/ Quantifizierung
Chiang et al. (2008) <sup>116</sup>	Sito-Glc	13,33 $\mu\text{g/g}$ FW	Wurzel	Gravimetrie; <sup>1</sup> H-NMR; <sup>13</sup> C-NMR; FAB-MS
	Stigma-Glc	11,78 $\mu\text{g/g}$ FW		
Shabana et al. (2013) <sup>12</sup>	Sito-Glc	146 $\mu\text{g/g}$ FW	Schale	Gravimetrie; <sup>1</sup> H-NMR; <sup>13</sup> C-NMR
	Poriferasterol-Glc	102 $\mu\text{g/g}$ FW		
Nyström et al. (2012) <sup>4</sup>	Sito-Glc	48,3 $\mu\text{g/g}$ TW	gesamte Frucht	Analytik des Aglykons nach saurer Hydrolyse der SGs mittels GC-MS/FID; Quantifizierung der freien Sterol- Trimethylsilyl Ether über internen Standard (Dihydrocholesterol)
	Stigma-Glc	12,7 $\mu\text{g/g}$ TW		
	Camp-Glc	4,1 $\mu\text{g/g}$ TW		
	andere SGs	2,2 $\mu\text{g/g}$ TW		
	Stanol-Glcs	0,3 $\mu\text{g/g}$ TW		
Zimowski (1996) <sup>13</sup>	Sito-Glc*	37-56 $\mu\text{g/g}$ FW	Blätter/ Frucht/ Wurzel	GC/MS, GC/FID Quantifizierung als Trimethylsilyl- Derivate nach Silylierung der intakten SGs
	Stigma-Glc*	11-12 $\mu\text{g/g}$ FW		
	Camp-Glc*	4-6 $\mu\text{g/g}$ FW		
	Chol-Glc*	1-4 $\mu\text{g/g}$ FW		

TW: Trockengewicht; FW: Frischgewicht; FAB-MS: Fast Atom Bombardment-Massenspektrometrie; \*schwankende Gehalte durch Differenzierung nach unterschiedlichen Pflanzenteilen

Die Ergebnisse der Studien verdeutlichen, dass das Sito-Glc, gefolgt von Stigma-Glc und Camp-Glc, die dominierende Struktur in Auberginen darstellt. Darüber hinaus konnten von Nyström et al. (2012) weitere nicht genau spezifizierte glycosilierte Sterole und Stanole quantifiziert werden.<sup>4</sup> Zimowski (1996) erfasste in verschiedenen Pflanzenteilen, neben den typischen SGs des Sito-Glc, Stigma-Glc und Camp-Glc unterschiedlicher Konzentrationen, auch das Chol-Glc.<sup>13</sup> Auch Dupéron et al. (1984) beschreibt das Chol-Glc in Auberginen, macht jedoch keine quantitativen Aussagen. Es wird ausschließlich ein Anteil von 22 % SGs in der gesamten Sterolfraction beschrieben.<sup>117</sup> Als Vertreter der *Solanaceae* werden in der Aubergine auch Vitamin D-Strukturen diskutiert. Die Biosynthese dieser Strukturen verläuft über das für Pflanzen untypische Cholesterol, wobei ein Intermediat

der Cholesterolsynthese das 7-Dehydrochoelsterol darstellt.<sup>28</sup> Dieses kann lichtinduziert in das aktive Vitamin D<sub>3</sub> umgewandelt werden.<sup>58</sup> Nicht zuletzt deshalb wird vor allem in *Solanaceae* das Auftreten von freien und glycosilierten Vitamin D-Strukturen vermutet.<sup>29</sup> Im Gegensatz zur Tomate und Kartoffel konnten in den Blättern der Aubergine bisher jedoch keine D-Vitamere in freier oder gebundener Form nachgewiesen werden.<sup>31,78</sup>

Neben den steroidal Strukturen existieren in der Aubergine jedoch auch andere glycosilierte Strukturen. So liegen die wasserlöslichen Farbstoffe der Anthocyane, welche der Klasse der Polyphenole zugeordnet werden können, zum großen Teil glycosiliert vor.<sup>118-120</sup>

Bisher konnten jedoch ausschließlich die Monoglucoside der SGs in Auberginen erfasst werden. Nach Vitamin D-Metaboliten wurde dagegen ausschließlich in den Blättern gesucht, die Früchte, in welchen ein Großteil der steroidal und glycosilierten Strukturen zu finden sind, wurden hingegen in keiner Studie analysiert.<sup>28</sup>

### 2.2.3.3 Cucurbita pepo (Zucchini)

Die Zucchini (*Cucurbita pepo*) stammt aus der Gattung der Kürbisgewächse (*Cucurbitaceae*) und stellt damit eine Art dar, welche reich an  $\Delta^7$ -Sterolen ist.<sup>15</sup> In Folge dessen konnten auch eine Reihe von Glucosiden der  $\Delta^7$ -Sterole charakterisiert werden. Dazu zählen unter anderem die  $\beta$ -D-Glucoside des Spinasterol, des Poriferasta-7,25-dienol, des 25-Dehydrochondrillasterol, des 5 $\alpha$ -Stigmasta-7,25-dien-3-ol und des 24- $\beta$ -Ethyl-5- $\alpha$ -Cholesta-7-trans-22,25(27)-trien-3- $\beta$ -ol.<sup>4,14,15</sup>

Dennoch konnten auch Glucoside von  $\Delta^5$ -Sterolen wie das Sito-Glc und das Camp-Glc identifiziert werden.<sup>4,92</sup> Zusätzlich wurden diverse Secosteroide und freie Vitamin D-Strukturen nachgewiesen. So quantifizierte Aburjai et al. (1998) einen Vitamin D<sub>3</sub>-Gehalt von 0,23  $\mu$ g/g Frischgewicht in Zucchiniblättern.<sup>31</sup> Glycosilierte Vitamin D-Strukturen sowie das Chol-Glc konnten bisher in keiner Studie nachgewiesen werden.

## 2.3 Analytik glycosidisch gebundener steroidal Strukturen

Glycosidisch gebundenesteroidale Strukturen stellen mittelpolare Minorbestandteile in einer komplexen Pflanzenmatrix dar, welche nur sehr schwer aus dem Probenmaterial zu extrahieren sind. Daher bedarf es einer aufwendigen Methode zur Extraktion, Isolation und Anreicherung der Zielstrukturen, um eine exakte Analytik zu ermöglichen.

Für die Analytik steroidal Strukturen wurden eine Vielzahl chromatographischer Analysemethoden entwickelt. Die wichtigsten stellen dabei die Gaschromatographie (GC) und die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) dar. Die meisten Detektionssysteme, wie der Ultraviolett/sichtbares Licht-Detektor (UV-Vis), der Lichtstreuungsdetektor (ELSD) und der Flammenionisationsdetektor (FID) sind für steroidale Strukturen nicht spezifisch und können co-eluierende Analyten nur sehr schwer voneinander trennen.<sup>50</sup> Daher wird in neuester Literatur nahezu ausschließlich auf massenspektrometrische (MS) Detektionssysteme zurückgegriffen.

### 2.3.1 Anreicherung und Isolierung aus pflanzlichen Proben

Zur Anreicherung von steroidal Strukturen werden meist organische Lösemittel genutzt, um die unpolaren Strukturen aus der wässrigen Matrix pflanzlicher Proben zu extrahieren. Dazu werden meist Chloroform, Methanol, Hexan, Methylenchlorid oder Aceton genutzt und durch anschließende Verseifung freie Fettsäuren abgetrennt. Eine anschließende Aufreinigung der freien Sterole kann mittels Säulenchromatographie (SC), Dünnschichtchromatographie (DC) oder Festphasenextraktion (SPE) erreicht werden.<sup>121</sup> Glycosilierte steroidale Strukturen weisen durch die polare Kopfgruppe einen tensidartigen Charakter auf, was sowohl die Löslichkeit, als auch das chromatographische Verhalten beeinflusst und eine Isolation aus der komplexen Pflanzenmatrix deutlich erschwert und neuartige Methoden zur Anreicherung dieser speziellen Substanzklasse erfordert.<sup>4,5</sup>

#### 2.3.1.1 Extraktion aus Pflanzenmaterial

Zur Extraktion von SGs werden eine Vielzahl von Lösemitteln und Lösemittelgemischen beschrieben. Mit den SGs werden in der Regel gleichzeitig auch andere Lipide extrahiert. Da es sich bei den SGs um Detergenzien handelt, welche sowohl in rein organischen als auch rein polaren Lösemitteln nur schlecht löslich sind, wird meist eine Mischung aus Chloroform und Methanol 2:1 (v/v) verwendet, um SGs effektiv aus vorgetrocknetem Pflanzenmaterial zu extrahieren.<sup>5,22,43</sup> Aber auch rein methanolische Extrakte haben sich bewährt.<sup>1,12</sup>

Während SGs mit mittelpolaren Lösemitteln extrahierbar sind, konnten glycosilierte Vitamin D-Strukturen auch in wässrigen Extrakten beobachtet werden, was für eine deutlich höhere Polarität spricht.<sup>35</sup> Dennoch wird auch bei diesen meist eine Extraktion mit Lösemitteln mittlerer Polarität wie Methanol, Aceton oder einem Gemisch aus Methanol und Chloroform 2:1 (v/v) beschrieben.<sup>86</sup> In der Regel werden die unpolaren freien Vitamin D-Strukturen und andere Lipide mit einem organischen Lösemittel wie *n*-Hexan oder Chloroform abgetrennt und der Rückstand des Pflanzenmaterials mit Wasser oder den erwähnten mittelpolaren Lösemitteln extrahiert.<sup>104,111,122</sup>

#### 2.3.1.2 Präparative Säulenchromatographie (SC)

Die am häufigsten genutzte Methode zur Anreicherung glycosidisch gebundener steroidal Strukturen stellt die klassische Säulenchromatographie (SC) an Kieselgel dar. Dabei können vor allem Fettbegleitstoffe der vorherigen Extraktion, wie Lipide, freie Fettsäuren, freie Sterole, SEs und ASGs entfernt werden. Stark unpolare Lösemittel wie *n*-Hexan und Diethylether oder ein Gemisch aus beiden 1:1 (v/v) sind effektiv geeignet, um Lipide, SE und FS zu eluieren. Die polarerer ASGs können durch Gemische aus *n*-Hexan/Diethylether 3:2 (v/v) oder Dichlormethan/Ethylacetat 2:3 (v/v) abgetrennt werden. Zur Elution von ASGs und SGs mit unterschiedlichen Glycosilierungsgraden werden verschiedenste Gemische aus Chloroform und Methanol beschrieben. Dabei sorgt ein steigender Anteil an Methanol für eine Elution von ASGs (2 % Methanol), Mono-SGs (5 % Methanol), Di-SGs (6-8 % Methanol), Tri-SGs (35 % Methanol) und Tetra-SGs (über 40 % Methanol). Alternativ wird anstelle von Methanol auch ein Gemisch aus Chloroform/Aceton 6:4 (v/v) beschrieben. Die

quantitativ bedeutendsten Mono-SGs können mit einem Methanolanteil von 4-10 % in Chloroform am effektivsten eluiert werden.<sup>5</sup>

Für die Trennung einzelner glycosilierte steroidaler Strukturen und eine anschließende Quantifizierung wird auch eine Säulenchromatographie mit Sephadex LH-20 Material beschrieben. Diese stellt eine Mischung aus Größenausschluss- und Adsorptionschromatographie dar. Zur Elution bieten sich dabei Gemische aus Methanol und Wasser an.<sup>12,123,124</sup>

### 2.3.1.3 Festphasenextraktion (solid phase extraction, SPE)

Neben der klassischen SC bietet auch die Festphasenextraktion (SPE) eine schnelle und einfache Möglichkeit zur Feinaufreinigung von Extrakten mit Gemischen verschieden glycosilierter Sterole sowie einzelner SGs. So wird eine Trennung von SGs, ASGs und anderen Sterolen mit Diol SPE-Kartuschen beschrieben, wobei die SGs nach vorherigem Waschen der Säule mit Heptan-Isopropanol 85:15(v/v) eluiert wurden.<sup>4</sup> In einer anderen Literaturstelle wird die Aufreinigung mit Benzolboronsäure-SPE Säulen beschrieben, wobei die SGs mit Methanol und einem Zusatz von 1 mmol Sorbitol eluiert werden konnten.<sup>125</sup> Im Prinzip ist auch einfache Kieselgel-basierte SPE zur Trennung von SGs und anderen steroidal Strukturen geeignet. Dabei können zunächst FS mit Chloroform und anschließend SGs mit Methanol oder einer Mischung aus Aceton-Isopropanol 1:1(v/v) eluiert werden.<sup>126,127</sup> Somit stellt auch die SPE eine Möglichkeit dar, um SGs gezielt anzureichern, wobei die unterschiedlichsten Säulenmaterialien genutzt werden können. Eine sorgfältige Auswahl des geeigneten Elutionsmittels ist dabei die Grundlage für eine effektive Anreicherung der SGs.

### 2.3.1.4 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die DC ist in der Regel der letzte und finale Schritt der Aufreinigung von glycosilierten steroidal Strukturen. In den meisten Fällen werden Normalphasen aus Kieselgel zur Trennung von ASGs, SEs glycosilierter Ceramiden und SGs mit unterschiedlichen Glycosilierungen genutzt. SGs werden für gewöhnlich mit Laufmittelsystemen aus Chloroform-Methanol und Wasser angereichert. Dabei variiert die genaue Mischung der Lösemittel zwischen einzelnen Autoren, sodass das genaue Volumenverhältnis nach den zu trennenden Substanzen angepasst werden kann. Am geeignetsten zeigte sich ein Gemisch aus Chloroform/Methanol/Wasser im Verhältnis 65:25:4 (v/v/v), um die erwähnten steroidal Strukturen zu trennen. Ein Zusatz von Essigsäure zum Laufmittelgemisch wird von einigen Autoren beschrieben.<sup>5,128,129</sup> ASGs und SGs können effektiv mit Chloroform/Methanol 9:1(v/v) voneinander getrennt werden. Zur Trennung von Sito-Glc und SEs hat sich zudem auch ein System aus Hexan und Ethylacetat 3:2(v/v) bewährt. Prinzipiell sind auch bei der DC ähnlich zur SC verschiedene Systeme anwendbar, wobei die an der DC getesteten Systeme meist in großem Maßstab auf die SC übertragen werden.<sup>23</sup> Zur unspezifischen Detektion der jeweiligen Substanzen genügt dabei ein Sprühreagenz aus 50 %iger Schwefelsäure.<sup>5</sup> Soll eine spezifische Detektion steroidal Strukturen erfolgen, so bieten sich verschiedene Sprühreagenzien aus *p*-Anisaldehyd und Schwefelsäure, Orcin und Schwefelsäure, Anthron und Schwefelsäure, ortho-Phtaldialdehyd oder das Liebermann-

Burchard Reagenz an.<sup>5,42,125,129</sup> Neben der qualitativen Trennung von SGs verschiedener Glycosilierungen bietet die DC auch eine Möglichkeit der quantitativen Bestimmung mittels DC-Densitometrie, welche jedoch im Vergleich zu HPLC-Methoden seltener genutzt wird.<sup>22,129</sup>

### 2.3.1.5 MLCCC (Gegenstromverteilungschromatographie)

Anfang 1970 wurde unter anderem von Yoichiro Ito mit der CCC (countercurrent chromatography) ein neuartiges Verfahren entwickelt, das in die flüssig-flüssig Verteilungschromatographie eingeordnet werden kann. Sie bietet eine schonende Alternative zur Aufreinigung und Anreicherung von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen aus komplexen Matrices.<sup>130,131</sup> Im Laufe der Jahre wurden eine Reihe von CCC-Systemen entwickelt, wobei die MLCCC (multilayer coil countercurrent chromatography) eine spezielle Anwendung mit einem in mehreren Lagen um eine Achse gewickelten System darstellt. Das Trennverfahren beruht auf einem wiederholten Einstellen von Verteilungsgleichgewichten zweier nicht mischbarer Flüssigkeiten, ähnlich einem wiederholten Trennvorgang in einem Scheidetrichter. Dabei rotiert eine Spule, um die ein Schlauch gewickelt wurde, wie eine planetarische Zentrifuge um eine feste Achse, wobei es zu wiederholten Trennvorgängen zwischen der mobilen und stationären Phase kommt. Während Zentrifugalkräfte die stationäre Phase fixieren, wird die mobile Phase kontinuierlich durch die Spule gepumpt.<sup>130-133</sup> Der wesentliche Unterschied zur herkömmlichen Flüssigkeitschromatographie (LC) ist das Vorliegen einer flüssigen und variablen stationären Phase, sowie einer kontinuierlichen Bewegung des chromatographischen Systems während der Trennung.<sup>134</sup> Das System wird hauptsächlich durch das Fließmittelsystem, die Rotationsgeschwindigkeit und die Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase bestimmt.<sup>135</sup> Die üblichen Fließmittelsysteme bestehen aus einem Gemisch von *n*-Hexan, Ethylacetat, Methanol und Wasser, wobei die Polarität des Systems durch Variation der Lösemittelkomponenten soweit angepasst werden kann, dass ein geeigneter Verteilungskoeffizient zwischen oberer (organischer) und unterer (wässriger) Phase für den zu isolierenden Analyten eingestellt werden kann. Für polare Analyten werden darüber hinaus auch andere Lösemittelsysteme, die auf Methyl-*tert*-butylether, Diethylether, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, *n*-Butanol, Ethanol, Acetonitril, Wasser und Mischungen aus diesen beruhen, eingesetzt. Ein Zusatz von Säuren oder Laugen kann darüber hinaus zur Einstellung des pH-Wertes genutzt werden, um die Elution der Analyten in Abhängigkeit des pKs-Wertes zu Verzögern oder zu Beschleunigen. Für gewöhnlich werden dazu Eisessig, Dichloressigsäure, Trifluoressigsäure, Salzsäure, Natronlauge oder Natriumcarbonat zugesetzt.<sup>135</sup> Prinzipiell unterscheidet man zwischen einer Elution im „Head to tail“ und „Tail to head“ Modus, wobei beim „Head to tail“ Modus die schwerere, wässrige Phase als mobile Phase verwendet wird, wohingegen im „Tail to head“ Modus die leichtere, organische Phase als mobile Phase dient. Die Optimierung für spezifische Analyten anhand der einzelnen Parameter wie Spulenvolumen, Laugmittelgeschwindigkeit, Rotationsgeschwindigkeit der Spule und Wahl der stationären Phase wurde ausführlich von Ito (2005)<sup>135</sup> beschrieben und muss für jede Gruppe von Analyten speziell entwickelt werden, um eine geeignete Trennung gewährleisten zu können, wobei vor allem die Polarität der Analyten von Bedeutung ist.<sup>135</sup>

Im Vergleich zu herkömmlichen LC-Methoden bietet die CCC eine gute Alternative zur Anreicherung polyphenolischer Naturstoffe wie Flavonoide oder auch Alkaloide. Diese zeigen oft unscharfe Signale bei der RP-HPLC und eine irreversible Adsorption an Kieselgel, weshalb einverlustfreie Anreicherung meist nicht gegeben ist. Durch die CCC können die Analyten ohne Adsorptionseffekte getrennt und bei Bedarf vollständig zurückgewonnen werden. Der Einsatzbereich der CCC ist sehr variabel. So ist die CCC sowohl für den Spurenbereich, als auch für größere Analytmengen geeignet, was sie auch für den präparativen Maßstab interessant macht.<sup>136,137</sup>

Alles in allem stellt die MLCCC eine vielversprechende Methode zur Anreicherung von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen in einem weiten Polaritätsbereich dar, weshalb diese auch für SGs und glycosilierte steroidale Strukturen geeignet ist. Zwar ist die Trennung mittels MLCCC im Vergleich zur HPLC deutlich zeitaufwendiger, jedoch kann dies durch größere Analytmengen kompensiert werden, womit ein deutlich größeres Probenvolumen bei einer Trennung aufgearbeitet werden kann. Der entscheidende Vorteil dieser Methode ist jedoch die verlustfreie Anreicherung im Vergleich zu säulenchromatographischen (SC) Verfahren. So sind nach MLCCC-Anreicherungen auch quantitative Aussagen zu den Analyten möglich, während bei der SC immer von adsorptiven Verlusten auszugehen ist.<sup>134</sup>

### 2.3.2 Hydrolyse glycosidisch gebundener Sterole

Intakte SGs sind für übliche Analysenmethoden nur sehr schwer zugänglich und für viele Detektionsarten ist eine Derivatisierung nötig. Daher stellt die Hydrolyse glycosidisch gebundener steroidaler Strukturen eine einfache Möglichkeit dar, um das Aglykon von der Zuckereinheit zu trennen und dieses für eine Derivatisierung zugänglich zu machen. Zur Hydrolyse der glycosidischen Bindung haben sich zwei wichtige Methoden durchgesetzt. Dabei handelt es sich zum einen um eine rein chemische Methode durch die Umsetzung im Säuren und zum anderen um eine enzymatische Methode mit verschiedenen Glucosidasen, welche gezielt die glycosidische Bindung spalten.<sup>9</sup> Eine wichtige Voraussetzung für eine verlustfreie und gezielte Hydrolyse ist dabei die Stabilität der Aglykone gegen die eingesetzten Bedingungen, weshalb die jeweilige Hydrolysemethode mit Bedacht gewählt werden sollte.

#### 2.3.2.1 Saure Hydrolyse

In der Literatur werden mehrere Möglichkeiten der sauren Hydrolyse glycosidisch gebundener Strukturen beschrieben. Hauptsächlich werden die Mineralsäuren der Schwefelsäure und Salzsäure in einem mittelpolaren protischen Lösemittel, wie Methanol oder Ethanol, eingesetzt. Aber auch eine Mischung eines protischen mit einem aprotischen Lösemittel, wie beispielsweise einer Mischung aus Trifluoressigsäure mit 1,4-Dioxan, wird beschrieben.<sup>138,139</sup> Meist erfolgt eine einfache und sichere Hydrolyse mit zwei bis sechs molarer Salzsäure und anschließendem Erhitzen bei Temperaturen um die 80 °C in Ethanol oder Methanol, wobei die Inkubationszeit zwischen 30 Minuten und zwei Stunden variiert.<sup>9,16,43,140,141</sup> Nach hydrolytischer Spaltung des Aglykons vom Zuckeranteil kann die organische Phase mit einem polaren Lösemittel extrahiert und anschließend auf FS untersucht werden. Zwar stellt die saure Hydrolyse eine einfache und wirksame Methode dar, um

Aglykon und Zuckeranteil glycosidisch gebundener Strukturen voneinander zu trennen, jedoch besteht durch die teils drastischen Bedingungen die Gefahr von Umlagerungs- und Nebenreaktionen, welche meist keine quantitative Hydrolyse der glycosilierten Sterole erlaubt. Durch die angewandten Bedingungen konnten vor allem säurekatalysierte Dehydrierungen für  $\Delta^5$ -Sterole und Thermo-oxidationen an den C=C-Doppelbindungen beobachtet werden.<sup>142,143</sup> So wird beispielsweise eine Isomerisierung des  $\Delta^5$ -Avenasterols in Fucosterol, Lathosterol und verschiedene Stigmadienole durch die Hydrolysebedingungen beobachtet.<sup>43</sup> Wie Münger et al. (2015) gezeigt haben, sind vor allem die  $\Delta^7$ -Sterole sehr anfällig für Umlagerungsreaktionen, wohingegen die  $\Delta^5$ -Sterole eine höhere Stabilität aufweisen. So konnte Phillipps et al. (2005) eine nahezu vollständige Wiederfindung der  $\Delta^5$ -Sterole des  $\beta$ -Sitosterols, Campesterols, Stigmasterols und Brassicasterols nach saurer Hydrolyse zu beobachten. Im Gegensatz dazu konnten Münger et al. (2015) in keinem Fall die zudosierten steroidalen Strukturen wiederfinden.<sup>9,16</sup> Durch zusätzliche Doppelbindungen und die Öffnung des B-Rings im Sterolgrundgerüst und damit zusätzliche Funktionalisierungen sind glycosilierte Vitamin D-Strukturen noch weitaus empfindlicher gegenüber niedriger pH-Werte und hoher Temperaturen, weshalb sie für eine quantitative saure Hydrolyse nahezu ungeeignet sind und für Vitamin D-Konjugate bevorzugt enzymatische Methoden eingesetzt werden.<sup>144</sup>

Damit stellt die saure Hydrolyse zwar eine einfache, schnelle und kostengünstige Möglichkeit zur Trennung des Aglykons und Zuckeranteils dar, welche jedoch eine sorgfältige Validierung verlangt, um die Stabilität des Aglykons gegenüber den sauren Bedingungen zu verifizieren. Bezüglich des Zuckeranteils ist von einer Hydrolyse aller hydrolysierten Oligosaccharide in die jeweiligen Monosaccharide auszugehen. Darüber hinaus können durch das Erhitzen im stark sauren Dehydratisierungsreaktionen auftreten, die zu einer Vielzahl von Furan- und Pyranverbindungen führen und eine quantitative Bestimmung der Zuckerstrukturen nicht zulassen.

### 2.3.2.2 Enzymatische Hydrolyse

Eine mildere und schonendere Alternative zur sauren Hydrolyse von glycosilierten Strukturen stellt die enzymatische Umsetzung mit verschiedenen Glucosidasen dar. In der Literatur werden dazu unterschiedliche Enzyme beschrieben, wobei einzelne  $\beta$ -Glucosidasen oder Enzymmischungen eingesetzt werden. So wurde unter anderem  $\beta$ -Glucosidase aus Mandeln oder mikrobielle  $\beta$ -Glucosidase aus *Aspergillus niger* (Cellobiase Novozym 188), Xylanase,  $\beta$ -Glucanase sowie Exo- und Endoinulinasen aus *Aspergillus niger* genutzt, um eine Hydrolyse der SGs zu erzielen.<sup>9,10,145-147</sup> Kalinowska et al. (1978) beschreibt darüber hinaus eine Methode durch Inkubation mit Sterylglycosidhydrolase (SGH) und UDPG-Glucosyltransferase, welche zuvor aus weißem Senf (*Sinapis alba*) als Protein-Aceton-Trockenpulver isoliert wurde.<sup>148</sup>

Eine umfangreiche Studie zur Wirksamkeit verschiedener Glucosidasen in Abhängigkeit der chemischen und physikalischen Bedingungen wurde von Nyström et al. (2008) durchgeführt.<sup>10</sup> Dabei wurden unterschiedliche Puffersysteme genutzt. Zum einen wurde ein Acetatpuffer bei einem pH von 4,0 und zum anderen ein Citratpuffer bei einem pH von 5,0 verwendet. Die schlecht löslichen SGs wurden zuvor in einem geringen Volumen an Dimethylsulfoxid (DMSO) als Dispergiemittel aufgenommen und anschließend mit der

jeweiligen Pufferlösung versetzt. Somit konnte eine homogene Lösung der amphiphilen SGs in den wässrigen Puffersystemen durch das nukleophile, aprotische und dipolare DMSO ermöglicht werden. Die verschiedenen Glucosidasen wurden an einer Mischung verschiedener SGs, welche aus Weizenkleie isoliert wurden, getestet. Dabei zeigte sich, dass bei einer 18 stündigen Inkubation mit 30 U (Enzymeinheiten)  $\beta$ -Glucosidase aus *Aspergillus niger* bei 37 °C und einem pH von 5,0 die besten Hydrolyseratenergebnisse erzielt wurden. Wurde die Enzymmenge variiert, so waren die Hydrolyseraten geringer. Auch durch die zusätzliche Gabe von 2 U der  $\beta$ -Glucosidase nach 18 h Inkubationszeit konnte kein höherer Umsatz, sondern eine um 29 % erhöhte Konzentration der intakten SGs beobachtet werden. Auch der Zusatz von 7 U  $\beta$ -Glucosidase aus Mandeln führte zu 13 % mehr SGs. Es wurde daher geschlossen, dass es zu Konkurrenzreaktionen verschiedener Glucosidasen kommen muss, wobei die genauen Zusammenhänge nicht geklärt werden konnten. Einzig der Zusatz von Taurocholat als zusätzlicher Phasenvermittler steigerte die Hydrolyserate von 50,3 % auf 56,9 %.<sup>10</sup>

Eine andere Studie belegte darüber hinaus deutlich eine Substratabhängigkeit bezüglich der zu hydrolysierenden SGs, sodass generell beim  $\Delta^7$ -Sterol des Spinasterols die höchste Hydrolyserate zu beobachten war. Zwar konnten insgesamt nur geringe Hydrolyseraten beobachtet werden, die stark abhängig von der jeweiligen Pflanzenmatrix waren, jedoch konnten bei den freigesetzten Sterolen keine Umlagerungen oder Fragmentierungen beobachtet werden.<sup>9</sup> Dies macht die enzymatische Hydrolyse vor allem für SGs mit instabilen Aglykonen interessant und bietet somit eine milde Alternative zur chemisch einfacheren und schnelleren sauren Hydrolyse von glycosidisch gebundenen steroidal Strukturen. Dennoch bedarf es auch bei der enzymatischen Hydrolyse einer sorgfältigen Evaluierung, um quantitative Aussagen machen zu können. Grundsätzlich ist diese vor allem für labile und chemisch instabile Strukturen von großer Bedeutung und sollte der sauren Hydrolyse vorgezogen werden.

### 2.3.3 Quantifizierungsmethoden steroidaler Strukturen

Zur chromatographischen Trennung der hydrophoben Strukturen mittels GC oder HPLC werden in der Regel unpolare stationäre Phasen gewählt, die eine ausreichende Auflösung gewährleisten. Während die chromatographische Trennung relativ einfach zu realisieren ist, stellt die Detektion der steroidal Strukturen hingegen eine große Herausforderung dar, weshalb neue Methoden entwickelt werden müssen, um die Strukturen für einfache Detektionsarten zugänglich zu machen.<sup>149</sup>

#### 2.3.3.1 GC-Methoden

Voraussetzung für die Bestimmung mittels Gaschromatographie ist ein ausreichender Dampfdruck zur Überführung der Analyten in die Gasphase. Sterole sind schwach flüchtige Substanzen, weshalb eine ausreichend hohe Temperatur nötig ist, um diese in die Gasphase überführen zu können. Dabei muss jedoch die Empfindlichkeit des Gerätes und auch die Labilität der steroidal Strukturen gegenüber hohen Temperaturen beachtet werden. Durch chemische Derivatisierung der schwer flüchtigen Sterole oder SGs kann die Flüchtigkeit der Moleküle erhöht werden, was diese auch für die GC zugänglich macht. Für Sterole bietet sich

vor allem die 3-Hydroxygruppe an, welche als freie funktionelle Gruppe einfach zugänglich für Derivatisierungen ist. In der Literatur hat sich das Einführen einer Acetat- oder Silylgruppe bewährt, wobei die Reagenzien zur Acetylierung von Sterolen in der Regel sehr reaktive Strukturen darstellen. Daher besteht die Gefahr von Neben- und Umlagerungsreaktionen, welche die Analytik behindern.<sup>121</sup> Die Umsetzung mit Silylierungsreagenzien, wie N,O-Bis-(Trimethylsilyl)-Trifluoroacetamid (BSTFA), N,O-Bis-(Trimethylsilyl)-Acetamid (BSA) oder N-Methyl-N-(Trimethylsilyl)-Trifluoroacetamid (MSTFA), stellt hingegen eine deutlich mildere Reaktion dar. So können die freien Sterole nach Hydrolyse der SGs als Trimethylsilyl (TMS)-Derivat mit der Methode des internen Standards quantifiziert werden.<sup>50</sup> Darüber hinaus wird auch eine Methode zur Silylierung intakter SGs beschrieben, welche jedoch besondere Silylierungsbedingungen erfordert und in sehr hochmolekularen Strukturen resultiert. Dennoch konnte von Pieber et al. (2010) gezeigt werden, dass eine vollständige Silylierung eines synthetischen Chol-Glycerit erreicht werden konnte. Jedoch konnten in dieser Studie nicht alle SGs der eingesetzten Biodieselprobe silyliert werden.<sup>150</sup> Die Detektion der einzelnen Strukturen kann bei vorhandenen Referenzsubstanzen unspezifisch mittels FID oder spezifisch mittels MS erfolgen.<sup>4</sup>

Somit kann die GC als brauchbare Methode zur Identifizierung und Quantifizierung von FSgenutzt werden. Für die Analytik intakter glycosilierter steroidalsteroidaler Strukturen ist diese Methode weniger geeignet, da zum einen die adäquate Derivatisierung der Strukturen und zum anderen die chromatographischen Bedingungen eine große Herausforderung darstellen.

### 2.3.3.2 HPLC-Methoden

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) gilt als die Methode mit überlegener Auflösung zur Trennung steroidalsteroidaler Strukturen. Während zu Anfängen der HPLC noch Normalphasen (NP) genutzt wurden, wird heutzutage verstärkt die Umkehrphasen (RP)-HPLC eingesetzt. Dabei liegt der große Vorteil der RP-HPLC in der Trennung einzelner SGs, während mit der NP-HPLC nur die Summe der SGs quantifiziert werden kann.<sup>5,8</sup> In der Regel werden dabei C18-Phasen genutzt, aber auch eine Methode mit einer C6-RP-Säule wird beschrieben.<sup>146</sup> Als Elutionsmittel der RP-HPLC wird meist eine Gradientenelution mit Gemischen aus Acetonitril-Wasser oder Methanol-Wasser genutzt. Eine isokratische Elution ist selten, kann aber mittels Acetonitril-Dichlormethan 68:32 (v/v) erreicht werden.<sup>5,8</sup> In neuesten Studien zur Bestimmung intakter SGs wird zudem die „UltraHigh Performance Liquid Chromatography“ (UHPLC) verwendet, welche den Vorteil von hoher Auflösung, geringem Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) und kurzer Analysenzeit miteinander vereint.<sup>8</sup>

Einfache und häufig genutzte Detektionsmöglichkeiten sind unter anderem der Ultraviolet (UV), Brechungsindex- (RI) oder Lichtstreuendetektor (ELSD).<sup>8</sup> Dabei stellt die UV-Detektion durch ein fehlendes Chromophor der Sterole ein großes Problem dar, sodass Sterole meist als 1-Anthrone-Derivate bei 254 nm analysiert werden, wobei die Elutionsreihenfolge der glycosilierten Strukturen vergleichbar mit denen der freien Sterole ist.<sup>5</sup> Für SGs besteht diese Möglichkeit durch Blockierung der 3-Hydroxygruppe nicht, weshalb meist eine unspezifische Detektion bei 200 nm erfolgt. Für Vitamin D-Strukturen ist eine sensible UV-Detektion bei Wellenlängen um 254 nm möglich. Für die Detektion mittels RI und ELSD sind keine Derivatisierungen nötig, wobei jedoch auch die Empfindlichkeit sehr gering ist. Ein großes Problem bei der Quantifizierung stellen häufig fehlende Referenzstandards dar, sodass meist

nur die Summe der SGs, nicht aber einzelne SGs erfasst werden können. Daher wird bei neuesten Methoden verstärkt auf die Massenspektrometrie gesetzt, um eine einfache und präzise Quantifizierung der freien Sterole und der SGs zu erzielen.<sup>8,149</sup>

### 2.3.3.3 Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)

Eine bedeutende Anwendung der HPLC, mit einem spezifischen, selektiven und hochsensitiven Detektionssystem, stellt die Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) dar. Für die Substanzklasse der steroidalen Strukturen bietet diese die ideale Voraussetzung, da Probleme wie thermische Labilität, geringe Flüchtigkeit und ein schwaches Chromophor nicht von Relevanz sind. So können steroidale Strukturen in jeglicher Form ohne vorherige Derivatisierung bestimmt werden. Dazu können sowohl Quadrupol-Ionenfallen-Massenspektrometer (QTrap-MS) als auch Quadrupol-Time of Flight-Massenspektrometer (Q-TOF-MS) eingesetzt werden.<sup>8,127,151</sup> Eine entscheidende Rolle spielt die Ionisationstechnik, wobei hauptsächlich das Elektrosprayionisationsverfahren (ESI) oder die Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) genutzt wird. Andere Verfahren wie die Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung (MALDI) oder die „Direct Analysis in Real Time“ (DART) sind prinzipiell möglich, werden aber sehr selten genutzt.<sup>50,8</sup> Während das ESI-MS/MS die sanftere Ionisationsmethode darstellt, erzeugt die wesentlich härtere APCI-Ionisation deutlich mehr Fragmente.<sup>8</sup> Somit können alle Arten steroidaler Strukturen mittels LC-MS/MS bestimmt werden, wobei die Auswahl des speziellen Systems auf den jeweiligen Analyten ausgerichtet sein sollte. Die Nutzung eines MS/MS-Systems erlaubt es, spezifische MRM (Multiple Reaction Monitoring)-Methoden mit charakteristischen Qualifiern und Quantifiern zu entwickeln, welche speziell die Sensitivität bei der Quantifizierung von steroidalen Strukturen deutlich erhöht. Durch charakteristische MS/MS-Übergänge können so Strukturen voneinander unterschieden und im Spurenbereich quantifiziert werden, die ähnliche oder nahezu identische Retentionszeiten aufweisen.<sup>50</sup> Bestimmungs- und Nachweisgrenzen weniger ppb (ng/ml) machen die LC-MS/MS somit zur leistungsfähigsten Methode für die Quantifizierung steroidaler Strukturen jeglicher Art.

Neben der zielgerichteten und quantitativen Analytik bietet die LC-MS über die Auswertung spezifischer Fragmente auch die Möglichkeit der qualitativen Analyse unbekannter Strukturen. Dies ist vor allem in Hinsicht auf die Bestimmung des Zuckeranteils von glycosilierten steroidalen Strukturen von Bedeutung, da dieser in der Regel den einzigen Unterschied im Fragmentierungsmuster verschiedener SGs ausmacht.<sup>8</sup>

### 2.3.3.4 Analytik des Zuckeranteils

Vor allem für die Qualifizierung neuartiger glycosilierter steroidaler Strukturen ist eine spezielle Analytik zur Bestimmung der genauen Struktur des Zuckeranteils essentiell. Eine separate Analytik des Zuckeranteils ist vor allem nach Hydrolyse der Strukturen von Bedeutung. Dazu wird in der Regel die wässrige Phase des Hydrolyseansatzes nach organischer Extraktion der Sterole mittels DC analysiert.<sup>140,152</sup> Als Laufmittel werden in der Regel Alkohol-Wasser-basierte Systeme genutzt. Zur spezifischen Detektion können diverse Sprühreagenzien genutzt werden, wie zum Beispiel das Anilin-Phthalat-Reagenz oder das Anilin-Diphenylamin-Phosphorsäure-Reagenz.<sup>140</sup>

Neben der DC bietet auch die HPLC eine Möglichkeit freigesetzte Zucker zu analysieren, wobei jedoch eine Derivatisierung nötig ist, um die Zuckerstrukturen für entsprechende UV- oder Fluoreszenz (FLD)-Detektionssysteme zugänglich zu machen. Dazu bietet sich eine reduktive Aminierung mit 1-Naphtylamin oder eine Derivatisierung mit Phenylisothiocyanat an.<sup>153,154</sup>

### 3 Zielstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, neuartige glycosilierte Strukturen mit steroidalem Grundgerüst aus ausgewählten Pflanzenfamilien zu isolieren und zu charakterisieren. Dazu sollte zunächst eine verlustfreie Methode zur Anreicherung entwickelt werden, die eine Isolation und Aufkonzentrierung der intakten Strukturen ermöglicht. Zu den Zielstrukturen zählten vor allem die SGs, aber auch glycosilierte Vitamin D-Strukturen, welche bereits in ausgewählten kalzinogenen Pflanzennachgewiesen wurden.<sup>33</sup> Die Analytik von SGs ist dabei nicht trivial und erfordert spezielle Methoden. In der Literatur werden häufig Hydrolysetechniken eingesetzt, um die Zuckerstruktur vom Aglykon zu trennen und anschließend das Sterol und das Glycosid einzeln betrachtet, was in vielen Fällen jedoch zu Umlagerungen durch die häufig sehr drastischen Bedingungen führte.<sup>9,12</sup> Daher sollte anhand synthetischer Standards zunächst das Verhalten der SGs studiert werden, um diese gezielt anreichern zu können. In den angereicherten Extrakten sollten in Folge dessen sowohl die mengenmäßig bedeutendsten Strukturen quantifiziert, als auch neuartige SGs identifiziert werden. Aufgrund der schlechten Zugänglichkeit von SGs für analytische Methoden wie die GC und die HPLC in Kombination mit einfachen Detektionsarten wie FID, RI, ELSD oder UV, war die Entwicklung einer geeigneten Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie-(LC-MS/MS) Methode das Hauptziel, um eine sichere Qualifizierung und Quantifizierung von bekannten Strukturen zu ermöglichen.

Darüber hinaus sollten geeignete Methoden zur Hydrolyse von glycosidisch gebundenen steroidalen Strukturen entwickelt werden, welche eine anschließende Analytik freier Sterole und freier Zucker zulassen. Für die freien Sterole und freien Zucker sollten anschließend LC-MS/MS unabhängige Methoden, wie zum Beispiel die GC-FID, HPLC-FLD oder HPLC-UV/DAD, etabliert werden, die eine einfache und schnelle Qualifizierung des Aglykons und des Zuckers erlauben. Durch diese Methoden sollten unbekannte glycosidisch gebundene steroidale Strukturen verifiziert werden.

Als pflanzliches Untersuchungsobjekt wurde zum einen der Goldhafer (*Trisetum flavescens*) als literaturbeschriebene kalzinogene Pflanze gewählt, um die Struktur der potentiellen Vitamin D-Glucoside aufzuklären.<sup>11</sup> Darüber hinaus ist im Hinblick auf die Vielfalt an glycosilierten Strukturen auch in verschiedenen *Solanaceae* von einem umfassenden Profil an SGs auszugehen. Daher sollte vor allem die Aubergine (*Solanum melongena*) als moderne Genusspflanze als Untersuchungsobjekt dienen. Es soll tenerstmals die klassischen SGs als intakte Strukturen quantifiziert und darüber hinaus neuartige SGs, nach deren Anreicherung, mit der entwickelten Methode qualifiziert werden. Abschließend sollte auch auf glycosilierte Vitamin D und Vitamin D-Vorläuferstrukturen untersucht werden und die Aubergine als potentielle Quelle für pflanzliches Vitamin D charakterisiert werden. Um eine Bildung des Vitamin D<sub>3</sub> zu induzieren, sollte anhand von Bestrahlungsexperimenten gezeigt werden, dass auch in Pflanzen glycosidisch gebundene steroidale Strukturen durch UV-Licht in aktive Vitamin D-Strukturen umgewandelt werden können.<sup>61</sup> Weiterhin sollten auch die Zucchini und der Goldhafer mit der neuartigen Methode auf SGs untersucht werden, um einen Überblick der enthaltenen Strukturen erstellen und neuartige SGs oder glycosilierte Vitamin D-Strukturen identifizieren zu können.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Synthese glycosilierter steroidaler Strukturen

Zum besseren Verständnis der chemischen und chromatographischen Eigenschaften glycosilierter steroidaler Strukturen wurden diverse Modellsubstanzen synthetisiert. Diese dienten während der Entwicklung einer geeigneten Aufarbeitungs- und Anreicherungs- methode als Surrogat, um eine möglichst verlustfreie Anreicherung der Zielstrukturen zu ermöglichen.

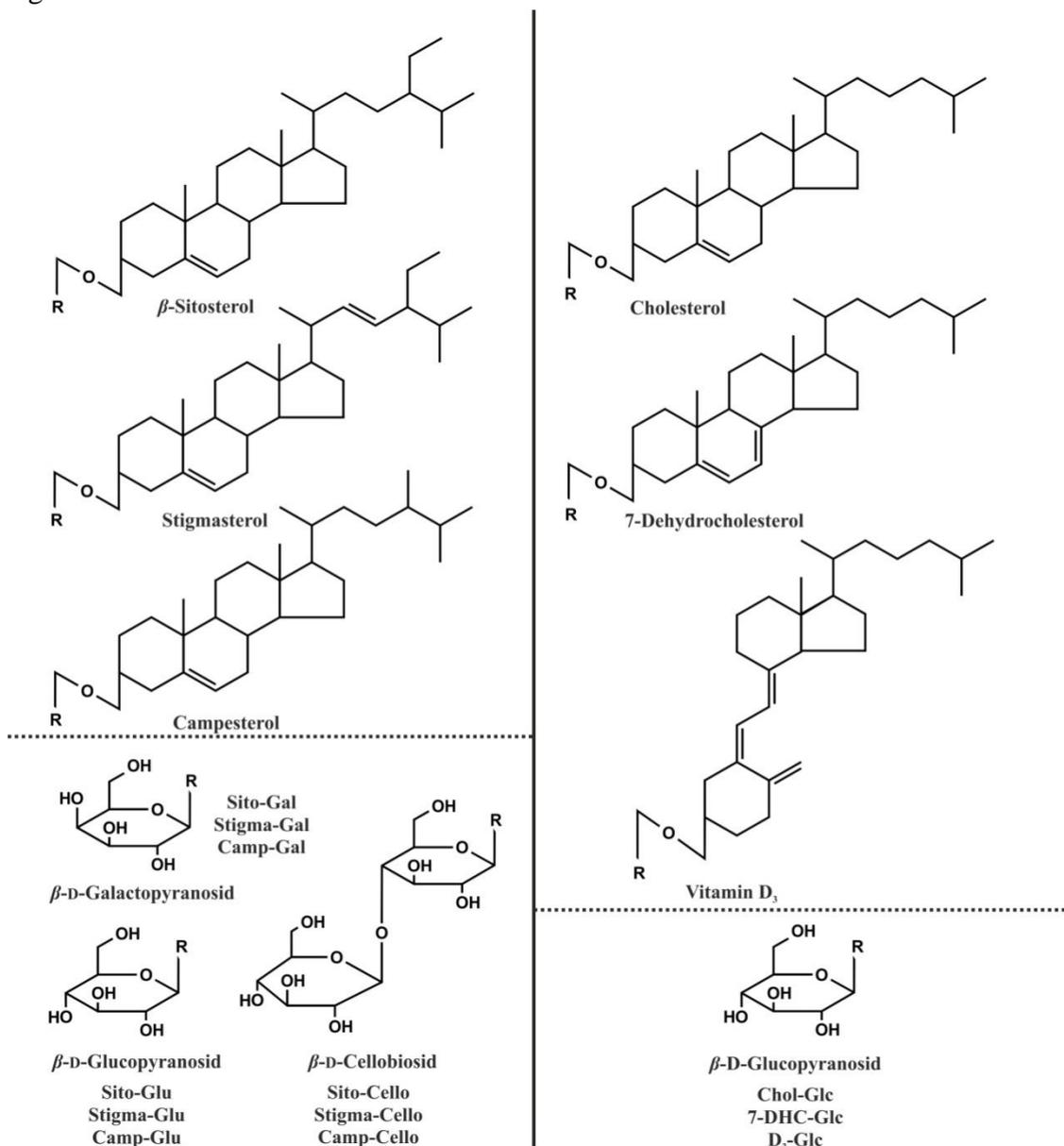


Abbildung 11: Überblick über die Struktur aller synthetisierten steroidalen Glycoside

Insgesamt wurden sechs Synthesen durchgeführt, welche in zwölf verschiedenen glycosilierten Strukturen mit steroidalem Grundgerüst resultierten. Das Cholesterol- $\beta$ -D-Glucosid (Chol-Glc), 7-Dehydrocholesterol- $\beta$ -D-Glucosid (7-DHC-Glc) und Cholecalciferol(Vitamin D<sub>3</sub>)- $\beta$ -D-Glucosid (D<sub>3</sub>-Glc) wurden als Reinsubstanz

synthetisiert. Bei der Synthese der Phytosterolglycoside wurde jeweils eine Sterolmischung als Ausgangsstoff eingesetzt, was in einem Mischstandard aus den jeweiligen  $\beta$ -D-Glycosiden des  $\beta$ -Sitosterols (Sito-Glc, Sito-Gal und Sito-Cello), Stigmasterols (Stigma-Glc, Stigma-Gal und Stigma-Cello) und Campesterols (Camp-Glc, Camp-Gal und Camp-Cello) resultierte. Abbildung 11 fasst die chemischen Strukturen aller synthetisierten Verbindungen zusammen. In der Literatur wurde die Glycosilierung der einfachen Sterole, wie Cholesterol und  $\beta$ -Sitosterol, bereits vielfach durchgeführt, wobei ausschließlich Glucoside synthetisiert wurden.<sup>15,155</sup> Galactoside und Cellobioside diverser steroidaler Strukturen wurden bisher noch nicht als Reinsubstanz hergestellt, konnten jedoch bereits aus ausgewählten Pflanzen isoliert werden.<sup>141,156-159</sup> Glycosilierte Vitamin D-Strukturen, wie das D<sub>3</sub>-Glc und das 7-DHC-Glc wurden bereits von Fürst et al. (1983) nach Koenigs-Knorr Strategie synthetisiert, in dessen Anlehnung auch die Synthese in dieser Arbeit erfolgte.<sup>160</sup>

#### 4.1.1 Synthesestrategie mittels Koenigs-Knorr Reaktion

Mit der Koenigs-Knorr Synthese wurden neben den quantitativ bedeutendsten Sterolen des Cholesterols oder  $\beta$ -Sitosterols, auch Metabolite des Vitamin D-Stoffwechsels, wie das 7-Dehydrocholesterol und Vitamin D<sub>3</sub>, glycosiliert. Die an der Hydroxygruppe des Sterols gebundenen Zucker umfassten neben der Glucose auch die Galactose und die Cellobiose. Die Sterol- $\beta$ -D-Galactopyranoside (Sterol-Gals) wurden als Variation eines Monoglucosides gewählt. Diese dienten zum einen als Surrogat für die Entwicklung einer geeigneten chromatographischen Methode, um Epimerentrennen und unterscheiden zu können, zum anderen als Quantifizierungsstandard für diverse Sterol-Gals. Die Sterol- $\beta$ -D-Cellobioside (Sterol-Cellos) hingegen wurden als Modellsubstanz für SGs mit höheren Zuckeranteilen synthetisiert, um die Eigenschaften der deutlich polarerer Strukturen mit höherem Zuckeranteil beurteilen zu können.

Für die Synthese nach Koenigs-Knorr mussten zunächst die Edukte bereitgestellt werden. Die entsprechenden Steroidalkohole wurden von kommerziellen Chemikalienhändlern bezogen. Dabei waren für die Strukturen des Cholesterols, 7-Dehydrocholesterols und Vitamin D<sub>3</sub> jeweils die Reinsubstanzen ( $\geq 98\%$ ) erhältlich, während die Phytosterole des  $\beta$ -Sitosterols, Stigmasterols und Campesterols nur in einer Mischung verfügbar waren. Die Anteile der Phytosterole wurden vor der Synthese mittels GC-FID bestimmt und ergaben eine Zusammensetzung von 46,6 %  $\beta$ -Sitosterol, 28,0 % Stigmasterol und 25,4 % Campesterol. Für die Kopplungsreaktion zwischen Steroidalkohol und Zuckerstruktur wurden verschiedene Glycosylbromide benötigt, welche anschließend in einem S<sub>N</sub>2-Mechanismus durch Katalyse eines Silbersalzes unter Inversion des anomeren Zentrums an das Sterol gebunden wurden. Die Synthese der Glycosylbromide der  $\alpha$ -Acetobromglucose,  $\alpha$ -Acetobromgalactose und  $\alpha$ -Acetobromcellobiose erfolgte aus dem jeweiligen  $\alpha$ -D-Glucosepentacetat,  $\alpha$ -D-Galactosepentacetat und  $\alpha$ -D-Cellobioseoctaacetat durch einfache Bromierung mit 33 % iger Bromwasserstoffsäure in Eisessig (Abbildung 12). Der vollständige Umsatz wurde mittels DC kontrolliert. Dabei wurden die strukturell ähnlichen  $\alpha$ -Acetobromglucose und  $\alpha$ -Acetobromgalactose mit einem System aus Petrolether-Ethylacetat 3:1 (v/v) durch die R<sub>f</sub>-Werte von 0,42 und 0,39 charakterisiert. Für die  $\alpha$ -Acetobromcellobiose wurde ein System aus Toluol-Eisessig 4:1 (v/v) genutzt, wobei ein R<sub>f</sub>-Wert von 0,28 beobachtet wurde. Die Ausgangsstoffe der fünffach beziehungsweise achtfach acetylierten

Zuckerstrukturen wiesen alle deutlich kleinere  $R_f$ -Werte als die bromierten Reaktionsprodukte auf, was eine eindeutige Unterscheidung ermöglichte. Anschließend wurden die bromierten Produkte mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wurde nach Waschen und Neutralisation aus Diethylether umkristallisiert, sodass ein weißer pulverartiger Feststoff zu beobachten war. Die Charakterisierung erfolgte nach Trocknung im Hochvakuum mittels Kernspinresonanz-spektroskopie (NMR). Die Auswertung erfolgte durch den Vergleich mit literaturbeschriebenen Spektren.<sup>161-163</sup> Die  $\alpha$ -Konfiguration des Broms am C<sub>1</sub> der bromierten Zuckerstrukturen konnte anhand eines charakteristischen Dubletts bei  $\delta$  6,6-6,9 ppm durch die Kopplungskonstante von  $J = 4,0$  Hz eindeutig belegt werden.

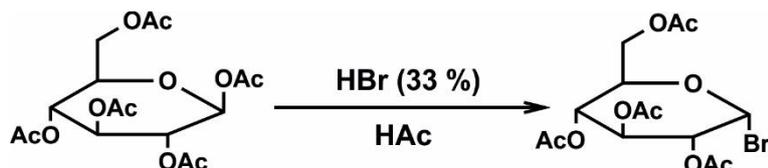


Abbildung 12: Bromierungsreaktion zur Synthese der acetylierten Zuckerstrukturen am Beispiel der  $\alpha$ -Acetobromoglucose

Die Synthese des Silberoxides erfolgte durch einfache Fällung von Silbernitrat mit Natriumhydroxid, wobei ein fein kristalliner, grauer Niederschlag von Silberoxid beobachtet werden konnte.<sup>164</sup> Dieser wurde nach Filtration mit Wasser und Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Das isolierte feine, schwarze Pulver wurde als Katalysator für die Koenigs-Knorr-Reaktion verwendet.

Nach Bereitstellung aller Ausgangsverbindungen erfolgte die Synthese der glycosilierten Sterole nach der Koenigs-Knorr Strategie, die eine einfache und etablierte Methode zur Glycosilierung von Steroidalkoholen in Gegenwart von unlöslichen Silbersalzen darstellt. Die Umsetzung von  $\alpha$ -Acetobromoglucose liefert dabei unter Walden-Inversion in der Theorie ausschließlich die  $\beta$ -Glycoside. In Abhängigkeit des Steroidalkohols und des Silbersalzes wurden jedoch auch die  $\alpha$ -Glycoside und Orthoester als Nebenprodukt beobachtet.<sup>165</sup> Die zweistufige Synthesestrategie ist in Abbildung 13 am Beispiel des  $\beta$ -Sitosterol- $\beta$ -D-Glucopyranosids (Sito-Glc) dargestellt. Die Synthese der Zielstrukturen wurde in Anlehnung an zwei verschiedene Literaturstellen durchgeführt. Dabei beschreibt Wulff et al. (1972) die Synthese des Cholesterol- $\beta$ -D-Glucopyranosids, nach dessen Vorschrift die einfachen Sterol-Glucoside (Sterol-Glcs) und Sterol-Galactoside (Sterol-Gals) synthetisiert wurden.<sup>165</sup> Im Gegensatz dazu wurde die Synthese der Vitamin D-Glucoside und Sterol-Cellobioside (Sterol-Cellos) nach Fürst et al. (1983) durchgeführt.<sup>160</sup> Das eingesetzte Silber-4-Hydroxyvalerat wurde in vorliegender Arbeit durch Silberoxid ersetzt, was in einer etwas schlechteren Ausbeute resultierte, die Reaktion jedoch nach demselben Mechanismus katalysierte. Galactoside und Cellobioside wurden im Gegensatz zu den Glucosiden in der Literatur noch nicht synthetisiert.<sup>15,24,116</sup> Die Synthese aller in Abbildung 11 dargestellten Strukturen erfolgte im Eintopfverfahren, bei dem die drei Ausgangsstoffe in eisgekühltem Diethylether suspendiert und für eineinhalb bis zwei Stunden unter Lichtausschluss gerührt wurden. Anschließend wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und unter regelmäßiger Umsatzkontrolle belassen. Die Reaktionsprodukte wurden mittels DC charakterisiert (siehe, Kapitel 6.2, Seite 97ff.).

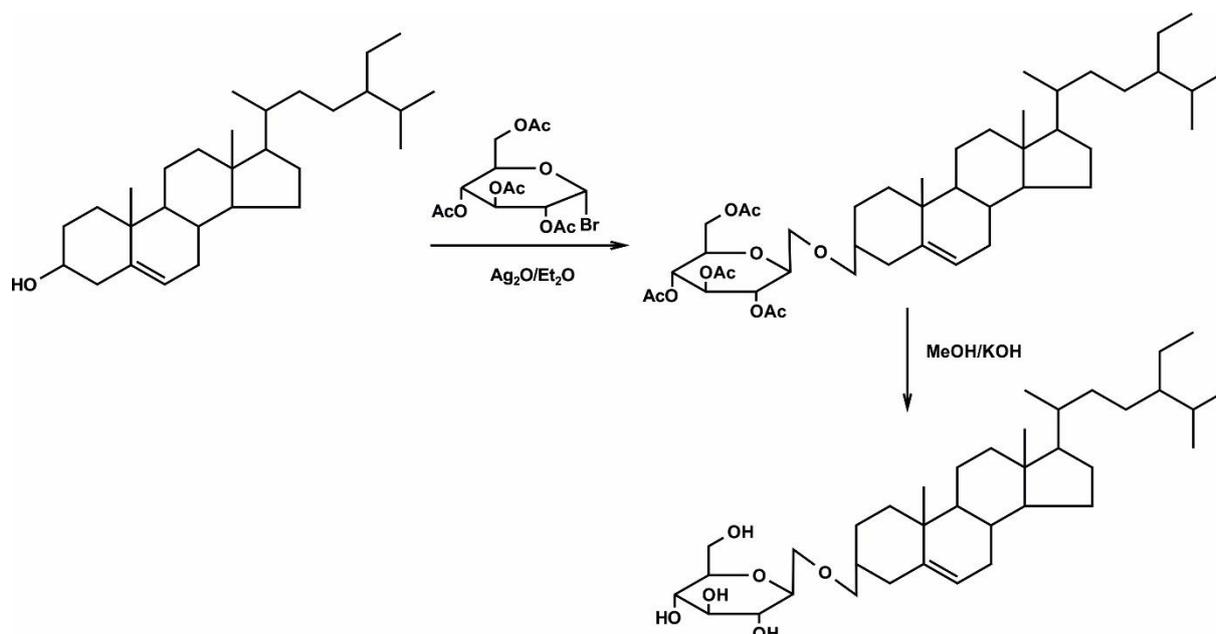


Abbildung 13: Syntheschema nach Koenigs-Knorr am Beispiel des  $\beta$ -Sitosterol- $\beta$ -D-Glucopyranosid

Ein vollständiger Umsatz des Sterols war in keinem Fall gegeben, sodass mittels DC sowohl das freie Sterol ( $R_f$ -Wert > Reaktionsprodukt) als auch diverse nicht näher charakterisierte Nebenprodukte ( $R_f$ -Werte < Reaktionsprodukt) detektiert werden konnten, bei denen es sich aber mit Sicherheit um die von Fürst et al. (1983) beschriebenen  $\alpha$ -Glycoside und Orthoester handelte.<sup>160</sup> Dafür sprach auch die Reaktion auf das Liebermann-Burchard Reagenz, welches unter anderem spezifisch für Sterine und steroidale Strukturen ist (siehe Abbildung 14).<sup>166</sup>

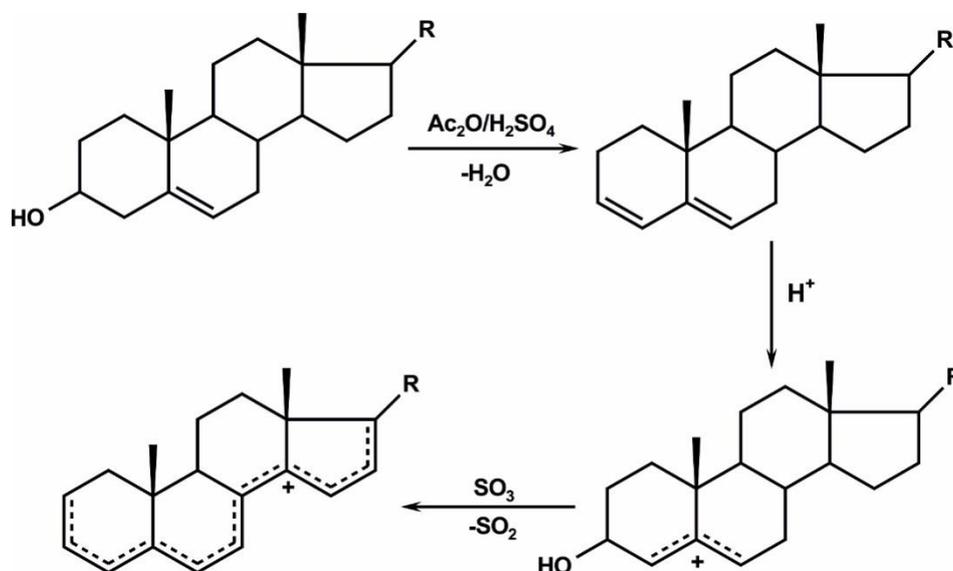


Abbildung 14: Reaktion nach Liebermann Burchard zum Nachweis steroidaler Strukturen

Da für die Strukturen der Sterol-Cellos auch nach 20 Stunden Reaktionszeit und mehrfacher Zugabe frischen Katalysators (Silberoxid) keine ausreichende Bildung des Produktes beobachtet werden konnte, wurde in Anlehnung an Fürst et al. (1983) Dichlormethan im Verhältnis 3:2 (v/v) zum ursprünglich Lösemittel (Diethylether) zugesetzt, was die Ausbeute an Sterol-Cellos deutlich erhöhte.<sup>160</sup> Nach etwa zweistündiger Reaktionszeit wurde der Reaktionsansatz filtriert und getrocknet. Zwar nahm so auch die Anzahl der Nebenprodukte

deutlich zu, welche aber durch die anschließende Aufarbeitung an Kieselgel abgetrennt werden konnten.

Die Zielstrukturen der  $\beta$ -D-Glycoside wiesen nach dem nicht umgesetzten Sterol allesamt die höchsten  $R_f$ -Werte der Produkte des Reaktionsansatzes auf und eluierten somit bei der anschließenden SC an Kieselgel stets als erstes Reaktionsprodukt. Die nicht umgesetzten  $\alpha$ -Acetobromzucker konnten durch deutlich niedrigere  $R_f$ -Werte sehr gut vom Reaktionsprodukt abgetrennt werden. Die SC erfolgte für jede Struktur anhand zuvor optimierter Systeme, wobei zur Anreicherung der Zielstrukturen generell  $R_f$ -Werte kleiner als 0,2 gewählt wurden. Zur Elution wurden Mischungen von *n*-Hexan-Diethylether, *n*-Hexan-Aceton oder Petrolether-Aceton gewählt. Die sauberen Fraktionen wurden auf Reinheit überprüft, vereinigt und anschließend getrocknet. Speziell die acetylierten Sterol-Cellos waren weniger rein und mussten aus Ethanol umkristallisiert werden. Anschließend wurde die Identität mittels NMR-Spektroskopie in Chloroform-*d* überprüft. Charakteristisch waren dabei vor allem die Signale der vier Acetylgruppen der Glucoside und Galactoside beziehungsweise sieben Acetylgruppen der Cellobioside mit den typischen chemischen Verschiebungen von  $\delta$  1,97-2,17 ppm im  $^1\text{H-NMR}$  und  $\delta$  169-171 ppm im  $^{13}\text{C-NMR}$ . Darüber hinaus konnte jeweils die  $\beta$ -Konfiguration der glycosidischen Bindung am  $\text{C}_1'$  des Zuckers durch ein Dublett bei  $\delta$  4,5-4,6 ppm im  $^1\text{H-NMR}$  mit einer Kopplungskonstanten von  $J = 8,0$  Hz, belegt werden.

Die anschließende Deacetylierung der aufgereinigten Zwischenstufen mittels Natriumhydroxidlösung in Methanol verlief für alle Strukturen nahezu quantitativ. Auch hier wurde aufgrund der schlechten Löslichkeit bei Bedarf Dichlormethan zugesetzt. Die vollständige Deacetylierung konnte mittels DC (Laufmittel A-H, siehe Kapitel 6.1.2.2, S.92) überprüft werden und lieferte für alle Reaktionsprodukte einen  $R_f$ -Wert von 0 (siehe Kapitel 6.2, experimenteller Teil, Seite 97ff.). Nach Neutralisation mit Salzsäure im äquimolaren Verhältnis zur eingesetzten Natriumhydroxidlösung wurde mit Wasser verdünnt und die in Wasser nahezu unlöslichen Strukturen als weißer Niederschlag ausgefällt. Nach Elution und Trocknung des Rückstandes wurden die jeweiligen Produkte mittels NMR charakterisiert. Die schwache Löslichkeit der Endprodukte in gängigen Lösemitteln erforderte die Verwendung von Pyridin- $d_5$ , welches neben Dimethylsulfoxid- $d_6$  das einzige Lösemittel darstellte, in welchem alle Strukturen ausreichend löslich waren. Darüber hinaus waren beim Einsatz von Pyridin- $d_5$  keinerlei Überlappungen des Lösemittelsignals mit Signalen der Probe zu beobachten, was eine zuverlässige Auswertung der 1D- ( $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , APT) und 2D-Spektren (H,H-cosy, HMBC, HSQC) erlaubte. Die  $\beta$ -Konfiguration der glycosidischen Bindung am  $\text{C}_1'$  des Zuckers konnte, wie bereits für die acetylierten Zwischenstufen beschrieben, durch ein typisches Dublett bei etwa  $\delta$  5 ppm des  $\text{H}_1'$  mit einer Kopplungskonstante  $J = 7,6-7,9$  Hz bestätigt werden, wohingegen das  $\alpha$ -Anomer eine deutlich kleinere Kopplungskonstante von etwa 3,9 Hz aufweisen würde.<sup>15</sup> Die übrigen Signale des Zuckeranteils konnten im Tieffeld des  $^1\text{H}$ -Spektrums zwischen  $\delta$  3,99 ppm und  $\delta$  5,22 ppm beobachtet werden. Die Unterscheidung zwischen glycosidisch gebundener Galactose und Glucose erfolgte durch das epimere Proton am  $\text{C}_4'$ , welches für die Glucoside ein nicht aufgelöstes Multiplett bei  $\delta$  4,30 ppm ergab, das mit dem Proton des  $\text{C}_3'$  überlappte. Bei gebundener Galactose konnte ein eindeutiges Signal bei  $\delta$  4,62 ppm (d;  $J = 3,4$  Hz; 1H) beobachtet werden. Das Sterolgrundgerüst wurde durch charakteristische Signale zwischen  $\delta$  0,59 und  $\delta$  2,57 ppm im  $^1\text{H}$ -Spektrum sowie 12 ppm und 58 ppm im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum

charakterisiert. Spezifische Signale der Doppelbindungen in der Steranstruktur, die bei hohen chemischen Verschiebungen beobachtet werden konnten, wurden zur Aufklärung der Struktur des Cholesterols,  $\beta$ -Sitosterols, Stigmasterols, Campesterols, 7-Dehydrocholesterols und Cholecalciferols genutzt und waren mit Literaturdatenvergleichbar.<sup>12,15,116,160,165</sup>

Eine besondere Schwierigkeit ergab sich bei der Auswertung der Glucoside, Galactoside und Cellobioside des  $\beta$ -Sitosterols, Stigmasterols und Campesterols. Durch die Verwendung einer Sterolmischung für die Synthese wurden die Einzelkomponenten bei der Koenigs-Knorr Synthese parallel glycosiliert. Somit ergab sich jeweils ein gemischtes Produkt von Glucosiden, Galactosiden und Cellobiosiden des  $\beta$ -Sitosterols, Stigmasterols und Campesterols, das ausschließlich mittels analytischer HPLC voneinander trennbar war. Da sich diese Strukturen chemisch sehr ähnlich sind, wiesen viele Signale der NMR-Spektren auch dieselben chemischen Verschiebungen auf. Dennoch ließen sich einige Unterschiede beobachten, an denen sich die parallele Glycosilierung bestätigen ließ. Vor allem das Stigmasterol konnte eindeutig vom  $\beta$ -Sitosterol und Campesterol abgrenzt werden. So konnte im  $^1\text{H}$ -Spektrum je ein Singulett bei  $\delta$  0,69 ppm für das  $\text{C}_{18}$  des  $\beta$ -Sitosterols und Campesterols, sowie ein Singulett bei  $\delta$  0,71 ppm für das  $\text{C}_{18}$  des Stigmasterols beobachtet werden. Das Verhältnis der Intergrale des jeweiligen Signals ergab etwa 75:25, was einen Anteil von etwa 25 % Stigmasterol in der Mischung bestätigte. Darüber hinaus konnte das Stigmasterol zusätzlich durch die Doppelbindung am  $\text{C}_{22}$  und  $\text{C}_{23}$  in der Seitenkette des Sterols charakterisiert werden. Diese wurden durch zweiduplizierte Dubletts (dd) bei  $\delta$  5,12 ppm ( $J = 15,1; 8,5 \text{ Hz}, 0,25\text{H}$ ) und  $\delta$  4,99 ppm ( $J = 15,2; 8,4 \text{ Hz}, 0,25\text{H}$ ) charakterisiert. Das Integral des  $\text{H}_{22}$  und  $\text{H}_{23}$  von 0,25 im Verhältnis zum  $\text{H}_3$  des Sterols bestätigte den Anteil von etwa 25 % Stigmasterol in der Mischung. Die Unterscheidung zwischen Campesterol und  $\beta$ -Sitosterol beziehungsweise Stigmasterol erfolgte anhand des  $^{13}\text{C}$ -Spektrums, in welchem das  $\text{C}_{28}$  des Campesterols durch ein charakteristisches Signal bei  $\delta$  16,1 ppm identifiziert werden konnte.

Abschließend wurden alle synthetisierten Strukturen mittels hochauflösender Massenspektrometrie (HRMS) charakterisiert, wobei Abweichungen von maximal 0,001 Da zwischen theoretisch berechneter und experimentell bestimmter Masse der jeweiligen Strukturen zu beobachten waren (siehe Kapitel 11.1.7, S.131, Anhang). Diese Abweichung liegt im akzeptablen Bereich, was die Identität der Strukturen bestätigte. Da für keine der Strukturen ein  $[\text{M}+\text{H}]^+$  beobachtet werden konnte, wurde zur Charakterisierung das  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  herangezogen. Darüber hinaus erfolgte eine zusätzliche Evaluierung der einzelnen Sterole der Mischungen aus Sterol-Glcs, Sterol-Gals und Sterol-Cellos mittels GC-FID nach vollständiger saurer Hydrolyse, um zum einen die Reinheit der Standards und zum anderen auch die Anteile der jeweiligen Sterole an der Gesamtmischung zu bestimmen. Die Methode und die Ergebnisse der Evaluierung werden im Kapitel 4.1.3 (S. 44ff.) näher beschrieben.

#### **4.1.2 *in vitro* Synthese des Cholecalciferol (Vitamin D<sub>3</sub>)- $\beta$ -D-Glucopyranosid aus 7-Dehydrocholesterol mittels UV-Bestrahlung**

Neben der Synthese des Vitamin D<sub>3</sub>- $\beta$ -D-Glucopyranosids (D<sub>3</sub>-Glc) mittels Koenigs-Knorr Reaktion wurde alternativ auch ein Syntheseweg durch UV-Bestrahlung verschiedener glycosilierter 7-Dehydrocholesterol-Strukturen entwickelt. In der Literatur wurde die photochemische Umwandlung von 7-Dehydrocholesterol in das Vitamin D<sub>3</sub> durch

UV-Bestrahlung vielfältig beschrieben.<sup>63,64</sup> Für glycosilierte Strukturen gibt es jedoch noch keine Studien. Daher wurde die Umwandlung von glycosilierten 7-Dehydrocholesterol-Strukturen in die entsprechenden glycosilierten Vitamin D<sub>3</sub>-Strukturen in unterschiedlichen Modellen überprüft. Zum einen wurde das 7-Dehydrocholesterol-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid (ac. 7-DHC-Glc), als acetylierte Zwischenstufe der Koenigs-Knorr Synthese, und zum anderen das Endprodukt des 7-Dehydrocholesterol- $\beta$ -D-Glucopyranosids (7-DHC-Glc) mit verschiedenen Intensitäten bestrahlt. In definierten Zeitabständen wurde die Umsetzung des jeweiligen 7-Dehydrocholesterol-Derivates mittels HPLC-UV kontrolliert. Die Qualifizierung erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten im UV-Chromatogramm. Die Anteile der detektierten Strukturen wurden durch den Vergleich der Peakflächen der Probelösung zur Peakfläche einer bekannten Standardlösung der jeweiligen Struktur bestimmt, welche mittels Koenigs-Knorr Reaktion synthetisiert wurden (siehe Kapitel 4.1, S.34ff.).

#### 4.1.2.1 UV-Bestrahlung des ac. 7-DHC-Glc

Ausgangsstoff für lichtinduzierte Synthese des D<sub>3</sub>-Glc war das ac. 7-DHC-Glc, welches als Zwischenstufe bei der Synthese des 7-DHC-Glc anfiel (siehe Abbildung 15).

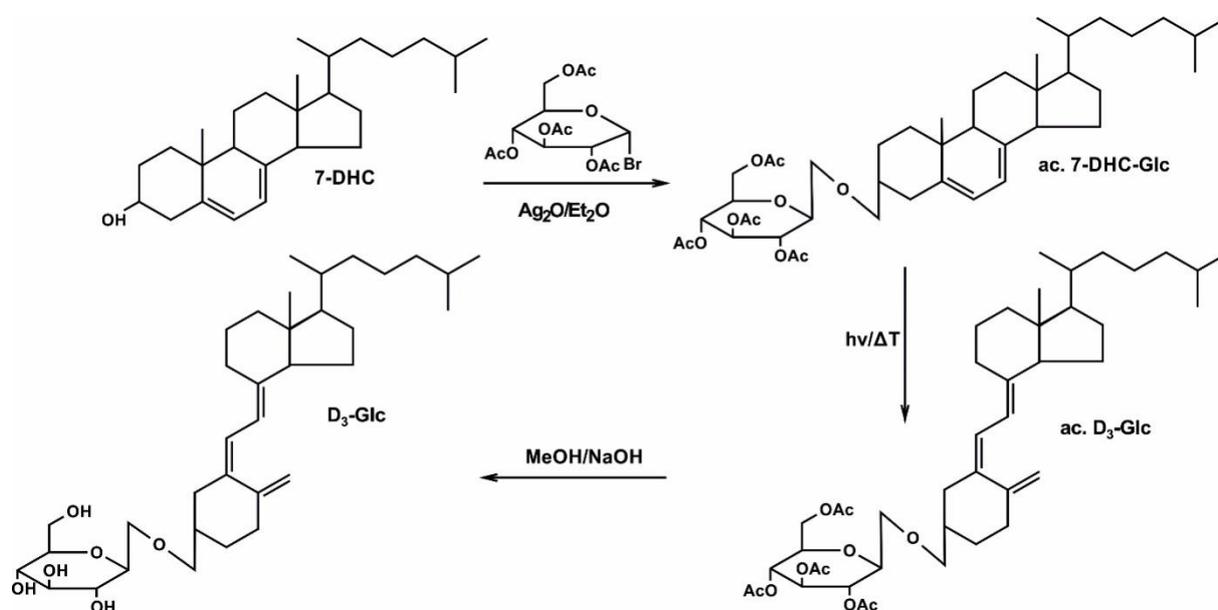


Abbildung 15: Syntheschema von D<sub>3</sub>-Glc mittels UV-Bestrahlung

Dieses wurde mittels wassergekühlter 125 W Niederdruck-Quecksilberdampfampe (Spektrum, siehe Kapitel 11.2, Anhang) bestrahlt, wobei in definierten Zeitabständen Aliquote entnommen und ohne weitere Aufarbeitung mittels HPLC-UV ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) analysiert wurden (siehe Abbildung 16). Die Verifizierung der Signale erfolgte mittels LC-MS/MS, wobei durch eine parallele UV-Detektion die Identität der UV-Signale bestätigt werden konnte. Dabei konnte eine photochemische Umwandlung des ac. 7-DHC-Glc in das Vitamin D<sub>3</sub>-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid (ac. D<sub>3</sub>-Glc) festgestellt werden, wobei der Zuckerrest an der Hydroxylgruppe des C<sub>3</sub> unangetastet blieb. Neben dem Reaktionsprodukt konnten nach HPLC-Trennung des Reaktionsansatzes auch einige Nebenprodukte im UV-Chromatogramm beobachtet werden, bei denen es sich um die literaturbeschriebenen Strukturen des

Tachysterols und Lumisterols handeln könnte, welche bei UV-Bestrahlung im Gleichgewicht mit dem Previtamin D stehen (Abbildung 6). Diese retenierten mit der unter Kapitel 4.3.4.1 (siehe Kapitel 11.5.4, Anhang, S. 134) beschriebenen HPLC-Methode zwischen dem Edukt und Reaktionsprodukt und nahmen mit der Bestrahlungsdauer stetig zu. Eine abschließende Strukturaufklärung der detektierten Nebenprodukte wurde nicht durchgeführt.

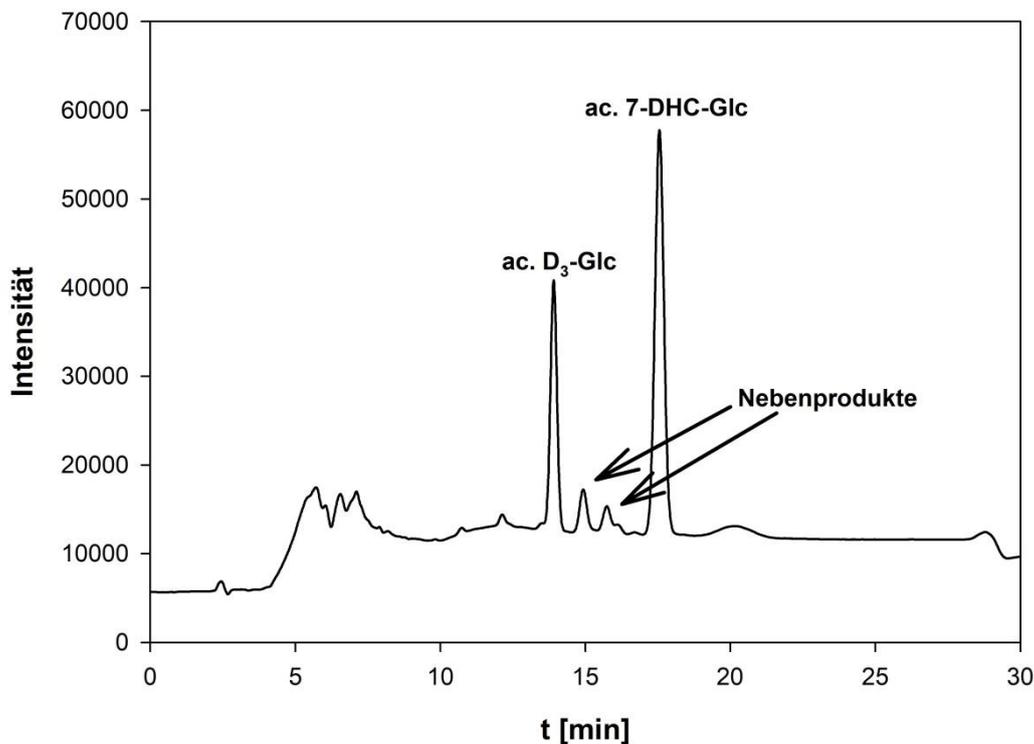


Abbildung 16: HPLC-UV-Chromatogramm (bei 254 nm) nach 90 minütiger UV-Bestrahlung des ac. 7-DHC-Glc in methanolischer Lösung

In einem ersten Ansatz wurde im kleinen Maßstab (2,5 mg ac. 7-DHC-Glc in 100 ml Methanol; 0,035 mM) der Umsatz zeitabhängig verfolgt (Abbildung 17). Da ein verifizierter Vergleichsstandard zum Zeitpunkt des Versuches nicht vorlag, wurde auf eine exakte Quantifizierung verzichtet und die Konzentration des jeweiligen Analyten anhand der prozentualen Peakflächen abgeschätzt (Abbildung 17). Es zeigte sich eine konstante Bildung des ac. D<sub>3</sub>-Glc in exponentieller Annäherung an einen Maximalwert, der nach 270 Minuten Bestrahlungsdauer erreicht war. Danach wuchs der prozentuale Anteil von etwa 46 % ac. D<sub>3</sub>-Glc nicht weiter an, wobei das Edukt des ac. 7-DHC-Glc ausschließlich in Nebenprodukte umgewandelt wurde. Im großen Maßstab musste die Bestrahlungsdauer verlängert werden, da größere Mengen an Edukt mehr Reaktionszeit erforderten. Insgesamt wurden 100 mg des ac. 7-DHC-Glc in methanolischer Lösung (250 mg/L; 0,35 mM) über 430 Minuten bestrahlt. Die Umsetzung wurde mittels HPLC-UV kontrolliert und nach 430 Minuten bei Gleichgewichtseinstellung abgebrochen. Anschließend wurde, analog zur Synthese nach Koenigs-Knorr Strategie, mit SC (Kieselgel, Laufmittel: *n*-Hexan-Diethylether 1:1) aufgereinigt und das getrocknete Eluat (Rotationsverdampfer < 36°C) durch methanolische Natriumhydroxidlösung deacetyliert. Dabei konnten die gebildeten Nebenprodukte sowie das restliche Edukt weder vor, noch nach Deacetylierung präparativ voneinander getrennt werden. Eine Trennung war ausschließlich mittels analytischer HPLC

möglich, wobei mit UV-Detektion anhand der Peakflächenverhältnisse eine Reinheit von 67 % des D<sub>3</sub>-Glc abgeschätzt wurde.

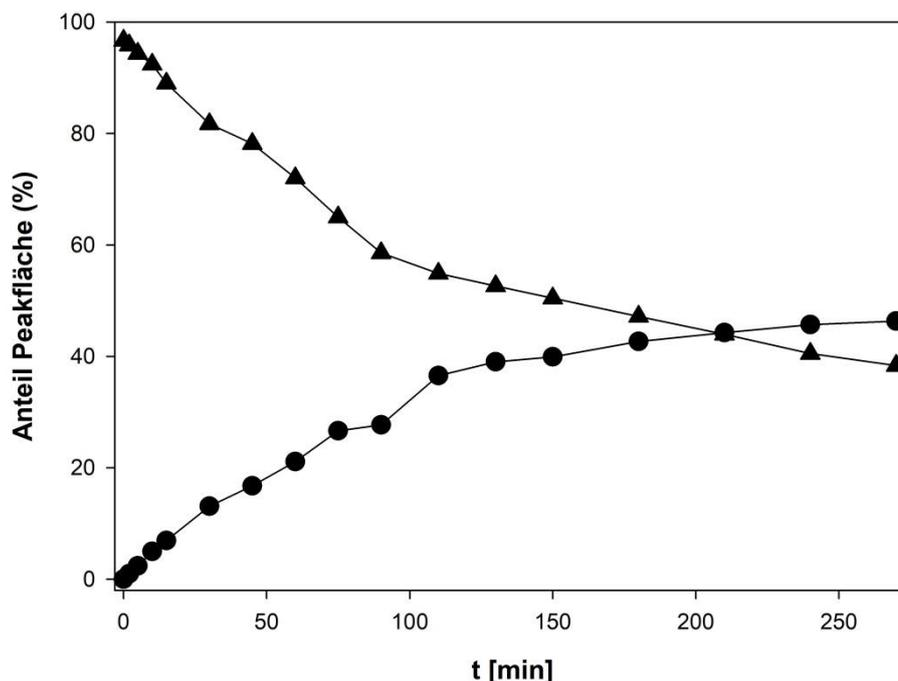


Abbildung 17: Zeit-Umsatz-Diagramm des ac. 7-DHC-Glc (▲) zum ac. D<sub>3</sub>-Glc (●) bei Bestrahlung mittels 125 W Niederdruck Quecksilberdampfampe

Insgesamt war die Ausbeute sehr gering, sodass nur wenige Milligramm des Produktes isoliert werden konnten. Da eine gesicherte NMR-Analyse der Zielstruktur deutlich mehr Substanz und eine höhere Reinheit erforderte, wurde im Folgenden von diesem Syntheseweg abgesehen und eine Darstellung des D<sub>3</sub>-Glc mittels Koenigs-Knorr Reaktion bevorzugt (siehe Kapitel 6.2.7, experimenteller Teil, S.100f.).

#### 4.1.2.2 UV-Bestrahlung des 7-DHC-Glc

In einem weiteren Experiment wurde die Umsetzung des 7-DHC-Glc ohne acetylierte Hydroxylgruppen der Glucose in D<sub>3</sub>-Glc überprüft. Dazu wurde zunächst derselbe Versuchsaufbau wie bei der Bestrahlung des ac. 7-DHC-Glc gewählt und 7-DHC-Glc mittels Niederdruck Quecksilberdampfampe bestrahlt. Diese weist ein starkes Strahlungsmaximum bei 254 nm und 185 nm auf, wobei für die photochemische Umwandlung des 7-DHC-Glc in D<sub>3</sub>-Glc ausschließlich die Wellenlänge von 254 nm von Bedeutung ist.<sup>58,63</sup> Als Ausgangslösung wurde eine Lösung von 50 µg/ml 7-DHC-Glc in 100 ml Methanol bestrahlt und die Umsetzung zeitabhängig verfolgt. Dabei zeigte sich jedoch, dass die Intensität der Lampe für eine kontinuierliche Umwandlung in D<sub>3</sub>-Glc deutlich zu hoch und daher bereits nach 15 Minuten ein nahezu vollständiger Abbau des Ausgangsstoffes zu verzeichnen war. Gleichzeitig konnte zwar eine Bildung des D<sub>3</sub>-Glc beobachtet werden, jedoch fand auch bei dieser Struktur eine starke Degradation bei einer Bestrahlungsdauer von über 15 Minuten statt. Demgegenüber nahm der Anteil an nicht näher charakterisierten Nebenprodukten deutlich zu, sodass der Versuch abgebrochen wurde. Somit konnte eindeutig gezeigt werden, dass eine

UV-Bestrahlung zwar zur Umwandlung von 7-DHC-Glc in D<sub>3</sub>-Glc führte, eine zu starke Intensität jedoch einen Abbau der Strukturen bewirkte.

Um zu zeigen, dass eine kontinuierliche Bildung von D<sub>3</sub>-Glc durch UV-Bestrahlung möglich ist, wurde in einem weiteren Experiment eine CAMAG UV-Lampe (8 W, 254 nm) eines CAMAG UV-Betrachters zur Bestrahlung gewählt. Dazu wurde wiederum eine methanolische Lösung des 7-DHC-Glc (50 µg/ml) für insgesamt 24 Stunden bestrahlt. Dabei konnte eine stetige Umwandlung von 7-DHC-Glc in D<sub>3</sub>-Glc beobachtet werden. Wie in Abbildung 18 dargestellt, konnte nach 24 Stunden ein prozentualer Anteil von 30,1 % D<sub>3</sub>-Glc detektiert werden, wobei nur noch 28,6 % der Ausgangskonzentration des 7-DHC-Glc nachgewiesen wurden. Der fehlende prozentuale Anteil im Laufe der Reaktionszeit wurde den Nebenprodukten zugeschrieben, bei denen es sich mit großer Sicherheit um die literaturbeschriebenen Strukturen des Previtamin D<sub>3</sub>, Lumisterols und Tachysterols handelt. Anhand der Retentionszeiten im HPLC-UV Chromatogramm lässt sich annehmen, dass diese ebenso glycosiliert vorlagen.<sup>63</sup> Eine längere Bestrahlungsdauer führte, bei gleichzeitiger Zunahme der Nebenprodukte, zu keinem weiteren Anstieg von D<sub>3</sub>-Glc, weshalb das Experiment nach 24 Stunden abgebrochen wurde. Daher kann geschlussfolgert werden, dass 7-DHC-Glc deutlich instabiler und empfindlicher gegenüber UV-Licht ist als die acetylierte Struktur.

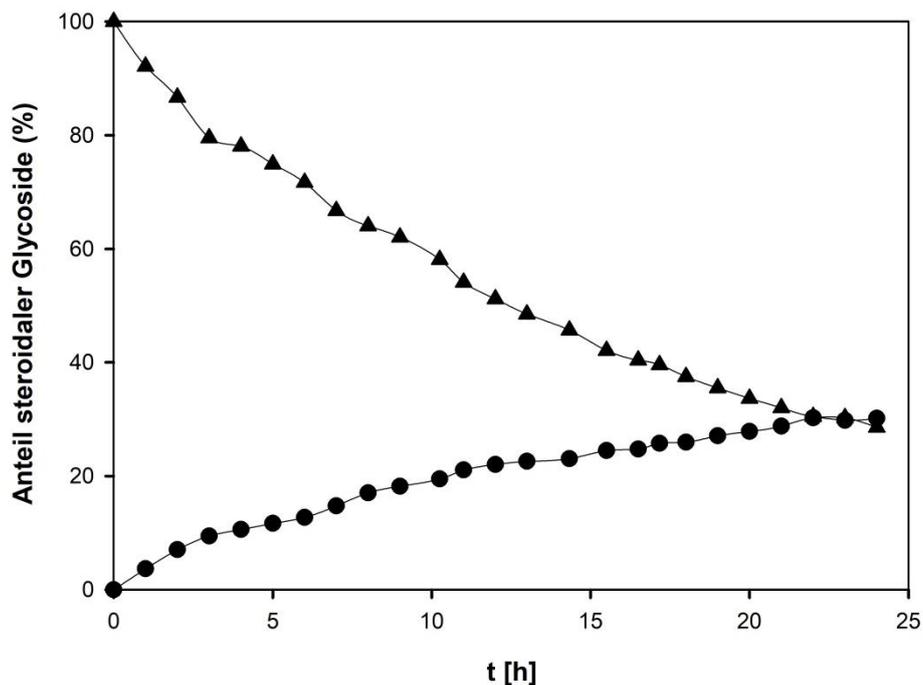


Abbildung 18: Zeit-Umsatz-Diagramm bei Bestrahlung des 7-DHC-Glc (▲) mittels 8 W CAMAG UV-Lampe zum D<sub>3</sub>-Glc (●)

Alles in allem konnte die lichtinduzierte Umwandlung des 7-DHC-Glc in das D<sub>3</sub>-Glc, unabhängig von der Glycosilierung am C<sub>3</sub>, nachgewiesen werden. Dabei wurde für alle Derivate ein zeitabhängiges Maximum erreicht, bei welchem die 7-DHC-Derivate zwar weiter degradiert, jedoch keine neuen D<sub>3</sub>-Derivate gebildet wurden. Ein derartiger Syntheseweg, vergleichbar mit der endogenen Vitamin D-Bildung in der menschlichen Haut, ist bei ausreichendem UV-Licht somit auch in Pflanzen denkbar.<sup>58</sup>

Zusammenfassend konnte durch die dargestellten Experimente gezeigt werden, dass bei UV-Bestrahlung eine zeitabhängige Umwandlung auch bei glycosilierten Strukturen des 7-Dehydrocholesterol in den aktiven Metaboliten des Vitamin D<sub>3</sub>, unabhängig von der gebundenen Zuckerstruktur, stattfindet. Somit konnte eindeutig bewiesen werden, dass glycosilierte Strukturen des 7-Dehydrocholesterols potentielle Vorläufer für glycosilierte Vitamin D-Metaboliten darstellen.

#### 4.1.3 Verifizierung der synthetisierten SGs mittels GC-FID

Für eine gesicherte Quantifizierung der synthetisierten SGs mittels LC-MS/MS wurden diese nach vollständiger saurer Hydrolyse durch Charakterisierung der freien Sterole verifiziert. Die Vollständigkeit der Hydrolyse und Stabilität der Aglykone wurde bei den gewählten Hydrolysebedingungen nach Akhtar et al. (2010) evaluiert.<sup>140</sup> So wurden nach Inkubationszeiten von 2 Stunden und 4 Stunden nahezu identische Gehalte der Aglykone detektiert, sodass bestätigt werden konnte, dass kein Abbau dieser erfolgte (siehe Abbildung 21, Kapitel 4.2.1, S.47). Durch eine nahezu vollständige Wiederfindung des Cholesterols (> 98 %) nach zweistündiger Hydrolyse des Chol-Glc konnte darüber hinaus auch die Stabilität der einfachen Sterole belegt werden. Die Analyse der freigesetzten Sterole erfolgte mittels GC-FID, wobei diese zuvor in die jeweiligen Trimethylsilylether überführt und anschließend mittels externer Kalibrierung quantifiziert wurden. So konnte sowohl die Reinheit als auch der Anteil des jeweiligen Sterols im glycosilierten Gemisch identifiziert werden. Die Auswertung erfolgte durch Vergleich der Menge an freigesetztem zur theoretisch freigesetzten Menge an Sterol im exakt eingewogenen Synthesematerial.

Tabelle 5: Verifizierung der synthetisierten Standards durch Bestimmung des Sterolanteils und der Reinheit mittels GC-FID

Substanz	Anteil Sterol [%]	Reinheit der Struktur [%]
Chol-Glc	100	98,1
Sterol-Glcs:		
Sito-Glc	43,7	90,6
Stigma-Glc	29,6	91,8
Camp-Glc	26,7	89,5
Sterol-Gals:		
Sito-Gal	44,7	65,1
Stigma-Gal	30,1	66,3
Camp-Gal	25,2	65,1
Sterol-Cellos:		
Sito-Cello	43,7	35,5
Stigma-Cello	30,3	34,3
Camp-Cello	26,0	35,0

Bei den verwendeten Hydrolysebedingungen waren ausschließlich die Sterole des Cholesterols,  $\beta$ -Sitosterols, Stigmasterols und Campesterols stabil. Für die Strukturen des 7-Dehydrocholesterols und des Vitamin D<sub>3</sub> waren die Bedingungen der Hydrolyse mit zweistündigem Erhitzen bei 70 °C zu drastisch, sodass es zu deutlichen Abbau- und Umlagerungsreaktionen kam, was in einer Vielzahl unbekannter Signale im GC-FID Chromatogramm resultierte (siehe Abbildung 19, Kapitel 4.2.1, S. 45ff.). Daher konnten diese

nicht abschließend verifiziert werden. Auch aus diesem Grund blieb diesen Strukturen eine spätere Quantifizierung mittels LC-MS/MS verwehrt. Es zeigte sich, dass die Strukturen der Sterol-Glcs nach dem Chol-Glc mit über 90 % die höchsten Reinheiten aufwiesen. Die Galactoside und Cellobioside, welche synthetisch deutlich schwerer herzustellen waren, wiesen deutlich geringere Reinheiten von etwa 65 % und 35 % auf. Die Verteilung der Sterole im jeweiligen Mischstandard war dagegen für alle Syntheseprodukte vergleichbar und lag bei etwa 44 %  $\beta$ -Sitosterol, 30 % Stigmasterol und 26 % Campesterol, was nahezu der Komposition der eingesetzten Sterolmischung von 46,6 %  $\beta$ -Sitosterol, 28,0 % Stigmasterol und 25,4 % Campesterol entsprach (Tabelle 5). Alles in allem erlaubte die beschriebene Verifizierung die Verwendung der synthetisierten Strukturen als Standards für eine gesicherte Quantifizierung der Einzelstrukturen mittels LC-MS/MS. Diese erfolgte anhand der Mischstandards durch Einwaage der jeweiligen Substanzen unter Berücksichtigung der Reinheit sowie des Sterolanteils.

## 4.2 Hydrolyse glycosilierter steroidalster Strukturen

Für die exakte Analytik intakter glycosidisch gebundener steroidalster Strukturen ist ein entsprechender authentischer Referenzstandard unabdingbar.<sup>8</sup> In der Literatur wird daher häufig auf die Hydrolyse der Zielstrukturen mit anschließender separater Analytik von Aglykon und Zuckeranteil zur Bestimmung glycosilierter steroidalster Strukturen zurückgegriffen. Andere Autoren beschreiben sowohl die saure Hydrolyse als auch die enzymatische Hydrolyse mit anschließender Bestimmung der Aglykone.<sup>10,140</sup> Da in dieser Studie nicht für alle glycosilierten steroidalster Strukturen ein entsprechender Standard synthetisiert werden konnte, wurde für beide Methoden ein System entwickelt und auf dessen Wirksamkeit überprüft. Der Vorteil der HPLC-UV lag dabei darin, dass sowohl die freigesetzten Sterole als auch die intakten SGs charakterisiert werden konnten. Mittels GC-FID wurden die Aglykone nach Extraktion der freigesetzten Sterole und anschließender Silylierung bestimmt. Die Retentionszeiten an der HPLC-UV sowie der GC-FID der jeweiligen freien oder glycosilierten steroidalster Strukturen wurden anhand der erworbenen oder synthetischen Standards verifiziert und sind in Kapitel 4.3.3 (S. 55ff.) zusammengefasst.

### 4.2.1 Saure Hydrolyse

Eine einfache Möglichkeit der sauren Hydrolyse bietet die Umsetzung mittels 1 M methanolischer Salzsäure.<sup>140</sup> Im Vergleich zu anderen Hydrolysetechniken bietet diese einige Vorteile. So konnten deutlich kürzere Reaktionszeiten bei gleichzeitig höheren Hydrolyseraten der glycosilierten Strukturen beobachtet werden. Diese waren für alle Strukturen unterschiedlich, sodass die saure Hydrolyse nicht universell anwendbar war. Vor allem bei Inkubationen der Vitamin D-Strukturen des 7-DHC-Glc und des D<sub>3</sub>-Glc zeigten sich nach saurer Hydrolyse viele unbekannte Strukturen, welche geringere Retentionszeiten als die der bekannten Aglykone des 7-Dehydrocholesterols und des Vitamin D<sub>3</sub> aufwiesen. Wie in Abbildung 19 dargestellt, konnten nach Hydrolyse einer Mischung des Sito-Glc, 7-DHC-Glc und D<sub>3</sub>-Glc einzig die Signale des 7-Dehydrocholesterols bei 9,79 Minuten und des  $\beta$ -Sitosterols bei 13,13 Minuten zugeordnet werden. Die Vielzahl an unbekanntem Signalen (siehe Abbildung 19) ist mit Sicherheit auf Abbauprodukte und Fragmente zurückzuführen,

welche durch die drastischen Bedingungen der sauren Hydrolyse entstanden sind. Das Vitamin D<sub>3</sub>, welches theoretisch bei einer Retentionszeit von 7,32 Minuten zu erwarten war, konnte nicht erfasst werden, was die starke Instabilität dieser Struktur verdeutlicht. Unvollständig hydrolysierte glycosilierte Sterole waren für die Methode nicht zugänglich.

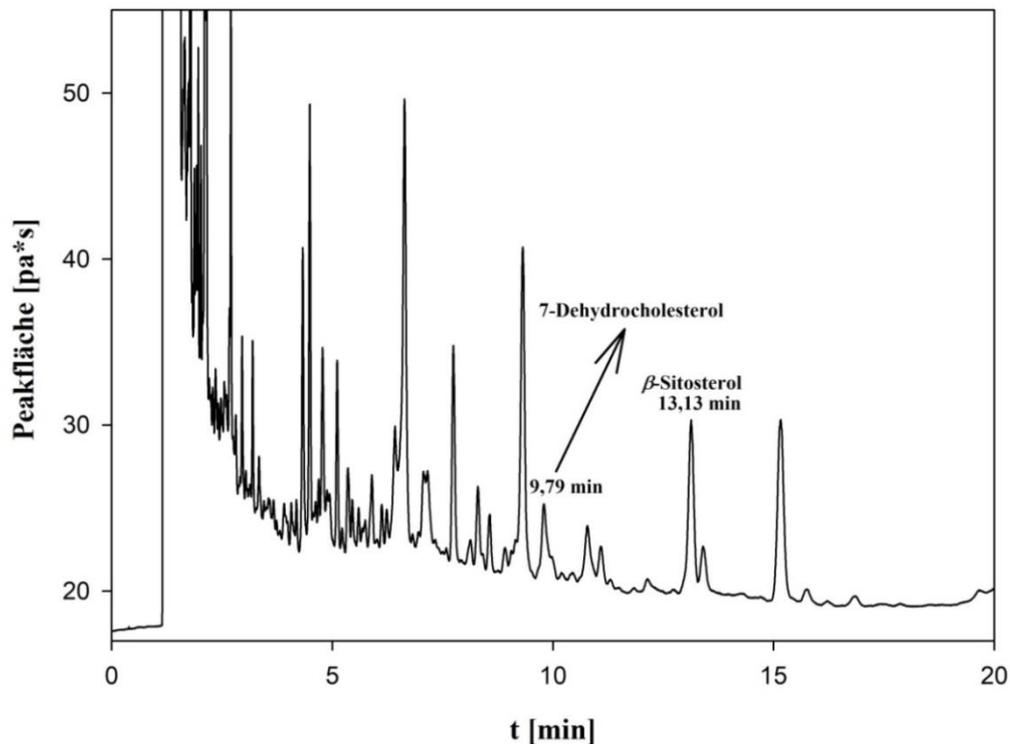


Abbildung 19: GC-FID Chromatogramm nach zweistündiger saurer Hydrolyse von je 25  $\mu\text{g}$  eines Mischstandards aus Sito-Glc, 7-DHC-Glc und D<sub>3</sub>-Glc. Die freigesetzten Aglykone der bekannten Strukturen sind im Diagramm mit der jeweiligen Retentionszeit dargestellt.

Generell konnte eine zeitabhängige Freisetzung der Aglykone beobachtet werden, wobei vor allem das Sito-Glc betrachtet wurde, da die saure Hydrolyse für die relativ stabilen Strukturen der einfachen Phytosterole und Zoosterole am ehesten geeignet war. Wie in Abbildung 20 ersichtlich, war bei der sauren Hydrolyse eine kontinuierliche Freisetzung der Aglykone mit steigender Reaktionszeit zu beobachten. Dabei war das aus dem D<sub>3</sub>-Glc freigesetzte Aglykon bereits nach einer Stunde vollständig abgebaut. Für das Sito-Glc und das 7-DHC-Glc war die saure Hydrolyse deutlich besser geeignet, was in späteren Einzelinkubationen bestätigt werden konnte, welche in Folge von Wartungsarbeiten am GC-FID mit einer anderen GC-Kapillarsäule stattfand. So wurden die Versuche nach Säulenwechsel erneut mit den verschiedenen Standards wiederholt. Im Gegensatz zu den Mischinkubationen zeigte sich bei Einzelinkubationen eine deutlich geringere zeitliche Abhängigkeit der Freisetzungsrates. Dies konnte in weiteren Hydrolysen auch für die Strukturen des Chol-Glc, der Sterol-Glcs und Sterol-Cellos bestätigt werden. Die Strukturen des 7-DHC-Glc und D<sub>3</sub>-Glc waren hingegen auch in Einzelinkubationen zu instabil für eine saure Hydrolyse, sodass kein spezifisches Signal für das jeweilige Aglykon im GC-FID Chromatogramm zu beobachten war. Wie in Abbildung 21 ersichtlich, wies eine zweistündige und vierstündige Inkubation des synthetisierten Sterol-Gal Mischstandards keine wesentlichen Unterschiede der Peakflächen auf, was eine ausreichende Hydrolysezeit von zwei Stunden belegte.

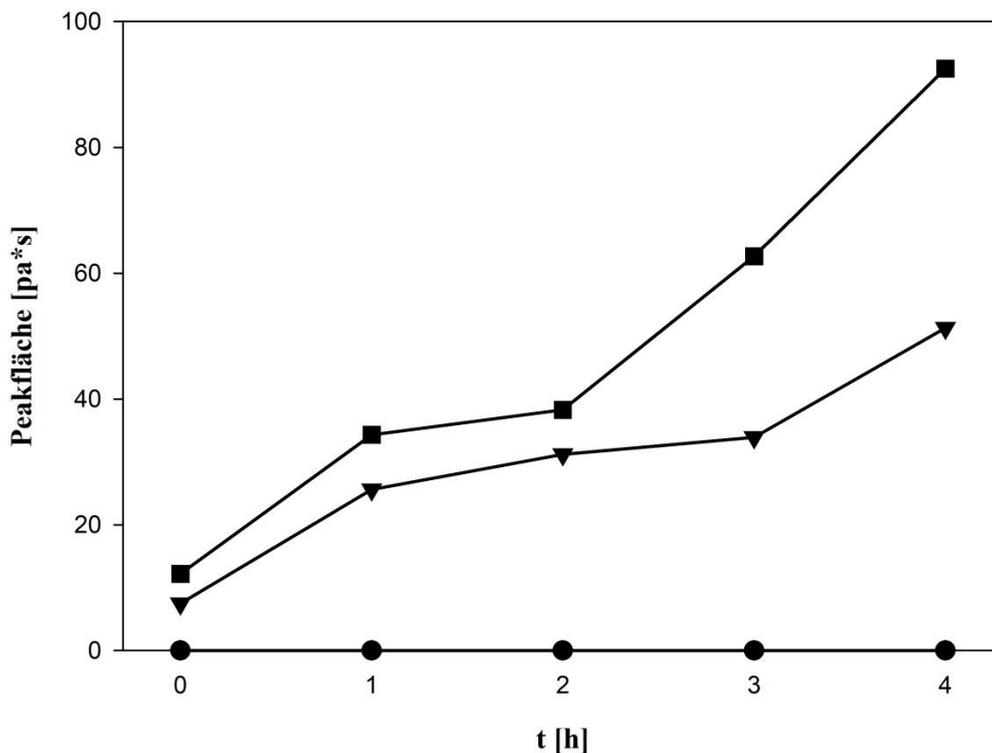


Abbildung 20: Peakflächenzuwachs der Aglykone des  $\beta$ -Sitosterols (■), 7-Dehydrocholesterols (▼) und Vitamin D<sub>3</sub> (●) in Abhängigkeit der Hydrolysedauer bei saurer Hydrolyse

Die vollständige Wiederfindung von 98,1 % des Cholesterols nach Hydrolyse des Chol-Glc (siehe Tabelle 5, Kapitel 4.1.3, S.44) spricht zudem dafür, dass eine vollständige Hydrolyse der einfachen  $\Delta^5$ -Sterole erzielt werden konnte.

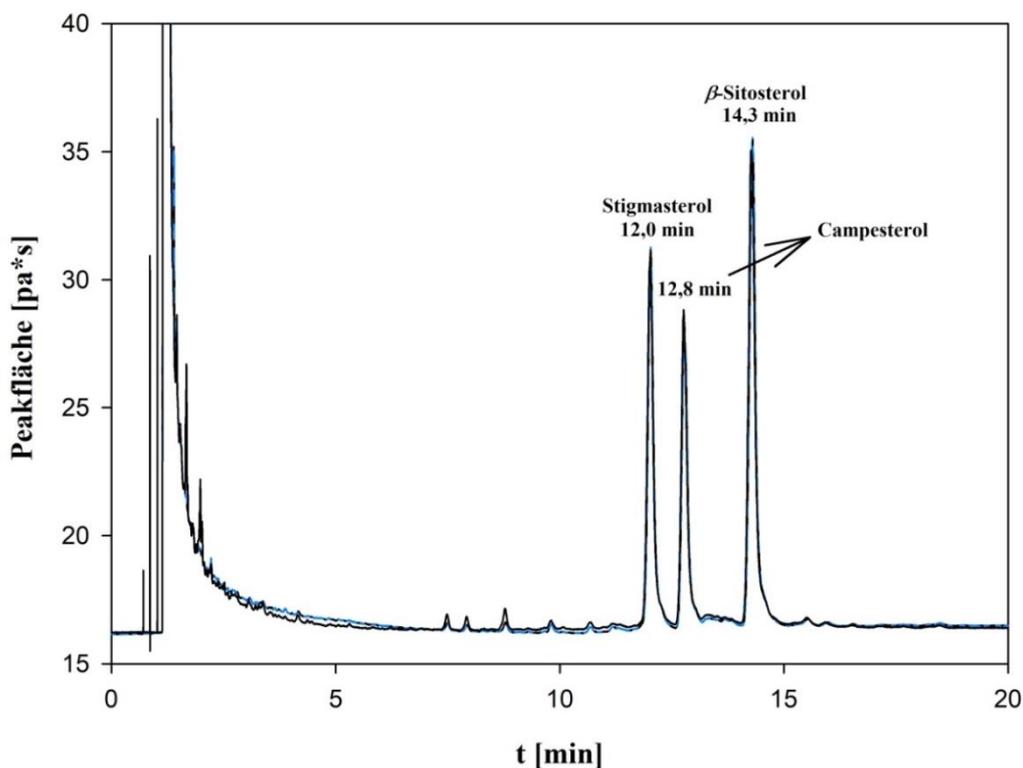


Abbildung 21: Signale der freigesetzten Sterole im GC-FID Chromatogramm nach zweistündiger (schwarze Kurve) und vierstündiger (blaue Kurve) saurer Hydrolyse des Sterol-Gal Mischstandards

Abschließend kann geschlussfolgert werden, dass mittels beschriebener zweistündiger saurer Hydrolyse eine wirksame und schnelle Methode entwickelt wurde, um das Aglykon vom Zuckeranteil der stabilen  $\Delta^5$ -Sterole des Cholesterols,  $\beta$ -Sitosterols, Stigmasterols und Campesterols voneinander zu trennen und darüber hinaus quantitative Aussagen zu den SGs anhand der freigesetzten Sterole machen zu können.

#### 4.2.2 Enzymatische Hydrolyse

Die enzymatische Hydrolyse wurde speziell für die Glucoside der Vitamin D-Strukturen des 7-DHC-Glc und des D<sub>3</sub>-Glc entwickelt. Da die Aglykone dieser Strukturen deutlich instabiler gegenüber sauren Bedingungen sind, waren diese Strukturen für eine derartige Hydrolyse nicht zugänglich, weshalb auf die deutlich mildere enzymatische Hydrolyse zurückgegriffen werden musste. Daher wurde ein System entwickelt, welches eine schonende und kontinuierliche Freisetzung der Aglykone gewährleistete.

Erste Versuche mit reiner  $\beta$ -Glucosidase aus Mandeln hatten wenig Erfolg. Deshalb wurde in Anlehnung an Nyström et al. (2008)<sup>10</sup> verstärkt auf eine Enzymmischung gesetzt und zusätzlich zur  $\beta$ -Glucosidase auch die Cellobiase von *Aspergillus niger* etabliert. So wurden die synthetisierten Standardsubstanzen mit 39 U/ml Cellobiase und zusätzlich 5 U/ml  $\beta$ -Glucosidase in einem Citratpuffer (pH=5) über verschiedene Zeiträume bei konstanter Temperatur (40 °C) inkubiert. Mit diesem System konnte eine zeitabhängige Hydrolyse der SGs mit einer maximalen Freisetzung nach etwa 36 Stunden erzielt werden (siehe Abbildung 22). Die maximale Freisetzungsbetrag 87 % für das D<sub>3</sub>-Glc und 81 % für das 7-DHC-Glc, was in mehrfachen Inkubationen bestätigt wurde. Eine längere Inkubationszeit führte zu keiner Steigerung der Freisetzungsbetrag.

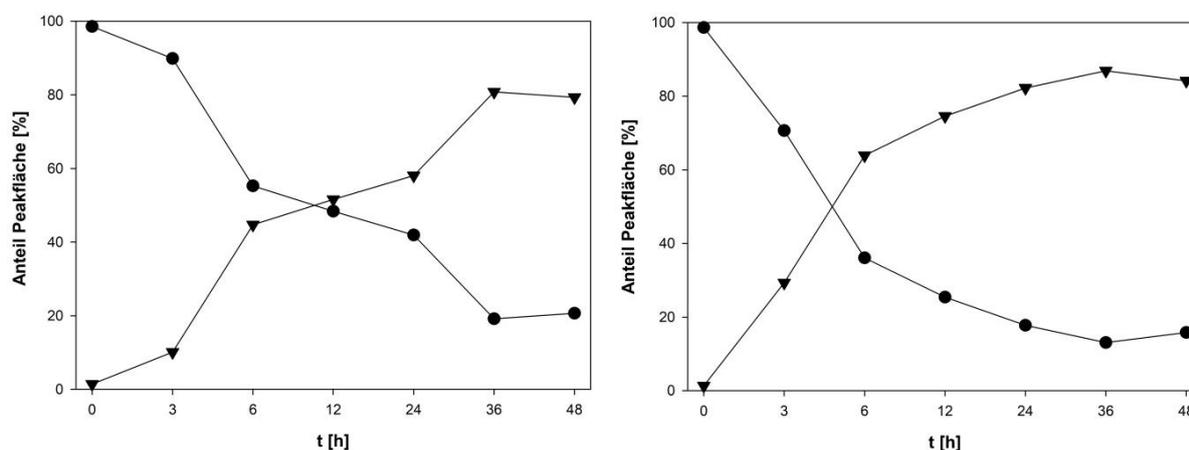


Abbildung 22: Zeitabhängige enzymatische Hydrolyse der synthetisierten Standards des 7-DHC-Glc (links) und D<sub>3</sub>-Glc (rechts); charakterisiert durch die Anteile der Peakflächen im HPLC-UV Chromatogramm der Aglykone des 7-Dehydrocholesterol und Vitamin D<sub>3</sub> (▼) sowie der unhydrolysierten Glycoside des 7-DHC-Glc und D<sub>3</sub>-Glc (●)

Im Verlaufe der Arbeit war die Cellobiase bei dem bisherigen Anbieter nicht mehr verfügbar, sodass auf ein Ersatzprodukt mit geringerer Enzymaktivität zurückgegriffen werden musste. Zur Überprüfung der Effektivität wurde daher eine Enzymmischung aus  $\beta$ -Glucosidase (5 U/ml) und Glucosidase von *Aspergillus niger* (10 U/ml) auf seine Wirksamkeit überprüft. Zusätzlich wurde zur besseren Phasenvermittlung zwischen den relativ unpolaren Zielstrukturen und der wässrigen Matrix ein Zusatz von 5 % (w/w) Polyethylenglykol 6000

(PEG 6000) als Phasenvermittler etabliert, der die Funktion des Enzyms nicht behinderte. In einer Modellinkubation wurden je 100  $\mu\text{g}$  Sito-Glc, 7-DHC-Glc und  $\text{D}_3$ -Glc in 1 ml des beschriebenen Systems bei 40 °C inkubiert und in definierten Zeitabständen Proben entnommen. Abbildung 23 zeigt die Wirksamkeit des Systems durch Quantifizierung der freigesetzten Aglykone der hydrolysierten Glucoside. Dabei wurden die freien steroidal Strukturen zunächst mittels *n*-Hexan extrahiert und anschließend am GC-FID nach Silylierung analysiert. Auf eine exakte Quantifizierung der Reaktionsprodukte wurde verzichtet, da zunächst die Wirksamkeit der Methode im Vordergrund stand. Wie in Abbildung 23 verdeutlicht, nahm der Anteil der Aglykone mit steigender Inkubationsdauer stetig zu.

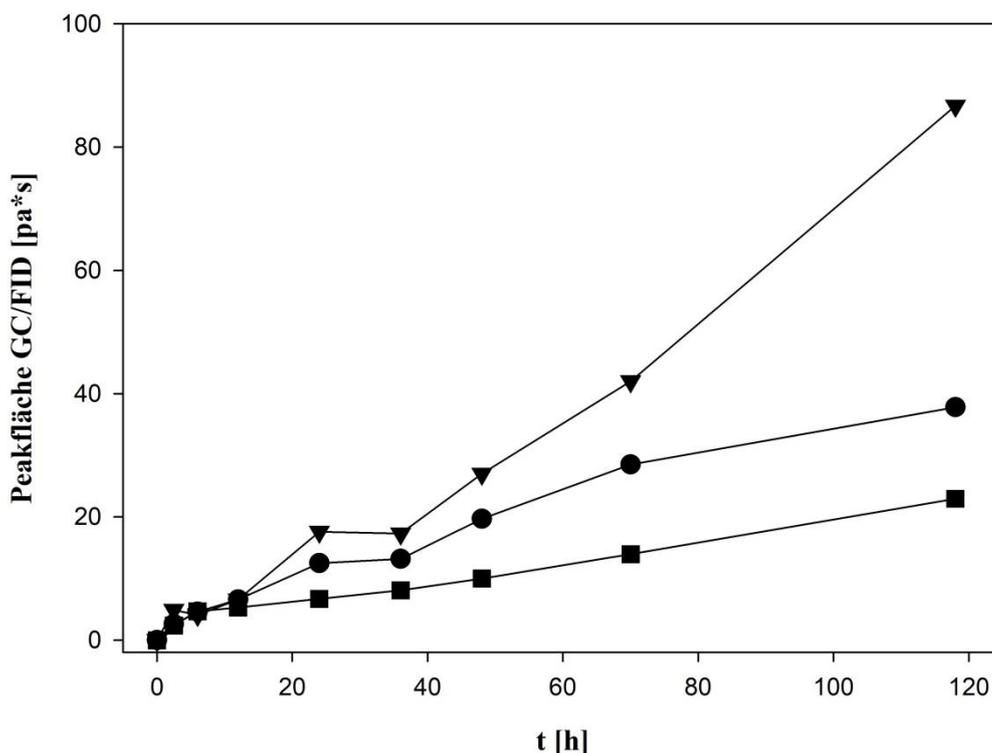


Abbildung 23: Zeitabhängige Freisetzung der Aglykone des 7-Dehydrocholesterols (▼),  $\beta$ -Sitosterols (■) und Vitamin D<sub>3</sub> (●) aus 7-DHC-Glc, Sito-Glc und  $\text{D}_3$ -Glc nach enzymatischer Hydrolyse

Es konnte jedoch keine vollständige Hydrolyse der eingesetzten Strukturen erzielt werden. Dies wurde durch die steigende Konzentration an freien steroidal Strukturen über 120 Stunden Inkubationszeit hinaus und durch die deutlich zu niedrige Peakfläche der freien Sterole im Verhältnis zur theoretisch zu erwarteten Menge an Sterol im Inkubationsstandard belegt. Dabei Einzelinkubationen der Glucoside deutlich größere Mengen an freigesetztem Aglykon nachgewiesen werden konnten, muss darüber hinaus von Konkurrenzreaktionen verschiedener glycosilierter Strukturen um die aktiven Zentren der Enzyme ausgegangen werden, die eine vollständige Hydrolyse in komplexen Matrices zusätzlich behinderten und die Hydrolysezeit damit deutlich erhöhte. Um die Freisetzungsrates der Aglykone zu erhöhen, kann zum einen die Inkubationszeit verlängert und zum anderen die Enzymmenge erhöht werden.<sup>10</sup> Da der Einsatz deutlich höherer Enzymmengen jedoch nicht rentabel und die Inkubationszeit von 5 Tagen bereits als grenzwertig zu betrachten war, wurden die schwachen Hydrolyseraten toleriert und auf die Inkubationen der Pflanzenextrakte übertragen. Um

dennoch eine ausreichende Hydrolyse zur Identifizierung der Zielstrukturen zu erzielen, wurde alle 16 bis 24 Stunden je 1 ml frische Enzymlösung zugegeben.

### **4.3 Methodenentwicklung**

#### **4.3.1 Optimierung der Anreicherungs-methode glycosilierter steroidal-er Strukturen**

Durch die Synthese der zwölf verschiedenen Standards (siehe Kapitel 4.1, S.34ff.) stand eine ausreichende Menge an glycosilierten steroidal-er Strukturen zur Verfügung, welche als Surrogats für die Entwicklung einer geeigneten Methode zur Anreicherung dieser aus Pflanzenextrakten genutzt werden sollten.

##### **4.3.1.1 Probennahme und –aufarbeitung**

Die pflanzlichen Proben wurden von lokalen Supermärkten bezogen, wobei stets auf frisches und gesundes Pflanzenmaterial geachtet wurde. Die Proben wurden frisch aufgearbeitet oder unverzüglich tiefgefroren und bis zur Aufarbeitung bei -24 °C gelagert. Zur Verbesserung der Extraktionsausbeute der relativ unpolaren Strukturen aus dem wässrigen Pflanzenmaterial wurden alle Proben mittels Moulinette zerkleinert, um eine ausreichend große Oberfläche zu gewährleisten und vor der Extraktion gefriergetrocknet. Zur einfacheren Handhabung erfolgte die Zerkleinerung im leicht gefrorenen Zustand. Nach der Trocknung wurde durch Differenzwägung der Wasseranteil bestimmt, was eine spätere Differenzierung der Analytgehalte zwischen Frisch- und Trockengewicht zuließ.

##### **4.3.1.2 Probenextraktion**

Die Pflanzenproben wurden nach Zerkleinerung und Trocknung mittels geeigneter Lösemittelsysteme extrahiert. Das zu Beginn der Arbeit gewählte Extraktionsgemisch für die Goldhaferproben aus Aceton-Wasser 70:30 (v/v) sollte speziell zur Extraktion stark wasserlöslicher Vitamin D-Strukturen dienen. Wie sich anhand der Synthesestandards gezeigt hatte, war dieses gut zur Extraktion der Strukturen des 7-DHC-Glc und des D<sub>3</sub>-Glc geeignet. Im Verlaufe der Arbeit rückten jedoch stärker die SGs in den Mittelpunkt, welche einen deutlich unpolaren Charakter aufwiesen. Daher wurde das Extraktionssystem überarbeitet und anhand der synthetisierten Standards optimiert. Dabei war die Löslichkeit aller Analyten am besten in einem Gemisch aus Chloroform-Methanol 2:1 (v/v) gegeben, wie es auch in der Literatur beschrieben wird.<sup>11</sup> Mit diesem System konnten die relativ unpolaren klassischen SGs, wie zum Beispiel das Chol-Glc oder Sito-Glc, vollständig extrahiert werden. Aber auch die polaren Strukturen wie das D<sub>3</sub>-Glc oder Sito-Cello wurden erfasst. Die Menge der Extraktionslösung orientierte sich an der Masse des jeweiligen Extraktes. So wurde darauf geachtet, dass stets das gesamte Pflanzenmaterial mit dem Extraktionsgemisch bedeckt war, sodass zwischen 150 ml bei der Extraktion der Schale und 500 ml bei der Extraktion der Fruchtanteile verwendet wurden. Die bei Zucchini- und Goldhaferproben grün und bei Auberginenproben braun bis purpur gefärbten Extrakte wurden anschließend schonend getrocknet (Rotationsverdampfer < 36 °C) und für die weitere Aufarbeitung verwendet.

#### 4.3.1.3 MLCCC (Gegenstromverteilungschromatographie)

Nach Extraktion der Zielanalyten musste ein geeignetes und vor allem verlustfreies System entwickelt werden, welches eine gezielte Anreicherung glycosilierter steroidal Strukturen aus der Pflanzenmatrix zuließ. Eine zuverlässige Methode zur Anreicherung sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe stellt die Gegenstromverteilungschromatographie (counter-current chromatography; CCC) dar. Als Sonderform ist speziell die MLCCC (multi-layer counter-current chromatography) geeignet, sowohl freie steroidale Strukturen als auch freie Zuckerstrukturen von glycosilierten steroidal Strukturen zutrennen. In Folge dessen wurde anhand der synthetisierten Standards ein System entwickelt, welches eine Konzentrierung aller Analyten erlaubte. Dabei wurde das System nach Ito et al. (2005) entwickelt, wobei auf halogenierte Lösemittel in Hinblick auf Toxizität und Materialbeständigkeit verzichtet wurde.<sup>135</sup> Das Spulenvolumen der manuell gewickelten Spule betrug 240 ml. Die Trennung erfolgte mittels „Head-to-tail“ Elution, bei welcher die schwerere wässrige Phase als mobile und die leichtere organische Phase als stationäre Phase verwendet wurde. Auch die Parameter für die Flussrate mit 2 ml/min und die Drehzahl der Spule mit 780-790 U/min wurden im Vergleich zu vorherigen Experimenten mit der beschriebenen Spule nicht verändert.<sup>167</sup> Als Fraktionsgröße erwiesen sich 10 ml (5 Minuten/Fraktion) als guter Kompromiss zwischen ausreichender Trennung und Lösemittelverbrauch. Die Detektion erfolgte mittels UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 254 nm, welche spezifisch für das 7-DHC-Glc und D<sub>3</sub>-Glc war oder bei 210 nm, wobei auch die SGs bei ausreichender Konzentration erfasst werden können.

Anhand des üblichen Gemisches aus *n*-Hexan-Ethylacetat-Methanol-Wasser 3:5:3:5 (v/v/v/v), welches ein geeignetes Ausgangssystem für Analyten unbekannter Polarität darstellt, wurde das Gemisch soweit angepasst, dass eine Retention der Analyten in einem geeignetem Fraktionsbereich erfolgte.<sup>135</sup> Gleichzeitig konnte so eine Trennung von stark polaren freien Zuckerstrukturen, aber auch von unpolaren Sterolen gewährleistet werden. Die synthetisierten Surrogats wiesen dabei einen unerwartet unpolaren Charakter auf, weshalb bei der Entwicklung des Lösemittelsystems ein deutlich höherer Anteil an organischen Lösemitteln benötigt wurde, um eine ausreichende Löslichkeit und eine frühere Retention der Analyten während der Trennung zu ermöglichen. Nach Anpassungen des Verteilungskoeffizienten ( $K_{U/L}$ ) zwischen organischer ( $K_U$ ) und wässriger Phase ( $K_L$ ), welcher bei „Head-to-tail“ Elutionsmethode einen Wert von  $0.5 \leq K_{U/L} \leq 1.0$  aufweisen sollte, erwies sich ein System aus *n*-Hexan-Ethylacetat-Methanol-Wasser 5:3:5:3 (v/v/v/v) für die Zielanalyten am geeignetsten. Der ermittelte  $K_{U/L}$  des Systems wurde anhand der Synthesestandards überprüft und wies einen Wert von 0,63 für das D<sub>3</sub>-Glc und 0,45 für das 7-DHC-Glc auf. Es gilt zu beachten, dass für das speziell entwickelte System das Volumen an organischer Phase ( $V_U$ ) deutlich geringer als das Volumen an wässriger Phase ( $V_L$ ) war. Es wurde ein Verhältnis von 2:3 ( $V_U/V_L$ ) bestimmt. Da die Trennung jedoch nach „Head-to-tail“ Elutionsmethode erfolgte, war der Verbrauch an mobiler, wässriger Phase deutlich höher als der an stationärer, organischer Phase, womit sich keine Nachteile hinsichtlich des Lösemittelverbrauches ergaben. Die jeweiligen Retentionszeiten und Fraktionsbereiche, in welchen die synthetisierten Standards bei einer matrixfreien Trennung mit dem beschriebenen System eluierten, sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Bei MLCCC-Trennungen waren die Zielstrukturen nicht in einer einzelnen Fraktion zu finden, sondern eluierten über einem

definierten Fraktionsbereich. Dies lag zum einen an der Trennmethode, welche der Einstellung diverser Verteilungsgleichgewichte unterliegt, und zum anderen am amphiphilen Charakter der Zielstrukturen.

Tabelle 6: Retentionszeiten der synthetisierten Standards bei MLCCC-Trennung mittels Lösemittelsystem aus *n*-Hexan-Ethylacetat-Methanol-Wasser 5:3:5:3 (v/v/v/v)

Substanz	Retentionszeit [min]	MLCCC Fraktion
Chol-Glc	95-105	17-20
Sterol-Glcs	100-120	20-24
Sterol-Gals	110-130	22-26
Sterol-Cellos	25-35	5-7
7-DHC-Glc	55-65	11-13
D <sub>3</sub> -Glc	70-85	14-17
freie Sterole	>200 (verbleiben in stationärer Phase)	>40 (verbleiben in stationärer Phase)

Unter Matrixeinfluss zeigte sich eine leichte Verschiebung der Zielanalyten hin zu späteren Retentionszeiten, welche jedoch maximal zwei Fraktionen (10 Minuten) betrug. Bei der MLCCC der Pflanzenextrakte zeigte sich für die Extrakte jeder Pflanzenart ein charakteristisches Muster im UV-Chromatogramm bei 210 nm, welches stark von der jeweiligen Matrix dominiert wurde, sodass die Einzelanalyten nicht im Chromatogramm zu erkennen waren und nur vermutet werden konnten (siehe Abbildung 24).

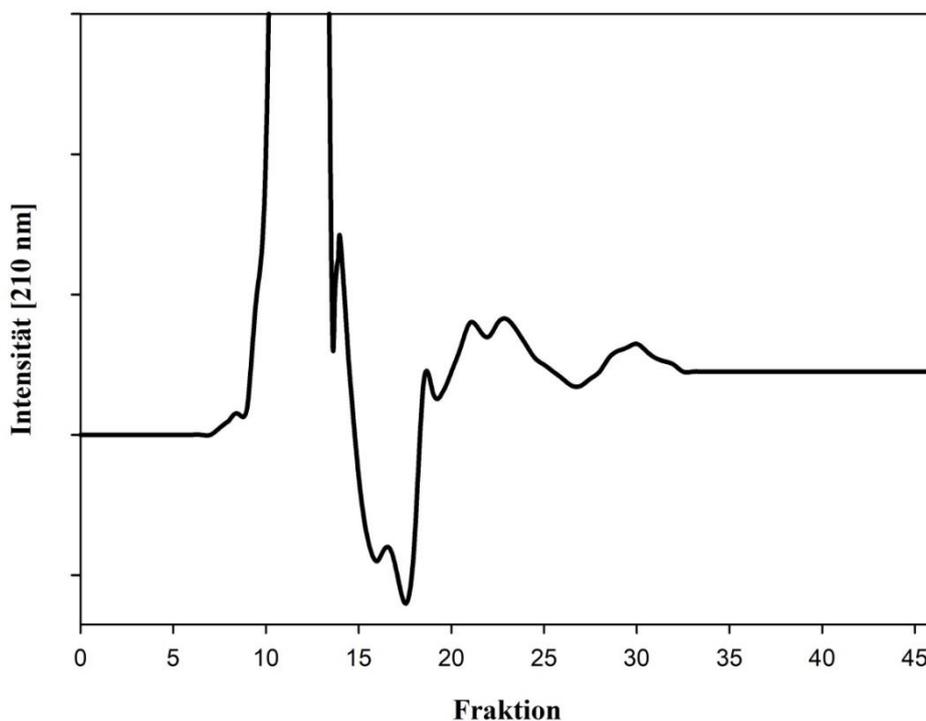


Abbildung 24: Charakteristisches Muster der MLCCC-Chromatogramme einer Auberginenprobe

Deshalb waren die jeweiligen Chromatogramme nicht zur Auswertung der MLCCC geeignet und die einzelnen Fraktionen wurden mittels DC charakterisiert (Laufmittel I: Ethylacetat/Methanol/Wasser, 7:1,5:1,4). Die Detektion erfolgte durch Besprühen mit frisch hergestelltem Liebermann-Burchard Reagenz, wobei die synthetisierten Standards nach zehnminütiger Entwicklungszeit bei 60 °C eine rosa Färbung aufwiesen. Die interessanten

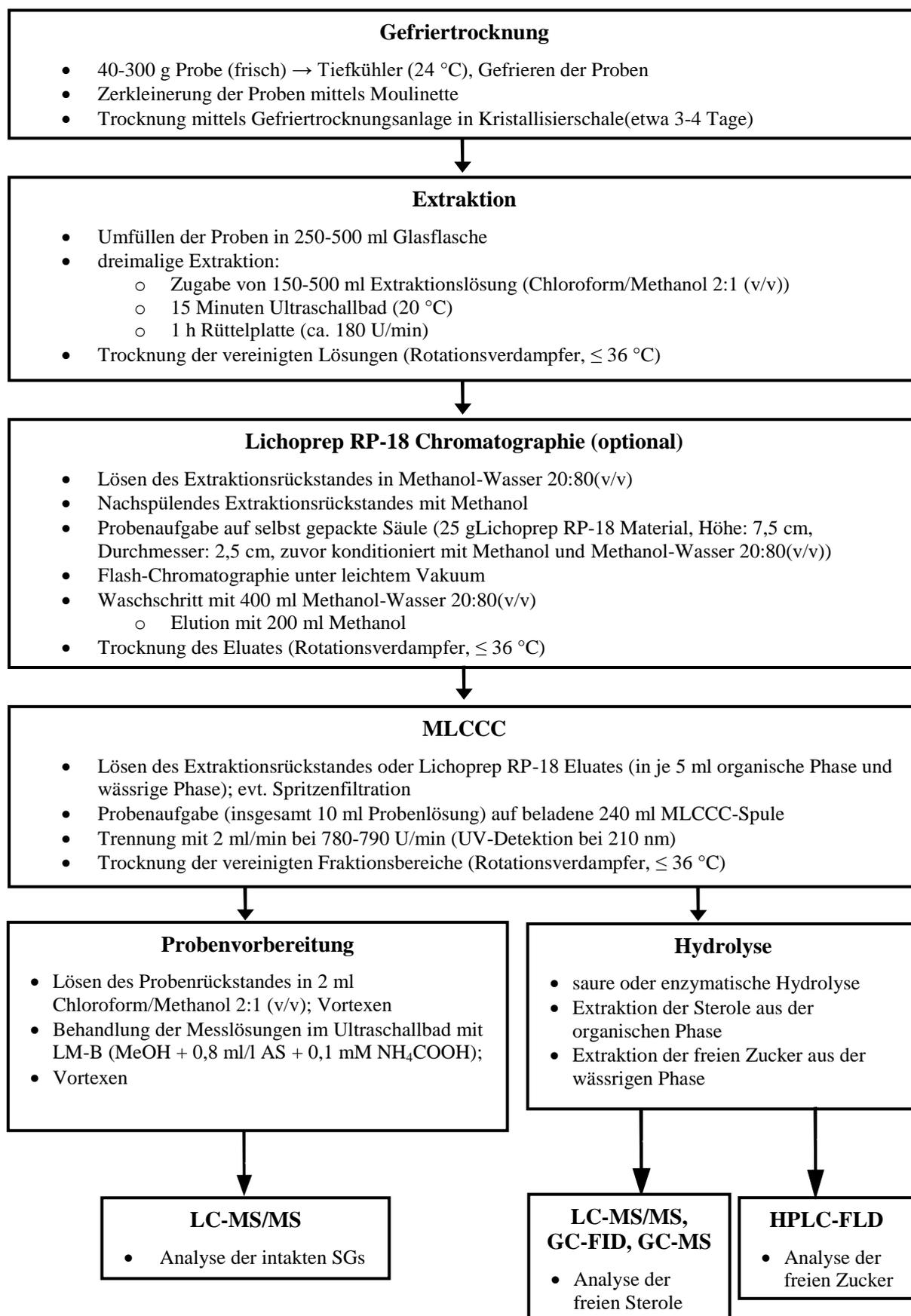
Fraktionen wurden durch Vergleich mit den  $R_f$ -Werten und Spotfarben der Standards ermittelt. Nach Überprüfung der MLCCC-Fraktionen wurden die Fraktionsbereiche der Extrakte so gewählt, dass trotz matrixbedingter Verschiebungen alle Analyten erfasst werden konnten. In der Regel wurden dazu die Fraktionen 1-10, 11-20 und 21-40 vereinigt. Dabei waren die Sterol-Cellos in Fraktion 1-10, die Strukturen des Chol-Glc, 7-DHC-Glc und D<sub>3</sub>-Glc in Fraktion 11-20 und die Sterol-Glcs sowie die Sterol-Gals in Fraktion 21-40 zu finden. Leichte Verschiebungen waren vor allem bei Stigma-Glc und Camp-Glc zu beobachten, die zum Teil auch im Fraktionsbereich 11-20 wiedergefunden wurden. Alle anderen Analyten eluierten ähnlich zur matrixfreien MLCCC Trennung, wie es in Tabelle 6 dargestellt ist.

#### 4.3.1.4 Lichoprep RP-18 Chromatographie

Einige polarere Analyten wie die Sterol-Cellos eluierten in den frühen Fraktionen (Fraktion 5-6, siehe Tabelle 6) der MLCCC, in denen unter anderem auch eine Vielzahl an freien Zuckerstrukturen zu finden waren. Dies störte zum einen die Trennung mittels MLCCC, da hierbei eine starke Verschleppung von stationärer Phase in die ersten zehn Fraktionen zu beobachten war. Zum anderen belastete die Matrix diesen Fraktionsbereich stark, sodass eine spätere Analytik erschwert wurde. Daher wurde eine chromatographische Methode mittels Lichoprep RP-18 Material entwickelt, die vor der MLCCC einen Großteil der stark polaren Substanzen abtrennte und gleichzeitig keinen der Zielanalyten diskriminierte. Zur zeitlichen Optimierung wurde unter leichtem Vakuum (etwa 450 mbar) die Laufmittelgeschwindigkeit soweit erhöht, dass eine vollständige Anreicherung inklusive aller Waschschriffe und Säulenregeneration in akzeptabler Zeit möglich war. Zur Minimierung von Verwirbelungen wurde die Säule mit Glaswolle überschichtet. Die Probenaufgabe erfolgte in Methanol-Wasser 2:8 (v/v), wobei der Probenrückstand zunächst so weit wie möglich im Laufmittelgelöst wurde. Um möglichst alle Zielstrukturen auf die Säule aufzutragen wurde mit wenigen Millilitern Methanol nachgespült. Der Waschschriff zur Abtrennung der polaren Strukturen erfolgte wie die Probenaufgabe mit 400 ml Methanol-Wasser 2:8 (v/v). Anschließend wurde mit 200 ml Methanol isokratisch eluiert. Sowohl das Eluat des Waschschriffes als auch das methanolische Eluat wurden nach Aufkonzentrierung mittels DC geprüft. Dabei waren alle mit den synthetisierten Standards vergleichbaren Strukturen im methanolischen Eluat zu finden, wohingegen im Eluat des Waschschriffes hauptsächlich Strukturen mit deutlich niedrigeren  $R_f$ -Werten enthalten waren, die verworfen wurden. Alternativ wurde auch versuchsfreie Zucker und andere unerwünschte Extraktionsprodukte mittels SPE-Kartuschen abzutrennen, wobei sich diese Methode jedoch als deutlich ineffektiver erwiesen hat als die Lichoprep RP-18 Chromatographie und daher nicht etabliert wurde.

Da Verluste bei präparativer Chromatographie nie auszuschließen sind, verhinderte die Anwendung dieses Trennschriffes eine spätere Quantifizierung der Zielanalyten. Infolgedessen wurde diese Methode ausschließlich zur Aufkonzentrierung von Extrakten genutzt, bei denen eine qualitative Bestimmung neuartiger glycosilierter steroidaler Strukturen im Vordergrund stand. Bei der Aufarbeitung der Extrakte für die Quantifizierung, welche in Kapitel 4.5.1.1 (S. 71ff.) beschrieben wird, wurde die Lichoprep RP-18 Chromatographie nicht verwendet.

### 4.3.2 Zusammenfassung der Anreicherungsmethode



### 4.3.3 Methodenentwicklung zur Bestimmung des Aglykons und der freien Zucker nach Hydrolyse glycosidisch gebundener steroidaler Strukturen

Zu Beginn der Arbeit sollten ausschließlich glycosidisch gebundene D-Vitamer aus *Trisetum flavescens* (Goldhafer) identifiziert werden. Da die genaue Konstitution des Aglykons und des Zuckeranteils im Rahmen vorliegender Arbeit identifiziert werden sollten, war zunächst eine Methode zur Identifizierung von freien D-Vitaminen nach Hydrolyse der angereicherten Strukturen nötig. Dabei wurde die Methode nach Seeburg et al. (2014) genutzt, für welche die gerätespezifischen Parameter bereits optimiert waren.<sup>85</sup> Die Entwicklung einer neuen Methode zur Bestimmung der freien D-Vitamer war daher nicht notwendig. Zur Analytik der freigesetzten Zuckerstrukturen wurde die Methode nach Rakete et al. (2013) für die potentiellen Zuckerstrukturen optimiert.<sup>154</sup>

Im Verlauf der Forschungsarbeit sollten neben den D-Vitaminen auch diverse, teils glycosidisch gebundene Zoosterole und vor allem Phytosterole aus Pflanzenextrakten isoliert und identifiziert werden. Für die Analytik von Sterolen bot sich neben der HPLC vor allem die GC an, welche die Vorteile der einfachen Detektion und schnellen Messung miteinander vereint.<sup>5</sup>

#### 4.3.3.1 Entwicklung und Optimierung einer GC-FID/MS Methode zur Bestimmung freier Sterole

In der Literatur wurden vielfältige Methoden zur Analytik freier Sterole beschrieben. Neben HPLC-Methoden, welche aufgrund eines fehlenden Chromophors steroidaler Strukturen für herkömmliche spektrometrische Detektionsarten weniger geeignet sind, wurde häufig die Gaschromatographie verwendet.<sup>5,168,169</sup> Die Identifizierung mittels FID ist dabei weit verbreitet, da sie viele Vorteile, wie einfaches Handling, gute Sensitivität und geringe Kosten, miteinander vereint.<sup>169</sup> Daher wurde eine analytische Trennmethode zur Identifizierung verschiedener Sterolderivate entwickelt, wobei sich die gaschromatographischen Bedingungen an der Literaturorientierten und für das genutzte Gerät soweit optimiert wurden, dass eine ausreichende Trennung in möglichst kurzer Zeit und geringer Säulenbelastung erzielt werden konnte.<sup>10,168</sup>

Zur Erhöhung der Flüchtigkeit und Sensitivität wurden die freien Sterole mittels BSA (N,O-Bis-Trimethylsilylacetamid) mit 5 % TCMS (Trimethylchlorsilan) in Pyridin an der 3-Hydroxygruppe silyliert. Diverse Inkubationstests haben gezeigt, dass nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei 70 °C eine vollständige Derivatisierung erzielt und somit eine schnelle und unkomplizierte Silylierungsmethode etabliert werden konnte. Anschließend erfolgte nach zweiminütiger Aufheizphase von 250 °C eine isotherme Trennung auf einer Agilent HP-5 GC-Säule bei 270 °C. Die genauen Parameter der Methode sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Die entwickelte Methode erlaubte die Trennung verschiedener Phytosterole und D-Vitamer innerhalb von 15 Minuten. Zum Ausheizen der Säule wurde die Temperatur für weitere 15 Minuten konstant bei 270 °C belassen, um möglichst alle Substanzen von der Säule zu entfernen, sodass sich eine Gesamtdauer von 30 Minuten für eine Trennung ergab.

Tabelle 7: Messparameter zur Trennung verschiedener Sterole und D-Vitamine mittels GC-FID/MS nach Derivatisierung mit BSA+TCMS

Parameter	Bedingung
Messmethode (FID)	
Trennsäule	HP-5 (30 Meter, 0,32 mm, 0,25 µm)
Säulenmaterial	5 % Diphenyl – 95 % Dimethylpolysiloxan
Trärgas	Helium
Fluss	1,6 ml/min
Inlet Temperatur	250 °C
Injektionsvolumen	1,0 µl
Split	1:50
Temperaturprogramm	250 °C $\xrightarrow{10\text{ °C/min (2')}}$ 270 °C (28')
Detektor	FID (310°C)
Dauer	30 Minuten
Messmethode (MS)	
Trennsäule	DB-5 MS (30 Meter * 0,25 mm * 0,25 µm)
Säulenmaterial	5% Diphenyl - 95% Dimethylpolysiloxan
Trärgas	Helium
Fluss	7,0 ml/min
Inlet Temperatur	250 °C
Injektionsvolumen	1,0-5,0 µl
Split	splitless
Temperaturprogramm	250 °C $\xrightarrow{10\text{ °C/min (2')}}$ 270 °C (33')/(63')
Detektor	Thermo Trace DSQ – Massenspektrometer
Dauer	35 Minuten/65 Minuten

Für die Verifizierung der Sterole und für stark matrixbelastete Proben der Pflanzenextrakte, welche teils zu Überlagerungen von einzelnen Signalen führten, wurde die massenspektrometrische Detektion genutzt. Die MS-Methode diente hauptsächlich zur Identifizierung unbekannter steroidaler Strukturen nach Hydrolyse der glycosidisch gebundenen Strukturen in komplexen Matrices, wohingegen zur sicheren Qualifizierung der bekannten Sterole in matrixfreien Proben die FID-Methode genügte. Dabei wurde mit der DB-5 MS eine andere Säule und andere Parameter verwendet, weshalb die Methode hinsichtlich ihrer Trennzeit angepasst wurde (siehe Tabelle 7). Daher zeigten sich abweichende Retentionszeiten, was mit dem unterschiedlichen Säulenmaterial zusammenhing. Durch die Etablierung einer „*selected ion monitoring*“ (SIM) Methode konnten diverse Phytosterole und Zoosterole sowie einige Vitamin D-Strukturen innerhalb von 23 Minuten getrennt und sicher quantifiziert werden. Zum Ausheizen der Säule wurde für weitere 12 Minuten bei 270 °C belassen, womit sich eine Gesamtlaufzeit von insgesamt

35 Minuten ergab. Für einige höhermolekulare Strukturen, die bei der Synthese der SGs anfielen, musste in Ausnahmefällen die Gesamtdauer der Methode jedoch auf 65 Minuten verlängert werden.

Neben den Sterolen konnten mit den in Tabelle 7 beschriebenen GC-Methoden auch freie D-Vitamine erfasst werden, bei denen jedoch in der Regel zwei Signale im Chromatogramm zu erkennen waren. Dies spricht für eine Umlagerung während der Derivatisierung, was die Empfindlichkeit von Vitamin D-Strukturen gegenüber Umlagerungsreaktionen verdeutlicht, eine Qualifizierung jedoch zuließ. Ein Beispielchromatogramm mit den jeweiligen Retentionszeiten der einzelnen steroidalen Strukturen ist in Abbildung 25 dargestellt, wobei zu beachten ist, dass es sich bei den Signalen mit den Retentionszeiten von 9,7 Minuten und 10,6 Minuten um Artefakte des Vitamin D<sub>3</sub> und des Vitamin D<sub>2</sub> handelte. Daher wurde für eine gesicherte Qualifizierung von freien D-Vitaminen auf die LC-MS/MS Methode von Seeburg et al. (2014) zurückgegriffen und ausschließlich die klassischen Sterole mittels GC-FID/MS in verschiedenen Extrakten charakterisiert.<sup>85</sup>

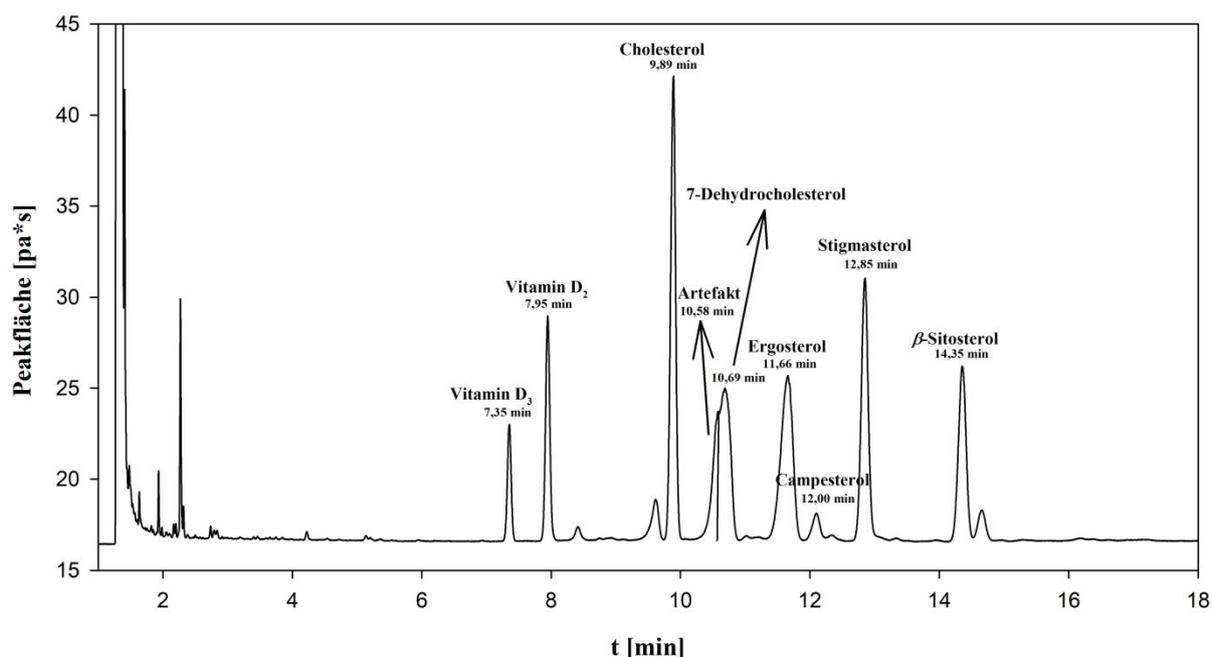


Abbildung 25: GC-FID Chromatogramm ausgewählter Sterole und D-Vitamine nach Derivatisierung mit BSA+TCMS mit den jeweiligen Retentionszeiten

Die Analyse der freien Zucker erfolgte nach Hydrolyse der glycosidisch gebundenen Strukturen aus der wässrigen Phase. Es wurde auf eine Methode von Rakete et al. (2013) zurückgegriffen, welche speziell für die Mono- und Oligosaccharide aus Maischen entwickelt wurde.<sup>154</sup> Diese Methode greift auf eine Vorsäulenderivatisierung durch reduktive Aminierung der Zucker mittels 1-Naphtylamin und anschließende Fluoreszenz-Messung nach chromatographischer Trennung zurück. Da die Methode spezielle Zucker detektiert, die vor allem beim Bier von Bedeutung sind, wurde die bestehende Methode erweitert, um auch potentielle Zucker an steroidalen Strukturen erfassen zu können. Da bei der sauren oder enzymatischen Umsetzung der glycosilierten Sterole alle glycosidischen Bindungen hydrolysiert werden, wurden speziell Monosaccharide in der Methode etabliert. Dazu mussten einige Parameter optimiert werden, um eine ausreichende Trennung der relevanten

Monosaccharide zu ermöglichen. Die Parameter der optimierten HPLC-Methode sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Optimierte Parameter der HPLC-FLD Methode zur Trennung verschiedener Monosaccharide nach reduktiver Aminierung mittels 1-Naphtylamin

Parameter/ Messmethode	Bedingung
Trennsäule	Knauer Eurospher 100-5 C18, 250x4,0 mm, 5 µm + Vorsäule
Laufmittel	A: H <sub>2</sub> O + 0,6 % HFBA (Heptafluorbuttersäure) B: Methanol/H <sub>2</sub> O 70:30 + 0,6 % HFBA
Fluss	1,0 ml/min
Temperatur	20 °C
Detektor	Fluoreszenz-Detektor
Wellenlänge der Anregung	318 nm
Wellenlänge der Emission	440 nm
Injektionsvolumen	10 µl
Gradient	65/35 $\xrightarrow{5'}$ 80/20 (25') $\xrightarrow{5'}$ 70/30 $\xrightarrow{10'}$ 65/35 (30') $\xrightarrow{5'}$ 0/100 (15') $\xrightarrow{10'}$ 65/35 (15')
Dauer	110 min

Insgesamt wurden acht bedeutende Monosaccharide in der Methode etabliert. Dabei konnten einzig die Strukturen der Xylose und Arabinosenicht mit der Methode voneinander getrennt werden und ergaben ausschließlich bei Einzelinkubationen leicht unterschiedliche Retentionszeiten (siehe Tabelle 9). Bei Injektionen eines gemischten Standards konnte für beide Strukturen nur ein Signal detektiert werden.

Tabelle 9: Retentionszeiten der etablierten Zucker mittels HPLC-FLD-Methode

Substanz	Retentionszeit [min] (siehe Methode Tabelle 8)
Fructose	36,7
Galactose	43,3
Glucose	45,6
Mannose	47,0
Xylose	51,2
Arabinose	50,5
Ribose	53,0
Rhamnose	67,4

Alles in allem erlaubte die entwickelte Methode die Trennung acht verschiedener Monosaccharide mit Bestimmungsgrenzen im Bereich weniger µmol. Dies war von Bedeutung, da für eine Qualifizierung der einzelnen Zucker mittels DC die Konzentrationen teils zu gering waren. Darüber hinaus störten Matrixbestandteile die Trennung mittels DC, weshalb zur Identifizierung der freien Zucker ausschließlich auf die HPLC-FLD-Methode zurückgegriffen wurde.

#### 4.3.4 Entwicklung und Optimierung einer LC-MS/MS-Methode für SGs

Nach der erfolgreichen Anreicherung sollten die literaturbeschriebenen SGs als intakte Strukturen quantifiziert und neuartige Strukturen qualifiziert werden. Generell sind in der Literatur verschiedene Verfahren beschrieben, um intakte SGs analytisch zu erfassen.<sup>5</sup> Dabei wurden neben LC-MS/MS-Methoden auch andere HPLC-Methoden beschrieben, die auf einfachere Detektionssysteme wie UV-Detektion oder Lichtstreuendetektoren zurückgreifen.<sup>128,146,125</sup> Diese waren jedoch deutlich unempfindlicher und benötigten eine ausreichende Anzahl authentischer Standards, um eine gesicherte Quantifizierung zuzulassen. Für die im Rahmen dieser Forschungsarbeit durchgeführten Experimente im Spurenbereich erwies sich der UV-Detektor aufgrund seiner geringen Empfindlichkeit und der daraus resultierenden hohen Nachweisgrenzen als ungeeignet. Ein weitreichendes Problem stellte vor allem die Charakterisierung des Zuckerrestes sowie eine ausreichende Trennung einzelner intakter SGs dar.<sup>4,8-10</sup> Daher wurden SGs in der Literatur häufig hydrolysiert und anschließend das Aglykon sowie der Zuckerrest jeweils einzeln analytisch bestimmt.<sup>9,10,140,170</sup> Dabei wurden jedoch Umlagerungs- und Abbaureaktionen beobachtet, die eine exakte quantitative Analytik verhindern. Dieses Problem kann nur durch die Bestimmung der intakten SGs gelöst werden. Bisher wurden jedoch nur wenige Methoden zur Analytik intakter SGs beschrieben.<sup>8,11,16,151,171</sup> Anhand der Synthesestandards wurde daher eine neuartige LC-MS/MS-Methode entwickelt, die es erlaubte, die verschiedenen Sterol-Glcs und Sterol-Gals parallel zu bestimmen. Damit konnten Varietät und Quantität der SGs in diversen Pflanzenextrakten aufgeklärt werden.

##### 4.3.4.1 Optimierung der HPLC Methode

Eine ausreichende chromatographische Trennung stellt ein wichtiges Kriterium für eine spätere Identifizierung strukturell sehr ähnlicher Strukturen dar. Daher musste eine Methode entwickelt werden, die es erlaubte, sowohl die Matrix, als auch die verschiedenen chemisch verwandten Strukturen der SGs ausreichend zu trennen, um eine gesicherte Qualifizierung und Quantifizierung zu ermöglichen. Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ist ein übliches Verfahren zur Bestimmung von SGs. Während die Normalphasen-chromatographie (NP) zur Bestimmung des Gesamtanteils an SGs geeignet ist, können die Umkehrphasen (RP) zur Trennung und Quantifizierung einzelner SGs genutzt werden.

Die chromatographische Trennmethode wurde auf Grundlage einer bereits etablierten Methode für freie D-Vitamer entwickelt.<sup>85</sup> SGs haben je nach Art der Glycosylierung einen mittelpolaren Charakter, wobei die einfach glycosylierten SGs trotz des Zuckeranteils einen unerwartet unpolaren Charakter aufwiesen. Zur Trennung wurde eine RP-HPLC-Säule (Knauer Vertex Column Eurospher-100 C18; 250 x 4,6 mm mit integrierter Vorsäule) genutzt, welche sowohl für polare als auch unpolare Analyten geeignet ist. Zur Optimierung der Messzeit wurde auch die Trennung an einer kürzeren Trennsäule des gleichen Materials (Knauer Eurospher II 100-3 C18 H, 100x2 mm, 3 µm + Vorsäule) überprüft, was jedoch in einer deutlich schwächeren Trennleistung resultierte. Somit war eine gesicherte Qualifizierung und Quantifizierung nicht gegeben, weshalb diese Säule ausschließlich zum

schnellen Screening einzelner Analyten oder zur Analytik freier D-Vitamer nach der Methode von Seeburg et al. (2014) genutzt wurde.<sup>85</sup>

Zunächst wurde die Methode mit UV/DAD-Detektion ( $\lambda = 254$  nm für 7-DHC-Glc und D<sub>3</sub>-Glc und  $\lambda = 202$  nm für alle SGs) für die synthetisierten Standards optimiert, sodass eine ausreichende Trennung der Einzelanalyten erzielt werden konnte (siehe Kapitel 11.3 und 11.4, S.132f., Anhang). Als mobile Phase wurde ein auf Methanol und Wasser basierendes System genutzt. Zur Erhöhung der Elutionskraft wurde dem Laufmittel jeweils 0,1 % (0,8 ml/l) Ameisensäure zugesetzt. Dieses Laufmittelsystem bot bereits in vorangegangenen Studien das beste SNR und folglich die geringsten Nachweis- (NWG) und Bestimmungsgrenzen (BG) aller verwendeten Gemische und war somit vor allem Acetonitril-basierten Laufmitteln weit überlegen.<sup>8</sup> Die Methode zur Trennung glycosidisch gebundener D-Vitamer umfasste eine Messzeit von 33 Minuten. Zur Trennung freier Sterole auf der verwendeten Säule war dagegen eine deutlich längere Messzeit von 65 Minuten erforderlich. Diese Methode wurde jedoch ausschließlich bei der Kontrolle der enzymatischen Hydrolyse der synthetisierten Vitamin D-Glucoside (7-DHC-Glc und D<sub>3</sub>-Glc) verwendet und fand keine Anwendung bei Matrixproben.

Tabelle 10: Optimierte Parameter der HPLC-Methoden zur Trennung von SGs

Parameter	Bedingung
Messmethode (SGs)	
Trennsäule	Knauer Eurospher I 100-5 C18, 250 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m + Vorsäule
Laufmittel	A: H <sub>2</sub> O + 0,1 % Ameisensäure + 0,1 mM NH <sub>4</sub> COOH (LC-MS/MS) B: Methanol + 0,1 % Ameisensäure + 0,1 mM NH <sub>4</sub> COOH (LC-MS/MS)
Fluss	1,0 ml/min
Temperatur	25 °C
Injektionsvolumen	20 $\mu$ l
Gradient	40/60 $\xrightarrow{2'}$ 5/95 $\xrightarrow{2'}$ 0/100 (21') $\xrightarrow{3'}$ 40/60 (5')
Dauer	33 min
Messmethode (Sterole)	
Injektionsvolumen	20 $\mu$ l
Gradient	40/60 $\xrightarrow{2'}$ 5/95 $\xrightarrow{2'}$ 0/100 (53') $\xrightarrow{3'}$ 40/60 (5')
Dauer	65 min
Anreicherungsmethode (SGs)	
Injektionsvolumen	20-100 $\mu$ l
Gradient	40/60 (5') $\xrightarrow{2'}$ 20/80 $\xrightarrow{2'}$ 7/93 (34') $\xrightarrow{3'}$ 0/100 (10') $\xrightarrow{3'}$ 40/60 (5')
Dauer	59 min

Für die massenspektrometrische Detektion wurde dem Laufmittel neben Ameisensäure zusätzlich 0,1 mM Ammoniumformiat zugesetzt, um die Bildung von  $[M+NH_4]^+$ -Addukten

zu initiieren, welche für die Entwicklung einer LC-MS/MS-Methode benötigt wurden. Bei einer UV/DAD-Detektion war ein derartiger Zusatz nicht nötig. In Tabelle 10 wurden die optimierten HPLC-Parameter der Standardmethode zusammengefasst. Um einzelne SGs gezielt mittels HPLC aufkonzentrieren zu können, wurde eine zusätzliche Methode entwickelt, welche eine Anreicherung einzelner Strukturen aus vorgereinigten Extrakten erlaubt (siehe Anreicherungsmethode Tabelle 10 sowie Kapitel 11.5.5, S.134). Zur Erhöhung der Polarität des Lösemittelgemisches erfolgte die isokratische Trennung mit einem Wasseranteil von 7 % im Laufmittel B, was zu einer besseren Trennung bei gleichzeitig schlechterer Trennleistung und deutlicher Peakverbreiterung führte. Dennoch konnten die synthetisierten Standards bei Elution mit Methanol-Wasser 93:7 (v/v) ausreichend getrennt werden. Anschließend wurde für 5 Minuten mit 100 % Methanol equilibriert. Mit dieser Methode konnten durch Verwendung eines Fraktionssammlers die gesuchten glycosilierten steroidal Strukturen angereichert und anschließend in aufkonzentrierter Lösung qualifiziert werden. Tabelle 11 gibt einen Überblick über die Retentionszeiten der synthetisierten Standards bei den unterschiedlichen verwendeten HPLC-Methoden. Ein entsprechendes UV-Chromatogramm der Messmethode für die Strukturen des 7-DHC-Glc, D<sub>3</sub>-Glc, 7-Dehydrocholesterol und Vitamin D<sub>3</sub> ist in Kapitel 11.3 (S.132) im Anhang dargestellt.

Tabelle 11: Retentionszeiten der synthetisierten Standards bei HPLC-Trennung mit der optimierten Standardmethode

Substanz	Retentionszeit HPLC-UV/DAD [min] mittels Messmethode (siehe Tabelle 10)	Retentionszeit HPLC-UV/DAD [min] mittels Anreicherungsmethode (siehe Tabelle 10)
D <sub>3</sub> -Glc	12,6	23,9
7-DHC-Glc	14,5	30,1
Chol-Glc	15,4	33,9
Sito-Cello	15,2	36,9
Stigma-Cello	14,5	34,0
Camp-Cello	14,7	36,2
Sito-Glc	16,5	41,5
Stigma-Glc	15,6	40,8
Camp-Glc	15,9	38,0
Sito-Gal	17,0	42,7
Stigma-Gal	16,1	41,9
Camp-Gal	16,4	38,7
Vitamin D <sub>3</sub>	19,9	n.b.
7-Dehydrocholesterol	40,8	n.b.

n.b. nicht bestimmt

#### 4.3.4.2 Optimierung der massenspektrometrischen Detektion

Die massenspektrometrische Detektion der einzelnen SGs erfolgte im MRM-Modus (ESI, positiv). Dabei wurden die synthetisierten SGs genutzt um einzelne substanzspezifische Massenübergänge zu ermitteln und anschließend die dazugehörigen Geräteparameter zu optimieren. Dazu wurden Standardlösungen mit einem Substanzgehalt von 0,25-10 µM (0,14 - 7,3 µg/ml) hergestellt. Die Standards wurden nach chromatographischer Trennung (siehe Kapitel 4.3.4.1, S. 59ff.) der Ionenquelle zugeführt. Das direkte Einspritzen der Analyten zur Identifikation der Massenübergänge war aufgrund des Vorliegens eines

Standardgemisches nicht möglich, weshalb eine vorherige Trennung mittels HPLC (siehe Tabelle 10, Messmethode (SGs) sowie Kapitel 11.5.6, S.135) nötig war.

Tabelle 12: MS/MS-Übergänge der Synthesestandards

Analyt	Mutterion	Q1 [Da]	Q3 [Da]	Rt [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
Chol-Glc	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	566,9*	369,7*	13,7	60	18	15
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	566,9	161,3			45	15
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	566,9	135,4			40	10
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	566,9	147,4			50	13
Sito-Glc	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	594,7*	397,7*	14,9	60	20	15
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	594,7	161,4			45	15
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	594,7	147,2			50	15
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	594,7	95,4			80	15
Stigma-Glc	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	592,9*	395,7*	14,0	60	15	13
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	592,9	83,2			50	13
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	592,9	139,5			30	13
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	592,9	255,6			30	13
Camp-Glc	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	580,9*	383,7*	14,4	60	20	20
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	580,9	147,2			45	10
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	580,9	161,4			50	10
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	580,9	135,3			45	10
Sito-Gal	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	594,7*	397,7*	15,5	60	20	18
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	594,7	147,5			50	13
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	594,7	189,4			45	10
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	594,7	85,4			60	15
Stigma-Gal	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	592,9*	395,7*	14,5	60	15	13
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	592,9	83,2			50	13
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	592,9	139,5			30	13
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	592,9	255,6			30	13
Camp-Gal	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	580,9*	383,7*	14,9	60	20	20
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	580,9	147,2			45	10
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	580,9	161,4			50	10
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	580,9	135,3			45	10
Sito-Cello	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	757,0*	397,7*	13,8	60	20	18
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	757,0	163,3			30	13
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	757,0	325,5			15	15
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	757,0	85,3			80	15
Stigma-Cello	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	755,0*	395,7*	13,1	60	20	15
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	755,0	83,1			60	13
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	755,0	325,5			15	10
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	755,0	163,5			30	13
Camp-Cello	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	743,0*	383,7*	13,5	60	20	20
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	743,0	163,3			30	13
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	743,0	85,3			80	13
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	743,0	325,5			15	13
7-DHC-Glc	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	566,9*	367,5*	12,7	60	20	13
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	566,9	145,4			40	10
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	566,9	159,4			45	15
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	566,9	385,4			20	20
D <sub>3</sub> -Glc	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	566,9*	367,5*	11,0	60	25	20
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	566,9	385,5			25	18
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	566,9	121,2			40	5
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	566,9	247,4			25	15

\*Quantifier

Darüber hinaus ergaben sich einige Schwierigkeiten beim Ermitteln der bestmöglichen Massenübergänge. Zunächst konnte unter keinen Bedingungen ein  $[M+H]^+$ -Ion ermittelt werden. Das  $[M+Na]^+$ -Ion wies dagegen bei allen SGs die höchste Intensität auf. Dieses ließ sich jedoch äußerst schlecht fragmentieren und lieferte lediglich einen Massenübergang auf das  $[Aglykon+H-H_2O]^+$ , wie es auch von Opplinger et al. beschrieben wurde.<sup>8</sup> Durch den Zusatz von geringen Mengen an Ammoniumformiat (0,1 mM) zum Laufmittelsystem konnte hingegen die Bildung von  $[M+NH_4]^+$ -Addukten initiiert werden, welche sich deutlich besser fragmentieren ließen. Eine ähnliche Methode wurde bereits von Akiyama et al. (2016) für das Chol-Glc berichtet.<sup>11</sup> In Folge dessen konnten für jeden Synthesestandard vier intensitätsstarke Masse zu Ladungs ( $m/z$ )-Übergänge (davon je drei Qualifier und ein Quantifier) ermittelt und anschließend die optimalen Fragmentierungsbedingungen angepasst werden. Die angepassten Geräteparameter für die Fragmente sowie die Retentionszeiten der einzelnen Substanzen sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Um eine maximale Ionenausbeute zu erzielen, wurden die nicht substanzspezifischen MS-Parameter durch Fließinjektionsanalyse (FIA) zunächst anhand des Chol-Glcs und der Sterol-Glcs optimiert. Wie sich zeigte, waren diese auch für alle synthetisierten Standards ähnlich, weshalb die in Tabelle 13 ermittelten Parameter für alle Substanzen übernommen wurden.

Tabelle 13: Optimierte massenspektrometrische Parameter

Parameter	Bedingung
Curtain Gas	30 psi
Temperature	550 °C
Gas 1 (Auxiliary Gas)	50 psi
Gas 2 (Nebulizer Gas)	60 psi
Collision Gas	Medium; 5psi
Ion Spray Voltage	5.500 V
Detection	MRM-Mode

#### 4.3.4.3 Säulenrekonstitution

Im Verlaufe der Messungen der aufgearbeiteten Pflanzenextrakten zeigte sich trotz Spülmessungen teils Verunreinigungen in den Chromatogrammen, welche sich in gestörten MRM-Übergängen einiger Analyten äußerten. Darüber hinaus konnten die  $m/z$ -Übergänge des Sito-Glc auch in Blindmessungen detektiert werden, was eine Quantifizierung behinderte. Da die Probenaufarbeitung keinen weiterenchromatographischen Trennschritt zur Abtrennung von Matrixbestandteilen erlaubte, musste die Säule regelmäßig rekonstruiert werden. Dazu wurde die Knauer Eurospher I mit einem Säulenvolumen von 2,91 ml mit diversen unpolaren Lösemitteln bei einem Fluss von 1 ml/min und einer Säulentemperatur von 50 °C gespült. Die Spülschritte umfassten dabei 20 Säulenvolumina Wasser, 20 Säulenvolumina Acetonitril, 5 Säulenvolumina Isopropanol und 20 Säulenvolumina *n*-Heptan. Anschließend wurde die Polarität langsam wieder erhöht, sodass erneut mit 5 Säulenvolumina Isopropanol und 20 Säulenvolumina Acetonitril gespült wurden. Abschließend erfolgte ein erneutes Umspülen auf das unter Kapitel 4.3.4.1 (Tabelle 10) beschriebene Methanol-Wasser System. Darüber hinaus fand vor jeder Säulenrekonstitution ein Vorsäulenwechsel statt, um eine erneute Verunreinigung zu verhindern. Durch dieses Verfahren konnten alle Störsubstanzen auf dem Säulenmaterial soweit entfernt werden, dass nach Rekonstitution keine gestörten Signale der

m/z-Übergänge in Blindmessungen mehr zu beobachten waren und das Grundrauschen das Niveau der Anfangsmessungen erreicht hatte. Somit konnte eine sichere Quantifizierung der Analyten gewährleistet werden.

#### 4.3.4.4 Entwicklung einer Quantifizierungsmethode für SGs

Nach der Entwicklung einer Multimethode für die zwölf synthetisierten SGs musste ein geeignetes Verfahren gewählt werden, um eine korrekte Quantifizierung in der komplexen und wechselnden Probenmatrix zuzulassen. Da keine isotopenmarkierte Standards für eine matrixangepasste Kalibrierung mit internem Standard zur Verfügung standen, welche eine Quantifizierung unter Berücksichtigung von Aufarbeitungsverlusten erlauben würden, wurde mit dem Standardadditionsverfahren gearbeitet. So konnten Matrixeffekte auch bei wechselnden Matrices korrigiert werden.

Bei der Aufarbeitungsmethode ohne internen Standard war die verlustfreie Anreicherung der Zielanalyten Voraussetzung für eine vollständige Quantifizierung. Diese konnte mittels MLCCC erreicht werden (siehe Kapitel 4.3.1.3, S.51ff.), wobei ein deutlich höherer Matrixanteil als bei klassischen chromatographischen Trennverfahren zu beobachten war. So konnten deutliche Matrixeffekte vor allem in den vorderen MLCCC Bereichen (1-20) der aufgearbeiteten Pflanzenproben festgestellt werden, welche durch das Standardadditionsverfahren ausgeglichen wurden, sodass ein linearer Messbereich für alle quantitativ bestimmten SGs gegeben war. Dabei wurde die Konzentration des jeweiligen Analyten anhand von Messungen definierter Standardlösungen abgeschätzt und anschließend mit der 0,5-fachen, 1-fachen, 2-fachen oder 3-fachen Menge des Synthesestandards addiert. Die Addition erfolgte aus einer Stammlösung von 1 µg/ml, wobei sich der Gehalt auf die Einwaage des jeweiligen Synthesestandards bezog. Bei den Mischstandards wurde stets das glycosilierte  $\beta$ -Sitosterol als Referenz gewählt. Die tatsächliche Konzentration der einzelnen Substanzen in der Standardlösung wurde unter Berücksichtigung der Reinheit, sowie des Gehaltes an Einzelsubstanz in den Mischstandards (Sterol-Glcs, Sterol-Gals und Sterol-Cellos) berechnet und bei der Dotierung berücksichtigt (siehe experimenteller Teil, Kapitel 6.1.2.1). Nach Analyse der Aliquote wurde eine Regressionsgerade der Peakfläche zur Konzentration des jeweiligen Analyten genutzt, um den Gehalt des jeweiligen Analyten in der Probe unter Berücksichtigung aller Verdünnungsschritte zu bestimmen.

#### 4.3.4.5 Nachweisgrenze/Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze (NWG) eines Verfahrens ist definiert durch die kleinste noch nachweisbare Menge an Analyt, während unter der Bestimmungsgrenze (BG) die geringste noch quantifizierbare Menge verstanden wird.<sup>172</sup> Zur Bestimmung dieser stehen verschiedenen Methoden zur Verfügung. Am weitesten verbreitet sind dabei die Methoden nach DIN 32645, sowie die Bestimmung aus dem SNR. In der entwickelten Methode wurden die analytischen Grenzen über das SNR ermittelt, da eine Leerwertprobe, wie sie nach DIN 32645 nötig ist, nicht ohne weiteres verfügbar war. Dabei ist die Nachweisgrenze als dreifache und die Bestimmungsgrenze als zehnfache Rauschhöhe zur Retentionszeit der Verbindung definiert.

Zur Bestimmung der NWG und BG wurden Verdünnungen der Standards erstellt, welche die drei- bis zehnfache Peakhöhedes Rauschens aufwiesen und anschließend doppelt bis dreifach vermessen. Nach linearer Regression der gemittelten Peakhöhen konnte ein Kalibrierfaktor ermittelt werden, welcher der theoretischen Konzentration des Rauschens entsprach. Durch Multiplikation des Kalibrierfaktors mit der Rauschhöhe in der Region des Signals des jeweiligen Analyten konnten die NWG und BG sowohl in der reinen, matrixfreien Standardlösungen als auch in Matrixproben bestimmt werden (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: NWG und BG in matrixfreien Probelösungen und in den aufgearbeiteten Auberginenproben bei der Bestimmung mittels LC-MS/MS

Analyt	NWG Standardlösungen [mg/kg]	BG Standardlösungen [mg/kg]	NWG Auberginenschale [mg/kg]	BG Auberginenschale [mg/kg]
Chol-Glc	0,001	0,004	0,28	0,93
Sito-Glc	0,001	0,003	13,87	46,22
Stigma-Glc	0,002	0,006	5,21	17,36
Camp-Glc	0,001	0,003	2,72	9,08
Sito-Gal	0,005	0,017	0,35	1,17
Stigma-Gal	0,003	0,010	0,14	0,46
Camp-Gal	0,001	0,004	0,05	0,15
Sito-Cello	0,004	0,014	0,19	0,63
Stigma-Cello	0,005	0,018	0,24	0,79
Camp-Cello	0,003	0,009	0,12	0,41
7-DHC-Glc	0,001	0,003	0,02	0,07
D <sub>3</sub> -Glc	0,003	0,010	0,07	0,22

Die NWG und BG wurde explizit für die Auberginenmatrix unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnungen ermittelt. Somit konnte eine gesicherte Qualifizierung und Quantifizierung der einzelnen Analyten in den aufgearbeiteten Pflanzenextrakten gewährleistet werden.

#### 4.4 Vitamin D-Strukturen *Trisetum flavescenz* (Goldhafer)

##### 4.4.1 Anreicherung glycosilierter Vitamin D-Strukturen

Zur Anreicherung und Isolierung glycosilierter Vitamin D-Strukturen im Goldhafer dienten selbst kultivierte Pflanzen aus Halle (Saale) und Umgebung. Zur Anreicherung glycosidisch gebundener Vitamin D-Strukturen wurden verschiedene Methoden entwickelt. Als Grundlage diente ein Aceton-Wasser Extrakt 70:30 (v/v) von etwa 3 g der gefriergetrockneten Proben. In den ersten Versuchen wurde mittels MLCCC versucht (siehe Kapitel 4.3.1.3, S.51ff.) anhand der Elutionsbereiche der synthetisierten Standards (siehe Tabelle 6, Kapitel 4.3.1.3, S.52) die glycosilierten Vitamin D-Strukturen anzureichern. Unter Berücksichtigung des UV-Chromatogramms bei 254 nm wurden charakteristische Fraktionen gebildet und diese direkt enzymatisch umgesetzt (siehe Tabelle 15). Zur Abtrennung freier Zuckerstrukturen wurde der vorderste Fraktionsbereich (11-17) zuvor mit Lichoprep RP-18 Säulenchromatographie aufgereinigt. Insgesamt musste festgestellt werden, dass nach enzymatischer Hydrolyse in keinem der Fraktionsbereiche D-Vitamine mittels LC-MS/MS nach der Aufarbeitungsmethode von Seeburg et al. (2014) nachgewiesen werden konnten.<sup>85</sup>

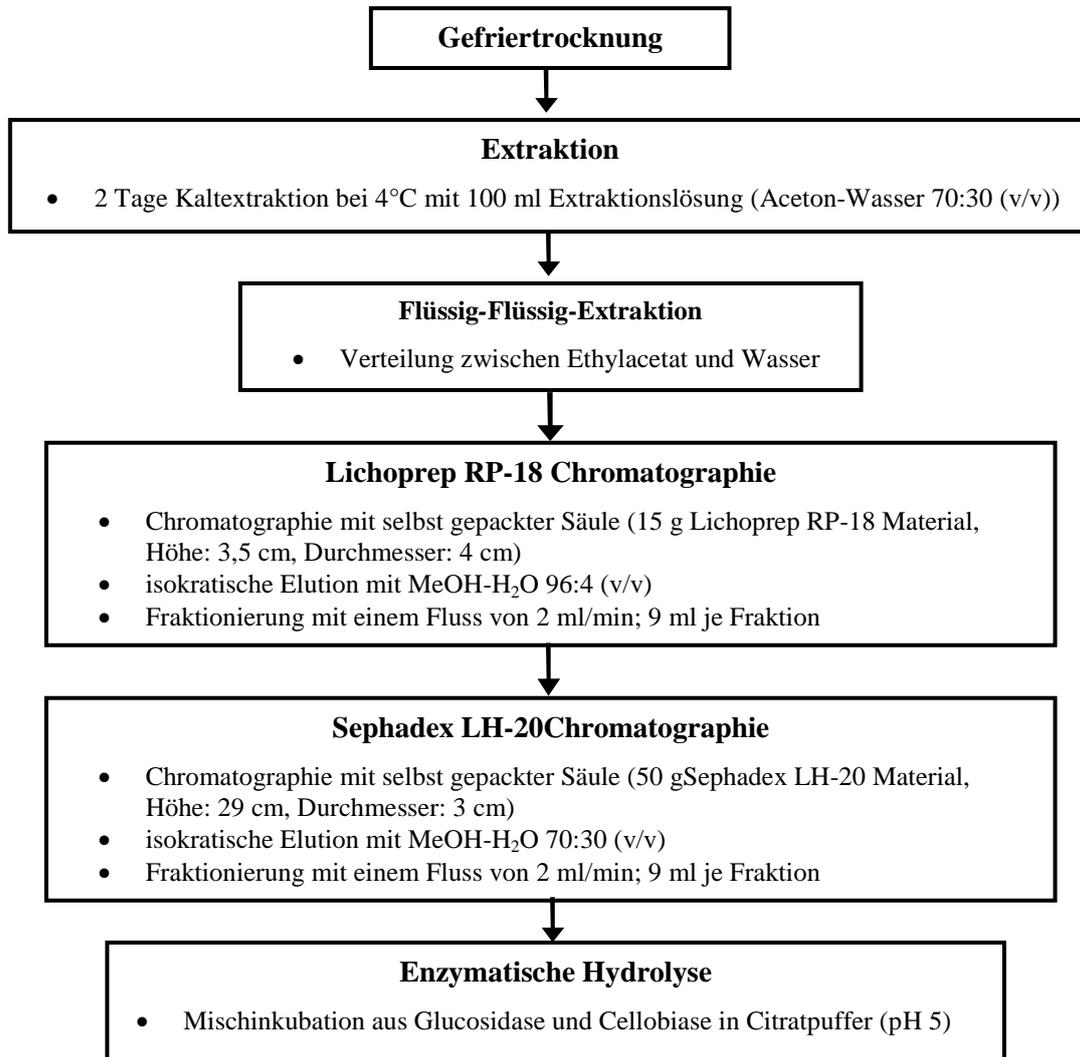
Tabelle 15: Charakterisierung der vereinigten MLCCC-Fraktionsbereiche nach Anreicherung der Goldhaferextrakte

MLCCC-Fraktionsbereich	Masse [mg]
1-10	verworfen
11-17	547,0
18-20	1,2
21-27	2,2
28-33	1,7
34-40	1,5
41-60	2,8
zurückgebliebene stationäre Phase (löslich in organischen Lösemitteln)	11,3
zurückgebliebene stationäre Phase (wasserlöslich)	78,1

Einzig in der verbleibenden stationären Phase waren Ergosterol und 7-Dehydrocholesterol nachweisbar, bei denen es sich jedoch um freie Vitamin D-Strukturen handeln muss, da diese auch ohne Hydrolyse nachweisbar waren. Daher wurde alternativ auf eine Aufarbeitung aus kombinierter Säulenchromatographie mittels Lichoprep RP-18 und Sephadex LH-20 Material mit vorheriger Flüssig-Flüssig-Extraktion (Ethylacetat-Wasser) zurückgegriffen, dessen Schema in Abbildung 26 dargestellt ist.

Die Fraktionierung erfolgte in Anlehnung an die Wiederfindung der Standards, wobei die Fraktionsbereiche etwas weiter gefasst wurden, um möglichst alle Zielstrukturen zu erfassen, deren genaue Struktur und folglich auch deren exaktes chromatographisches Verhalten unbekannt war. Da die Standards in den Fraktionsbereichen 14-30 und 29-45 der Lichoprep RP-18 beziehungsweise Sephadex LH-20 Säule wiederzufinden waren, wurde der Fraktionsbereich 13-40 der Lichoprep RP-18 und der Fraktionsbereich 30-80 der Sephadex LH-20 Säule angereichert. Die vereinigten und getrockneten Fraktionen wurden anschließend einer enzymatischen Hydrolyse (siehe Kapitel 4.2.2, S.48ff.) unterzogen und nach der Methode von Seeburg et al. (2014) mittels SPE-Säulen aufgereinigt.<sup>85</sup> Nach PTAD-Derivatisierung wurde mittels LC-MS/MS auf freie Vitamin D-Strukturen untersucht (siehe Kapitel 11.5.10, Anhang, S.139ff.). Zur Kontrolle wurde zusätzlich ein Aliquot der nicht hydrolysierten Proben umgesetzt und ebenso mittels LC-MS/MS vermessen. Die Ergebnisse zeigten, dass die meisten Vitamin D-Strukturen in der organischen Phase nachweisbar waren, obwohl die eigentlichen aktiven Metaboliten, die für eine Vitamin D-Aktivität im Goldhafer verantwortlich gemacht werden, in der wässrigen Phase beschrieben wurden (siehe Tabelle 16).<sup>35,34</sup> Darüber hinaus waren sowohl vor als auch nach der Hydrolyse D-Vitamine nachweisbar. Folglich muss es sich bei den identifizierten Analyten um die freien Strukturen des Ergosterols, 7-Dehydrocholesterols, Vitamin D<sub>3</sub> und Vitamin D<sub>2</sub> handeln, wobei nicht alle Extrakte dieselben Ergebnisse lieferten und speziell die Metaboliten des Vitamin D<sub>3</sub> und Vitamin D<sub>2</sub> nur in einigen Proben nachweisbar waren. Eine Ursache dafür könnte der Einfluss von UV-Licht sein, sodass die Proben in denen Vitamin D<sub>3</sub> und Vitamin D<sub>2</sub> enthalten waren, deutlich stärker dem Sonnenlicht ausgesetzt gewesen sein müssen, als Proben in denen keine der Strukturen gefunden wurden. Eine lichtabhängige Synthese des Vitamin D<sub>2</sub> und

Vitamin D<sub>3</sub> würde sich eindeutig mit dem Bestrahlungsexperiment in Kapitel 4.1.2 (S.39ff.) decken, bei welchem eine UV-Licht induzierte Umwandlung von 7-Dehydrocholesterol in Vitamin D-Metabolite beobachtet werden konnte.



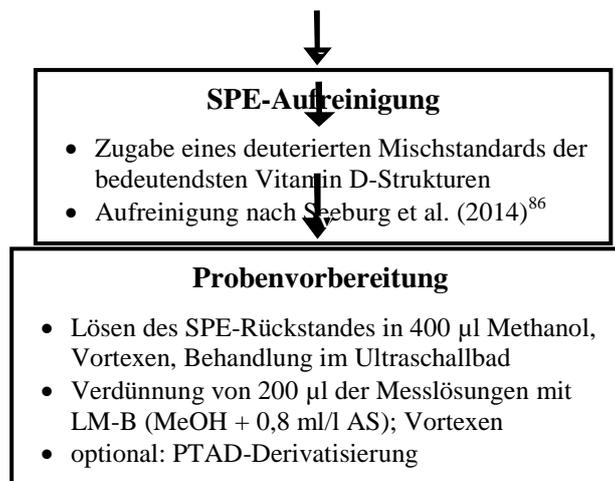


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Aufarbeitung der Goldhaferproben

Mehrfach hydroxylierte Vitamin D-Strukturen konnten nicht nachgewiesen werden. Zusammenfassend konnte eindeutig belegt werden, dass es sich bei den identifizierten D-Vitaminen um freie Strukturen handeln muss. Die Wiederfindung der lipophilen Vitamin D-Strukturen in der wässrigen Phase lässt sich durch eine unzureichende Trennung bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion von organischer und wässriger Phase aufgrund einer Vielzahl tensidartiger Strukturen in den Proben erklären. Ein Hinweis auf glycosidisch gebundene D-Vitamine konnte mit den angewandten Methoden nicht gefunden werden.

Tabelle 16: Nachweis freier Vitamin D-Strukturen im Goldhafer nach spezieller Anreicherung

Phase der flüssig-flüssig Verteilung	Analyt								
	Ergo	7-DHC	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	25(OH)D <sub>2</sub>	25(OH)D <sub>3</sub>	24,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>2</sub>	1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>
Ethylacetat Phase (hydrolysiert)	+	+	±	±	-	-	-	-	-
wässrige Phase (hydrolysiert)	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Ethylacetat Phase (ohne Hydrolyse)	+	+	+	+	-	-	-	-	-
wässrige Phase (ohne Hydrolyse)	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Ergo, Ergosterol; 7-DHC, 7-Dehydrocholesterol; D<sub>2</sub>, Vitamin D<sub>2</sub>; D<sub>3</sub>, Vitamin D<sub>3</sub>; 25(OH)D<sub>2</sub>, Ergocalcidiol; 25(OH)D<sub>3</sub>, Calcidiol; 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 24,25-Dihydroxycholecalciferol; 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub>, 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxycalciferol; 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, Calcitriol; + eindeutig nachweisbar; - kein Nachweis möglich; ± in ausgewählten Proben nachweisbar

#### 4.4.2 Quantifizierung freier Vitamin D-Strukturen

Nachdem eindeutig belegt wurde, LC-MS/MS dass im Goldhafer zwar freie, jedoch keine glycosilierten Vitamin D-Strukturen zu finden waren, sollte eine Quantifizierung Aufschluss darüber geben, ob der Gehalt an freien D-Vitaminen für die kalzinogene Wirkung des Goldhafers verantwortlich sein kann. Daher wurden die Goldhaferproben nach der Methode von Seeburg et al. (2014) aufgearbeitet und anschließend mittels LC-MS/MS quantifiziert.<sup>85</sup> Die Quantifizierungsergebnisse haben

gezeigt, dass geringe Gehalte an freiem Vitamin D<sub>3</sub> zu finden waren (siehe Tabelle 17). Darüber hinaus konnten deutliche Mengen der Strukturen des 7-Dehydrocholesterols und des Ergosterols nachgewiesen werden, welche die biosynthetischen Vorläufer des Vitamin D<sub>3</sub> und des Vitamin D<sub>2</sub> darstellen. Durch ein Bestrahlungsexperiment von selbst gezogenen Keimlingen konnte darüber hinaus deutlich die Abhängigkeit des UV-Lichtes auf die Bildung von Vitamin D<sub>3</sub> und Vitamin D<sub>2</sub> gezeigt werden. So waren diese nur in den mittels CAMAG UV-Lampe (8 W) aktiv bestrahlten Keimlingen nachweisbar, wohingegen in den unbestrahlten Keimlingen ausschließlich die Vitamin D-Vorstufen Ergosterol und 7-Dehydrocholesterol zu finden waren.

Tabelle 17: Quantifizierungsergebnisse freier Vitamin D-Strukturen im Goldhafer

Probe	Analytkonzentration [ $\mu\text{g/g}$ TW]			
	Ergosterol	7-Dehydrocholesterol	Vitamin D <sub>2</sub>	Vitamin D <sub>3</sub>
feldgewachsener Goldhafer	66,01	1,33	<BG	0,13
Keimlinge (unbestrahlt)	2,90	0,05	<NWG	<NWG
Keimlinge (bestrahlt)	10,77	0,25	<BG	0,03

TW: Trockengewicht, <NWG, unterhalb der Nachweisgrenze; <BG, unterhalb der Bestimmungsgrenze

Wie Tabelle 17 verdeutlicht, war im ausgewachsenen Goldhafer die höchste Konzentration an Vitamin D-Strukturen zu finden. Den größten Anteil machte dabei das Ergosterol aus, welches mit 66,01  $\mu\text{g/g}$  Trockengewicht etwa 50-fach höher konzentriert war als das 7-Dehydrocholesterol. Im Gegensatz dazu war bemerkenswert, dass Vitamin D<sub>3</sub> deutlich stärker vertreten war als Vitamin D<sub>2</sub>. So war das Vitamin D<sub>2</sub> nur in Spuren unterhalb der NWG detektierbar. Der ermittelte Gehalt von 0,13  $\mu\text{g/g}$  Trockengewicht stimmt mit den von Jäpelt et al. (2013) mittels Gaschromatographie bestimmten Werten überein.<sup>29</sup> In dieser Studie wurden 0,1  $\mu\text{g/g}$  Trockengewicht freies Vitamin D<sub>3</sub> beschrieben. Somit würde ein Gramm getrockneter Goldhafer etwa 5,2 IE (Internationale Einheiten) Vitamin D<sub>3</sub> enthalten, was keineswegs die kalzinogene Wirkung dieser Pflanze erklären kann, da eine Überdosierung mittels Vitamin D<sub>3</sub> erst ab einer Aufnahme von 50000 IE zu beobachten war. Darüber hinaus ruft das Vitamin D<sub>3</sub> keine dem biologisch wirksamen 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vergleichbare kalzinogene Wirkung hervor, da es im tierischen Organismus strengen Regulierungsmechanismen unterliegt.<sup>29,33,173</sup> Zudem wurden in der stark kalzinogenen Pflanze *Solanum glaucophyllum* deutlich höhere Aktivitäten von 400 bis 800 IE/g Trockengewicht ermittelt.<sup>68,174</sup>

#### 4.4.3 Ergebnisse der Identifizierung von Vitamin D-Strukturen

Aufgrund der im Rahmen des Projektes aufwendigen durchgeführten Untersuchungen muss daher zusammenfassend der Schluss gefasst werden, dass keine Hinweise auf die vermuteten glycosidisch gebundenen D-Vitamine gefunden werden konnten. Mello et al. (2003) beschreiben eine Wirkung der wasserlöslichen Vitamin D wirksamen Strukturen des Goldhafers, die vergleichbar mit der des 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-C(25)-Glucosids ist. Jedoch wurde auch hier verdeutlicht, dass die genaue Verbindung noch nicht strukturell charakterisiert werden konnte, was sich mit den Ergebnissen in vorliegender Studie deckt.<sup>33</sup> Zwar wurden

freie D-Vitameren detektiert, diese waren jedoch nicht der wasserlöslichen Fraktion von Goldhaferextrakten zuzuordnen. Es muss demnach geschlussfolgert werden, dass die in der Literatur beschriebene kalzinogene Wirkung von wässrigen Goldhaferextrakten auf Substanzen zurückzuführen ist, die zwar eine Vitamin D-Aktivität aufweisen, denen jedoch keine Vitamin D-Struktur zu Grunde liegt.<sup>33,35,34,175</sup>

#### 4.5 Glycosilierte steroidale Strukturen in pflanzlichen Proben

Nachdem glycosilierte Vitamin D-Strukturen in der Gattung *Trisetum flavescens* (Goldhafer) nicht identifiziert werden konnten, wurden die bisher erlangten Erkenntnisse und Materialien genutzt, um glycosilierte steroidale Strukturen in anderen Pflanzen und Lebensmitteln zu analysieren. Im Zuge umfangreicher Literaturrecherchen bezüglich steroidalster Strukturen werden neben bekannten kalzinogenen Pflanzen wie *Solanum glaucophyllum*, *Trisetum flavescens*, *Cestrum diurnum* oder *Solanum malacoxylon* auch immer wieder die Pflanzengattungen *Cucurbita* (Kürbisgewächse) und *Solanaceae* (Nachtschattengewächse) genannt.<sup>29,31,37,176</sup> Dabei gerietenspeziell *Cucurbita pepo* (Zucchini) und *Solanum melongena* (Aubergine) als moderne „functional foods“, auch aufgrund potentieller Vitamin D-Aktivitäten, in den Blickpunkt vorliegender Untersuchungen. In Folge dessen sollte das wenig erforschte Feld der SGs weiter untersucht werden, um neuartige Strukturen zu identifizieren und anhand der Synthesestandards bekannte Strukturen exakt analysieren zu können. Nach der intensiven Erforschung von glycosilierten steroidalster Strukturen in der Aubergine wurde mit der neuartigen Methode auch eine Übersicht zu SGs in *Trisetum flavescens* (Goldhafer) und *Cucurbita pepo* (Zucchini) erstellt.

##### 4.5.1 glycosilierte steroidale Strukturen in *Solanum melongena* (Aubergine)

Das bedeutendste pflanzliche Untersuchungsobjekt vorliegender Arbeit stellte die Aubergine oder auch Eierpflanze dar. In dieser wurden bereits viele glycosilierte steroidale Strukturen beschrieben, wie zum Beispieldie steroidalster Saponine des  $\alpha$ -Solamargins,  $\alpha$ -Solasonins<sup>177</sup> sowie die Melongoside.<sup>88</sup>

Tabelle 18: Übersicht analysierter Gehalte an SGs in Auberginen in bisherigen Studien

Studie	Analysemethoden		
Analyt	Pflanzenmatrix	Gehalt Trockengewicht [mg/kg]	Gehalt Frischgewicht [mg/kg]
Nyström et al. <sup>4</sup>	GC-FID des Aglykons nach saurer Hydrolyse	Literaturangabe	berechnet bei mittlerem Wassergehalt von 7 %
Sito-Glc	gesamte Frucht	48,3	3,4
Stigma-Glc	gesamte Frucht	12,7	0,9
Camp-Glc	gesamte Frucht	4,1	0,3
Summe aller SGs	gesamte Frucht	65,1	4,6
Zimowski et al. <sup>13</sup>	GC-FID der intakten Strukturen	berechnet bei mittlerem Wassergehalt von 7 %	Literaturangabe

Sito-Glc	gesamte Frucht	651,4	45,6
Stigma-Glc	gesamte Frucht	172,9	12,1
Camp-Glc	gesamte Frucht	88,6	6,2
Chol-Glc	gesamte Frucht	54,3	3,8
Summe aller SGs	gesamte Frucht	967,1	67,7
Chiang et al. <sup>116</sup>	Anreicherung und Isolation als Reinsubstanz	berechnet bei mittlerem Wassergehalt von 7 %	Literaturangabe
Sito-Glc	Wurzeln	190,5	13,3
Stigma-Glc	Wurzeln	168,6	11,8
Shabana et al. <sup>12</sup>	Anreicherung und Isolation als Reinsubstanz	berechnet bei mittlerem Wassergehalt von 7 %	Literaturangabe
Sito-Glc	Schale	2085,7	146,0
Poriferasterol-Glc	Schale	1457,1	102,0

Darüber hinaus wurde auch eine Vielzahl von SGs charakterisiert, welche jedoch bisher in keiner Studie mittels MS-Methode als intakte Struktur quantifiziert wurden.<sup>4,12,13</sup> Wie in Tabelle 18 zusammengefasst, existieren bisher nur wenige Studien mit stark widersprüchlichen Ergebnissen. Dies verdeutlicht auch, dass in jeder der aufgeführten Studien eine andere Analysenmethode genutzt wurde, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse erschwert. Daher wurden erstmals die mengenmäßig bedeutendsten SGs quantifiziert sowie neuartige glycosilierte steroidale Strukturen mit der entwickelten LC-MS/MS Methode qualifiziert. So konnten eindeutige Aussagen zu den Gehalten an SGs gemacht werden und noch nicht charakterisierte SGs identifiziert werden.

#### 4.5.1.1 Quantifizierung bekannter und neuartiger SGs in *Solanum melongena* (Aubergine)

Zur Quantifizierung der einzelnen Strukturen wurden ausschließlich die mittels MLCCC angereicherten Extrakte genutzt, wobei definierte Fraktionsbereiche gebildet wurden. Es wurden jeweils die Fraktionen 1-10, 11-20 und 21-40 vereinigt und nach Trocknung für die Quantifizierung mittels LC-MS/MS in geeigneten Verdünnungen verwendet. Die verschiedenen Extrakte wiesen dabei unterschiedliche Anteile der jeweiligen Analyten in den verschiedenen MLCCC-Fraktionsbereichen auf. So konnten deutliche Unterschiede vor allem zwischen den aufgearbeiteten Extrakten von Schale und Frucht ausgemacht werden, was mit Sicherheit auf die stark variierende Matrix zurückzuführen war. Dabei wiesen die Extrakte der Frucht ein deutlich höheres Trockengewicht als die Schalenextrakte auf, was für deutlich mehr Matrixbestandteile in der Frucht sprach. Daher eluierten alle Analyten bei der MLCCC von Fruchtextrakten etwas später als in den Proben der Schale. Zusätzlich waren Unterschiede nicht nur zwischen den einzelnen Organellen, sondern auch bei verschiedenen Auberginenproben auszumachen, weshalb die Quantifizierung für jede Probe individuell angepasst wurde. Generell war der Hauptanteil der Analyten in den MLCCC-Fraktionen 21-40 zu finden, wobei vor allem das Chol-Glc und teilweise das Camp-Glc und Stigma-Glc auch im Fraktionsbereich 11-20 eluierten. In den Fraktionen 1-10 wurden keine der gesuchten

Analyten gefunden, weshalb diese nicht zur quantitativen Bestimmung verwendet wurden. Da die Analytkonzentrationen für eine quantitative Bestimmung in den einzelnen MLCCC-Fraktionsbereichen zu groß waren, mussten diese entsprechend verdünnt werden. Um einen möglichst vergleichbaren Kalibrierbereich zu gewährleisten, war zudem bei einigen Extrakten eine unterschiedliche Verdünnung der einzelnen Fraktionsbereiche nötig. Tabelle 19 gibt einen Überblick über die in den jeweiligen Fraktionen identifizierten Analyten sowie deren Verdünnungen, aus denen die Kalibrierung mittels Standardadditionsverfahren erfolgte. Die Analysen haben gezeigt, dass die bisher in der Literatur beschriebenen Strukturen des Chol-Glc, Sito-Glc, Stigma-Glc und Camp-Glc eindeutig in quantifizierbaren Mengen in der Schale und Frucht nachweisbar waren. Darüber hinaus konnten auch die Strukturen des Sito-Gal und des Stigma-Gal nachgewiesen und quantifiziert werden. Bisher wurden ausschließlich die Glucoside des Cholesterols,  $\beta$ -Sitosterols, Stigmasterols und Campesterols charakterisiert und quantifiziert.<sup>4,12,116</sup> Das Auftreten von Sterol-Gals konnte in vorherigen Studien nicht bestätigt werden.<sup>13</sup> Somit konnten Sterol-Gals erstmals in Auberginenextrakten quantifiziert werden. Dabei erwies sich die Quantifizierung der Galactoside jedoch als Herausforderung, da diese in den schwach verdünnten Messlösungen mit keiner HPLC-Methode vollständig von den Glucosiden trennbar waren. Durch die Verwendung des Standard-Additionsverfahrens konnte das Signal der Galactoside dennoch verifiziert werden und eine standardisierte Integration der Signale erfolgen, welche eine Quantifizierung trotz unzureichender Grundlinientrennung zuließ.

Tabelle 19: Übersicht der identifizierten SGs in den einzelnen Fraktionsbereichen der MLCCC-Anreicherung und deren Verdünnung für die Quantifizierung mittels LC-MS/MS

Fraktionsbereich der MLCCC-Anreicherung	identifizierter Analyt	Verdünnungsfaktor der Messlösung
1-10	-	-
11-20	Chol-Glc	400
	Camp-Glc ( $\pm$ )	400
	Stigma-Glc ( $\pm$ )	400
21-40	Chol-Glc ( $\pm$ )	4000
	Sito-Glc	25000-62500
	Stigma-Glc	5000-25000
	Camp-Glc	5000-25000
	Sito-Gal	80
	Stigma-Gal	40

$\pm$  nicht in allen Messlösungen nachgewiesen

Beispielhaft ist in Abbildung 27 ein Chromatogramm der MLCCC-Fraktion 21-40 der Frucht mit dem Verdünnungsfaktor 40 dargestellt, aus welchem deutlich wird, dass das Signal des Sito-Gal bei 15,70 Minuten im linken Diagramm nach Dotierung mit etwa der doppelten Menge der Struktur an Intensität gewinnt, sodass ein deutlicher Peakflächenzuwachs zu verzeichnen war (siehe Signal bei 15,72 Minuten im rechten Diagramm). Folglich konnte zum einen das Signal verifiziert werden und zum anderen eine Quantifizierung erfolgen, welche durch Lotfällung zum Signal des Sito-Glc bei 15,2 Minuten (Signal oberhalb des Intensitätsbereiches) erfolgte.

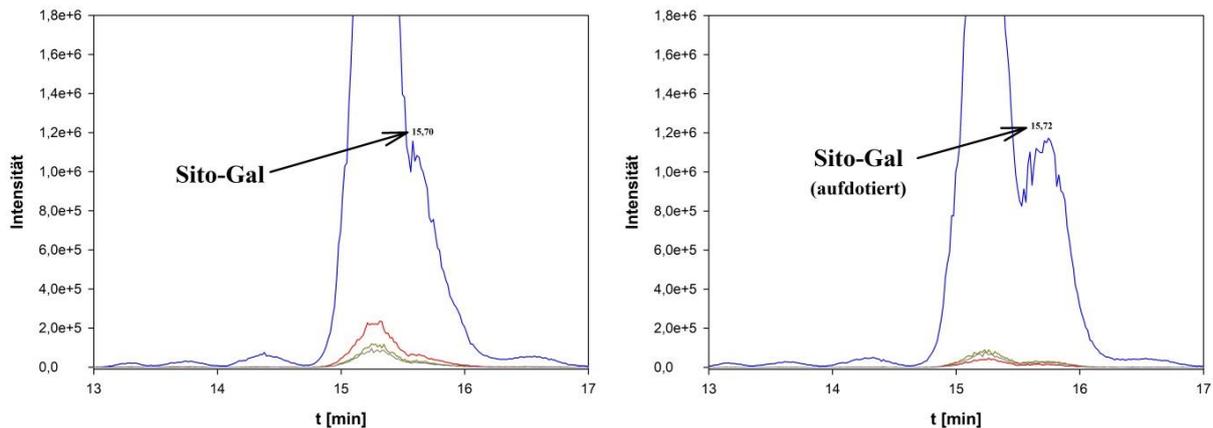


Abbildung 27: Signal des Sito-Gal in verdünnter Probenlösung (links) und aufdotierter Probe (rechts)

Tabelle 20 gibt einen Überblick über die Quantifizierungsergebnisse. Dabei wurden die Ergebnisse der MLCCC-Fractionen, in denen der jeweilige Analyt enthalten war, zusammengefasst. Alles in allem wurde ein Gesamtgehalt an SGs von 540 mg/kg Trockengewicht (81 mg/kg Frischgewicht) in der gesamten Aubergine bestimmt. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass der massenbezogene Anteil an SGs in der Schale mit  $737 \pm 256$  mg/kg deutlich höher als in der Frucht mit  $344 \pm 107$  mg/kg ist, wogegen sich durch die insgesamt höhere Masse in der Summe immer noch mehr SGs in der Frucht befinden. Dies ist insofern bedeutend, da sich andere steroidale Glycoside wie Glykoalkaloide stärker in der Frucht als in der Schale anreichern.<sup>20</sup> Ein Grund dafür könnte die Akkumulation der SGs in den Plasmamembranen diverser Pflanzenzellen sein, wobei die genaue Funktion der SGs jedoch noch nicht vollständig verstanden wurde.<sup>7</sup> Generell bestätigten die Ergebnisse die von Nyström et al. (2012)<sup>4</sup> und Duperon et al. (1984)<sup>117</sup> bestimmte Komposition an SGs in Auberginen. So wurden etwa 68 % Sito-Glc, 26 % Stigma-Glc, 4 % Camp-Glc und 2 % Chol-Glc ermittelt.

Tabelle 20: Quantifizierung der bedeutendsten SGs in Auberginen in mg/kg Trockengewicht (gegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

	Schale				Frucht			
Wasseranteil	92,3 %				94,3 %			
durchschnittliche Masse (TW)	3,66 g				15,93 g			
	n	MW $\pm$ SD	NWG	BG	n	MW $\pm$ SD	NWG	BG
Chol-Glc	3	8,4 $\pm$ 1,6	0,28	0,93	3	7,7 $\pm$ 3,9	0,06	0,21
7-DHC-Glc		<BG	0,02	0,07		<BG	0,005	0,017
D <sub>3</sub> -Glc		<BG	0,07	0,22		<NWG	0,015	0,051
Sito-Glc	3	497,5 $\pm$ 189,9	13,86	46,22	3	233,1 $\pm$ 74,1	3,19	10,62
Stigma-Glc	3	192,8 $\pm$ 43,7	5,21	17,36	3	82,7 $\pm$ 20,0	1,20	3,99
Camp-Glc	3	26,1 $\pm$ 13,6	2,72	9,08	3	16,0 $\pm$ 6,9	0,63	2,09
Sito-Gal	2	9,9 $\pm$ 5,9	0,35	1,16	3	3,35 $\pm$ 1,68	0,08	0,26
Stigma-Gal	2	1,73 $\pm$ 0,98	0,13	0,46	3	0,75 $\pm$ 0,25	0,03	0,11
Camp-Gal		<NWG	0,05	0,15		<NWG	0,01	0,04
Sito-Cello		<BG	0,19	0,63		<BG	0,04	0,14
Stigma-Cello		<BG	0,24	0,79		<BG	0,05	0,18
Camp-Cello		<NWG	0,12	0,41		<NWG	0,03	0,09
Summe der quantifizierten SGs		737 $\pm$ 256				344 $\pm$ 107		

TW: Trockengewicht; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; <BG: unterhalb der Bestimmungsgrenze; <NWG: unterhalb der Nachweisgrenze; n: Anzahl der Bestimmungen

Der Anteil der Galactoside des  $\beta$ -Sitosterols und Stigmasterols war etwa um den Faktor 50-100 niedriger als der Anteil der Glucoside. Das Camp-Gal konnte dagegen in keinem der Extrakte nachgewiesen werden.

Bisherige Studien zu den Gehalten an SGs in Auberginen sind selten und wurden mit unterschiedlichsten Methoden durchgeführt (Tabelle 18). So wurden von Nyström et al. (2012), mittels Hydrolyse der SGs und anschließender Bestimmung freier Sterole, deutlich geringere Gehalte (65,1  $\mu\text{g/g}$  SGs Trockengewicht) in Auberginen bestimmt als in vorliegender Studie.<sup>4</sup> Augenscheinlich führten die hier angewandten sauren Bedingungen zu erheblichen Verlusten. Bei der Analyse von intakten SGs wurden von Sugawara et al. (1999) mittels HPLC-ELSD (35  $\mu\text{g/g}$  SGs Frischgewicht) und Zimowski et al. (1996) mittels GC-FID (67,7 mg/kg Frischgewicht) vergleichbare Gehalte bestimmt.<sup>13,128</sup> Dabei konnten bei der von Sugawara et al. (1999) genutzten HPLC-ELSD Methode die SGs ausschließlich als Summenparameter bestimmt werden, welche bei einem durchschnittlichen Wassergehalt von etwa 7 % eine Gesamtmenge von 583 mg/kg in der gesamten Frucht ergaben.<sup>128</sup> Dieser Wert ist vergleichbar mit dem in dieser Studie bestimmten mittleren Gehalt von 540 mg/kg. Zimowski et al. (1996) konnte dagegen die einzelnen SGs nach Derivatisierung mittels GC voneinander trennen und analysierte mit 967,1 mg/kg Trockengewicht in der Summe sogar deutlich höhere Werte als in vorliegender Studie. Trotz intensiver Prüfung auf Galactoside mittels DC und GC, konnten diese von Zimowski et al. (1996) nicht detektiert werden. Darüber hinaus wurde von Zimowski et al. (1996) der außergewöhnlich hohe Anteil des Chol-Glc im Vergleich zu anderen SGs enthaltenden Pflanzen verdeutlicht.<sup>13</sup> Dies ist mit Sicherheit auf die Funktion des Cholesterols als Vorstufe für diverse Glycoalkaloide und Saponine im komplexen Sterolmetabolismus zurückzuführen.<sup>28</sup> Andere Studien, in denen das Sito-Glc und Poriferasterol-Glucosid (ein Konformationsisomer des Stigmasterols) gezielt mittels SC (Kieselgel) angereichert wurden, bestätigten darüber hinaus die hohen Gehalte von SGs in der Schale. So konnten von Shabana et al. (2013) Konzentrationen im Bereich von mg/kg Trockengewicht das Sito-Glc und Poriferasterol-Glucosid isoliert werden (Tabelle 18).<sup>12</sup> Eine andere Studie befasste sich mit SGs in der Wurzel und ist daher nicht vergleichbar mit den hier bestimmten Werten für die Matrix der Frucht. Jedoch konnten auch aus diesen Pflanzenkompartimenten das Sito-Glc und Stigma-Glc isoliert werden.<sup>116</sup>

Zusammenfassend konnten erstmals die wichtigsten SGs in Auberginen mittels neuartiger LC-MS/MS Methode quantifiziert werden, welche eine selektive und präzise Bestimmung der Zielanalyten zuließ. Weshalb sich SGs speziell in der Schale anreichern, konnte abschließend nicht geklärt werden und bleibt ein Aspekt für zukünftige Forschungen.

#### **4.5.1.2 Identifizierung und strukturelle Aufklärung neuartiger SGs in *Solanum melongena* (Aubergine)**

Die mengenmäßig bedeutendsten, bereits unter Kapitel 4.5.1.1 (S.71ff.) beschriebenen, neuartigen Strukturen stellten die Strukturen des Sito-Gals und des Stigma-Gals dar. Das Camp-Gal konnte hingegen nicht nachgewiesen werden, wobei Gehalte unterhalb der BG aufgrund starker Matrixbelastung der Extrakte nicht ausgeschlossen werden konnten. Durch hohe Aktivitäten diverser Galactosyltransferasen wurden Galactoside bisher bereits in

Auberginen vermutet, konnten jedoch noch nicht nachgewiesen werden.<sup>13,178</sup> Im Gegensatz zu Zimowski et al. (1996) der keine gleichzeitige Anwesenheit von Sterol-Glcs und Sterol-Gals nachweisen konnte, wurde in vorliegender Studie erstmals der Nachweis der Sterol-Gals geführt (siehe Abbildung 27, Kapitel, 4.5.1.1, S.73). Zusätzlich konnten diese in vorliegender Studie quantifiziert werden (siehe Tabelle 19). Neben den bekannten Signalen der Sterol-Gals konnten mit der neu entwickelten LC-MS/MS-Methode auch unbekannte Signale detektiert werden, welche zwar dieselben MRM-Übergänge wie die synthetisierten Strukturen aufwiesen, jedoch bei anderen Retentionszeiten detektiert wurden. In der Literatur wird ein vergleichbares Fragmentierungsmuster für alle SGs mit gleicher Konstitution beschrieben.<sup>8</sup> Da auch die Stereoisomere der Sterol-Glcs und Sterol-Gals ein nahezu identisches Fragmentierungsmuster aufwiesen, liegt es nahe, dass es sich bei diesen Strukturen ebenfalls um Isomere der bekannten Strukturen handelt. Eines der Signale stellte dabei mit Sicherheit das von Shabana et al. beschriebene Poriferasterol-Glucosid ( $((3\beta,22E,24R)$ -Stigmasterol-Glucosid) dar (siehe Tabelle 18, Kapitel 4.5.1, S.70), welches in ähnlichen Intensitäten wie das Stigma-Glc im LC-MS/MS-Chromatogramm detektiert werden konnte (siehe Abbildung 28, links).<sup>12</sup> Dabei handelte es sich um einen Extrakt des MLCCC-Fraktionsbereich 10-20, in welchem bei 13,20 Minuten und 13,57 Minuten zwei Signale neben dem bekannten Stigma-Glc bei 14,25 Minuten detektiert wurden. Dabei stimmten die MRM-Übergänge auch bei 13,20 Minuten (siehe Abbildung 28, links) mit denen des Stigma-Glc überein, weshalb davon auszugehen ist, dass es sich hierbei um das beschriebene Poriferasterol-Glucosid handelt.<sup>12</sup>

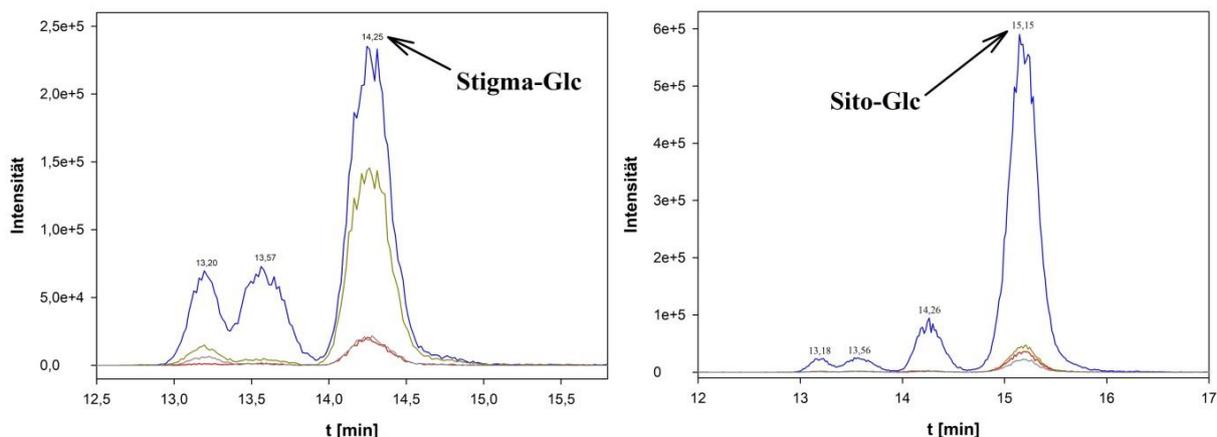


Abbildung 28: Unbekannte detektierte Strukturen mit ähnlichen MRM-Übergängen wie Stigma-Glc (links) und Sito-Glc (rechts) in der MLCCC-Fraktion 11-20 der aufgearbeiteten Auberginenextrakte

Darüber hinaus konnten auch Signale mit dem Massenübergang des Quantifiers des Sito-Glc detektiert werden (siehe Abbildung 28, rechts, blaue Massenspur). Die Verhältnisse der Massenübergänge der Qualifier stimmten dabei nicht überein, was für dem Sito-Glc ähnliche Strukturen mit derselben Masse, jedoch unterschiedlichem strukturellen Aufbau spricht. Alles in allem gab es deutliche Hinweise auf verschiedene unbekannte Mono-SGs in den Auberginenproben, deren strukturelle Aufklärung im Rahmen der Arbeit jedoch nicht möglich war.

Neben neuartigen SGs mit einer Zuckereinheit wurde mit dem Sito-Cello zusätzlich eine mehrfach glycosilierte steroidale Struktur detektiert, welche bisher noch nicht für Auberginen beschrieben wurde. Die normal aufgearbeiteten Extrakte lieferten nur sehr schwache, nicht eindeutige Signale im LC-MS/MS Chromatogramm. Zum eindeutigen Nachweis der

Strukturen war daher eine spezielle Anreicherungsmethode nötig, welche unter anderem eine Flash-Chromatographie mittels Lichoprep RP-18 Material vor der MLCCC-Anreicherung umfasste. Mit dieser Methode konnten speziell freie Zuckerstrukturen und andere polare Bestandteile des Chloroform-Methanol-Extraktes vor der MLCCC abgetrennt werden. In Folge dessen wurde in den so aufgearbeiteten Extrakten ein schwaches Signal des Sito-Cello und des Stigma-Cello detektiert. Dabei konnten die Strukturen mittels analytischer HPLC aus dem MLCCC-Fraktionsbereich 1-10 angereichert werden, was dem chromatographischen Verhalten der synthetisierten Standards entsprach (siehe Kapitel 4.3.1.3, S.51ff.). Die Verifizierung erfolgte aus den aufkonzentrierten Fraktionen 34-37 der analytischen HPLC, wobei durch mehrfache Injektionen mit hohem Injektionsvolumen (80-100 µl) eine gezielte Anreicherung der Struktur erreicht werden konnte (siehe Kapitel 4.3.4.1, Tabelle 11, S.61ff.). Anschließend erfolgte die Probenvorbereitung analog zu den vorherigen Bestimmungen und die Qualifizierung mittels LC-MS/MS. Wie Abbildung 29 verdeutlicht, konnte so der Nachweis des Sito-Cellos durch Vergleich des aufgenommenen LC-MS/MS-Massenspektrums (A) mit dem Massenspektrum des synthetisierten Standards (B) geführt werden. Durch die spezielle chromatographische Aufarbeitungsmethode war eine verlustfreie Anreicherung der Strukturen jedoch nicht gegeben, was einen quantitativen Nachweis verwehrte. Eine zusätzliche Verifizierung des Sito-Cellos erfolgte durch Hydrolyse der angereicherten Struktur mit anschließender separater Analytik von Sterol und Zuckeranteil mittels GC-FID und HPLC-FLD. Dabei wurde der mittels analytischer HPLC angereicherte Fraktionsbereich 34-37 über zwei Stunden sauer hydrolysiert und die wässrige Phase mit *n*-Hexan extrahiert. Die anschließende Analytik steroidaler Strukturen aus der organischen Phase mittels GC-FID lieferte nur ein einziges Signal für das  $\beta$ -Sitosterol bei 14,2 Minuten (siehe Kapitel 4.3.3.1, S. 55ff.). Gleichzeitig konnte in der wässrigen Phase nach reduktiver Aminierung mit anschließender HPLC-FLD Analytik ausschließlich die Glucose nachgewiesen und durch ein Dotierungsexperiment eindeutig bestätigt werden. Damit konnte bewiesen werden, dass im Zuckeranteil des detektierten SGs ausschließlich Glucose vorkommt, was das Cellobiosid (D-Glucosyl- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glucose) bestätigt.

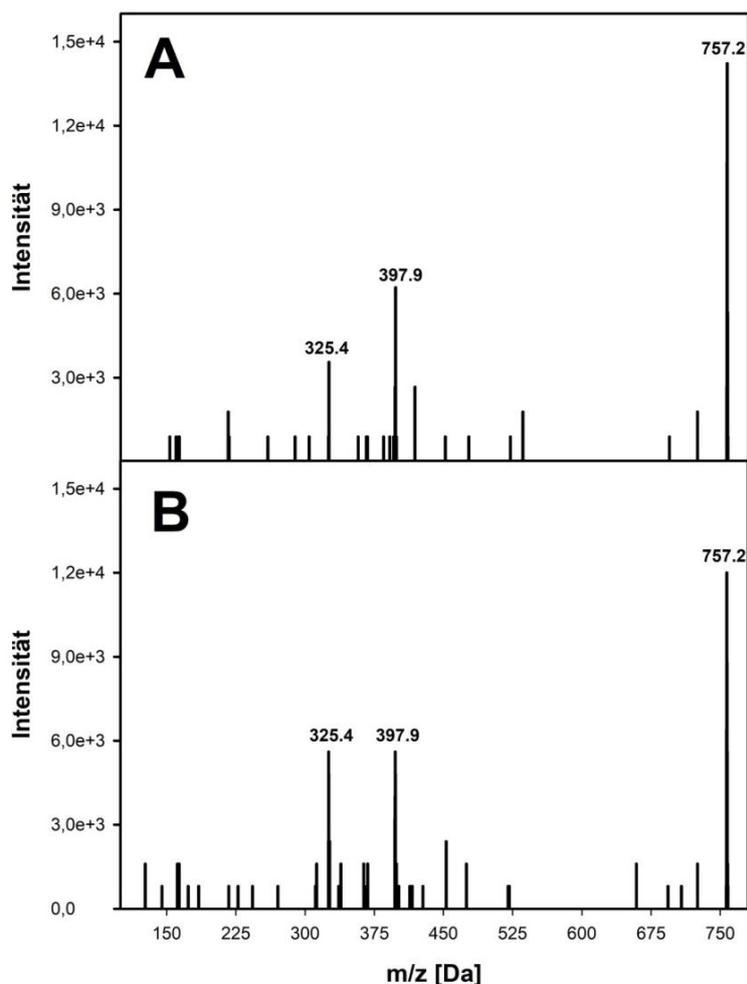


Abbildung 29: Massenspektrum (LC-MS/MS) des Sito-Cellos aus einem aufkonzentrierten Auberginenextrakt (A) im Vergleich zum synthetisierten Standard (B)

Neben dem eindeutigen Signal des Sito-Cello waren auch schwache Signale des Stigma-Cello in einigen aufgearbeiteten Auberginenextrakten der MLCCC-Fraktion 1-10 zu finden. Dieses konnte jedoch nicht in derselben Art wie das Sito-Cello angereichert werden.

Insgesamt konnte der eindeutige Nachweis für drei neuartige SGs in Auberginenextrakten geführt werden. Diese waren das Sito-Gal, das Stigma-Gal, das Sito-Cello und das Stigma-Cello, welche selektiv mittels empfindlicher LC-MS/MS Analytik und durch Hydrolyse mit anschließender Analytik des freien Sterols und der freien Zucker charakterisiert wurden. Das Stigma-Cello konnte zwar identifiziert werden, der zusätzliche Nachweis mittels Massenspektrometrie, in Form eines CID-Experimentes, konnte durch die im Vergleich zum Sito-Cello deutlich niedrigeren Konzentrationen jedoch nicht geführt werden.

#### 4.5.1.3 Glycosilierte Vitamin D-Strukturen in *Solanum melongena* (Aubergine)

Neben den klassischen neuartigen glycosilierten steroidal Strukturen konnten auch spezielle neuartige steroidale Verbindungen, welche eine Vitamin D-Struktur aufwiesen, aus Auberginenpflanzen extrahiert werden. Bei diesen handelte es sich zum einen um das 7-DHC-Glc und zum anderen um das D<sub>3</sub>-Glc, welche nach gezielter UV-Bestrahlung nachweisbar waren.

Glycosilierte Vitamin D-Strukturen konnten dabei ausschließlich aus Extrakten der Schale nachgewiesen werden, wobei auch hier nicht alle Proben diese enthielten. Zum Nachweis wurde die spezielle Aufarbeitungsmethode (siehe Kapitel 4.3.2, S.54) analog zur Anreicherung des Sito-Cellos mittels Lichoprep RP-18 Chromatographie sowie eine abschließende Aufkonzentrierung mittels HPLC-Anreicherungsverfahren (siehe Kapitel 11.5.5, S.134, Anhang) angewandt. Da das 7-DHC-Glc ausschließlich in der Schale nachweisbar war, liegt es nahe, dass spezielle abiotische Faktoren für die Bildung dieser Struktur verantwortlich sind. So wurden ausgewählte Auberginenproben gezielt mit verschiedenen UV-Lampen bestrahlt und anschließend mit der etablierten Methode aufgearbeitet. Generell konnte in allen bestrahlten Proben das 7-DHC-Glc nachgewiesen werden. Dies spricht deutlich für ein lichtabhängige Synthese dieser Struktur, welche biosynthetisch aus dem Cholesterinstoffwechsel stammt.<sup>28</sup> Somit könnte durch den unterschiedlichen Einfluss von UV-Licht auf die verschiedenen Auberginenproben erklärt werden, weshalb nicht alle unbestrahlten Extrakte 7-DHC-Glc enthielten. Auch biosynthetisch ist diese Hypothese erklärbar. So ist der letzte Schritt der Biosynthese des Cholesterols die enzymatisch katalysierte Umwandlung des 7-Dehydrocholesterols mittels 7-Dehydrocholesterol-Reduktase (DHCR7). Eine funktionelle Veränderung dieses Enzyms führt beim Menschen zu einer deutlichen Verschiebung des Verhältnisses von Cholesterin zu Vitamin D-Strukturen.<sup>179</sup> Daher ist es durchaus denkbar, dass es auch bei Pflanzendurch lichtinduzierten Stress zu einer Hemmung der DHCR7 kommt, was folglich zu einer Akkumulation des 7-Dehydrocholesterols und einer verminderten Cholesterinproduktion führt. In Folge dessen würde auch eine anschließende Glycosylierung des Sterols mittels Glucosyltransferasen nicht am Cholesterin sondern am 7-Dehydrocholesterin erfolgen, was eine Synthese von 7-DHC-Glc in nennenswerten Konzentrationen zur Folge hätte.

Neben der Bildung von 7-DHC-Glc durch UV-Licht konnte zusätzlich eine strahlungsinduzierte Umwandlung des 7-DHC-Glc in das D<sub>3</sub>-Glc festgestellt werden, welche jedoch von der Intensität und Dauer der Bestrahlung abhängig war. So stellt das 7-DHC die direkte Vorstufe des Vitamin D<sub>3</sub> dar, dessen lichtinduzierte Umlagerung auch in glycosilierter Form bewiesen wurde (siehe Kapitel 4.1.2.2, S. 42ff.). Diese sollte in den nachfolgend beschriebenen Experimenten auch an lebenden pflanzlichen Proben verifiziert werden. Dazu wurden kongruent zu den *in vitro* Versuchen der Synthesestandards (siehe Kapitel 4.1.2, S.39ff.) frische Auberginen mit verschiedenen UV-Lampen bestrahlt. In über 25 Stunden mittels CAMAG Lampe bei 254 nm (8 W) bestrahlten Auberginenproben konnte kein D<sub>3</sub>-Glc nachgewiesen werden. Hier reichte die Strahlungsintensität nicht aus, um eine Umwandlung zu induzieren. Daher wurde in einem weiteren Experiment die deutlich intensivere 125 W Quecksilberdampf Lampe zur Bestrahlung genutzt. Zur zeitlichen Kontrolle wurde sowohl für 70 Minuten als auch über 270 Minuten bestrahlt. Dabei konnte nach 70 minütiger Bestrahlung der Nachweis für das D<sub>3</sub>-Glc bei gleichzeitiger Anwesenheit von 7-DHC-Glc geführt werden. Die Qualifizierung durch LC-MS/MS erfolgte dabei nach Aufkonzentrierung der Analyten mittels Anreicherungsverfahren (siehe Kapitel 11.5.5, S.134) an der analytischen HPLC. Wie in Abbildung 30 dargestellt, konnte so ein eindeutiges Signal für das 7-DHC-Glc aus den vereinigten HPLC-Fractionen 29-32 und für D<sub>3</sub>-Glc aus den vereinigten HPLC-Fractionen 24-26 detektiert werden.

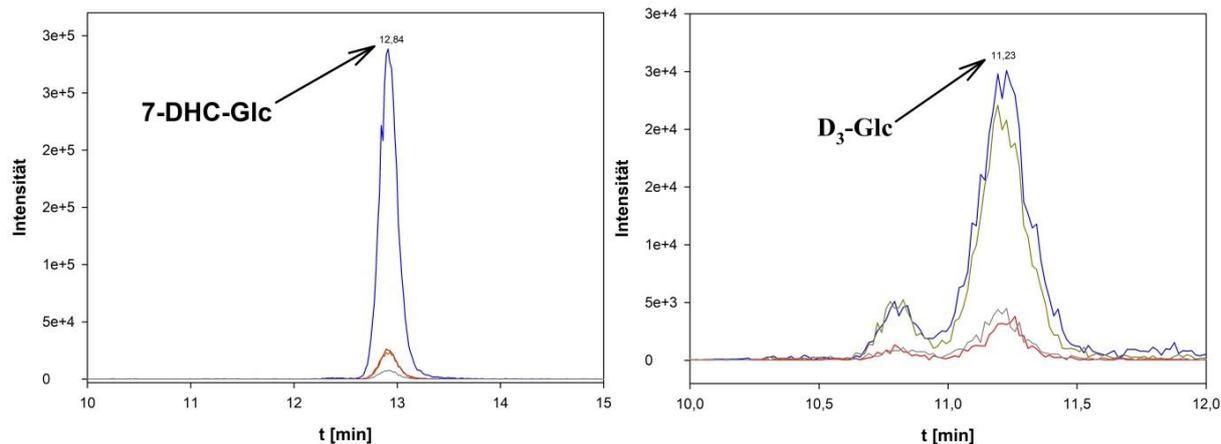


Abbildung 30: Nachweis des 7-DHC-Glc (links) und des D<sub>3</sub>-Glc (rechts) aus angereicherten Auberginenextrakten nach 70 minütiger Bestrahlung mittels 125 W UV-Lampe

Dies ist vergleichbar mit den Fraktionen der anhand der synthetisierten Standards bestimmten Retentionszeiten von 23,9 Minuten des D<sub>3</sub>-Glc und 30,1 Minuten des 7-DHC-Glc (siehe Kapitel 4.3.4.1, S.61, Tabelle 11). Da die in Kapitel 4.3.4.1 beschriebene Anreicherungsmethode eine Peakverbreiterung nach sich zog, wurden entsprechende Fraktionsbereiche gebildet, um möglichst viel Substanz anreichern zu können (Fraktion 29-32 und 24-26, s.o.).

Eine abschließende Verifizierung sowohl für 7-DHC-Glc (links) als auch für D<sub>3</sub>-Glc (rechts) erfolgte durch Vergleich der LC-MS/MS-Massenspektren der positiven Proben (A) mit den synthetisierten Standards (B), welche in Abbildung 31 dargestellt sind. Nach 270 minütiger Bestrahlung konnten ausschließlich Spuren des D<sub>3</sub>-Glc bei gleichzeitig stärkerer Matrixbelastung der aufgearbeiteten Probe detektiert werden. Dies spricht deutlich für eine Degradation des D<sub>3</sub>-Glc, wie sie auch bei den *in vitro* Versuchen beobachtet werden konnte (siehe Kapitel 4.1.2.2, S. 42ff.). Durch die spezielle Anreicherungsmethode waren auch in diesem Experiment ausschließlich qualitative Aussagen möglich.

Alles in allem legen die Versuche nahe, dass die Strahlungsintensität der CAMAG UV-Lampe (8W) zu niedrig war, um eine Umwandlung des 7-DHC-Glc in das D<sub>3</sub>-Glc in biologischen Proben zu induzieren. Dagegen genügte eine relativ kurze Bestrahlungsdauer mit der hochintensiven 125 W Quecksilberdampfampe für eine Umwandlung in der Auberginenschale. Eine längere Bestrahlung bei derart hohen Strahlungsintensitäten führte dagegen zum Abbau des Produktes. Dennoch konnte erstmals der Nachweis für glycosilierte Vitamin D-Strukturen in Auberginen geführt werden, obwohl das Auftreten von D-Vitaminen zwar vermutet, bisher jedoch noch in keiner Studie belegt werden konnten.<sup>31</sup> Vor allem glycosilierte Vitamin D-Strukturen, wie sie in diversen kalzinogenen Pflanzen vorkommen, sind dabei für die Aubergine in jeglicher Hinsicht neuartig.<sup>29,37</sup> Durch die dargestellten Experimente konnten erstmals glycosilierte Vitamin D-Strukturen qualifiziert werden, für deren Bildung eine Abhängigkeit von abiotischen Faktoren, insbesondere vom UV-Licht, bestehen muss. Eine abschließende Aufklärung der genauen Zusammenhänge war in dieser Studie jedoch nicht möglich und ist ein Aspekt für zukünftige Untersuchungen.

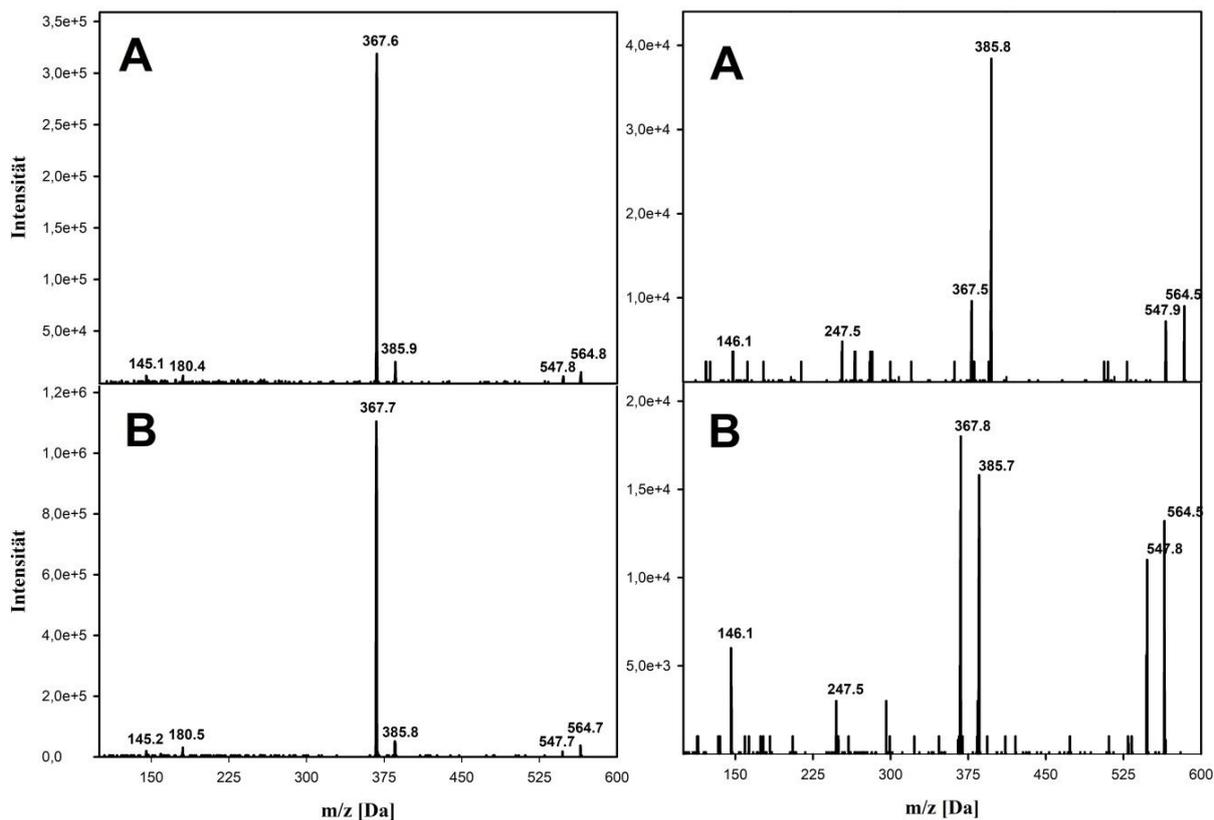


Abbildung 31: Darstellung der Massenspektren des 7-DHC-Glc (links) und D<sub>3</sub>-Glc (rechts), angereichert aus bestrahlten Auberginenextrakten (A) im Vergleich zu den Synthesestandards (B)

#### 4.5.1.4 Zusammenfassung neuartiger glycosilierter steroidal Strukturen in *Solanum melongena* (Aubergine)

Mit der entwickelten Methode zur Anreicherung und Charakterisierung glycosilierter steroidal Strukturen aus pflanzlichen Proben konnten viele bisher nicht beschriebene Strukturen in der Aubergine identifiziert und anhand der Vielzahl an synthetisierten Standards eindeutig charakterisiert werden. Tabelle 21 fasst alle neuartigen Strukturen zusammen. Dabei wurden zunächst Strukturen mit bereits bekanntem Sterolgrundgerüst jedoch neuartigem Glycosilierungsmuster isoliert. Dazu zählen die Strukturen des Sito-Gal, Stigma-Gal, Sito-Cello und Stigma-Cello. Viel bedeutender war jedoch die Isolation von glycosilierten Vitamin D-Strukturen, welche eine außergewöhnliche Quelle für pflanzliches Vitamin D darstellen könnten.<sup>29,30</sup> So wurden eindeutig die Strukturen des 7-DHC-Glc und des D<sub>3</sub>-Glc nach aktiver Bestrahlung mit UV-Licht nachgewiesen, wobei eine deutliche Abhängigkeit von Bestrahlungsdauer und Bestrahlungsintensität bestand (siehe Abbildung 32). Die genauen Zusammenhänge und die Bedeutung der neuartigen Verbindungen für die Pflanze konnten in dieser Studie nicht geklärt werden. Sicher ist jedoch, dass das 7-Dehydrocholesterol die direkte Vorstufe des Cholesterols im Isoprenoidstoffwechsel der Pflanzen darstellt und die Aubergine ungewöhnlich große Mengen an Cholesterol als Vorstufe diverser Saponine und Steroidalkaloide aufweist.<sup>28</sup>

Tabelle 21: Zusammenfassung der Anreicherung neuartiger Strukturen aus *Solanum melongena*

Bestrahlungsart	Bestrahlungs-	Fraktionsbereich	HPLC-Fraktion der	identifizierte
-----------------	---------------	------------------	-------------------	----------------

	dauer	der MLCCC-Anreicherung	Anreicherungsmethode (siehe Tabelle 11)	Analyten
unbestrahlte Probe	-	1-10	34-37	Sito-Cello Sigma-Cello
unbestrahlte Probe	-	21-40	- -	Sito-Gal Stigma-Gal
Camag UV-Lampe (8 W, 254 nm)	25 h	8-20	29-32	7-DHC-Glc
Narva UVS 125 W Quecksilberdampf Lampe	70 min (1,1 h)	8-20	29-32 24-26	7-DHC-Glc D <sub>3</sub> -Glc
Narva UVS 125 W Quecksilberdampf Lampe	270 min (4,5 h)	8-20	-	D <sub>3</sub> -Glc (<BG)

Daher ist neben den Glycoalkaloiden, wie Solasodin und Solamargin, wohl auch das Cholesterol und das 7-Dehydrocholesterol zugänglich für Glycosyltransferasen, welche eine aktive Glycosilierung dieser Strukturen bewirkt.<sup>7,17,20</sup>

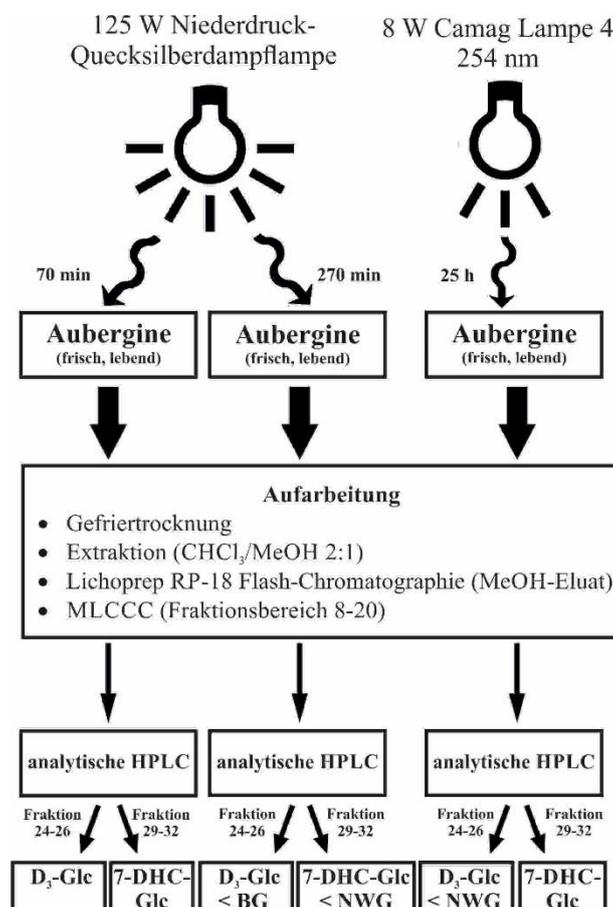


Abbildung 32: Schematische Darstellung des Bestrahlungsexperimentes zum Nachweis von Vitamin D-Glucosiden

Mit den durchgeführten Experimenten konnte bewiesen werden, dass unter Einfluss von UV-Licht eine Akkumulation des 7-Dehydrocholesterols auftritt, welches *in vitro* durch Bestrahlung mit UV-Licht in das D<sub>3</sub>-Glc umgewandelt wird. Darüber hinaus wurde in Abhängigkeit der Strahlungsintensität in der Schale von Auberginen das D<sub>3</sub>-Glc aus dem 7-DHC-Glc gebildet. Dabei musste die Strahlungsintensität ausreichend groß sein, um eine Bildung zu induzieren. Zu hohe Intensitäten führten dagegen zu einem Abbau der Struktur, welche sehr sensibel gegenüber abiotischen Faktoren ist.<sup>180</sup> Dies würde auch erklären, dass

sich in der Auberginenprobe, welche sehr lange mit der intensiven 125 W Niederdruck-Quecksilberdampfampe bestrahlt wurde, ausschließlich Spuren des D<sub>3</sub>-Glc detektiert werden konnten. So wurde das 7-DHC-Glc vollständig über den beschriebenen Mechanismus der Vitamin D Umlagerung in das Vitamin D<sub>3</sub> umgewandelt, wobei die lange Reaktionszeit mit Sicherheit zu diversen Neben- und Abbauprodukten führte. Daher konnten zwar noch Spuren des D<sub>3</sub>-Glc detektiert werden, das 7-DHC-Glc hingegen wurde bereits vollständig abgebaut. Die Ergebnisse decken sich mit den *in vitro* Experimenten zur Bestrahlung des synthetischen 7-DHC-Glc (siehe Kapitel 4.1.2.2, S.42ff.) und stützen somit den postulierten Mechanismus der Bildung des 7-DHC-Glc und D<sub>3</sub>-Glc in Auberginen.<sup>58</sup>

#### 4.5.1.5 Freie Vitamin D-Strukturen

Im vorangegangenen Kapitel 4.4.1 (S.65ff.) wurde der Nachweis glycosidisch gebundener Vitamin D-Strukturen geführt. Im Gegensatz dazu berichtet Aburjai et al. (1998) auch von freien Vitamin D-Strukturen in Auberginen.<sup>31</sup> Daher wurden die Proben analog zum Goldhafer (siehe Kapitel 4.4.2, 68f.), mit der Methode nach Seeburg et al. (2014) aufgearbeitet und anschließend mittels LC-MS/MS qualifiziert.

Tabelle 22: Qualifizierung freier Vitamin D-Strukturen in *Solanum melongena*

Analyt			
Ergosterol	7-Dehydrocholesterol	Vitamin D <sub>2</sub>	Vitamin D <sub>3</sub>
+	< BG	< BG	< NWG

+, eindeutig nachweisbar; < NWG, unterhalb der Nachweisgrenze; < BG, unterhalb der Bestimmungsgrenze

Wie in Tabelle 22 dargestellt, konnte deutlich das Ergosterol nachgewiesen werden. Die Strukturen des 7-Dehydrocholesterol und Vitamin D<sub>2</sub> waren ausschließlich im Spurenbereich nachweisbar, weshalb auf eine Quantifizierung verzichtet wurde. Dennoch konnte deutlich belegt werden, dass neben dem glycosidisch gebundenen 7-Dehydrocholesterol auch freies 7-Dehydrocholesterol in Auberginen zu finden ist, welches bei ausreichender UV-Bestrahlung auch in freies Vitamin D<sub>3</sub> umgewandelt werden könnte.

#### 4.5.2 Glycosilierte steroidale Strukturen in *Trisetum flavescens* (Goldhafer)

Nach dem erfolglosen Versuch glycosilierte Vitamin D-Strukturen aus dem Goldhafer anzureichern und zu charakterisieren, sollte mit der neu entwickelten Methode der Goldhafer auch auf SGs geprüft werden, welche, wie in der Aubergine gezeigt wurde, eng mit dem Vorkommen von glycosilierten D-Vitameren zusammenhängen. Dabei zeigten alle aufgearbeiteten Goldhaferproben verschiedener Standorte und unterschiedlicher Erntezeiten vergleichbare qualitative Ergebnisse. Aus den dargestellten Ergebnissen wird ersichtlich, dass auch im Goldhafer eine Vielzahl von SGs enthalten waren. Dazu zählten die Glucoside der wichtigsten Phytosterole des  $\beta$ -Sitosterols, Stigmasterols und Campesterols, welche auch in der Aubergine die bedeutendsten Strukturen darstellten. Galactoside waren hingegen nicht nachweisbar. Wie bei den Auberginenproben konnten auch hier weitere Signale detektiert werden, welche zwar ähnliche MRM-Übergänge wie die bekannten Glucoside, jedoch variierende Retentionszeiten aufwiesen. Eine Struktur mit den MRM-Übergängen des Stigma-Glc bei 13,8 Minuten könnte dabei ein bereits in der Aubergine detektiertes Isomer

des Stigma-Glc darstellen (siehe Kapitel 4.5.1, S. 70ff.). Ein weiteres Signal mit ähnlichen Übergängen konnte auch bei 13,2 Minuten nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden in der MLCCC-Fraktion 11-20 noch zwei Strukturen erkannt, welche dieselben MRM-Übergänge wie das Sito-Glc und das 7-DHC-Glc, jedoch andere Retentionszeiten (12,5 Minuten und 13,8 Minuten) aufwiesen. Eine abschließende Strukturaufklärung aller zusätzlichen unbekanntem Signale konnte, wie auch bei der Aubergine, nicht getätigt werden. Tabelle 23 gibt einen Überblick zu den identifizierten SGs in den jeweiligen MLCCC-Fraktionen der aufgearbeiteten Extrakte. Viel bedeutender war hingegen der qualitative Nachweis des 7-DHC-Glc in den Goldhaferextrakten. Dieses konnte wie auch in der Aubergine aus der MLCCC-Fraktion 11-20 sowohl mit als auch ohne Lichoprep RP-18 Aufreinigung nachgewiesen werden. Das D<sub>3</sub>-Glc hingegen konnte in keinem der Extrakte detektiert werden. Die Ergebnisse waren damit kongruent zu denen der Aubergine, in welcher das D<sub>3</sub>-Glc ausschließlich nach aktiver UV-Bestrahlung enthalten war. Dies könnte eine Erklärung liefern, weshalb keine glycosilierten Vitamin D-Strukturen in Goldhaferextrakten gefunden werden konnten, da die Analytik hier aus unbestrahlten Proben erfolgte. Somit könnte auch im Goldhafer die Bildung glycosilierter Vitamin D-Strukturen stark von abiotischen Faktoren abhängen, wobei vor allem die Intensität des UV-Lichtes einen entscheidenden Einfluss zu haben scheint und die UV-Intensität der Sonnenstrahlen in Europa nicht ausreicht.<sup>65</sup> Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Mello et al. (1991) gemacht, welcher den Einfluss von UV-Licht, Temperatur und Sonneneinstrahlung auf die kalzinogene Aktivität des Goldhafers untersucht hat.<sup>84</sup>

Tabelle 23: Übersicht identifizierter SGs in verschiedenen Goldhafer Extrakten

Probe	Fraktionsbereich der MLCCC-Anreicherung	identifizierte Analyten	Unbekannte Strukturen charakteristischer Fragmentierung
Goldhafer 4.Schnitt Ernte 2012 (mit und ohne Lichoprep RP-18 Aufarbeitung)	1-10	-	-
	11-20	7-DHC-Glc Chol-Glc Sito-Glc Stigma-Glc Camp-Glc	7-DHC-Glc (12,5 min) Sito-Glc (13,8 min) Stigma-Glc (13,8 min)
	21-40	Chol-Glc Sito-Glc Stigma-Glc Camp-Glc	Stigma-Glc (13,2 min) Stigma-Glc (13,8 min)
Goldhafer 1.Schnitt Ernte 2015	1-10	-	-
	11-20	7-DHC-Glc Chol-Glc Sito-Glc Camp-Glc	7-DHC-Glc (12,5 min) Sito-Glc (13,8 min) Stigma-Glc (13,8 min)
	21-40	Chol-Glc Sito-Glc Stigma-Glc Camp-Glc	Stigma-Glc (13,2 min) Stigma-Glc (13,7 min)

Die Untersuchungen in dieser Studie hatten gezeigt, dass vor allem die Vitamin D-Aktivität der wasserlöslichen Extrakte des Goldhafers stark mit dem Einfluss von UV-Licht zusammenhängen. So waren unter UV-Licht freien Bedingungen aufgewachsene Goldhaferpflanzen nicht in der Lage eine kalzinogene Wirkung bei Hühnerküken zu bewirken. Dagegen zeigten diejenigen Küken, welche mit den wasserlöslichen Extrakten von

Freilandproben und UV-bestrahlten Proben gefüttert wurden, deutlich weniger rachitische Symptome. Auch konnte ein deutlicher Unterschied zwischen einheimischen Goldhaferextrakten und brasilianischen Extrakten beobachtet werden, was auf eine deutlich intensivere und längere Sonneneinstrahlung bei brasilianischen Proben zurückgeführt wurde.<sup>84</sup> Somit konnte ein eindeutiger Zusammenhang zwischen UV-Bestrahlung und Vitamin D-Aktivitäten für pflanzliche Proben belegt werden. Alles in allem hängt die Bildung von glycosilierten Vitamin D-Strukturen wie auch die von freien Vitamin D-Strukturen stark von den Umweltbedingungen ab. Dies würde erklären, weshalb einheimische Goldhaferproben in Folge schwacher Sonneneinstrahlung kaum Vitamin D Metaboliten enthalten. Die Anwesenheit von glycosilierten Vitamin D-Vorstufen, wie dem 7-DHC-Glc, legt jedoch die Grundlage für eine mögliche UV-Licht induzierte Umwandlung in aktive glycosilierte Vitamin D-Strukturen, welche in südamerikanischen Proben mit stärkerem UV-Licht Einfluss zu finden sein könnten.

#### 4.5.3 Glycosilierte steroidale Strukturen in *Cucurbita pepo* (Zucchini)

Als weitere Pflanzenart wurde auch die Zucchini mit der neuartigen Methode auf glycosilierte steroidale Strukturen untersucht. Die Ergebnisse dazu sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

Tabelle 24: Übersicht identifizierter SGs in Zucchini Extrakten

Probe	Fraktionsbereich der MLCCC-Anreicherung	identifizierte Analyten	unbekannte Strukturen charakteristischer Fragmentierung
Zucchini	1-10	-	-
	11-20	Sito-Glc Stigma-Glc Camp-Glc	Stigma-Glc (13,0 min) Sito-Glc (13,0 min) Sito-Glc (14,0 min) Sito-Glc (14,1 min)
	21-40	Sito-Glc Stigma-Glc Camp-Glc Sito-Gal (±)	Stigma-Glc (13,1 min) Sito-Glc (14,0 min)

± nicht eindeutig nachweisbar

Im Gegensatz zu den Auberginen und Goldhaferproben konnten insgesamt deutlich weniger bekannte glycosilierte steroidale Strukturen detektiert werden. Am bedeutendsten waren das Sito-Glc und das Stigma-Glc, welche deutliche Signale lieferten. Das Camp-Glc war nur in geringen Konzentrationen nachweisbar. Das Sito-Gal lieferte kein eindeutiges Signal, welches darüber hinaus nicht vollständig vom Sito-Glc trennbar war, was unter anderem auf das Konzentrationsverhältnis beider Strukturen zurückzuführen war. Auch durch eine entsprechende Aufdotierung mit dem synthetisierten Sito-Gal, wie bei der Aubergine (siehe Kapitel 4.5.1.1, S.71 ff.), konnte das Signal nicht verifiziert werden. Somit bleibt fraglich, ob diese Struktur tatsächlich als neuartige Substanz in Zucchini enthalten ist. Zusätzlich wurden viele unbekannte Signale detektiert, welche ähnliche MRM-Übergänge, jedoch unterschiedliche Retentionszeiten aufwiesen. Dies deutet auf Stereoisomere des Sito-Glc und Stigma-Glc hin (siehe Tabelle 24). Die Signale könnten auf die literaturbeschriebenen  $\Delta^7$ -Sterylglycoside zurückgeführt werden, welche neben einer Reihe von glycosilierten  $\Delta^5$ -Sterylglycosiden in Zucchini vorkommen.<sup>4,14,15</sup> Eine anschließende Strukturaufklärung war im Rahmen dieser Studie jedoch nicht möglich.

Viel bedeutender war die Tatsache, dass in Zucchini weder das Chol-Glc noch glycosilierte Vitamin D-Metabolite detektiert werden konnten. Zwar wurde von Aburjaj et al. (1998) 0,23 mg/kg freies Vitamin D<sub>3</sub> in Zucchiniblättern bestimmt, glycosilierte Strukturen wurden jedoch nicht gefunden.<sup>31</sup> So scheint der Cholesterolmetabolismus für die Zucchini im Vergleich zu anderen Pflanzen von geringer Relevanz zu sein, was vermutlich auf die schwache Bedeutung von Glycoalkaloiden im Gegensatz zu vielen *Solanaceae* zurückzuführen ist. Daher ist vor allem der Phytosterolmetabolismus von Bedeutung, welcher nicht über die Struktur des Cholesterols und des 7-Dehydrocholesterols verläuft.<sup>28</sup> Darüber hinaus wurde freies Vitamin D<sub>3</sub> bisher ausschließlich in Zucchiniblättern gefunden, wohingegen in vorliegender Studie die Frucht untersucht wurde.<sup>31</sup>

Alles in allem konnten die drei SGs des Sito-Glc, Stigma-Glc und Camp-Glc eindeutig in Zucchini identifiziert werden. Davon wurde bisher das Sito-Glc und Camp-Glc in der Literatur beschrieben.<sup>4,15,92</sup> Das Stigma-Glc wurde noch nicht direkt erwähnt, jedoch diverse Derivate, zu denen unter anderem die Glucoside des Spinasterols, Poriferasta-7,25-dienols, 25-Dehydrochondrillasterols und des 5 $\alpha$ -Stigmasta-7,25-dien-3-ols zählen. Einige dieser Strukturen entsprechen mit großer Sicherheit den detektierten unbekanntenen Strukturen, welche ähnliche Fragmentierungen wie das Stigma-Glc oder Sito-Glc aufwiesen (siehe Tabelle 24). Ein Nachweis von glycosilierten Vitamin D-Strukturen konnte nicht geführt werden.

#### 4.5.3.1 Freie Vitamin D-Strukturen

Wie auch die Aubergine wurde die Zucchini auf freie Vitamin D-Strukturen untersucht (siehe Kapitel 4.5.1.5, S. 82). Im Gegensatz zur Aubergine wurde in der Zucchini freies Vitamin D<sub>3</sub> von Aburjai et al. (1998) in den Blättern nachgewiesen, wohingegen freies 7-Dehydrocholesterol nicht beschrieben wurde.<sup>31</sup> Freies Vitamin D<sub>3</sub> konnte in dieser Studie auch erstmals in der Frucht bestätigt werden. Darüber hinaus waren die Strukturen des Ergosterols und des 7-Dehydrocholesterols nachweisbar. Vitamin D<sub>2</sub> konnte hingegen nicht detektiert werden. Den größten Anteil machte das Ergosterol aus, während 7-Dehydrocholesterol und Vitamin D<sub>3</sub> nur in Spuren unterhalb der BG detektiert werden konnten. Für eine Quantifizierung dieser Strukturen müssen deutlich größere Probenmengen aufgearbeitet werden.

Tabelle 25: Qualifizierung freier Vitamin D-Strukturen in *Cucurbita pepo*

Analyt			
Ergosterol	7-Dehydrocholesterol	Vitamin D <sub>2</sub>	Vitamin D <sub>3</sub>
+	< BG	< NWG	< BG

+, eindeutig nachweisbar; < NWG, unterhalb der Nachweisgrenze; < BG, unterhalb der Bestimmungsgrenze

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie konnten diverse glycosilierte steroidale Strukturen in ausgewählten Pflanzenfamilien isoliert und strukturell aufgeklärt werden. Als Untersuchungsobjekt dienten der Goldhafer (*Trisetum flavescens*), die Aubergine (*Solanum melongena*) und die Zucchini (*Cucurbita pepo*), welche eine Vielzahl an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen aufweisen.<sup>17,18,34,181</sup> Dabei waren vor allem glycosilierte Strukturen mit steroidalem Grundgerüst von Interesse, da diese sowohl in ihrer genauen Struktur als auch in ihrer Vielfalt wenig erforscht sind. Darüber hinaus stellen steroidale Strukturen die Vorläufer von Vitamin D-Strukturen dar, welche in den analysierten Pflanzen und deren Familien in der Literatur diskutiert wurden, deren chemische Strukturen jedoch nur selten eindeutig nachgewiesen werden konnten.<sup>31,35</sup> Da auch wasserlösliche Vitamin D-Strukturen gefunden werden konnten, wurde davon ausgegangen, dass die lipophilen steroidalen Strukturen durch Glycosilierungen in eine hydrophile Form überführt wurden.

Daher wurde eine Methode entwickelt, die es erlaubte glycosilierte steroidale Strukturen gezielt anzureichern und anschließend durch eine empfindliche und selektive Methode nachzuweisen. Um die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Zielstrukturen besser verstehen zu können, wurde eine Auswahl glycosilierter Sterole synthetisiert, welche bei der Entwicklung der Aufarbeitungsmethode als Surrogat-Standards dienten. Durch die Kombination unterschiedlicher chromatographischer Methoden konnten so verschiedenste glycosiliertesteroidale Strukturen voneinander getrennt werden. Um eine verlustfreie Anreicherung für eine Quantifizierung zu gewährleisten wurden spezielle Methoden angewandt, bei denen Adsorptions- und Absorptionseffekte ausgeschlossen werden konnten. Die Aufarbeitungsmethode orientierte sich dabei an bereits etablierten Methoden zur Anreicherung sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe. Abschließend wurden die isolierten steroidalen Strukturen selektiv mittels LC-MS/MS qualifiziert und bei ausreichender Konzentration auch quantifiziert.

### *Synthese glycosilierter Sterole*

Als authentische Standards für die Entwicklung einer geeigneten Methode zur gezielten und zuverlässigen Anreicherung von glycosilierten steroidalen Strukturen wurden zwölf verschiedene Verbindungen synthetisiert. Dabei wurde sowohl das Glycosilierungsmuster als auch das steroidale Grundgerüst variiert, um eine Auswahl verschiedenster Strukturen zu generieren. Die Sterol-Strukturen umfassten mit  $\beta$ -Sitosterol, Stigmasterol, Campesterol und Cholesterol die bedeutendsten Phytosterole und Zoosterole. Darüber hinaus wurden auch die Vitamin D-Strukturen des 7-Dehydrocholesterols und des Vitamin D<sub>3</sub> glycosiliert. Als Glucosid wurde hauptsächlich die Glucose verwendet, aber auch Galactoside und Cellobioside wurden synthetisiert. Dabei wurde stets eine  $\beta$ -D-glycosidische Bindung synthetisiert, da diese die häufigste in der Natur vorkommende Bindung darstellt. Eine Verifizierung der Standards erfolgte nach saurer Hydrolyse mit anschließender Analytik des Aglykons mittels GC-FID, sodass die Standards für eine gesicherte Quantifizierung genutzt werden konnten.

### *Identifizierung freier Vitamin D-Strukturen*

Zur Identifizierung diverser Vitamin D-Strukturen, vor allem im Goldhafer, wurde die Methode nach Seeburg et al. (2014) genutzt, um neben glycosilierten Vitamin D-Strukturen (nach enzymatischer Hydrolyse) auch freie D-Vitamere nachweisen und quantifizieren zu können.<sup>85</sup> Die Ergebnisse zeigten, dass es sich bei den im Goldhafer vorkommenden Vitamin D-Strukturen um freie D-Vitamere handeln muss, wobei ein Gehalt von 66,01 mg/kg Ergosterol, 1,33 mg/kg 7-Dehydrocholesterol und 0,13 mg/kg Vitamin D<sub>3</sub>, jeweils bezogen auf das Trockengewicht, identifiziert wurde.

### *Glycosilierte Vitamin D-Strukturen im Goldhafer*

Im Hinblick auf glycosilierte Vitamin D-Strukturen stand vor allem der Goldhafer im Mittelpunkt der Untersuchungen, da dieser bereits seit vielen Jahren als kalzinogene Pflanze bekannt ist und vor allem wasserlösliche Extrakte starke Vitamin D-Aktivitäten aufwiesen.<sup>34,175</sup> Zwar konnten Spuren von freien Vitamin D-Strukturen nachgewiesen, jedoch keine glycosilierten D-Vitamere, welche die kalzinogene Aktivität der wasserlöslichen Extrakte des Goldhafers erklären würden, identifiziert werden. Da auch die Konzentration an freien D-Vitaminen im Goldhafer als nicht kalzinogen einzustufen war, musste geschlossen werden, dass die Vitamin D-Aktivität nicht auf Vitamin D-Strukturen zurückzuführen sein kann, sondern von anderen Strukturen ausgegangen werden muss.

### *Methodenentwicklung zur Identifizierung von SGs*

Anhand der synthetisierten Standards wurde eine Aufarbeitungsmethode entwickelt, durch die eine verlustfreie Anreicherung von SGs aus pflanzlichen Proben erzielt werden konnte und somit eine gesicherte Quantifizierung mittels Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) erlaubte. Darüber hinaus wurde die Methode durch zusätzliche chromatographische Aufarbeitungsschritte erweitert, um einzelne glycosilierte Strukturen gezielt aufkonzentrieren und somit auch im Spurenbereich nachweisen zu können. Die entwickelte Methode umfasste dabei folgen die Trennschritte:

1. Extraktion der Zielanalyten aus dem getrockneten Probenmaterial
2. Anreicherung und Aufkonzentrierung mittels MLCCC und diversen SC-Methoden
3. Identifizierung/Quantifizierung mittels LC-MS/MS

Die Probenaufarbeitung wurde in Anlehnung an bereits etablierte Literatur für die Isolation glycosilierter steroidal Strukturen entwickelt. Die Extraktion wurde hinsichtlich der Löslichkeit und Extraktionsausbeute der Zielanalyten optimiert. Die Anreicherung und Aufkonzentrierung sollte möglichst verlustfrei erfolgen, weshalb eine Differenzierung zwischen qualitativer und quantitativer Analytik gemacht wurde. So wurde für die Quantifizierung von SGs ausschließlich die „multi-layer coil counter-current chromatography“ (MLCCC) genutzt, welche eine verlustfreie Anreicherung gewährleistete. Zur Quantifizierung wurden zusätzlich säulenchromatographische (SC) Methoden etabliert, welche jedoch keine quantitative Analytik erlaubten und ausschließlich zum Nachweis neuartiger, im Spurenbereich vorkommender, glycosilierter Sterole genutzt wurden. Zur Identifizierung wurde zunächst anhand synthetisierter Standards eine HPLC-Methode mit UV/DAD-Detektion entwickelt, welche anschließend auf ein LC-MS/MS-System übertragen wurde. Durch Vorversuche mittels enzymatischer und saurer Hydrolysen und anschließender

separater Analytik von Aglykon und Zuckereinheit wurden die relevanten Fraktionsbereiche der Anreicherungs-methode identifiziert. Anschließend erfolgte die Analytik mittels LC-MS/MS. Dazu wurden die Geräteparameter und substanzspezifischen Massenübergänge für eine Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Methode optimiert. Zur Steigerung der Empfindlichkeit und für eine geeignete Fragmentierung wurden 0,1 % Ameisensäure und 0,1 mM Ammoniumformiat zum Laufmittel zugesetzt. Die entwickelte Methode erlaubte die Trennung und den separaten Nachweis der zwölf synthetisierten Standards bei Nachweis- und Bestimmungsgrenzen im Bereich weniger ppb.

#### *Quantifizierung der SGs in Auberginen*

Mittels neu entwickelter LC-MS/MS-Methode konnten die mengenmäßig bedeutendsten SGs in der Aubergine erstmals als intakte Strukturen quantifiziert werden. Dazu wurden die Pflanzenteile Frucht und Schale gesondert voneinander betrachtet. Nach verlustfreier Anreicherung mittels MLCCC konnten die Zielanalyten selektiv im MRM-Modus nachgewiesen und quantifiziert werden. Es zeigte sich, dass in der Schale deutlich höhere Konzentrationen ( $737 \pm 256$  mg/kg Frischgewicht) an SGs zu finden waren als in der Frucht ( $344 \pm 107$  mg/kg Frischgewicht). Die bedeutendste Struktur war das  $\beta$ -Sitosterol- $\beta$ -D-Glucopyranosid (Sito-Glc) mit 497,5 mg/kg in der Schale bzw. 233,1 mg/kg in der Frucht. Weiterhin wurden das Stigmasterol-D-Glucopyranosid (Stigma-Glc) mit 192,8 mg/kg bzw. 82,7 mg/kg, Campesterol- $\beta$ -D-Glucopyranosid (Camp-Glc) mit 26,1 mg/kg bzw. 16,0 mg/kg und das Cholesterol- $\beta$ -D-Glucopyranosid (Chol-Glc) mit 8,7 mg/kg bzw. 7,7 mg/kg charakterisiert. Die Quantifizierung des Chol-Glc war insoweit von Bedeutung, als dass das Cholesterol als Zoosterol für gewöhnlich auf tierische Organismen beschränkt ist. In Auberginen wird es jedoch als Vorläufer für andere steroidale Strukturen, wie Glycoalkaloide und Saponine, synthetisiert. Darüber hinaus konnten erstmals Galactoside der Phytosterole des  $\beta$ -Sitosterols und Stigmasterols identifiziert und quantifiziert werden. Dabei wurden jedoch etwa fünf- bis zehnfach geringere Gehalte an Galactosiden als die der entsprechenden Glucoside identifiziert.

#### *Qualifizierung neuartiger SGs*

Neben den bereits literaturbeschriebenen Strukturen, welche quantitativ bestimmt wurden, konnten auch diverse neuartige glycosilierte steroidale Strukturen in Auberginen identifiziert werden. Zu diesen zählten die Galactoside des  $\beta$ -Sitosterols und Stigmasterols, welche bereits bei der Quantifizierung beschrieben wurden. Des Weiteren konnten das  $\beta$ -Sitosterol- $\beta$ -D-Cellobiosid (Sito-Cello), das 7-Dehydrocholesterol- $\beta$ -D-Glucopyranosid (7-DHC-Glc) und in Spuren auch das Stigmasterol- $\beta$ -D-Cellobiosid (Stigma-Cello) nach spezieller SC-Anreicherung nachgewiesen werden. Mit dem 7-DHC-Glc konnte eine Vitamin D-Vorstufe identifiziert werden. Ein Experiment mit UV-Bestrahlung von Auberginenproben durch verschiedene UV-Lampen zeigte, dass einstrahlungsinduzierte Umwandlung des 7-DHC-Glc in das Vitamin D<sub>3</sub>- $\beta$ -D-Glucopyranosid (D<sub>3</sub>-Glc) erzielt werden kann. Somit könnten Auberginen bei ausreichender Bestrahlung eine Quelle für pflanzliches Vitamin D darstellen.

#### *SGs in Goldhafer und Zucchini*

Zusätzlich zur Aubergine wurden auch die Zucchini und der Goldhafer mit der entwickelten LC-MS/MS-Methode auf SGs untersucht. Dabei stand eine quantitative Bestimmung im Vordergrund. In Zucchini konnten die Strukturen des Sito-Glc, Stigma-Glc und Camp-Glc nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurden weitere nicht genauer spezifizierte Strukturen identifiziert, bei denen es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um diverse Glycoside von  $\Delta^7$ - und  $\Delta^5$ -Sterolen handelte.

Auch der Goldhafer wies eine Vielzahl von SGs auf. So konnten das Chol-Glc, das Sito-Glc, das Stigma-Glc, das Camp-Glc und auch das 7-DHC-Glc nachgewiesen werden. Da die diversen SGs als Vorstufen von glycosilierten Vitamin D-Strukturen angesehen werden können, ist bei ausreichender UV-Bestrahlung auch von einer Umwandlung in diese auszugehen. Diese konnten im Rahmen dieses Projektes jedoch nicht nachgewiesen werden.

## 6 Experimenteller Teil

### 6.1 Chemikalien und Materialien

#### 6.1.1 Chemikalien

Chemikalien	Reinheit	Hersteller	CAS-Nr.
Aceton	100 %	VWR	67-64-1
Acetonitril	≥ 99,95 %	VWR	75-05-8
Ameisensäure	≥ 98 %	Sigma Aldrich	64-18-6
Ammoniumchlorid	≥ 99,995 %	Fluka	12125-02-9
Ammoniumformiat	≥ 97 %	Fluka	540-69-2
Bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA) + Trimethylchlorosilan (TMCS)	GC grade	Sigma-Aldrich	10416-59-8
Bromwasserstoffsäure (33 %ig in Eisessig)	33 %	Alfa Aesar	10035-10-6
$\beta$ -Glucosidase von <i>Aspergillus niger</i>	750 U/g	Sigma Aldrich	9033-06-1
$\beta$ -Glucosidase von Mandeln	6 U/mg	Sigma Aldrich	9001-22-3
Cellobiase(Novozyme 188)	250 U/g	Sigma Aldrich	9001-22-3
Choloroform	≥ 99,8 %	VWR	67-66-3
Citronensäure	99 %	Lancaster	77-92-9
Dichlormethan	99,5 %	Roth	75-09-2
Diethylether	≥ 99,5 %	Roth	60-29-7
Dimethylsulfoxid	99,9 %	Fluka	67-38-5
Essigsäure	≥ 99,8 %	Fluka	64-19-7
Essigsäureanhydrid	≥ 99 %	Acros	108-24-7
Ethanol	96 %; ≥ 99,9 %	Roth	67-17-5
Ethylacetat	≥ 99,8 %	VWR	141-78-6
Isopropanol	99,6 %	VWR	67-63-0
Kieselgel 60	100 %	Roth	7631-86-9
LiChoprep RP-18 (40-63 $\mu$ m)	100 %	Merck	108688-10-4
Methanol	99,9 %	VWR	67-56-1
Natriumcitrat	≥ 99 %	Roth	6132-04-3
Natriumhydrogencarbonat	99,5 %	Roth	144-55-8
Natriumhydroxid	99 %	Grüssing	290-314
Natriumsulfat	≥ 99 %	Roth	7757-82-6
<i>n</i> -Butanol	99,5 %	VWR	71-36-3
<i>n</i> -Hexan	≥ 99 %	Roth	110-54-3
Petrolether (40-60 °C)	≥ 99 %	VWR	101316-46-5
Polyethylenglycol 6000	≥ 99,9 %	Merck	25322-68-3
4-Phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion (PTAD)	97 %	Sigma Aldrich	4233-33-4
Pyridin	≥ 99 %	Sigam-Aldrich	110-86-1
Salzsäure	37 %	VWR	7647-01-0
Schwefelsäure	95-97 %	Sigma Aldrich	7664-93-9
Silbernitrat	≥ 99,9 %	Alfa Aesar	7761-88-8
Sephadex LH-20 (25-100 $\mu$ m)	100 %	Pharmacia Fine Chemicals, Sweden	9041-37-6

Standard	Reinheit	Hersteller	CAS-Nr.
1,2,3,4,6-Penta- <i>O</i> -acetyl- $\beta$ -D-Galactopyranose ( $\beta$ -D-Galactose Pentaacetat)	98 %	Sigma Aldrich	4163-60-4
1,2,3,4,6-Penta- <i>O</i> -acetyl- $\beta$ -D-Glucopyranose ( $\beta$ -D-Glucose Pentaacetat)	98 %	Alfa Aesar	604-69-3
1 $\alpha$ 25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub> 6,19,19-d <sub>3</sub>	≥ 97 %	Sigma Aldrich	128723-16-0
25-Hydroxyvitamin D <sub>3</sub> 6,19,19-d <sub>3</sub>	≥ 97 %	Sigma Aldrich	MFCD11656128*
7-Dehydrocholesterol	≥ 98 %	Sigma Aldrich	434-16-2
7-Dehydrocholesterol- (25,26,26,26,27,27,27-d <sub>7</sub> )	98 %	Sigma Aldrich	388622-58-0
Cholecalciferol	≥ 98 % (HPLC)	Sigma Aldrich	67-97-0
Cholecalciferol 6,19,19-d <sub>3</sub>	97 %	Sigma Aldrich	MFCD11656127*
Cholesterol	≥ 99 %	Sigma Aldrich	57-88-5
Ergocalciferol 6,19,19-d <sub>3</sub>	97 %	Sigma Aldrich	1217448-46-8
Ergosterol	≥ 98 % (HPLC)	Sigma Aldrich	57-87-4
Sterolmischung ( $\beta$ -Sitosterol, Stigmasterol und Campesterol)	46,6 % $\beta$ -Sitosterol, 28,0 % Stigmasterol, 25,4 % Campesterol	Molekula	83-46-5
Stigmasterol	technisch	Roth	83-48-7
$\alpha$ -D-Cellobiose Octaacetat	98 %	Sigma Aldrich	5346-90-7
$\beta$ -Sitosterol	Technisch, ≥ 65 %	Roth	83-46-5

\*MDL-Nummer

## 6.1.2 Laufmittel und Lösungen

### 6.1.2.1 Standard-Lösungen

Zur Herstellung der Standard-Lösungen wurden die jeweiligen synthetisierten Substanzen eingewogen, in Chloroform-Methanol 2:1 (v/v) gelöst und entsprechend mit Laufmittel B (MeOH + 0,1 % Ameisensäure + 0,1 mM NH<sub>4</sub>COOH) verdünnt (siehe nachfolgende Tabelle). Die korrigierte Endkonzentration wurde unter Einbeziehung des Sterolanteils und der Reinheit des jeweiligen Synthesestandards korrigiert und für jeden Einzelanalyten berücksichtigt. Es wurden für jeden Analyten mindestens 2 mg eingewogen und daraus eine 1 mg/ml Stammlösung hergestellt, aus welcher die weiteren Verdünnungen erfolgten.

Lösung	Verdünnung	Endkonzentration [ $\mu$ g/ml]	Sterol- anteil [%]	Reinheit [%]	korrigierte Endkonzentration [ $\mu$ g/ml]
Chol-Glc	2 mg/2 ml//10 $\mu$ l/1000 $\mu$ l//4 $\mu$ l/400 $\mu$ l	1,0	100	98,1	0,981
Sterol-Glcs: Sito-Glc Stigma-Glc Camp-Glc	2 mg/2 ml//10 $\mu$ l/1000 $\mu$ l//4 $\mu$ l/400 $\mu$ l	1,0	43,7 29,6 26,7	90,6 91,8 89,5	0,396 0,272 0,239
Sterol-Gals: Sito-Gal Stigma-Gal Camp-Gal	2 mg/2 ml//10 $\mu$ l/1000 $\mu$ l//4 $\mu$ l/400 $\mu$ l	1,0	44,7 30,1 25,2	65,1 66,3 65,1	0,291 0,200 0,163
Sterol-Cellos: Sito-Cello Stigma-Cello Camp-Cello	2 mg/2 ml//10 $\mu$ l/1000 $\mu$ l//4 $\mu$ l/400 $\mu$ l	1,0	43,7 30,3 26,0	35,5 34,3 35,0	0,155 0,104 0,091
7-DHC-Glc	2 mg/2 ml//10 $\mu$ l/1000 $\mu$ l//4 $\mu$ l/400 $\mu$ l	1,0	100	-	1,000
D <sub>3</sub> -Glc	2 mg/2 ml//10 $\mu$ l/1000 $\mu$ l//4 $\mu$ l/400 $\mu$ l	1,0	100	-	1,000

### 6.1.2.2 DC-Laufmittel

Laumittel	Zusammensetzung/Herstellung
Syntheselaufmittel	
Laufmittel A	Petrolether-Ethylacetat 3:1 (v/v)
Laufmittel B	Toluol-Eisessig 4:1 (v/v)
Laufmittel C	Petrolether-Aceton 4:1 (v/v)
Laufmittel D	Diethylether-Dichlormethan 1:1 (v/v)
Laufmittel E	Petrolether-Aceton 2:1 (v/v)
Laufmittel F	<i>n</i> -Hexan-Aceton 3:1 (v/v)
Laufmittel G	Petrolether-Aceton 6:1 (v/v)
Laufmittel H	<i>n</i> -Hexan- Diethylether 1:1 (v/v)
Laufmittel J	<i>n</i> -Hexan-Aceton 7:1 (v/v)
Laufmittel K	Petrolether-Aceton 8:1 (v/v)
Laufmittel L	<i>n</i> -Hexan-Aceton 4:1 (v/v)
Laufmittel M	<i>n</i> -Hexan-Ethylacetat 5:1 (v/v)
Laufmittel N	<i>n</i> -Hexan- Diethylether 2:1 (v/v)
allgemeine Laufmittel für SGs	
Laufmittel I	Ethylacetat-Methanol-Wasser 7:1,5:1,4 (v/v/v)
Laufmittel II	Chloroform-Methanol 9:1 (v/v)

### 6.1.2.3 Pufferlösungen

Pufferlösung	Zusammensetzung/Herstellung
Citratpuffer pH 5,0	20,5 ml Citronensäurelösung (0,1 M; 2,101 g/100 ml H <sub>2</sub> O), 29,5 ml Natriumcitrat-Dihydratlösung (0,1 M; 2,941 g/100 ml H <sub>2</sub> O), mit 50 ml H <sub>2</sub> O auf 100 ml auffüllen pH-Einstellung mit Natriumcitrat-Dihydratlösung (0,1 M)
25 % (w/w) Polyethylenglykol 6000	25 g/100 ml Citratpufferlösung

### 6.1.2.4 Weitere Lösungen

Lösung	Zusammensetzung/Herstellung
0,1 M methanolische Salzsäure	0,62 ml Salzsäure mit MeOH auf 100 ml auffüllen
0,12 M methanolische Natriumhydroxidlösung	4,8 g/1000 ml MeOH
0,2 M 1-Naphtylaminlösung	28,6 mg/500 µl Essigsäure (15 %) + 500 µl DMSO
1 M methanolische Natriumhydroxidlösung	4 g/100 ml MeOH
1 M methanolische Salzsäure	50 ml Salzsäure (0,1 M)/100 ml MeOH
1 M Natriumcyanoborhydridlösung	134 mg /2,09 ml DMSO
2 M methanolische Salzsäure	12,4 ml mit MeOH auf 100 ml auffüllen
gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung	Natriumhydrogencarbonat ad libitum in H <sub>2</sub> O
PTAD-Lösung	4,06 mg/2,03 ml Acetonitril
DC-Sprühreagenzien	I: 250 µl H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> in 5 ml Ethanol II: 500 Essigsäureanhydrid + 500 µl H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> in 5 ml Ethanol (Liebermann-Burchard Reagenz)

### 6.1.3 Geräte

#### HPLC-DAD

Gerät	Hersteller
Detektor	Jasco MD-2015 Plus Multiwavelength Detector
Pumpe	Jasco PU-2080 Plus Intelligent HPLC-Pump
Eluentenmischkammer	Jasco LG-2080-04 Quaternary Gradient Unit
Entgaser	Jasco DG-2080-54 4-Line Degasser
Injektor	Jasco AS-2055 Plus Intelligent Sampler
AD-Wandler	Jasco LC-Net II/ADC
Verwendete Säulen	Knauer Eurospher I 100-5 C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm mit Vorsäule Knauer Eurospher II 100-3 C18 H, 100x2 mm, 3 µm mit Vorsäule

#### HPLC-UV

Gerät	Hersteller
Detektor	Jasco UV 2075 Plus UV/VIS-Detector
Pumpe	Jasco PU-2089 Plus Intelligent HPLC-Pump
Eluentenmischkammer	Jasco LG-2080-04 Quaternary Gradient Unit
Entgaser	Jasco DG-2080-54 4-Line Degasser
Injektor	Jasco AS-2055 Plus Intelligent Sampler
AD-Wandler	Jasco LC-Net II/ADC
Verwendete Säulen	Knauer Eurospher I 100-5 C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm mit Vorsäule Knauer Eurospher II 100-3 C18 H, 100x2 mm, 3 µm mit Vorsäule

#### HPLC-FLD

Gerät	Hersteller
Detektor	Jasco FP-2020 Plus Intelligent Fluorescence Detector
Pumpe	Jasco PU-2080 Plus Intelligent HPLC-Pump
Eluentenmischkammer	Jasco LG-2080-04 Quaternary Gradient Unit
Entgaser	Jasco DG-2080-54 4-Line Degasser
Injektor	Jasco AS-2055 Plus Intelligent Sampler
AD-Wandler	Jasco LC-Net II/ADC
Verwendete Säulen	Knauer Eurospher I 100-5 C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm mit Vorsäule Knauer Eurospher II 100-3 C18 H, 100x2 mm, 3 µm mit Vorsäule

#### GC-FID

Gerät	Hersteller
GC-System	Agilent Technologies 6890N Network GC System
Injektor	Agilent Technologies 7683 Series Injector
Detektor	FID
Säule	HP-5 (30 Meter, 0,32 mm, 0,25 µm)
Säulenmaterial	5% Diphenyl - 95% Dimethylpolysiloxan
Trägergas	Helium

#### GC-MS

Gerät	Hersteller
GC-System	Finnigan TRACE GC Ultra
Säule	HP-5 (30 Meter, 0,32 mm, 0,25 µm)
Säulenmaterial	5% Diphenyl - 95% Dimethylpolysiloxan
Detektor	Trace DSQ-Mass spectrometer
Trägergas	Helium

**LC-MS/MS**

Gerät	Hersteller
LC-MS/MS System	LC-MS/MS System 4000 QTrap Applied Biosystems MDS Sciex
Detektor	Jasco UV-2075Plus Intelligent UV/VIS Detector; 4000 QTrap MS
Pumpe	Jasco PU-2080 Plus Intelligent HPLC-Pump
Eluentenmischkammer	Jasco LG-2080-04 Quaternary Gradient Unit
Entgaser	Jasco DG-2080-54 4-Line Degasser
Injektor	Jasco AS-2057 Plus Intelligent Sampler
AD-Wandler	Jasco LC-Net II/ADC

**MLCCC****Manuell gewickelte Spule**

Gerät	Hersteller
Detektor	Bausch & Lomb Spectronic 21 Zeiss Spektralphotometer PM2D
Pumpe	Waters Associates Chromatography Pump model 6000 A
Trennsäule/Schlauchmaterial	Bola PTFE 1,9 x 2,5 x 0,3 mm; 100 m
Schreiber	Servogor 220 Writer
Fraktionssammler	Ultrarac7000 LKB Fraction Collector

**6.1.4 sonstige Geräte und Materialien**

Gerät	Hersteller
Analysenwaage	Acculab ATL224I Analytical Balance
Argon-Abdampfstation	VLM-Evaporator CAMAG
Faltenfilter	Schleicher & SchuellPapierfilter, 1/2 gefaltet, Grade 597, 90 mm oder 150 mm
Feinwaage	Sartorius Mikrowaage MC5
Gefriertrocknungsanlage	VirTis, Benchtop K
Heiz- & Rührplatte	Heidolph MR Hei-Standard mit Heidolph EKT Hei-Con
Hochauflösendes MS	Bruker Apex III FT-ICR
Hochvakuumpumpe	Vakuumpumpe 2DS 4
Kieselgelplatten	Merck DC Kieselgel 60 F <sub>254</sub> Alufolien 20 x 20 cm
Laborzentrifuge	Labofuge 400R, Heraeus; SIGMA 203
Magnetrührer	Heidolph MR3001K
NMR-Spektrometer	Bruker Avance III 800
Pasteurpipetten	Glaspipetten 150-230 mm, Einweg-Pipetten graduiert 3 ml, 155 mm; Carl Roth
pH-Meter	Typ CG 837, Schott Geräte
pH-Elektrode	Knick SE101N pH/Pt 1000 sensor -5 °C bis 80 °C
Reinstwasseranlage	Siemens ultra clear
Präzisionswaage	A&D Präzisionswaage; FX-3000i
Rotationsverdampfer	Heidolph Laborota 4000-efficient mit ILMVAC Vakuumpumpe
Vakuumkonzentrator	Savant SPD121P SpeedVac Concentrator
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific Edison, N.J., USA
Spritzenfilter	Rotilabo-Spritzenfilter, CA, unisteril, 0,45 µm, d = 25 mm
SPE-Säulen, RP	Strata-SDB-L Styrene Divinylbenzene Polymer (200 mg/ 3 ml); Phenomex
SPE-Säulen, NP	Strata SI-1 Silica (500 mg/ 3 ml); Phenomenex
Thermostat	WK 5000 LAUDA
Trockenschrank	Heraeus UT 6, 64 l
UV-Lampe	CAMAG; UV Lampe 4 mit UV Kabinett 4
UV-Lampe (Quecksilberdampf Lampe)	Narva; UVS 125W Niederdruck Quecksilberdampf Lampe
Vortex	Fisher Bioblock Scientific Top-Mix 1118

## 6.2 Synthese glycosilierter steroidaler Strukturen

Die Synthese aller glycosilierten Strukturen erfolgte nach der Koenigs-Knorr Reaktion, wie sie in der Literatur ausführlich beschrieben wurde.<sup>160,165</sup> Dabei wurden geringfügige Anpassungen an den beschriebenen Methoden vorgenommen, wie sie nachfolgend für jede einzelne synthetisierte Struktur zusammengefasst werden. Die Lokantenbeziehung des Sterol-Grundkörpers und des Zuckerteils erfolgte dabei wienachfolgend am Beispiel des  $\beta$ -Sitosterol- $\beta$ -D-Cellobiosids (Abbildung 33) beschrieben:

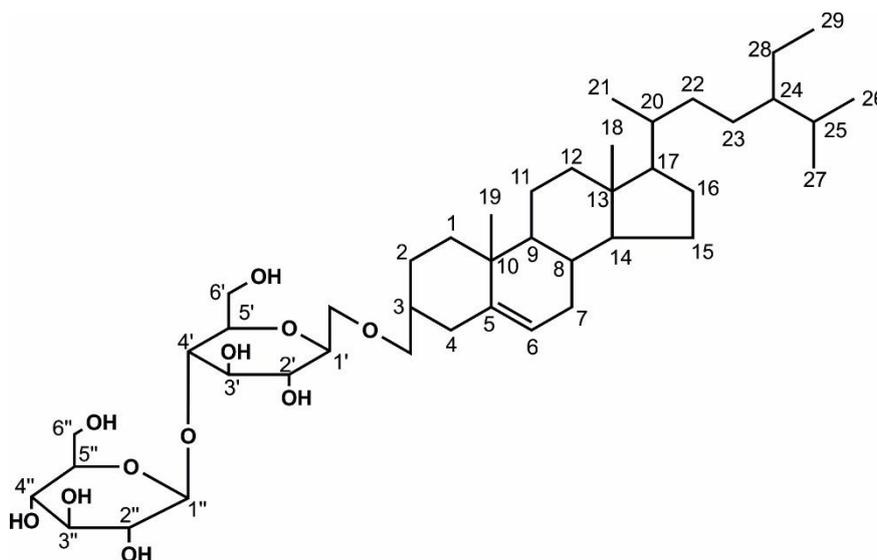


Abbildung 33: Struktur des  $\beta$ -Sitosterol- $\beta$ -D-Cellobiosids mit Lokantenbeziehung

### 6.2.1 Synthese der Ausgangsstoffe zur Koenigs-Knorr Synthese

#### 6.2.1.1 Silberoxid

Silber(I)-oxid wurde nach Kim et al. (2012) durch Fällung von Silbercarbonat im basischen synthetisiert.<sup>164</sup> Dazu wurden 20 ml einer 6,77 g Silbernitratlösung (0,1 M) in 1 l Natriumhydroxidlösung (0,2 M) gegeben und unter Rühren für 2 h bei Raumtemperatur belassen. Die anschließende Vakuumfiltration und waschen mit Wasser (2x) und Ethanol (2x) lieferte einen feinen schwarzen Niederschlag. Nach Trocknung für 24 h wurde das Produkt als Katalysator für alle anschließend beschriebenen Glycosilierungsreaktionen verwendet.

#### 6.2.1.2 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranosylbromid ( $\alpha$ -Acetobromglucose)<sup>161,162</sup>

10 g (25,6 mmol) 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl- $\alpha$ -D-Glucopyranose (Glucosepentacetat) wurde mit 28 ml Bromwasserstoffsäure (33 %ig in Eisessig) und 50 ml Eisessig versetzt und anschließend lichtgeschützt für 48 h unter ständigem Rühren belassen. Die Umsatzkontrolle mittels DC (silica gel 60; Laufmittel A) zeigte nahezu vollständigen Umsatz des Ausgangsstoffes ( $R_f$ -Wert: 0,42, Sprühreagenz I). Nach dem Hinzufügen von 100 ml Chloroform im Scheidetrichter wurde das Produkt zweimal mit je 50 ml Wasser und 100 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. In einem abschließenden Waschschritt mit 25 ml Wasser wurde die Chloroform-Phase über Natriumsulfat getrocknet.

Das Entfernen des Lösemittels im Vakuum und Umkristallisation aus Diethylether lieferte einen weißen Niederschlag als Produkt (8,3 g; 20,2 mmol; 78,8 %).

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz; CDCl<sub>3</sub>):**

6,60 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H, H-C<sup>1</sup>), 5,55 (t, *J* = 9,7 Hz, 1H, H-C<sup>3</sup>), 5,15 (dd, *J* = 10,1, 9,4 Hz, 1H, H-C<sup>4</sup>), 4,83 (dd, *J* = 10,0, 4,0 Hz, 1H, H-C<sup>2</sup>), 4,32 (m, 1H, H-C<sup>6B</sup>), 4,28 (m, 1H; H-C<sup>5</sup>), 4,12 (dd, *J* = 12,2, 1,8 Hz, 1H, H-C<sup>6A</sup>), 2,10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>)

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz; CDCl<sub>3</sub>):**

170,59 (C=O), 169,93 (C=O), 169,88 (C=O), 169,56 (C=O), 86,70 (H-C<sup>1</sup>), 72,28 (H-C<sup>3</sup>), 70,74 (H-C<sup>5</sup>), 70,31 (H-C<sup>2</sup>), 67,33 (H-C<sup>4</sup>), 61,09 (H<sub>2</sub>-C<sup>6</sup>), 20,78 (CH<sub>3</sub>), 20,76 (CH<sub>3</sub>), 20,73 (CH<sub>3</sub>), 20,67 (CH<sub>3</sub>)

**6.2.1.3 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-galactopyranosylbromid ( $\alpha$ -Acetobromglactose)<sup>161,162</sup>**

In Analogie zu Kapitel 6.2.1.2 (S. 95) wurde 10 g (25,6 mmol) 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl- $\alpha$ -D-Galactopyranose (Galactosepentaacetat) bromiert (*R<sub>f</sub>*-Wert: 0,39, Laufmittel A, Sprühreagenz I). Die anschließende Umkristallisation aus Diethylether lieferte 8,7 mg Produkt als weißen Niederschlag (21,2 mmol; 84,7 %).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**

6,69 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H, H-C<sup>1</sup>), 5,51 (dd, *J* = 3,4, 1,3 Hz, 1H, H-C<sup>4</sup>), 5,40 (dd, *J* = 10,6, 3,3 Hz, 1H, H-C<sup>2</sup>), 5,04 (dd, *J* = 10,6, 4,0 Hz, 1H, H-C<sup>3</sup>), 4,48 (m, 1H, H-C<sup>5</sup>), 4,18 (dd, *J* = 11,4, 6,4 Hz, 1H, H-C<sup>6B</sup>), 4,10 (dd, *J* = 11,5, 6,8 Hz, 1H, H-C<sup>6A</sup>), 2,14 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>)

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**

170,42 (C=O), 170,17 (C=O), 170,00 (C=O), 169,85 (C=O), 88,26 (H-C<sup>1</sup>), 71,21 (H-C<sup>5</sup>), 68,13 (H-C<sup>3</sup>), 67,91 (H-C<sup>2</sup>), 67,12 (H-C<sup>4</sup>), 60,96 (H-C<sup>6</sup>), 20,87 (CH<sub>3</sub>), 20,76 (CH<sub>3</sub>), 20,70 (CH<sub>3</sub>), 20,67 (CH<sub>3</sub>)

**6.2.1.4  $\alpha$ -D-Glucopyranosylbromid, 4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-Glucopyranosyl)-, 2,3,6-Triacetat ( $\alpha$ -D-Cellobiosylbromid Heptaacetat)<sup>163</sup>**

10 g  $\alpha$ -D-Glucopyranose, 4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-Glucopyranosyl)-, Tetraacetat ( $\alpha$ -D-Cellobiose Octaacetat) wurde nach Goggin et al. (1994) mit 20 ml Bromwasserstoffsäure (33 %ig in Eisessig) und 35 ml Eisessig versetzt.<sup>163</sup> Nach 68 stündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde der Umsatz mit DC (Laufmittel B) überprüft (*R<sub>f</sub>*-Wert: 0,28, Sprühreagenz I). Die Aufarbeitung und Umkristallisation aus Diethylether wie unter Kapitel 6.2.1.2 (S. 95) beschrieben lieferte 7,7 g (11,01 mmol, 74,7 %) Produkt als weißen Niederschlag.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**

6,52 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H, H-C<sup>1</sup>), 5,52 (t, *J* = 9,7 Hz, 1H, H-C<sup>3</sup>), 5,14 (m, 1H, H-C<sup>4</sup>), 5,07 (m, 1H, H-C<sup>2</sup>), 4,93 (dd, *J* = 9,2, 7,9 Hz, 1H, H-C<sup>3</sup>), 4,76 (dd, *J* = 10,0, 4,1 Hz, 1H, H-C<sup>2</sup>), 4,53 (m,

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ), 4,36 (dd,  $J = 12,5, 4,5$  Hz,  $1\text{H}, \text{H-C}^{1'}$ ), 4,22 – 4,14 (m,  $2\text{H}, 2\text{H-C}^{6\text{A},\text{B}'}$ ), 4,05 (dd,  $J = 12,5, 2,3$  Hz,  $1\text{H}, \text{H-C}^{5'}$ ), 3,83 (m,  $1\text{H}, \text{H-C}^4$ ), 3,67 (m,  $1\text{H}, \text{H-C}^5$ ), 2,13 (s,  $3\text{H}, \text{CH}_3$ ), 2,08 (d,  $J = 0,7$  Hz,  $6\text{H}, 2\text{CH}_3$ ), 2,03 (d,  $J = 1,0$  Hz,  $6\text{H}, 2\text{CH}_3$ ), 2,00 (s,  $3\text{H}, \text{CH}_3$ ), 1,98 (s,  $3\text{H}, \text{CH}_3$ )

#### $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{CDCl}_3$ ):

170,59 (C=O), 170,35 (C=O), 170,21 (C=O), 170,08 (C=O), 169,39 (C=O), 169,08 (C=O), 100,69 ( $\text{H-C}^{1'}$ ), 86,56 ( $\text{H-C}^1$ ), 75,36 ( $\text{H-C}^5$ ), 73,16 ( $\text{H-C}^3$ ), 73,09 ( $\text{H-C}^4$ ), 72,20 ( $\text{H-C}^3$ ), 71,76 ( $\text{H-C}^{5'}$ ), 70,92 ( $\text{H-C}^2$ ), 69,58 ( $\text{H-C}^{4'}$ ), 67,94 ( $\text{H-C}^2$ ), 61,76 ( $2\text{H-C}^6$ ), 61,08 ( $2\text{H-C}^{6'}$ ), 20,93 ( $\text{CH}_3$ ), 20,81 ( $\text{CH}_3$ ), 20,80 ( $\text{CH}_3$ ), 20,71 ( $\text{CH}_3$ ), 20,67 ( $\text{CH}_3$ ), 20,66 ( $\text{CH}_3$ ), 20,65 ( $\text{CH}_3$ )

### 6.2.2 Cholesterol- $\beta$ -D-Glucopyranosid

914 mg (2,36 mmol) Cholesterol wurden mit 3,64 g (8,85 mM)  $\alpha$ -Acetobromglucose (2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-Glucopyranosylbromid) und 1,64 g (7,08 mM) Silber(I)-oxid versetzt und mit 120 ml Diethylether bei  $-7^\circ\text{C}$  (Eisbad + NaCl) suspendiert. Nach einstündigem Rühren auf Eis ( $-7^\circ\text{C}$ ) wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 2 h gerührt. Anschließend wurde der Umsatz mittels DC kontrolliert (Laufmittel C;  $R_f$ -Wert: 0,43, Sprühreagenz I). Die Aufreinigung mittels SC an Kieselgel (Laufmittel M, 5:1,  $R_f$ -Wert: 0,16, Sprühreagenz I) liefert 68 mg (0,095 mmol; 4,02 %) Cholesterol-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid. Durch Zugabe von 5 ml methanolischer Kaliumhydroxid-Lösung (0,1 M) wurde für etwa 2 h deacetyliert. Nach Neutralisation mit methanolischer Salzsäure (0,1 M) wurde mit Wasser verdünnt und der Niederschlag abfiltriert. Das Waschen mit Wasser und *n*-Hexan lieferte 40 mg (0,073 mmol; 69,2 %) Produkt als weißen Feststoff.

Die Charakterisierung mittels  $^1\text{H-NMR}$  und  $^{13}\text{C-NMR}$  (Pyridin- $d_5$ ) ist dem Anhang (Kapitel 11.1.1, S.123f.) zu entnehmen.

### 6.2.3 Sterol- $\beta$ -D-Glucopyranoside

Die Synthese der SGs erfolgte aus einer kommerziell erhältlichen Sterolmischung, welche 46,6 %  $\beta$ -Sitosterol, 28,0 % Stigmasterol und 25,4 % Campesterol enthielt. Daraus resultierte ein gemischtes Produkt ähnlicher Zusammensetzung.

500 mg Sterolmischung (1,2 mM bezogen auf  $\beta$ -Sitosterol) wurden mit 1,2 g (2,92 mmol)  $\alpha$ -Acetobromglucose und 0,8 g (3,45 mmol) Silber(I)-oxid versetzt und anschließend mit 20 ml Diethylether bei  $-7^\circ\text{C}$  (Eisbad + NaCl) suspendiert. Nach einstündigem Rühren bei Eiskühlung ( $-7^\circ\text{C}$ ) wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und weitere zwei Stundengerührt. Anschließend wurde der Umsatz mittels DC kontrolliert (Laufmittel D,  $R_f$ -Wert: 0,31, Sprühreagenz I). Die Aufreinigung an Kieselgel (Laufmittel J,  $R_f$ -Wert: 0,17, Sprühreagenz I) lieferte 50 mg (0,067 mmol; 5,6 % bezogen auf  $\beta$ -Sitosterol) einer Mischung aus  $\beta$ -Sitosterol-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid, Stigmasterol-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid und Campesterol-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid. Die aufgereinigte Zwischenstufe wurde in 4 ml Methanol gelöst und mit 1 ml Natriumhydroxid-Lösung (0,12 M) für 90 Minuten deacetyliert. Die Neutralisation mit

Salzsäure (0,1 M in Methanol) und das Verdünnen mit Wasser lieferte einen weißen Niederschlag, der abfiltriert und anschließend mit Wasser und eisgekühltem Aceton gewaschen wurde. Die Elution mit Chloroform-Methanol 2:1 (v/v) und Umkristallisation aus Diethylether lieferte 30 mg (0,052 mmol, 77,6 %) eines weißen Niederschlages, bestehend aus einem Gemisch von  $\beta$ -Sitosterol- $\beta$ -D-Glucopyranosid, Stigmasterol- $\beta$ -D-Glucopyranosid und Campesterol- $\beta$ -D-Glucopyranosid.

Die Charakterisierung mittels  $^1\text{H-NMR}$  und  $^{13}\text{C-NMR}$  (Pyridin- $d_5$ ) ist dem Anhang (Kapitel 11.1.2, S.124f.) zu entnehmen.

#### 6.2.4 Sterol- $\beta$ -D-Galactopyranoside

Analog zu den Glucosiden erfolgte auch hier die Synthese aus der unter Kapitel 6.2.3 beschriebenen Sterolmischung.

250 mg Sterolmischung (0,6 mmol bezogen auf  $\beta$ -Sitosterol) wurden mit 0,62 g (1,51 mmol)  $\alpha$ -Acetobromgalactose und 0,38 g (1,64 mM) Silber(I)-oxid versetzt und anschließend mit 10 ml Diethylether bei  $-7^\circ\text{C}$  (Eisbad + NaCl) suspendiert. Nach einstündigem Rühren bei Eiskühlung ( $-7^\circ\text{C}$ ) wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und weitere eineinhalb Stunden gerührt. Anschließend wurde der Umsatz mittels DC kontrolliert (Laufmittel C,  $R_f$ -Wert: 0,30, Sprühreagenz I). Die Aufreinigung an Kieselgel (Laufmittel K,  $R_f$ -Wert: 0,17, Sprühreagenz I) lieferte 75 mg (0,101 mmol; 16,8 % bezogen auf  $\beta$ -Sitosterol) einer Mischung aus  $\beta$ -Sitosterol-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid, Stigmasterol-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid und Campesterol-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid. Die aufgereinigte Zwischenstufe wurde in 2 ml Methanol-Dichlormethan 1:1 (v/v) gelöst und mit 100  $\mu\text{l}$  methanolischer Natriumhydroxidlösung (1 M) über 60 Minuten deacetyliert. Nach Kontrolle mittels DC (Laufmittel E;  $R_f$ -Wert: 0, Sprühreagenz II) wurde mit 50  $\mu\text{l}$  Salzsäure (2 M in Methanol) neutralisiert. Anschließend wurde mit Wasser verdünnt und der Niederschlag abfiltriert. Der erhaltene weiße Rückstand wurde mit Wasser und eisgekühltem Aceton gewaschen und anschließend getrocknet. Die Elution mit Chloroform-Methanol 2:1 (v/v) und Umkristallisation aus Diethylether lieferte 35 mg (0,061 mmol, 60,1 %) eines weißen Niederschlagseiner Mischung von  $\beta$ -Sitosterol- $\beta$ -D-Galactopyranosid, Stigmasterol- $\beta$ -D-Galactopyranosid und Campesterol- $\beta$ -D-Galactopyranosid.

Die Charakterisierung mittels  $^1\text{H-NMR}$  und  $^{13}\text{C-NMR}$  (Pyridin- $d_5$ ) ist dem Anhang (Kapitel 11.1.3, S. 125f.) zu entnehmen.

#### 6.2.5 Sterol-4-O- $\beta$ -D-Glucopyranosyl- $\beta$ -D-Glucopyranoside (Sterol- $\beta$ -D-Cellobioside)

Analog zu den Glucosiden erfolgte auch hier die Synthese aus der unter Kapitel 6.2.3 beschriebenen Sterolmischung. 500 mg Sterolmischung (1,2 mmol bezogen auf  $\beta$ -Sitosterol) wurden mit 2 g (3,0 mmol)  $\alpha$ -D-Glucopyranosylbromid 4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-Glucopyranosyl)-2,3,6-Triacetat ( $\alpha$ -D-Cellobiosylbromid Heptaacetat) und 0,8 g (2,4 mmol) Silber(I)-oxid versetzt und anschließend mit 30 ml Diethylether, sowie 25 ml Dichlormethan bei  $-7^\circ\text{C}$  (Eisbad + NaCl) suspendiert. Nach 45 Minuten Reaktionszeit wurde

langsam auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere zwei Stunden gerührt. Der Umsatz wurde mittels DC (Laufmittel F,  $R_f$ -Wert:0,34, Sprühreagenz I) kontrolliert. Nach Umkristallisation aus Ethanol (20 ml) und Aufreinigung an Kieselgel (Laufmittel L,  $R_f$ -Wert: 0,15, Sprühreagenz I) wurden 56 mg Rohprodukt erhalten. Die anschließende Umkristallisation aus Diethylether ergaben 46 mg (0,044 mmol; 3,7 % bezogen auf  $\beta$ -Sitosterol) einer Mischung aus  $\beta$ -Sitosterol-Glucopyranosyl 4- $\beta$ -O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)- 2,3,6-Triacetat ( $\beta$ -Sito-sterol- $\beta$ -D-Cellobiosyl Heptaacetat), Stigmasterol-Glucopyranosyl 4- $\beta$ -O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-2,3,6-Triacetat(Stigmasterol- $\beta$ -D-Cellobiosyl Heptaacetat) und Campesterol-Glucopyranosyl 4- $\beta$ -O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-2,3,6-Triacetat(Campesterol- $\beta$ -D-Cellobiosyl Heptaacetat).Die aufgereinigte Zwischenstufe wurde in 7 ml Methanol gelöst und mit 2,1 ml Natriumhydroxidlösung (0,12 M) über 150 Minuten deacetyliert. Nach Neutralisation mit 2,5 ml Salzsäure (0,1 M in Methanol) wurde das Lösemittel im Vakuum verdampft und der Rückstand in 18 ml *n*-Butanol gelöst. Anschließend wurde dreimal mit Wasser gewaschen und die organische Phase eingedampft. Die anschließende Umkristallisation aus Diethylether lieferte nach Trocknung im Vakuum 26,9 mg (0,036 mmol; 81,8 %) eines weißen Niederschlages aus  $\beta$ -sitosterol-4-O- $\beta$ -D-Glucopyranosyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid( $\beta$ -Sitosterol- $\beta$ -D-Cellobiosid), Stigmasterol-4-O- $\beta$ -D-Glucopyranosyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid(Stigmasterol- $\beta$ -D-Cellobiosid) und Campesterol-4-O- $\beta$ -D-Glucopyranosyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid (Campesterol- $\beta$ -D-Cellobiosid).

Die Charakterisierung mittels  $^1\text{H-NMR}$  und  $^{13}\text{C-NMR}$  (Pyridin- $d_5$ ) ist dem Anhang (Kapitel 11.1.4, S. 126f.) zu entnehmen.

### 6.2.6 7-Dehydrocholesterol- $\beta$ -D-Glucopyranosid

760 mg (2 mmol) 7-Dehydrocholesterol wurden mit 2,05 g (5 mmol)  $\alpha$ -Acetobromglucose (2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-Glucopyranosylbromid) und 1,27 g (5,5 mmol) Silber(I)-oxid versetzt und mit 30 ml Diethylether bei  $-7\text{ }^\circ\text{C}$  (Eisbad + NaCl) suspendiert. Unter Lichtausschluss wurde die Mischung unter ständigem Rühren für zwei Stunden belassen und langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Nach einer Stunde wurde der Umsatz mittels DC (Laufmittel C;  $R_f$ -Wert:0,44, Sprühreagenz I) kontrolliert. Die anschließende Aufreinigung an Kieselgel (Laufmittel G,  $R_f$ -Wert: 0,17, Sprühreagenz I) lieferte 550 mg (0,769 mmol, 38,5 %) 7-Dehydrocholesterol-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid. 340 mg (0,476 mmol) der aufgereinigten Zwischenstufe wurden in 5 ml Methanol und 5 ml Dichlormethan gelöst und mit 4,5 ml Natriumhydroxidlösung (0,1 M) über 180 Minuten deacetyliert. Nach Kontrolle mittels DC (Laufmittel G;  $R_f$ -Wert: 0, Sprühreagenz II) wurde mit 4,5 ml Salzsäure (0,1 M in Methanol) neutralisiert. Anschließend wurde mit Wasser verdünnt und der Niederschlag abfiltriert. Die Elution mit Chloroform-Methanol 1:1 (v/v) und Umkristallisation aus Aceton lieferte 250 mg (0,458 mmol, 96,2 %) 7-Dehydrocholesterol- $\beta$ -D-Glucopyranosid als weißen Niederschlag.

Die Charakterisierung mittels  $^1\text{H-NMR}$  und  $^{13}\text{C-NMR}$  (Pyridin- $d_5$ ) ist dem Anhang (Kapitel 11.1.5, S.128f.) zu entnehmen.

### 6.2.7 Cholecalciferol- $\beta$ -D-Glucopyranosid (Vitamin D<sub>3</sub>- $\beta$ -D-Glucopyranosid)

430 mg (1,12 mmol) Cholecalciferol wurde mit 1,29 g (3,14 mmol)  $\alpha$ -Acetobromglucose (2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranosylbromid) und 0,84 g (3,62 mmol) Silber(I)-oxid versetzt und mit 30 ml Diethylether bei -7 °C (Eisbad + NaCl) suspendiert. Unter Lichtausschluss wurde die Mischung unter ständigem Rühren für 30 Minuten belassen und langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Nach zwei Stunden wurde der Umsatz mittels DC (Laufmittel H,  $R_f$ -Wert: 0,24, Sprühreagenz I) kontrolliert. Die anschließende Aufreinigung an Kieselgel (Laufmittel N;  $R_f$ -Wert: 0,10, Sprühreagenz I) lieferte 137 mg Cholecalciferol-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid (0,192 mmol; 17,1 %). Die aufgereinigte Zwischenstufe wurde in 18 ml Methanol gelöst und mit 2 ml Natriumhydroxidlösung (0,12 M) über 100 Minuten deacetyliert. Nach Kontrolle mittels DC (Laufmittel II,  $R_f$ -Wert: 0,71, Sprühreagenz II) wurde mit 2,5 ml Salzsäure (0,1 M in Methanol) neutralisiert. Das Verdünnen mit Wasser lieferte einen weißen Niederschlag, der anschließend mit Diethylether extrahiert wurde. Die Umkristallisation der getrockneten Etherphase aus Ethylacetat und erneutes Waschen mit eiskaltem Ethylacetat lieferten 75 mg (0,137 mmol, 71,3 %) Cholecalciferol- $\beta$ -D-Glucopyranosid als weißen Niederschlag.

Die Charakterisierung mittels <sup>1</sup>H-NMR und <sup>13</sup>C-NMR (Pyridin-d<sub>5</sub>) ist dem Anhang (Kapitel 11.1.6, S.129f.) zu entnehmen.

## 6.3 Methoden

### 6.3.1 Bestimmung freier und glycosidisch gebundener steroidaler Strukturen

#### 6.3.1.1 Probenmaterial

Die pflanzlichen Proben wurden aus unterschiedlichen Quellen bezogen. Die Goldhaferproben stammten von verschiedenen Feldern unterschiedlicher Erntezeiten. Zusätzlich wurde ein eigens angelegtes Feld im Jahr 2015 als Quelle der pflanzlichen Proben genutzt. Zur gezielten Bestrahlung wurden selbst gezogene Keimlinge genutzt, welche anschließend optional mittels CAMAG UV-Lampe 4 (8W) bestrahlt wurden. Die Auberginen und Zucchini wurden stets frisch von lokalen Märkten bezogen, wobei es sich um spanische Proben handelte, welche unter konventionellen Bedingungen angebaut wurden.

#### 6.3.1.2 Probenvorbereitung

Zur Probenvorbereitung wurden die pflanzlichen Proben zunächst grob zerkleinert und anschließend bei -24 °C leicht gefroren. Anschließend wurden die festen Pflanzenbestandteile mittels Moulinette fein zerkleinert und für die anschließende Gefriertrocknung bei -30 °C für mindestens 24 h gefroren. Die Trocknung erfolgte mittels „VirTis, Benchtop K“ Gefriertrocknungsanlage für 3-4 Tage bei einem Druck von  $\leq$  300 mbar, sodass ein trockenes Pulver erhalten wurde. Die getrockneten Proben wurden bis zur Aufarbeitung bei -24 °C gelagert.

### 6.3.1.3 Probenaufarbeitung

Die Probenaufarbeitung umfasste mehrere Schritte, die im Folgenden näher beschrieben werden:

#### *Extraktion*

Zu Beginn des Projektes wurden die Goldhaferextrakte mittels zweitägiger Kaltextraktion bei 4 °C mit einem Gemisch aus Aceton-Wasser 70:30 (v/v) extrahiert. Dazu wurden die gefriergetrockneten Proben in 200-500 ml Laborflaschen vollständig mit dem Extraktionsgemisch überschichtet und nach Durchmischung auf einer Rüttelplatte für zwei Tage lichtgeschützt bei 4 °C belassen. Anschließend wurde filtriert, das Filtrat schonend getrocknet (Rotationsverdampfer < 36 °C) und weiter aufgearbeitet.

Die Extraktion der SGs im Hauptteil der Arbeit erfolgte durch eine Dreifachextraktion mittels Chloroform-Methanol 2:1 (v/v). Dazu wurden die gefriergetrockneten Proben in 150-500 ml Laborflaschen vollständig mit dem Extraktionsgemisch überschichtet, für 15 min im Ultraschallbad homogenisiert und anschließend bei Raumtemperatur für 60 Minuten auf einer Rüttelplatte (etwa 180 U/min) extrahiert. Anschließend wurde filtriert, die vereinigten Filtrate getrocknet (Rotationsverdampfer < 36 °C) und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -24 °C gelagert. Während der gesamten Extraktion wurden die Probengefäße zum Schutz vor Lichteinfluss mit Aluminiumfolie umwickelt oder Braunglasflaschen genutzt.

#### *Flüssig-Flüssig-Extraktion*

600 mg des jeweiligen Extraktes wurden im Scheidetrichter mit je 100 ml Ethylacetat und Wasser versetzt und anschließend durch Schütteln unter regelmäßigem Belüften einer Flüssig-Flüssig-Verteilung unterzogen. Nach Trennung von organischer und wässriger Phase wurde schonend getrocknet (Rotationsverdampfer < 36 °C) und die Rückstände für die weitere Aufarbeitung mittels Lichoprep RP-18 Chromatographie verwendet.

#### *Lichoprep RP-18 Chromatographie*

Zur Aufreinigung der Goldhaferextrakte mittels Säulenkombination wurde ein Aliquot (maximal 600 mg) des Aceton-Wasser-Extraktes 70:30 (v/v) oder die Rückstände der Flüssig-Flüssig-Extraktion in Methanol-Wasser 96:4 (v/v) gelöst, spritzenfiltriert und zuerst an ca. 15 g Lichoprep RP-18-Material mittels gepackter Säule (h: 3,5 cm, d: 4 cm) aufgereinigt. Es wurde isokratisch mit Methanol-Wasser 96:4 (v/v) eluiert und Fraktionen zu je 9 ml bei einem Fluss von 2 ml/min gesammelt und anschließend die Fraktionen 13-40 miteinander vereinigt. Nach Trocknung im Vakuum (Rotationsverdampfer < 36 °C) wurde der Rückstand für die weitere Aufarbeitung mittels Sephadex LH-20 verwendet.

Einige ausgewählte Extrakte sowie die Extrakte der bestrahlten Auberginenproben wurden vor der MLCC an ca. 28 g Lichoprep RP-18-Material mittels gepackter Säule (h: 13 cm, d: 2 cm) aufgereinigt. Zur Erhöhung der Fließgeschwindigkeit wurde ein leichtes Vakuum an der Säule angelegt. Die Rückstände der jeweiligen Extrakte wurden in etwa 2 ml Methanol-Wasser (2:8, v/v) aufgenommen und anschließend mit etwa 500 µl Methanol nachgespült. Nach Probenaufgabe auf die mit Glaswolle überschichtete Säule wurde mit 400 ml Methanol-Wasser 2:8 (v/v) gewaschen. Das Wascheluat wurde verworfen. Die Elution der Zielstrukturen

erfolgte mit 200 ml Methanol. Anschließend wurde das Eluat schonend getrocknet (Rotationsverdampfer < 36 °C).

#### *Sephadex LH-20 Chromatographie*

Die Trocknungsrückstände der Lichoprep RP-18-Eluats der Goldhaferextrakte wurden vollständig in Methanol-Wasser 70:30 (v/v) gelöst und an ca. 50 g Sephadex LH-20-Material mittels gepackter Säule (h: 29 cm, d: 3 cm) isokratisch mit Methanol-Wasser 70:30 (v/v) eluiert. Es wurden Fraktionen zu je 9 ml bei einem Fluss von 2 ml/min gesammelt und die Fraktionen 30-80 miteinander vereinigt. Nach Trocknung im Vakuum (Rotationsverdampfer < 36 °C) wurde der Rückstand für die enzymatische Hydrolyse verwendet.

#### *MLCCC (Gegenstromverteilungschromatographie)*

Die MLCCC erfolgte anhand manuell gewickelter Spule eines Gesamtvolumens von 240 ml bei „head to tail“-Elution. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus *n*-Hexan-Ethylacetat-Methanol-Wasser (5:3:5:3, v/v), welches stets frisch hergestellt wurde. Dazu erfolgte eine Durchmischung durch mehrfaches 3-5 minütiges Schütteln mit anschließender Trennung von organischer und wässriger Phase.

Die getrockneten Probenextrakte wurden vor der MLCCC je nach Löslichkeit (maximal 120 mg/ml) in 2,5-5 ml organischer und wässriger Phase gelöst und anschließend das Gesamtvolumen von 5-10 ml injiziert. Zunächst erfolgte zum Einstellen des Gleichgewichtes eine fünfminütige Rotation ohne Fluss. Danach wurde bei einem konstanten Fluss von 2 ml/min und einer Rotation von 780-790 U/min getrennt. Dabei wurden alle 5 Minuten Fraktionen zu je 10 ml mittels Fraktionssammler gesammelt und anschließend mittels DC (Laufmittel II, Kapitel 6.1.2.2, S.92) charakterisiert. Anschließend erfolgte die Vereinigung der relevanten Fraktionsbereiche 1-10, 11-20 und 21-40, welche anhand der DC-Spots ausgewählt wurden. Das verbleibende Lösemittel in der Spule wurde verworfen. Nach Vereinigung wurden die Fraktionsbereiche schonend getrocknet (Rotationsverdampfer < 36 °C).

#### *Dünnschichtchromatographie (DC)*

Zur Überprüfung einzelner Fraktionen auf glycosilierte steroidale Strukturen und besonders SGs wurden die aufkonzentrierten vereinigten Fraktionsbereiche mittels DC (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>) charakterisiert. Zum allgemeinen Test auf glycosilierte steroidale Strukturen wurde ein Laufmittel I genutzt. SGs wurden mit Laufmittel II charakterisiert (siehe Kapitel 6.1.2.2, S.92). Die Identifizierung der relevanten Fraktionen erfolgte durch Vergleich der  $R_f$ -Werte und der Färbung der Probenspots mit den Spots der synthetisierten Standards nach Besprühen mit Liebermann-Burchard Reagenz. Das chromatographische Verhalten und die  $R_f$ -Werte der synthetisierten glycosilierten steroidal Strukturen wurden unter 6.2 explizit für jede Struktur beschrieben. Kapitel 6.1.2.2 (S.92, Laufmittel I und II) fasst die verwendeten Laufmittel zusammen. Die Detektion erfolgte in der Regel mittels Liebermann-Burchard Reagenz, welches stets frisch hergestellt wurde. Für eine einfache und schnelle Charakterisierung wurde ein unspezifisches Reagenz aus 5 %iger Schwefelsäure in Methanol genutzt.

### *Clean up*

Der MLCCC-Rückstand der vereinigten Fraktionen wurde in 2 ml Chloroform-Methanol 2:1 (v/v) aufgenommen, gelöst, homogenisiert (Vortex, ggf. Ultraschallbad) und zentrifugiert. Für die Messlösung wurden je nach Zielkonzentration der Analyten Aliquote abgenommen und mit Laufmittel B (Methanol + 0,1 % Ameisensäure + (0,1 mM NH<sub>4</sub>COOH)) verdünnt. Nach Homogenisierung (Vortex, ggf. Ultraschallbad) folgte die Vermessung der klaren Lösungsmittels LC-MS/MS. Die entsprechenden HPLC und MS-Parameter sind Kapitel 11.5.6 (S. 135ff., Anhang) zu entnehmen.

### *Hydrolyse glycosilierter steroidal Strukturen*

Die Hydrolyse wurde vor allem für die Evaluierung der synthetisierten Standards und die aufgearbeiteten Extrakte der Goldhaferproben zu Beginn des Projektes genutzt, um freie Vitamin D-Strukturen detektieren zu können und erfolgte entweder sauer (SGs) oder enzymatisch (glycosilierte Vitamin D-Strukturen).

### *enzymatische Hydrolyse*

Die enzymatische Hydrolyse erfolgte mittels enzymatischer Mischinkubation verschiedener Systeme in je 1 ml Citratpuffer (pH=5). Das ursprünglich verwendete System bestand aus Cellobiase von *Aspergillus niger* (39 U/ml) und  $\beta$ -Glucosidase (5 U/ml) aus Mandeln. In einem neu entwickelten System wurde Glucosidase von *Aspergillus niger* (10 U/ml) und von  $\beta$ -Glucosidase (5 U/ml) eingesetzt. Die jeweilige Probe wurde vor Zugabe des Citratpuffers in 50  $\mu$ l Dimethylsulfoxid aufgenommen. Zur besseren Phasenvermittlung zwischen den relativ unpolaren Zielstrukturen und der wässrigen Matrix wurde eine Lösung aus 5 % Polyethylenglykol 6000 (PEG 6000) als Phasenvermittler zugesetzt. Dazu wurden 200  $\mu$ l einer 25 %igen Lösung von PEG 6000 in Citratpuffer zu 1 ml Inkubationslösung gegeben. Die Inkubationszeit variierte in Abhängigkeit der Probenmatrix zwischen wenigen Stunden und mehreren Tagen, wobei alle 24 h frische Enzymlösung (1 ml der oben beschriebenen Zusammensetzung) zugegeben wurde. Die Probelösung wurde mit 1 ml Wasser versetzt und zwei Mal mit je 2 ml *n*-Hexan extrahiert. Organische und wässrige Phase wurden anschließend unter Argon bzw. im SAVANT SpeedVac Vakuumpkonzentrator getrocknet und für die weitere Analytik mittels HPLC-UV, HPLC-FLD, GC-FID oder LC-MS/MS verwendet (Kapitel 11.5, S. 133ff, Anhang).

### *saure Hydrolyse*

Die SGs wurden sauer nach Akhtar et al. (2010) hydrolysiert.<sup>140</sup> Dazu wurde die Probelösung in je 1 ml Methanol gelöst und mit 1 ml methanolischer Salzsäure (2 M) versetzt. Anschließend wurde matrixabhängig für zwei bis vier Stunden bei 70 °C hydrolysiert. Nach Abkühlen der Probelösung wurde mit 1 ml Wasser versetzt und drei Mal mit *n*-Hexan oder Ethylacetat (je 2 ml) extrahiert. Organische und wässrige Phase wurden anschließend unter Argon bzw. am SAVANT SpeedVac Vakuumpkonzentrator getrocknet und für die weitere Analytik der freigesetzten Sterole (GC-FID oder HPLC-UV) und Zucker (HPLC-FLD) verwendet (Kapitel 11.5, S. 133ff, Anhang).

### 6.3.1.4 Qualifizierungsmethoden

#### *GC-FID/MS*

Zur Analyse freier Sterole mittels GC-FID/MS wurden die Trocknungsrückstände der organischen Phase nach Hydrolyse der Proben in 50 µl Pyridin gelöst und mit 50 µl BSA + 5 % TMCS versetzt. Nach Homogenisierung der Lösung (Vortex) wurde für 15 min bei 70 °C im Trockenschrank inkubiert und anschließend ohne weitere Aufarbeitung mit GC-FID/MS vermessen. Die entsprechenden GC- und FID/MS-Parameter sind Kapitel 11.5.1 (S.133, Anhang) und Kapitel 11.5.2 (S.133, Anhang) zu entnehmen.

#### *HPLC-UV/DAD*

Zur Analyse freier und glycosidisch gebundener steroidaler Strukturen sowie der synthetisierten Standards wurden die getrockneten Probenrückstände je nach Löslichkeit in Methanol oder Chloroform-Methanol 2:1 (v/v) aufgenommen, gelöst, homogenisiert (Vortex, ggf. Ultraschallbad) und zentrifugiert. Anschließend wurden Aliquote mit Laufmittel B (Methanol + 0,1 % Ameisensäure) in einem geeigneten Konzentrationsbereich verdünnt, ein standardisiertes Volumen von 20 µl in die HPLC injiziert und mittels HPLC-Identifizierungsmethode (siehe Kapitel 0, S.134 und 11.5.4, S.134, Anhang) vermessen.

Zur Anreicherung spezieller SGs und glycosilierter Vitamin D-Strukturen wurden die Rückstände der jeweiligen MLCCC-Fraktionsbereiche in 600 µl Chloroform-Methanol 2:1 (v/v) gelöst. Anschließend wurden mehrfach 80 µl in die HPLC-DAD injiziert und mittels HPLC-Anreicherungsmethode (siehe Kapitel 11.5.5, S.134, Anhang) aufkonzentriert. Zum Sammeln der relevanten Fraktionen wurde ein Fraktionssammler (Ultrarac7000 LKB Fraction Collector) genutzt. Die bedeutenden Fraktionen wurden anschließend vereinigt und schonend getrocknet (Rotationsverdampfer < 36 °C).

#### *HPLC-FLD*

Nach Hydrolyse der glycosidisch gebundenen steroidalen Strukturen wurde die wässrige Phase der Hydrolyseansätze mittels SAVANT SpeedVac Vakuumpkonzentrator getrocknet. Zur Qualifizierung der einzelnen Monosaccharide wurden je 100 µl einer 0,1 mM Lösung des jeweiligen Standards getrocknet. Anschließend wurde der Trocknungsrückstand mit je 50 µl einer 0,2 mM 1-Naphtylamin-Lösung und einer 1 M Natriumcyanoborhydridlösung versetzt und anschließend für 24 h bei 40 °C inkubiert. Nach Abkühlen der derivatisierten Proben wurden in Abhängigkeit der Konzentration der Analyten 10-100 µl des Inkubationsansatzes entnommen und mit Laufmittel B (Methanol-Wasser 70:30 + 0,6 ml HFBA/l) auf 400 µl aufgefüllt. Zur Analyse wurden je 10 µl der verdünnten Proben injiziert und mittels HPLC-FLD-Identifizierungsmethode (siehe Kapitel 11.5.8, S.138, Anhang) vermessen.

#### *LC-MS/MS*

Zur Identifizierung neuartiger SGs wurden die Trocknungsrückstände der mittels analytischer HPLC (s.o. HPLC-DAD) angereicherten MLCCC-Fraktionsbereiche in je 300 µl Chloroform-Methanol 2:1 (v/v) aufgenommen, gelöst, homogenisiert (Vortex, ggf. Ultraschallbad) und zentrifugiert. Anschließend wurden 100 µl der klaren Lösung abgenommen, mit 100 µl Laufmittel B (Methanol + 0,1 % Ameisensäure + 0,1 mM NH<sub>4</sub>COOH) verdünnt und zur

Analyse 20 µl der verdünnten Proben injiziert und mittels LC-MS/MS-Identifizierungsmethode (Kapitel 11.5.6, S.135, Anhang) vermessen.

Zur Bestimmung freier D-Vitamer wurden die Probenrückstände mit PTAD-Lösung (2 mg/ml in Acetonitril) derivatisiert und anschließend mittels LC-MS/MS-Identifizierungsmethode für freie D-Vitamer (siehe Kapitel 11.5.7, S.137, Anhang) vermessen.

### 6.3.1.5 Quantifizierung

Die Quantifizierung der einzelnen Analyten erfolgte nach dem Standardadditionsverfahren. Zur Kalibrierung wurden die vereinigten Fraktionsbereiche der MLCCC in je 2 ml Chloroform-Methanol 2:1 (v/v) aufgenommen, gelöst, homogenisiert (Vortex, ggf. Ultraschallbad) und zentrifugiert. Zunächst wurden verschiedene Verdünnungen mittels LC-MS/MS-Identifizierungsmethode (siehe Anhang, Kapitel 11.5.6) vermessen um den Konzentrationsbereich der jeweiligen Lösung abzuschätzen. Anhand der ermittelten Peakflächen konnten geeignete Verdünnungen zur Quantifizierung hergestellt werden, welche mit etwa der 0,5-fachen, 1-fachen, 2-fachen und 3-fachen Menge an synthetisiertem Standard aufdotiert wurden. Tabelle 26 fasst beispielhaft die Dotierung für die Quantifizierung der SGs in den Extrakten der Auberginenschalen zusammen. Dabei wurden die jeweiligen Gehalte der Analyten in den Mischstandards (Sterol-Glcs und Sterol-Gals) sowie die Reinheit bei der Dotierung und der anschließenden Auswertung berücksichtigt. Die Quantifizierung erfolgte über Regressionsgeraden der Peakflächen zur korrigierten Konzentration des jeweiligen Analyten unter Berücksichtigung aller Verdünnungsschritte.

Tabelle 26: Dotierung der einzelnen Messlösungen von Extrakten der Auberginenschale

Fraktionsbereich der MLCCC-Anreicherung	identifizierter Analyt	Verdünnungsfaktor der Messlösung	Dotierung der Schalenextrakte mit Standardlösung in µg je ml Messlösung			
			0,5 fach	1 fach	2 fach	3 fach
11-20	Chol-Glc	400	0,025	0,050	0,100	0,150
	Camp-Glc (±)	400	0,250	0,500	1,000	1,500
	Stigma-Glc (±)	400	0,250	0,500	1,000	1,500
21-40	Chol-Glc (±)	4000	0,200	0,400	0,800	1,200
	Sito-Glc	25000-62500	0,025	0,050	0,100	0,150
	Stigma-Glc	5000-25000	0,040	0,080	0,160	0,240
	Camp-Glc	5000-25000	0,025	0,050	0,100	0,150
	Sito-Gal	80	0,200	0,400	0,800	1,200
	Stigma-Gal	40	0,050	0,100	0,200	0,400

± nicht in allen Messlösungen nachgewiesen

Durch die und physiologischen Unterschiede der Pflanzenproben und daher variierenden Matrix wurde die Dotierung bei allen Messlösungen einzeln angepasst, weshalb Tabelle 26 nur eine allgemeine Orientierung für die am häufigsten verwendete Dotierungsmenge mit der jeweiligen Standardlösung gibt.

## 6.4 Bestrahlungsexperimente der glycosilierten steroidalen Strukturen

Die Bestrahlungsexperimente erfolgten sowohl mit dem synthetischen 7-DHC-Glc in einer definierten methanolischen Lösung, als auch *in vivo* an verschiedenen Auberginenproben. Es wurden zwei verschiedene UV-Lampen unterschiedlicher Intensitäten verwendet.

### 6.4.1 Bestrahlung mittels CAMAG UV-Lampe 4 (8W)

Eine Lösung des synthetisierten 7-DHC-Glc (50 µg/ml) in Methanol wurde in einem CAMAG UV-Kabinet für 25 Stunden mit der darin integrierten CAMAG UV-Lampe (8 W) bei 254 nm in einem Abstand von etwa 10 cm bestrahlt. Zur Umsatzkontrolle wurde stündlich ein Aliquot von 200 µl zu direkter Analyse mittels HPLC-UV entnommen. Die Bestrahlung der pflanzlichen Proben erfolgte in demselben UV-Kabinet für unterschiedliche Zeiten unter regelmäßigem Wenden (etwa alle 15 Minuten) der Probe. Anschließend wurde nach der entwickelten Anreicherungs­methode (siehe Kapitel 4.3.2, S. 54) aufgearbeitet.

### 6.4.2 Bestrahlung mittels Narva UVS 125 Niederdruck Quecksilberdampf­lampe

Eine Lösung des synthetisierten 7-DHC-Glc (50 µg/ml) in Methanol wurde mit einer wassergekühlten Narva Niederdruck Quecksilberdampf­lampe für etwa 4 h bestrahlt. Dabei wurde der integrierte Reaktionsraum der Lampe für die Probenlösung genutzt. Zur Umsatzkontrolle wurde in definierten Zeitabständen ein Aliquot von etwa 200 µl zu direkter Analyse mittels HPLC-UV entnommen. Die Bestrahlung der pflanzlichen Proben erfolgte in einem Abstand von etwa 15-20 cm zur Lampe für 70-270 Minuten (1,1-4,5 h) unter regelmäßigem Wenden (etwa alle 15 Minuten) der Probe. Anschließend wurde nach der entwickelten Anreicherungs­methode (siehe Kapitel 4.3.2, S. 54) aufgearbeitet.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] Kovganko, N. V.; Kashkan, Z. Sterol glycosides and acylglycosides, *Chem. Nat. Compd.* **1999**, *35*, 479–497.
- [2] Benveniste, P. Sterol metabolism, *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists.* **2002**, *1*, e0004.
- [3] Gunstone, F. D.; Harwood, J. L.; Padley, F. B. *The Lipid Handbook, Second Edition*; Taylor & Francis, **1994**.
- [4] Nyström, L.; Schär, A.; Lampi, A.-M. Steryl glycosides and acylated steryl glycosides in plant foods reflect unique sterol patterns, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2012**, *114*, 656–669.
- [5] Heinz, E. Plant glycolipids. Structure, isolation and analysis, *Oily Press Lipid Library.* **1996**, *3*, 211–332.
- [6] Grille, S.; Zaslowski, A.; Thiele, S.; Plat, J.; Warnecke, D. The functions of steryl glycosides come to those who wait: Recent advances in plants, fungi, bacteria and animals, *Prog. Lipid Res.* **2010**, *49*, 262–288.
- [7] Ferrer, A.; Altabella, T.; Arró, M.; Boronat, A. Emerging roles for conjugated sterols in plants, *Prog. Lipid Res.* **2017**, *67*, 27–37.
- [8] Oppliger, S. R.; Münger, L. H.; Nyström, L. Rapid and highly accurate detection of steryl glycosides by Ultraperformance Liquid Chromatography-Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS), *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 9410–9419.
- [9] Münger, L. H.; Jutzi, S.; Lampi, A.-M.; Nyström, L. Comparison of enzymatic hydrolysis and acid hydrolysis of sterol glycosides from foods rich in  $\Delta^7$ -sterols, *Lipids.* **2015**, *50*, 735–748.
- [10] Nyström, L.; Moreau, R. A.; Lampi, A.-M.; Hicks, K. B.; Piironen, V. Enzymatic hydrolysis of steryl ferulates and steryl glycosides, *Eur Food Res Technol.* **2008**, *227*, 727–733.
- [11] Akiyama, H.; Nakajima, K.; Itoh, Y.; Sayano, T.; Ohashi, Y.; Yamaguchi, Y.; Greimel, P.; Hirabayashi, Y. Aglycon diversity of brain sterylglucosides: structure determination of cholesteryl- and sitosterylglucoside, *J. Lipid Res.* **2016**, *57*, 2061–2072.
- [12] Shabana, M. M.; Salama, M. M.; Ezzat, S. M.; Ismail L. R. *In vitro* and *in vivo* anticancer activity of the fruit peels of *Solanum melongena* L. against hepatocellular carcinoma, *J. Carcinog Mutagen.* **2013**, *04*.
- [13] Zimowski, J. TLC and GLC analysis of individual molecular species in natural mixtures of steryl glycosides isolated from eggplant, *Herba polonica.* **1996**, *42*, 269–272.
- [14] Rauwald, H.-W.; Sauter, M.; Schilcher, H. A  $24\beta$ -ethyl- $\Delta^7$ -steryl glucopyranoside from *Cucurbita pepo* seeds, *Phytochemistry.* **1985**, *24*, 2746–2748.
- [15] Strobl, M.  $\Delta^7$ -Sterole und  $\Delta^7$ -Sterolglykoside aus Samen von *Cucurbita pepo* L.: Isolierung und Strukturaufklärung, *Dissertation.* **2004**.
- [16] Phillips, K. M.; Ruggio, D. M.; Ashraf-Khorassani, M. Phytosterol composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 9436–9445.
- [17] Friedman, M. Chemistry and anticarcinogenic mechanisms of glycoalkaloids produced by eggplants, potatoes, and tomatoes, *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 3323–3337.
- [18] Madukwe, E. U.; Nwabunze, A. M.; Onyibalu, C. L. Bioavailability of selected phytochemicals in the extracts of fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis*), tomato (*Lycopersicum esculentum*) and eggplant (*Solanum melongena*), *Int. j. basic appl. sci. res.* **2013**, 251–257.
- [19] Chen, J. C.; Chiu, M. H.; Nie, R. L.; Cordell, G. A.; Qiu, S. X. Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities, *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22*, 386.
- [20] Cezary Paczkowski, Zdzislaw A. Wojciechowski Glucosylation and galactosylation of diosgenin and salasodine by soluble glycosyltransferase(s) from *solanum Melongena* leaves, *Phytochemistry.* **1994**, *1994*, 1429–1434.
- [21] Potocka, A.; Zimowski, J. Metabolism of conjugated sterols in eggplant. Part 2. Phospholipid.steryl glucoside acyltransferase, *Acta Biochim Pol.* **2008**, *55*, 135–140.
- [22] Kojima, M.; Ohnishi, M.; Ito, S.; Fujino, Y. Characterization of acylmono-, mono-, di-, tri- and tetraglycosylsterol and saponin in Adzuki bean (*Vigna angularis*) seeds, *Lipids.* **1989**, *24*, 849–853.
- [23] Ezzat, S.; Salama, M.; Mahrous, E.; Maes, L.; Pan, C.-H.; Abdel Sattar, E. Antiprotozoal activity of major constituents from the bioactive fraction of *Verbesina encelioides*, *Nat. Prod. Res.* **2017**, *31*, 676–680.

- [24] Hoang, N. H.; Hong, S.-Y.; Huong, N. L.; Park, J. W. Biochemical characterization of recombinant UDP-glucose: sterol 3-O-glycosyltransferase from *Micromonospora rhodorangea* ATCC 31603 and enzymatic biosynthesis of sterol-3-O- $\beta$ -glucosides, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *26*, 477–482.
- [25] Del Gobbo, L. C.; Falk, M. C.; Feldman, R.; Lewis, K.; Mozaffarian, D. Are phytosterols responsible for the Low-Density Lipoprotein-lowering effects of tree nuts?: A systematic review and meta-analysis, *J. Am. Coll. Cardiol.* **2015**, *65*, 2765–2767.
- [26] Klingberg, S.; Ellegard, L.; Johansson, I.; Hallmans, G.; Weinehall, L.; Andersson, H.; Winkvist, A. Inverse relation between dietary intake of naturally occurring plant sterols and serum cholesterol in northern Sweden, *Am J Clin Nutr.* **2008**, *87*, 993–1001.
- [27] Pegel, K. H. The importance of sitosterol and sitosterolin in human and animal nutrition, *S. Afr. J. Sci.* **1997**, *93*, 263.
- [28] Sonawane, P. D.; Pollier, J.; Panda, S.; Szymanski, J.; Massalha, H.; Yona, M.; Unger, T.; Malitsky, S.; Arendt, P.; Pauwels, L.; Almekias-Siegl, E.; Rogachev, I.; Meir, S.; Cárdenas, P. D.; Masri, A.; Petrikov, M.; Schaller, H.; Schaffer, A. A.; Kamble, A.; Giri, A. P.; Goossens, A.; Aharoni, A. Plant cholesterol biosynthetic pathway overlaps with phytosterol metabolism, *Nat. Plants.* **2016**, *3*, 16205.
- [29] Jäpelt, R. B.; Jakobsen, J. Vitamin D in plants. A review of occurrence, analysis, and biosynthesis, *Front. Plant Sci.* **2013**, *4*, 136.
- [30] Boland, R.; Skliar, M.; Curino, A.; Milanese, L. Vitamin D compounds in plants, *Plant Sci.* **2003**, *164*, 357–369.
- [31] Aburjai, T.; Al-Khalil, S.; Abuirjeie, M. Vitamin D<sub>3</sub> and its metabolites in tomato, potato, eggplant and zucchini leaves, *Phytochemistry.* **1998**, *49*, 2497–2499.
- [32] Skliar, M. I.; Boland, R. L.; Mourino, A.; Tojo, G. Isolation and identification of Vitamin D<sub>3</sub>, 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>, 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 1,24,25-Trihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in *Solanum malacoxylon* incubated with ruminal fluid, *J Steroid Biochem Mol Biol.* **1992**, *43*, 677–682.
- [33] Mello, J.R.B. Calcinosis—calcinogenic plants, *Toxicon.* **2003**, *41*, 1–12.
- [34] Morris, K. M. L.; Levack, V. M. Evidence for aqueous soluble vitamin D-like substances in the carcinogenic plant, *Trisetum flavescens*, *Life Sci.* **1982**, *30*, 1255–1262.
- [35] Zucker, H.; Rambeck, W. A. Vitamin D<sub>3</sub> und Vitamin-D<sub>3</sub>-metabolitartige Aktivität in *Trisetum flavescens*, *Zentralbl Veterinarmed A.* **1981**, *28*, 436–441.
- [36] Pailer, M.; Riedl, P. Sterine in Weidegräsern, *Monatsh. Chem. / Chemical Monthly.* **1978**, *109*, 1167–1176.
- [37] Wasserman, R. H. Active Vitamin D-Like Substances in *Solanum malacoxylon* and Other Calcinogenic Plants, *Nutr. Rev.* **1975**, *33*, 1–5.
- [38] Bachmann, H.; Offord-Cavin, E.; Phothirath, P.; Horcajada, M.-N.; Romeis, P.; Mathis, G. A. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-glycoside of herbal origin exhibits delayed release pharmacokinetics when compared to its synthetic counterpart, *J Steroid Biochem Mol Biol.* **2013**, *136*, 333–336.
- [39] Belitz, H. D.; Grosch, W.; Schieberle, P. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*; Springer Berlin Heidelberg, **2007**.
- [40] Fischer, P.D.M.; Glomb, P.D.M.A. *Moderne Lebensmittelchemie*; Behr's Verlag Hamburg, **2015**.
- [41] Valitova, J. N.; Sulkarnayeva, A. G.; Minibayeva, F. V. Plant sterols. Diversity, biosynthesis, and physiological functions, *Biochem.(Mosc.)* **2016**, *81*, 819–834.
- [42] Nes, W. D. Biosynthesis of cholesterol and other sterols, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6423–6451.
- [43] Moreau, R. A.; Whitaker, B. D.; Hicks, K. B. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods. Structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses, *Prog Lipid Res.* **2002**, *41*, 457–500.
- [44] Abe, I.; Rohmer, M.; Prestwich, G. D. Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 2189–2206.
- [45] Espenshade, P. J.; Hughes, A. L. Regulation of sterol synthesis in Eukaryotes, *Annu. Rev. Genet.* **2007**, *41*, 401–427.
- [46] Westover, E. J.; Covey, D. F. The enantiomer of cholesterol, *J Membr Biol.* **2004**, *202*, 61–72.
- [47] Voet, D.; Voet, J. G. *Biochemistry (second edition)*. John Wiley and Sons, New York. 1995, *Biochem. Educ.* **1995**, *23*, 104–105.

- [48] Corrêa, R. C.G.; Peralta, R. M.; Bracht, A.; Ferreira, I. C.F.R. The emerging use of mycosterols in food industry along with the current trend of extended use of bioactive phytosterols, *Trends Food Sci Technol.* **2017**, *67*, 19–35.
- [49] Alcazar-Fuoli, L.; Mellado, E.; Garcia-Effron, G.; Lopez, J. F.; Grimalt, J. O.; Cuenca-Estrella, J. M.; Rodriguez-Tudela, J. L. Ergosterol biosynthesis pathway in *Aspergillus fumigatus*, *Steroids.* **2008**, *73*, 339–347.
- [50] Gachumi, G.; El-Aneed, A. Mass spectrometric approaches for the analysis of phytosterols in biological samples, *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 10141–10156.
- [51] Prinetti, S. S. a. A. Membrane domains and the “Lipid raft” concept, *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20*, 4–21.
- [52] Guo, D. A.; Venkatramesh, M.; Nes, W. D. Developmental regulation of sterol biosynthesis in *Zea mays*, *Lipids.* **1995**, *30*, 203–219.
- [53] Piironen, V.; Lindsay, D. G.; Miettinen, T. A.; Toivo, J.; Lampi, A.-M. Plant sterols. Biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition, *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 939–966.
- [54] Han, P.-p.; Zhou, J.; Yuan, Y.-j. Analysis of phospholipids, sterols, and fatty acids in *Taxus chinensis* var. *mairei* cells in response to shear stress, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2009**, *54*, 105–112.
- [55] Wang, T.; Hicks, K. B.; Moreau, R. Antioxidant activity of phytosterols, oryzanol, and other phytosterol conjugates, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2002**, *79*, 1201–1206.
- [56] Wegener, A.; Gimbel, W.; Werner, T.; Hani, J.; Ernst, D.; Sandermann, H., JR. Molecular cloning of ozone-inducible protein from *Pinus sylvestris* L. with high sequence similarity to vertebrate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-synthase, *Biochim. Biophys. Acta.* **1997**, *1350*, 247–252.
- [57] Kulie, T.; Groff, A.; Redmer, J.; Hounshell, J.; Schragar, S. Vitamin D. An evidence-based review, *J. Am. Board Fam. Med.* **2009**, *22*, 698–706.
- [58] Holick, M. F.; MacLaughlin, J. A.; Clark, M. B.; Holick, S. A.; Potts, J. T., JR; Anderson, R. R.; Blank, I. H.; Parrish, J. A.; Elias, P. Photosynthesis of previtamin D<sub>3</sub> in human skin and the physiologic consequences, *Science (New York, N.Y.)*. **1980**, *210*, 203–205.
- [59] Streeten, E. A.; Levine, M. A. *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics (Sixth Edition). Chapter 98 - Vitamin D Metabolism or Action*; Academic Press: Oxford, **2013**.
- [60] Zittermann, A. The estimated benefits of vitamin D for Germany, *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**, *54*, 1164–1171.
- [61] Tian, X. Q.; Chen, T. C.; Matsuoka, L. Y.; Wortsman, J.; Holick, M. F. Kinetic and thermodynamic studies of the conversion of previtamin D<sub>3</sub> to vitamin D<sub>3</sub> in human skin, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 14888–14892.
- [62] Fraser, W. D.; Milan, A. M. Vitamin D assays. past and present debates, difficulties, and developments, *Calcif. Tissue Int.* **2013**, *92*, 118–127.
- [63] Fuse, S.; Tanabe, N.; Yoshida, M.; Yoshida, H.; Doi, T.; Takahashi, T. Continuous-flow synthesis of vitamin D<sub>3</sub>, *Chem. Commun. (Cambridge, U.K.)*. **2010**, *46*, 8722–8724.
- [64] Zhu, G.-D.; Okamura, W. H. Synthesis of Vitamin D (Calciferol), *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 1877–1952.
- [65] Wacker, M.; Holick, M. F. Sunlight and Vitamin D. A global perspective for health, *Dermatoendocrinol.* **2013**, *5*, 51–108.
- [66] Souberbielle, J.-C.; Cavalier, E. Supplementation, optimal status, and analytical determination of vitamin D. Where are we standing in 2012?, *Anticancer Agents Med. Chem.* **2013**, *13*, 36–44.
- [67] Suda, T. Vitamin D and bone. How does vitamin D regulate bone formation and resorption?, *Proc. Jpn. Acad., B.* **2004**, *80*, 407–421.
- [68] Greissing; C. *Bestimmung der Vitamin D-Aktivität von calcinogenen Pflanzen im Wachteleischalentest*. Dissertation. Universität München. **2004**.
- [69] Brown, A. J.; Dusso, A.; Slatopolsky, E. Vitamin D, *Am. J. Physiol.* **1999**, *277*, F157-75.
- [70] Heaney, R. P. Vitamin D in health and disease, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2008**, *3*, 1535–1541.
- [71] Jäpelt, R. B.; Silvestro, D.; Smedsgaard, J.; Jensen, P. E.; Jakobsen, J. LC–MS/MS with atmospheric pressure chemical ionisation to study the effect of UV treatment on the formation of vitamin D<sub>3</sub> and sterols in plants, *Food Chem.* **2011**, *129*, 217–225.
- [72] Mattila, P.; Lampi, A.-M.; Ronkainen, R.; Toivo, J.; Piironen, V. Sterol and vitamin D<sub>2</sub> contents in some wild and cultivated mushrooms, *Food Chem.* **2002**, *76*, 293–298.

- [73] Waldmann, A.; Koschizke, J. W.; Leitzmann, C.; Hahn, A. Dietary intakes and lifestyle factors of a vegan population in Germany. Results from the German vegan study, *Eur. J. Clin. Nutr.* **2003**, *57*, 947 EP.
- [74] Baur, A. C.; Brandsch, C.; König, B.; Hirche, F.; Stangl, G. I. Plant oils as potential sources of vitamin D, *Front. Nutr.* **2016**, *3*, 29.
- [75] Aburjai, T.; Bernasconi, S.; Manzocchi, L.; Pelizzoni, F. Isolation of 7-dehydrocholesterol from cell cultures of *Solanum malacoxylon*, *Phytochemistry*. **1996**, *43*, 773–776.
- [76] Weihrauch, J. L.; Gardner, J. M. Sterol content of foods of plant origin, *J. Am. Diet. Assoc.* **1978**, *73*, 39–47.
- [77] Wang, T.; Bengtsson, G.; Karnefelt, I.; Bjorn, L. O. Provitamins and vitamins D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> in *Cladina* spp. over a latitudinal gradient. Possible correlation with UV levels, *J. Photochem. Photobiol. B.* **2001**, *62*, 118–122.
- [78] Prema, T. P.; Raghuramulu, N. Vitamin D<sub>3</sub> and its metabolites in the tomato plant, *Phytochemistry*. **1996**, *42*, 617–620.
- [79] P. Prema, T.; Raghuramulu, N. Free vitamin D<sub>3</sub> metabolites in *Cestrum diurnum* leaves, *Phytochemistry*. **1994**, *37*, 677–681.
- [80] Horst, R. L.; Reinhardt, T. A.; Russell, J. R.; Napoli, J. L. The isolation and identification of vitamin D<sub>2</sub> and vitamin D<sub>3</sub> from *Medicago sativa* (alfalfa plant), *Archives of biochemistry and biophysics*. **1984**, *231*, 67–71.
- [81] A Rambeck, W.; Weiser, H.; Zucker, H. Biological activity of glycosides of vitamin D<sub>3</sub> and 1-alpha-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>, *Int J Vitam Nutr Res.* **1984**, *54*, 25–34.
- [82] Black, L. J.; Lucas, R. M.; Sherriff, J. L.; Björn, L. O.; Bornman, J. F. In pursuit of vitamin D in plants, *Nutrients*. **2017**, *9*, 136.
- [83] Zucker, H.; Stark, H.; Rambeck, W. A. Light-dependent synthesis of cholecalciferol in a green plant, *Nature*. **1980**, *283*, 68–69.
- [84] Mello, J. R.; Habermehl G. The effect of ultraviolet rays and climatic conditions (solar radiation and temperature) on the calcinogenic activity of *Trisetum flavescens* and *Nierembergia veitchii*, *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* **1991**, *98*, 462–465.
- [85] Seeburg, N.; Glomb, M. *Entwicklung, Validierung und Anwendung einer Methode zur Vitamin D-Analytik in Lebensmitteln mittels LC-MS/MS*. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. **2014**.
- [86] Hughes, M. R.; McCain, T. A.; Chang, S. Y. A. I.; Haussler, M. R.; Villareale, M.; Wassermann, R. H. Presence of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-glycoside in the calcinogenic plant *Cestrum diurnum*, *Nature*. **1977**, *268*, 347 EP -.
- [87] Liu, S.; Cui, M.; Liu, Z.; Song, F.; Mo, W. Structural analysis of saponins from medicinal herbs using electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom. Chem.* **2004**, *15*, 133–141.
- [88] Kintia, P. K.; Shvets, S. A. Melongosides N, O and P. Steroidal saponins from seeds of *Solanum melongena*, *Phytochemistry*. **1985**, *24*, 1567–1569.
- [89] Li, W.; Koike, K.; Tatsuzaki, M.; Koide, A.; Nikaido, T. Cucurbitosides F-M, acylated phenolic glycosides from the seeds of *Cucurbita pepo*, *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1754–1757.
- [90] Zimowski, J. Specificity and some other properties of cytosolic and membranous UDP-Glc. 3 $\beta$ -Hydroxysteroid glucosyltransferases from *Solanum tuberosum* leaves, *Phytochemistry*. **1992**, *31*, 2977–2981.
- [91] Vioque, J.; Pastor, J.; Vioque, E. Sterol composition in *Coincya* (Brassicaceae), *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1995**, *72*, 493–495.
- [92] Ding, Y.-L.; Deng, X.-M.; Cai, H.; Wang, F.-S.; Wang, X.-L.; Zhang, Y.-M.; Yang, J.-S. Studies on the chemical constituents of *Cucurbita pepo* cv dayangua, *Chin. Med. J.* **2002**, *37*, 659–661.
- [93] Potocka, A.; Zimowski, J. Metabolism of conjugated sterols in eggplant. Part 1. UDP-glucose. Sterol glucosyltransferase, *Acta Biochim Pol.* **2008**, *55*, 127–134.
- [94] Singh, G.; Dhar, Y. V.; Asif, M. H.; Misra, P. Exploring the functional significance of sterol glucosyltransferase enzymes, *Prog. Lipid Res.* **2018**, *69*, 1–10.

- [95] Guohong, M.; Venkata, S. P. C.; Jacob, E. V.; Oliver, Y. Enzymatic synthesis and structural characterization of Rebaudioside D<sub>3</sub>, a minor steviol glycoside of *Stevia rebaudiana* Bertoni, *Am. J. Plant Sci.* **2017**, *8*, 441–450.
- [96] Ullmann, P.; Ury, A.; Rimmele, P.; Benveniste, P.; Bouvier-Navé, P. UDP-glucose sterol  $\beta$ -D-glucosyltransferase, a plasma membrane-bound enzyme of plants. Enzymatic properties and lipid dependence, *Biochimie.* **1993**, *75*, 713–723.
- [97] Ullmann, P.; Rimmele, D.; Benveniste, P.; Bouvier-Navé, P. Phospholipid-dependence of plant UDP-glucose-sterol- $\beta$ -D-glucosyltransferase. II. Acetone-mediated delipidation and kinetic studies, *Plant Sci. Lett.* **1984**, *36*, 29–36.
- [98] Hillig, I.; Leipelt, M.; Ott, C.; Zähringer, U.; Warnecke, D.; Heinz, E. Formation of glucosylceramide and sterol glucoside by a UDP-glucose-dependent glucosylceramide synthase from cotton expressed in *Pichia pastoris*, *FEBS Lett.* **2003**, *553*, 365–369.
- [99] Mackenzie, P. I.; Bock, K. W.; Burchell, B.; Guillemette, C.; Ikushiro, S.-i.; Iyanagi, T.; Miners, J. O.; Owens, I. S.; Nebert, D. W. Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily, *Pharmacogenet. Genomics.* **2005**, *15*, 677–685.
- [100] Singh, G.; Tiwari, M.; Singh, S. P.; Singh, R.; Singh, S.; Shirke, P. A.; Trivedi, P. K.; Misra, P. Sterol glycosyltransferases required for adaptation of *Withania somnifera* at high temperature, *Physiol. Plant.* **2017**, *160*, 297–311.
- [101] Abraham, W.; Wertz, P. W.; Burken, R. R.; Downing, D. T. Glucosylsterol and acylglucosylsterol of snake epidermis. Structure determination, *J. Lipid Res.* **1987**, *28*, 446–449.
- [102] Stefanska, A. Detoxification and compartmentation of xenobiotics in plant cells, *Cosmos.* **2000**, *49*, 149–159.
- [103] Rambeck, W. A.; Zucker, H. Synergistic effects of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on duodenal CaBP in rachitic chicks and on eggshell weight in Japanese quails, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1985**, *126*, 799–804.
- [104] R. Haussler, M.; H. Wasserman, R.; A. McCain, T.; Peterlik, M.; M. Bursac, K.; R. Hughes, M. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-glycoside. Identification of a calcinogenic principle of *solanum malacoxylon*, *Life Sci.* **1976**, *18*.
- [105] Zimmerman, D. R.; Koszewski, N. J.; Hoy, D. A.; Goff, J. P.; Horst, R. L. Targeted delivery of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> to colon tissue and identification of a major 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> glycoside from *Solanum glaucophyllum* plant leaves, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2015**, *148*, 318–325.
- [106] Prema, T. P.; Raghuramulu, N. Vitamin D-like activity in *Cestrum diurnum* grown in Hyderabad, India, *J. Sci. Food Agric.* **1993**, *62*, 21–27.
- [107] Mello, J. R.B.; Habermehl, G. Kalzinogene Pflanzen und der Inkubationseffekt durch Pansensaft, *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* **1992**, *99*, 353–392.
- [108] Vidal, M. C.; Lescano, W.; Avdolov, R.; Puche, R. C. Partial structure elucidation of the carbohydrate moiety of 1,25-dihydroxycholecalciferol glycoside isolated from *Solanum glaucophyllum* leaves, *Turrialba.* **1985**, *35*, 65–70.
- [109] Jensen, P. H.; Harder, B. J.; Strobel, B. W.; Svensmark, B.; Hansen, H. C. B. Extraction and determination of the potato glycoalkaloid  $\alpha$ -solanine in soil, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2007**, *87*, 813–824.
- [110] Sucha, L.; Tomsik, P. The steroidal glycoalkaloids from *Solanaceae*. Toxic Effect, antitumour activity and mechanism of action, *Planta Med.* **2016**, *82*, 379–387.
- [111] W. A. Rambeck, H. Weiser, and H. Zucker A Vitamin D<sub>3</sub> steroid hormone in the calcinogenic grass *Trisetum flavescens*, *Z. Naturforsch. C.* **1987**, 430–434.
- [112] Wasserman, R. H.; Corradino, R. A.; Krook, L. P. *Cestrum diurnum*. A domestic plant with 1,25-dihydroxycholecalciferol-like activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, *62*, 85–91.
- [113] Sarker, S. D.; Savchenko, T.; Šik, V.; Rees, H. H.; Dinan, L. 20-Hydroxyecdysone and its glucosides from *Trisetum flavescens*, *Biochem. Syst. Ecol.* **1998**, *26*, 135–137.
- [114] Al Sinani, S.S.S.; Eltayeb, E. A. The steroidal glycoalkaloids solamargine and solasonine in *Solanum* plants, *S. Afr. J. Bot.* **2017**, *112*, 253–269.
- [115] Maurya, A.; Manika, N.; Verma, R. K.; Singh, S. C.; Srivastava, S. K. Simple and reliable methods for the determination of three steroidal glycosides in the eight species of *Solanum* by reversed-phase HPLC coupled with diode array detection, *Phytochem. Anal.* **2013**, *24*, 87–92.

- [116] Chiang, H.-C.; Chen, Y.-Y. Xanthine Oxidase Inhibitors from the Roots of Eggplant (*Solanum Melongena* L.), *J. Enzym Inhib.* **2008**, *7*, 225–235.
- [117] Duperon, R.; Thiersault, M.; Duperon, P. High level of glycosylated sterols in species of *solanum* and sterol changes during the development of the tomato, *Phytochemistry.* **1984**, *23*, 743–746.
- [118] Zhang, Y.; Hu, Z.; Chu, G.; Huang, C.; Tian, S.; Zhao, Z.; Chen, G. Anthocyanin accumulation and molecular analysis of anthocyanin biosynthesis-associated genes in eggplant (*Solanum melongena* L.), *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 2906–2912.
- [119] Azuma, K.; Ohyama, A.; Ippoushi, K.; Ichianagi, T.; Takeuchi, A.; Saito, T.; Fukuoka, H. Structures and antioxidant activity of anthocyanins in many accessions of eggplant and its related species, *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 10154–10159.
- [120] Jing, P.; Qian, B.; Zhao, S.; Qi, X.; Ye, L.; Mónica Giusti, M.; Wang, X. Effect of glycosylation patterns of Chinese eggplant anthocyanins and other derivatives on antioxidant effectiveness in human colon cell lines, *Food Chem.* **2015**, *172*, 183–189.
- [121] Abidi, S.L. Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils, *J. Chrom. A.* **2001**, *935*, 173–201.
- [122] Peterlik, M.; Bursac, K.; Haussler, M. R.; Hughes, M. R.; Wasserman, R. H. Further evidence for the 1,25-dihydroxyvitamin D-like activity of *Solanum malacoxylon*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1976**, *70*, 797–804.
- [123] Dutta, P. C. *Phytosterols as functional food components and nutraceuticals*; Marcel Dekker Inc.: New York, **2004**.
- [124] Yang, E.-J. The chemical constituents of the stem barks of *Fraxinus rhynchophylla*, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **2007**, *50*, 348–351.
- [125] Breinhölder, P.; Mosca, L.; Lindner, W. Concept of sequential analysis of free and conjugated phytosterols in different plant matrices, *J. Chromatogr. B.* **2002**, *777*, 67–82.
- [126] Phillips, K. M.; Ruggio, D. M.; Ashraf-Khorassani Analysis of steryl glucosides in foods and dietary supplements by solid-phase extraction and GC, *J Food Lipids.* **2005**, *12*, 124–140.
- [127] Wewer, V.; Dombrink, I.; Vom Dorp, K.; Dormann, P. Quantification of sterol lipids in plants by quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *J. Lipid Res.* **2011**, *52*, 1039–1054.
- [128] Sugawara, T.; Miyazawa, T. Separation and determination of glycolipids from edible plant sources by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering detection, *Lipids.* **1999**, *34*, 1231–1237.
- [129] Takakuwa, N.; Saito, K.; Ohnishi, M.; Oda, Y. Determination of glucosylceramide contents in crop tissues and by-products from their processing, *Bioresour. Technol.* **2005**, *96*, 1089–1092.
- [130] Ito, Y.; Conway, W. D. Experimental observations of the hydrodynamic behavior of solvent systems in high-speed counter-current chromatography, *J. Chrom. A.* **1984**, *301*, 405–414.
- [131] Ito, Y. Counter-current motion in counter-current chromatography, *J. Chrom. A.* **2014**, *1372*, 128–132.
- [132] Tanimura, T.; Pisano, J. J.; Ito, Y.; Bowman, R. L. Droplet Countercurrent Chromatography, *Science.* **1970**, *169*, 54–56.
- [133] Oka, F.; Oka, H.; Ito, Y. Systematic search for suitable two-phase solvent systems for high-speed counter-current chromatography, *J. Chrom. A.* **1991**, *538*, 99–108.
- [134] Berthod, A.; Maryutina, T.; Spivakov, B.; Shpigun, O.; Sutherland, I. A. Countercurrent chromatography in analytical chemistry (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.* **2009**, *81*, 1311.
- [135] Ito, Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography, *J. Chrom. A.* **2005**, *1065*, 145–168.
- [136] Marston, A.; Hostettmann, K. Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis, *J. Chrom. A.* **2006**, *1112*, 181–194.
- [137] Sethi, N.; Anand, A.; Sharma, A.; Chandrul, K.; Jain, G.; Srinivasa, K. High speed counter current chromatography. A support-free LC technique, *J. Pharm. Bioallied Sci.* **2009**, *1*, 8–15.
- [138] Palta, J. P.; Whitaker, B. D.; Weiss, L. S. Plasma membrane lipids associated with genetic variability in freezing tolerance and cold acclimation of *Solanum* species, *Plant Physiol.* **1993**, *103*, 793–803.
- [139] Kojima, H.; Sato, N.; Hatano, A.; Ogura, H. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*, *Phytochemistry.* **1990**, *29*, 2351–2355.
- [140] Akhtar, N.; Ali, M.; Alam, M. S. New steroidal glycosides from the stem bark of *Mimusops elengi*, *Chem. Nat. Compd.* **2010**, *46*, 549–553.

- [141] Dinda, B.; Majumder, S.; Arima, S.; Sato, N.; Harigaya, Y. Iridoid glucoside and sterol galactoside from *Mussaenda macrophylla*, *J Nat Med.* **2008**, *62*, 447–451.
- [142] Patel, M. S.; Peal, W. J. Acid-catalysed dehydration of 3-hydroxysteroids—II. The influence of solvents on the products of the reaction between hydrogen chloride and 3 $\beta$ -hydroxy- $\Delta^5$ -steroids, *Tetrahedron.* **1964**, *20*, 2499–2510.
- [143] Rudzińska, M.; Przybylski, R.; Wąsowicz, E. Degradation of phytosterols during storage of enriched margarines, *Food Chem.* **2014**, *142*, 294–298.
- [144] Shimada, K.; Mitamura, K.; Saito, K.; Ohtake, Y.; Nakatani, I. Enzymatic hydrolysis of the conjugate of vitamin D and related compounds, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1997**, *15*, 1207–1214.
- [145] Nyström, L.; Lampi, A.-M.; Rita, H.; Aura, A.-M.; Oksman-Caldentey, K.-M.; Piironen, V. Effects of processing on availability of total plant sterols, steryl ferulates and steryl glycosides from wheat and rye bran, *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 9059–9065.
- [146] Kesselmeier, J.; Eichenberger, W.; Urban, B. High performance liquid chromatography of molecular species from free sterols and steryl glycosides isolated from oat leaves and seeds, *Plant Cell Physiol.* **1985**, *26*, 463–471.
- [147] Moreau, R. A.; Hicks, K. B. The in vitro hydrolysis of phytosterol conjugates in food matrices by mammalian digestive enzymes, *Lipids.* **2004**, *39*, 769–776.
- [148] Kalinowska, M.; Wojciechowski, Z. A. Purification and some properties of steryl- $\beta$ -D-glucoside hydrolase from *Sinapis alba* seedlings, *Phytochemistry.* **1978**, *17*, 1533–1537.
- [149] Rozenberg, R.; Ruibal-Mendieta, N. L.; Petitjean, G.; Cani, P.; Delacroix, D. L.; Delzenne, N. M.; Meurens, M.; Quetin-Leclercq, J.; Habib-Jiwan, J.-L. Phytosterol analysis and characterization in spelt (*Triticum aestivum* ssp. *spelta* L.) and wheat (*T. aestivum* L.) lipids by LC/APCI-MS, *J Cereal Sci.* **2003**, *38*, 189–197.
- [150] Pieber, B.; Schober, S.; Goebel, C.; Mittelbach, M. Novel sensitive determination of steryl glycosides in biodiesel by gas chromatography-mass spectroscopy, *J. Chrom. A.* **2010**, *1217*, 6555–6561.
- [151] Schrick, K.; Shiva, S.; Arpin, J. C.; Delimont, N.; Isaac, G.; Tamura, P.; Welti, R. Steryl glucoside and acyl steryl glucoside analysis of *Arabidopsis* seeds by electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Lipids.* **2012**, *47*, 185–193.
- [152] Ohnishi, M. Mono- and triglycosylsterols from the leafy stem of rice, *Phytochemistry.* **1981**, *20*, 1357–1358.
- [153] Ali, Z.; Smillie, T. J.; Khan, I. A. Cholestane steroid glycosides from the rhizomes of *Dioscorea villosa* (wild yam), *Carbohydr Res.* **2013**, *370*, 86–91.
- [154] Rakete, S.; Glomb, M. A. A novel approach for the quantitation of carbohydrates in mash, wort, and beer with RP-HPLC using 1-Naphthylamine for precolumn derivatization, *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 3828–3833.
- [155] Kiribuchi, T.; Yasumatsu, N.; Funahashi, S. Synthesis of 6-O-palmitoyl- $\beta$ -D-glucosyl  $\beta$ -sitosterol, *Agr. Biol. Chem.* **1967**, *31*, 1244–1247.
- [156] Ahmed, W.; Ahmad, Z.; Malik, A. Stigmasteryl galactoside from *Rhynchosia minima*, *Phytochemistry.* **1992**, *31*, 4038–4039.
- [157] Atta-Ur-Rehman; Begum, S.; Saied, S.; Choudhary, M.; Akhtar, F.A steroidal glycoside from *Clerodendron inerme*, *Phytochemistry.* **1997**, *45*, 1721–1722.
- [158] Ohnishi, M.; Fujino, Y. Novel glycolipids; cellobiosylsterol and cellotriosylsterol in rice bran, *Agric. Biol. Chem.* **1978**, *42*, 2423–2425.
- [159] Dinda, B.; Debnath, S.; Majumder, S.; Sato, N.; Harigaya, Y. New iridoid glucoside from *Wendlandia tinctoria* roots, *Chin. Chem. Lett.* **2011**, *22*, 1233–1236.
- [160] Fürst, A.; Labler, L.; Meier, W. Synthese von  $\beta$ -D-Glucopyranosiden einiger hydroxylierter Vitamin D-Verbindungen, *Helv. Chim. Acta.* **1983**, *66*, 2093–2102.
- [161] Davis, B. G.; Lloyd, R. C.; Jones, J. B. Controlled site-selective glycosylation of proteins by a combined site-directed mutagenesis and chemical modification approach, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9614–9615.
- [162] Schönherr, M. Glucose- und Galactose-Oximether in der enantioselektiven Katalyse, *Dissertation.* **2002**, *Universität Regensburg.*
- [163] Goggin, K. D.; Hammen, P. D.; Knutson, K. L.; Lambert, J. F.; Walinsky, S. W.; Watson, H. A. Commercial synthesis of alpha-D-cellobiosyl bromide heptaacetate, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1994**, *60*, 253–256.

- [164] Kim, M.-J.; Cho, Y.-S.; Park, S.-H.; Huh, Y.-D. Facile synthesis and fine morphological tuning of Ag<sub>2</sub>O, *Cryst. Growth Des.* **2012**, *12*, 4180–4185.
- [165] Wulff, G.; Röhle, G.; Schmidt, U. Untersuchungen zur Glykosidsynthese, V. Reaktionsprodukte und Stereospezifität der Glucosylierung in Gegenwart unlöslicher Silbersalze in Diäthyläther, *Chem. Ber.* **1972**, *105*, 1111–1121.
- [166] Xiong, Q.; Wilson, W. K.; Pang, J. The Liebermann–Burchard reaction. sulfonation, desaturation, and rearrangement of cholesterol in acid, *Lipids.* **2007**, *42*, 87–96.
- [167] Mai, F.; Glomb, M. A. Isolation of phenolic compounds from iceberg lettuce and impact on enzymatic browning, *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 2868–2874.
- [168] Phillips, K. M.; Ruggio, D. M.; Bailey, J. A. Precise quantitative determination of phytosterols, stanols, and cholesterol metabolites in human serum by capillary gas-liquid chromatography, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1999**, *732*, 17–29.
- [169] Marco Aurelio Ziemann dos Santos, Miguel Roehrs, Claudio Martins Pereira de Pereira, Rogério Antonio Freitag and Andre Valle de Bairros Analysis of phytosterols in plants and derived products by gas chromatography – A short critical review, *Austin Chromatogr.* **2014**, *1*, 2379–7975.
- [170] Münger, L. H.; Nyström, L. Enzymatic hydrolysis of steryl glycosides for their analysis in foods, *Food Chem.* **2014**, *163*, 202–211.
- [171] Roger A. Laine/Alan D. Elbein Steryl glucosides in *Phaseolus aureus*. Use of gas-liquid chromatography and mass spectrometry for structural identification, *Biochem.* **1971**, *10*, 2547–2553.
- [172] Dr. Stavros Kromidas, Ed. *Handbuch Validierung in der Analytik*; WILEY-VCH Verlag: Weinheim, **2009**.
- [173] Haussler, M. R.; Hughes, M. R.; McCain, T. A.; Zerwekh, J. E.; Brumbaugh, P. F.; Jubiz, W.; Wasserman, R. H. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. Mode of action in intestine and parathyroid glands, assay in humans and isolation of its glycoside from *Solanum malacoxylon*, *Calcif. Tissue Res.* **1977**, *22*, 1–18.
- [174] Holick, M. F. Vitamin D Deficiency, *N. Engl. J. Med.* **2007**, *357*, 266–281.
- [175] Rambeck, W.; Oesterhelt, W.; Vecchi, M.; Zucker, H. Occurrence of cholecalciferol in the calcinogenic plant *trisetum flavescens*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1979**, *87*, 743–749.
- [176] Di Suardi, M. D. C. O. e. I.)L.; Bernasconi, S.; Pelizzoni, F.; Racchi, M. L. *In vitro* cultures of *Solanum malacoxylon* Sendt.: Nutritional requirements and sterol production, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* **1994**, *36*, 9–14.
- [177] Milner, S. E.; Brunton, N. P.; Jones, P. W.; O’ Brien, N. M.; Collins, S. G.; Maguire, A. R. Bioactivities of Glycoalkaloids and Their Aglycones from *Solanum* Species, *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 3454–3484.
- [178] Paczkowski, C.; Kalinowska, M.; Wojciechowski, Z. A. UDP-glucose. Solasodine glucosyltransferase from eggplant (*Solanum melongena* L.) leaves: partial purification and characterization, *Acta Biochim. Pol.* **1997**, *44*, 43–53.
- [179] Prabhu, A. V.; Luu, W.; Sharpe, L. J.; Brown, A. J. Cholesterol-mediated degradation of 7-Dehydrocholesterol reductase switches the balance from cholesterol to Vitamin D synthesis, *J Biol. Chem.* **2016**, *291*, 8363–8373.
- [180] A Connors, K. *Chemical stability of pharmaceuticals a handbook for pharmacists*; Wiley-Interscience & Sons Inc: Inglés, **1979**.
- [181] K. Dhiman; A. Gupta; D.K. Sharma; N.S. Gill and A. Goyal A review on the medicinally important plants of the family *Cucurbitaceae*, *Asia J. Clin. Nutr.* **2012**, *4*, 14–26.

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Grundstruktur des Sterans (links) und des 5 $\alpha$ -Gonans (rechts).....	3
Abbildung 2: Übersicht über die wichtigsten $\Delta^5$ -Sterole in Tieren (Zoosterole), Pflanzen (Phyosterole) und Pilzen (Mycosterole).....	4
Abbildung 3: Vereinfachtes Biosyntheschema von Sterolen in Pflanzen, Tieren und Pilzen. Die katalysierenden Enzyme AACT, Acetyl-CoA C-Acetyltransferase: HMGS, 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Synthase: HMG-CoA, 3-Hydroxy-3-Methylglutarat: HMGR, HMG-CoA-Reduktase: MVA, Mevalonat: MVK, Mevalonat-Kinase: IPP, Isopentenylpyrophosphat: DMAPP, Dimethylallylpyrophosphat: FPP, Farnesylpyrophosphat: SQS, Squalen-Synthase: SQE, Squalenepoxidase: LAS, Lanosterol-Synthase und CAS, Cycloartenol-Synthase der Einzelreaktionen sind in blau dargestellt. Mehrstufige Reaktionen sind mit gestrichelten Pfeilen dargestellt.....	5
Abbildung 4: Struktur der Provitamine des 7-Dehydrocholesterols (links) und Ergosterols (rechts).....	8
Abbildung 5: UV-Licht induzierte Umwandlung des 7-Dehydrocholesterols in Vitamin D <sub>3</sub> (links) <sup>40</sup> , sowie des Ergosterols in Vitamin D <sub>2</sub> (rechts) <sup>29</sup> .....	8
Abbildung 6: Metabolismus und Synthese des Vitamin D <sub>3</sub> .....	10
Abbildung 7: Strukturen der bedeutendsten SGs in Pflanzen .....	13
Abbildung 8: Allgemeine Reaktionsgleichung der SGT, UGT und CesA1 katalysierten Glycosilierung von Sterolen <sup>96</sup> .....	15
Abbildung 9: Syntheseweg von Sterylglycosiden in Pflanzen; Die katalysierenden Enzyme sind in blau dargestellt; GCS: Glucosylceramid-Synthase; SGT: Sterol-Glucosyltransferase; SGH: Sterol Glucosyl Hydrolase.....	16
Abbildung 10: Übersicht der wichtigsten Glycoalkaloide in <i>Solanaceae</i> .....	20
Abbildung 11: Überblick über die Struktur aller synthetisierten steroidalen Glycoside.....	34
Abbildung 12: Bromierungsreaktion zur Synthese der acetylierten Zuckerstrukturen am Beispiel der $\alpha$ -Acetobromglucose .....	36
Abbildung 13: Syntheschema nach Koenigs-Knorr am Beispiel des $\beta$ -Sitosterol- $\beta$ -D-Glucopyranosid .....	37
Abbildung 14: Reaktion nach Liebermann Burchard zum Nachweis steroidaler Strukturen .....	37
Abbildung 15: Syntheschema von D <sub>3</sub> -Glc mittels UV-Bestrahlung .....	40
Abbildung 16: HPLC-UV-Chromatogramm (bei 254 nm) nach 90 minütiger UV-Bestrahlung des ac. 7-DHC-Glc in methanolischer Lösung .....	41
Abbildung 17: Zeit-Umsatz-Diagramm des ac. 7-DHC-Glc (▲) zum ac. D <sub>3</sub> -Glc (●) bei Bestrahlung mittels 125 W Niederdruck Quecksilberdampf Lampe .....	42
Abbildung 18: Zeit-Umsatz-Diagramm bei Bestrahlung des 7-DHC-Glc (▲) mittels 8 W CAMAG UV-Lampe zum D <sub>3</sub> -Glc (●).....	43

- Abbildung 19: GC-FID Chromatogramm nach zweistündiger saurer Hydrolyse von je 25 µg eines Mischstandards aus Sito-Glc, 7-DHC-Glc und D<sub>3</sub>-Glc. Die freigesetzten Aglykone der bekannten Strukturen sind im Diagramm mit der jeweiligen Retentionszeit dargestellt. ....46
- Abbildung 20: Peakflächenzuwachs der Aglykone des β-Sitosterols (■), 7-Dehydrocholesterols (▼) und Vitamin D<sub>3</sub> (●) in Abhängigkeit der Hydrolysedauer bei saurer Hydrolyse.....47
- Abbildung 21: Signale der freigesetzten Sterole im GC-FID Chromatogramm nach zweistündiger (schwarze Kurve) und vierstündiger (blaue Kurve) saurer Hydrolyse des Sterol-Gal Mischstandards .....47
- Abbildung 22: Zeitabhängige enzymatische Hydrolyse der synthetisierten Standards des 7-DHC-Glc (links) und D<sub>3</sub>-Glc (rechts); charakterisiert durch die Anteile der Peakflächen im HPLC-UV Chromatogramm der Aglykone des 7-Dehydrocholesterol und Vitamin D<sub>3</sub> (▼) sowie der unhydrolysierten Glycoside des 7-DHC-Glc und D<sub>3</sub>-Glc (●).....48
- Abbildung 23: Zeitabhängige Freisetzung der Aglykone des 7-Dehydrocholesterols (▼),β-Sitosterols (■) und Vitamin D<sub>3</sub> (●) aus 7-DHC-Glc, Sito-Glc und D<sub>3</sub>-Glc nach enzymatischer Hydrolyse .....49
- Abbildung 24: Charakteristisches Muster der MLCCC-Chromatogramme einer Auberginenprobe .....52
- Abbildung 25: GC-FID Chromatogramm ausgewählter Sterole und D-Vitamere nach Derivatisierung mit BSA+TCMS mit den jeweiligen Retentionszeiten.....57
- Abbildung 26: Schematische Darstellung der Aufarbeitung der Goldhaferproben.....68
- Abbildung 27: Signal des Sito-Gal in verdünnter Probenlösung (links) und aufdotierter Probe (rechts).....73
- Abbildung 28: Unbekannte detektierte Strukturen mit ähnlichen MRM-Übergängen wie Stigma-Glc (links) und Sito-Glc (rechts) in der MLCCC-Fraktion 11-20 der aufgearbeiteten Auberginenextrakte .....75
- Abbildung 29: Massenspektrum (LC-MS/MS) des Sito-Cellos aus einem aufkonzentrierten Auberginenextrakt (A) im Vergleich zum synthetisierten Standard (B) .....77
- Abbildung 30: Nachweis des 7-DHC-Glc (links) und des D<sub>3</sub>-Glc (rechts) aus angereicherten Auberginenextrakten nach 70 minütiger Bestrahlung mittels 125 W UV-Lampe .....79
- Abbildung 31: Darstellung der Massenspektren des 7-DHC-Glc (links) und D<sub>3</sub>-Glc (rechts), angereichert aus bestrahlten Auberginenextrakten (A) im Vergleich zu den Synthesestandards (B) .....80
- Abbildung 32: Schematische Darstellung des Bestrahlungsexperimentes zum Nachweis von Vitamin D-Glucosiden .....81
- Abbildung 33: Struktur des β-Sitosterol-β-D-Cellobiosids mit Lokantenbezeichnung.....95

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gehalte von Vitamin D <sub>3</sub> (D <sub>3</sub> ), 7-Dehydrocholesterol (7-DHC), 25-Hydroxycholecalciferol (25(OH)D <sub>3</sub> ) und 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxycholecalciferol (1 $\alpha$ ,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> ) in ausgewählten Pflanzenarten <sup>29</sup> .....	11
Tabelle 2: Gehalte von 7-Dehydrocholesterol (7-DHC), Vitamin D <sub>3</sub> (D <sub>3</sub> ), Cholesterol und Cycloartenol abhängig von der UV-Bestrahlung in $\mu$ g/g Frischgewicht <sup>71</sup> .....	12
Tabelle 3: Gehalte der wichtigsten SGs in verschiedenen Pflanzenfamilien; bestimmt nach Nyström et al. (2012) in $\mu$ g/g Trockengewicht <sup>4</sup> .....	14
Tabelle 4: Bisherige Studien qualitativer und quantitativer Nachweise von SGs in <i>Solanum melongena</i> .....	22
Tabelle 5: Verifizierung der synthetisierten Standards durch Bestimmung des Sterolanteils und der Reinheit mittels GC-FID .....	44
Tabelle 6: Retentionszeiten der synthetisierten Standards bei MLCCC-Trennung mittels Lösemittelsystem aus <i>n</i> -Hexan-Ethylacetat-Methanol-Wasser 5:3:5:3 (v/v/v/v) .....	52
Tabelle 7: Messparameter zur Trennung verschiedener Sterole und D-Vitamere mittels GC-FID/MS nach Derivatisierung mit BSA+TCMS .....	56
Tabelle 8: Optimierte Parameter der HPLC-FLD Methode zur Trennung verschiedener Monosaccharide nach reduktiver Aminierung mittels 1-Naphtylamin .....	58
Tabelle 9: Retentionszeiten der etablierten Zucker mittels HPLC-FLD-Methode .....	58
Tabelle 10: Optimierte Parameter der HPLC-Methoden zur Trennung von SGs .....	60
Tabelle 11: Retentionszeiten der synthetisierten Standards bei HPLC-Trennung mit der optimierten Standardmethode .....	61
Tabelle 12: MS/MS-Übergänge der Synthesestandards .....	62
Tabelle 13: Optimierte massenspektrometrische Parameter .....	63
Tabelle 14: NWG und BG in matrixfreien Probelösungen und in den aufgearbeiteten Auberginenproben bei der Bestimmung mittels LC-MS/MS .....	65
Tabelle 15: Charakterisierung der vereinigten MLCCC-Fraktionsbereiche nach Anreicherung der Goldhaferextrakte .....	66
Tabelle 16: Nachweis freier Vitamin D-Strukturen im Goldhafer nach spezieller Anreicherung .....	68
Tabelle 17: Quantifizierungsergebnisse freier Vitamin D-Strukturen im Goldhafer .....	69
Tabelle 18: Übersicht analysierter Gehalte an SGs in Auberginen in bisherigen Studien .....	70
Tabelle 19: Übersicht der identifizierten SGs in den einzelnen Fraktionsbereichen der MLCCC-Anreicherung und deren Verdünnung für die Quantifizierung mittels LC-MS/MS .....	72
Tabelle 20: Quantifizierung der bedeutendsten SGs in Auberginen in mg/kg Trockengewicht (gegeben als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung) .....	73
Tabelle 21: Zusammenfassung der Anreicherung neuartiger Strukturen aus <i>Solanum melongena</i> .....	80
Tabelle 22: Qualifizierung freier Vitamin D-Strukturen in <i>Solanum melongena</i> .....	82

Tabelle 23: Übersicht identifizierter SGs in verschiedenen Goldhafer Extrakten.....	83
Tabelle 24: Übersicht identifizierter SGs in Zucchini Extrakten .....	84
Tabelle 25: Qualifizierung freier Vitamin D-Strukturen in <i>Cucurbita pepo</i> .....	85
Tabelle 26: Dotierung der einzelnen Messlösungen von Extrakten der Auberginenschale .....	105

## 10 Abkürzungsverzeichnis

...d <sub>3</sub> bzw. d <sub>7</sub>	3-fach bzw. 7-fach deuteriert
1,25(OH)D <sub>3</sub>	1,25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub>
24,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	(24R)-24,25-Dihydroxycholecalciferol
25(OH)D <sub>3</sub>	25-Hydroxycalciferol
7-DHC	7-Dehydrocholesterol
AACT	Acetyl-CoA C-Acetyltransferase
ac. 7-DHC-Glc	7-Dehydrocholesterol-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid
ac. D <sub>3</sub> -Glc	Vitamin D <sub>3</sub> -2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid
Ac <sub>2</sub> O	Essigsäureanhydrid
Acetyl CoA	Acetyl-Coenzym A
APCI	Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck/„Atmospheric-Pressure Chemical Ionization“
AS	Ameisensäure
ASGs	acylierte Sterylglycoside
BG	Bestimmungsgrenze
BSA	N,O-Bis-(Trimethylsilyl)-Acetamid
BSTFA	N,O-Bi-(Trimethylsilyl)-Trifluoroacetamid
Camp-Cello	Campesterol- $\beta$ -D-Cellobiosid
Camp-Gal	Campesterol-D-Galactopyranosid
Camp-Glc	Campesterol-D-Glucopyranosid
CAS	Cycloartenol-Synthase
CCC	countercurrent chromatography
CesA	Cellulose Synthase
CID	kollisionsinduzierte Dissoziation
d	Duplett
$\delta$	Chemische Verschiebung
D <sub>3</sub>	Vitamin D <sub>3</sub>
DAD	Diodenarray-Detektor
DART	„Direct Analysis in Real Time“
DBP	Vitamin D-bindende Proteine
DC	Dünnschichtchromatographie
dd	Duplett von Duplett
DHCR7	7-Dehydrocholesterol-Reduktase
Di-SGs	zweifach glycosilierte Sterylglycoside
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELSD	Lichtstreuendetektor
ESI	Elektrosprayionisation
FAB-MS	Fast Atom Bombardment-Massenspektrometrie
FIA	Fließinjektionsanalyse
FID	Flammenionisationsdetektor
FLD	Fluoreszenz-Detektor

FPP	Farnesylpyrophosphat
FS	freie Sterole
FW	Frischgewicht
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
GCS	Glucosylceramid-Synthase
H,H-cosy	correlation spectroscopy-Experiment
H <sup>+</sup>	Wasserstoffion/Proton
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation-Experiment
HMG	3-Hydroxy-3-Methylglutarat
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A
HMGR	HMG-CoA-Reduktase
HMGS	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Synthase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRMS	hochauflösender Massenspektrometrie
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence-Experiment
IPP	Isopentenylpyrophosphat
J	Kopplungskonstante
K <sub>L</sub>	Verteilungskoeffizient der unteren/wässrigen Phase
K <sub>U</sub>	Verteilungskoeffizient der oberen/oranischen Phase
LAS	Lanosterol-Synthase und
LC	Flüssigkeitschromatographie
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie
m	Multipllett
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MALDI	Laser-Desorption-Ionisierung
MeOH	Methanol
min	Minuten
MLCCC	multilayer coil countercurrent chromatography, Gegenstromverteilungschromatographie
Mono-SGs	einfach glycosilierte Sterylglycoside
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie
MSTFA	N-Methyl-N-(Trimethylsilyl)-Trifluoracetamid
MVA	Mevalonat
MVK	Mevalonat-Kinase
NaCl	Natriumchlorid
NH <sub>4</sub> COOH	Ammoniumformiat
nm	Nanometer
NMR	„Nuclear Magnetic Resonance“/Kernspinresonanzspektroskopie
NP	Normalphasen
NWG	Nachweisgrenze
ppm	„parts per million“/Anteile pro Million

ppb	„parts per billion“/Teile pro Milliarde
PTAD	4-Phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion
ql	qualitativ
Q-TOF-MS	Quadrupol-Time of Flight-Massenspektrometer
RI	Brechungsindexdetektor
RP	Umkehrphasen
Rt	Retentionszeit
SC	Säulenchromatographie
SEs	Sterylester
SGH	Steryl- $\beta$ -Glucosidasen
SGs	Sterylglycoside
SGTs	Sterol-Glycosyltransferasen
SIM	„selected ion monitoring“
Sito-Cello	$\beta$ -Sitosterol- $\beta$ -D-Cellobiosid
Sito-Gal	$\beta$ -Sitosterol- $\beta$ -D-Galactopyranosid
Sito-Glc	$\beta$ -Sitosterol- $\beta$ -D-Glucopyranosid
SNR	Signal-Rausch-Verhältnis
s.o.	siehe oben
SO <sub>2</sub>	Schwefeldioxid
SO <sub>3</sub>	Schwefeltrioxid
SPE	Festphasenextraktion
SQE	Squalenepoxidase;
SQS	Squalen-Synthase;
Sterol-Cellos	Sterol- $\beta$ -D-Cellobioside ( $\beta$ -Sitosterol, Stigmasterol, Campesterol)
Sterol-Gals	Sterol- $\beta$ -D-Galactopyranoside ( $\beta$ -Sitosterol, Stigmasterol, Campesterol)
Sterol-Glcs	Sterol- $\beta$ -D-Glucopyranoside ( $\beta$ -Sitosterol, Stigmasterol, Campesterol)
Stigma-Cello	Stigmasterol- $\beta$ -D-Cellobiosid
Stigma-Gal	Stigmasterol- $\beta$ -D-Galactopyranosid
Stigma-Glc	Stigmasterol- $\beta$ -D-Glucopyranosid
TCMS	Trimethylchlorosilan
Tetra-SGs	vierfach glycosilierte Sterylglycoside
T <sub>H1</sub> /T <sub>H2</sub>	T-Helfer Zellen
TMS	Trimethylsilyl
Tri-SGs	dreifach glycosilierte Sterylglycoside
TW	Trockengewicht
U	Enzymeinheit/Unit
UDP	Uridindiphosphat
UDPG	Uridindiphosphat-Glucose
UGTs	UDP-Glycosyltransferasen
UHPLC	„UltraHigh Performance Liquid Chromatography“
UV	Ultraviolett
UV-B	Ultraviolettstrahlung bei 280-315 nm
UV-C	Ultraviolettstrahlung von 100-280 nm
UV-Vis	Ultraviolett/sichtbares Licht-Detektor
VF	Verdünnungsfaktor

---

$V_L$	Volumen an unterer/wässriger Phase
$V_U$	Volumen an oberer/organischer Phase
W	Watt

## 11 Anhang

### 11.1 Charakterisierung der synthetisierten glycosilierten steroidal Strukturen

#### 11.1.1 Chol-Glc

Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgte nach Lösen von etwa 30 mg der Substanz in 700  $\mu$ l Pyridin- $d_5$ .

##### 11.1.1.1 $^1\text{H-NMR}$ -Daten

H	$\delta$ (ppm), Multiplizität und Kopplungskonstanten der Signale des Sterolgrundgerüsts	H	$\delta$ (ppm), Multiplizität und Kopplungskonstanten der Signale des Zuckeranteils
3	3,97 (m; 1H) überlappt mit H-5'	1'	5,05 (d; J = 7,7 Hz; 1H)
4	2,74 (ddd; J = 13,5, 4,7, 2,5 Hz; 1H) 2,49 (m; 1H)	2'	4,06 (t; J = 8,1 Hz; 1H)
6	5,36 (m; 1H)	3'	4,28 (m; 1H) überlappt mit H-4
18	0,67 (s; 3H)	4'	4,28 (m; 1H) überlappt mit H-3'
19	0,94 (s; 3H)	5'	4,00 (m; 1H) überlappt mit H-3
21	0,98 (d; J = 6,5 Hz; 3H)	6'	4,40 (dd; J = 11,8, 5,3 Hz; 1H) 4,57 (dd; J = 11,8, 2,5 Hz; 1H)
26	0,91 (s; 3H)		
27	0,89 (s; 3H)		
andere H's	0,80-2,10 (m)		

$\delta$ , chemische Verschiebung; J, Kopplungskonstanten; Wasserstoff und Kohlenstoff Zuordnungen wurden durch HMBC, HSQC, H,H-COSY und APT Messungen verifiziert.

##### 11.1.1.2 $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten

C	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm) Literatur <sup>15</sup> (in $\text{CDCl}_3/\text{MeOH-D}_4$ )	C	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm) Literatur <sup>15</sup> (in $\text{CDCl}_3/\text{MeOH-D}_4$ )
1	37,8	37,4	18	12,3	12,1
2	30,6	28,5	19	19,7	19,5
3	78,5	77,9	20	36,3	36,1
4	40,3	40,4	21	19,3	18,9
5	141,2	140,9	22	36,8	36,5
6	122,2	122,3	23	24,4	24,1
7	32,4	32,2	24	39,7	39,8
8	32,5	32,2	25	28,5	27,9
9	50,7	50,5	26	23,0	22,7
10	37,2	37,0	27	22,9	23,0
11	21,6	21,4	1'	102,9	97,3
12	40,0	40,1	2'	75,6	72,1
13	42,8	42,6	3'	78,9	72,4
14	57,1	57,1	4'	72,0	70,6
15	24,8	24,6	5'	78,7	74,3
16	28,8	28,3	6'	63,1	61,8
17	56,7	56,5			

$\delta$ , chemische Verschiebung; J, Kopplungskonstanten; Wasserstoff und Kohlenstoff Zuordnungen wurden durch HMBC, HSQC, H,H-COSY und APT Messungen verifiziert.

### 11.1.2 Sterol-Glcs

Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgte nach Lösen von etwa 30 mg der Substanz in 700  $\mu$ l Pyridin-d<sub>5</sub>.

#### 11.1.2.1 <sup>1</sup>H-NMR-Daten

H	$\beta$ -Sitosterol- $\beta$ -D-Glucopyranosid <sup>a(12,116)</sup>	Stigmasterol- $\beta$ -D-Glucopyranosid <sup>a(116)</sup>	Campesterol- $\beta$ -D-Glucopyranosid <sup>a(24)</sup>
2	2,15 (m, 1H)	2,15 (m, 1H)	2,15 (m, 1H)
3	3,99 (m, 2H)	3,99 (m, 2H)	3,99 (m, 2H)
4	überlappt mit H-5'	überlappt mit H-5'	überlappt mit H-5'
	2,75 (m; 1H)	2,75 (m; 1H)	2,75 (m; 1H)
	2,49 (m; 1H)	2,49 (m; 1H)	2,49 (m; 1H)
6	5,37 (m; 1H)	5,37 (m; 1H)	5,37 (m; 1H)
18	0,68 (m; 3H)	0,68 (m; 3H)	0,68 (m; 3H)
22	-	5,24 (dd, J=15,2; 8,7 Hz; 1H)	-
23	-	5,09 (dd) überlappt mit H-1'	-
andere H's	0,82-2,11 (m)	0,82-2,11 (m)	0,82-2,11 (m)
1'		5,07 (d; J = 7,7 Hz; 1H)	
2'		4,07 (m; 1H)	
3'		4,30 (m; 1H) überlappt mit H-4'	
4'		4,30 (m; 1H) überlappt mit H-3'	
5'		3,99 (m; 2H) überlappt mit H-3	
6'		4,43 (dd; J = 11,8; 5,2 Hz; 1H)	
		4,58 (dd; J = 11,8; 2,5 Hz; 1H)	

<sup>a</sup>Alle Daten stimmen mit den gegebenen Literaturdaten überein: (Shabana et al.2013)<sup>12</sup>, (Hoang et al. 2016)<sup>24</sup> und (Chiang et al 2008)<sup>116</sup>

$\delta$ : chemische Verschiebung; J: Kopplungskonstanten; Wasserstoff und Kohlenstoff Zuordnungen wurden durch HMBC, HSQC, H,H-COSY und APT Messungen verifiziert.

#### 11.1.2.2 <sup>13</sup>C-NMR-Daten

C	$\beta$ -Sitosterol- $\beta$ -D-Glucopyranosid <sup>a(12,116)</sup>	Stigmasterol- $\beta$ -D-Glucopyranosid <sup>a(116)</sup>	Campesterol- $\beta$ -D-Glucopyranosid <sup>a(24)</sup>
1	38,0	38,0	38,0
2	30,8	30,8	30,8
3	79,0	79,0	79,0
4	39,9	39,9	39,9
5	141,4	141,4	141,4
6	122,4	122,4	122,4
7	32,6	32,6	32,6
8	32,2	32,2	32,2
9	50,9	50,9	50,9
10	37,4	37,4	37,4
11	21,8	21,8	21,8
12	40,5	40,5	40,3
13	43,0	42,9	43,0
14	57,3	57,4	56,8
15	25,0	25,0	25,0
16	29,0	29,8	29,0
17	56,8	56,6	56,8
18	12,5	12,7	12,5
19	19,9	19,7	19,9
20	36,9	41,3	36,9

C	$\beta$ -Sitosterol- $\beta$ -D-Glucopyranosid <sup>12,116;a</sup>	Stigmasterol- $\beta$ -D-Glucopyranosid <sup>116;a</sup>	Campesterol- $\beta$ -D-Glucopyranosid <sup>24;a</sup>
21	19,5	22,0	19,4
22	34,7	139,3	34,5
23	26,9	130,0	33,1
24	46,6	51,9	39,6
25	30,0	31,1	32,2
26	19,7	21,2	18,9
27	20,5	19,5	20,8
28	23,9	26,2	16,1
29	12,7	13,0	-
1'	103,1	103,1	103,1
2'	75,8	75,8	75,8
3'	79,1	79,1	79,1
4'	72,2	72,2	72,2
5'	78,6	78,6	78,6
6'	63,4	63,4	63,4

<sup>a</sup>Alle Daten stimmen mit den gegebenen Literaturdaten überein: (Shabana et al.2013)<sup>12</sup>, (Hoang et al. 2016)<sup>24</sup> und (Chiang) et al 2008)<sup>116</sup>

$\delta$ . chemische Verschiebung; J. Kopplungskonstanten; Wasserstoff und Kohlenstoff Zuordnungen wurden durch HMBC, HSQC, H,H-COSY und APT Messungen verifiziert.

### 11.1.3 Sterol-Gals

Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgte nach Lösen von etwa 30 mg der Substanz in 700  $\mu$ l Pyridin-d<sub>5</sub>.

#### 11.1.3.1 <sup>1</sup>H-NMR-Daten

H	$\beta$ -Sitosterol- $\beta$ -D-Galactopyranosid <sup>a(23,159)</sup>	Stigmasterol- $\beta$ -D-Galactopyranosid <sup>a(23,156)</sup>	Campesterol- $\beta$ -D-Galactopyranosid <sup>a</sup>
2	2,18 (m, 1H)	2,18 (m, 1H)	2,18 (m, 1H)
3	3,98 (m; 1H)	3,98 (m; 1H)	3,98 (m; 1H)
4	2,74 (m; 1H)	2,74 (m; 1H)	2,74 (m; 1H)
	2,48 (m; 1H)	2,48 (m; 1H)	2,48 (m; 1H)
6	5,37 (m; 1H)	5,37 (m; 1H)	5,37 (m; 1H)
18	0,68 (m; 3H)	0,68 (m; 3H)	0,68 (m; 3H)
22	-	5,25 (dd; J = 15,2; 8,7 Hz; 1H)	-
23	-	5,09 (dd; J = 15,2; 8,8 Hz; 1H)	-
andere H's	0,82-2,12 (m)	0,82-2,12 (m)	0,82-2,12 (m)
1'		4,99 (d; J = 7,6 Hz; 1H)	
2'		4,49 (m; 1H) überlappt mit 2H-6'	
3'		4,24 (dd; J = 9,5; 3,4; 1H)	
4'		4,62 (d; J=3,4 Hz; 1H)	
5'		4,13 (m; 1H)	
6'		4,49 (m; 1H) überlappt mit H-2'	

<sup>a</sup>Alle Daten stimmen mit den gegebenen Literaturdaten überein: (Ezzat et al.2017)<sup>23</sup>, (Ahmed et al. 1992)<sup>156</sup> und (Dinda et al. 2011)<sup>159</sup>

$\delta$ . chemische Verschiebung; J. Kopplungskonstanten; Wasserstoff und Kohlenstoff Zuordnungen wurden durch HMBC, HSQC, H,H-COSY und APT Messungen verifiziert

### 11.1.3.2 <sup>13</sup>C-NMR-Daten

C	<i>β</i> -Sitosterol- <i>β</i> -D-Galactopyranosid	Stigmasterol- <i>β</i> -D-Galactopyranosid	Campesterol- <i>β</i> -D-Galactopyranosid
1	38,0	38,0	38,0
2	30,9	30,9	30,9
3	78,5	78,5	78,5
4	39,9	39,9	39,9
5	141,5	141,5	141,5
6	122,3	122,3	122,3
7	32,7	32,7	32,7
8	32,6	32,6	32,6
9	50,9	50,9	50,9
10	37,4	37,4	37,4
11	22,0	22,0	22,0
12	40,5	40,5	40,3
13	43,0	42,9	43,0
14	57,3	57,4	56,7
15	25,0	25,1	25,0
16	29,1	29,8	29,0
17	56,7	56,6	56,8
18	12,5	12,7	12,5
19	19,9	19,9	19,9
20	36,6	41,3	36,6
21	19,5	21,9	19,4
22	34,7	139,3	34,5
23	26,9	130,0	33,1
24	46,6	52,0	39,6
25	30,0	31,1	32,2
26	19,7	21,2	18,9
27	20,5	19,5	20,9
28	23,9	26,2	16,1
29	12,7	13,0	-
1'	103,7	103,7	103,7
2'	73,2	73,2	73,2
3'	75,9	75,9	75,9
4'	70,8	70,8	70,8
5'	77,4	77,4	77,4
6'	63,0	63,0	63,0

δ. chemische Verschiebung; J. Kopplungskonstanten; Wasserstoff und Kohlenstoff Zuordnungen wurden durch HMBC, HSQC, H,H-COSY und APT Messungen verifiziert.

### 11.1.4 Sterol-Cellos

Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgte nach Lösen von etwa 40 mg der Substanz in 700 µl Pyridin-d<sub>5</sub>.

11.1.4.1 <sup>1</sup>H-NMR-Daten

H	<i>β</i> -Sitosterol- <i>β</i> -D-Cellobiosid	Stigmasterol- <i>β</i> -D-Cellobiosid	Campesterol- <i>β</i> -D-Cellobiosid
3	3,90 (tt, J = 10,8; 4,6 Hz; 1H)	3,90 (tt, J = 10,8; 4,6 Hz; 1H)	3,90 (tt, J = 10,8; 4,6 Hz; 1H)
4	2,73 (m, 1H) 2,50 (m, 1H)	2,73 (m, 1H) 2,50 (m, 1H)	2,73 (m, 1H) 2,50 (m, 1H)
6	5,35 (d; J = 5,0 Hz; 1H)	5,35 (d; J = 5,0 Hz; 1H)	5,35 (d; J = 5,0 Hz; 1H)
18	0,69 (s, 3H)	0,71 (m, 3H)	0,69 (s, 3H)
22	-	5,23 (dd; J = 15,0, 8,7Hz; 1H)	-
23	-	5,09 (dd; J = 15,0, 8,8 Hz; 1H)	-
andere H's	0,83-2,17 (m)	0,83-2,17 (m)	0,83-2,17 (m)
1'		5,01 (d; J = 7,8 Hz; 1H)	
2'		4,07 (t; J = 8,0 Hz; 1H)	
3'		4,34 (m, 1H) überlappt mit H-6'' und H-4'	
4'		4,38 (t; 1H; J = 9,0 Hz)	
5'		3,94 (m, 1H)	
6'		4,58 (dd; 1H; J = 11,9; 5,8 Hz) 4,49 (dd; 1H; J = 11,9; 2,7 Hz)	
1''		5,22 (d; 1H; J = 7,8 Hz)	
2''		4,13 (t; 1H; J = 8,2 Hz)	
3''		4,22 (m; 1H), überlappt mit H-4''	
4''		4,22 (m; 1H), überlappt mit H-3''	
5''		4,02 (m, 1H)	
6''		4,55 (m; 1H), überlappt mit H-6' 4,30 (m; 1H) überlappt mit H-3'	

δ, chemische Verschiebung; J, Kopplungskonstanten; Wasserstoff und Kohlenstoff Zuordnungen wurden durch HMBC, HSQC, H,H-COSY und APT Messungen verifiziert.

11.1.4.2 <sup>13</sup>C-NMR-Daten

C	<i>β</i> -Sitosterol- <i>β</i> -D-Cellobiosid	Stigmasterol- <i>β</i> -D-Cellobiosid	Campesterol- <i>β</i> -D-Cellobiosid
1	38,0	38,0	38,0
2	30,8	30,8	30,8
3	78,9	78,9	78,9
4	39,8	39,9	39,8
5	141,4	141,4	141,4
6	122,5	122,5	122,5
7	32,7	32,7	32,7
8	32,6	32,6	32,6
9	50,9	50,9	50,9
10	37,5	37,5	37,5
11	21,8	21,8	21,8
12	40,5	40,5	40,4
13	43,0	42,9	43,0
14	57,4	57,5	56,8
15	25,1	25,1	25,1
16	29,1	29,6	26,1
17	56,8	56,6	56,9
18	12,5	12,7	12,5
19	20,0	19,8	20,0
20	36,9	41,3	37,0
21	19,6	22,0	19,5
22	34,8	139,3	34,5
23	27,0	130,0	33,2
24	46,6	52,0	39,6
25	29,8	31,1	32,3
26	19,7	21,2	20,9
27	20,5	19,7	18,3
28	24,0	25,6	16,1
29	12,7	13,1	-

C	$\beta$ -Sitosterol- $\beta$ -D-Cellobiosid	Stigmasterol- $\beta$ -D-Cellobiosid	Campesterol- $\beta$ -D-Cellobiosid
1'		105,5	
2'		75,4	
3'		77,3	
4'		81,9	
5'		77,0	
6'		62,7	
1''		102,8	
2''		75,3	
3''		78,8	
4''		72,1	
5''		79,0	
6''		63,0	

$\delta$ , chemische Verschiebung; J, Kopplungskonstanten; Wasserstoff und Kohlenstoff Zuordnungen wurden durch HMBC, HSQC, H,H-COSY und APT Messungen verifiziert.

### 11.1.5 7-DHC-Glc

Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgte nach Lösen von etwa 30 mg der Substanz in 700  $\mu$ l Pyridin- $d_5$ .

#### 11.1.5.1 $^1\text{H}$ -NMR-Daten

H	7-Dehydrocholesterol- $\beta$ -D-Glucopyranosid
2	2,21 (m; 1H)
3	4,01 (m; 1H)
4	2,91 (m; 1H)
	2,53 (m; 1H)
6	5,65 (m; 1H)
7	5,47 (m; 1H)
12	2,06 (m; 1H)
18	0,59 (s; 3H)
19	0,94 (s; 3H)
21	1,00 (d; J = 6,4 Hz; 3H)
26	0,9 (s; 3H)
27	0,92 (s; 3H)
andere H's	1,01 - 2,05 (m; 22H)
1'	5,07 (d; J = 7,7 Hz; 1H)
2'	4,07 (m; 1H) überlappt mit H-5'
3'	4,30 (m; 1H) überlappt mit H-4'
4'	4,30 (m; 1H) überlappt mit H-3'
5'	4,07 (m; 1H) überlappt mit H-2'
6'	4,44 (dd; J=11,7, 5,3 Hz; 1H)
	4,60 (dd; J = 11,7, 2,5 Hz; 1H)

$\delta$ , chemische Verschiebung; J, Kopplungskonstanten; Wasserstoff und Kohlenstoff Zuordnungen wurden durch HMBC, HSQC, H,H-COSY und APT Messungen verifiziert.

### 11.1.5.2 $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten

C	7-Dehydrocholesterol- $\beta$ -D-Glucopyranosid
1	39,3
2	31,4
3	79,3
4	38,7
5	141,9
6	120,9
7	117,7
8	140,9
9	47,2
10	38,2
11	22,1
12	40,2
13	43,9
14	55,4
15	24,1
16	29,0
17	56,9
18	12,7
19	17,2
20	37,2
21	19,8
22	37,2
23	25,0
24	40,5
25	29,1
26	23,4
27	23,7
1'	103,4
2'	76,1
3'	79,4
4'	72,5
5'	77,6
6'	63,7

$\delta$ , chemische Verschiebung; J, Kopplungskonstanten; Wasserstoff und Kohlenstoff Zuordnungen wurden durch HMBC, HSQC, H,H-COSY und APT Messungen verifiziert.

### 11.1.6 $\text{D}_3$ -Glc

Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgte nach Lösen von etwa 30 mg der Substanz in 700  $\mu\text{l}$  Pyridin- $\text{d}_5$ .

#### 11.1.6.1 $^1\text{H}$ -NMR-Daten

H	Cholecalciferol (Vitamin $\text{D}_3$ )- $\beta$ -D-Glucopyranosid <sup>a(160)</sup>
1	2,45 (m; 1H)
2	2,13 (m; 1H) überlappt mit H-2
3	2,13 (m; 1H) überlappt mit H-1
4	4,20 (tt; J = 8,4, 4,1 Hz; 1H)
5	2,91 (m; 2H) überlappt mit H-9 <sup>A</sup>
6	2,62 (dd; J = 13,3, 8,4 Hz; 1H)
7	6,46 (d; J = 11,3 Hz; 1H)
8	6,33 (d; J = 11,3 Hz; 1H)
9	2,91 (m; 2H) überlappt mit H-4 <sup>A</sup>
18	0,60 (s; 3H)
19	5,15 (m; 1H)
	5,04 (m; 1H) überlappt mit H-1'

H	Cholecalciferol (Vitamin D <sub>3</sub> )- $\beta$ -D-Glucopyranosid <sup>a (160)</sup>
21	0,97 (d; J = 6,3 Hz; 3H)
26	0,90 (s; 3H)
27	0,92 (s; 3H)
andere H's	1,00 - 2,03 (m)
1'	5,04 (m; 2H), überlappt mit H-19 <sup>B</sup>
2'	4,00 (m; 1H) überlappt mit H-5'
3'	4;28 (m; 1H) überlappt mit H-4'
4'	4,28 (m; 1H) überlappt mit H-3'
6'	4,41 (dd; J = 11,8, 5,2 Hz; 1H)
	4,55 (dd; J=11,8, 2,5 Hz; 1H)

<sup>a</sup>Alle Daten stimmen mit den gegebenen Literaturdaten überein: (Fürst. 1983)<sup>160</sup>

$\delta$ . chemische Verschiebung; J. Kopplungskonstanten; Wasserstoff und Kohlenstoff Zuordnungen wurden durch HMBC, HSQC, H,H-COSY und APT Messungen verifiziert. Die  $\beta$ -glycosidische Bindung des D<sub>3</sub>-Glc wurde durch ein Duplet für das H-1' in methanol-d<sub>4</sub> bei 4,46 ppm (7,8 Hz) verifiziert.

### 11.1.6.2 <sup>13</sup>C-NMR-Daten

C	Cholecalciferol (Vitamin D <sub>3</sub> )- $\beta$ -D-Glucopyranosid <sup>a (160)</sup>
1	33,5
2	35,1
3	77,3
4	46,5
5	136,7
6	123,1
7	118,8
8	142,5
9	29,8
10	146,5
11	23,2
12	41,2
13	44,1
14	57,3
15	24,4
16	28,5
17	57,0
18	12,7
19	113,0
20	36,9
21	19,5
22	36,9
23	24,7
24	40,2
25	28,5
26	23,1
27	23,4
1'	103,9
2'	75,6
3'	79,1
4'	72,1
5'	79,0
6'	63,3

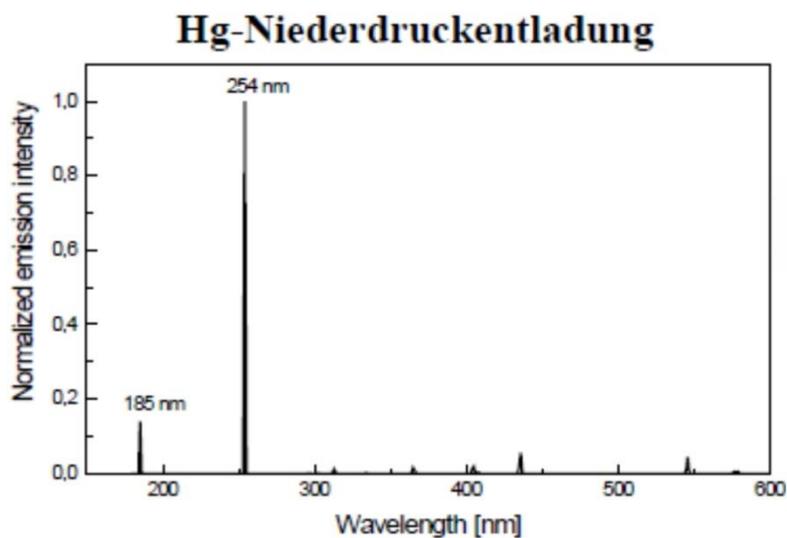
<sup>a</sup>Alle Daten stimmen mit den gegebenen Literaturdaten überein: (Fürst. 1983)<sup>160</sup>

$\delta$ . chemische Verschiebung; J. Kopplungskonstanten; Wasserstoff und Kohlenstoff Zuordnungen wurden durch HMBC, HSQC, H,H-COSY und APT Messungen verifiziert.

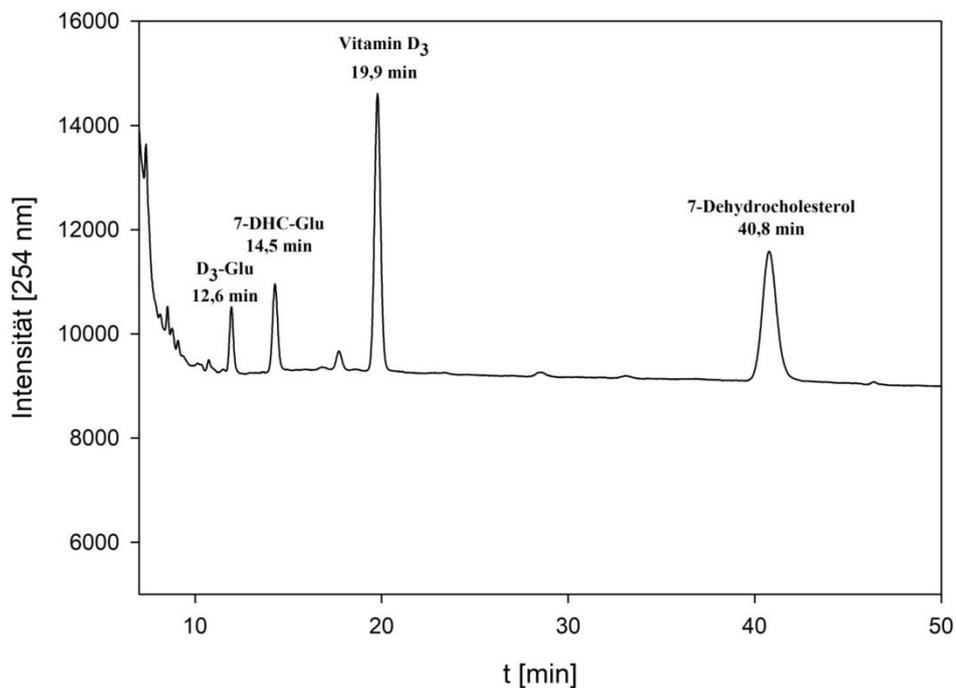
### 11.1.7 Hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS-Spektrometrie)

Struktur	Charakteristisches Ion der jeweiligen Struktur	ermittelte Masse des spezifischen Ions m/z, [Da]	theoretisch berechnete Masse des spezifischen Ions m/z, [Da]
Chol-Glc	$C_{33}H_{56}NaO_6^+, [M + Na]^+$	571,3959	571,3969
Sito-Glc	$C_{35}H_{60}NaO_6^+, [M + Na]^+$	599,4270	599,4282
Stigma-Glc	$C_{35}H_{58}NaO_6^+, [M + Na]^+$	597,4119	597,4119
Camp-Glc	$C_{34}H_{58}NaO_6^+, [M + Na]^+$	585,4115	585,4126
Sito-Gal	$C_{35}H_{60}NaO_6^+, [M + Na]^+$	599,4277	599,4282
Stigma-Gal	$C_{35}H_{58}NaO_6^+, [M + Na]^+$	597,4130	597,4119
Camp-Gal	$C_{34}H_{58}NaO_6^+, [M + Na]^+$	585,4121	585,4126
7-DHC-Glc	$C_{33}H_{54}NaO_6^+, [M + Na]^+$	569,3812	569,3813
D <sub>3</sub> -Glc	$C_{33}H_{54}NaO_6^+, [M + Na]^+$	569,3813	569,3813
Sito-Cello	$C_{41}H_{70}NaO_{11}^+, [M + Na]^+$	761,4800	761,4801
Stigma-Cello	$C_{41}H_{68}NaO_{11}^+, [M + Na]^+$	759,4652	759,4654
Camp-Cello	$C_{40}H_{68}NaO_{11}^+, [M + Na]^+$	747,4650	747,4654

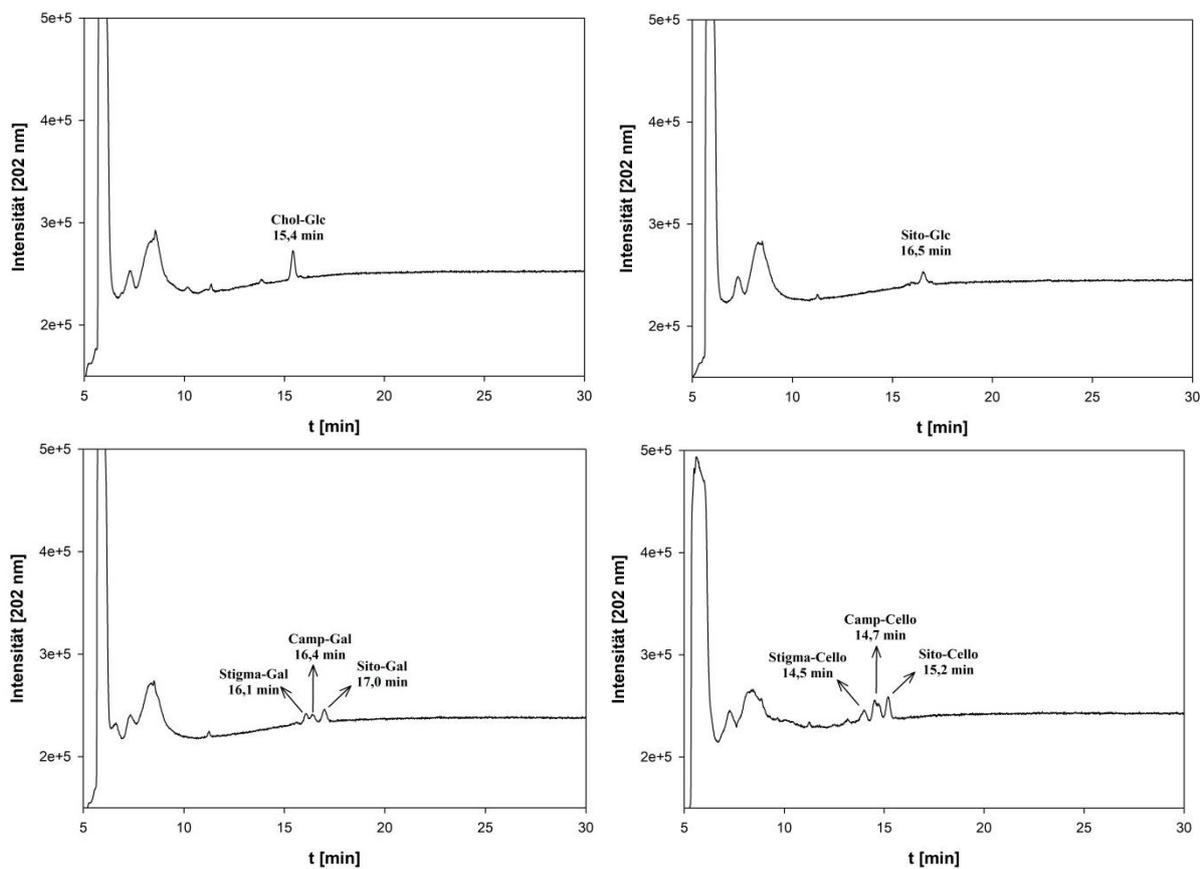
### 11.2 Wellenlängenspektrum der NARVA UVS 125 W Quecksilberdampfampe



### 11.3 HPLC-UV Chromatogramm ausgewählter freier und glycosidisch gebundener Vitamin D-Strukturen



### 11.4 HPLC-DAD Chromatogramm der UV-Spur bei 202 nm ausgewählter SGs



## 11.5 Chromatographische Methoden

### 11.5.1 GC-FID-Methode zur Analytik freier Sterole

Parameter	Bedingung
Trennsäule	HP-5 (30 Meter, 0,32 mm, 0,25 µm)
Säulenmaterial	5 % Diphenyl – 95 % Dimethylpolysiloxan
Fluss	1,6 ml/min
Inlet Temperatur	250 °C
Injektionsvolumen	1,0 µl
Split	1:50
Temperaturprogramm	250 °C $\xrightarrow{10\text{ °C/min (2')}}$ 270 °C (28')
Detektor	FID (310°C)
Dauer	30 Minuten

### 11.5.2 GC-MS-Methode zur Analytik freier Sterole

Parameter	Bedingung
Trennsäule	DB-5 MS (30 Meter * 0,25 mm * 0,25 µm)
Säulenmaterial	5% Diphenyl - 95% Dimethylpolysiloxan
Trägergas	Helium
Fluss	7,0 ml/min
Inlet Temperatur	250 °C
Injektionsvolumen	1,0-5,0 µl
Split	splitless
Temperaturprogramm	250 °C $\xrightarrow{10\text{ °C/min (2')}}$ 270 °C (33')/(63')
Detektor	Thermo Trace DSQ – Massenspektrometer
Dauer	35 Minuten/65 Minuten

**11.5.3 HPLC-UV/DAD-Identifizierungsmethode freier Sterole**

Parameter	Bedingung
Trennsäule	Knauer Eurospher I 100-5 C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm + Vorsäule
Laufmittel	A: H <sub>2</sub> O + 0,1 % Ameisensäure B: MeOH + 0,1 % Ameisensäure
Fluss	1,0 ml/min
Temperatur	25 °C
Injektionsvolumen	20 µl
Gradient	40/60 <sup>2'</sup> → 5/95 <sup>2'</sup> → 0/100 (53') <sup>3'</sup> → 40/60 (5')
Dauer	65 min

**11.5.4 HPLC-UV/DAD-Identifizierungsmethode glycosidisch gebundener steroidaler Strukturen**

Parameter	Bedingung
Trennsäule	Knauer Eurospher I 100-5 C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm + Vorsäule
Laufmittel	A: H <sub>2</sub> O + 0,1 % Ameisensäure B: MeOH + 0,1 % Ameisensäure
Fluss	1,0 ml/min
Temperatur	25 °C
Injektionsvolumen	20 µl
Gradient	40/60 <sup>2'</sup> → 5/95 <sup>2'</sup> → 0/100 (21') <sup>3'</sup> → 40/60 (5')
Dauer	33 min

**11.5.5 HPLC-UV/DAD-Anreicherungsmethode steroidaler Strukturen**

Parameter	Bedingung
Trennsäule	Knauer Eurospher I 100-5 C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm + Vorsäule
Laufmittel	A: H <sub>2</sub> O + 0,1 % Ameisensäure B: MeOH + 0,1 % Ameisensäure
Fluss	1,0 ml/min
Temperatur	25 °C
Injektionsvolumen	20-100 µl
Gradient	40/60 (5') <sup>2'</sup> → 20/80 <sup>2'</sup> → 7/93 (34') <sup>3'</sup> → 0/100 (10') <sup>3'</sup> → 40/60 (5')
Dauer	59 min

### 11.5.6 LC-MS/MS-Identifizierungsmethode glycosidisch gebundener steroidaler Strukturen

<i>Parameter/ Messmethode</i>	<i>Bedingung</i>
Trennsäule	Knauer Eurospher I 100-5 C18, 250x4,6 mm, 5 µm + Vorsäule
Laufmittel	A: H <sub>2</sub> O + 0,1 % Ameisensäure + 0,1 mM NH <sub>4</sub> COOH B: MeOH + 0,1 % Ameisensäure + 0,1 mM NH <sub>4</sub> COOH
Fluss	1,0 ml/min
Temperatur	25 °C
Injektionsvolumen	20 µl
Gradient	40/60 $\xrightarrow{2'}$ 5/95 $\xrightarrow{2'}$ 0/100 (21') $\xrightarrow{3'}$ 40/60 (5')
Dauer	33 min

#### 11.5.6.1 MS/MS-Parameter

Parameter	Bedingung
Curtain Gas	30 psi
Temperatur	550 °C
Gas 1 (Auxiliary Gas)	50 psi
Gas 2 (Nebulizer Gas)	60 psi
Collision Gas	medium, 5 psi
Ion Spray Voltage	5,500 V
Detection	MRM-Mode

## 11.5.6.2 MS/MS-Übergänge der derivatisierten D-Vitamer

Analyt	Mutterion	Q1 [Da]	Q3 [Da]	Rt [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
Chol-Glc	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	566,9*	369,7*	13,7	60	18	15
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	566,9	161,3			45	15
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	566,9	135,4	13,7	60	40	10
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	566,9	147,4			50	13
Sito-Glc	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	594,7*	397,7*	14,9	60	20	15
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	594,7	161,4			45	15
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	594,7	147,2	14,9	60	50	15
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	594,7	95,4			80	15
Stigma-Glc	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	592,9*	395,7*	14,0	60	15	13
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	592,9	83,2			50	13
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	592,9	139,5	14,0	60	30	13
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	592,9	255,6			30	13
Camp-Glc	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	580,9*	383,7*	14,4	60	20	20
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	580,9	147,2			45	10
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	580,9	161,4	14,4	60	50	10
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	580,9	135,3			45	10
Sito-Gal	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	594,7*	397,7*	15,5	60	20	18
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	594,7	147,5			50	13
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	594,7	189,4	15,5	60	45	10
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	594,7	85,4			60	15
Stigma-Gal	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	592,9*	395,7*	14,5	60	15	13
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	592,9	83,2			50	13
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	592,9	139,5	14,5	60	30	13
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	592,9	255,6			30	13
Camp-Gal	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	580,9*	383,7*	14,9	60	20	20
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	580,9	147,2			45	10
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	580,9	161,4	14,9	60	50	10
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	580,9	135,3			45	10
Sito-Cello	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	757,0*	397,7*	13,8	60	20	18
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	757,0	163,3			30	13
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	757,0	325,5	13,8	60	15	15
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	757,0	85,3			80	15
Stigma-Cello	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	755,0*	395,7*	13,1	60	20	15
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	755,0	83,1			60	13
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	755,0	325,5	13,1	60	15	10
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	755,0	163,5			30	13
Camp-Cello	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	743,0*	383,7*	13,5	60	20	20
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	743,0	163,3			30	13
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	743,0	85,3	13,5	60	80	13
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	743,0	325,5			15	13
7-DHC-Glc	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	566,9*	367,5*	12,7	60	20	13
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	566,9	145,4			40	10
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	566,9	159,4	12,7	60	45	15
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	566,9	385,4			20	20
D <sub>3</sub> -Glc	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	566,9*	367,5*	11,0	60	25	20
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	566,9	385,5			25	18
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	566,9	121,2	11,0	60	40	5
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	566,9	247,4			25	15

\*Quantifier

### 11.5.7 LC-MS/MS-Identifizierungsmethode für freie Vitamin D-Strukturen

<i>Parameter/ Messmethode</i>	<i>Bedingung</i>
Trennsäule	Knauer Eurospher II 100-3 C18 H 100 x 2 mm + Vorsäule
Laufmittel	A: H <sub>2</sub> O + 0,1 % Ameisensäure B: MeOH + 0,1 % Ameisensäure
Fluss	0,3 ml/min
Temperatur	25 °C
Injektionsvolumen	20 µl
Gradient	40/60 $\xrightarrow{2'}$ 5/95 $\xrightarrow{2'}$ 0/100 (15') $\xrightarrow{0,75'}$ 40/60 (4,25')
Dauer	24 min

#### 11.5.7.1 PTAD-Derivatisierung

Der aufgearbeitete Extrakt wurde in 1 ml Methanol gelöst, homogenisiert und zentrifugiert. Von der überstehenden Lösung wurden 400 µl entnommen, das Lösemittel unter Argon-Strom abgedampft und anschließend mit 200 µl PTAD-Lösung (2 mg/ml in Acetonitril) versetzt und im Braunglasvial für 90 min bei Raumtemperatur derivatisiert. Nach Abdampfen des Lösungsmittels unter Argon-Strom wurde in 400 µl Laufmittel B aufgenommen und der klare Überstand am LC-MS/MS (ESI, positiv) vermessen.

#### 11.5.7.2 MS/MS-Parameter

Parameter	Bedingung
Curtain Gas	30 psi
Temperatur	550 °C
Gas 1 (Auxiliary Gas)	45 psi
Gas 2 (Nebulizer Gas)	60 psi
Collision Gas	medium
Ion Spray Voltage	5.500 V
Detection	MRM-Mode

### 11.5.7.3 LC-MS/MS-Identifizierungsmethode für Vitamin D-Strukturen

Analyt	Mutterion	Q1 [Da]	Q3 [Da]	Rt [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>2</sub> (PTAD)	[M-18+H] <sup>+</sup>	574,5	161,3	5,9	80	53	10
	[M-18+H] <sup>+</sup>	574,5*	298,3*	5,9	80	25	6
	[M+H] <sup>+</sup>	592,6	298,4	5,9	35	26	6
1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (PTAD)	[M+H] <sup>+</sup>	592,6	314,3	6,1	60	23	8
	[M-18+H] <sup>+</sup>	574,4	556,5	6,1	50	13,5	10
	[M-18+H] <sup>+</sup>	574,4*	314,3*	6,1	50	23	10
	[M-18+H] <sup>+</sup>	574,4	298,1	6,1	50	23	10
1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>2</sub> (PTAD)	[M+H] <sup>+</sup>	604,6	314,4	6,2	30	21	18
	[M+H] <sup>+</sup>	604,6	586,5	6,2	30	10	10
	[M-18+H] <sup>+</sup>	586,5*	314,3*	6,2	30	18	18
25(OH)D <sub>3</sub> (PTAD)	[M-18+H] <sup>+</sup>	558,3*	298,3*	6,6	80	19	6
	[M-18+H] <sup>+</sup>	558,3	280,3	6,6	80	37	10
	[M-18+H] <sup>+</sup>	558,3	161,2	6,6	80	51	10
25(OH)D <sub>2</sub> (PTAD)	[M+H] <sup>+</sup>	558,7	298,3	6,7	30	18,5	15
	[M-18+H] <sup>+</sup>	570,5*	298,4*	6,7	30	21	18
	[M-18+H] <sup>+</sup>	570,5	161,3	6,7	30	51	11
Vitamin D <sub>2</sub> (PTAD)	[M+H] <sup>+</sup>	572,7*	298,3*	9,1	40	20	6
	[M+H] <sup>+</sup>	572,7	280,3	9,1	40	40	10
	[M+H] <sup>+</sup>	572,7	161,2	9,1	40	52	10
Vitamin D <sub>3</sub> (PTAD)	[M+H] <sup>+</sup>	560,6*	298,4*	9,2	40	21	6
	[M+H] <sup>+</sup>	560,6	280,3	9,2	40	39	16
	[M+H] <sup>+</sup>	560,6	161,2	9,2	40	51	13
Ergosterol (PTAD)	[M+H] <sup>+</sup>	572,7	377,5	9,3	30	24	10
	[M+22+H] <sup>+</sup>	594,6	200,3	9,3	70	33	15
	[M+22+H] <sup>+</sup>	594,6*	419,4*	9,3	70	28	11
7-Dehydrocholesterol (PTAD)	[M+H] <sup>+</sup>	560,6	365,5	9,4	30	25	9
	[M+22+H] <sup>+</sup>	582,3*	407,4*	9,4	50	27	9
	[M+22+H] <sup>+</sup>	582,3	365,4	9,4	50	34	9

\*Quantifier, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>2</sub>; 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxycholecalciferol; 25(OH)D<sub>2</sub>, 25-Hydroxyvitamin D<sub>2</sub>; 25(OH)D<sub>3</sub>, 25-Hydroxycholecalciferol

### 11.5.8 HPLC-FLD-Identifizierungsmethode freier Zucker

Parameter/ Messmethode	Bedingung
Trennsäule	Knauer Eurospher 100-5 C18, 250x4,0 mm, 5 $\mu$ m + Vorsäule
Laufmittel	A: H <sub>2</sub> O + 0,6 % HFBA (Heptafluorbuttersäure) B: MeOH/H <sub>2</sub> O 70:30 + 0,6 % HFBA
Fluss	1,0 ml/min
Temperatur	20 °C
Parameter des Detektors:	
Wellenlänge für Anregung	318 nm
Wellenlänge der Emission	440 nm
Injektionsvolumen	10 $\mu$ l
Gradient	65/35 $\xrightarrow{5'}$ 80/20 (25') $\xrightarrow{5'}$ 70/30 $\xrightarrow{10'}$ 65/35 (30') $\xrightarrow{5'}$ 0/100 (15') $\xrightarrow{10'}$ 65/35 (15')
Dauer	110 min

### 11.5.9 Anreicherungsmethode mittels MLCCC

<i>Parameter/ Messmethode</i>	<i>Bedingung</i>
Trennsäule/Schlauchmaterial	PTFE 1,9 x 2,5 x 0,3 mm
Spulenlänge	80-90 m
Laufmittel	n-Hexan/Ethylacetat/Methanol/Wasser 5:3:5:3
Trennmethode	Head to Tail
Gesamtvolumen der Trennsäule (Spule)	240 ml
Verhältnis stationäre/wässrige Phase nach Phasenaufgabe	200 ml organische/stationäre Phase 40 ml wässrige/mobile Phase
Fluss	2,0 ml/min
Fraktionsgröße	10 ml; 5 min/Fraktion
Probeneinwaage	600 mg in je 2,5 ml organischer und wässriger Phase
Detektion	UV-Detektion bei 254 nm

### 11.5.10 Bestimmung von freiem Vitamin D in Lebensmitteln mittels LC-MS/MS

#### 11.5.10.1 Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
Lösung I	methanolische Kaliumhydroxyd-Lösung: 420 g KOH/1,5 l (MeOH:H <sub>2</sub> O 9:1); 2,4 l H <sub>2</sub> O; 5,1 l MeOH
Natriumsulfid-Lsg. (1,6 M)	123,1 g/l H <sub>2</sub> O
Lösung II	zitronensäurehaltiger Ammoniumchlorid-Puffer: 259,2 g NH <sub>4</sub> Cl; 1,68 l NH <sub>3</sub> ; 3,12 l H <sub>2</sub> O; 1,2 l Zitronensäure-Lsg. (2,5 M); 567 g/1,2 l H <sub>2</sub> O
Zitronensäure-Lsg. (1 M)	192 g/l H <sub>2</sub> O

Misch-Standard	Verdünnung	End-Konzentration [mg/l]
Vitamin D <sub>3</sub> 6,19,19-d <sub>3</sub>	1 mg/ 1000 µl// 100 µl/ 500 µl// 416 µl/ 20 ml	4,1
Vitamin D <sub>2</sub> 6,19,19-d <sub>3</sub>	1 mg/ 1000 µl// 100 µl/ 500 µl// 416 µl/ 20 ml	4,1
25-Hydroxyvitamin D <sub>3</sub> 6,19,19-d <sub>3</sub>	1 mg/ 500 µl// 50 µl/ 500 µl// 416 µl/ 20 ml	4,1
1 $\alpha$ 25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub> 6,19,19-d <sub>3</sub>	1 mg/ 500 µl// 50 µl/ 500 µl// 416 µl/ 20 ml	4,1
7-Dehydrocholesterol- (25,26,26,26,27,27,27-d <sub>7</sub> )	5 mg/1 ml// 20 µl/ 500 µl// 832 µl/ 20 ml	8,2

### 11.5.10.2 Probenvorbereitung

Im Rahmen der Probenvorbereitung wurde von jeder Probe ein repräsentativer Teil (etwa 80 g Frischgewicht oder 1,2-2,9 g Trockengewicht) zerkleinert, homogenisiert und direkt aufgearbeitet oder bis zur Aufarbeitung bei  $-30^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 11.5.10.3 Probenaufarbeitung

#### *Verseifung*

Die vorbereiteten Proben wurden mit 1 g Natriumascorbat in eine druckresistente 250 ml Laborflasche eingewogen und mit methanolischer Kaliumhydroxyldlösung (Lösung I, siehe Kapitel 11.5.10.1, S. 139) auf 150 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von 133  $\mu\text{l}$  des deuterierten internen Mischstandards (siehe Kapitel 11.5.10.1, S. 139) und 2 M Natriumsulfid-Lösung (2 ml) wurde der Reaktionsansatz mit Stickstoff überschichtet, fest verschlossen, gut durchmischt und im Trockenschrank für 3,5 Stunden bei  $70^{\circ}\text{C}$  hydrolysiert. Zu der vollständig aufgeschlossenen und verseiften Probelösung folgte nach Abkühlen die Zugabe von 50 ml eines zitronensäurehaltigen Ammoniumchlorid-Puffers (Lösung II; siehe Kapitel 11.5.10.1, S. 139) sowie 4 ml einer 1 M Zitronensäurelösung zur Einstellung des pH-Wertes, welcher zwischen 10 und 11 liegen sollte. Anschließend wurden die Lösungen mit Wasser auf 250 ml aufgefüllt, gut durchmischt und mittels Faltenfilter filtriert.

#### *SPE (RP-Phase, Strata-SDB-L)*

Die Konditionierung der Strata-SDB-L-Kartuschen erfolgte mit jeweils 6 ml Ethylacetat-Isopropanol 3:7 (v/v), 6 ml Methanol und 6 ml Wasser. Auf die vorbereiteten Säulen wurden anschließend 9 ml der Probelösung aufgegeben, welche mit den deuterierten Vitamin D-Standardsubstanzen definierter Konzentration versetzt wurden. Zur Aufreinigung der Analyten wurde das Sorbens zunächst mit 6 ml Methanol-Wasser 90:10 (v/v) und anschließend mit 6 ml Methanol-Wasser 50:50 (v/v) gewaschen. Die Elution der Zielstrukturen erfolgte mit 2 x 3 ml Isopropanol von den zuvor unter Stickstoffstrom getrockneten Säulen. Das Eluat wurde unter Argon-Strom getrocknet.

#### *SPE (NP-Phase, Strata SI-1 Silica, Phenomenex)*

Das getrocknete Eluat der Strata-SDB-L-SPE wurde in 1 ml Isopropanol/n-Hexan 0,5:99,5 (v/v) gelöst, in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und anschließend zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde für die NP-SPE eingesetzt.

Die Vorkonditionierung der SI-1 Silica-Kartuschen erfolgte mit 4 x 1,5 ml Elutionsmittel, 4 x 1,5 ml Hexan und 4 x 1,5 ml Isopropanol/n-Hexan 0,5:99,5 (v/v), bevor 800  $\mu\text{l}$  Probelösung aufgegeben wurden. Zum Waschen der Säulen wurden die bereits zur Konditionierung eingesetzten Lösungsmittel bzw. -gemische eingesetzt. Anschließend erfolgte die Elution mit 3 ml Isopropanol/n-Hexan 35:65 (v/v). Der resultierende Extrakt wurde unter Argon-Strom getrocknet.

#### *Clean-up*

Der erhaltene Rückstand wurde in 267  $\mu\text{l}$  Methanol aufgenommen, gelöst bzw. homogenisiert (Vortex, ggf. Ultraschallbad) und zentrifugiert. Zur Aufreinigung der Probe wurden von der

klaren Lösung 200  $\mu\text{l}$  abgenommen, mit 44  $\mu\text{l}$  Wasser versetzt und homogenisiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurden von der oberen Phase 200  $\mu\text{l}$  abgenommen und mit dem gleichen Volumen an Laufmittel B (MeOH + 0,1 % Ameisensäure) des chromatographischen Systems versetzt. Nachdem die Lösung für mind. 30 min tiefgekühlt und der ausgefallene Niederschlag abgetrennt wurde, folgte die Vermessung von 200  $\mu\text{l}$  des klaren Überstandes am LC-MS/MS nach der Methode von Seeburg et al (2014).<sup>85</sup>

#### *Quantifizierung*

Eine matrixangepasste Kalibrierung mit deuterierten internem Standard diente der Quantifizierung. Zur Aufnahme der Kalibrierungen wurden die Proben vor der Aufarbeitung mit unterschiedlichen Gehalten an D-Vitaminen versetzt. Die Kalibrierung erfolgte je nach Analyt im Konzentrationsbereich von 16  $\mu\text{g/l}$  bis 850  $\mu\text{g/l}$ , wobei die deuterierten Referenzsubstanzen (Vitamin D<sub>3</sub>-d<sub>3</sub> (6, 19, 19-d<sub>3</sub>); Vitamin D<sub>2</sub>-d<sub>3</sub> (6, 19, 19-d<sub>3</sub>); 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-d<sub>3</sub> (6, 19, 19-d<sub>3</sub>); 1 $\alpha$ , 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-d<sub>3</sub> (6, 19, 19-d<sub>3</sub>) und 7-Dehydrocholesterol-(25,26,26,26,27,27,27-d<sub>7</sub>)) als interne Standards dienten. Zur Auswertung wurden die Peakflächenverhältnisse (Analyt/Interner Standard) linear gegen die Konzentration aufgetragen.

## 12 Lebenslauf

### *Persönliche Daten*

---

Name	Philipp Heinz
Geburtsdatum / -ort	03.10.1990 in Erfurt
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig, keine Kinder

### *Beruflicher Werdegang*

---

seit 07/2018	Sachverständiger in der Produktanalytik bei DEKRA Automobil GmbH in Halle (Saale)
--------------	---

### *Wissenschaftlicher Werdegang*

---

05/2014 – 12/2017	wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg als Promotionsstudent, am Institut für Chemie, Lebensmittel- und Umweltchemie <i>Thema: „Synthese, Charakterisierung und Nachweis glycosidischer steroidaler Strukturen“</i>
-------------------	--

### *Bildungsweg*

---

10/2009 – 04/2014	Diplom der Lebensmittelchemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Abschluss: 1. Staatsexamen, Diplomlebensmittelchemiker <i>Thema der Diplomarbeit: „Einfluss von Singulett-Sauerstoff auf die Isomerisierung von Carotinoiden“</i>
07/2001 – 05/2009	Arnoldschule Gotha, Staatliches Gymnasium

### 13 Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich diese Dissertation „Synthese, Charakterisierung und Nachweis glycosidischer steroidaler Strukturen“ selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlichgemacht. Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung vorgelegt.

.....  
Datum, Unterschrift