

Institut für Pharmazeutische Biologie und Phytochemie

# **Kapillarelektrophoretische Untersuchungen an cyanogenen Glykosiden**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie und Pharmazie  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Petra Demmer  
aus Köln

- 2004 -

---

Dekan: Prof. Dr. Jens Leker

1. Gutachter: Prof. Dr. Adolf Nahrstedt

2. Gutachter: PD. Dr. Georg Hempel

Tage der mündlichen Prüfungen: 23.07., 27.07. und 28.07.2004

Tag der Promotion: 30.07.2004

„Jeder Tag, an dem Du nicht lächelst, ist ein verlorener Tag.“

*Charlie Chaplin*

## **Danksagungen:**

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazeutische Biologie und Phytochemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Nahrstedt angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. A. Nahrstedt für die Überlassung des Themas, für die zahlreichen Anregungen und Diskussionen sowie für die Unterstützung während der Fertigstellung dieser Arbeit.

Herrn Dr. M. Lechtenberg danke ich herzlich für die kompetente und kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Herrn Dr. H. Luftmann, Institut für Organische Chemie, WWU Münster, danke ich für die Aufnahme der MS-Spektren.

Weiterhin möchte ich danken:

Herzlich danken möchte ich allen Mitarbeitern, auch den Ehemaligen, für wertvolle und produktive Diskussionen sowie die freundliche Atmosphäre und Zusammenarbeit.

Mein ganz besonderer Dank gebührt Bettina Quandt für die sehr schöne und konstruktive Zusammenarbeit. Ebenso danken möchte ich allen, die mich durch alle mit dieser Arbeit verbundenen Hochs und Tiefs begleitet haben und damit einen sehr großen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben, ebenso wie durch ihre permanente, konstruktive und tatkräftige Unterstützung.

Den Gärtnern des Instituts danke ich für die Anzucht und Pflege von *Eschscholtzia californica* und *Sambucus nigra*. Auch möchte ich mich bei meinem Bruder Christian und Thorsten Bohg bedanken für das Mitbringen von Bambussprossen und Maniok aus Thailand bzw. Vietnam, denn sie haben mir damit die Untersuchung authentischen Pflanzenmaterials ermöglicht, ebenso wie Dr. João Carlos Palazzo de Mello durch das Übersenden von Maniok aus Brasilien.

Allen meinen Freunden, allen voran Verena, Susanne und Steffi, danke ich für die sehr lustige und schöne Studienzeit in Münster.

Der allergrößte Dank gehört meinen Eltern und meinen Lieblingsgeschwistern Claudi und Christian.

**Teile dieser Arbeit wurden publiziert:**

Demmer, P., Lechtenberg, M., Quandt, B., Nahrstedt, A.

*Determination of the cyanogenic compounds Triglochinin, Dhurrin and Taxiphyllin by  
Capillary Electrophoresis in Food*

Posterbeitrag; 51. Jahrestagung der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung,  
31. August – 04. September 2003, Kiel

---

**I. ALLGEMEINER TEIL**

<b><u>1</u></b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b><u>2</u></b>
<b><u>2</u></b>	<b><u>GRUNDLAGEN DER KAPILLARELEKTROPHORESE</u></b>	<b><u>3</u></b>
2.1	HISTORISCHE ENTWICKLUNG	3
2.2	GERÄTEAUFBAU	4
2.2.1	TRENNKAPILLARE UND SPANNUNGSVERSORGUNG	4
2.2.2	PROBENINJEKTION	5
2.2.3	DETEKTION	6
2.3	DAS TRENNPRINZIP DER KAPILLARELEKTROPHORESE	7
2.3.1	ELEKTROMIGRATION	7
2.3.2	ELEKTROOSMOSE	8
2.4	TRENNMODI	10
2.4.1	KAPILLARZONENELEKTROPHORESE (CZE)	10
2.4.2	MIZELLARE ELEKTROKINETISCHE CHROMATOGRAPHIE (MEKC)	11
2.4.3	ENANTIOMEREN- UND EPIMERENTRENNUNG MITTELS KAPILLARELEKTROPHORESE	12
2.4.4	WEITERE KAPILLARELEKTROPHORETISCHE VARIANTEN	14
<b><u>3</u></b>	<b><u>VALIDIERUNG</u></b>	<b><u>14</u></b>
3.1	ALLGEMEINE ASPEKTE DER VALIDIERUNG	14
3.2	VALIDIERUNGSPARAMETER	16
3.2.1	SPEZIFITÄT	16
3.2.2	ARBEITSBEREICH	16
3.2.3	LINEARITÄT	17
<b><u>4</u></b>	<b><u>CYANOGENE GLYKOSIDE UND CYANOGENESE</u></b>	<b><u>21</u></b>
4.1	ALLGEMEINES	21
4.2	KATABOLISMUS	23
4.3	BLAUSÄUREENTGIFTUNG	23
4.4	BIOGENESE	24
<b><u>5</u></b>	<b><u>PFLANZENMATERIAL</u></b>	<b><u>27</u></b>

<b>5.1</b>	<b>AUSWAHLKRITERIEN DES PFLANZENMATERIALS</b>	<b>27</b>
<b>5.2</b>	<b>VORSTELLUNG DER UNTERSUCHTEN PFLANZEN</b>	<b>29</b>
5.2.1	<i>BAMBUSA VULGARIS</i> , SCHRAD. EX J.C. WENDL., POACEAE	29
5.2.2	<i>ESCHSCHOLZIA CALIFORNICA</i> , L., PAPAVERACEAE	30
5.2.3	<i>HOLOCALYX BALANSAE</i> , MICH., CAESALPINIACEAE	30
5.2.4	<i>LINUM USITATISSIMUM</i> , L., LINACEAEA	31
5.2.5	<i>MANIHOT ESCULENTA</i> , CRANTZ, EUPHORBIACEAE	31
5.2.6	<i>PHASEOLUS LUNATUS</i> , L., FABACEAE	32
5.2.7	<i>SAMBUCUS NIGRA</i> , L., CAPRIFOLIACEAE	32

## **6 ZIELSETZUNG** **33**

### **II. SPEZIELLER TEIL**

#### **A AROMATISCHE, HYDROXYLIERTE CYANGLYKOSIDE** **36**

##### **1 P-HYDROXYLIERTE CYANGLYKOSIDE: DHURRIN UND TAXIPHYLLIN, ABGELEITET DAVON TRIGLOCHININ** **36**

<b>1.1</b>	<b>DHURRIN UND TAXIPHYLLIN, TRIGLOCHININ UND SEINE ISOMEREN</b>	<b>36</b>
<b>1.2</b>	<b>CHEMISCHE UND PHYSIKALISCHE EIGENSCHAFTEN</b>	<b>38</b>
<b>1.3</b>	<b>METHODENENTWICKLUNG ZUR TRENNUNG VON TRIGLOCHININ, DHURRIN UND TAXIPHYLLIN</b>	<b>39</b>
1.3.1	TRIGLOCHININ UND SEINE ISOMERE	41
1.3.2	TRENNUNG DES EPIMERENPAARES DHURRIN UND TAXIPHYLLIN	43
<b>1.4</b>	<b>WAHL DES INTERNEN STANDARDS</b>	<b>47</b>
<b>1.5</b>	<b>STABILITÄT IM GEWÄHLTEN PH-BEREICH</b>	<b>48</b>

#### **2 VALIDIERUNG** **50**

<b>2.1</b>	<b>SPEZIFITÄT</b>	<b>50</b>
<b>2.2</b>	<b>KALIBRATION</b>	<b>50</b>
<b>2.3</b>	<b>BESTIMMUNGS- UND NACHWEISGRENZE</b>	<b>52</b>
<b>2.4</b>	<b>RICHTIGKEIT UND PRÄZISION DER KALIBRIERUNG</b>	<b>52</b>

#### **3 BESTIMMUNG VON TAXIPHYLLIN, DHURRIN UND TRIGLOCHININ IN PFLANZENEXTRAKTEN** **55**

---

3.1	BESTIMMUNG VON TAXIPHYLLIN IN <i>BAMBUSA SPEC.</i>	55
3.2	BESTIMMUNG VON TRIGLOCHININ IN <i>ESCHSCHOLTZIA CALIFORNICA</i>	57
<b>4</b>	<b><u>HCN – BESTIMMUNG NACH ALDRIGE UND VERGLEICH MIT DEN ERGEBNISSEN DER CE-BESTIMMUNG</u></b>	<b>58</b>
<b>5</b>	<b><u>M – HYDROXYLIERTE CYANGLYKOSIDE: HOLOCALIN UND ZIERIN</u></b>	<b>60</b>
5.1	HOLOCALIN UND ZIERIN	60
5.2	CHEMISCHE UND PHYSIKALISCHE EIGENSCHAFTEN	61
5.3	METHODENENTWICKLUNG	61
<b>B</b>	<b><u>AROMATISCHE CYANGLYKOSIDE</u></b>	<b>63</b>
<b>6</b>	<b><u>SAMBUNIGRIN, PRUNASIN, AMYGDALIN, NEOAMYGDALIN</u></b>	<b>63</b>
6.1	PRUNASIN, SAMBUNIGRIN, AMYGDALIN, NEOAMYGDALIN	63
6.2	CHEMISCHE UND PHYSIKALISCHE EIGENSCHAFTEN	64
6.3	METHODENENTWICKLUNG ZUR TRENNUNG VON PRUNASIN, SAMBUNIGRIN, AMYGDALIN, NEOAMYGDALIN, HOLOCALIN UND ZIERIN	65
6.3.1	ALLGEMEINES	65
6.3.2	VORVERSUCHE ZUR ANTRENNUNG	66
6.3.3	SYSTEMATISCHE METHODENENTWICKLUNG	67
6.4	WAHL DES INTERNEN STANDARDS	73
<b>7</b>	<b><u>VALIDIERUNG</u></b>	<b>74</b>
7.1	SPEZIFITÄT	74
7.2	KALIBRATION	75
7.3	BESTIMMUNGS- UND NACHWEISGRENZE	76
7.4	RICHTIGKEIT UND PRÄZISION	76
<b>8</b>	<b><u>UNTERSUCHUNG VON PRUNASIN, SAMBUNIGRIN, AMYGDALIN, NEOAMYGDALIN, HOLOCALIN UND ZIERIN IN EXTRAKTEN</u></b>	<b>80</b>
8.1	BESTIMMUNG VON PRUNASIN IN <i>SAMBUCUS NIGRA</i> UND <i>HOLOCALYX BALANSAE</i>	80
8.2	BESTIMMUNG VON AMYGDALIN IN LAETRILE®	82

---

<b><u>9 HCN – BESTIMMUNG NACH ALDRIGE UND VERGLEICH MIT DEN ERGEBNISSEN DER CE-BESTIMMUNG</u></b>	<b>83</b>
<b><u>C ALIPHATISCHE CYANGLYKOSIDE</u></b>	<b>84</b>
<b><u>10 LINAMARIN, LOTAUSTRALIN, LINUSTATIN, NEOLINUSTATIN</u></b>	<b>84</b>
10.1 LINAMARIN, LOTAUSTRALIN, LINUSTATIN, NEOLINUSTATIN	84
10.2 CHEMISCHE UND PHYSIKALISCHE EIGENSCHAFTEN	85
10.3 DERIVATISIERUNG MIT PHTHALSÄUREANHYDRID BZW. NAPHTHOYLIMIDAZOL	86
10.3.1 DERIVATISIERUNG MIT PHTHALSÄUREANHYDRID ZUR EINFÜHRUNG EINES IONISCHEN UND UV-AKTIVEN CHROMOPHORS	86
10.3.2 DERIVATISIERUNG MIT NAPHTHOYLIMIDAZOL ZUR EINFÜHRUNG EINES FLUOROGENEN CHROMOPHORS	88
10.3.3 ÜBERPRÜFUNG DER VOLLSTÄNDIGEN DERIVATISIERUNG	90
10.4 KAPILLARELEKTROPHORETISCHE UNTERSUCHUNGEN DER PHTHALSÄURE- UND NAPHTHOYLDERIVATE VON LINAMARIN, LOTAUSTRALIN, LINUSTATIN UND NEOLINUSTATIN	94
10.4.1 METHODENENTWICKLUNG ZUR TRENNUNG DER NAPHTHOYLDERIVATE VON LINAMARIN, LOTAUSTRALIN, LINUSTATIN UND NEOLINUSTATIN PER CE	94
10.4.2 METHODENENTWICKLUNG ZUR TRENNUNG DER PHTHALSÄUREDERIVATE VON LINAMARIN, LOTAUSTRALIN, LINUSTATIN UND NEOLINUSTATIN PER CE	97
10.5 HPLC-METHODE ZUR QUANTIFIZIERUNG DER ALIPHATISCHEN CYANGLYKOSIDE LINAMARIN, LOTAUSTRALIN, LINUSTATIN UND NEOLINUSTATIN NACH DERIVATISIERUNG MIT NAPHTHOYLIMIDAZOL	99
10.6 WAHL DES INTERNEN STANDARDS	102
<b><u>11 VALIDIERUNG DER HPLC-METHODE</u></b>	<b>104</b>
11.1 SPEZIFITÄT	104
11.2 KALIBRATION	104
11.3 BESTIMMUNGS- UND NACHWEISGRENZE	105
11.4 RICHTIGKEIT UND PRÄZISION DER KALIBRIERUNG	105
<b><u>12 BESTIMMUNG VON LINAMARIN, LOTAUSTRALIN, LINUSTATIN UND NEOLINUSTATIN IN PFLANZENEXTRAKTEN</u></b>	<b>107</b>

---

<b>12.1</b>	<b>BESTIMMUNG VON LINUSTATIN UND NEOLINUSTATIN IN LEINSAMEN</b>	<b>108</b>
<b>12.2</b>	<b>BESTIMMUNG VON LINAMARIN UND LOTAUSTRALIN IN PFLANZENEXTRAKTEN</b>	<b>109</b>
<b><u>13 HCN-BESTIMMUNG NACH ALDRIGE UND VERGLEICH DEN ERGEBNISSEN DER HPLC-QUANTIFIZIERUNG</u></b>		<b>113</b>
<b><u>14 DISKUSSION DER ERGEBNISSE</u></b>		<b>115</b>
<b>14.1</b>	<b>ÜBERSICHT</b>	<b>118</b>
<b>14.2</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION DER EINZELNEN METHODEN</b>	<b>118</b>
14.2.1	TAXIPHYLLIN/DHURRIN/TRIGLOCHININ	118
14.2.2	PRUNASIN/SAMBUNIGRIN, HOLOCALIN/ZIERIN, AMYGDALIN/NEOAMYGDALIN	119
14.2.3	LINAMARIN/LOTAUSTRALIN/LINUSTATIN/NEOLINUSTATIN	120
<b><u>III. EXPERIMENTELLER TEIL</u></b>		
<b><u>1 ALLGEMEINES ZUR KAPILLARELEKTROPHORESE</u></b>		<b>123</b>
<b>1.1</b>	<b>HERSTELLUNG DER PUFFER FÜR DIE KAPILLARELEKTROPHORESE</b>	<b>123</b>
<b>1.2</b>	<b>KONDITIONIERUNG VON NEUEN CE-KAPILLAREN</b>	<b>123</b>
<b>1.3</b>	<b>TESTMETHODE FUNKTIONSFÄHIGKEIT</b>	<b>123</b>
<b>1.4</b>	<b>WEITERE SPÜLVERFAHREN</b>	<b>125</b>
<b><u>2 ALLGEMEINES ZU DEN METHODENENTWICKLUNGEN</u></b>		<b>125</b>
<b>2.1</b>	<b>ALLGEMEINES ZUR METHODENENTWICKLUNG</b>	<b>125</b>
<b>2.2</b>	<b>GERÄTE</b>	<b>125</b>
<b>2.3</b>	<b>VERGLEICHE</b>	<b>125</b>
2.3.1	EPIMERISIERUNG DER CYANGLYKOSIDE	126
2.3.2	DERIVATISIERUNGEN	127
<b>2.4</b>	<b>EXTRAKTE</b>	<b>128</b>
2.4.1	EXTRAKTIONSMETHODEN	128
<b><u>3 TAXIPHYLLIN UND DHURRIN, TRIGLOCHININ UND SEINE ISOMERE</u></b>		<b>130</b>
<b>3.1</b>	<b>VALIDIERTE METHODE</b>	<b>130</b>
<b>3.2</b>	<b>METHODENENTWICKLUNG</b>	<b>130</b>

---

3.2.1	ACETATPUFFER	130
3.2.2	PHOSPHATPUFFER (SØRENSEN)	131
3.2.3	BORAT-PUFFER	131
<b>3.3</b>	<b>KALIBRATION FÜR TAXIPHYLLIN UND TRIGLOCHININ</b>	<b>132</b>
3.3.1	PIPETTIERSCHEMA	132
3.3.2	KALIBRATIONSGERADEN	133
<b>3.4</b>	<b>DATEN ZUR RICHTIGKEIT UND PRÄZISION FÜR TRIGLOCHININ UND TAXIPHYLLIN/DHURRIN</b>	<b>134</b>
3.4.1	PIPETTIERSCHEMA	134
<b>3.5</b>	<b>DHURRIN – ABBAU</b>	<b>136</b>
<b>3.6</b>	<b>DATEN ZUR UNTERSUCHUNG DER EXTRAKTE</b>	<b>136</b>
3.6.1	BAMBUS	137
3.6.2	BAMBUS2-SPITZE (VIETNAM)	140
3.6.3	BAMBUS, GANZ, THAILAND	141
3.6.4	ESCHSCHOLTZIA CALIFORNICA	142
<b><u>4</u></b>	<b><u>HOLOCALIN UND ZIERIN</u></b>	<b><u>143</u></b>
4.1	ENTWICKELTE METHODE	143
<b><u>5</u></b>	<b><u>PRUNASIN, SAMBUNIGRIN, AMYGDALIN, NEOAMYGDALIN, HOLOCALIN UND ZIERIN</u></b>	<b><u>143</u></b>
5.1	VALIDIERTE METHODE	143
5.2	METHODENENTWICKLUNG	144
5.3	KALIBRATION FÜR PRUNASIN UND HOLOCALIN	144
5.3.1	PIPETTIERSCHEMA	144
5.3.2	KALIBRATIONSGERADEN	145
5.4	DATEN ZUR RICHTIGKEIT UND PRÄZISION FÜR HOLOCALIN UND PRUNASIN	146
5.4.1	PIPETTIERSCHEMA	146
5.5	DATEN ZUR UNTERSUCHUNG DER EXTRAKTE	148
5.5.1	HOLUNDER	148
5.5.2	HOLOCALYX BALANSAE	149
<b><u>6</u></b>	<b><u>LINAMARIN, LOTAUSTRALIN, LINUSTATIN, NEOLINUSTATIN</u></b>	<b><u>150</u></b>
6.1	VALIDIERTE METHODE	150

---

<b>6.2 HPLC-METHODENENTWICKLUNG</b>	<b>150</b>
6.2.1 MEOH-H <sub>2</sub> O-GRADIENT	151
6.2.2 MeCN-(H <sub>2</sub> O/0,1 %TFA)-ISOPROPANOL-GRADIENT	151
<b>6.3 KALIBRATION FÜR LINAMARIN</b>	<b>151</b>
6.3.1 PIPETTIER-SCHEMA KALIBRATION	152
6.3.2 KALIBRATIONSGERADE LINAMARIN	152
<b>6.4 DATEN ZUR RICHTIGKEIT UND PRÄZISION FÜR LINAMARIN</b>	<b>152</b>
6.4.1 PIPETTIERSCHEMA	153
<b>6.5 DATEN ZUR UNTERSUCHUNG DER EXTRAKTE</b>	<b>154</b>
6.5.1 UNTERSUCHUNGEN ZUR EXTRAHIERBARKEIT	154
6.5.2 LEINSAMEN	155
6.5.3 LIMABOHNE	156
6.5.4 MANIOK THAILAND	157
6.5.5 MANIOK BRASILIEN	158
<b>6.6 CE-METHODENENTWICKLUNG FÜR DIE DERIVATE</b>	<b>159</b>
6.6.1 PUFFER	159
6.6.2 MIKROEMULSION (NACH ALTRIA, 1999)	159
<b><u>7 BLAUSÄURE-BESTIMMUNGEN</u></b>	<b><u>159</u></b>
7.1 QUANTITATIVE BLAUSÄUREBESTIMMUNG	159
7.2 QUALITATIVE BLAUSÄUREBESTIMMUNGEN	160
7.2.1 QUALITATIVER NACHWEIS MIT DEM FEIGL-ANGER-TEST	160
7.2.2 QUALITATIVER NACHWEIS MITTELS PIKRAT- BZW. SANDWICH-TEST	161
<b><u>8 DÜNNSCICHTCHROMATOGRAPHIE</u></b>	<b><u>162</u></b>
8.1 DETEKTIONSVERFAHREN	163
8.1.1 BETRACHTUNG UNTER UV-LICHT	163
8.1.2 ANISALDEHYD-SCHWEFELSÄURE-REAGENZ	164
<b><u>9 HERKUNFT DES PFLANZENMATERIALS</u></b>	<b><u>165</u></b>
<b><u>10 MATERIAL UND METHODEN</u></b>	<b><u>165</u></b>
10.1 GERÄTE	165
10.2 ALLGEMEINE LABORGERÄTE	166

---

<b>10.3</b>	<b>CE-MATERIALIEN</b>	<b>166</b>
10.3.1	PUFFER-CHEMIKALIEN	166
10.3.2	ADDITIVE	167
<b>10.4</b>	<b>HPLC-MATERIALIEN</b>	<b>168</b>
10.4.1	LÖSUNGSMITTEL UND LÖSUNGEN	168
<b>10.5</b>	<b>WEITERE CHEMIKALIEN UND ZUBEREITUNGEN</b>	<b>168</b>

#### **IV. ANHANG**

<b><u>1</u></b>	<b><u>ALLGEMEINE PHYSIKALISCHE GRÖßEN</u></b>	<b><u>170</u></b>
<b><u>2</u></b>	<b><u>PHYSIKALISCHE KONSTANTEN</u></b>	<b><u>170</u></b>
<b><u>3</u></b>	<b><u>ELEKTROPHORETISCHE KENNGRÖßEN</u></b>	<b><u>171</u></b>
<b><u>4</u></b>	<b><u>STATISTISCHE KENNGRÖßEN</u></b>	<b><u>171</u></b>
<b><u>5</u></b>	<b><u>ABKÜRZUNGEN</u></b>	<b><u>172</u></b>

#### **V. LITERATURVERZEICHNIS**

## *I. Allgemeiner Teil*

# 1 Einleitung

Die Kapillarelektrophorese (CE) stellt als innovative und leistungsfähige Analysenmethode neben der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) und der Gaschromatographie (GC) die dritte große analytische Trenntechnik dar, die innerhalb der letzten 50 Jahre kommerziell eingeführt wurde [ISSAQ, 2000].

Die Anwendungsmöglichkeiten der CE sind breit gefächert und erstrecken sich auf die Analytik sowohl von Makromolekülen (Proteine [DOLNÍK, 1999; MANABE, 1999] und Peptiden [KAŠIÈKA, 1999], DNA [SLATER et al., 1999; HELLER, 2001]) als auch von „kleinen“ Molekülen (Naturstoffe [ISSAQ, 1999; SUNTORNSUK, 2002], Lebensmittelinhalts- und Zusatzstoffe [BOYCE, 1999; LINDEBERG, 1996; SUBBULAKSHMI und CHITRA, 1996], Arzneistoffe [THORMANN und CASLAVSKA, 1998; NISHI, 1999], Metaboliten und Pestizide [KARCHER und EL RASSI, 1998] u.a.) und sogar einzelnen Ionen [TIMERBAEV und SHPIGUN, 2000; TIMERBAEV, 2002]. Letztendlich stellt auch die chirale Analytik eine Domäne der CE dar [CHANKVETADZE, 1997; VESPALEC und BOÈEK, 1999].

Im Gegensatz zur HPLC, der immer noch meistverbreitetsten Trenntechnik, bei der die Trennung auf Adsorptionsvorgängen an einer stationären Phase bzw. auf Verteilungsvorgängen zwischen einer stationären und einer mobilen Phase beruht, besitzt die CE ein dazu komplementäres, elektrophoretisches Trennprinzip, weshalb sich beide Techniken in idealer Weise ergänzen.

Die CE zeichnet sich gegenüber der HPLC durch meist kürzere Analysenzeiten und eine deutlich höhere Trenneffizienz aus [HARRIS, 1997]. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß bei der CE i.d.R. wässrige Puffersysteme Verwendung finden, so daß keine Kosten für die Entsorgung großer Mengen organischer Lösungsmittel anfallen. Das benötigte Probenvolumen beträgt nur wenige Nanoliter, was insbesondere dann von Bedeutung ist, wenn keine größeren Probenmengen zur Verfügung stehen oder gewonnen werden können. Darüber hinaus sind Untersuchungen in biologischen Matrices in vielen Fällen direkt und ohne aufwendige Probenvorbereitung möglich [KUNKEL und WÄTZIG, 1999].

Besonders für den Bereich der lebensmittelchemischen und pharmazeutischen Analytik stellt die CE somit eine attraktive Technik dar, da der Bedarf an schnellen qualitativen und quantitativen Analysen von immer kleiner werdenden Substanzmengen in immer komplexeren Gemischen stetig wächst. Hierbei ist vor allem der Nachweis von beispielsweise toxikologisch relevanten Inhaltsstoffen in biologischen Matrices

(Naturstoffe aus Pflanzenmaterial, Lebensmitteln oder Extrakten, aber auch Wirkstoffe und deren Metaboliten in Plasma, Urin, Gewebe u.a.) von Bedeutung.

Den entscheidenden Nachteil der CE stellt ihre relativ geringe Empfindlichkeit dar, da die meistverwendeten Detektoren nach dem Absorptionsprinzip arbeiten und aufgrund des kurzen Lichtwegs innerhalb der Kapillaren von nur 25 bis 100  $\mu\text{m}$  relativ unempfindlich sind [SWINNEY und BORNHOP, 2000]. Insbesondere die Analytik niedrigkonzentrierter Analyten wird hierdurch erschwert.

## 2 Grundlagen der Kapillarelektrophorese

### 2.1 Historische Entwicklung

Geladene Teilchen wandern in Lösung unter dem Einfluss eines angelegten elektrischen Feldes mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten in unterschiedliche Richtungen. Diese mit dem Begriff Elektrophorese bezeichneten Ionenwanderungen wurden bereits 1897 von KOHLRAUSCH untersucht, der auch die physikalischen Gesetzmäßigkeiten dafür beschrieb [KOHLRAUSCH, 1897]. Dieses Prinzip als praktikables Analyseverfahren zu nutzen war allerdings erst möglich, nachdem es gelang, die durch Diffusion hervorgerufene Verbreiterung der Probenzonen in der Lösung weitgehend zu unterdrücken.

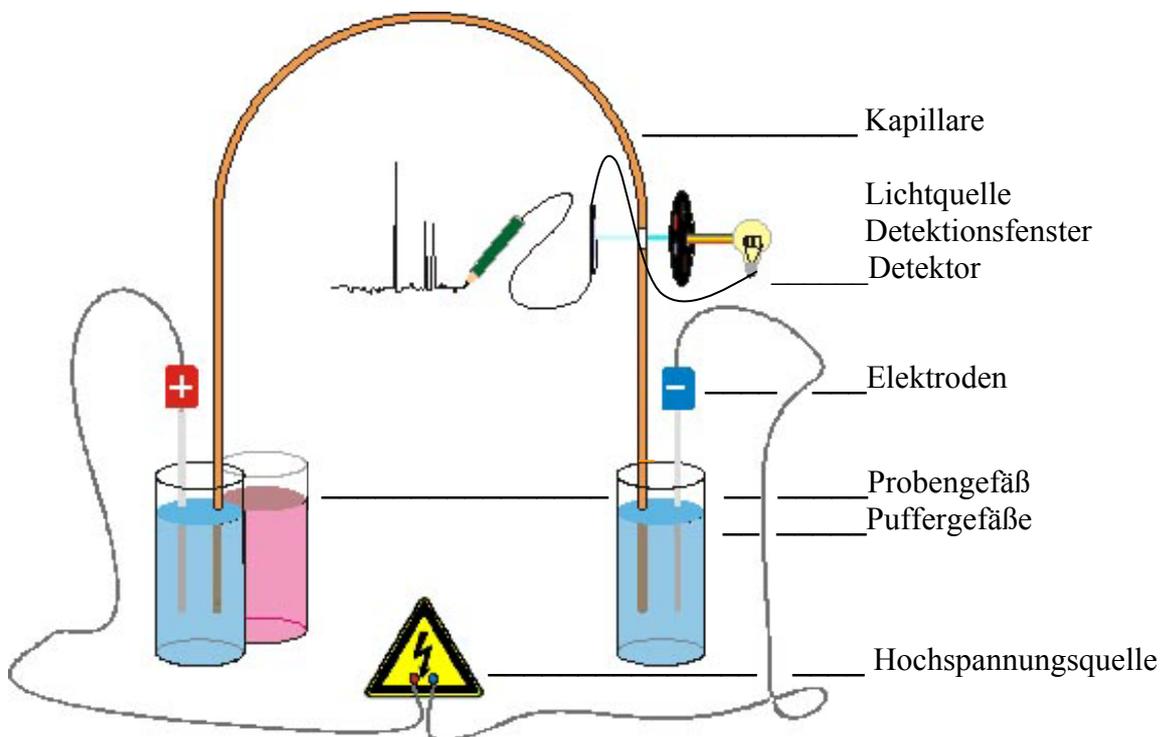
Dies geschieht zum einen durch die Verwendung von stabilisierenden Gelen, die auf eine Glasplatte gegossen werden (Gelelektrophorese), und zum anderen durch die Durchführung der Elektrophorese in dünnen Glaskapillaren (Kapillarelektrophorese, engl. Capillary Electrophoresis, CE). Bedingt durch die kleinen Innendurchmesser der Kapillaren (25 bis 100  $\mu\text{m}$ ) sind Konvektionsströme relativ gering, und die bezogen auf das Innenvolumen große Oberfläche der Kapillaren erlaubt den schnellen und effektiven Abtransport der entstehenden JOULE'schen Wärme, so daß relativ hohe Spannungen angelegt werden können und somit ausreichend hohe Analysengeschwindigkeiten möglich sind.

Die erste Trennung in einer offenen Glasröhre wurde 1967 von HJERTÉN beschrieben, der die Stabilisierung der Lösung durch Rotation des Rohres um seine Achse erreichte [HJERTÉN, 1967]. Die eigentliche Entwicklung der Kapillarelektrophorese begann daraufhin mit den Pionierarbeiten von MIKKERS und EVERLAERTS [MIKKERS et al., 1979] sowie von JORGENSON und LUKACS [JORGENSON und LUKACS, 1981] gegen Ende der 70er bzw. zu Beginn der 80er Jahre.

Seit 1989 sind die ersten Geräte kommerziell verfügbar. Nach einem rasanten Aufschwung in den letzten 10 Jahren überzeugt diese Analysetechnik heute neben ihrer hohen Trenneffizienz und Geschwindigkeit der Trennung besonders durch Wirtschaftlichkeit und sehr geringen Probenbedarf. Zahlreiche Anwendungsbeispiele belegen die Vielfalt der Einsatzmöglichkeiten der CE – von einzelnen Atomen bis hin zu Makromolekülen, sowohl für geladene als auch für ungeladene Moleküle.

## 2.2 Geräteaufbau

Ein Kapillarelektrophoresegerät besteht im Wesentlichen aus einer Hochspannungsquelle, einer Trennkapillare und einem Detektor (s. *Abb. I.1*).



*Abb. I.1: Schematischer Aufbau einer CE-Apparatur*

### 2.2.1 Trennkapillare und Spannungsversorgung

Eine zur Erhöhung der Stabilität auf der Außenseite mit Polyimid überzogene Trennkapillare mit einem Innendurchmesser (ID) von typischerweise 50–100  $\mu\text{m}$  und einem Außendurchmesser (OD) von 365  $\mu\text{m}$  überbrückt die beiden Puffergefäße, zwischen denen mittels Platinelektroden eine Hochspannung von bis zu 30 kV angelegt wird. Das

sich ausbildende elektrische Feld bewirkt einen Stromfluss in der Größenordnung von etwa 10-200  $\mu\text{A}$ . Zur Charakterisierung der Kapillare ist neben der Angabe der Gesamtlänge auch die der effektiven Länge erforderlich. Als Gesamtlänge  $l_{ges}$  wird die Länge der Kapillare bezeichnet. Die effektive Länge  $l_{eff}$  ist die für die Trennung relevante Strecke zwischen Kapillaranfang und dem in die Polyimidschicht eingebrannten Detektionsfenster. Die durch den Stromfluss erzeugte Wärme wird je nach verwendetem Gerät durch Thermostatisierung der Kapillare mittels Luft- oder FKW-Flüssigkühlung abgeführt [HARRIS, 1997].

### 2.2.2 Probeninjektion

Die Probeninjektion erfolgt üblicherweise an der anodischen Seite der Kapillare. Von Bedeutung sind hierbei die hydrodynamische und die elektrokinetische Injektion. Bei der Erstgenannten werden durch kurzzeitigen Stickstoffüberdruck auf das Probenvial einige nl der Probe in die Kapillare gedrückt. Das Injektionsvolumen  $V$  kann hierbei nach dem Gesetz von HAGEN-POISEUILLE folgendermaßen berechnet werden:

$$V = \frac{\Delta p \cdot \pi \cdot t \cdot r^4}{8 \cdot \eta \cdot l_{ges}} \quad (2.1)$$

( $p$ : Druckdifferenz,  $r$ : Radius des Kapillarlumens,  $t$ : Injektionsdauer,  $\eta$ : Viskosität des Laufpuffers,  $l_{ges}$ : Kapillarlänge)

Die Viskosität des die Kapillare ausfüllenden Laufpuffers ist im Allgemeinen nicht genau bekannt, bei den Berechnungen dieser Arbeit wurde deshalb näherungsweise die Viskosität von Wasser bei 20° C (1 mPas) zugrunde gelegt.

Da nur wenige nl der Probe in die Kapillare überführt werden, ist ein Probenvolumen von einigen  $\mu\text{l}$  (auch für wiederholte Messungen) prinzipiell ausreichend. Die Gefahr der Probenverdunstung ist bei diesen geringen Volumina allerdings groß, zumal die Verschlüsse für die Probenvials üblicherweise perforiert sind und somit nicht dicht abschließen.

Bei der elektrokinetischen Injektion migrieren die geladenen Probenbestandteile durch kurzzeitiges Anlegen einer Spannung in die Kapillare. Da hierbei relativ mehr geladene Analytmoleküle als neutrale Lösungsmittelmoleküle in die Kapillare wandern, findet während der Injektion eine Aufkonzentrierung der Analyten statt. Nachteilig hierbei ist die Diskriminierung von Analyten in Abhängigkeit ihrer unterschiedlichen Mobilitäten. Aus einer einzigen Probe kann daher keine zweite Injektion erfolgen, da sich durch die Injektion die Zusammensetzung dieser Probe ändert.

### 2.2.3 Detektion

Im Gegensatz zur HPLC oder GC, bei der die Detektion der Analyten nach der Trennung erfolgt (end-column), findet in der CE die Detektion üblicherweise on-column statt, d.h. die Analyten werden noch während der Trennung durch das Detektionsfenster der Kapillare detektiert [SWINNEY und BORNHOP, 2000]. Dies ist bei der CE von Vorteil, da somit die Hochspannung ohne Probleme geerdet werden kann. Nachteilig ist hingegen der Effekt, daß diejenigen Analyten, die nur langsam durch die Kapillare und somit auch durch das Detektionsfenster migrieren, schon allein deshalb bei der Detektion eine größere Peakfläche ergeben als schneller migrierende Analyten, weil sie länger im Detektionsfenster verweilen. Daher müssen bei der on-column Detektion die erhaltenen Peakflächen ( $PA$ ) entsprechend Gl. 2.2 um die beobachtete Migrationsgeschwindigkeit  $v_{app}$  (s. Abschnitt 2.3.2) des entsprechenden Analyten korrigiert werden, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

$$\text{korrigierte Peakfläche (CPA)} = \frac{\text{Peakfläche (PA)}}{v_{app}} = \frac{\text{Peakfläche (PA)} \times l_{eff}}{t_m} \quad (2.2)$$

Alle Berechnungen der vorliegenden Arbeit wurden unter Verwendung dieser korrigierten Peakflächen ( $CPA$ ) durchgeführt.

Die UV-Absorptionsdetektion ist aufgrund ihrer Robustheit und universellen Einsetzbarkeit das am häufigsten angewandte Detektionsprinzip in der CE. Der Diodenarray-Detektor eignet sich insbesondere, um Peaks anhand ihrer UV-Spektren identifizieren zu können. Beide Detektionsmöglichkeiten erreichen eine sehr hohe Massensensitivität mit Nachweisgrenzen im Bereich von  $10^{-13}$  bis  $10^{-15}$  mol, die Konzentrationsempfindlichkeit ist jedoch aufgrund des kleinen Injektionsvolumens und des kurzen Detektionsweges, der durch den Innendurchmesser der Kapillare begrenzt wird, mit  $10^{-6}$  bis  $10^{-8}$  mol/l eher gering.

Um die Konzentrationsempfindlichkeit der CE zu erhöhen, sind verschiedene Strategien beschrieben worden, [HEMPEL, 2000]. Neben Versuchen, den Lichtweg innerhalb der Kapillare zu verlängern (bubble cell, Z-Zelle [CHERVET et al., 1991]), ist auch die laserinduzierte Fluoreszenzdetektion (LIF-Detektion) geeignet, die mangelnde Empfindlichkeit zu verbessern [COUDERC et al., 1998].

## 2.3 Das Trennprinzip der Kapillarelektrophorese

### 2.3.1 Elektromigration

Das Trennprinzip der Kapillarelektrophorese beruht auf der unterschiedlichen Wanderungsrichtung und -geschwindigkeit der einzelnen Ionen im elektrischen Feld. Diese sind abhängig von ihrer Ladung und Größe und beruhen auf den im Folgenden beschriebenen physikalischen Gesetzmäßigkeiten.

Im elektrischen Feld unterliegt ein Ion der Beschleunigungskraft  $\vec{F}$ :

$$\vec{F} = z \cdot e \cdot E \quad (2.3)$$

wobei  $z$  die effektive Ladung des Ions,  $e$  die Elementarladung und  $E$  die elektrische Feldstärke darstellt. Dieser Kraft stellt sich die Reibungskraft  $\vec{F}$ , die vereinfachend durch das STOKES'sche Gesetz dargestellt werden kann, entgegen:

$$\vec{F} = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad (2.4)$$

Hierbei ist  $\eta$  die dynamische Viskosität des umgebenden Lösungsmittels,  $r$  der STOKES'sche Radius des Ions, der auch die Solvathülle beinhaltet, und  $v$  die Geschwindigkeit des Ions. Im dynamischen Gleichgewicht gilt  $\vec{F} = \vec{F}$ , also:

$$z \cdot e \cdot E = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad (2.5)$$

Die Ionen bewegen sich dann mit einer konstanten, zur elektrischen Feldstärke proportionalen Wanderungsgeschwindigkeit  $v$ , wobei der Proportionalitätsfaktor die elektrophoretische Mobilität  $\mu$  eines einzelnen Ions in einer bestimmten Umgebung beschreibt.

$$v = \frac{z \cdot e}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \cdot E \quad (2.6)$$

$$\mu = \frac{z \cdot e}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (2.7)$$

Experimentell bestimmt werden kann die Wanderungsgeschwindigkeit eines Ions, indem man die zurückgelegte Wegstrecke (= effektive Kapillarlänge  $l_{eff}$ ) durch die Migrationszeit  $t_m$  des Peaks dividiert.

$$v = \frac{l_{eff}}{t_m} \quad (2.8)$$

Berücksichtigt man zudem, daß sich die elektrische Feldstärke  $E$  durch den Quotienten aus angelegter Spannung  $U$  und der Gesamtlänge der Kapillarlänge  $l_{ges}$  ergibt, kann die elektrophoretische Mobilität eines Ions aus den experimentellen Daten nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$\mu = \frac{l_{ges} \cdot l_{eff}}{U \cdot t_m} \quad (2.9)$$

Die elektrophoretische Mobilität besitzt demnach die Dimension  $[\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}]$ .

### 2.3.2 Elektroosmose

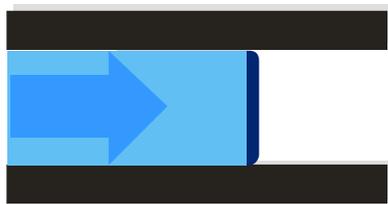
Während die zuvor beschriebene elektrophoretische Migration die Trennung von Teilchen unterschiedlicher Mobilität bewirkt, verursacht die Elektroosmose einen Fluss der Pufferlösung im elektrischen Feld. Dieser elektroosmotische Fluss (EOF) ist für alle Teilchen gleich stark und gleich gerichtet und in der Kapillarelektrophorese häufig stärker als die elektrophoretische Wanderung.

Hervorgerufen wird dieses Phänomen durch die pH-abhängige Dissoziation der Silanolgruppen an der Innenwand der Quarzkapillare bei Kontakt mit dem Laufpuffer (Unter „Puffer“ ist hier sowie im weiteren Verlauf der Arbeit kein Puffer im chemischen Sinne zu verstehen, sondern der eingesetzte Trennelektrolyt). Hierdurch erhält die Kapillarwand einen Überschuss an negativen Ladungsträgern. Insgesamt gesehen ist die Kapillare jedoch elektrisch neutral, so daß ein Kationenüberschuss im Laufpuffer resultiert. Durch elektrostatische Anziehung lagern sich die Kationen der Pufferlösung an die Kapillarwand an, und zwar zum einen in Form einer fest gebundenen, unbeweglichen HELMHOLTZ-Schicht direkt an der Kapillaroberfläche und zum anderen in einer diffusen, beweglichen DEBYE-HÜCKEL-Schicht in weiterem Abstand zur Kapillarwand. Das sich ausbildende elektrische Potential, das als  $\xi$ -Potential bezeichnet wird, fällt innerhalb der Helmholtz-Schicht linear und innerhalb der DEBYE-HÜCKEL-Schicht auf kurzer Distanz exponentiell bis hin zum eigentlichen Elektrolyten hin ab [ADAMSON, 1982].

Beim Anlegen eines elektrischen Feldes parallel zur Kapillaroberfläche beginnen sich die Kationen der diffusen Grenzschicht in Richtung Kathode zu bewegen. In Quarzkapillaren mit hinreichend geringem Innendurchmesser ziehen nun die Kationen durch ihre Solvathüllen den gesamten Laufpuffer in Abhängigkeit von seiner Viskosität mit.

Da die treibende Kraft für den EOF nur von der den Laufpuffer ringförmig umgebenden DEBYE-HÜCKEL-Schicht ausgeht, bildet sich ein flaches, stempelförmiges Strömungsprofil aus. Eine Peakverbreiterung, wie sie bei den in chromatographischen Verfahren

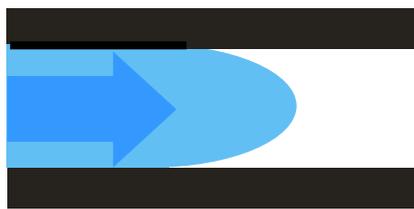
vorkommenden hydrodynamischen Flüssen mit parabelförmigem, HAGEN-POISEUILLE'schem Strömungsprofil üblich ist, tritt hier nicht auf (*Abb. I.2*).



EOF

stempelförmiges Strömungsprofil:  
schmale Probenzone (schmaler Peak)

■ \_\_\_\_\_ zu erwartende Peakbreite



HPLC

laminare Strömung mit typischem,  
parabelförmigen Strömungsprofil:  
Bandenverbreiterung (breiter Peak)

■ \_\_\_\_\_ zu erwartende Peakbreite

*Abb. I.2: Verschiedene Strömungsprofile und daraus resultierende unterschiedliche Peakbreiten*

Hierdurch ist insbesondere die im Vergleich zur HPLC höhere Trennleistung der CE begründet.

Die Wanderungsgeschwindigkeit des EOF  $v_{EOF}$  ist abhängig von der Dielektrizitätszahl ( $\epsilon_r$  = relative Dielektrizitätszahl,  $\epsilon_0$  = Dielektrizitätszahl im Vakuum) und der dynamischen Viskosität  $\eta$  des Laufpuffers, vom  $\zeta$ -Potential, sowie natürlich von der angelegten elektrischen Feldstärke  $E$  und lässt sich analog Gl. 2.6 folgendermaßen beschreiben:

$$v_{EOF} = \frac{\epsilon_r \cdot \epsilon_0 \cdot \xi}{4\pi \cdot \eta} \cdot E \quad (2.10)$$

Hieraus leitet sich die Mobilität des EOF  $\mu_{EOF}$  analog Gl. 2.7 wie folgt her:

$$\mu_{EOF} = \frac{\epsilon_r \cdot \epsilon_0 \cdot \xi}{4\pi \cdot \eta} \quad (2.11)$$

Aus den vorstehenden Ausführungen ergibt sich, daß sich die beobachtete Geschwindigkeit eines Teilchens  $v_{app}$  im kapillarelektrophoretischen System aus der

vektoriellen Addition der elektrophoretischen Eigengeschwindigkeit  $v$  des Teilchens und der Geschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses  $v_{EOF}$  ergibt.

$$V_{app} = v + v_{EOF} \quad (2.12)$$

Analog gilt für die scheinbare Mobilität  $\mu_{app}$  eines Teilchens:

$$\mu_{app} = \mu + \mu_{EOF} \quad (2.13)$$

Da der EOF durch einen durch die Dissoziation der Silanolgruppen bedingten Kationenüberschuss im Laufpuffer entsteht, bildet er sich prinzipiell in Richtung Kathode aus. Kationen migrieren dadurch schneller als die mit dem EOF passiv wandernden Neutralteilchen, die nicht getrennt werden. Ist die Geschwindigkeit des EOF betragsmäßig größer als die Eigengeschwindigkeit eines Anions, können selbst diese zur Kathode migrieren und bei Normalpolung detektiert werden. Diesen Effekt macht man sich in der CE häufig zunutze, um Kationen und Anionen in einem Lauf nebeneinander zu bestimmen. Der EOF kann durch die Wahl der Trennbedingungen und durch Veränderungen der inneren Kapillaroberfläche in weiten Bereichen modifiziert werden. Da die Dissoziation der Silanolgruppen mit steigendem pH-Wert des Puffers zunimmt und somit das  $\xi$ -Potential größer wird, steigt ebenfalls die Geschwindigkeit des EOF. Bei Erhöhung der Ionenstärke des Laufpuffers hingegen wird die Dissoziation der Silanolgruppen zurückgedrängt, demzufolge sinken  $\xi$ -Potential und  $v_{EOF}$ . Durch Zugabe von organischen Lösungsmitteln, sog. Modifiern wie Methanol oder Acetonitril kann der EOF verringert, durch dynamische oder permanente Oberflächenbeschichtung unterbunden [GILGES et al., 1994; LIAO et al., 1995] und durch Zusatz von kationischen Tensiden (Tetraalkylammoniumsalzen), die an die Kapillarwand adsorbieren, sogar umgekehrt werden [OTSUKA et al., 1985; CROSBY und EL RASSI, 1993].

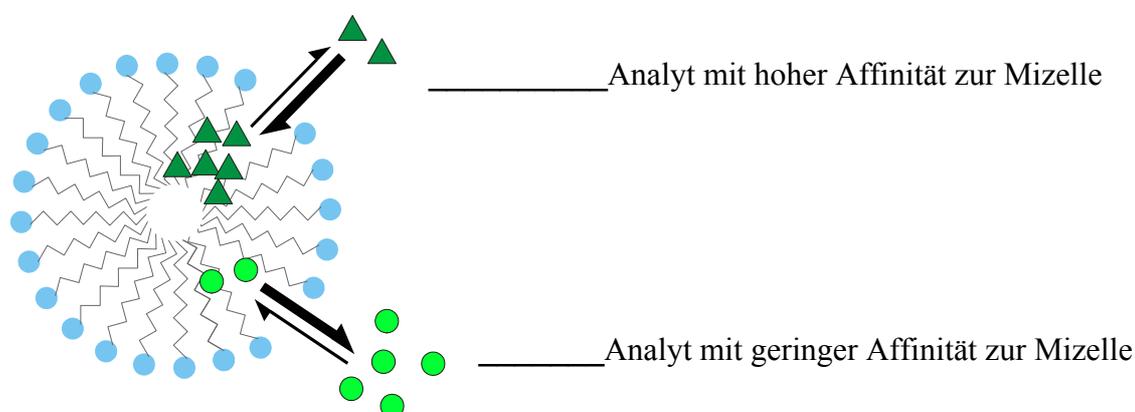
## 2.4 Trennmodi

### 2.4.1 Kapillarzonenelektrophorese (CZE)

Die Kapillarzonenelektrophorese stellt die originäre Form der CE dar, die in ausschließlich mit Elektrolyt gefüllten Kapillaren durchgeführt wird und bei der das Trennprinzip rein elektrophoretisch ist, d.h. die Trennung nur auf den elektrophoretischen Mobilitätsdifferenzen der Analyten beruht. Im Folgenden werden daher die Begriffe Kapillarelektrophorese (CE) und Kapillarzonenelektrophorese (CZE) weitgehend synonym verwendet.

### 2.4.2 Mizellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC)

Die mizellare elektrokinetische Chromatographie wurde 1985 durch TERABE erstmalig beschrieben [TERABE et al., 1985] und dient insbesondere dazu, auch elektrisch neutrale Analyten kapillarelektrophoretisch voneinander trennen zu können. Dem Laufpuffer werden hierbei Mizellbildner zugesetzt und die Analyten verteilen sich zwischen Puffer und den Mizellen entsprechend ihrer Hydrophilie. In einer Konzentration oberhalb der CMC (kritische mizellbildende Konzentration) bilden Tenside aufgrund ihres hydrophoben Restes Mizellen aus, wobei es verschiedene Modellannahmen gibt zur Art der Mizellen-Struktur: Tröpfchen-Struktur, Tensidblock-Struktur oder Bilayerfragment-Struktur [FROMHERZ, 1981]. Diese Aggregate haben im Inneren hydrophoben Charakter und sind im Falle des Einsatzes von anionischen oder kationischen Tensiden nach außen hin geladen. Die Anzahl an Tensidmonomeren, aus denen eine Mizelle aufgebaut ist, wird Aggregationszahl (AZ) genannt. In Lösung sind Mizellen ein dynamisches Gebilde, welches im dynamischen Gleichgewicht mit seinen Monomeren steht, es werden also durch den Austausch an Monomeren ständig neue Mizellen generiert. Somit stellt die AZ nur einen Mittelwert dar. Die Trennung beruht auf der Mobilität der wegen des hauptsächlichen Einsatzes anionischer Mizellbildner meist negativ geladenen Mizellen (z.B.. Natriumdodecylsulfat) und dem Transport der Analytmoleküle außerhalb der Mizellen durch den EOF. Dabei handelt es sich um einen Verteilungsprozess, bei dem die Mizellen eine pseudostationäre Phase darstellen, so daß in diesem Fall das elektrophoretische Trennprinzip durch ein chromatographisches erweitert wird. Der Trennbereich liegt zwischen der Wanderung derjenigen (hydrophilen) Analyten, die sich nicht in der Mizelle aufhalten, also mit dem EOF wandern, und derjenigen (hydrophoben) Verbindungen, die permanent in der Mizelle eingeschlossen sind (s. *Abb. I.3*).



*Abb. I.3: Mizelle mit unterschiedlich hydrophilen Analyten*

Im Falle von SDS kann z.B. durch Zugabe von MeOH (minimale Aufenthaltswahrscheinlichkeit in der Mizelle) und Sudanrot (maximale Aufenthaltswahrscheinlichkeit in der Mizelle) zum aufzutrennenden Substanzgemisch das Trennfenster bestimmt werden, das sich durch den Zusatz des Mizellbildners zum Laufpuffer ergibt. Wenn die Migrationszeiten für minimalen Aufenthalt ( $t_m(\text{EOF})$ ) und maximalen Aufenthalt in der Mizelle bekannt sind, kann über die Migrationszeit der zu analysierenden Substanz auch deren Affinität zur Mizelle abgeschätzt werden.

Im Gegensatz zur CZE ergibt sich für Neutralteilchen eine Migrationsreihenfolge entsprechend der Hydrophilie der Analyten und nicht wie bei geladenen Molekülen entsprechend ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis. Es können auch andere Substanzen als Natriumdodecylsulfat als Mizellbildner eingesetzt werden [WÄTZIG et al., 1998; OZAKI et al., 1995], so daß neben negativ geladenen (z.B. Cholsäure-Derivate [NISHI et al., 1990]) auch positiv geladene (z.B. CTAB: Cetyltrimethylammoniumbromid [NISHI et al., 1990]), neutrale (Emulgatoren wie Brij 35 oder Tweens [ROSÉS et al., 1999]) oder pH-Wert-abhängig geladene amphotere Mizellbildner (z.B. CHAPS: 3-[(3-Cholamido-propyl)-dimethylammonio]-propan-sulfonat [NISHI et al., 1990]) verwendet werden können. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß der Einsatz positiv geladener Mizellbildner je nach Konzentration den EOF umkehren kann [DWORSCHAK, 2000]. Unter Verwendung des Counter-Flow- oder Gegenstromprinzips können oft sehr effiziente Trennungen erreicht werden. Hierbei verwendet man einen Mizellbildner mit einer dem Analyten entgegengesetzten Ladung (z.B. kationischer Analyt und anionischer Mizellbildner).

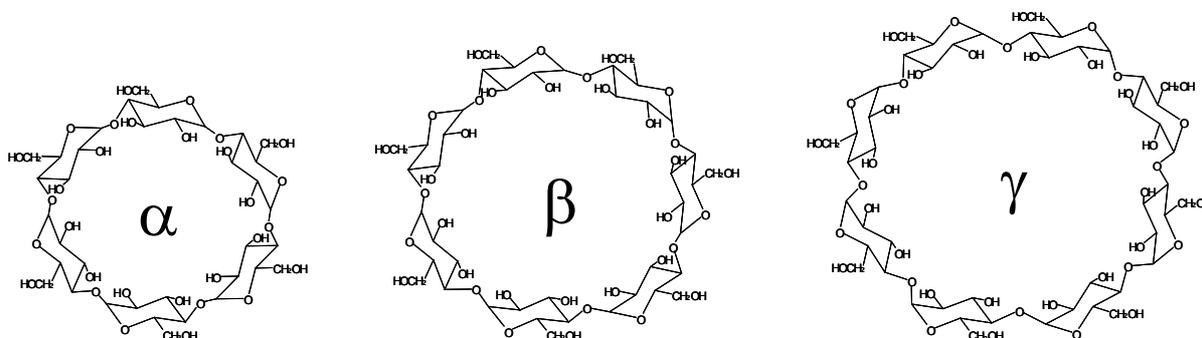
Beim Anlegen eines elektrischen Feldes migrieren dann Analyt und Mizelle in entgegengesetzte Richtungen. Bei dieser Technik sind i.d.R. schon geringere Unterschiede in der Affinität der Analyten zur Mizelle ausreichend, um eine effektive Trennung zu erzielen.

### **2.4.3 Enantiomeren- und Epimerentrennung mittels Kapillarelektrophorese**

Neben der Hochleistungsflüssigchromatographie zählt die CE zu den effizientesten Techniken für Enantiomerentrennungen im analytischen Maßstab [CHANKVETADZE, 1997; VERLEYSSEN und SANDRA, 1998]. Dem Laufpuffer werden chirale Selektoren zugesetzt, so daß sich durch Wechselwirkung der Enantiomere mit der optisch aktiven Umgebung diastereomere Assoziate bilden, die sich in ihrer Mobilität unterscheiden und somit getrennt werden können [CHANVETADZE und BLASCHKE, 1999]. Als chirale Additive werden in erster Linie native und substituierte Cyclodextrine verwendet [FILLET et al.,

1998], daneben auch chirale Kronenether (cyclische Polyethylenglykole) [SCHMID und GÜBITZ, 1995; KUHN, 1999], Glycopeptidantibiotika (Vancomycin, Teicoplanin) [ARAI et al., 1996], Oligo- und Polysaccharide [D'HULST und VERBEKE, 1992], Proteine (z.B. bovines oder humanes Serumalbumin) [BUSCH et al., 1993] und chirale Mizellbildner (z.B. Gallensäuren, Saponine) [NISHI et al., 1990].

Bei Cyclodextrinen (CD) handelt es sich um cyclische Oligosaccharide, die aus sechs, sieben oder acht  $\alpha$ -1,4-glykosidisch verbundenen D-Glucopyranoseeinheiten bestehen. Entsprechend der Anzahl ihrer Glucoseeinheiten werden sie als  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Cyclodextrine bezeichnet (s. *Abb. I.4*).



*Abb. I.4: Strukturen der nativen  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrine.*

Neben den nativen Cyclodextrinen werden jedoch in den meisten Fällen derivatisierte Cyclodextrine verwendet. Hierbei kann eine prinzipielle Unterteilung in ungeladene (z.B. Methyl- $\alpha$ -CD oder Hydroxypropyl- $\beta$ -CD), negativ geladene (z.B. Carboxymethyl- $\beta$ -CD oder sulfatiertes  $\beta$ -CD) und positiv geladene (z.B. Trimethylammoniumhydroxypropyl- $\beta$ -CD) Cyclodextrine vorgenommen werden.

In Analogie zu der in Kapitel 2.4.2 beschriebenen MEKC lassen sich geladene Cyclodextrine prinzipiell auch als Carrier für elektrisch neutrale Analyten verwenden. Hier übernehmen sie wie die Mizellen in der MEKC die Funktion einer pseudostationären Phase. Des Weiteren können Cyclodextrine auch als Lösungsvermittler für lipophile Substanzen verwendet werden [SZENTE et al., 1998; FROBÖSE, 2003]. Werden Cyclodextrine in Kombination mit einem Mizellbildner eingesetzt, spricht man von „Cyclodextrin mediated MEKC“ [NISHI und TERABE, 1996].

#### **2.4.4 Weitere kapillarelektrophoretische Varianten**

Als weitere kapillarelektrophoretische Trenntechniken, die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht verwendet wurden, sind die Isotachophorese (ITP), die Kapillarisoelektrische Fokussierung (CIEF), die Kapillargelelektrophorese (CGE) und die Kapillarelektrochromatographie (CEC) zu nennen.

Bei der ITP wird die Probe in ein diskontinuierliches Puffersystem zwischen einem Leitelektrolyt mit einer höheren Mobilität als die Ionen der Probelösung und einem Folgeelektrolyt mit einer niedrigeren Mobilität eingebracht [ENGELHARDT et al., 1994]. Beim Anlegen einer Spannung trennen sich die Ionen der Probelösung entsprechend ihrer Mobilität auf, verbleiben jedoch „sandwich-artig“ eingebettet zwischen dem Leit- und dem Folgeelektrolyten. Ab dem Erreichen eines Gleichgewichtszustandes bewegen sich alle Ionen mit konstanter Geschwindigkeit weiter [KUHN und HOFFSTETTER-KUHN, 1993]. Die ITP hat ihre Bedeutung als eigenständiges Trennverfahren weitgehend verloren und wird heute im Wesentlichen zur Probenaufkonzentrierung vor einer eigentlichen CE-Trennung angewendet [GEBAUER und BOČEK, 2002].

Bei der CIEF erfolgt die Trennung der Analyten entsprechend ihrer isoelektrischen Punkte an einem pH-Gradienten entlang der Kapillare [AEBERSOLD und MORRISON, 1990; SHIMURA, 2002]. Die CGE wird in einer mit einem Gel oder einer Polymerlösung gefüllten Kapillare durchgeführt und eignet sich aufgrund des zusätzlichen Siebeffektes durch das Gel vor allem für größere Moleküle, wie z.B. Proteine und DNA [COHEN und KARGER, 1987; GUTTMAN et al., 1990]. Die CEC stellt eine Hybridtechnik aus Elektrophorese und Chromatographie dar. Die Trennung erfolgt an der in die Kapillare eingebrachten stationären Phase, während die Strömung des Eluenten und der Transport der Probe durch den elektroosmotischen Fluss bewirkt werden [COHEN und KARGER, 1987].

## **3 Validierung**

### **3.1 Allgemeine Aspekte der Validierung**

Validierung bezeichnet das Erbringen und Dokumentieren des Nachweises, daß ein Verfahren oder eine Methode mit hinreichender Sicherheit zu einem gewünschten Ergebnis führt. Für eine analytische Methode werden charakteristische und aussagekräftige Parameter benötigt, die die Qualität der Methode beschreiben und die eine kontinuierliche Überprüfung ihrer Einhaltung erlauben.

Nach Beendigung der Methodenentwicklung werden die Methodenspezifikationen durch ein festgesetztes, formales Validierungsexperiment ermittelt. Während der Serienanalytik muss die Einhaltung der Methodenspezifikationen durch entsprechende Kontrollproben kontinuierlich überprüft werden. Änderungen des Verfahrens und Übertragungen auf andere Geräte oder in andere Labore machen in der Regel eine neue Validierung zur Bestätigung bzw. Neufestsetzung der Spezifikationen erforderlich. Validierung ist also kein einmaliger Vorgang, sondern vielmehr ein fortlaufender Prozess [GREEN, 1996].

Gegenstand der Validierung ist die Überprüfung von Methodenspezifikationen anhand diverser Parameter. Nach den ICH-Richtlinien zur Validierung analytischer Verfahren [ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE (Q2A): TEXT ON VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES, 1994; ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE (Q2B): VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: METHODOLOGY, 1996] sind dies folgende:

	Deutsche Bezeichnung	Begriff lt. ICH
1.	Spezifität	specificity
2.	Linearität	linearity
3.	Arbeitsbereich	range
4.	Richtigkeit	accuracy
5.	Präzision	precision
6.	Nachweisgrenze	Limit of detection (LOD)
7.	Bestimmungsgrenze	limit of quantification (LOQ)
8.	Robustheit	robustness

*Tab.I.1: Validierungsparameter*

Darüber hinaus spielen oft noch die Parameter Wiederfindung (recovery), die aber oft auch in die Richtigkeit eingeht und Probenstabilität (sample stability) eine Rolle; weiterhin werden Wiederholbarkeit (repeatability) und Vergleichbarkeit (reproducibility) als Parameter benannt, jedoch teilweise in unterschiedlichen Definitionen.

In der DIN 55350 (Teil13) und weiterer Literatur [KROMIDAS et al., 1995], die die Vorgaben in der Lebensmittelanalytik widerspiegeln, sind die oben angegebenen Begriffe ebenfalls angegeben bzw. definiert, die beschriebenen Parameter entsprechen denen der ICH-Guidelines.

Es gibt verschiedene Ansätze zur Validierung von analytischen Verfahren, die sich je nach Zielsetzung unterscheiden. Zur Bestimmung von Pflanzeninhaltsstoffen in Pflanzenmaterial oder daraus hergestellten Lebensmitteln ist es sinnvoll, sich neben den ICH-Richtlinien an den Verfahren und Akzeptanzgrenzen der lebensmittelchemischen Analytik zu orientieren.

## **3.2 Validierungsparameter**

### **3.2.1 Spezifität**

Eine Methode wird als spezifisch für einen Analyten bezeichnet, wenn das von ihr gelieferte Messsignal ausschließlich von der zu analysierenden Substanz herrührt. Im Rahmen der Spezifitätsprüfung analytischer Verfahren sollte ein besonderes Augenmerk auf zu erwartende Interferenzen gelegt werden. Hierzu zählen z.B. Abbauprodukte der Analyten sowie u.U. andere Verbindungen, die ein nahezu identisches elektrophoretisches oder chromatographisches Verhalten zeigen.

CE/UV ist als Analysenverfahren prinzipiell sehr spezifisch, da zunächst eine spezifische Trennung und darüber hinaus eine sehr selektive Messung des Analyten in seinem speziellen UV-Maximum erfolgt, außerdem kann parallel zur Quantifizierung bei einer diskreten Wellenlänge das UV-Spektrum jedes Peaks erfasst werden, was eine weitere Absicherung der Identität der bestimmten Verbindung und eine Peakreinheitsuntersuchung ermöglicht.

### **3.2.2 Arbeitsbereich**

Vor Beginn einer Validierung muss der (u.U. vorläufige) Arbeitsbereich der Methode festgelegt werden. Dieser richtet sich zum einen nach dem praxisbezogenen Anwendungsziel und zum anderen nach den technisch realisierbaren Möglichkeiten. Außerdem ist zu beachten, daß eine Methode letztendlich nur für den Arbeitsbereich eingesetzt werden darf, für den sie formal validiert worden ist, denn eine Extrapolation über die Grenzen des Arbeitsbereiches hinaus ist nicht zulässig.

Da es unter anderem das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Möglichkeiten der entwickelten CE-Methoden aufzuzeigen, wurde als untere Grenze des Arbeitsbereiches immer die Bestimmungsgrenze angestrebt. Die obere Grenze wurde möglichst so gewählt, daß die höchste zu erwartende Probenkonzentration noch innerhalb des Arbeitsbereiches

lag, um den zusätzlichen Arbeitsaufwand und das Fehlerrisiko für ein vermeidbares Verdünnen von Proben, die außerhalb des Arbeitsbereiches liegen, zu vermeiden.

### 3.2.3 Linearität

#### 3.2.3.1 Kalibration

Zu Beginn einer Methodenvalidierung steht die Kalibrierung des Verfahrens, um den funktionalen Zusammenhang zwischen der Analytkonzentration und der erhaltenen Messgröße zu bestimmen. Hierzu werden fünf bis acht Referenzstandards bekannter Konzentration, die den gesamten (erwarteten) Arbeitsbereich abdecken, in der entsprechenden Matrix hergestellt und analysiert.

Um Fehler, die bei einer eventuellen Probenaufarbeitung oder z.B. durch mangelnde Injektionspräzision des CE-Gerätes entstehen, zu kompensieren, wurde mit der Methode des internen Standards (ISTD) gearbeitet.

In der vorliegenden Arbeit wurde jede Kalibrationslösung fünfmal analysiert und der Mittelwert der fünf Ergebnisse der Berechnung der Kalibrierfunktion zugrunde gelegt. Hierdurch fallen statistische Schwankungen nicht so sehr ins Gewicht und Ausreißer können sicherer erkannt und eliminiert werden.

#### 3.2.3.2 Einfache lineare Regression

In aller Regel geht man von einem linearen Zusammenhang zwischen der Konzentration des Analyten und dem erhaltenen Signal aus.

Die einfachste Methode zur Berechnung einer linearen Kalibrierfunktion vom Typ:

$$y = m x + b$$

ist die lineare Regression. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß die Konzentration  $x$  (unabhängige Variable) als fehlerfrei betrachtet wird, die Messgröße  $y$  (abhängige Variable) hingegen als potentiell fehlerbehaftet, berechnen sich die Steigung  $m$  und der Achsenabschnitt  $b$  folgendermaßen:

$$m = \frac{n \cdot \sum_{i=1}^n x_i y_i - \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i}{n \cdot \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left( \sum_{i=1}^n x_i \right)^2} \quad (3.1)$$

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n y_i - m \cdot \sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (3.2)$$

Diese Berechnung der Kalibrierfunktion beruht auf der Methode der kleinsten Fehlerquadrate, d.h. es wird die Summe der Quadrate der *absoluten* Abweichungen aller Messwerte minimiert.

Die Qualität einer Kalibrierfunktion wird anhand des Korrelationskoeffizienten  $r$  bzw.  $r^2$  beurteilt [SACHS, 1997].

$$r = \frac{n \cdot \sum_{i=1}^n x_i y_i - \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i}{\sqrt{\left[ n \cdot \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left( \sum_{i=1}^n x_i \right)^2 \right] \left[ n \cdot \sum_{i=1}^n y_i^2 - \left( \sum_{i=1}^n y_i \right)^2 \right]}} \quad (3.3)$$

### 3.2.3.3 Bestimmungsgrenze (LOQ) und Nachweisgrenze (LOD)

Die Bestimmungsgrenze (Limit of Quantification, LOQ) eines Analysenverfahrens ist die kleinste Konzentration, die noch mit hinreichender Präzision und Richtigkeit bestimmt werden kann. Sie entspricht in der Regel der unteren Grenze des Arbeitsbereiches. Das Signal-Rausch-Verhältnis liegt bei etwa 5-9:1.

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD) ist die kleinste Konzentration, die gerade noch detektiert werden kann. Üblicherweise ist dies bei einem Signal-Rausch-Verhältnis von 2-3:1 der Fall [KROMIDAS et al., 1995].

### 3.2.3.4 Richtigkeit und Präzision

Zur Bestimmung der Richtigkeit und Präzision einer Methode wird die zuvor erhaltene Kalibrierfunktion durch neu hergestellte Proben bekannten Gehaltes überprüft. Empfohlen wird hierbei, auf mindestens drei Konzentrationsniveaus, welche die untere und obere Grenze des Arbeitsbereiches einschließen, Proben herzustellen, aufzuarbeiten und zu analysieren.

Unter Richtigkeit versteht man die prozentuale Abweichung des mittleren gefundenen Gehaltes der Bestimmungen vom Sollgehalt, diese Abweichung sollte 15 % nicht übersteigen. An der LOQ darf maximal eine Abweichung von 20 % auftreten [KROMIDAS, 1999].

Die Präzision, die durch die relative Standardabweichung (Variationskoeffizient) der mindestens fünf Einzelmessungen pro Konzentrationsstufe errechnet wird, sollte ebenfalls kleiner als 15 % sein. Auch hier ist an der Bestimmungsgrenze ein Wert von bis zu 20 % erlaubt [KROMIDAS, 1999].

Diese Akzeptanzkriterien müssen sowohl bei der intraday- (eine Serie) als auch bei der interday-Validierung (drei Serien an drei verschiedenen Tagen) überprüft und eingehalten werden. Die interday-Validierung muss anhand von unabhängigen, d.h. für jede Serie neu hergestellten Proben bekannten Gehalts, durchgeführt werden.

### 3.2.3.5 Robustheit

Die Robustheit einer Analysenmethode bedeutet ihre Widerstandsfähigkeit gegen stärkere Abänderungen der Analysenbedingungen und gegen Störeffekte. Sie beschreibt, inwieweit ein Verfahren trotz solcher Einflüsse noch richtige und präzise Werte liefert.

Bei kapillarelektrophoretischen Verfahren sind in diesem Zusammenhang insbesondere von Bedeutung die Stabilität der verwendeten Laufpuffer, Temperatureinflüsse sowie Adsorptionseffekte an der Kapillarwand, die eine Verschiebung von Migrationszeiten nach sich ziehen und zur Beobachtung von Hystereseeffekten führen können.

Um optimale pH-Stabilität zu gewährleisten, sollte der verwendete Laufpuffer so gewählt werden, daß er bei dem verwendeten pH-Wert eine ausreichende Pufferkapazität aufweist, d.h. der pH-Wert sollte in der Nähe des  $pK_s$ -Wertes des Puffersystems liegen. Außerdem empfiehlt sich ein regelmäßiges Austauschen des Laufpuffers, um Ungenauigkeiten, die infolge von Verunreinigungen oder allmählichen Konzentrationsveränderungen auftreten können, zu vermeiden. Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, jeden Puffer vor seiner Verwendung im Ultraschallbad zu behandeln, um eine vollständige Lösung aller Pufferbestandteile zu garantieren und gelöste Gase, die später in der Kapillare Luftblasen und somit Stromzusammenbrüche bewirken können, zu entfernen. Außerdem empfiehlt es sich, die Puffer vor ihrer Verwendung zu filtrieren.

Der Einfluss der Temperatur ist auch von Bedeutung im Hinblick auf die im Autosampler befindlichen Proben. Hier spielen gerade bei den oft kleinen Volumina, wie sie in der CE üblich sind, Probenverdunstungseffekte eine große Rolle, zumal die Probengefäße in aller

Regel nicht dicht verschlossen werden können. Die Verwendung eines internen Standards ist schon aus diesem Grunde unerlässlich und leicht flüchtige Proben (z.B. methanolische Lösungen) sollten erst direkt vor der Injektion in den Autosampler gestellt werden. Von großem Vorteil sind hier Geräte, die eine Probenkühlung während der einzelnen Messungen gestatten.

Eine besondere Bedeutung im Hinblick auf die Robustheit von CE-Methoden kommt auch der Reinigung und Konditionierung der verwendeten Kapillaren zu. Abhängig von der verwendeten Methode, insbesondere von der Zusammensetzung des Laufpuffers und der Probenmatrix, kann es zu mehr oder weniger stark ausgeprägten Adsorptionseffekten an der Kapillarwand kommen. Ferner zeigt der EOF bei einem Wechsel des pH-Wertes einen Hysterese-Effekt [ENGELHARDT et al., 1994], d.h., daß der EOF bei gleichem pH-Wert nicht identisch ist, sondern davon abhängt, welcher pH-Wert vorher in der Kapillare vorlag. Dieser Fehler lässt sich vermeiden, wenn für jede Methode eine eigene Kapillare verwendet wird.

### **3.2.3.6 Wiederfindung**

Die Wiederfindung gibt das prozentuale Verhältnis der nach kompletter Aufarbeitung gefundenen Menge des jeweiligen Analyten zur ursprünglich eingesetzten Menge an. Um Messfehler so gering wie möglich zu halten, ist eine hohe Wiederfindungsrate wünschenswert, eine Mindestrate wird jedoch nicht gefordert. In jedem Fall soll die Wiederfindung für alle Analyten und den internen Standard über den ganzen Arbeitsbereich konstant, präzise und reproduzierbar sein.

Bei den in der CE häufig durchgeführten Direktinjektionen der biologischen Matrix ohne vorhergehende Aufarbeitung kann naturgemäß von einer 100 %-Wiederfindungsrate ausgegangen werden. Eine Überprüfung bzw. Validierung dieses Parameters entfällt somit. Wird mit dem Standardzusatzverfahren (SZV) gearbeitet, kann hierdurch außerdem die Verfälschung von Messergebnissen durch Matrixeffekte ausgeschlossen werden.

### **3.2.3.7 Probenstabilität**

Für die entwickelten Methoden ist es notwendig, daß Daten über die Stabilität der Analyten bekannt sind. Für die Analytik von Naturstoffen in biologischen Matrices ist es besonders wichtig, vorhandene Daten über Lagerung und Langzeitstabilität zu berücksichtigen und im Zweifelsfall zumindest stichprobenartig zu überprüfen.

## 4 Cyanogene Glykoside und Cyanogenese

### 4.1 Allgemeines

Schon 1802 wies der Apotheker BOHM Blausäure in geriebenen Bittermandeln nach [ROSENTHALER, 1919] und bereits 1830 konnten ROBIQUET und BOUTRON-CHARLARD das cyanogene Glykosid Amygdalin als für die HCN – Freisetzung verantwortliche Verbindung in kristalliner Form isolieren. 1837 erkannten WÖHLER und LIEBIG, daß Amygdalin durch ein Emulsin genanntes Ferment in Blausäure, Benzaldehyd und Zucker gespalten wird [HEGNAUER, 1977]. Außerdem gelang ihnen im selben Jahr die Strukturaufklärung des Aglykons [KAKES, 1990].

Unter Cyanogenese versteht man die Fähigkeit eines Organismus, unter physiologischen Bedingungen Blausäure freizusetzen. Cyanogene Glykoside stellen dabei die am häufigsten gefundene Form gebundener Blausäure dar.

Cyanogene Glykoside sind O- $\beta$ -glykosidierte  $\alpha$ -Hydroxynitrile (Cyanhydrine), die in vielen Pflanzen, aber auch in Insekten vorkommen [NAHRSTEDT, 1987].

Cyanglykoside werden in der Regel nach ihren biogenetischen Precursoren eingeteilt. Diese sind die proteinogenen Aminosäuren L-Valin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Phenylalanin und L-Tyrosin. Weiterhin fungiert die nicht-proteinogene Aminosäure 2-(2'-Cyclopentenyl)-glycin als Vorstufe [ANDERSEN et al., 2001] einiger cyanogener Glykoside wie Deidaclin [TOBER und CONN, 1985] sowie wahrscheinlich Nicotinsäure als Vorstufe von Acalyphin [NAHRSTEDT et al., 1982; NAHRSTEDT, 1987].

Cyanglykoside findet man sowohl in relativ ursprünglichen Pteridophyta (dort allerdings nur bei Farnen) und Gymnospermae als auch bei den Angiospermae [KAKES, 1990]. Bei Farnen wurden ausschließlich Verbindungen des Phenylalanin-Typs nachgewiesen, während bei den Gymnospermae mit Taxiphyllin als einzigem Vertreter der Cyanglykoside nur der Tyrosin-Typ realisiert ist. Angiospermae zeigen eine weite Verbreitung der Cyanglykoside. So herrschen bei den Monokotyledonen Verbindungen des Tyrosin-Typs vor, während bei den Dikotyledonen fast alle bekannten Cyanglykoside vorgefunden werden [HEGNAUER, 1977; LECHTENBERG und NAHRSTEDT, 1999]. Zur Zeit sind über 62 cyanogene Verbindungen aus höheren Pflanzen und Insekten bekannt [LECHTENBERG und NAHRSTEDT, 1999].

Neben den Cyanglykosiden kann gebundene Blausäure auch in Form von Cyanolipiden vorliegen, allerdings nur in den Familien der Sapindaceae und Hippocastanaceae [SEIGLER,

1992]. Hierbei ist das  $\alpha$ -Hydroxynitril über Esterbindungen mit ein oder zwei, meist C18:1 oder C18:2-Fettsäuren, verknüpft.

Von Cyanogenese abzugrenzen ist die Tatsache, daß in fast allen Pflanzen, auch in den nicht-cyanogenen, neben gebundener auch freie Blausäure in geringen Mengen nachzuweisen ist. Diese ist hauptsächlich ein Nebenprodukt der Ethylenproduktion und beruht nicht auf Cyanogenese [KENDE, 1989].

Bezüglich der biologisch-ökologischen Bedeutung der Cyanglykoside ist festzuhalten, daß sie bei Pflanzen hauptsächlich als Abwehrmechanismus gegen Herbivore dienen [GLEADOW und WOODROW, 2002; ZAGROBELNY et al., 2004]. Manifestiert wird diese These der Schutzfunktion dadurch, daß besonders in den Reproduktionsorganen (Blüten, Früchte, Samen) sowie in jungen Blättern hohe Gehalte an cyanogenen Verbindungen zu finden sind, also in Organen, die ihrer Funktion oder ihres Entwicklungsstadiums nach den höchsten Schutz erfordern [NAHRSTEDT, 1985].

Cyanogene Glykoside als Inhaltsstoffe von Nutzpflanzen [NAHRSTEDT, 1993; JONES, 1997] wie z.B. Cassava (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) sind für den Menschen von toxikologischer Bedeutung. Nach Aufnahme von cyanogenen Glykosiden wirkt freigesetztes Cyanid neurotoxisch. Durch Degeneration peripherer Nervenzellen kann es zur Schädigung des *Nervus opticus* wie auch zu Dyskinesien der Extremitäten kommen [NAHRSTEDT, 1988; TOR-AGBIDYE et al., 1999]. Aus Cyanid gebildetes Thiocyanat hemmt die Bildung des Schilddrüsenhormons Thyroxin und kann zur Kropfbildung führen [LANGER und GREER, 1977].

Pharmaka, die cyanogene Glykoside oder Cyanid enthalten sind heute obsolet bzw. nicht mehr zugelassen. Die 6. Ausgabe des Deutschen Arzneibuches enthielt die Monographie Aqua amygdalarum amarum (Bittermandelwasser), das bei Übelkeit und Erbrechen sowie bei Hustenreiz angewandt wurde. In Deutschland und in den USA nicht mehr zugelassen ist das Präparat Laetrile® (Wirkstoff: Amygdalin), das im Rahmen der Krebs-Mehrschritt-Therapie nach VON ARDENNE zusammen mit  $\beta$ -Glykosidasen gegeben wurde [JUNGHANS, 1982; NAHRSTEDT, 1978]. Unter dem Namen „Vitamin B-17“ wird Amygdalin zur Injektion aber nach wie vor exportiert (Fa. C.P.W. RAHLSTEDT), auch wird es bis heute in den USA in der Krebstherapie eingesetzt. Internet-Recherchen mit Standardsuchmaschinen wie z.B. GOOGLE ergeben mehr als 18.000 Treffer für das Stichwort „Laetrile®“, wobei es sich bei den angezeigten Einträgen meist um Erfahrungs- und Anwendungsberichte von Patienten handelt und nur selten um wissenschaftliche Darstellungen.

## 4.2 Katabolismus

Ein cyanogener Organismus enthält neben den Cyanglykosiden oder Cyanolipiden auch die entsprechenden degradierenden Enzyme, die für die Freisetzung der Blausäure verantwortlich sind. Cyanogene Glykoside und ihre korrespondierenden Enzyme sind nach verschiedenen Arbeiten in der unverletzten Pflanze in voneinander getrennten Kompartimenten lokalisiert, wobei diese Kompartimentierung intra- oder extrazellulär verwirklicht sein kann [KOJIMA et al., 1979; THAYER und CONN 1981; FREHNER und CONN 1987; HALKIER und MØLLER 1989; SELMAR et al., 1989; POULTON, 1988]. Bei Verletzung pflanzlichen Gewebes wird die Kompartimentierung aufgehoben und die Cyanglykoside kommen in Kontakt mit ihrem korrespondierenden Enzym.

Der Abbau der Cyanglykoside erfolgt meist in zwei Schritten. Einleitend wird durch eine mehr oder weniger spezifische, meist lösliche  $\beta$ -Glykosidase der O- $\beta$ -glykosidisch gebundene Zucker abgespalten, so daß ein  $\alpha$ -Hydroxynitril entsteht. Dieses entstehende instabile  $\alpha$ -Hydroxynitril kann spontan oder durch Reaktion mit dem Enzym Hydroxynitrilyase zum korrespondierenden Keton oder Aldehyd zerfallen und dabei HCN freisetzen [JONES et al., 2000; MØLLER und POULTON, 1993]. Dies geschieht bevorzugt in alkalischem Milieu, in saurem Milieu ( $\text{pH} < 3$ ) ist der spontane Zerfall sehr gering [POULTON, 1993]. Da in der Pflanze ein saurer pH-Wert vorliegt, ist der Abbau hier vernachlässigbar.

## 4.3 Blausäureentgiftung

Cyanogene Organismen benötigen einen effektiven Detoxifikationsmechanismus, um eine Vergiftung, hervorgerufen durch aus verletztem Gewebe freigesetzte Blausäure, zu vermeiden. Aber auch nicht-cyanogene Organismen können in der Regel HCN zu weniger toxischen Verbindungen metabolisieren. Drei Wege der Entgiftung sind besonders gut untersucht und sollen deshalb im Folgenden vorgestellt werden (s. *Abb. I.5*).

Den Hauptweg der Blausäuredetoxifikation in Pflanzen stellt die Übertragung von HCN auf L-Serin oder L-Cystein unter Bildung der nicht-proteinogenen Aminosäure  $\beta$ -Cyanoalanin dar. Diese Reaktion wird durch die  $\beta$ -Cyanoalanin-Synthase katalysiert und ist in höheren Pflanzen ubiquitär verbreitet [NAHRSTEDT, 1992].  $\beta$ -Cyanoalanin kann weiter zu Asparagin hydratisiert und schließlich zu Asparaginsäure umgesetzt werden, wobei der freiwerdende Ammoniak in den Stickstoff-Pool der Pflanze zurückgeführt wird [CASTRIC et al., 1972].

In höheren Tieren wird HCN mit Thiosulfat unter Katalyse der Rhodanase (traditionell häufig auch als Rhodanese bezeichnet) zum deutlich weniger toxischen Thiocyanat umgesetzt. Dieser Detoxifikationsmechanismus spielt bei Insekten und Mikroorganismen eine eher untergeordnete Rolle. Bei höheren Pflanzen wurde schwache Rhodanase-Aktivität gefunden, die aber nicht in Beziehung zur Cyanogenese gebracht werden konnte [VOLINI und ALEXANDER, 1981; KAKES und HAKVOORT, 1992].

Ein nur bei Pilzen realisierter Weg zur Entgiftung von Blausäure stellt die Bildung von Formamid dar. Die Reaktion wird durch die Formamidhydrolyase katalysiert [FRY und MEYERS, 1981].

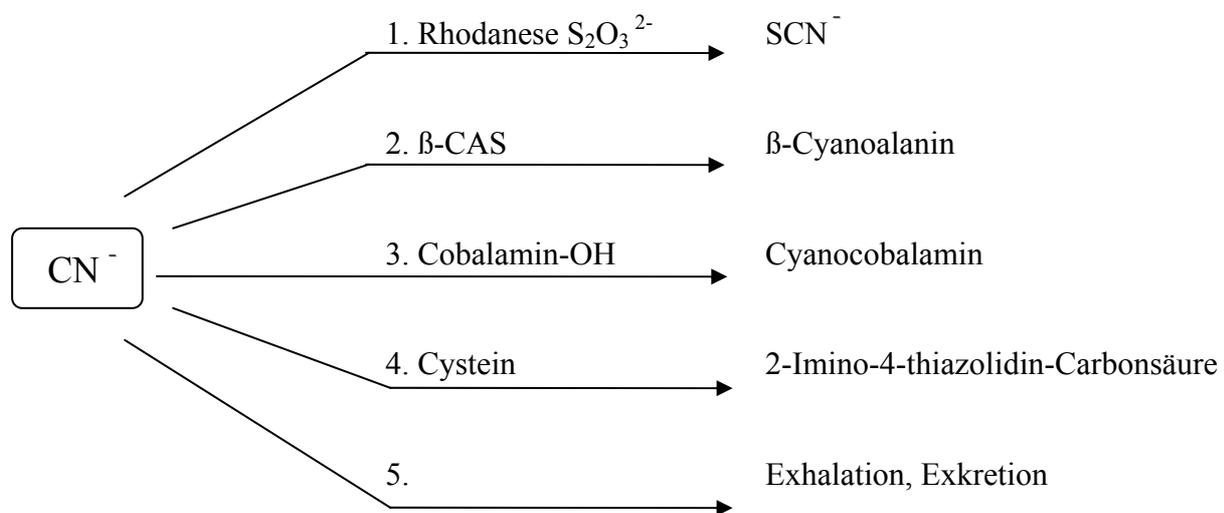


Abb.I.5: Entgiftungswege für Cyanid, nach LECHTENBERG und NAHRSTEDT, 1999

#### 4.4 Biogenese

Wie bereits unter 3.1 erwähnt, sind für die meisten der bekannten cyanogenen Glykoside die proteinogenen Aminosäuren L- Valin, L- Isoleucin, L- Leucin, L- Phenylalanin und L- Tyrosin die biogenetischen Precursoren. Weiterhin stellt das 2-(2'-Cyclopentenyl)-glycin die Vorstufe einiger Cyanglykoside dar. Außerdem fungiert möglicherweise Nicotinsäure als Precursor von Acalyphin.

Die Biosynthese cyanogener Glykoside zählt zu den am intensivsten erforschten Stoffwechselwegen pflanzlicher Sekundärstoffe. Besonders gut untersucht ist hierbei die Synthese von Dhurrin in *Sorghum bicolor*, deren Intermediate bei Experimenten an Mikosomenpräparationen identifiziert werden konnten [MCFARLANE et al., 1975]. In Abb.I.6

ist eine Übersicht über die Dhurrin-Biosynthesesequenz der Mikrosomenpräparationen dargestellt [KAHN et al., 1997].

Den ersten Schritt der Biosynthesesequenz stellt die Hydroxylierung des biogenetischen Precursors Tyrosin zum *N*-Hydroxytyrosin dar, katalysiert durch eine Cytochrom-P450-abhängige Aminosäure-*N*-hydroxylase. Dieses zur CYP79-Familie gehörende Enzym katalysiert die gesamte Umsetzung des Tyrosins über eine zweite Hydroxylierung, eine Dehydratisierung und Decarboxylierung bis hin zum (*E*)-*p*-Hydroxyphenylacetaldoxim, welches durch eine spezifische Isomerase zur (*Z*)-Form isomerisiert wird [HALKIER et al., 1991; SIBBESEN et al., 1995]. Das Aldoxim wird über eine Dehydratisierung weiter zum korrespondierenden Nitril, hier zum *p*-Hydroxyphenylacetonitril, umgesetzt. Unter Verbrauch von O<sub>2</sub> und NADPH wird das Nitril zum *p*-Hydroxymandelonitril, einem Cyanhydrin, oxidiert. Diese beiden Schritte werden von einem zweiten Cytochrom-P450-Enzym katalysiert, dem P450ox [KAHN et al., 1997]. Unter physiologischen Bedingungen wird das Cyanhydrin von einer löslichen, substratspezifischen  $\beta$ -Glucosyltransferase zum Dhurrin glucosidiert [MØLLER und POULTON, 1993]. Alle Schritte, mit Ausnahme der Glucosidierung, werden membranassoziiert katalysiert. Die beiden multifunktionalen Cytochrom-P450-Enzyme bilden jeweils einen hochorganisierten Multienzymkomplex, der ein sogenanntes „Channeling“ der Intermediate erlaubt. Dieser Begriff wurde von CUTLER definiert [CUTLER et al., 1981]. Er beschreibt die bevorzugte Umsetzung eines endogenen Intermediates einer Biosynthesesequenz im Vergleich zu einem exogen eingebrachten Intermediat. Ein gechanneltes Zwischenprodukt steht demnach nicht im Austausch mit seiner Umgebung. So kann das Produkt eines Enzyms als Substrat vom nächsten Enzym genutzt werden, ohne den Komplex zu verlassen. Das „Channeling“ bewirkt eine Stabilisierung der labilen Intermediate und ermöglicht eine gerichtete und effizientere Synthese [SELMAR, 1999]. Mittlerweile wurden bei vielen Pflanzen solche gechannelten Biosynthesewege nachgewiesen, wie beispielsweise für Taxiphyllin in *Triglochin maritima* [CUTLER et al., 1981] oder für Linamarin in Cassava [DU et al., 1995; ANDERSEN et al., 2000] oder *Trifolium repens* [COLLINGE und HUGHES, 1984].

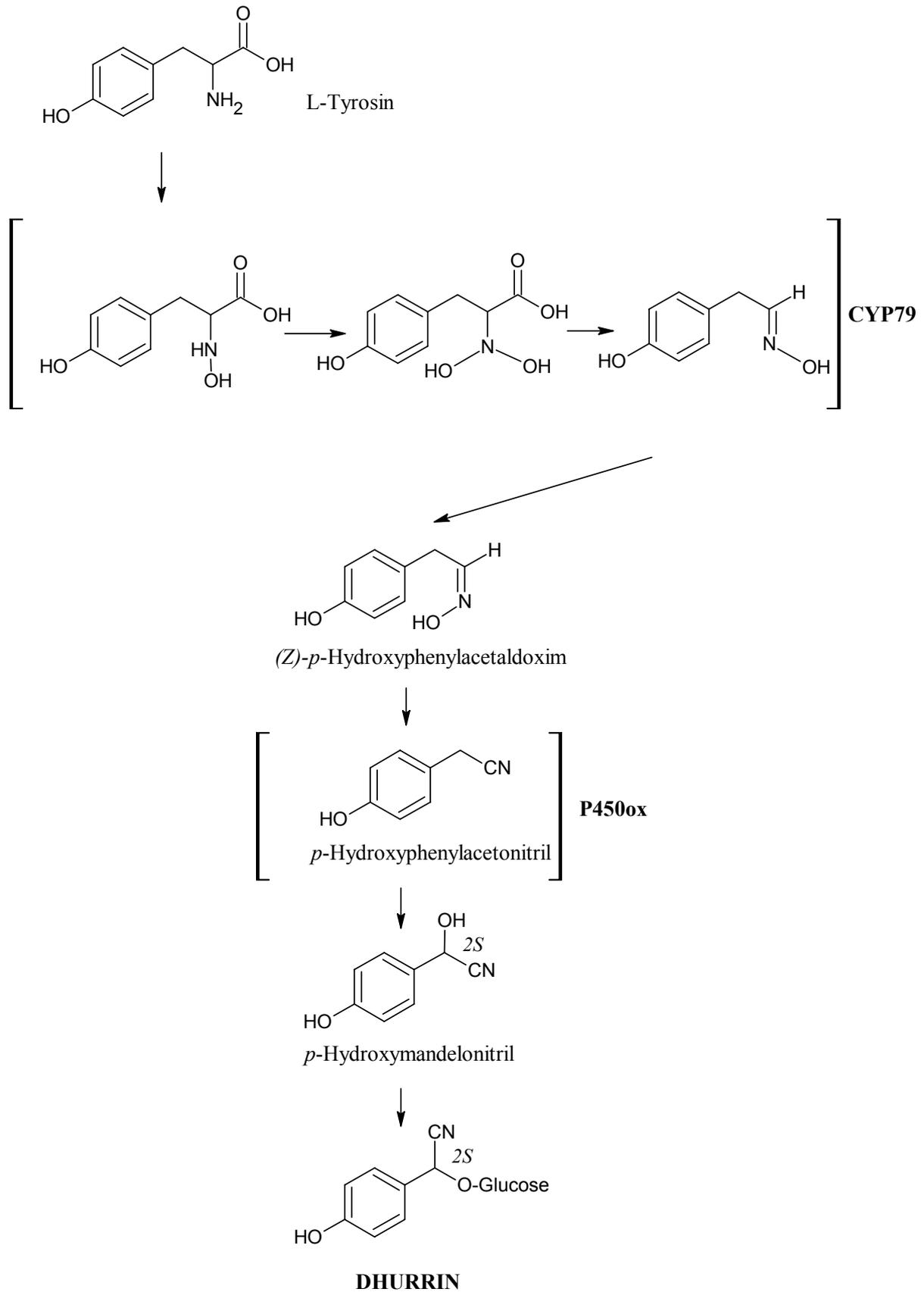


Abb.I.6: Biosynthese von Dhurrin (nach KAHN et al., 1997)

CYP79: Cytochrom-P450-N-Hydroxylase;

P450ox: Cytochrom-P450-C-Hydroxylase

## 5 Pflanzenmaterial

### 5.1 Auswahlkriterien des Pflanzenmaterials

Verschiedene wichtige Nahrungsmittel, die besonders in den Tropen von Bedeutung sind, enthalten Blausäure, wie bspw. Cassava (*Manihot esculenta*, Crantz, Euphorbiaceae), Hirse (*Sorghum bicolor* (L.) Moench, Poaceae), Bambus-Sprossen (verschiedene *Bambusa spec.*, Schrad. ex J.C. Wendl., Poaceae) oder Limabohnen (*Phaseolus lunatus* L., Fabaceae), ebenso wie die Samen von Pfirsich (*Prunus persica* L., Rosaceae), Aprikose (*Prunus armeniaca* L., Rosaceae), Kirsche (*Prunus cerasus/ Prunus avium* L., Rosaceae), Apfel (*Malus domestica* L., Rosaceae) und Pflaume (*Prunus domestica* L., Rosaceae). Auch einige arzneilich genutzte Pflanzen enthalten cyanogene Glykoside, z.B. Leinsamen (*Linum usitatissimum* L., Linaceae) oder die Blüten von Schwarzem Holunder (*Sambucus nigra* L., Caprifoliaceae), außerdem sind sie in bitteren Mandeln (*Prunus amygdalus* L., Rosaceae) enthalten [NAHRSTEDT, 1993; KINGSBURY, 1964]. In den genannten Pflanzen sind hauptsächlich drei cyanogene Glykoside verantwortlich für die immer noch in regelmäßigen Abständen durch ihren Verzehr auftretenden Vergiftungen [MONTGOMERY, 1965; LINDNER, 1990]: Linamarin in Cassava und Limabohnen, Dhurrin in Zuckerhirse und Taxiphyllin in Bambus-Sprossen [JONES, 1998; VETTER, 2000], außerdem Amygdalin in bitteren Mandeln.

Obwohl Maniok als Stärkelieferant nach Weizen, Reis, Mais und Kartoffeln mit 152 Mio t (Weltproduktion 1995) die fünft wichtigste Weltwirtschaftspflanze darstellt [FRANKE, 1997], haben für Mitteleuropa nur die Vergiftungen mit bitteren Mandeln größere toxikologische Bedeutung.

Giftstoffe, die nur indirekt mit cyanogenen Glykosiden zu tun haben, sind die Neurolathyrismus (u.a. Muskelstarre, Lähmung der Beinmuskulatur, Schwäche) auslösenden Verbindungen. Saatplatterbsen (*Lathyrus sativus*, (L.), Papilionaceae) und aromatisch riechende Platterbsen (*Lathyrus odorata*, (L.), Papilionaceae) akkumulieren z.B.  $\beta$ -Cyanoalanin als Blausäuredetoxifikationsprodukt und sind in der Lage, daraus  $\gamma$ -Glutamyl- $\beta$ -cyanoalanin zu bilden. Zusammen mit anderen nichtproteinogenen Aminosäuren sind die eben genannten Verbindungen für die in Indien und Algerien besonders häufig vorkommenden Vergiftungserscheinungen des Neurolathyrismus verantwortlich [TÄUFEL et al., 1993].

Beim Menschen setzen intakte cyanogene Glykoside die Blausäure im Gastrointestinal-Trakt i.d.R. nur langsam frei, da hier nur eingeschränkte  $\beta$ -Glucosidaseaktivität

nachzuweisen ist [NAHRSTEDT, 1993]. Jedoch können bestimmte Darmbakterien das Glykosid spalten und so die Blausäure freisetzen.

Bei Vergiftungen von Weidevieh, insbesondere durch z.B. Weißklee (*Trifolium repens*, L., Papilionaceae), müssen zur veterinärtoxikologischen Beurteilung die spezifischen Verdauungsmechanismen der Tiere berücksichtigt werden [TÄUSCHER und LINDEQUIST, 1994]. Im Pansen von Wiederkäuern werden cyanogene Glykoside durch ihre bakterielle Magenflora im dort vorherrschenden neutralen Milieu gespalten, so daß Blausäure freigesetzt wird, die zur Vergiftung des Viehs führt [STOLTENOW und LARDY, 1998].

Da in Pflanzen, die Cyanglykoside enthalten, die abbauenden Enzyme meist räumlich getrennt von den Glykosiden vorliegen [SELMAR et al., 1989; POULTON, 1988], sollen herkömmliche Zubereitungsmethoden auf die Entgiftung durch Zerquetschen, Einweichen und Kochen in Wasser unter Verwerfung des Wassers die Zerstörung der Blausäure bewirken. Außerdem werden durch Kochen die Glykosidasen inaktiviert. Werden diese Schritte unzureichend ausgeführt, werden zwar die Enzyme zerstört, aber ein Teil der Glykoside verbleibt ungespalten. Diese können dann bei dem in östlichen Ländern üblichen Vermischen der gekochten Speisen mit etwas frischem, ungekochten Gemüse gespalten werden, so daß Blausäure frei wird [LINDNER, 1990]. Das Ausmaß der Vergiftungen ist oft schwer vorherzusagen, da die tolerierbare Menge an HCN bei Menschen sehr unterschiedlich ist (1-20 mg/kg). Auch in den Pflanzen ist der Cyanid-Gehalt starken biologischen Schwankungen ausgesetzt, so enthält Cassava, je nachdem ob es sich um süßen oder bitteren Maniok handelt, z.B zwischen 15 und 400 mg/kg (Frischgewicht) Linamarin und Lotaustralin [CEREDA und MATTOS, 1996]. HCN wirkt tödlich durch eine Hemmung der Ferricytochrom-Oxidase. Dadurch wird die Sauerstoffverwertung in der Atmungskette unterbrochen, so dass der Tod durch die Anoxie der Zellen eintritt. Besonders das Gehirn, aber auch der Herzmuskel sind gegen diese Hemmung empfindlich. Der Körper verfügt aber über Entgiftungsmöglichkeiten, die zuvor unter **4.3** besprochen wurden.

Neben der Gefahr der akuten Vergiftung müssen aber auch die bisher noch nicht vollständig aufgeklärten Formen der Langzeitfolgen berücksichtigt werden. Der Stoffwechsel der HCN-haltigen Glykoside im menschlichen Körper ist bisher nicht vollständig aufgeklärt, sehr wohl aber die Schäden, die eine chronische Zufuhr dieser Stoffe bewirken können [SOLMONSON, 1981; LÜLLMANN und MOHR, 2001]. Eine jahrelange Aufnahme subletaler Blausäuremengen aus Nahrungsmitteln bedingt hauptsächlich neurologische Effekte. Erwähnenswert ist hier die tropische ataktische

Neuropathie (TAN), die in weiten Teilen Afrikas verbreitet ist. Hohe  $\text{SCN}^-$ -Plasmaspiegel (resultierend aus der  $\text{CN}^-$ -Detoxifikation, s. auch 4.3) sind mitverantwortlich für das Auftreten des endemischen Kropfs und Kretinismus [NAHRSTEDT, 1993; TÄUSCHER und LINDEQUIST, 1994]. Zudem können Unterernährung (Proteinarmut, Mangel an Vitamin  $\text{B}_{12}$ ) und genetisch bedingte Störungen im Cyanidabbau eine Förderung dieser Krankheitsbilder bedeuten [TÄUSCHER und LINDEQUIST, 1994].

Es ist schlecht möglich, auf die genannten Nutz- und Arzneipflanzen zu verzichten, daher ist es zum einen erforderlich, sichere Entgiftungsmaßnahmen zu treffen, aber natürlich auch, sichere Methoden bereit zu stellen, um die wirksame Entgiftung überprüfen zu können und diese Inhaltstoffe identifizieren und quantifizieren zu können. Hierzu soll die vorgelegte Arbeit einen Beitrag leisten.

Um zu zeigen, daß die erarbeiteten Methoden ausreichend robust sind für die Messung von Pflanzenmaterial, also keine negative Beeinflussung durch Matrixeffekte auftritt, wurden mittels der entwickelten Methoden die Glykosidgehalte verschiedener cyanogener Pflanzen oder aus solchen Pflanzen gewonnener Produkte quantifiziert. Bei dem untersuchten Pflanzenmaterial handelt es sich um verschiedene Nutz- oder Arzneipflanzen mit unterschiedlich hohen Gehalten an cyanogenen Glykosiden. Alle Pflanzen wurden nach Erhalt zunächst mit FEIGL-ANGER-Papier auf ihre cyanogene Aktivität geprüft.

## 5.2 Vorstellung der untersuchten Pflanzen

### 5.2.1 *Bambusa vulgaris*, Schrad. ex J.C. Wendl., Poaceae

*Bambusa vulgaris* ist ein ausdauerndes Gras mit mono- oder sympodial wachsenden Rhizomen, die jährlich sieben bis zehn Lufttriebe hervorbringen. In gemäßigten Breiten erreichen die Halme eine Höhe von 1 bis 3 m, in den Tropen erreichen manche Arten eine Höhe bis zu 37 m. Die Halmachsen sind in längere, hohle Internodien und kurze, querwandbildende Knoten gegliedert, die wechselständig zweizeilig lanzettliche Blätter mit halmumfassender Blattscheide tragen. Bei Bambussprossen (Bamboo shoots) handelt es sich um bleiche Schösslinge aus den Niederblattachsen von Bambusrhizomen, die im jungen, noch unverholzten Zustand gestochen werden.

Das Blausäurevorkommen in Bambus ist fast ausschließlich auf die Sprosse beschränkt, die außer des cyanogenen Glykosids Taxiphyllin hauptsächlich Proteine enthalten. Sie werden in Stücke geschnitten gekocht oder gedünstet als Feingemüse verzehrt. Roh dürfen

sie aufgrund ihres mit bis zu 1 % recht hohen Gehalts an Taxiphyllin nicht gegessen werden [SCHWARZMEIER, 1976; REHM und ESPIG, 1991].

Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Pflanzenmaterial stammt aus Bangkok, Thailand und aus Ho-Chi-Minh-Stadt, Vietnam.

### **5.2.2 *Eschscholzia californica*, L., Papaveraceae**

*Eschscholzia californica* (dt: Goldmohn, Kalifornischer Mohn) ist ein in Kalifornien bis Neu-Mexiko heimisches, ein- bis mehrjähriges, ca. 0,3 bis 0,6 m hohes Kraut mit spärlichen, stark gefiederten und in dünne Zipfel auslaufenden Laubblättern. Die hellgelben bis orangen Blüten sitzen auf langen Stielen einzeln in den Blattachseln und haben einen Durchmesser von 2,5 bis 3,5 cm. Bei der Schleuderfrucht handelt es sich um eine 4-6 cm große, schotenförmige Kapsel, wobei die je neun Gefäßbündel der einzelnen Fruchtklappen von außen als mehr oder weniger stark hervortretende Rippen sichtbar sind. Als Inhaltsstoffgruppen enthält *Eschscholzia californica* ätherisches Öl, cyanogene Glykoside [VAN VALEN, 1978] und Alkaloide vom Protopin-, Apomorphin- und Benzophenantridintyp, auf die auch die im Folgenden beschriebenen Anwendungen zurückzuführen sind.

*Eschscholzia californica* ist als Extractum Eschscholziae (Kalifornischer Mohnextrakt) als Fluidextrakt im DAB10 monographiert. Die Droge ist definiert als die zur Blütezeit gesammelten und getrockneten oberirdischen Teile; sie ist Bestandteil einiger Fertigarzneimittel, jeweils in Kombination mit pflanzlichen Sedativa. Zubereitungen werden zur Behandlung von Schlafstörungen, Schmerzen, nervöser Übererregbarkeit und Neuropathien eingesetzt. Außer zur Schmerzbehandlung scheinen die Anwendungsgebiete plausibel, sind jedoch weder durch klinische Studien noch durch ausreichend dokumentiertes Erfahrungsmaterial belegt [HAGER, 1994].

Kultiviert wurden die analysierten Pflanzen im institutseigenen Arznei- und Nutzpflanzengarten.

### **5.2.3 *Holocalyx balansae*, Mich., Caesalpiniaceae**

*Holocalyx balansae* (auch *Holocalyx glaziovii*, brasil.: Alecrim-de-campinas, Ibirapê) ist ein in den Tropen und Subtropen wachsender, ca. 10-25 m hoher Baum mit 7-15 cm langen, gefiederten Blättern und kleinen, weißlichen Blüten. Die Früchte (Kapseln) sind 3-4 cm groß und enthalten 1-2 Samen.

Die Samen enthalten das cyanogene Glykosid Holocalin [GMELIN et al., 1972; FRANCISCO und PINOTTI, 2000], in den Blättern hingegen konnte das cyanogene Glykosid Prunasin nachgewiesen werden [NAHRSTEDT, 1976]. Traditionell wird der Sud [<http://planeta.terra.com.br/informatica/zerenato/arvores/alecrim.html>] von *Holocalyx balansae* als Antipyretikum verwendet.

Freundlicherweise wurden die Blätter von *Holocalyx balansae* vom Botanischen Garten der Universität Berlin-Dahlem zur Verfügung gestellt.

#### **5.2.4 *Linum usitatissimum*, L., Linaceae**

*Linum usitatissimum* (dt: Lein, Leinsamen) liefert als einjährige Pflanze sowohl Fasern (aus den Stengeln) als auch Öl (aus den Samen). Lein ist ein 60–100 cm hohes, meist eintriebiges Kraut mit linealistischen Blüten und rispigen Infloreszenzen. Fünf Fruchtblätter verwachsen zu einer erbsengroßen, zehnfächrigen Kapsel mit meist 6-7 eiförmigen, abgeplatteten Samen.

Als Inhaltsstoffe enthalten die Samen von *Linum usitatissimum* fettes Öl, Ballaststoffe und 0,01 % bis 1,5 % der cyanogenen Glykoside Linustatin und Neolinustatin, wobei der Gehalt an cyanogenen Glykosiden in den Samen höher ist als im Pflanzenmaterial [OOMAH et al., 1992].

Die Samen von *Linum usitatissimum* (Leinsamen) werden sowohl arzneilich als auch als Nahrungsmittel genutzt, vor allem in Backwaren. Lini Samen sind im EuAB 2004 monographiert und finden als Ganzdroge, gequetscht oder geschrotet Anwendung als Quellungs laxans bei Obstipation. Außerdem kann Leinsamen aufgrund seines Gehaltes an ungesättigten Fettsäuren lipidsenkend und gekocht als Leinsamenschleim wegen seines hohen Ballaststoffgehaltes blutzuckersenkend wirken. Zudem deuten neuere klinische Studien darauf hin, daß Leinsamen u.U. das Risiko für Colon- und Mammatumore verringern kann, dieser protektive Effekt wird auf die Anwesenheit von Lignanvorläufern zurückgeführt [HAGERS HANDBUCH DER PHARMAZEUTISCHEN PRAXIS, 1994].

Untersucht wurde handelsüblicher, ganzer Leinsamen der Firma Phönix, Bondorf.

#### **5.2.5 *Manihot esculenta*, Crantz, Euphorbiaceae**

*Manihot esculenta* ist eine streng tropische, mehrjährige, strauchartige Pflanze und wird bis zu 3 m hoch. Ihre Blätter sind langgestielt und tief handförmig geteilt, Blütenstände treten als terminale Rispen auf. Aus ihren sprossbürtigen Wurzeln bildet sie an der Sproßbasis durch sekundäres Dickenwachstum zylindrische oder kegelförmige

Wurzelknollen, die 30–50 cm lang werden und einen Durchmesser von 5–10 cm aufweisen. Alle Teile der Pflanze sind von langen Milchröhren durchzogen, deren Milch 0,008 % bis 0,4 % der Blausäureglykoside Linamarin und Lotaustralin enthält [BISSETT et al., 1969].

Verzehrt werden von *Manihot esculenta* ausschließlich die stärkehaltigen Wurzelknollen, jedoch scheidet hier ebenso wie bei *Phaseolus lunatus* der Rohgenuss wegen des Gehaltes an Blausäureglykosiden aus. Die Knollen werden geschält, dann gekocht, gedämpft oder geröstet und anschließend als Brei oder gebacken als Fladen verzehrt. Teilweise wird das gekochte Pflanzenmaterial aber auch zu Mehl verarbeitet oder dient der Gewinnung von „Tapioka“ (Stärke) oder Perlsago.

Es wurde Maniok aus Ho-Chi-Minh-Stadt, Vietnam, aus Bangkok, Thailand und aus Maringá, Brasilien untersucht.

#### **5.2.6 *Phaseolus lunatus*, L., Fabaceae**

*Phaseolus lunatus* (dt: Limabohne, Mondbohne) ist eine einjährige Phaseolus-Art, die vorzugsweise in tropischen und subtropischen Ländern angebaut wird. Die breiten, sichelförmig gebogenen kurzen Hülsen der buschigen oder windenden Pflanze gehen aus den grünlich-gelben Blüten hervor und enthalten 2–4 verschiedenartig braun bis dunkelviolett gefärbte, radial gerillte, nierenförmige Samen, die ca 0,7–1,3 cm lang sind.

Als Inhaltsstoffe kommen in den Samen von *Phaseolus lunatus* Proteine und 0,04 % bis 0,1 % der cyanogenen Glykoside Linamarin („Phaseolunatin“) und Lotaustralin vor [KOMIYAMA et al.,1986], wobei ebenso wie bei *Linum usitatissimum* auch hier der Gehalt an cyanogenen Glykosiden in den Samen höher ist als in allen anderen Pflanzenteilen [WATT und BREYER-BRANDWIJK, 1962].

Die Samen von *Phaseolus lunatus* sind essbar und finden in Süd- und Ostafrika teilweise als Nahrungsmittel Verwendung, hauptsächlich dienen sie jedoch als proteinreiches Viehfutter.

Die Samen stammen aus dem Botanischen Garten der Universität Berlin-Dahlem.

#### **5.2.7 *Sambucus nigra*, L., Caprifoliaceae**

*Sambucus nigra* (dt: Holunder, Fliederbeeren) ist ein von Europa bis Asien heimischer, bis zu 7 m hoher Strauch mit gegenständig unpaarigen Fiederblättern und zur Blütezeit (Juni) endständigen, schirmförmigen Trugdolden weißer Blüten.

Die mehr oder weniger kugeligen Früchte sind leicht glänzend schwarz-violett mit einem Durchmesser bis zu 6 mm und weisen in ihrem purpurfarbenen Fruchtfleisch 3-5 längliche Steinkerne. Als Inhaltsstoffe enthalten die Früchte neben Flavonoiden wenig ätherisches Öl, Vitamine und Mineralstoffe und im Samen die cyanogenen Glykoside Holocalin, Zierin, Prunasin und Sambunigrin [JENSEN und NIEHLSSEN, 1976; DELLAGRECA, 2000, D'ABROSCA et al., 2001].

Die Früchte von *Sambucus nigra*, Holunderbeeren, dienen als Nahrungsmittel (Holundergelee, Holunderbeerensaft), werden aber auch arzneilich genutzt. Die Droge ist definiert als die reifen, getrockneten oder frischen Früchte und wird volkstümlich als Saft der frischen Früchte verabreicht bei Verstopfung, zur Anregung der Harnausscheidung und als schweißtreibendes Mittel, wobei die Wirksamkeit der Droge bei den genannten Anwendungsgebieten derzeit nicht wissenschaftlich belegt ist [HAGERS HANDBUCH DER PHARMAZEUTISCHEN PRAXIS, 1994].

Die analysierten Holunderbeeren stammen aus dem institutseigenen Arznei- und Nutzpflanzengarten.

## 6 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, unter Berücksichtigung bereits zuvor durchgeführter Arbeiten, weitere Quantifizierungs- und Identifizierungsmöglichkeiten für cyanogene Glykoside in biologischen Matrices (vorzugsweise Pflanzenextrakte) zu etablieren und entsprechende routinefähige Methoden zu entwickeln und zu validieren. Dabei sollten cyanogene Glykoside mit unterschiedlichen Chromophoren (eigene oder durch entsprechende Derivatisierung eingeführte) untersucht werden. Die Probenaufarbeitung für die zu entwickelnden Methoden, wie z.B. Extraktions- oder Anreicherungsschritte, sollte möglichst kurz sein.

Für die cyanogenen Glykoside, die teilweise auch als Epimerenpaare vorkommen, sollte eine simultane Bestimmungsmethode für beide Epimere angestrebt werden, außerdem sollte das Verfahren ermöglichen, mehrere biogenetisch verwandte bzw. natürlicherweise vergesellschaftet vorkommende cyanogene Glykoside zu trennen.

Durch den Vergleich mit anderen Methoden, z.B. HPLC, sollten die Vor- und Nachteile der CE-Analytik dokumentiert werden.

Pflanzenname	Pflanze	Untersuchter Pflanzenteil
<i>Bambusa vulgaris</i>		
<i>Eschscholtzia californica</i>		
<i>Holocalyx balansae</i>		
<i>Linum usitatissimum</i>		
<i>Manihot esculenta</i>		
<i>Phaseolus lunatus</i>		
<i>Sambucus nigra</i>		

Tab.I.6: Farbtafeln zu den untersuchten Pflanzen

### *III. Spezieller Teil*

## A Aromatische, hydroxylierte Cyanglykoside

### 1 *p* – Hydroxylierte Cyanglykoside: Dhurrin und Taxiphyllin, abgeleitet davon Triglochinin

#### 1.1 Dhurrin und Taxiphyllin, Triglochinin und seine Isomeren

Die drei cyanogenen Glykoside Dhurrin, Taxiphyllin und Triglochinin leiten sich biogenetisch von der Aminosäure Tyrosin ab. Die Biosynthese von Dhurrin wurde bereits im Allgemeinen Teil unter 4.4, *Abb.I.6* beschrieben. Dass sie über die Aminosäure Tyrosin als biogenetischen Precursor und nicht über Phenylalanin verläuft, wurde u.a. für *Sorghum bicolor* [HALKIER et al, 1990] und für die Familie der Rosaceae nachgewiesen [SCHENK, 1998]. Dhurrin wurde erstmalig 1902 beschrieben [DUNSTAN und HENRY, 1902], die absolute Konfiguration der beiden phenolischen cyanogenen Glykoside Dhurrin und Taxiphyllin wurde 1964 aufgeklärt [TOWERS et al., 1964].

Triglochinin wurde erstmalig aus *Triglochin maritima* [EYJOLFSSON, 1970; ETLINGER und EYOLFSSON, 1972] isoliert und entsteht vermutlich durch oxidative Ringöffnung des Tyrosins [NAHRSTEDT, 1984; MØLLER und SEIGLER, 1999; NIELSEN und MØLLER, 1999], jedoch ist der genaue Mechanismus der Biosynthese nicht geklärt [SELMAR, 1999]. Isotriglochinin, das (*E*)-Isomer des Triglochinins, wurde ebenfalls isoliert und beschrieben, wird aber als ein durch die Aufarbeitung entstehendes Artefakt angesehen [NAHRSTEDT, 1975; CONN, 1981]. Unter 1.2 (s. *Abb.II.2*) werden die Isomere des Triglochinins eingehender diskutiert.

Vom Tyrosin abgeleitete cyanogene Glykoside treten zumeist in monocotylen Angiospermen auf, aber auch in einigen Familien der dicotylen Pflanzen [HEGNAUER, 1986].

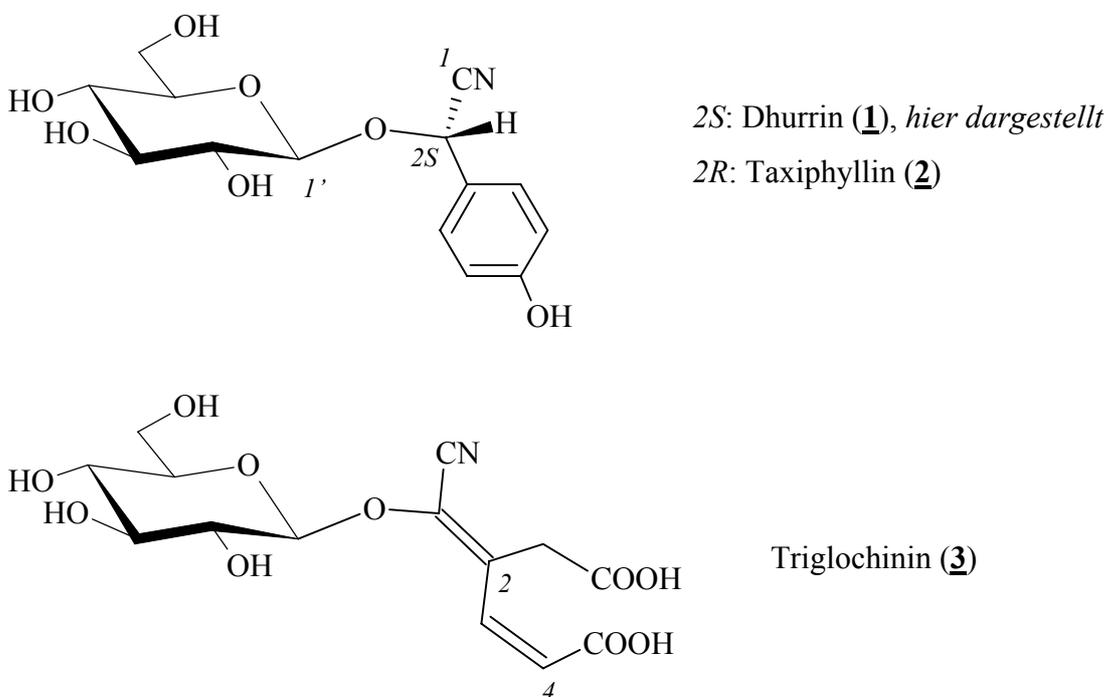
Häufig anzutreffen sind diese hier angesprochenen cyanogenen Glykoside auch in Lebensmitteln (z.B. Bambus-Sprossen), bzw. in Pflanzen, die zur Gewinnung von Lebensmitteln genutzt werden (z.B. Hirse von *Sorghum bicolor*) [JONES, 1998]. Es liegt also nahe, eine Methode zu entwickeln, diese in Nutz- und teilweise auch in arzneilich eingesetzten Pflanzen vorkommenden, blausäurefreisetzenden Inhaltstoffe sicher identifizieren und quantifizieren zu können. Die Methode wurde so ausgearbeitet, dass sie eine gleichzeitige Bestimmung von Triglochinin neben Dhurrin oder Taxiphyllin erlaubt, da diese Verbindungen in der Natur vergesellschaftet vorkommen. Dies ist plausibel, da

eine Bildung des Triglochinins durch oxidative Ringöffnung der meta-hydroxylierten Cyanglykoside Dhurrin oder Taxiphyllin untersucht wurde [NAHRSTEDT et al. 1979; KANT, 1983].

Die Bezeichnung von cyanogenen Glykosiden erfolgt oftmals nicht einheitlich, daher werden im Folgenden (s. *Tab.II.1*) die in der Literatur hauptsächlich verwendeten halbsystematischen und systematischen Namen den i.d.R. verwendeten Trivialnamen zugeordnet:

<i>Trivialname</i>	<i>halbsystematische Bezeichnung</i>	<i>Systematische Bezeichnung (Nitril- oder Cyano-Nomenklatur)</i>
Dhurrin	2 <i>S</i> - <i>p</i> -Hydroxymandelonitrilglucosid	2-β-D-Glucopyranosyloxy-2(4-hydroxyphenyl)-2 <i>S</i> -acetonitril
Taxiphyllin	2 <i>R</i> - <i>p</i> -Hydroxymandelonitrilglucosid	2-β-D-Glucopyranosyloxy-2(4-hydroxyphenyl)-2 <i>R</i> -acetonitril
Triglochinin		O-[β-D-Glucopyranosyl]-1-cyano-1-hydroxy-2-methylcarboxy-4-carboxy-Δ <sup>1,2</sup> ( <i>E</i> )-3,4( <i>Z</i> )-butadien

*Tab. II.1: Bezeichnungen einiger p-hydroxylierter Cyanglykoside*



*Abb.II.1: Beispiele für Tyrosin – abgeleitete cyanogene Glycoside*

## 1.2 Chemische und Physikalische Eigenschaften

Dhurrin und Taxiphyllin sind phenolische Glykoside. Sie können im schwach alkalischen Milieu aufgrund der möglichen Mesomeriestabilisierung Phenolat-Anionen ausbilden, wodurch ihre Acidität deutlich größer ist als z.B. die von aliphatischen Alkoholen. Cyanogene Glykoside isomerisieren aber auch leicht in alkalischem Milieu, jedoch ist für Dhurrin im basischen Milieu der Abbau beschrieben [MAO und ANDERSON, 1965]. Es ist also bei einer kapillarelektrophoretischen Trennung mittels eines alkalischen Puffers die Stabilität der Epimeren Dhurrin und Taxiphyllin wenigstens für die Dauer eines Laufes zu beachten. Eine Detektion der beiden Substanzen ist aufgrund ihres Phenolkörpers problemlos, lediglich kann es pH-Wert abhängig zu bathochromen Verschiebungen des UV-Maximums kommen. Im sauren oder neutralen pH-Bereich liegen Taxiphyllin und Dhurrin ungeladen vor, ihre Labilität im Alkalischen wird unter 1.5 näher untersucht und erläutert.

Triglochinin ist eine Dicarbonsäure, die sowohl im sauren Milieu protoniert vorliegt als auch im alkalischen Milieu aufgrund ihrer beiden Carboxylgruppen zwei resonanzstabilisierte Ladungen aufweist. Durch ihr konjugiertes  $\pi$ -Elektronensystem ist auch diese Verbindung, ebenso wie die entsprechenden Isomere, problemlos detektierbar.

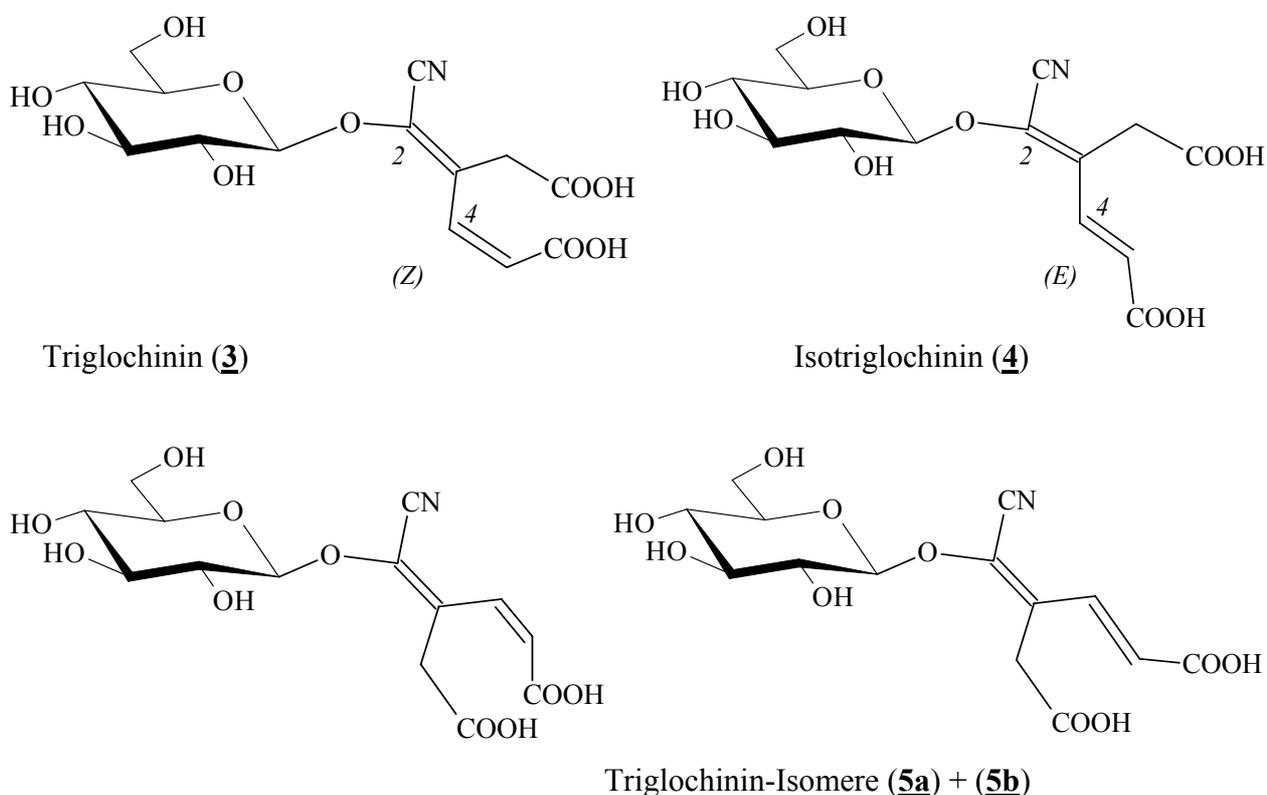


Abb.II.2: (E)-Triglochinin (**3**), (Z)-Isotriglochinin (**4**), Triglochinin-Isomere (**5a**) und (**5b**)

Bereits NAHRSTEDT und KANT beschrieben die Isomerisierung von Triglochinin [NAHRSTEDT, 1981; KANT, 1983]. Auch wurde 1981 bereits eine HPLC-Methode zur Bestimmung der drei Hauptisomere des Triglochinins entwickelt und publiziert [NAHRSTEDT, 1981]. Triglochinin isomerisiert bevorzugt an C<sub>4</sub>, diese Verbindung wird allgemein als Isotriglochinin bezeichnet. Des Weiteren können sowohl Triglochinin als auch Isotriglochinin noch an C<sub>2</sub> isomerisieren (Triglochinin-Isomere, **(5a)** + **(5b)**). Diese Reaktion findet aber offensichtlich in deutlich geringerem Ausmaß statt, denn die erhaltenen Peaks weisen, bei mit Triglochinin und Isotriglochinin übereinstimmenden UV-Spektren, eine sehr viel geringere Intensität auf als die Signale von Triglochinin und Isotriglochinin. Eine Zuordnung dieser beiden Komponenten konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht getroffen werden. Diese Verbindungen werden als weitere Artefakte im Zuge der Aufarbeitung bzw. der Extrakterstellung angesehen. Die Anwesenheit eines weiteren Triglochinin-Isomeren neben Triglochinin und Isotriglochinin wurde bereits bei der Beschreibung einer HPLC-Methode für Triglochinin und seine Isomere besprochen [NAHRSTEDT, 1973].

### **1.3 Methodenentwicklung zur Trennung von Triglochinin, Dhurrin und Taxiphyllin**

Die Trennung von Analyten mittels Kapillarzonenelektrophorese (CZE) beruht auf der unterschiedlichen elektrophoretischen Beweglichkeit von Ionen im elektrischen Feld. Das Epimerenpaar Dhurrin/Taxiphyllin ist neutral, verfügt aber über eine freie phenolische Hydroxylgruppe, d.h. in alkalischem Milieu liegen diese beiden Moleküle deprotoniert und somit negativ geladen vor. Bei Triglochinin und seinen Isomeren handelt es sich um Dicarbonsäuren, die aufgrund ihres pH-Wert-abhängigen Dissoziationsgleichgewichts positiv oder negativ geladen oder neutral vorliegen. Im stark alkalischen Milieu liegen die Moleküle vollständig deprotoniert, also doppelt negativ geladen vor.

Ein erstes Ziel ist somit die Auftrennung eines Gemisches von einer Dicarbonsäure und deren Isomere, zwei phenolischen Verbindungen und einem geeigneten internen Standard (zur Wahl des internen Standards s. **1.4**), hier eine Hydroxycarbonsäure: Salicylsäure.

Da cyanogene Glykoside im alkalischen Milieu zur Isomerisierung neigen, wurden zunächst Puffersysteme mit leicht sauren bis neutralen pH-Werten zur Trennung eingesetzt. Da die Analyten im neutralen oder sauren Milieu teilweise neutral vorliegen,

konnten diese Puffer nicht ohne ionische Mizellbildner oder durch Substitution geladene Cyclodextrine eingesetzt werden.

Es wurden als Basistrennpuffer eine Phosphat-Puffer-Reihe im pH-Bereich von pH 5,3–8,0, eine Acetat-Puffer-Reihe im Bereich von 3,6–5,6 und reine Borsäure mit einem pH-Wert von ~5,1 (ohne pH-Wert-Einstellung) eingesetzt.

Zum Einsatz kamen als Additive Natriumdodecylsulfat (SDS), Natriumtaurodesoxycholat (TDC), sulfatiertes  $\beta$ -Cyclodextrin (HS- $\beta$ -CD) und für binäre Systeme zusätzlich Mischungen dieser geladenen Additive mit dem neutralen Emulgator Tween 20 (T20),  $\beta$ -Cyclodextrin ( $\beta$ -CD) und  $\beta$ -Methyl-Cyclodextrin (Me- $\beta$ -CD), jeweils in verschiedenen Konzentrationen der Puffer und der Additive und bei verschiedenen angelegten Spannungen. Eine tabellarische Auflistung sowie die genaue Zusammensetzung und Herstellung ist dem Experimentellen Teil unter **3.2** zu entnehmen.

Da die Verwendung der oben beschriebenen Puffersysteme im schwach sauren bis neutralen pH-Bereich keine befriedigenden Auftrennungen lieferten, wurde schließlich doch eine Trennung im Alkalischen in Betracht gezogen. Vor der weiteren Methodenentwicklung wurde hierfür zunächst die Stabilität des Epimers Dhurrin im eingesetzten pH-Wert überprüft (s. **1.5**).

Bei einem pH-Wert von ca. 9,3 (Natriumteraboratpuffer ohne pH-Wert-Einstellung) sind die Moleküle, wie oben erklärt, negativ geladen und haben durch ihre Eigenladung eine eigene elektrophoretische Beweglichkeit. Außerdem ist bei diesem pH-Wert der EOF ausreichend stark, so dass die Analyten bei anodischer Probenaufgabe trotz negativer Eigenladung als Anionen zum Detektor auf der Kathodenseite transportiert werden.

Beim Einsatz von Boratpuffern ist außerdem zu bedenken, dass eine steigende Borationen-Konzentration in steigendem Maße zu einer Komplexbildung vicinaler Hydroxylgruppen und 1,3-Diole führt [MORIN et al., 1993; HOFFSTETTER-KUHN et al., 1991], hierauf wird bei der weiteren Beschreibung der Methodenentwicklung noch näher eingegangen. Der optimale Puffer, die optimale Pufferkonzentration, ebenso wie der optimale pH-Wert wurden experimentell ermittelt.

Nach ersten Screening-Versuchen mit Borat- und Carbonatpuffern zeigte der Einsatz des Boratpuffers deutliche Vorteile gegenüber dem Carbonat-Puffer, da es bei Verwendung des Carbonatpuffers immer wieder zu Stromzusammenbrüchen durch teilweise sehr starke Gasentwicklung beim Anlegen der Spannung kam. Dieses Problem trat bereits bei einer angelegten Spannung von 10 kV auf, so dass der Einsatz dieses Puffers verworfen wurde.

Da erste Vorversuche mit 100 mM Natriumtetraboratpuffer bei einer angelegten Spannung von 30 kV bereits eine Auftrennung des Triglochinins von seinen drei Isomeren zeigte (s. *Abb.II.3*), wurde dieser Puffer als Basis- oder Leerpuffer gewählt.

Die weitere Methodenentwicklung wird separat für die Trennung von Triglochinin und seinen Isomeren und das Epimerenpaar Dhurrin und Taxiphyllin beschrieben, da für eine Trennung von Dhurrin und Taxiphyllin offensichtlich ein weiterer Pufferzusatz erforderlich war.

Während der gesamten Methodenentwicklung wurde mehrfach die Trennung mit einer verkürzten Kapillare (von 70 auf 50 cm) getestet, was zwar zu einer Verbesserung bezüglich der Analysendauer führte, allerdings auch verbunden war mit einer deutlichen Verschlechterung der Reproduzierbarkeit. Grund für die mangelnde Reproduzierbarkeit, die sich vor allem in stark schwankenden Stromstärken während eines Laufes äußert, ist wahrscheinlich die hohe Spannung in der verkürzten Kapillare, woraus höhere Stromstärken resultieren. Letztendlich wurde aufgrund des Einsatzes eines Puffers, der auch bei einer Kapillarlänge von 70 cm immer noch eine Stromstärke von ca. 90-100  $\mu\text{A}$  bewirkt, auf diese Möglichkeit zur Verbesserung der Migrationszeiten verzichtet. Die durch die Verkürzung der Kapillare deutlich unregelmäßigere Basislinie ist durch thermische Effekte („*JOULE-Heating*“) in der Kapillare zu erklären [ENGELHARDT et al., 1994].

### 1.3.1 Triglochinin und seine Isomere

*Abb.II.3* zeigt deutlich die Verbesserung der Auftrennung des Triglochinins von seinen Isomeren, die durch *cis-trans*-Isomerisierungen an  $\text{C}_2$  und an  $\text{C}_4$  entstehen, in Abhängigkeit von der Konzentration des eingesetzten Natriumtetraboratpuffers. Durch die Konzentrationserhöhung wird zwar auch die Migrationszeit verzögert, dafür ist bei Einsatz von 100 mM eine Auftrennung aller vier Isomere möglich, während bei einer Boratkonzentration von 60 mM lediglich drei Peaks zu erkennen sind.

Der Hauptpeak ist dem Triglochinin zuzuordnen, die zuvor migrierende Substanz ist das Isotriglochinin (Isomerisierung am  $\text{C}_2$ ), der bzw. die beiden weiteren Peaks sind auf die durch *cis-trans*-Isomerisierung am  $\text{C}_4$  entstandenen Verbindungen zurückzuführen. Dass es sich bei den zugeordneten Peaks um die beschriebenen Verbindungen handelt, wurde durch den Vergleich mit früheren Untersuchungen [NAHRSTEDT, 1981], durch Additionsexperimente und durch den Vergleich der UV-Spektren verifiziert.

Die Migrationszeit des Triglochinins ist bei Verwendung des 80 mM Puffers größer als bei dem 100 mM Puffer, dies ist in diesem Fall darauf zurückzuführen, dass bei letzterem Versuch eine neue Kapillare eingesetzt wurde, die wahrscheinlich noch nicht ausreichend konditioniert war. Was auch sehr deutlich die Notwendigkeit ausreichend langer Konditionierungsschritte belegt. Die Zunahme der Migrationszeiten bei steigender Ionenstärke des eingesetzten Puffers gründet in der Tatsache, dass mit steigender Molarität eines Puffers der EOF schwächer wird [ENGELHARDT et al., 1994].

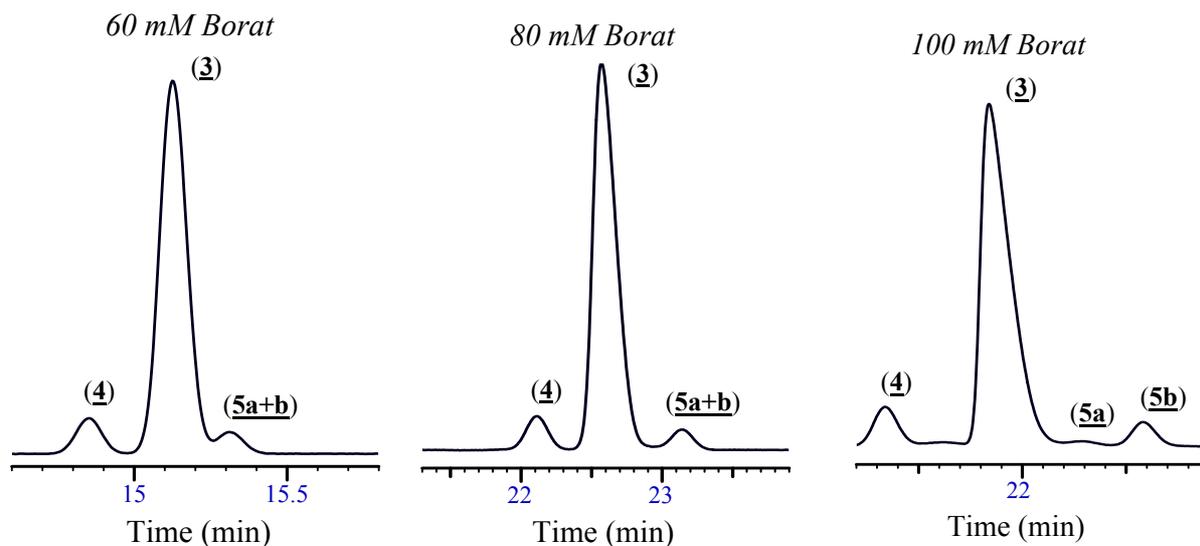


Abb.II.3: Verbesserung der Auftrennung von Triglochinin (3), Isotriglochinin (4) und den beiden weiteren Isomeren (5a+b)

Trennbedingungen\*: 60, 80 bzw. 100 mM Na<sub>2</sub>B<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Puffer (v.l.n.r.), 30 kV, l = 60/70cm, 50 µm I.D., Detektion: Max-Plot-Modus, Injektion: 3s isomerisiertes Triglochinin

Wurde anstelle des Borat-Puffers ein ebenfalls basischer Phosphat-Puffer eingesetzt (pH ~ 8,6), zeigte sich keine Antrennung des Triglochinins und seiner Isomere. Hieraus ist zu schließen, dass der oben gezeigte Trenneffekt nicht in erster Linie auf der aus der Wahl des pH-Wertes resultierenden negativen Eigenladung der Analyten, sondern eventuell auch auf dem chelatisierenden Effekt des Borats auf die Hydroxylgruppen der Glykoside beruht, der bereits in der Literatur mehrfach beschrieben wurde [MORIN et al., 1993; HOFFSTETTER-KUHN et al., 1991].

\*: für alle CE-Methoden gilt hier und im Weiteren, soweit nicht ausdrücklich anders vermerkt: Injektion bei 0,5 psi, Konzentration der Vergleiche zur Methodenentwicklung 1-2 mg/ml, Temperatur (Kapillare) 20° C, Probenkühlung 10° C, weitere allg. Bedingungen s. Ex. Teil unter 2

### 1.3.2 Trennung des Epimerenpaares Dhurrin und Taxiphyllin

Da durch geschickte Wahl des Puffers zwar eine vollständige Auftrennung von Triglochinin und seinen Isomeren möglich war, nicht jedoch die des Epimerenpaares Dhurrin und Taxiphyllin, mußte ein Pufferadditiv gefunden werden, mit dessen Hilfe die beiden Epimere getrennt werden können, ohne die Trennung der Triglochinine zu beeinflussen.

Epimere sind Diastereomere, die sich nur in der relativen Lage der Substituenten an einem Kohlenstoffatom unterscheiden, d.h. sie besitzen am ersten von u.U. mehreren asymmetrischen C-Atomen unterschiedliche Konfiguration, sind aber nicht spiegelbildlich zueinander.

Der einzige Unterschied von Dhurrin und Taxiphyllin besteht in der räumlichen Anordnung der Substituenten an C<sub>2</sub>, so dass zunächst Cyclodextrine zur Trennung eingesetzt wurden. Diese bilden mit den Epimeren Assoziate. Aufgrund der sterischen Unterschiede haben die beiden Epimere unterschiedlich lange mittlere Aufenthaltswahrscheinlichkeiten bzw. Affinitäten und somit unterschiedliche Migrationszeiten. Cyclodextrine wandern als Neutralteilchen mit dem EOF, Dhurrin und Taxiphyllin aufgrund ihrer negativen Eigenladung langsamer als der EOF, so dass sich ihre Migrationszeit proportional zur mittleren Aufenthaltswahrscheinlichkeit im Cyclodextrin verringert.

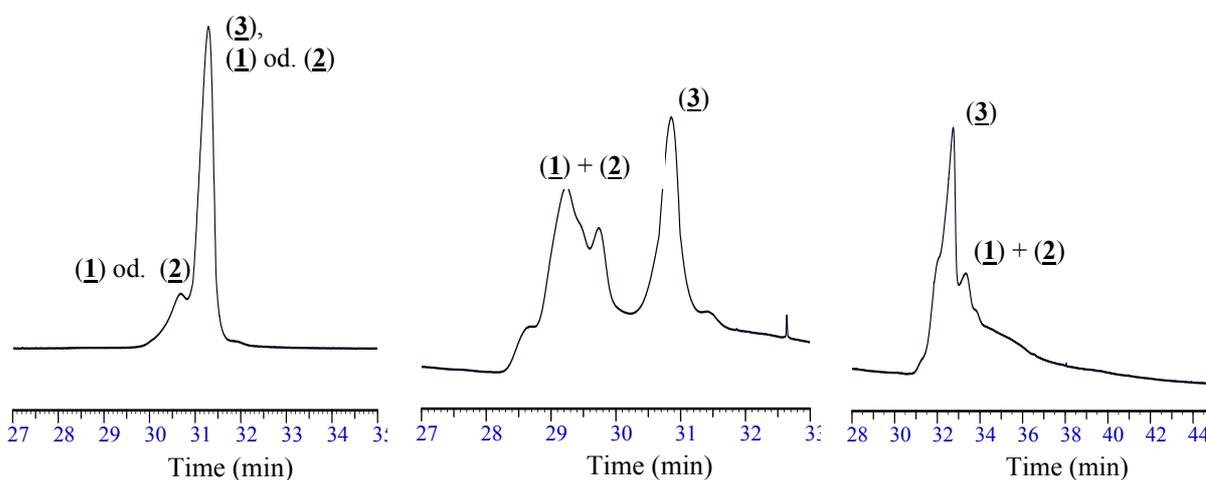


Abb.II.4: Zusatz von 0.15, 0.1 und 0.05 %  $\alpha$ -Cyclodextrin (v.l.n.r.)

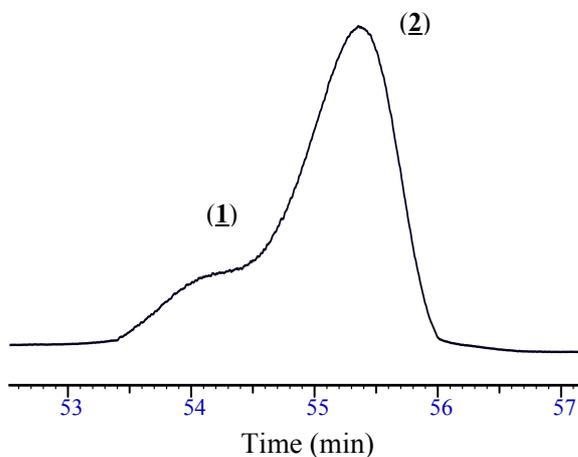
Trennbedingungen: 100 mM Na<sub>2</sub>B<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Puffer, 30 kV, l = 60/70cm, 50  $\mu$ m I.D.,

Detektion: Max-Plot-Modus, Injektion: 3s Triglochinin (3), 3s isomerisiertes Taxiphyllin (1+2)

Der Einsatz von  $\alpha$ -Cyclodextrinen lieferte zwar eine Antrennung des vorliegenden Epimerenpaares, jedoch konnte dieses System nicht über die dargestellte Antrennung hinaus optimiert werden (s. *Abb.II.4*).

Die Zuordnung der Peaks wurde über ihre UV-Spektren getroffen, sowohl im ersten als auch im letzten Beispiel überlagert sich der Triglochinin-Peak mit einem der beiden Epimere Dhurrin oder Taxiphyllin, bzw. beim letzten Elektropherogramm laufen wegen der sehr schlechten Auflösung die Peaks aller drei Verbindungen zusammen.

Der Einsatz anderer Cyclodextrine, sowohl underivatiertes  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Cyclodextrin als auch derivatisierter Cyclodextrine, lieferten keine bzw. keine vielversprechenderen Ergebnisse. Lediglich bei Zugabe von sulfatiertem  $\beta$ -Cyclodextrin zum Puffer konnte auch eine Antrennung des Epimerenpaares erzielt werden. Diese Möglichkeit wurde jedoch verworfen, da der Einsatz des im vorliegenden Puffer negativ geladenen sulfatierten  $\beta$ -CD bei der Trennung der im alkalischen Milieu ebenfalls negativ geladenen Verbindungen Dhurrin und Taxiphyllin zu einer erheblichen, unerwünschten Verlängerung der Analysenzeit beitrug (s. *Abb.II.5*).



*Trennbedingungen:* s.o.

*Pufferadditiv:* 0.15 % HS- $\beta$ -CD

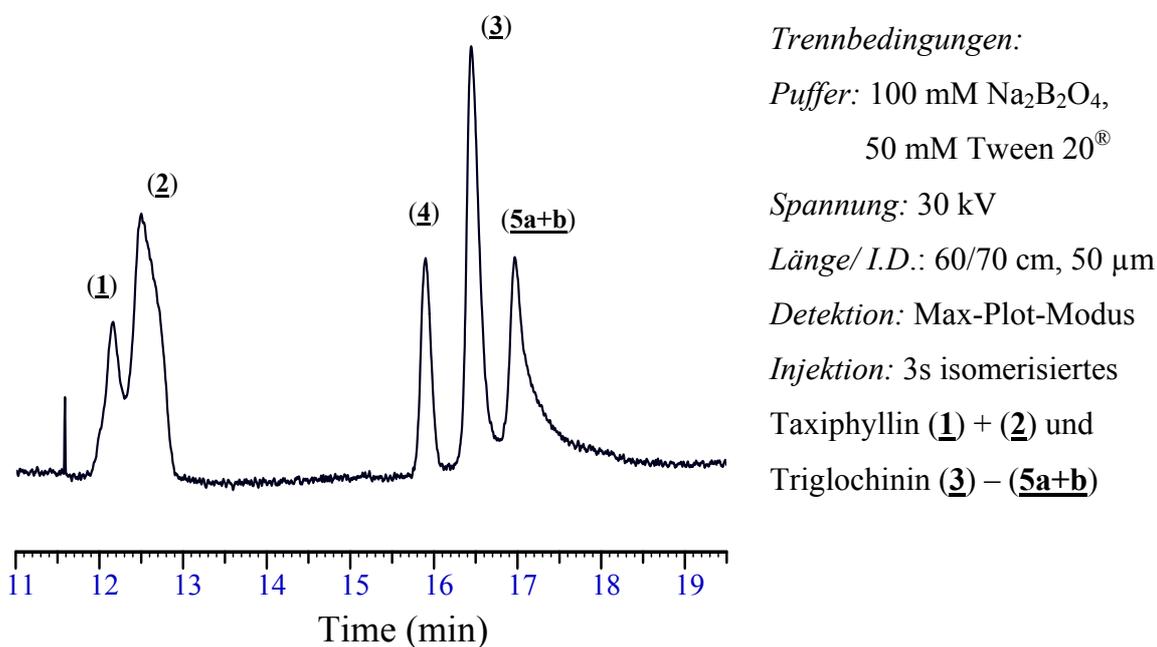
*Injektion:* 3s Taxiphyllin, 3s  
isomerisiertes Taxiphyllin

*Abb.II.5:* Einsatz von HS- $\beta$ -CD, sehr späte Migration von Dhurrin (1) und Taxiphyllin (2)

Im Anschluss an die Austestung der diversen Cyclodextrine wurden zunächst die bei der Methodenentwicklung in der CE üblichen Mizellbildner eingesetzt. Jedoch wurde auch dieser Ansatz schnell wieder fallengelassen, als feststand, dass auch diese Pufferzusätze zu einer extremen Verzögerung der Migrationszeiten führten.

Schlußendlich wurden neutrale Mizellbildner eingesetzt. Hierbei standen die Emulgatoren Tween 20<sup>®</sup>, Tween 60<sup>®</sup> und Brij 35<sup>®</sup> zur Disposition. Tween 60<sup>®</sup> schied nach den ersten Screening-Versuchen aus, da dieser Emulgator schon bei relativ niedrigen Konzentrationen zur Gelbildung neigt und somit unter den gegebenen Bedingungen als ungeeignetes Pufferadditiv für eine kapillarelektrophoretische Trennung angesehen wird. Mit Tween 20<sup>®</sup> konnten zwar vielversprechende Antrennungen in relativ kurzen Analysenzeiten erzielt werden, leider ließ sich der Einsatz dieses Emulgators aber nicht weiter als unten dargestellt verbessern, da eine weitere Auftrennung des Epimerenpaares einher ging mit einem Zusammenfall der Peaks des Triglochinins und seiner Isomere. Im nachfolgend gezeigten Lauf (*Abb.II.6*) fallen zwei der Nebenpeaks des Triglochinins zusammen.

Nur Brij 35<sup>®</sup> führte zu einer Auftrennung des Epimerenpaares ohne die Trennung der Triglochinine negativ zu beeinflussen, weshalb die Wahl letztendlich auf den Einsatz des 100 mM Boratpuffers mit einem Zusatz von 20 mM Brij 35<sup>®</sup> fiel. Hier migriert das *S*-Epimer Dhurrin vor dem *R*-Epimer Taxiphyllin.



*Abb.II.6:* Antrennung durch Zugabe von Tween 20

Nachstehend (s. *Abb.II.7a und b*) sind beide Trennsysteme dargestellt, für den Einsatz von Brij 35<sup>®</sup> wird zusätzlich die Optimierung der Analysenzeit durch eine Erhöhung der angelegten Spannung gezeigt.

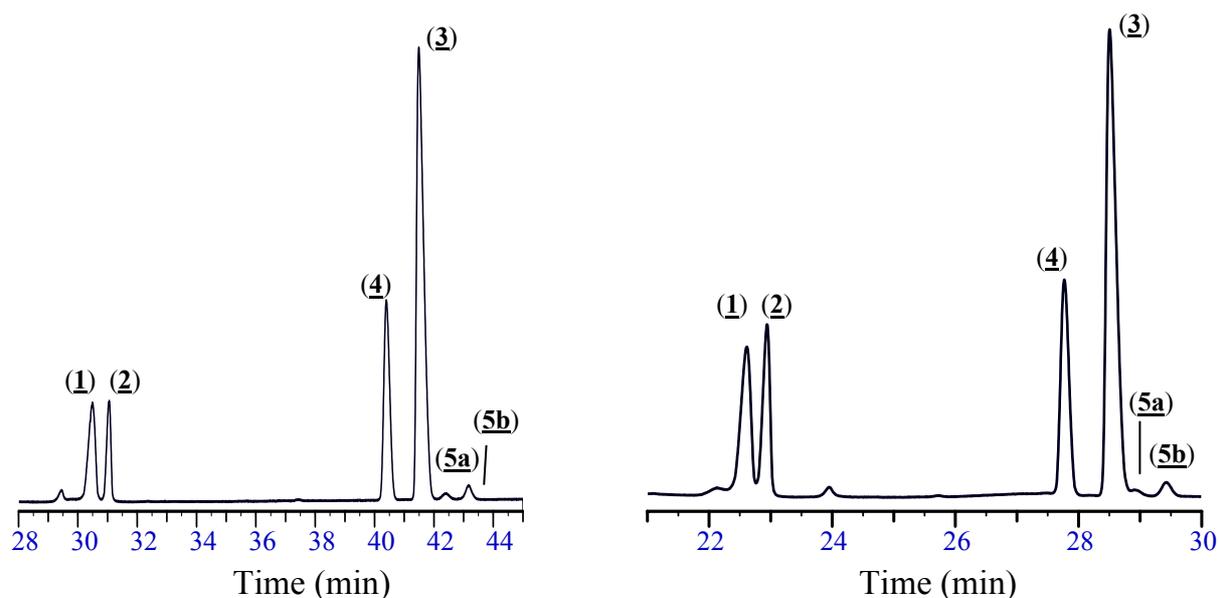


Abb.II.7a: Optimierung der Laufzeit durch Erhöhung der angelegten Spannung von 20 kV auf 30 kV (v.l.n.r.)

Trennbedingungen: 100 mM Na<sub>2</sub>B<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, 20 mM Brij<sup>®</sup> 35, l = 60/70 cm, I.D. 50 µm,

Detektion: Max-Plot-Modus, Injektion: 3s isomerisiertes Taxiphyllin (1) + (2) und Triglochinin (3)–(5a+b)

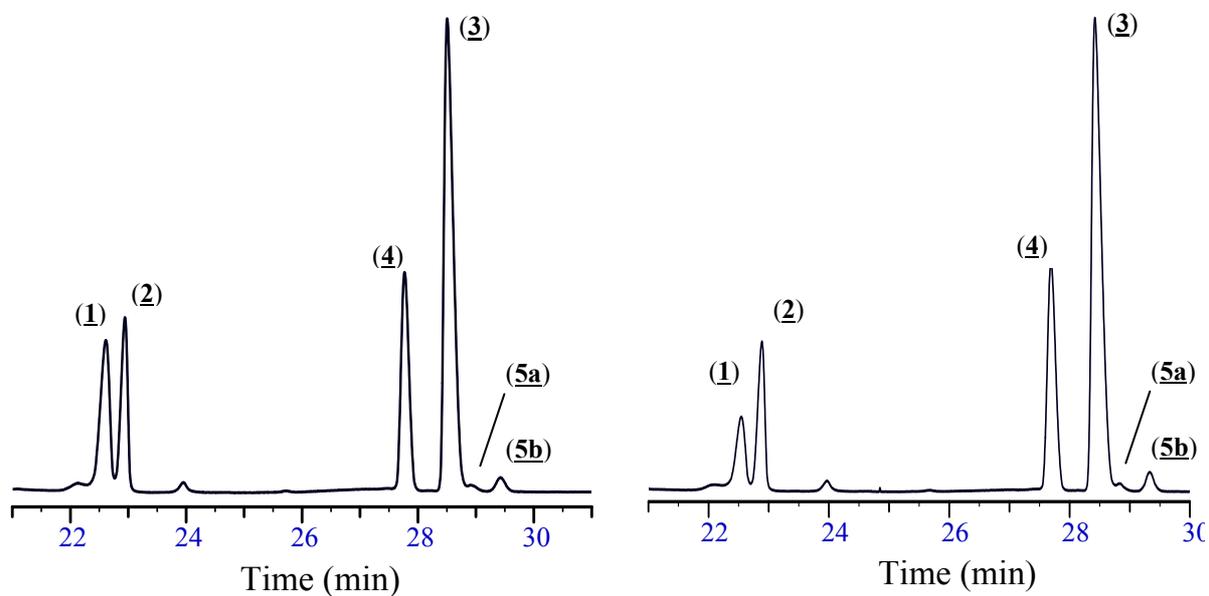


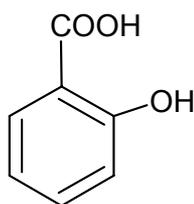
Abb.II.7b: Zuordnung der Peaks durch Addition von Taxiphyllin

Trennbedingungen: s. Abb.II.6a, Injektion: 3s isomerisiertes Triglochinin

(3)–(5a+b), 2s isomerisiertes Taxiphyllin (1) + (2) und 1s Taxiphyllin (2)

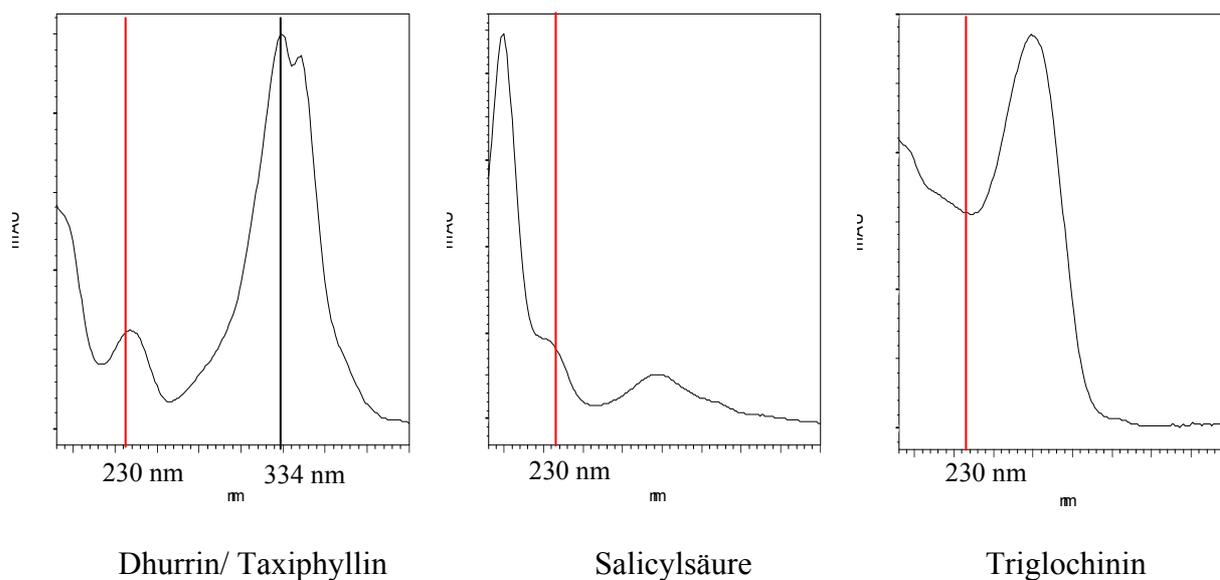
## 1.4 Wahl des internen Standards

Allgemeine Anforderungen an einen internen Standard (ISTD) sind insbesondere folgende Aspekte: Der interne Standard sollte für die Trennung ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften haben wie die Analyten, muss im eingesetzten Milieu stabil sein, darf weder den elektrophoretischen noch den chromatographischen Trennprozeß beeinflussen und sollte kommerziell erhältlich sein. Das Migrationsverhalten des ISTD ist der *Abb.II.14* zu entnehmen.



*Abb.II.8: Salicylsäure (6)*

Aufgrund der UV-Spektren wurde Salicylsäure (s. *Abb.II.8*) als interner Standard gewählt. Eine Betrachtung des UV-Spektrums der Salicylsäure im schließlich entwickelten Trennsystem im Vergleich mit den Spektren von Dhurrin/Taxiphyllin und Triglochinin veranschaulicht diese Wahl zusätzlich.

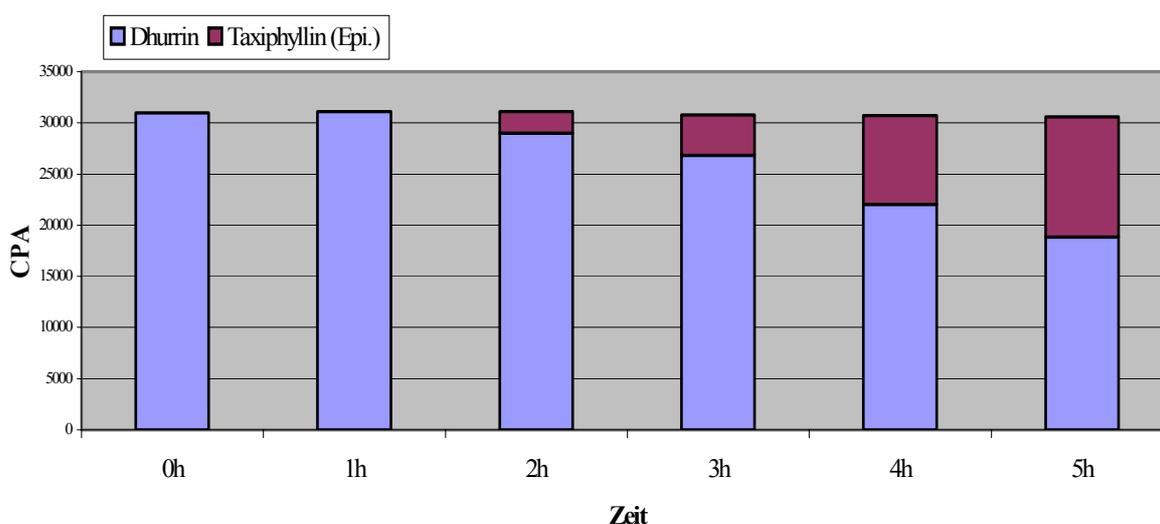


*Abb.II.9: UV-Spektren von Dhurrin/Taxiphyllin, Salicylsäure und Triglochinin, jeweils von 190 – 400 nm, aufgenommen mit MDQ- Capillary Electrophoresis System, Software 32 Karat™*

Von Bedeutung ist der Vergleich der Absorptionsspektren der Analyten für die Analytik mit dem P/ACE 5510-Gerät, da hier nicht im Max-Plot-Modus detektiert werden kann (d.h. jeder Peak wird in seinem eigenen UV-Maximum erfasst), sondern bei zwei diskreten Wellenlängen gemessen werden muss. Als Detektionswellenlängen wurden 230 nm (in *Abb.II.9* mit einer roten Linie gekennzeichnet) und 334 nm gewählt. Bei 230 nm werden Dhurrin und Salicylsäure in einem Nebenmaximum und Triglochinin in einem Zwischenminimum bestimmt, bei dieser Wellenlänge zeigen alle Substanzen eine ähnliche Intensität in ihrem UV-Absorptionsverhalten. Die Aufzeichnung der Elektropherogramme bei 334 nm dient der Überprüfung der Basislinientrennung von Dhurrin und Taxiphyllin. Diese beiden Verbindungen werden bei 334 nm in ihrem Maximum erfasst.

## 1.5 Stabilität im gewählten pH-Bereich

Da Dhurrin und Taxiphyllin im Alkalischen labil sind, wurde nach der vorläufigen Entscheidung für eine Trennung im Alkalischen zunächst die Stabilität von Dhurrin im entwickelten Puffersystem überprüft. Dieses Experiment soll zeigen, ab wann eine nachweisbare Veränderung eintritt, ob Dhurrin bzw. Taxiphyllin für die Dauer eines Laufes stabil sind und ob eine Epimerisierung stattfindet oder ein Abbau. Hierfür wurde Dhurrin im Natriumtetraborat-Puffer gelöst, unmittelbar nach dem Solubilisieren der Probe wurde das erste Mal injiziert, weitere fünf Injektionen erfolgten nach Aufbewahrung bei 10° C im Autosampler in jeweils einstündigen Abständen (s. *Abb.II.10*).



*Abb.II.10: Zeitabhängiger Abbau (Epimerisierung) von Dhurrin in 100 mM Na<sub>2</sub>B<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Puffer mit 20 mM Brij 35*

Aus obigem Diagramm geht eindeutig hervor, dass in der Zeit bis zur Detektion von Dhurrin bzw. Taxiphyllin noch keine Epimerisierung stattfindet, auch konnte kein anderweitiger Abbau des Moleküls beobachtet werden. Die Epimerisierung setzt unter den oben beschriebenen Trennbedingungen erst nach mehr als einer Stunde ein.

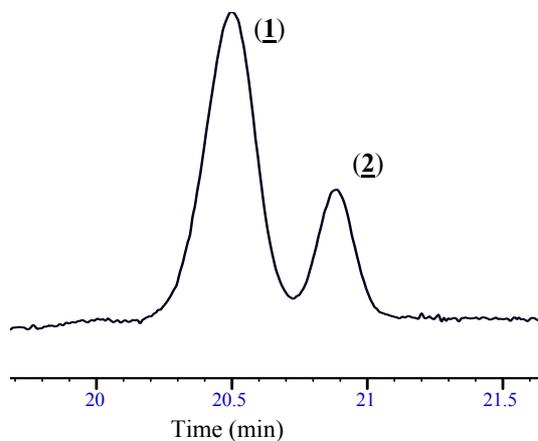
Diese Untersuchungen wurden mit Dhurrin und nicht mit Taxiphyllin durchgeführt, da Dhurrin in diesem pH-Bereich noch labiler ist als Taxiphyllin [MAO et al., 1965]. Gemäß Literatur besteht für Dhurrin bei diesem pH-Wert nicht die Gefahr der Epimerisierung, sondern der vollständigen Zersetzung des Moleküls, d.h. der Spaltung der glykosidischen Bindung [MAO und ANDERSON, 1965] und des Abbau des Aglykons bis zum *p*-Hydroxybenzaldehyd. Unter den hier vorherrschenden Bedingungen, insbesondere unter Berücksichtigung, dass die Proben während der Versuche auf 10° C temperiert wurden (analog zu den äußeren Bedingungen während der kapillarelektrophoretischen Bestimmung), setzte allerdings sehr wohl eine Epimerisierung ein und kein Abbau, anders als in der Literatur beschrieben. Ein weiterer Abbau, wie z.B. die Spaltung der glykosidischen Bindung, d.h. das Entstehen weiterer Peaks, konnte im Verlauf dieser Untersuchung nicht beobachtet werden. Dass es sich hier um eine Epimerisierung handelt und nicht um eine Abbaureaktion zum *p*-Hydroxybenzaldehyd, wie es in der Literatur beschrieben ist, wurde aus folgenden Beobachtungen geschlossen:

1. Unter den gewählten Bedingungen entstand im Verlauf des Experiments neben dem Peak des reinen Dhurrins nur ein neuer Peak (s. *Abb.II.11*), der zudem ein mit dem des Dhurrins völlig identisches UV-Spektrum aufwies.
2. Die Migrationszeit dieses Peaks stimmt exakt mit der von Taxiphyllin überein, dies wurde verifiziert sowohl durch Addition als auch durch separates Analysieren reinen Taxiphyllins und einer Mischung aus reinem Dhurrin und reinem Taxiphyllin
3. Wird epimerisiertes Taxiphyllin injiziert, erhält man ein mit dem unten abgebildeten völlig übereinstimmendes Elektropherogramm.

Wäre, wie in der Literatur beschrieben, das Abbauprodukt *p*-Hydroxybenzaldehyd entstanden, hätte dieses

1. als Aldehyd nicht dasselbe UV-Spektrum wie Dhurrin als phenolisches Glykosid
2. als Aldehyd in dem angegebenen System eine deutlich andere Migrationszeit als das *p*-hydroxylierte, aromatische Cyanglykosid.

Des Weiteren ist zu beachten, dass in der Literatur die Labilität des Dhurrins auch als Thermolabilität bezeichnet wird, denn die beschriebenen Abbaureaktionen focussieren die Temperaturabhängigkeit des Abbaus auch sehr viel stärker als die pH-Wert-Abhängigkeit [NAHRSTEDT, 1981; SCHWARZMAIER, 1976]. Von MAO [MAO, 1965] wurde die pH-Wert-Abhängigkeit genauer beschrieben, allerdings wurden alle von MAO beschriebenen Experimente bei 25° C durchgeführt, während die Proben hier auf 10° C temperiert wurden (s. Exp. Teil unter 3.1).



*Trennbedingungen:*

*Puffer:* 100 mM Na<sub>2</sub>B<sub>2</sub>O<sub>4</sub>,

20 mM Brij 35<sup>®</sup>

*Spannung:* 30 kV

*Länge/ I.D.:* 60/70 cm, 50 µm

*Detektion:* Max-Plot-Modus

*Injektion:* 3s Dhurrin (nach 5h in

Na<sub>2</sub>B<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)

Abb.II.11: Elektropherogramm der Epimerisierung: Dhurrin (1), Taxiphyllin (2)

## 2 Validierung

### 2.1 Spezifität

Die Spezifität der entwickelten Methode wurde durch Additions-Experimente und Vergleich der Elektropherogramme der einzelnen Reinsubstanzen mit den Elektropherogrammen der Extrakte sichergestellt. Alle Quantifizierungen erfolgten mittels Standardzusatzverfahren (SZV), d.h. bei gleich bleibender Menge an zugegebenem internem Standard werden dem zu untersuchenden Extrakt steigende Konzentrationen des zu bestimmenden cyanogenen Glykosids zugesetzt.

### 2.2 Kalibration

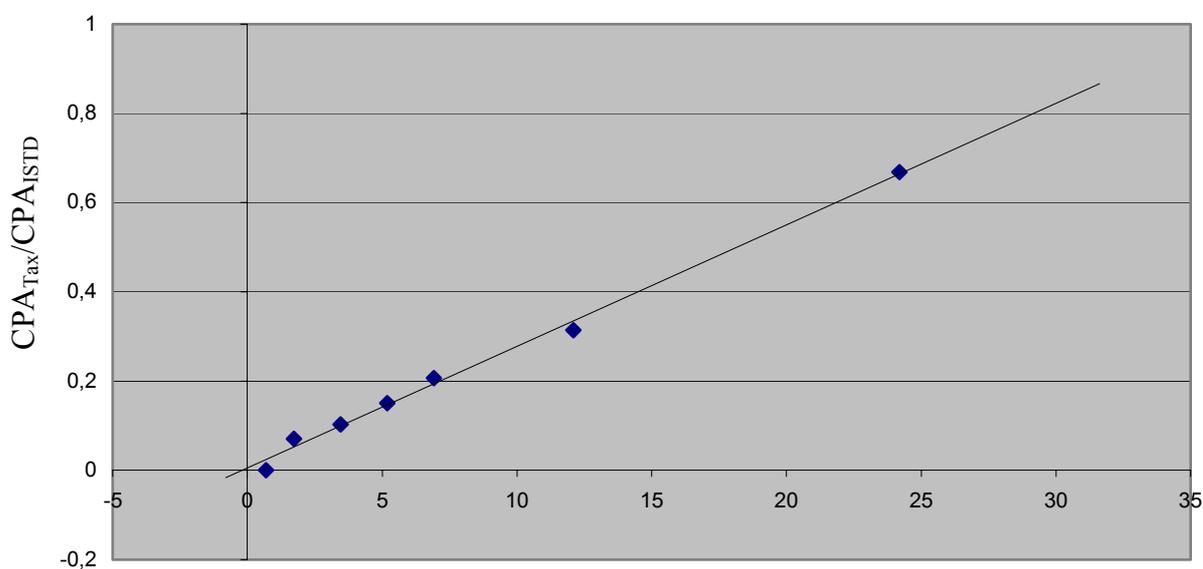
Mit Hilfe von acht Referenzlösungen wurde die unter 1.3 entwickelte Methode im Bereich von 10 µg/ml bis 2,5 mg/ml für Taxiphyllin und Triglochinin kalibriert (Konzentration der

Untersuchungslösungen), mit einer Konzentration des ISTDs von 0,081 mg/ml. Für die Kalibration des Triglochinins wurden die Peakflächen aller vier Signale (Triglochinin, Isotriglochinin und Triglochinin-Isomere) addiert, um bei der späteren Quantifizierung, bzw. bei einer Berechnung des Gehaltes an Triglochinin in einem Extrakt über die Steigung der Kalibrationsgeraden keine Minderfunde zu erhalten. Für das Epimerenpaar Dhurrin und Taxiphyllin wurde die Kalibration mit nur einem Epimer (Taxiphyllin) durchgeführt; dies ist zulässig, da die beiden Epimere ein identisches UV-Absorptionsspektrum aufweisen, d.h. das Absorptionsmaximum  $\lambda_{\max}$  und der Absorptionskoeffizient  $\varepsilon$  sind gleich.

Den Kalibrierlösungen wurde als ISTD jeweils eine konstante Menge an Salicylsäure zugesetzt.

Jede Kalibrierlösung wurde viermal analysiert und es wurden die Quotienten der jeweiligen korrigierten Peakflächen (CPA) der Analyten und des ISTD gebildet. Die Kalibrierfunktionen wurden erhalten, indem die arithmetischen Mittelwerte dieser Flächenverhältnisse aus den jeweils vier Einzelmessungen gegen die Analytenkonzentrationen aufgetragen wurden (*Abb.II.12a und b*).

### *Taxiphyllin*



*Abb.II.12a: Kalibrationsgerade Taxiphyllin*

$$\text{Geradengleichung: } y = 0,0272x + 0,0051; r^2 = 0,9947$$

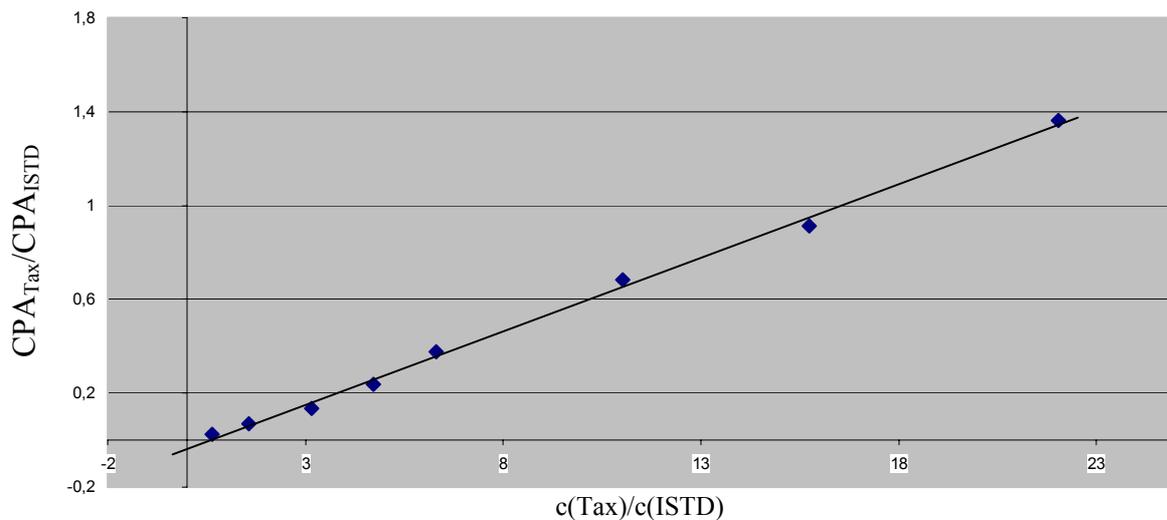
*Triglochinin*

Abb.II.12b: Kalibrationsgerade Triglochinin

$$\text{Geradengleichung: } y = 0,0627x - 0,0358; r^2 = 0,9970$$

Die Kalibrationsgerade für Triglochinin verläuft deutlich steiler als die für Taxiphyllin, was zeigt, dass Triglochinin unter den gewählten Bedingungen einen deutlich höheren Absorptionskoeffizient hat als Taxiphyllin und Dhurrin.

### 2.3 Bestimmungs- und Nachweisgrenze

Die Bestimmungsgrenze (Limit of Quantification, LOQ) der Methode wurde für Triglochinin mit 25 µg/ml und für Taxiphyllin mit 50 µg/ml festgelegt, basierend auf einem Signal-Rausch-Verhältnis von 9:1. Bei diesen Konzentrationen können noch akzeptable Präzisions- und Richtigkeitswerte bestimmt werden.

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD) liegt für Triglochinin bei 10 µg/ml und für Taxiphyllin bei 25 µg/ml, basierend auf einem Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1 [KROMIDAS, 1999].

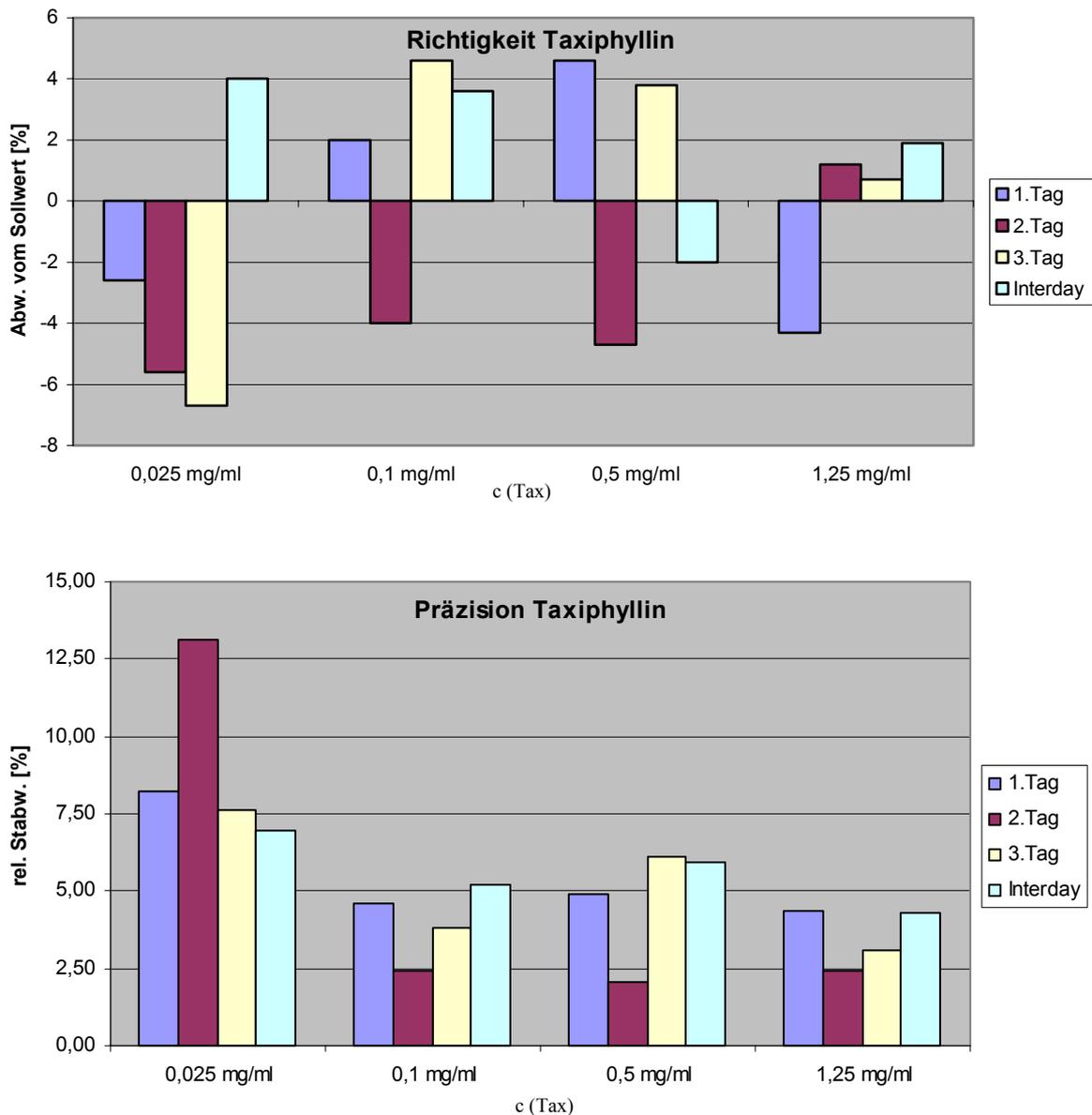
### 2.4 Richtigkeit und Präzision der Kalibrierung

Richtigkeit und Präzision (zur Definition dieser Begriffe s. Allg. Teil 3.2.3.4) der entwickelten Methode wurden sowohl „intraday“ als auch „interday“ bestimmt. Hierzu wurden unter Verwendung stets frisch hergestellter Stammlösungen der Analyten Triglochinin und Taxiphyllin vier Lösungen bekannten Gehalts auf verschiedenen Konzentrationsniveaus, die den gesamten Arbeitsbereich abdecken (0,025 mg/ml, 0,1

mg/ml, 0,5 mg/ml, 1,25 mg/ml) hergestellt, mit der entsprechenden Menge an internem Standard versetzt und jeweils viermal injiziert.

Da die Methode keinen Aufarbeitungsschritt enthält, konnte auf das separate Herstellen von Referenzlösungen für jedes einzelne Konzentrationsniveau verzichtet werden. Hierdurch wären lediglich Richtigkeit und Präzision der Pipettierschritte bei der Herstellung der Referenzlösungen überprüft worden, die nicht eigentlicher Bestandteil der Methode sind und somit auch nicht Gegenstand der Validierung. Es wurde als ausreichend angesehen, aus jeder Probe viermal zu injizieren.

Zur Bestimmung der interday-Richtigkeit und -Präzision wurde das Verfahren insgesamt dreimal an drei verschiedenen Tagen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den nachstehenden Balkendiagrammen (*Abb.II.13a und -b*) zusammenfassend dargestellt.



*Abb.II.13a: Validierungsdaten zu Richtigkeit und Präzision für Taxiphyllin*

Die Richtigkeit liegt für Taxiphyllin zwischen 94,6 % und 104,6 %. Die Präzision, ausgedrückt durch den Variationskoeffizienten (= relative Standardabweichung) der Einzelmessungen, lag bei den oberen Konzentrationsstufen stets unter 6,11 %. An der LOQ wurden 13,12 % nicht überschritten.

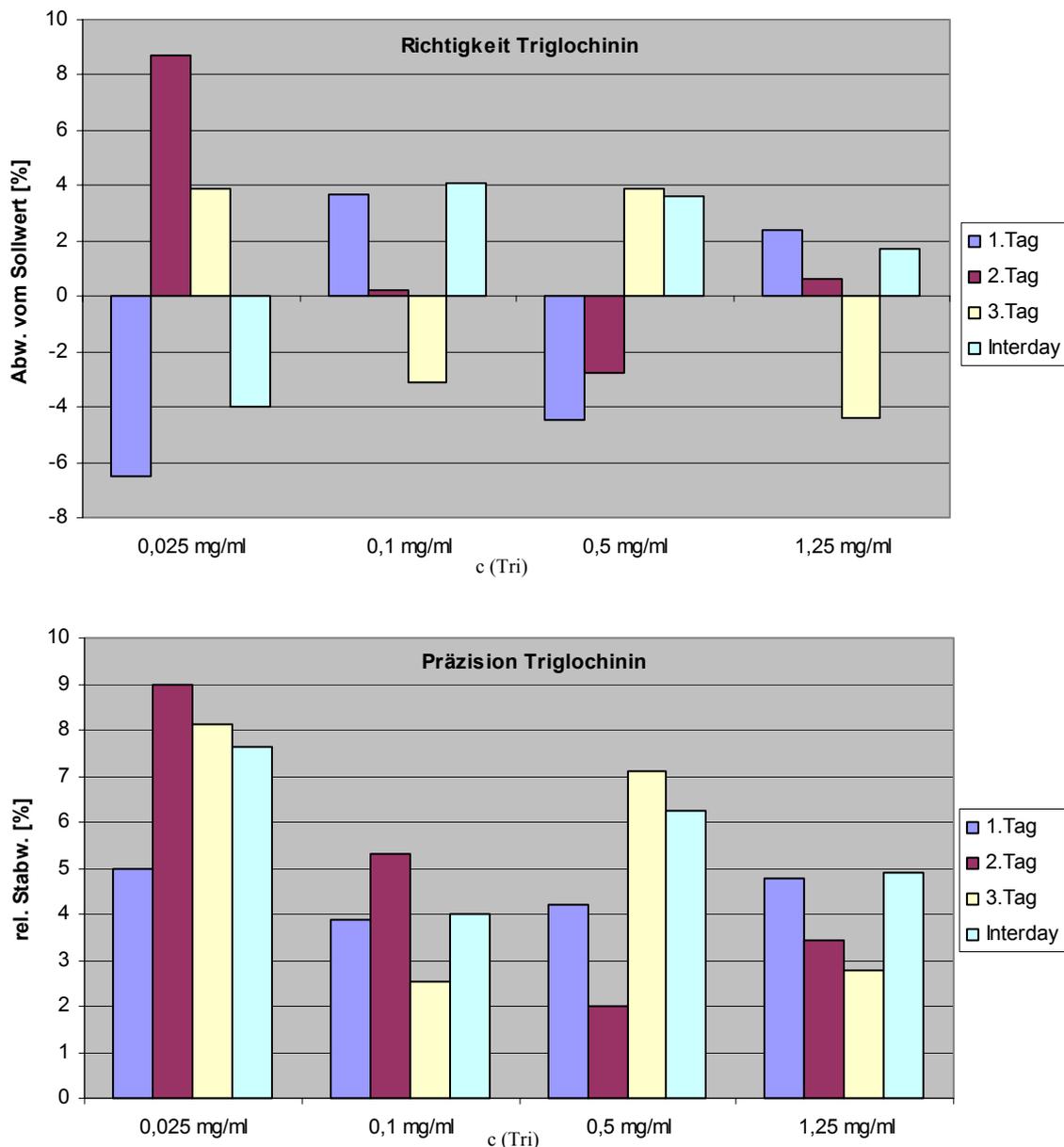


Abb.II.13b: Validierungsdaten zu Richtigkeit und Präzision für Triglochinin

Die Richtigkeit liegt für Triglochinin in den oberen Konzentrationsstufen zwischen 95,5 % und 103,9 % und an der LOQ zwischen 93,5 % und 108,7 %. Die Präzision, ausgedrückt durch den Variationskoeffizienten (= relative Standardabweichung) der Einzelmessungen, lag bei den oberen Konzentrationsstufen stets unter 7,11 %. An der LOQ wurden 8,96 % nicht überschritten. Somit entspricht die entwickelte Methode voll den im Allgemeinen Teil unter 3.2.3.4 formulierten Anforderungen an Richtigkeit und Präzision.

### 3 Bestimmung von Taxiphyllin, Dhurrin und Triglochinin in Pflanzenextrakten

Mit Hilfe der vorstehend entwickelten Methode wurden Pflanzenextrakte verschiedener cyanogener Pflanzen analysiert und somit weitere Validierungsdaten erhoben. Alle Extrakte wurden per Standardzusatz-Verfahren (SZV) analysiert, d.h. es wurden mehrere Lösungen des Pflanzenextraktes vorbereitet, denen nach Zugabe einer konstanten Menge an internem Standard steigende Mengen des zu analysierenden cyanogenen Glykosids zugegeben wurde. Diese Vorgehensweise hat zum einen die Spezifität der Methode bestätigt, zum anderen konnte so gezeigt werden, dass die entwickelte und validierte Methode unanfällig ist für Matrixeffekte, zum Beispiel durch weitere Inhaltsstoffe und Bestandteile des Pflanzenmaterials. Somit liefert das Standardzusatzverfahren einen weiteren Beitrag zur Überprüfung der Richtigkeit dieser Methode.

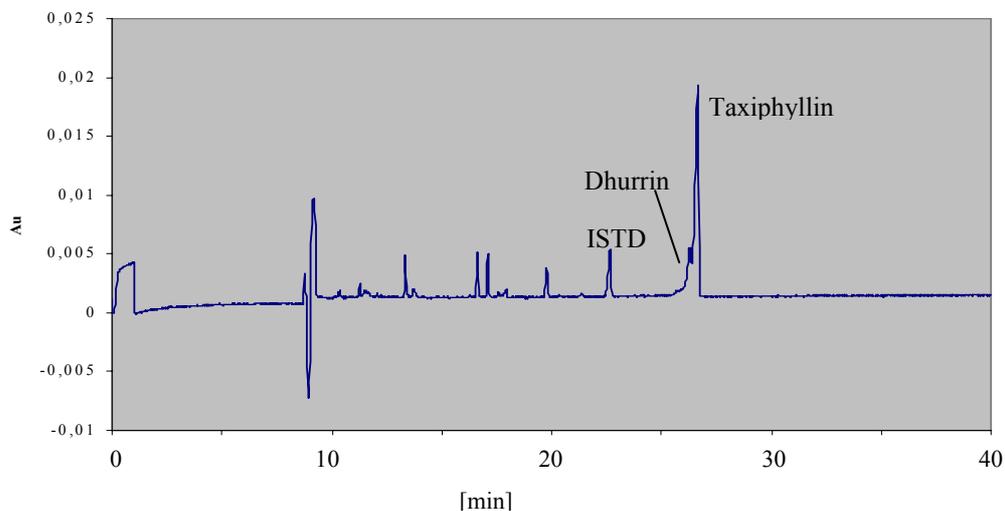
Untersucht wurden zwei Bambussprosse aus Vietnam und eine Bambussprosse aus Thailand. Wie auch der Literatur zu entnehmen ist, konnte an diesen drei Beispielen gezeigt werden, wie stark sich die Gehalte an Taxiphyllin in Bambus voneinander unterscheiden [SCHWARZMEIER, 1976; REHM und ESPIG, 1991]. Die beiden Bambussprossen aus Vietnam stammen von einem städtischen Wochenmarkt in Ho-Chi-Minh-City, die Bambussprosse aus Thailand stammt aus einem Supermarkt in Bangkok.

Zur Bestimmung von Triglochinin in Pflanzenmaterial wurde ein Extrakt aus *Eschscholtzia californica* aus dem institutseigenen Arzneipflanzengarten untersucht.

#### 3.1 Bestimmung von Taxiphyllin in *Bambusa spec.*

Die Bambussprossen wurden zunächst ihrer in Südostasien üblichen Zubereitungsart entsprechend entblättert und das Mark freigelegt. Hiervon wurden nach Gefriertrocknung methanolische Extrakte hergestellt (s. Exp. Teil unter 2.4.1.2). In Voruntersuchungen wurde zunächst der ungefähre Gehalt an Taxiphyllin abgeschätzt und danach die Probe mittels Standardzusatzverfahren (SZV) analysiert. Da der Gehalt an Taxiphyllin auch innerhalb der Sprossen deutlich variiert, wurden von den stark cyanogenen Bambussprossen aus Vietnam die Spitzen der Sprosse und ihr Stumpf getrennt analysiert. Der ermittelte Gehalt in den Spitzen der Sprossen ist fast doppelt so hoch wie im unteren Bereich.

Nachstehend ist in *Abb.II.14* ein typisches Elektropherogramm eines Bambus-Extraktes gezeigt. Deutlich zu erkennen ist hier, dass die Epimerisierung des Taxiphyllins bereits eingesetzt hat.



*Abb.II.14: Taxiphyllin in Bambusa spec.*

Vergleich der verschiedenen untersuchten Bambussprossen:

<i>Untersuchungsobjekt</i>	<i>Gehalt an Taxiphyllin [g/100g TM]</i>		<i>Geradegleichung des SZV (Standardzusatzverfahren)</i>
	<i>nach SZV</i>	<i>nach Kal.</i>	
Bambus (Thailand)	3,24	3,48 (+ 7,4 %)	$y = 0,0638x + 0,376$ $r^2 = 0,9995$
Bambus1 (Vietnam), Stumpf	10,34	10,56 (+ 2,1 %)	$y = 0,1231x + 1,7058$ $r^2 = 0,9975$
Bambus1 (Vietnam), Spitze	17,9	17,1 (- 4,5 %)	$y = 0,0457x + 0,3316$ $r^2 = 0,9992$
Bambus2 (Vietnam), Stumpf	2,94	2,97 (+ 0,8 %)	$y = 0,0686x + 0,4613$ $r^2 = 0,9934$
Bambus2 (Vietnam), Spitze	5,12	5,39 (+ 5,3 %)	$y = 0,1517x + 0,2351$ $r^2 = 0,9865$

*Tab.II.2: Gehalt an Taxiphyllin im untersuchten Pflanzenmaterial*

Angegeben ist jeweils der Gehalt an Taxiphyllin bezogen auf die Trockenmasse (TM), d.h. das gefriergetrocknete Material. Die genauen Daten zur Berechnung, ebenso wie die Darstellung der einzelnen Geraden zu den verschiedenen analysierten Extrakten, sind dem Experimentellen Teil unter **3.6** zu entnehmen.

### 3.2 Bestimmung von Triglochinin in *Eschscholtzia californica*

Zur Bestimmung des Triglochinin-Gehaltes von *Eschscholtzia californica* wurde der gesamte oberirdische Pflanzenteil gefriergetrocknet und daraus ein methanolischer Extrakt hergestellt (s. Exp. Teil unter 2.4.1.2). Das im Folgenden dargestellte Elektropherogramm (Abb.II.15) zeigt die Auftrennung des Triglochinins von seinen Isomeren. Trotz sofortiger Gefrierdrying nach der Ernte konnten die Isomere im Extrakt nachgewiesen werden. Da es unwahrscheinlich ist, dass das Triglochinin während der Herstellung des Extraktes mit kaltem Methanol unter Kühlung und schnellstmöglicher Analyse des Extraktes in einem solchen Maße isomerisiert, ist anzunehmen, dass die Isomerisierung bereits im Pflanzenmaterial stattgefunden hat.

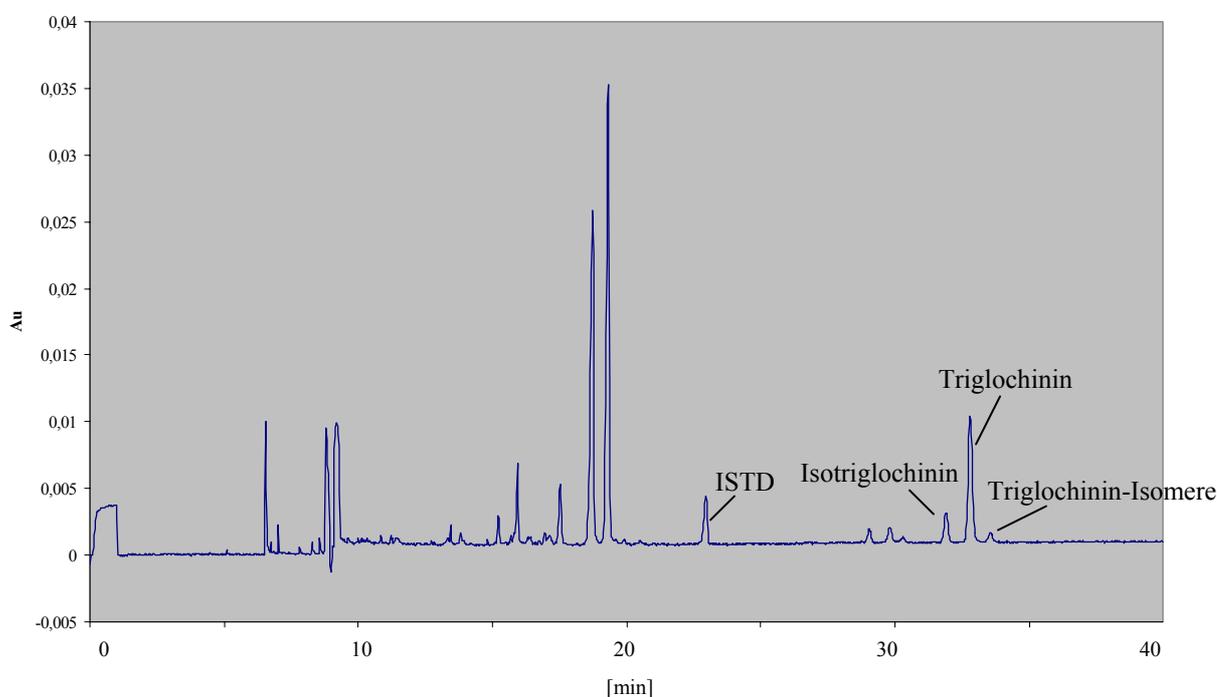


Abb.II.15: Triglochinin in *Eschscholtzia californica*

Alle weiteren, nicht zugeordneten Peaks stammen von Inhaltsstoffen des untersuchten Pflanzenextraktes. Dhurrin und Taxiphyllin konnten im analysierten Extrakt nicht identifiziert werden.

Untersuchungsobjekt	Gehalt an Triglochinin [g/100g TM]		Geradengleichung des SZV
	nach SZV	nach Kalib.	
<i>Eschscholtzia californica</i>	1,42	1,37 (- 3,5 %)	$y = 0,2435x + 0,7247$ $r^2 = 0,9995$

Tab.II.3: Gehalt an Triglochinin im untersuchten Pflanzenmaterial

Angegeben ist auch hier der Gehalt an Triglochinin bezogen auf die Trockenmasse. Alle weiteren Angaben zur Berechnung, ebenso wie die Darstellung der Geraden des Standardzusatzverfahrens sind dem Experimentellen Teil unter 3.6.6 zu entnehmen.

## 4 HCN–Bestimmung nach ALDRIGE und Vergleich mit den Ergebnissen der CE-Bestimmung

Zur Verifizierung der kapillarelektrophoretisch ermittelten Gehalte an cyanogenen Glykosiden in den oben beschriebenen Untersuchungsobjekten wurde der Cyanid-Gehalt dieser Extrakte auch nach der sehr empfindlichen Methode nach ALDRIGE, modifiziert nach NAHRSTEDT [NAHRSTEDT, 1977; ALDRIGE, 1944], bestimmt.

Es ist zu beachten, dass mit dieser Bestimmungsmethode der Gesamt-Cyanid-Gehalt der Probe bestimmt wird. Es kann also im Fall von Epimerisierungen oder Isomerisierungen der cyanogenen Glykoside zu einem deutlich höheren Wert bei dieser Bestimmung kommen, da die Methode - im Gegensatz zu der entwickelten CE-Methode - nicht selektiv für einzelne Substanzen ist.

<i>Pflanze</i>	<i>Cyanid-Gehalt über HCN, ber. als Tax</i>	<i>Gehalt an Taxiphyllin bzw. Triglochinin</i>	<i>Differenz der HCN-Best. vs. CE</i>
Bambus (Thailand)	3,30 g/100g TM	3,24 g/100g TM	+ 2,0 %
Bambus1 (Vietnam), Stumpf	10,54 g/100g TM	10,34 g/100g TM	+ 1,9 %
Bambus1 (Vietnam), Spitze	18,63 g/100g TM	17,9 g/100g TM	+4,1 %
Bambus2 (Vietnam), Stumpf	3,23 g/100g TM	2,94 g/100g TM	+ 9,8 %
Bambus2 (Vietnam), Spitze	5,84 g/100g TM	5,12 g/100g TM	+ 14,1 %
<i>Eschscholtzia californica</i>	1,69 g/100g TM	1,42 g/100g TM	+ 19,3 %

Tab.II.4: Vergleich der ermittelten Cyanidgehalte der untersuchten Pflanzen

Besonders deutlich sind die Unterschiede bei den beiden zuletzt angegebenen Werten. Dies geht indirekt bereits aus den oben gezeigten Abbildungen hervor (s. Abb.II.14 und Abb.II.15): Bei dem Elektropherogramm von Bambus ist sehr klar die bereits eingesetzte Epimerisierung des Taxiphyllins zu Dhurrin zu sehen, ebenso ist im Elektropherogramm von *Eschscholtzia californica* deutlich die bereits stattgefundenene Isomerisierung des Triglochinins zu erkennen. Integriert man per Hand die von den Isomeren bzw. dem Epimer stammenden Peakflächen nach und addiert diesen zusätzlichen Gehalt an cyanogenen Glykosiden, berechnet als Taxiphyllin bzw. Triglochinin, zu den oben

angegebenen Ergebnissen, relativieren sich die Unterschiede (s. *Tab.II.5*). Was die Genauigkeit der kapillarelektrophoretische Bestimmung unterstreicht.

<i>Pflanze</i>	<i>Tri.-Gehalt nach CE</i>	<i>CN<sup>-</sup>-Gehalt über</i>	<i>Tri + Isomere nach CE/</i>	<i>Differenz</i>
	<i>Tax.-Gehalt nach CE</i>	<i>HCN</i>	<i>Tax. + Epimer nach CE</i>	<i>CN<sup>-</sup> vs. CE</i>
<i>E. californica</i>	1,42 g/100g TM	1,69 g/100g TM	1,67 g/100g TM	1,2 %
<i>Bambus 2</i> <i>(Vn), Stumpf</i>	2,94 g/100g TM	3,23 g/100g TM	3,15 g/100g TM	2,6 %
<i>Bambus 2</i> <i>(Vn), Spitze</i>	5,12 g/100g TM	5,84 g/100g TM	5,68 g/100g TM	2,8 %

*Tab.II.5: Vergleich des Gehaltes an cyanogenen Glykosiden unter Berücksichtigung der Isomeren von Triglochinin bzw. des Epimers von Taxiphyllin*

Die Unterschiede der nach den verschiedenen Methoden (CE-Quantifizierung und photometrische Bestimmung nach ALDRIGE) bestimmten Gehalte an cyanogenen Glykosiden liegen im akzeptablen Bereich für den Vergleich zweier prinzipiell unterschiedlicher Bestimmungsweisen.

## 5 *m* – Hydroxylierte Cyanglykoside: Holocalin und Zierin

### 5.1 Holocalin und Zierin

Die beiden epimeren cyanogenen Glykoside Holocalin und Zierin leiten sich biogenetisch von der Aminosäure Phenylalanin ab. Zierin wurde erstmals 1936 aus der Rutaceae *Zieria laevigata* isoliert [FINNEMORE und COOPER, 1936], Holocalin wurde erstmals 1971 isoliert und beschrieben [GMELIN et al., 1973], die Konfiguration von Holocalin und Zierin wurde 1973 von NAHRSTEDT aufgeklärt [NAHRSTEDT, 1973]. Das Postulat, dass die Biogenese dieser beiden cyanogenen Glykoside über Phenylalanin als biogenetischen Precursor verläuft, wurde mit dem gleichzeitigen Vorhandensein von Sambunigrin und Prunasin in den für die Biogenese untersuchten Pflanzen begründet [HEGNAUER, 1986; NAHRSTEDT, 1976] und u.a. durch Untersuchungen mit radioaktiv markiertem Phenylalanin bestätigt [SCHWIND, 1991; SCHENK, 1998].

Holocalin und Zierin (s. *Abb.II.16*) als Phenylalanin-abgeleitete Cyanglykoside kommen bspw. in Holunderbeeren (*Sambucus nigra*) vor. Die Blüten dieses Strauches werden auch arzneilich genutzt (*sambuci flos*) [FRANKE, 1999]. Aufgrund des vergesellschafteten Vorkommens von Holocalin und Zierin mit Prunasin und Sambunigrin wird in diesem Kapitel nur eine Möglichkeit zur Trennung des Epimerenpaares Holocalin/ Zierin aufgezeigt, die validierte Methode zur Identifizierung und Quantifizierung einschließlich der Methodenentwicklung ist im nachfolgenden Kapitel beschrieben.

Auch für Holocalin und Zierin werden im Folgenden (s. *Tab.II.5*) die möglichen, in der Literatur hauptsächlich verwendeten, halbsystematischen und systematischen Namen den Trivialnamen zugeordnet:

<i>Trivialname</i>	<i>halbsystematische Bezeichnung</i>	<i>Systematische Bezeichnung</i> <i>(Nitril-Nomenklatur)</i>
Zierin	2 <i>S</i> - <i>m</i> -Hydroxymandelonitrilglucosid	2-β-D-Glucopyranosyloxy-2(3-hydroxyphenyl)-2 <i>S</i> -acetonitril
Holocalin	2 <i>R</i> - <i>m</i> -Hydroxymandelonitrilglucosid	2-β-D-Glucopyranosyloxy-2(3-hydroxyphenyl)-2 <i>R</i> -acetonitril

*Tab.II.5: Bezeichnungen der m-hydroxylierten Cyanglykoside*

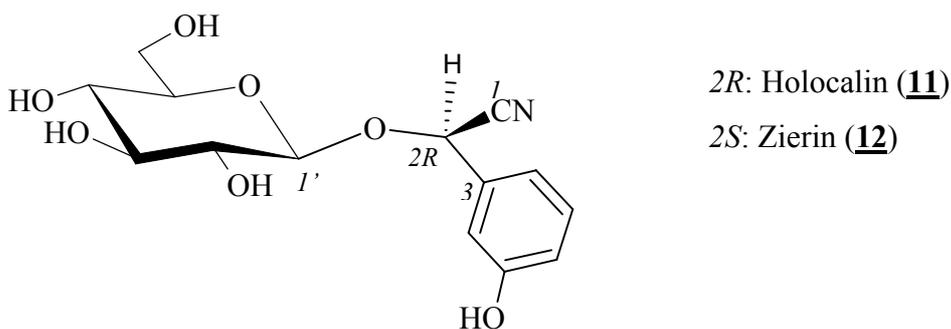


Abb.II.16: Phenylalanin-abgeleitete cyanogene Glykoside

## 5.2 Chemische und Physikalische Eigenschaften

Holocalin und Zierin sind ebenso wie Dhurrin und Taxiphyllin phenolische Glykoside. Sie bilden daher ebenfalls in alkalischem Milieu aufgrund der möglichen Mesomeriestabilisierung stabile Phenolat-Anionen aus, epimerisieren aber auch leicht in alkalischem Milieu. Aufgrund der *meta*-Position der OH-Gruppe kann sich hier kein chinoides System ausbilden, wie es bei Dhurrin oder Taxiphyllin der Fall ist, so dass bei diesem Epimerenpaar auch bei höheren Temperaturen kein Abbau im alkalischen Milieu stattfindet. Eine Detektion dieser beiden Substanzen ist aufgrund ihres Phenolkörpers problemlos, lediglich kann es pH-Wert abhängig zu bathochromen Verschiebungen des UV-Maximums kommen. Im sauren oder neutralen pH-Bereich liegen Holocalin und Zierin ungeladen vor.

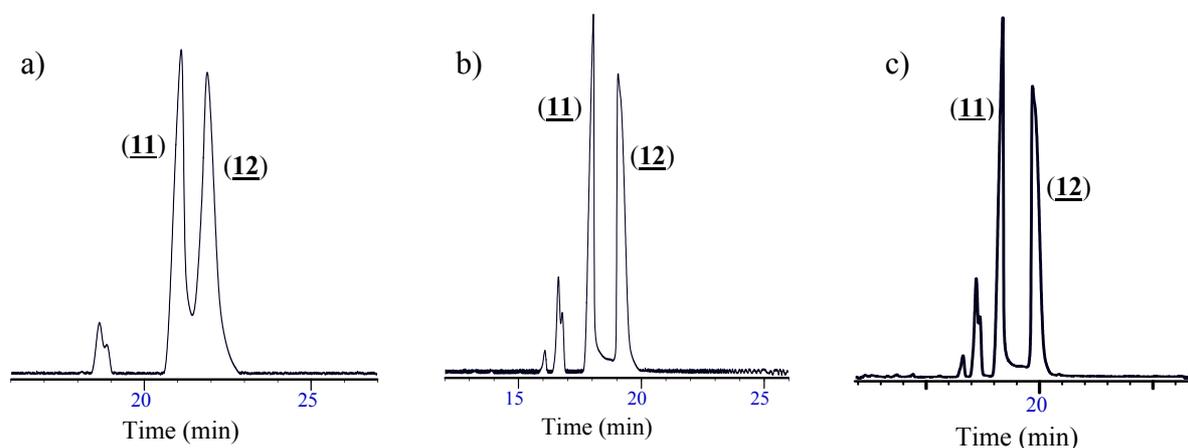
## 5.3 Methodenentwicklung

Bereits bei der Methodenentwicklung für die Trennung der Tyrosin-abgeleiteten Cyanglykoside Dhurrin und Taxiphyllin konnte mit dem underivatisierten  $\alpha$ -Cyclodextrin eine Antrennung erzielt werden. Da die Vorversuche zur Trennung der *p*-hydroxylierten Verbindungen Dhurrin und Taxiphyllin im neutralen oder schwach sauren Milieu ergebnislos geblieben waren, wurde für die zu entwickelnde Methode von vornherein Natriumtetraboratpuffer als Trennelektrolyt gewählt. Da sich das Epimerenpaar Holocalin und Zierin ohne Pufferadditive nicht auftrennte, wurde aufgrund der Erkenntnisse aus der vorangegangenen Methodenentwicklung eine Konzentrationsreihe mit 100 mM, 150 mM und 200 mM Natriumtetraborat mit  $\alpha$ -Cyclodextrin ausgetestet, was zum Erfolg führte. Mit einer Konzentration von 0.75 %  $\alpha$ -Cyclodextrin wurde bereits eine Basislinientrennung

erzielt: Zuerst migriert Holocalin, also das *R*-Epimer und darauffolgend das *S*-Epimer Zierin (s. *Abb.II.17*), was ebenso wie bei der Trennung von Dhurrin und Taxiphyllin durch Additionsexperimente verifiziert wurde.

Es kann hier, anders als bei der HPLC oder GC [NAHRSTEDT, 1981], nicht prognostiziert werden, auch nicht für die überschaubare Gruppe der aromatischen, hydroxylierten Cyanglykoside, welches Epimer zuerst migriert. Dies muss bei jeder neuen kapillarelektrophoretischen Methodenentwicklung durch Additionsversuche verifiziert werden.

Da Holocalin lt. Literatur [NAHRSTEDT, 1973] im Alkalischen stabiler ist als Dhurrin, wurde aufgrund der Ergebnisse des Experimentes mit Dhurrin, beschrieben unter **1.5**, auf die Wiederholung dieses Experimentes mit Holocalin oder Zierin verzichtet.



*Abb.II.17: Auftrennung der Epimere Holocalin (11) und Zierin (12) in Abhängigkeit der Konzentration an zugesetztem  $\alpha$ -Cyclodextrin: a) 0,53 %, b) 0,754 %, c) 1,01 %  $\alpha$ -Cyclodextrin (v.l.n.r.)*

*Trennbedingungen:* 100 mM  $\text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_4$ -Puffer,  $\alpha$ -Cyclodextrin (Konz. s.o.), 30 kV,  $l = 60/70$  cm, I.D.: 50  $\mu\text{m}$ , *Detektion:* Max-Plot-Modus, *Injektion:* 3s isomerisiertes Holocalin, 1s reines Holocalin

Die Methodenentwicklung zur Trennung der *m*-hydroxylierten Cyanglykoside wurde an dieser Stelle abgebrochen, da eine weiterführende Methodenentwicklung zusammen mit den nicht-hydroxylierten aromatischen Cyanglykosiden aufgrund des vergesellschafteten Vorkommens sinnvoller erschien. Aus diesem Grund wurde diese Methode nicht validiert, es steht mit der im anschließenden Kapitel beschriebenen Methode eine andere Quantifizierungsmöglichkeit für das Epimerenpaar Holocalin und Zierin zu Verfügung.

## B Aromatische Cyanglykoside

### 6 Sambunigrin, Prunasin, Amygdalin, Neoamygdalin

#### 6.1 Prunasin, Sambunigrin, Amygdalin, Neoamygdalin

Die beiden cyanogenen Epimerenpaare Prunasin und Sambunigrin und Amygdalin und Neoamygdalin leiten sich biogenetisch von der Aminosäure Phenylalanin ab. Amygdalin, isoliert aus Bittermandeln, ist das erste jemals beschriebene cyanogene Glykosid [ROBIQUET und BOUTRON-CHARLARD, 1830], die Konstitution des Aglykons konnte bereits sieben Jahre später aufgeklärt werden [LIEBIG und WÖHLER, 1837]. 37 Jahre später, gegen Ende des 19. Jahrhunderts, wurde dann Prunasin entdeckt und beschrieben [LEHMANN, 1874], kurz nach der Jahrhundertwende wurde die Isomerisierung des Prunasins und somit die Bildung von Sambunigrin beschrieben [BOURQUELOT und HÉRISSEY, 1907].

Vom Phenylalanin abgeleitete cyanogene Glykoside sind im Pflanzenreich weit verbreitet. Hauptsächlich zu finden sind sie bei Vertretern der Rosidae und Asteridae [NAHRSTEDT und LECHTENBERG, 1999].

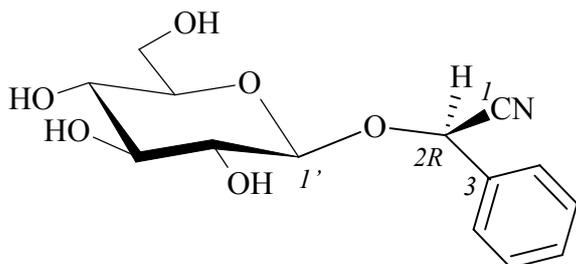
Prunasin, Sambunigrin und Amygdalin kommen in vielen Nahrungs- und teilweise auch in Arzneipflanzen vor, u.a. in den Samen vieler Prunus-Arten (Aprikosen, Pfirsiche, Mandeln), aber auch in denen von Holunderbeeren oder Äpfeln [FRANKE, 1999]. Neoamygdalin kommt nach heutigem Wissensstand nicht genuin vor [NAHRSTEDT und LECHTENBERG, 1999].

Auch für Prunasin, Sambunigrin, Amygdalin und Neoamygdalin werden im Folgenden (s. *Tab.II.6*) die möglichen, in der Literatur hauptsächlich verwendeten, halbsystematischen und systematischen Namen den Trivialnamen zugeordnet:

<i>Trivialname</i>	<i>halbsystematische Bezeichnung</i>	<i>Systematische Bezeichnung (Nitril-Nomenklatur)</i>
Prunasin	2 <i>R</i> -Mandelonitrilglucosid	2-β-D-Glucopyranosyloxy-2 <i>R</i> -phenylacetonitril
Sambunigrin	2 <i>S</i> -Mandelonitrilglucosid	2-β-D-Glucopyranosyloxy-2 <i>S</i> -phenylacetonitril
Amygdalin	2 <i>R</i> -Mandelonitrildiglucosid	2-β-D-[1→6- β-D Glucopyranosylglucopyranosyloxy]-2 <i>R</i> -phenylacetonitril

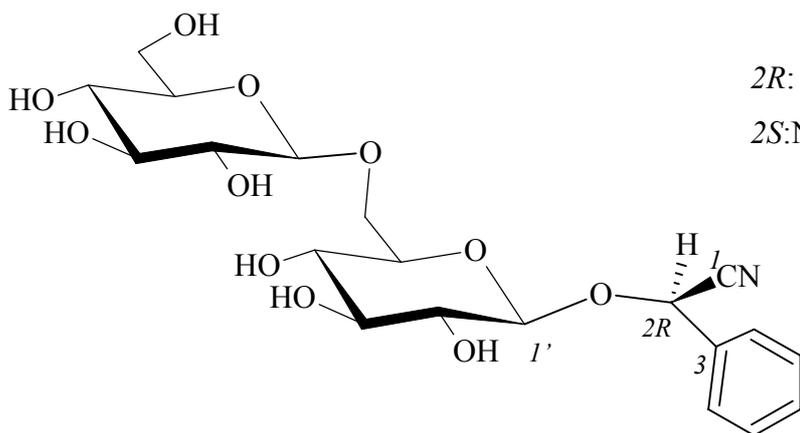
Neoamygdalin	2 <i>S</i> -Mandelonitrildiglucoosid	2-β-D-[1→6- β-D Glucopyranosyl- glucopyranosyloxy]-2 <i>S</i> - phenylacetonitril
--------------	--------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------

Tab.II.6: Bezeichnungen der aromatischen Cyanglykoside



2*R*: Prunasin (**7**)

2*S*: Sambunigrin (**8**)



2*R*: Amygdalin (**9**)

2*S*: Neoamygdalin (**10**)

Abb.II.18: Phenylalanin – abgeleitete cyanogene Glykoside

## 6.2 Chemische und Physikalische Eigenschaften

Prunasin, Sambunigrin, Amygdalin und Neoamygdalin sind aromatische Cyanglykoside (s. Abb.II.18), deren Phenylrest nicht weiter substituiert ist. Die aliphatischen Hydroxylgruppen weisen eine bedeutend geringere Acidität auf als phenolische OH-Gruppen, da das entstehende Anion (wie z.B. bei Dhurrin/Taxiphyllin oder Holocalin/Zierin) nicht mesomeriestabilisiert ist, so dass diese Moleküle nicht nur im schwach sauren und neutralen pH-Bereich, sondern auch im alkalischen Milieu (pH-Wert bis ~ 10) undissoziiert vorliegen. Höhere pH-Werte sind hier nicht relevant, da dann die

Gefahr der Spaltung der glykosidischen Bindung oder eine anderweitige Zersetzung des Moleküls besteht.

Da alle vier Verbindungen ein aromatisches Ringsystem aufweisen, bietet sich die UV-Detektion an.

### **6.3 Methodenentwicklung zur Trennung von Prunasin, Sambunigrin, Amygdalin, Neoamygdalin, Holocalin und Zierin**

#### **6.3.1 Allgemeines**

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel unter **5.3** erwähnt, wurde aufgrund des vergesellschafteten Vorkommens die Analytik des Epimerenpaares Holocalin und Zierin in die hier diskutierte Methodenentwicklung eingebunden.

Prunasin und Sambunigrin kommen in der Natur häufig entweder mit Holocalin und Zierin oder mit Amygdalin und Neoamygdalin als ihren entsprechenden Diglykosiden vergesellschaftet vor. Deshalb wurde die Methodenentwicklung im Rahmen dieser Arbeit gesplittet: Zum einen wurde eine Methode entwickelt zur Trennung von Prunasin und Sambunigrin neben Holocalin und Zierin, des Weiteren wurde die bereits publizierte Trennung von Prunasin und Sambunigrin zusammen mit dem Epimerenpaar Amygdalin und Neoamygdalin optimiert [CAMP A et al., 2000]. In der Arbeit von CAMP A wurden die Epimerenpaare Prunasin/Sambunigrin und Amygdalin/Neoamygdalin sowohl in basischem Carbonat-Puffer (25 mM, pH 9,1) als auch in leicht saurem Acetatpuffer (25 mM, pH 5,2), jeweils mit Zusatz von 100 mM SDS getrennt

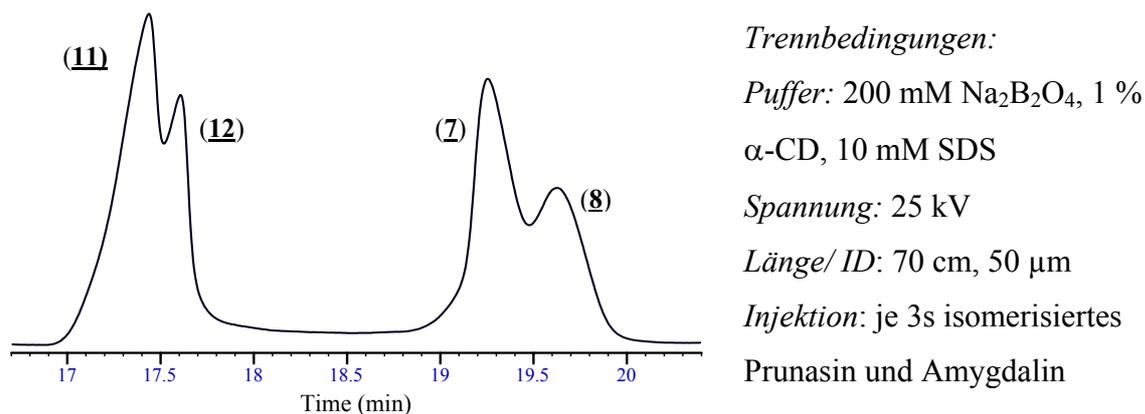
Da lt. Literatur Holocalin und Zierin durch Hydroxylierung von Prunasin und Sambunigrin gebildet werden [SCHWIND, 1981; SCHENK, 1998], aber kein Hinweis darauf zu finden ist, dass neben Prunasin und Sambunigrin auch Amygdalin und Neoamygdalin vergesellschaftet mit Holocalin und Zierin vorkommen, wurde darauf verzichtet, alle drei Epimerenpaare in einer Bestimmung zu erfassen.

Entwickelt werden sollte also die Auftrennung eines Gemisches aus zwei aromatischen Monoglykosiden (Prunasin/Sambunigrin) mit zwei aromatischen Diglykosiden (Amygdalin/Neoamygdalin) bzw. mit zwei phenolischen, *m*-hydroxylierten Monoglykosiden (Holocalin/Zierin).

Standardmäßig wurde die Methodenentwicklung auch hier mit isolierten Reinsubstanzen durchgeführt bzw. es wurden durch Epimerisierung (s. Exp. Teil unter **2.3.1**) gewonnene Gemische der Reinsubstanzen und den zugehörigen Epimeren eingesetzt.

### 6.3.2 Vorversuche zur Antrennung

Vor Beginn der systematischen Methodenentwicklung, die unter 6.3.3 eingehend dargelegt wird, wurde ausgetestet, ob mit bestehenden Methoden schon eine Trennung oder zumindest Antrennung der Analyten Prunasin, Sambunigrin, Amygdalin, Neoamygdalin, Holocalin und Zierin erzielt werden kann. Neben der von CAMPA beschriebenen Methode wurde in einem Vorversuch überprüft, ob eine Trennung mittels des basischen Puffersystems zu erzielen ist, mit dem bereits Holocalin und Zierin getrennt werden konnten (200 mM Boratpuffer mit 1 %  $\alpha$ -Cyclodextrin), hier allerdings mit Zusatz von SDS, da die nicht hydroxylierten Cyanglykoside sonst nicht hätten erfasst werden können. Durch diesen Puffer, bei verschiedenen SDS-Konzentrationen, konnten zwar Prunasin und Sambunigrin angetrennt werden (s. *Abb.II.19*), jedoch verschlechterte sich im selben Maß, wie sich die Trennung dieses Epimerenpaares verbesserte, die Trennung von Holocalin und Zierin. Aufgrund dieser Ergebnisse und wegen der Gefahr der Epimerisierung wurde die Trennung im alkalischen Milieu nicht weiter optimiert.



*Abb.II.19:* Holocalin (11)/Zierin (12) und Prunasin (7)/Sambunigrin (8)

Für die Optimierung der in der Veröffentlichung von CAMPA et al. [2000] beschriebenen Trennung wurden zunächst die dort angegebenen Bedingungen übernommen. Hierbei handelte es sich um eine Trennung im schwach sauren Milieu mit einem 25 mM Acetatpuffer, pH-Wert 5,2, und eine Trennmöglichkeit im Alkalischen mit einem 25 mM Carbonatpuffer, pH-Wert 9,25, jeweils unter Zusatz von 100 mM SDS.

Die Trennung im Alkalischen unter Verwendung des Carbonatpuffers konnte nicht bestätigt werden. Zum einen waren die Migrationszeiten in keiner Weise reproduzierbar, zum anderen kam es häufig durch Entgasungen zu Stromzusammenbrüchen und im Zusammenhang mit der Gasentwicklung beim Anlegen der Spannung, also mit der Bildung

von CO<sub>2</sub>, zu messbaren Veränderungen des pH-Wertes um bis zu 0,5 Einheiten. Da diese Problematik bei der Verwendung von Carbonatpuffern schon von der Methodenentwicklung für die Trennung von Dhurrin, Taxiphyllin und Triglochinin bekannt war, wurde diese Methode als nicht geeignet zur reproduzierbaren Bestimmung der beiden Epimerenpaare Prunasin und Sambunigrin und Amygdalin und Neoamygdalin angesehen. Zudem sind in der oben genannten Literaturstelle keine weiteren Validierungsparameter angegeben außer der Bestimmungsgrenze.

Im weiteren Verlauf der Methodenoptimierung wurde die Trennung im essigsaurigen Milieu wiederholt. Auch hier war die Reproduzierbarkeit nicht zufriedenstellend, es konnte weder eine dauerhafte Basislinientrennung erzielt werden, noch wurden konstante Migrationszeiten erhalten. Jedoch erschien diese Methode als vielversprechender Ansatz hinsichtlich ihrer Optimierbarkeit.

### 6.3.3 Systematische Methodenentwicklung

Da cyanogene Glykoside im alkalischen Milieu zur Isomerisierung neigen, wurden für die systematische Methodenentwicklung Puffersysteme mit leicht sauren bis neutralen pH-Werten verwendet. Stark saure Puffer (pH 2-3) wurden nicht verwendet wegen der Gefahr der sauren Hydrolyse der glykosidischen Bindung. Auf den Einsatz von alkalischen Puffern sollte verzichtet werden, da die Gefahr der Epi- oder Isomerisierung der cyanogenen Glykoside besteht, und es nicht möglich ist, alle Analyten durch Wahl dieses pH-Wertes in eine geladene Form zu überführen (wie z.B. bei Dhurrin/Taxiphyllin, s. 1.3). Da die zu trennenden Epimerenpaare im neutralen oder sauren Milieu neutral vorliegen, heißt dies für die Entwicklung einer kapillarelektrophoretischen Methode, dass die Analyten nicht mit dem einfachen Verfahren der CZE zu trennen sind. Sie bilden erst nach einem Pufferzusatz ionischer Mizellbildner oder ionisch-substituierter Cyclodextrine geladene und damit im elektrischen Feld eigenbewegliche Assoziate.

Zunächst wurde die aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse der in der Veröffentlichung von CAMPA beschriebene Acetat-Puffer beibehalten und die SDS-Konzentration modifiziert. Mit einer SDS-Konzentration von 200 mM konnten alle drei Epimerenpaare Holocalin/Zierin, Prunasin/Sambunigrin und Amygdalin/Neoamygdalin angetrennt werden (s. *Abb.II.20*).

Anhand der UV-Spektren konnte (s. *Abb.II.21*) verifiziert werden, dass bei dieser Antrennung die hydroxylierten Monoglykoside vor den nicht-hydroxylierten Diglykosiden migrieren. Die Zuordnung der Epimere wurde in diesem Beispiel aufgrund der später mit Zusatz von SDS erzielten Trennung aller Verbindungen abgeleitet, denn eine absolute

Absicherung der Zuordnung einzelner Peaks wurde erst für die abschließend entwickelte Methode durchgeführt, weil einige der Reinsubstanzen nur in sehr begrenzter Menge vorlagen.

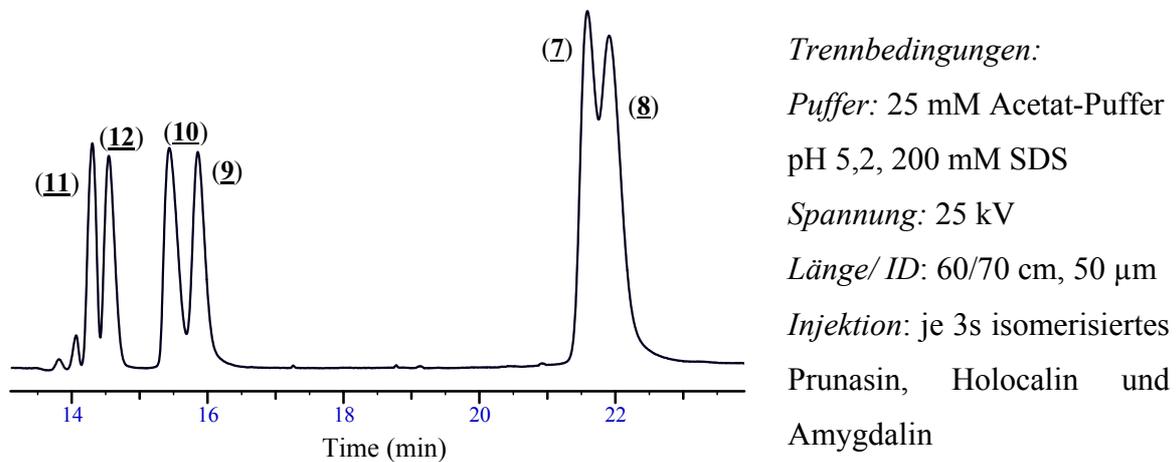


Abb.II.20: Antrennung der drei Epimerenpaare Holocalin (**11**)/Zierin(**12**), Neoamygdalin (**10**)/Amygdalin (**9**) und Prunasin (**7**)/Sambunigrin (**8**)

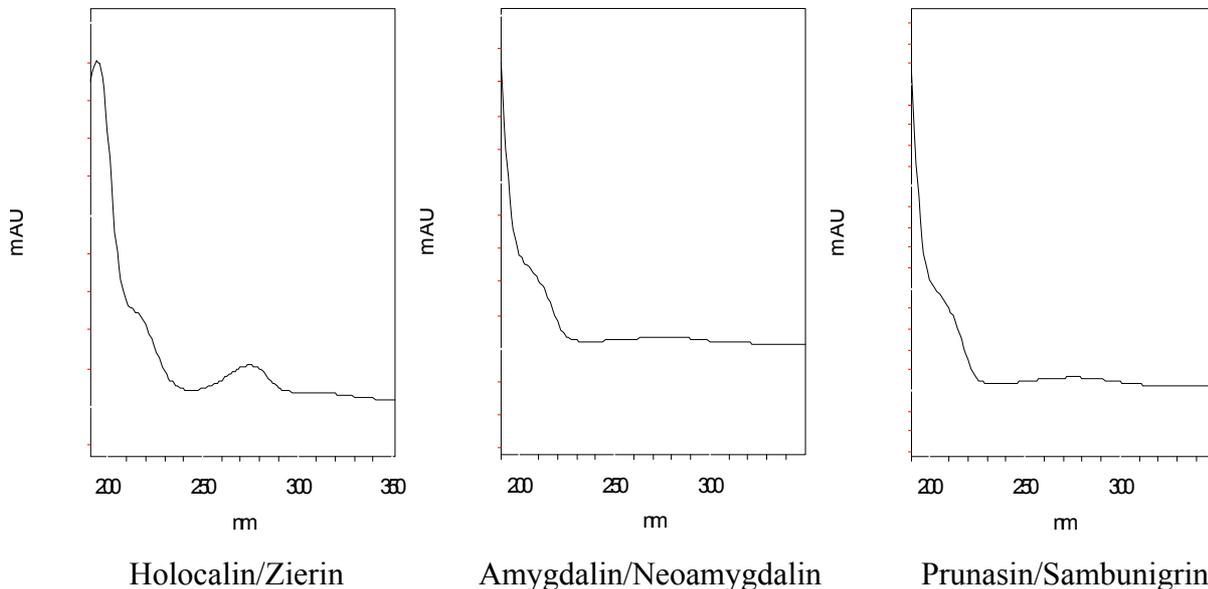
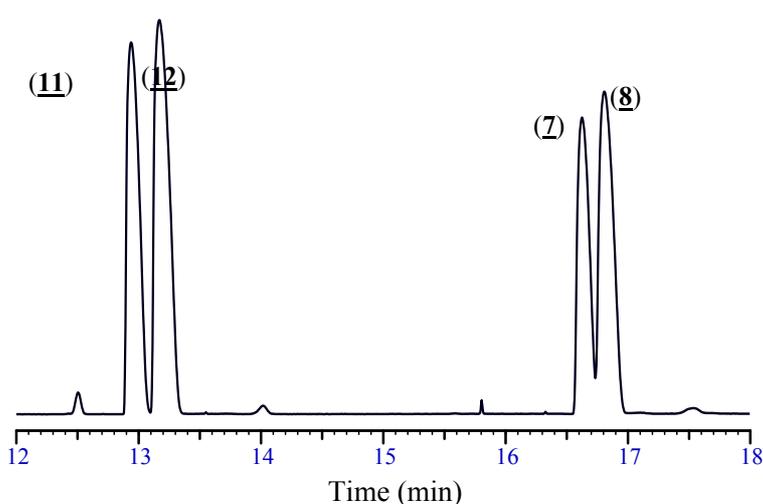


Abb.II.21: UV-Spektren von Holocalin, Amygdalin und Prunasin und ihren Epimeren

Durch eine Verringerung der SDS-Konzentration auf 175 mM, einer Erhöhung der angelegten Spannung auf 30 kV und einer Verkürzung der Kapillare auf  $l_{\text{eff}}=50$  cm konnten hervorragende Trennergebnisse erzielt werden (s. Abb.II.22). Bei dieser Methode

können jedoch jeweils nur zwei Epimerenpaare in einem Lauf getrennt werden, d.h. Prunasin und Sambunigrin können entweder zusammen mit Holocalin und Zierin oder aber zusammen mit Amygdalin oder Neoamygdalin analysiert werden.

Im Verlauf der Methodenentwicklung stellte sich relativ schnell heraus, dass diese Optimierung nur für die Trennung von jeweils zwei Epimerenpaaren zu optimieren war. Dies wurde aus den bereits erläuterten Gründen toleriert, da in der Natur zwar Prunasin und Sambunigrin sowohl mit Holocalin und Zierin als auch mit Amygdalin und Neoamygdalin vergesellschaftet vorkommen, jedoch Zierin und Holocalin nicht zusammen mit Amygdalin und Neoamygdalin. Die geringere SDS-Konzentration von 175 mM führt nämlich zu einer vollständigen Trennung von Prunasin und Sambunigrin, jedoch überlagern sich hier zwei Peaks der vier Verbindungen Holocalin, Zierin, Amygdalin und Neoamygdalin. Da es unwahrscheinlich ist, dass sie sich in ihrer Migrationsreihenfolge verändert haben, fallen vermutlich die Peaks von Zierin und Neoamygdalin zusammen (s. *Abb.II.23*).



*Trennbedingungen:*

Puffer: 25 mM Acetat-Puffer  
pH 5,2, 175 mM SDS

Spannung: 30 kV

Länge/ ID: 50/60 cm, 50 µm

Injektion: je 3s isomerisiertes  
Holocalin und Prunasin

*Abb.II.22: Holocalin (11), Zierin(12), Prunasin(7), Sambunigrin (8)*

Zur weiteren Veranschaulichung der Methodenentwicklung wird noch ein Elektropherogramm gezeigt, welches die Problematik der Peaküberlagerung darstellt. Im Vergleich von *Abb.II.22* mit *Abb.II.23* ist erkennbar, in welchem Ausmaß die Erhöhung der angelegten Spannung und die Verkürzung der Kapillare um 10 cm zur Verbesserung der Migrationszeiten geführt haben. Bei der auffällig langen Migrationszeit ist hier allerdings zusätzlich zu berücksichtigen, dass es sich bei dem in *Abb.II.23* gezeigten Lauf um eine recht neue Kapillare gehandelt hat. Hieran ist ebenfalls zu sehen, wie wichtig eine

ausreichende Konditionierung mit dem verwendeten Puffer ist, um reproduzierbare Migrationszeiten zu erhalten. Beim Einsatz der hier gewählten SDS-Konzentration konnte beobachtet werden, dass es bis zu 20 durchgeführter Analysen bedarf, bevor sich die Migrationszeiten auf eine reproduzierbare Zeitspanne eingestellt haben. Auch der Wechsel des CE-Gerätes, an dem die Versuche durchgeführt werden, kann Einfluss auf die Migrationszeiten haben. Dieser Effekt ist darauf zurückzuführen, dass bei den beiden eingesetzten unterschiedlichen Geräten bei gleicher Kapillarlänge zum Detektor die Gesamtkapillarlänge trotzdem unterschiedlich ist, so dass es hierdurch bei gleicher angelegter Spannung zu unterschiedlichen Feldstärken kommt, was sich letztendlich in unterschiedlichen Migrationszeiten niederschlägt.

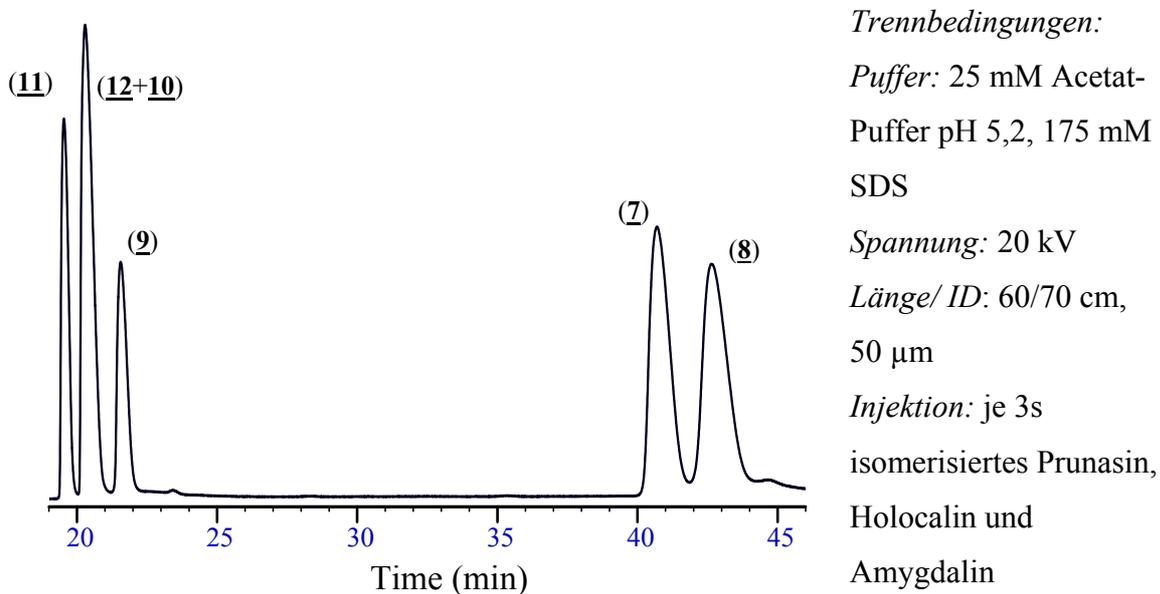
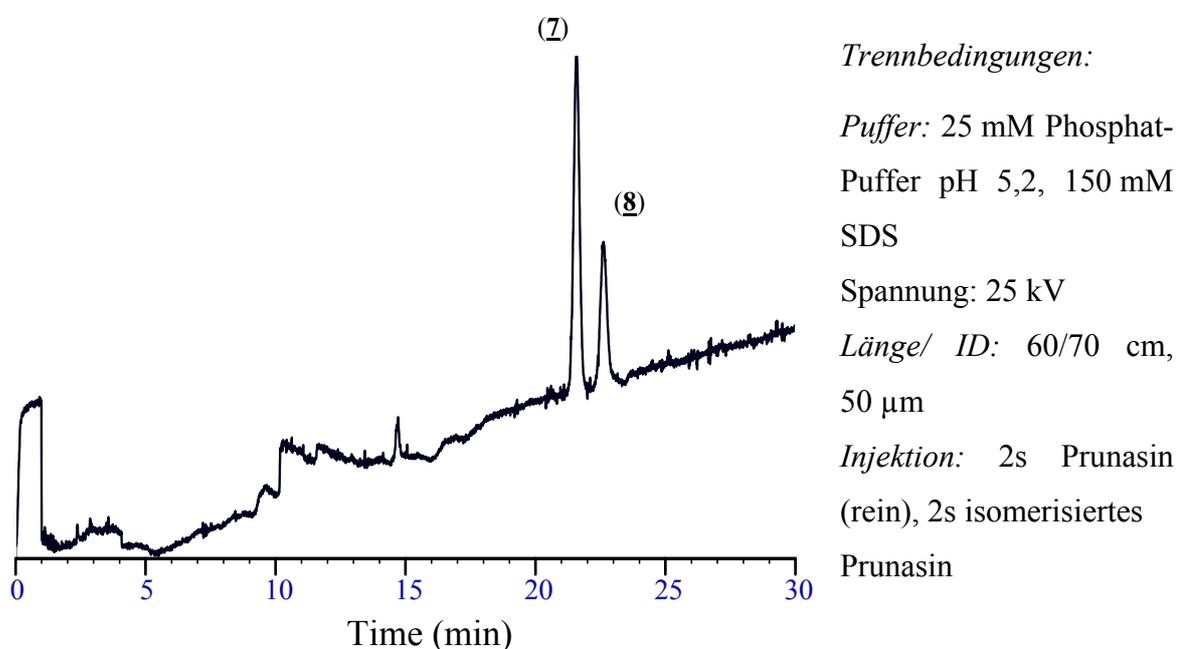


Abb.II.23: Holocalin (**11**), Zierin (**12**)/Neoamygdalin (**10**), Amygdalin (**9**), Prunasin (**7**), Sambunigrin (**8**)

Der Einsatz des 25 mM Acetatpuffers mit der oben angegebenen, relativ hohen SDS-Konzentration, erwies sich zunächst als problematisch, da regelmäßig am MDQ-Gerät nach wenigen Läufen die Kapillare brach. Zurückzuführen ist dies mit hoher Wahrscheinlichkeit darauf, dass die während eines Analysendurchganges entstehenden Acetat-Laurylsulfat-Ablagerungen den Polyimidfilm der Kapillare durch Anheftung beschädigen, wodurch eine Sollbruchstelle entsteht, an der bei der nächsten mechanischen Belastung die Kapillare bricht. Als Beispiel ist hier der Wechsel der Vial-Position beim Übergang des Trennvorganges zum abschließenden Spülschritt einer Methode zu nennen.

Zunächst wurde der Acetatpuffer durch einen Phosphatpuffer pH-Wert 5,2 ersetzt. Auch dieser Puffer erwies sich als unbrauchbar, da hier ebenso wie beim Einsatz des Carbonatpuffers keine einheitlichen Migrationszeiten erzielt werden konnten. Unmittelbar nach Einsatz neuer, frisch gespülter und konditionierter Kapillaren migrierten die Epimeren-Paare Holocalin und Zierin bei 9 bzw. 10 und Prunasin und Sambunigrin bei 13 bzw. 14 Minuten, nach längerer Verwendung der Kapillaren jedoch konnten Sambunigrin und Prunasin innerhalb einer Stunde nicht mehr detektiert werden. Ein Erklärungsansatz für diese Erscheinung liegt darin, dass vermutlich der Phosphat-Puffer und die Natrium-Laurylsulfat-Micellen, bzw. entstehende Verbindungen oder Komplexe dieser Substanzen, die Kapillarwand irreversibel belegen und somit zu einer derartigen Veränderung des Trennverhaltens der Analyten führen. Des Weiteren kam es bei Verwendung des Phosphatpuffers immer wieder zu Stromzusammenbrüchen, ohne dass jedoch makroskopisch Veränderungen an der Kapillare beobachtet werden konnten. Auch zeigten sich innerhalb einzelner Läufe nicht tolerierbare Basislinienunregelmäßigkeiten.

Im Folgenden (*Abb.II.24*) wird die zwar teilweise erzielte Trennung am Beispiel von Prunasin und Sambunigrin dargestellt, ebenfalls zu erkennen ist aber auch das nicht zu akzeptierende Basislinienrauschen und die Basisliniendrift.



*Abb.II.24: Prunasin (7) und Sambunigrin (8)*

Das Problem der Kapillarbrüche bei Verwendung des Acetatpuffers (pH  $\sim$  5,2) konnte schlussendlich durch die im Folgenden beschriebenen zwei Maßnahmen behoben werden:

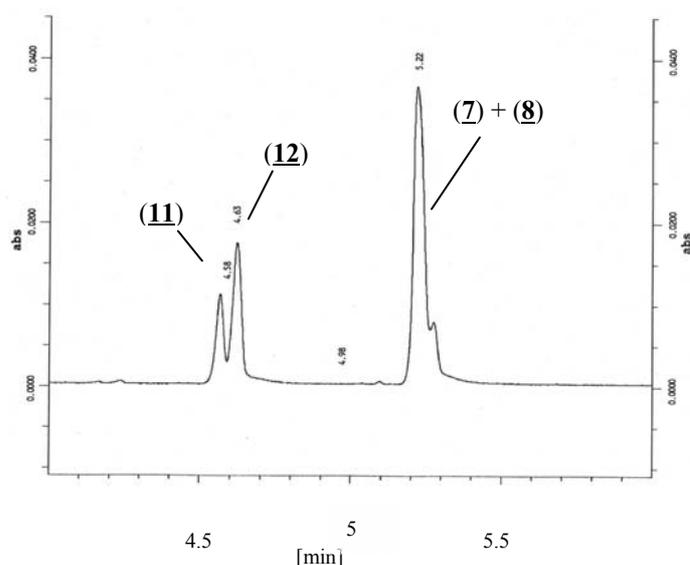
1. durch einen Wechsel vom MDQ- zum P/ACE 5510-Gerät
2. durch einen dem eigentlichen Trennprozess der Methode nachgestellten Spülschritt mit bidestilliertem Wasser, wobei das Wasser-Vial deutlich höher aufgefüllt wurde als die Puffergefäße mit dem verwendeten Acetatpuffer.

Somit wurde sichergestellt, dass die Kapillare nach der Trennung gleichermaßen von innen wie von außen gespült wird.

Da das P/ACE-Gerät jedoch nicht über ein so umfassendes Kühlsystem verfügt wie das MDQ-Gerät, welches im Gegensatz zum P/ACE 5510 nicht nur eine Temperierung der Kapillare sondern auch des Probeninnenraumes erlaubt, wurde die Methode an diesem Gerät noch einmal modifiziert.

Die SDS-Konzentration wurde gesenkt und stattdessen die Acetatkonzentration gesteigert. Auch die Erhöhung der Acetatkonzentration führte ebenso wie die zuvor diskutierte Erhöhung der SDS-Konzentration zu einer deutlich höheren Reproduzierbarkeit als sie unter den in der Veröffentlichung von CAMPA angegebenen Bedingungen erzielt werden konnte. Auch in diesem Fall ist durch den Einsatz eines relativ hochmolaren Puffers, der bei der gewählten Spannung von 25 kV und einer Kapillarlänge von 70/77 cm eine Stromstärke von ca. 90  $\mu\text{A}$  ergibt, eine sehr lange Konditionierungsphase vor Beginn der Analytik erforderlich. Wurde die Kapillare nicht ausreichend konditioniert, schlug sich dies auch hier wieder in stark schwankenden Migrationszeiten nieder.

Um die Analysendauer zu verkürzen, wurden dem Puffer im Verlauf der Methodenentwicklung verschiedene Cyclodextrine zugesetzt, bzw. die SDS-Konzentration wurde noch weiter abgesenkt. Dies führte in allen Fällen zwar zu einer teilweisen sehr deutlichen Verbesserung der Analysendauer, vor allem beim Einsatz neutraler Cyclodextrine, die ein die Migrationszeiten verkürzendes Konkurrenzsystem zu den negativ geladenen Mizellen darstellten. Gleichzeitig hatte dies aber auch die teilweise erhebliche Verschlechterung der Auftrennung der jeweils zwei Peaks der zu trennenden Epimerenpaare zur Folge (s. *Abb.II.25*).



*Trennbedingungen:*

*Gerät:* P/ACE 5510

*Puffer:* 25 mM Acetat-Puffer pH 5,2, 100 mM SDS, 0,25 %  $\beta$ -CD

*Spannung:* 25 kV

*Länge/ ID:* 70/77 cm, 50  $\mu$ m

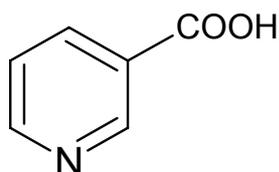
*Injektion:* je 3s isomerisiertes Prunasin und Holocalin

*Detektion:* 205 nm

*Abb.II.25: Trennung von Prunasin (7)/ Sambunigrin (8) und Holocalin (11)/ Zierin (12) mit Zusatz von  $\beta$ -Cyclodextrin*

#### 6.4 Wahl des internen Standards

Da bei der momentan diskutierten Methodenentwicklung die abschließende Methodenentwicklung am P/ACE 5510 durchgeführt wurde und somit keine Möglichkeit besteht, simultan mehr als zwei Wellenlängen aufzuzeichnen, bzw. zu einzelnen Peaks ganze UV-Spektren aufzunehmen, wurde als interner Standard (ISTD) in diesem Falle eine Substanz gesucht, die bei der während der Methodenentwicklung festgelegten Detektionswellenlänge ein gutes Konzentrations-/Intensitätsverhältnis aufweist. Die Wahl fiel in diesem Fall auf Nikotinsäure, auch bekannt als Niacin (s. *Abb.II.26*) oder Vitamin B5. Die Lage des internen Standards ist *Abb.II.27* zu entnehmen.



*Abb.II.26: Nikotinsäure (13)*

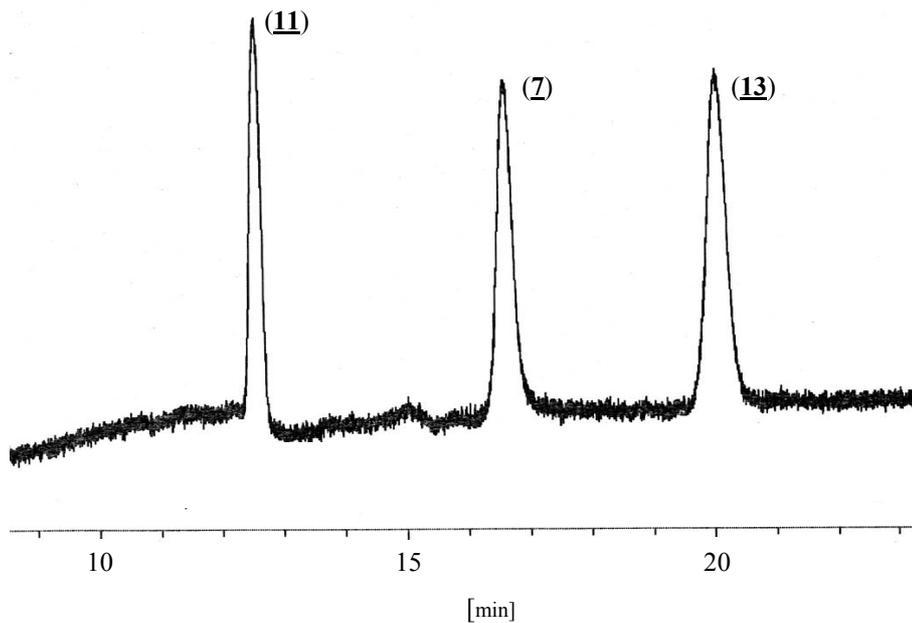


Abb.II.27: Elektropherogramm der entwickelten Methode, Holocalin (11), Prunasin (7), ISTD (13)

*Trennbedingungen: Trennelektrolyt: 100 mM Acetat-Puffer (pH 5,2), 100 mM SDS, Spannung: 25 kV, Länge/ID: 70/77 cm, 50  $\mu$ m, Detektion: 205 nm, Injektion: je 3s Nikotinsäure, Prunasin, Holocalin*

Abb.II.27 zeigt das Elektropherogramm einer Kalibrationslösung (enthält Prunasin, Holocalin und ISTD) für die entwickelte Methode zur Trennung der Epimerenpaare Prunasin/Sambunigrin und Holocalin/Zierin bzw. Amygdalin und Neoamygdalin.

## 7 Validierung

### 7.1 Spezifität

Die Spezifität der entwickelten Methode (s. Abb.II.27) wurde durch Additions-Experimente und Vergleich der Elektropherogramme der einzelnen Reinsubstanzen mit den Elektropherogrammen von Extrakten sichergestellt. Alle Quantifizierungen erfolgten mittels Standardzusatzverfahren (SZV), d.h. bei gleich bleibender Menge an zugegebenem Standard werden dem zu untersuchenden Extrakt steigende Konzentrationen des zu bestimmenden Analyten zugesetzt.

## 7.2 Kalibration

Mit Hilfe von acht Referenzlösungen wurde die unter 1.3 entwickelte Methode im Bereich von 10 µg/ml bis 2,5 mg/ml für Prunasin und Holocalin kalibriert. Für die Epimerenpaare Prunasin und Sambunigrin bzw. Holocalin und Zierin ist die Kalibration mit nur einem Epimer (Prunasin bzw. Holocalin) zulässig, da Epimere ein identisches UV-Absorptionsspektrum aufweisen. Aufgrund nicht für die Kalibration ausreichender Mengen der Substanzen Amygdalin und Neoamygdalin werden diese als Prunasin berechnet angegeben.

Den Kalibrierlösungen wurde als interner Standard jeweils eine konstante Menge an Nikotinsäure zugesetzt.

Jede Kalibrierlösung wurde dreimal analysiert und es wurden die Quotienten der jeweiligen korrigierten Peakflächen (CPA) der Analyten und des internen Standards (ISTD) gebildet. Die Kalibrierfunktionen wurden erhalten, indem die arithmetischen Mittelwerte dieser Flächenverhältnisse aus den jeweils fünf Einzelmessungen gegen die Konzentrationsverhältnisse von Analyten und internem Standard aufgetragen wurden (Abb.II.28a und- b)

### Prunasin

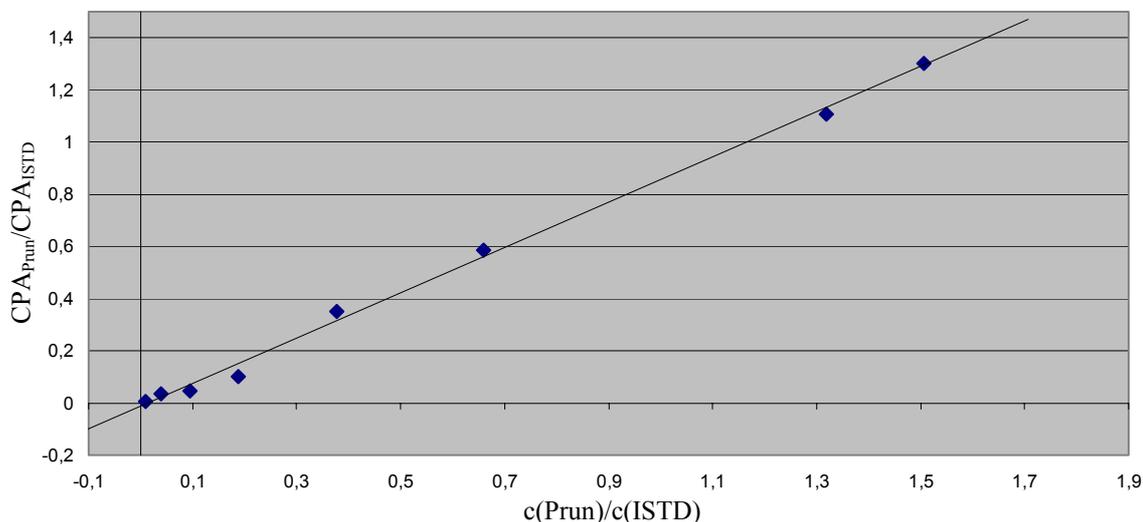


Abb.II.28a: Kalibrationsgerade Prunasin

$$\text{Geradengleichung: } y = 0,8687x - 0,0131; r^2 = 0,9969$$

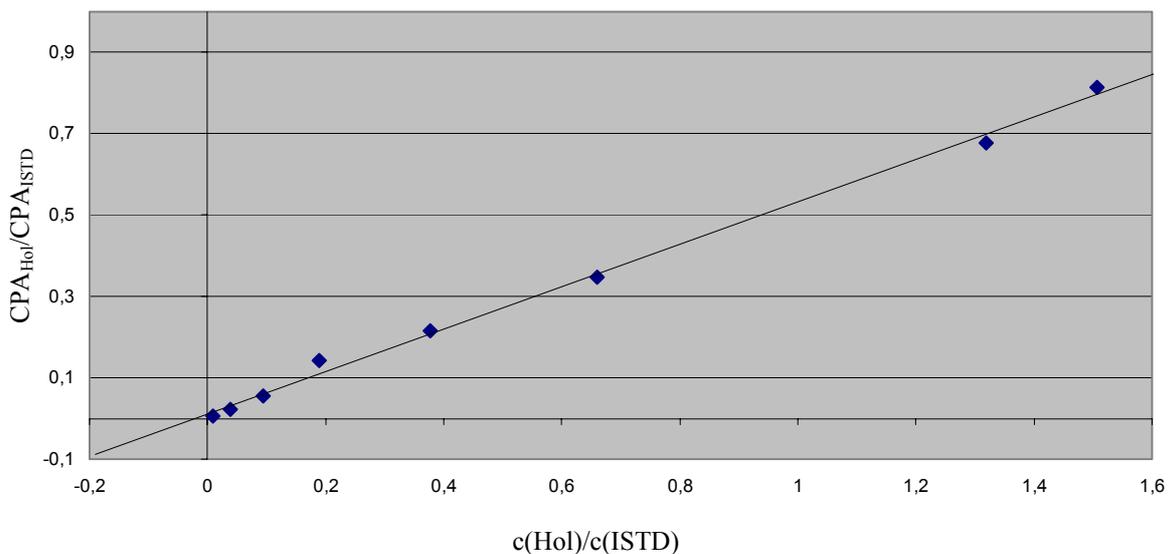
*Holocalin*

Abb.II.28 b: Kalibrationsgerade Holocalin

$$\text{Geradengleichung: } y = 0,5214x + 0,0116; r^2 = 0,9967$$

Die Kalibrationsgerade für Prunasin verläuft deutlich steiler als die für Holocalin, was zeigt, dass Prunasin und somit auch Sambunigrin bei der gewählten Wellenlänge ein deutlich höheres UV-Absorptionsvermögen haben als Holocalin und Zierin.

### 7.3 Bestimmungs- und Nachweisgrenze

Die Bestimmungsgrenze (Limit of Quantification, LOQ) der Methode wurde sowohl für Prunasin als auch für Holocalin mit 35 µg/ml festgelegt, basierend auf einem Signal-Rausch-Verhältnis von 9:1. Bei dieser Konzentration können noch akzeptable Präzisions- und Richtigkeitswerte bestimmt werden.

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD) liegt für beide Verbindungen bei 20 µg/ml, basierend auf einem Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1 [KROMIDAS, 1999].

### 7.4 Richtigkeit und Präzision

Richtigkeit und Präzision der entwickelten Methode wurden sowohl intraday als auch interday bestimmt. Hierzu wurden unter Verwendung stets frisch hergestellter Stammlösungen der Analyten Prunasin und Holocalin vier Lösungen bekannten Gehalts auf verschiedenen Konzentrationsniveaus, die den gesamten Arbeitsbereich abdecken

(0,03775 mg/ml, 0,3775 mg/ml, 0,755 mg/ml, 1,3213 mg/ml) hergestellt, mit der entsprechenden Menge an internem Standard versetzt und jeweils fünfmal injiziert.

Da die Methode keinen Aufarbeitungsschritt enthält, konnte auf das separate Herstellen von Referenzlösungen für jedes einzelne Konzentrationsniveau verzichtet werden. Hierdurch wären lediglich Richtigkeit und Präzision der Pipettierschritte bei der Herstellung der Referenzlösungen überprüft worden, die nicht eigentlicher Bestandteil der Methode sind und somit auch nicht Gegenstand der Validierung. Es wurde als ausreichend angesehen, aus jeder Probe fünfmal zu injizieren.

Zur Bestimmung der interday-Richtigkeit und -Präzision wurde das Verfahren insgesamt dreimal an drei verschiedenen Tagen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den nachstehenden Balkendiagrammen (*Abb.II.29a und -b*) zusammenfassend dargestellt.

Die Richtigkeit liegt für Prunasin zwischen 99,7 % und 107,1 % für die oberen Konzentrationsstufen, an der LOQ beträgt sie zwischen 95,9 % und 103,5 %. Die Präzision, ausgedrückt durch den Variationskoeffizienten (= relative Standardabweichung) der Einzelmessungen, lag bei den oberen Konzentrationsstufen stets unter 7,6 %. An der LOQ wurden 8,1 % nicht überschritten.

Die Richtigkeit liegt für Holocalin zwischen 92,5 % und 100,2 % für die oberen Konzentrationsstufen, an der LOQ beträgt sie zwischen 93,7 % und 104,7 %. Die Präzision, ausgedrückt durch den Variationskoeffizienten (= relative Standardabweichung) der Einzelmessungen, lag bei den oberen Konzentrationsstufen stets unter 7,6 %. An der LOQ wurden 7,8 % nicht überschritten. Somit entspricht die entwickelte Methode voll den im Allgemeinen Teil unter **3.2.3.4** formulierten Anforderungen an Richtigkeit und Präzision.

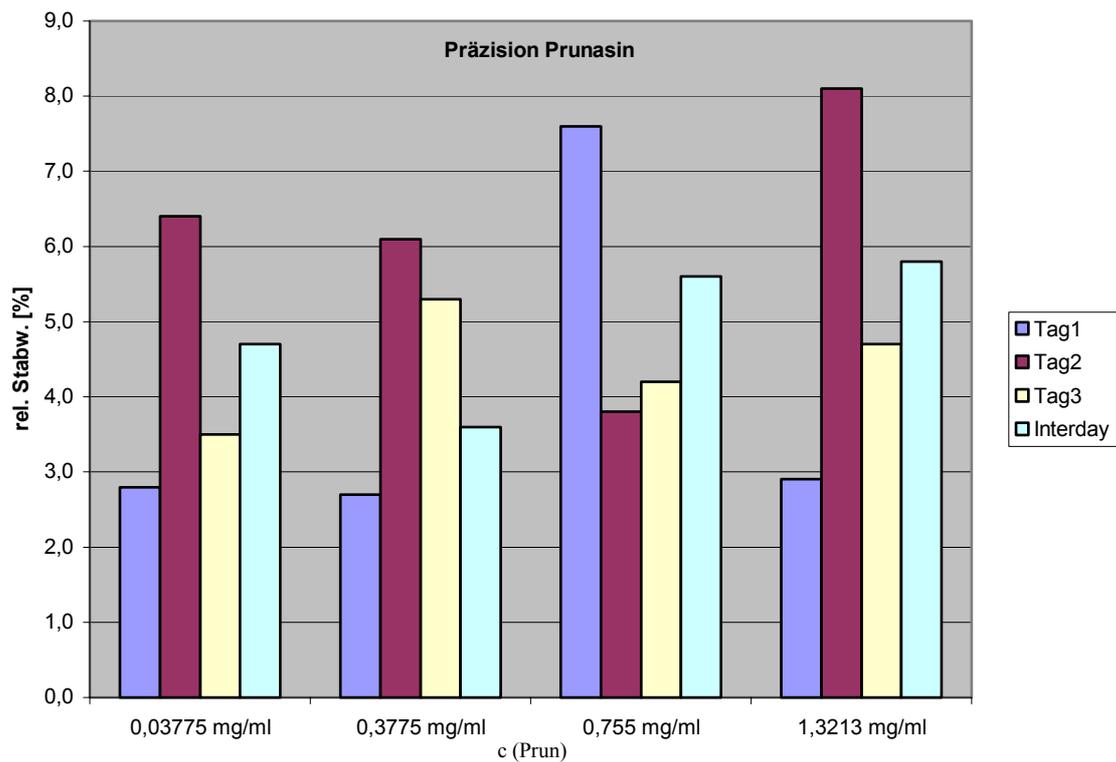
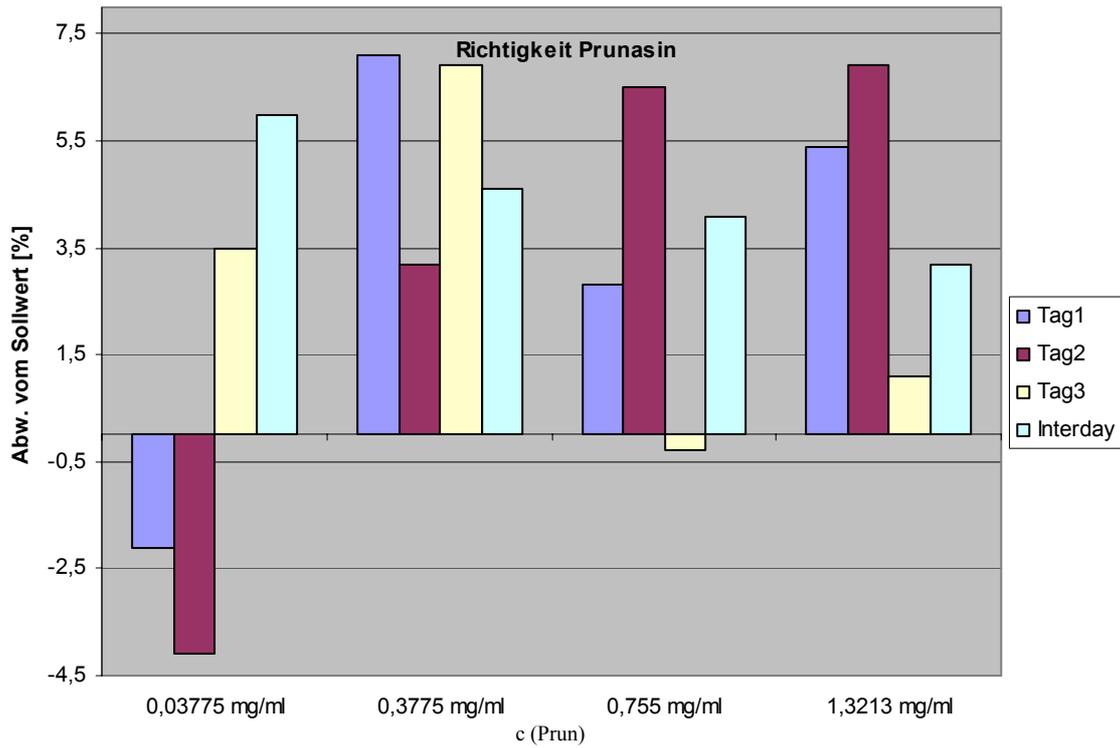


Abb.II.29a: Validierungsdaten zu Richtigkeit und Präzision für Prunasin

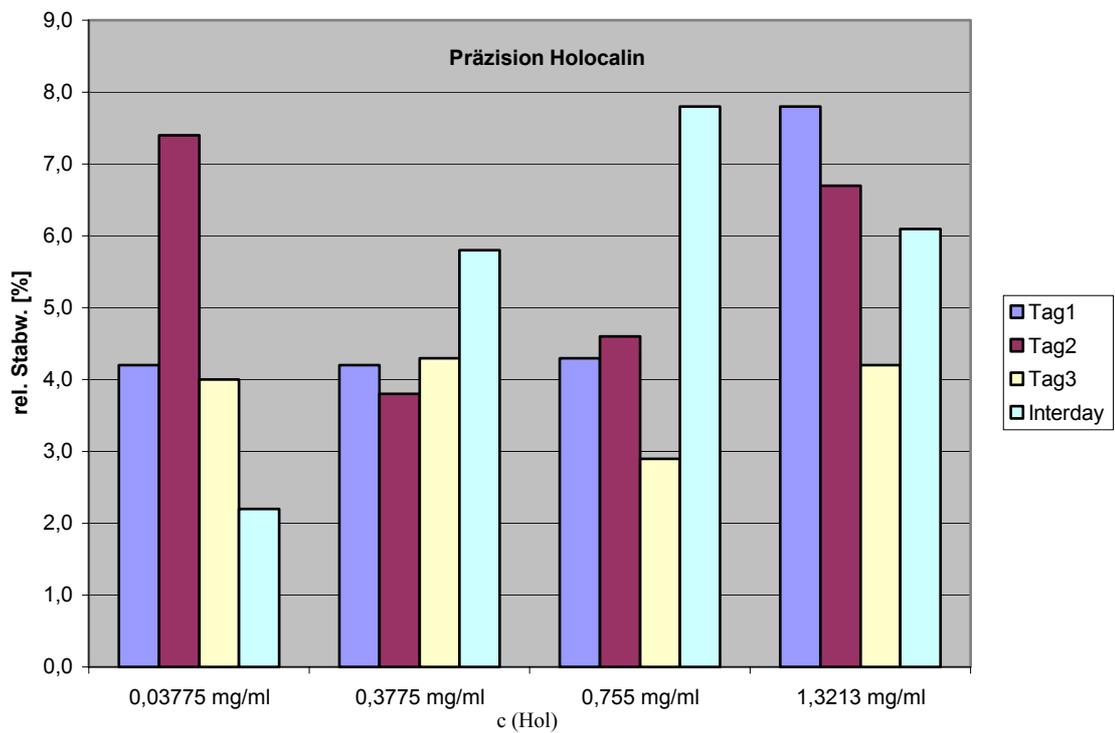
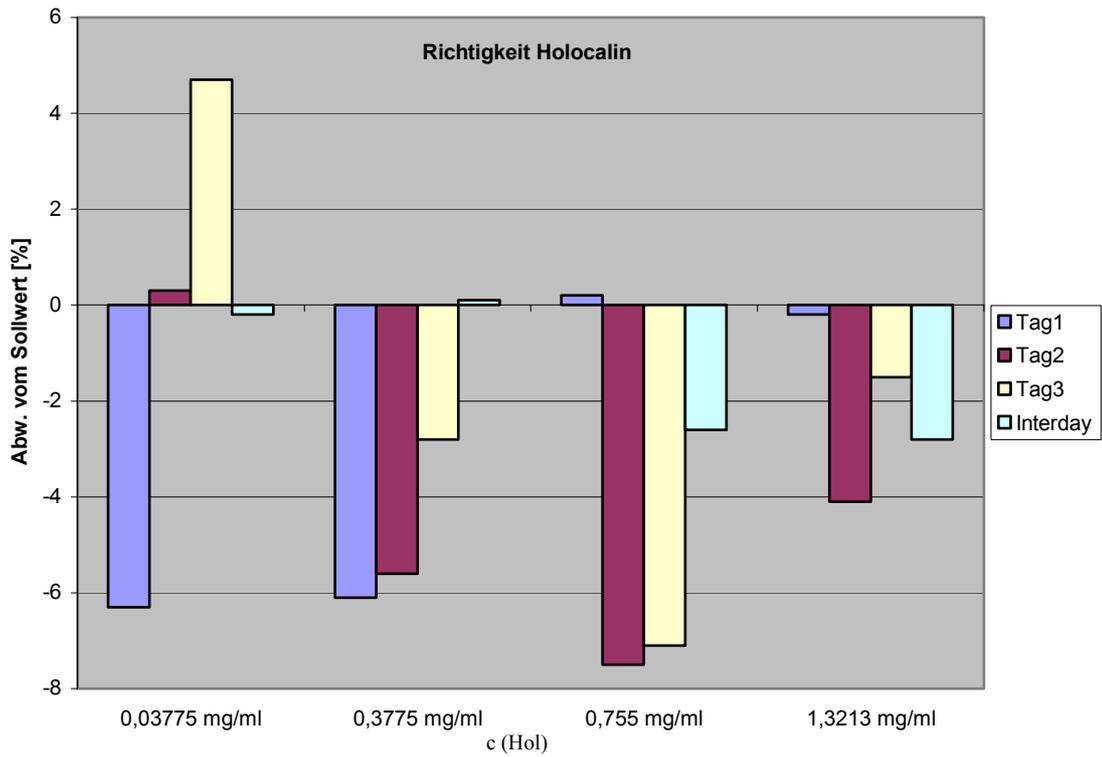


Abb.II.29b: Validierungsdaten zu Richtigkeit und Präzision für Holocalin

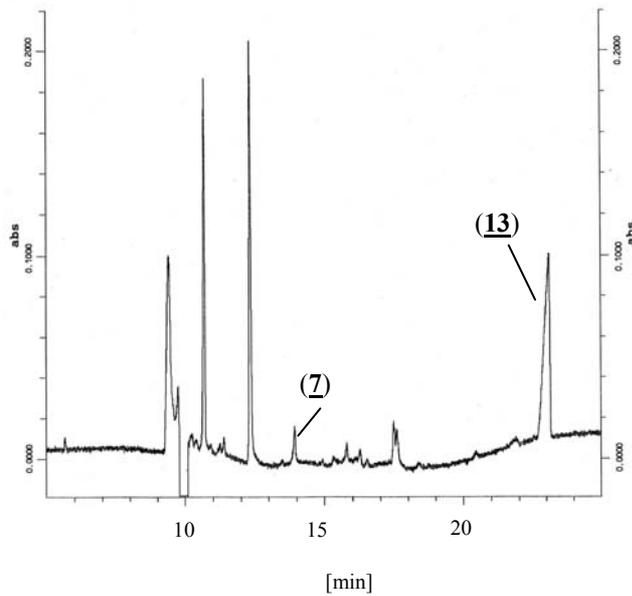
## **8 Untersuchung von Prunasin, Sambunigrin, Amygdalin, Neoamygdalin, Holocalin und Zierin in Extrakten**

Mit Hilfe der vorstehend kalibrierten Methode wurden Pflanzenextrakte verschiedener cyanogener Pflanzen analysiert. Alle Extrakte wurden per Standardzusatzverfahren (SZV) analysiert, d.h. es wurden mehrere Lösungen des Pflanzenextraktes vorbereitet, denen nach Zugabe einer konstanten Menge an internem Standard steigende Mengen des zu analysierenden Cyanglykosids zugegeben wurden. Diese Vorgehensweise hat zum einen die Spezifität der Methode bestätigt, zum anderen konnte so gezeigt werden, dass die entwickelte und validierte Methode unanfällig ist für Matrixeffekte, zum Beispiel durch weitere Inhaltsstoffe und Bestandteile des Pflanzenmaterials. Untersucht wurden Früchte von *Sambucus nigra* aus dem institutseigenen Arzneipflanzengarten und Blätter des brasilianischen Baumes *Holocalyx balansae* aus dem Botanischen Garten Berlin-Dahlem.

### **8.1 Bestimmung von Prunasin in *Sambucus nigra* und *Holocalyx balansae***

Wie im Experimentellen Teil unter 2.4.1.2 beschrieben, wurden die Holunderbeeren bzw. das Blattmaterial von *Holocalyx balansae* zunächst gefriergetrocknet, anschließend wurden hiervon methanolische Extrakte hergestellt. In Voruntersuchungen wurde zunächst anhand der entwickelten Methode identifiziert, welche cyanogenen Glykoside in welchen Konzentrationsbereichen in den Pflanzenextrakten zu erwarten sind. Daraufhin wurden die Proben mittels Standardzusatzverfahren analysiert. Nachstehend sind typische Elektropherogramme eines *Sambucus-nigra*-Extraktes und eines Extraktes von *Holocalyx balansae* abgebildet, nach Zusatz des internen Standards, jedoch ohne Zusatz der zu analysierenden cyanogenen Glykoside. Entgegen den Beschreibungen in der Literatur [JENSEN und NIEHLSSEN, 1976, D'ABROSCA ET.AL., 2001] enthielten die untersuchten Früchte von *Sambucus nigra* jedoch nicht alle vier cyanogenen Glykoside Prunasin, Sambunigrin, Holocalin und Zierin, sondern nur Prunasin (s. *Abb.II.30*). Es konnte also nur Prunasin quantifiziert werden.

In der volkstümlich wahrscheinlich als Antipyretikum genutzten Pflanze *Holocalyx balansae* [<http://planeta.terra.com.br/informatica/zerenato/arvores/alecrim.html>] wurde ebenfalls Prunasin quantifiziert (s. *Abb.II.31*).



*Trennbedingungen:*

*Gerät:* P/ACE 5510

*Puffer:* 100 mM Acetat-Puffer pH 5,2, 100 mM SDS

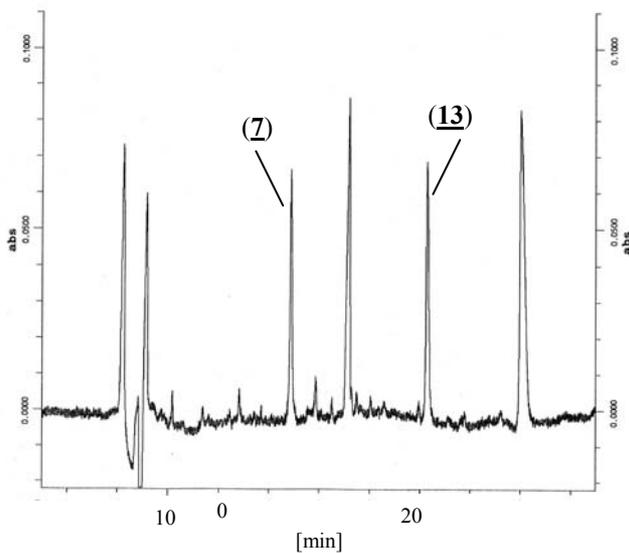
*Spannung:* 25 kV

*Länge/ ID:* 60 cm, 50 µm

*Injektion:* 5s *Sambucus nigra*-Extr. mit Prunasin (7) und ISTD (13)

*Detektion:* 205 nm

*Abb.II.30: Elektropherogramm von Sambucus nigra*



*Trennbedingungen:*

*Gerät:* P/ACE 5510

*Puffer:* 100 mM Acetat-Puffer pH 5,2, 100 mM SDS

*Spannung:* 25 kV

*Länge/ ID:* 60 cm, 50 µm

*Injektion:* 5s Extrakt v. *Holocalyx balansae* mit Prunasin (7) u. ISTD (13)

*Detektion:* 205 nm

*Abb.II.31: Elektropherogramm von Holocalyx balansae*

Vergleich der untersuchten Pflanzenextrakte:

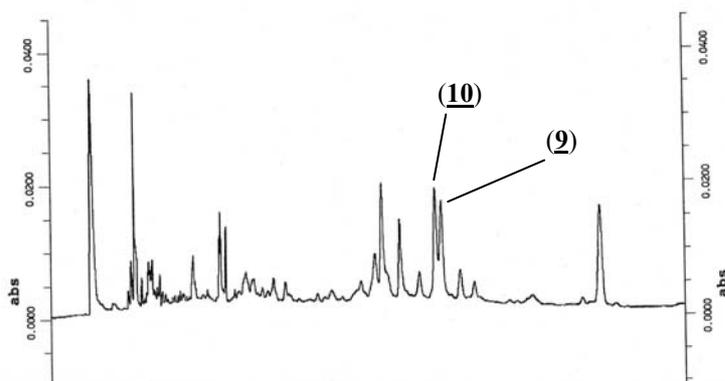
<i>Untersuchungsobjekt</i>	<i>Gehalt an Prunasin [mg/100g TM] nach SZV</i>	<i>Gehalt an Prunasin [mg/100g TM] über Kal.gerade</i>	<i>Geradengleichung des SZV</i>
Holunderbeeren	5,82	5,57 (- 4,3 %)	$y = 1,0852x + 0,062;$ $r^2 = 0,9930$
Blätter von <i>H. balansae</i>	46,72	45,27 (- 3,1 %)	$y = 0,7563x + 0,9636;$ $r^2 = 0,9944$

Tab.II.7: Gehalt an Prunasin im untersuchten Pflanzenmaterial

Angegeben ist jeweils der Gehalt an Prunasin bezogen auf die Trockenmasse (TM), d.h. das gefriergetrocknete Material. Die genauen Daten und Geraden zu den oben angegebenen Geradengleichungen sind dem Experimentellen Teil unter 5.5 zu entnehmen. Die über die Geradengleichung der Kalibrationsgeraden für Prunasin errechneten Gehalte an Prunasin im untersuchten Pflanzenmaterial liegen leicht unter den per Standardzusatzverfahren ermittelten.

## 8.2 Bestimmung von Amygdalin in Laetrile®

Eine über einen längeren Zeitraum gelagerte Probe des Präparates Laetrile® sollte untersucht werden. Nachstehend (s. Abb.II.32) ist ein Elektropherogramm des Präparates zu sehen, offensichtlich hat es sich über den Zeitraum der Lagerung sehr weit zersetzt, so dass von einer Bestimmung des Amygdalin-Gehaltes Abstand genommen wurde.



*Trennbedingungen, Gerät,*

*Detektion: s. Abb.II.31*

*Injektion: 5s Laetrile® (1:10-  
Verdünnung)*

Abb.II.32: Laetrile®, 1:10-Verdünnung, Amygdalin (9) und Neoamygdalin (10)

## 9 HCN–Bestimmung nach ALDRIGE und Vergleich mit den Ergebnissen der CE-Bestimmung

Zur Verifizierung der kapillarelektrophoretisch ermittelten Gehalte an cyanogenen Glykosiden in den oben beschriebenen Untersuchungsobjekten wurde der Cyanidgehalt dieser Extrakte auch nach der sehr empfindlichen Methode nach ALDRIGE, modifiziert nach NAHRSTEDT [NAHRSTEDT, 1977; ALDRIGE, 1944] bestimmt. Da für die Validierung dieser Methode bzw. zur Überprüfung der Richtigkeit kein käuflicher oder sonstiger definierter Vergleich zur Verfügung steht, kann in dem Vergleich mit einer, auf einem völlig anderen Prinzip basierenden Methode ein weiterer Beitrag zur Bestätigung der Richtigkeit gesehen werden.

Es ist zu beachten, dass mit dieser Bestimmungsmethode der Gesamt-Cyanidgehalt der Probe bestimmt wird. Es kann also im Fall von Isomerisierungen der cyanogenen Glykoside zu einem deutlich höheren Wert bei dieser Bestimmung kommen, da die Methode - im Gegensatz zu der entwickelten CE-Methode - nicht selektiv für einzelne Substanzen ist.

<i>Pflanze</i>	<i>Cyanid-Gehalt nach [Aldrige], ber. als Prunasin</i>	<i>Gehalt an Prunasin</i>	<i>Differenz der Bestimmungen</i>
Holunderbeeren	6,00 mg/ 100g TM	5,82 mg/100g TM	3,1 %
Blätter von <i>H. balansae</i>	47,84 mg/ 100g TM	46,72 mg/100g TM	2,4 %

*Tab.II.8: Vergleich der ermittelten Cyanidgehalte der untersuchten Pflanzen*

Die Unterschiede der nach den verschiedenen Methoden bestimmten Gehalte an cyanogenen Glykosiden liegen im akzeptablen Bereich für den Vergleich zweier prinzipiell unterschiedlicher Gehaltsbestimmungen.

## C Aliphatische Cyanglykoside

### 10 Linamarin, Lotaustralin, Linustatin, Neolinustatin

#### 10.1 Linamarin, Lotaustralin, Linustatin, Neolinustatin

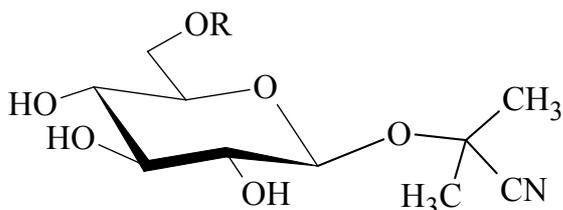
Die aliphatischen cyanogenen Glykoside Linamarin, Lotaustralin, Linustatin und Neolinustatin leiten sich biogenetisch von den Aminosäuren Valin bzw. Isoleucin ab. Linamarin und Lotaustralin gehören zu den im Pflanzenreich am häufigsten vorkommenden Cyanglykosiden und kommen oft vergesellschaftet vor. Hauptsächlich sind sie z.B. in den Familien der Fabaceae, Linaceae, Euphorbiaceae oder Poaceae zu finden, Linamarin und Lotaustralin sind außerdem in Insekten der Spezies Lepidoptera zu finden. Linamarin wurde erstmalig aus *Linum usitatissimum* [JORISSEN und HAIRS, 1891] isoliert und beschrieben, derselbe Pflanze, aus der 1980 auch Linustatin und Neolinustatin erstmals beschrieben wurden [SMITH et al., 1980]. Lotaustralin wurde 1939 entdeckt [HENRY, 1938].

Linamarin, Lotaustralin, Linustatin und Neolinustatin kommen sehr häufig in Nutzpflanzen, nicht nur zur Herstellung von Lebensmitteln, wie z.B. Tapioka-Mehl aus Maniok-Knollen, sondern auch in Arzneipflanzen wie Leinsamen vor. Daher war hier die Motivation für die Entwicklung einer CE-Methode folgende: Eine Möglichkeit aufzuzeigen, bereits in sehr geringen Konzentrationen toxische und deshalb unerwünschte Pflanzeninhaltsstoffe bestimmen zu können.

Die Bezeichnung von cyanogenen Glykosiden erfolgt oftmals nicht einheitlich, daher werden in *Tab.II.9* die in der Literatur hauptsächlich verwendeten systematischen Namen den i.d.R. verwendeten Trivialnamen zugeordnet:

<i>Trivialname</i>	<i>Systematische Bezeichnung (Nitrilnomenklatur)</i>
Linamarin	2-β-D-Glucopyranosyloxy-2-methyl-propionitril
Lotaustralin	2-β-D-Glucopyranosyloxy-2R-ethyl-propionitril
Linustatin	2-β-D-[1→6-β-D-Glucopyranosyl-Glucopyranosyloxy]-2R-ethyl-propionitril
Neolinustatin	2-β-D-[1→6-β-D-Glucopyranosyl-Glucopyranosyloxy]-2-methyl-propionitril

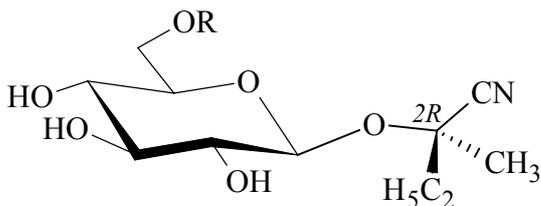
*Tab.II.9: Bezeichnungen der aliphatischen Cyanglykoside*



R = H: Linamarin (**14**)

R =  $\beta$ -(D)-Glucosyl: Linustatin (**15**)

Abb.II.33: Valin-abgeleitete cyanogene Glykoside



R = H: Lotaustralin (**16**)

R =  $\beta$ -(D)-Glucosyl: Neolinustatin (**17**)

Abb.II.34: Isoleucin-abgeleitete cyanogene Glykoside

## 10.2 Chemische und Physikalische Eigenschaften

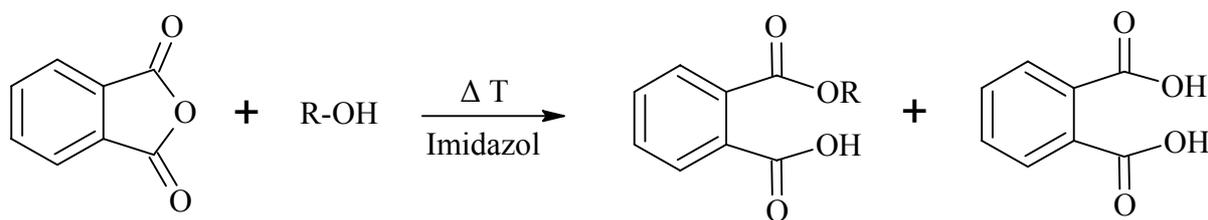
Linamarin und Lotaustralin sind aliphatische, cyanogene Monoglykoside, Linustatin und Neolinustatin sind ihre entsprechenden Diglykoside. Aliphatische cyanogene Glykoside haben strukturbedingt kein eigenes Chromophor, so dass die UV-Detektion hier problematisch ist. Dies gilt zwar nicht für Reinsubstanzen oder Mischungen von Reinsubstanzen, da diese im unteren UV-Bereich sehr wohl erfasst werden können, wohl aber für die Analyten bspw in Pflanzenextrakten. Dieser Wellenlängenbereich umschließt sehr unspezifisch alle in einem Gemisch vorliegenden Verbindungen, so dass es hierdurch zu Überlagerungen von Signalen der Analyten mit Peaks anderer Verbindungen kommen kann. Um auch hier eine spezifische Methode zu entwickeln, wurde daher zunächst nach einer schonenden Methode zur Derivatisierung der Glykoside gesucht, um ein UV-detektierbares Chromophor einzuführen. Eine Herausforderung stellte die kapillarelektrophoretische Trennung aller vier aliphatischen Cyanglykoside nach Derivatisierung dar, denn der Struktur- bzw. Massenunterschied zwischen den je zwei Mono- bzw. Diglykosiden beträgt nur eine Methylgruppen, d.h. 14 Da. Nach der Derivatisierung liegt der prozentuale Unterschied der Massen der Derivate also im Promille-Bereich. Aus diesem Grund wurde parallel eine HPLC-Methode zur Quantifizierung der oben genannten derivatisierten Cyanglykoside entwickelt.

## 10.3 Derivatisierung mit Phthalsäureanhydrid bzw. Naphthoylimidazol

### 10.3.1 Derivatisierung mit Phthalsäureanhydrid zur Einführung eines ionischen und UV-aktiven Chromophors

Für die zu entwickelnde kapillarelektrophoretische Trennung wurden die aliphatischen Glykoside mit Phthalsäureanhydrid derivatisiert. Durch diese Umsetzung wird nicht nur ein Chromophor eingeführt, zusätzlich bietet diese Derivatisierungsweise die Einführung einer ionischen Gruppe. Dies stellt insbesondere für die zu entwickelnde kapillarelektrophoretische Trennung einen großen Vorteil dar, da so der Zusatz von Mizellbildnern o.ä. Pufferadditiven zum Trennpuffer nicht unbedingt erforderlich ist.

Die hier ausgewählte Methode ist etabliert für die quantitative Derivatisierung von Hydroxyl- oder Amino-Gruppen enthaltenden Verbindungen [WELLONS et al., 1980; VANHOENACKER, 2001]. Die zu derivatisierende Substanz, bzw. die umzusetzenden aliphatischen OH-Gruppen werden mit Phthalsäureanhydrid in Pyridin unter Einsatz von Imidazol als Katalysator zum entsprechenden Ester derivatisiert (s. *Abb.II.33*). Die genauen Bedingungen sind im Exp. Teil unter **2.3.2.1** beschrieben.



*Abb.II.33: Derivatisierung von aliphatischen Hydroxylgruppen mit Phthalsäureanhydrid*

Die so erhaltenen Derivate, die untenstehend zur Veranschaulichung dreidimensional dargestellt sind (s. *Abb.II.34a und -b*, hier und im weiteren zur Visualisierung verwendetes Programm: ACD/Labs Chromatography Chemskech Software, Version 8.0), wurden nach Überprüfung der vollständigen Umsetzung per DC zur kapillarelektrophoretischen Trennung eingesetzt. Durch die Einführung von vier Ester- bzw. Carboxyl-Gruppen bei den Monoglykosiden bzw. sieben dieser Gruppen bei den Diglykosiden bestand hier die Möglichkeit, durch Wahl eines geeigneten pH-Wertes die Analyten sowohl im schwach sauren als auch im alkalischen Milieu in eine geladenen Form zu überführen und so eine Trennung ohne weitere Pufferadditive zu ermöglichen.

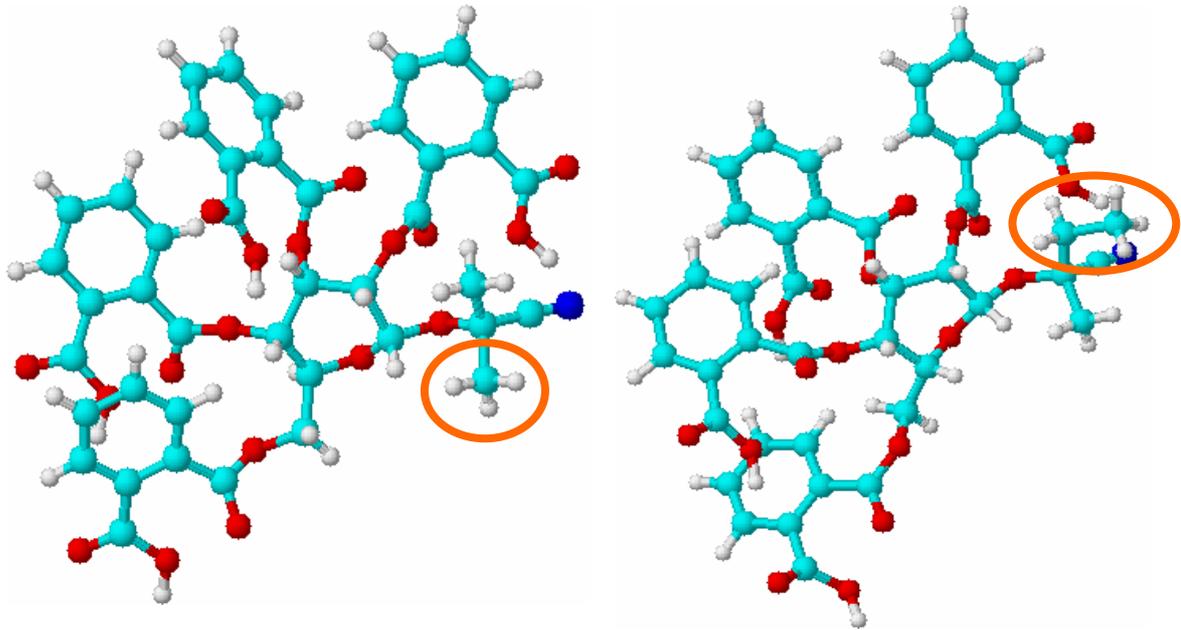


Abb.II.34a: Phthalsäurederivate von Linamarin (18, l.) und Lotaustralin (20, r.)

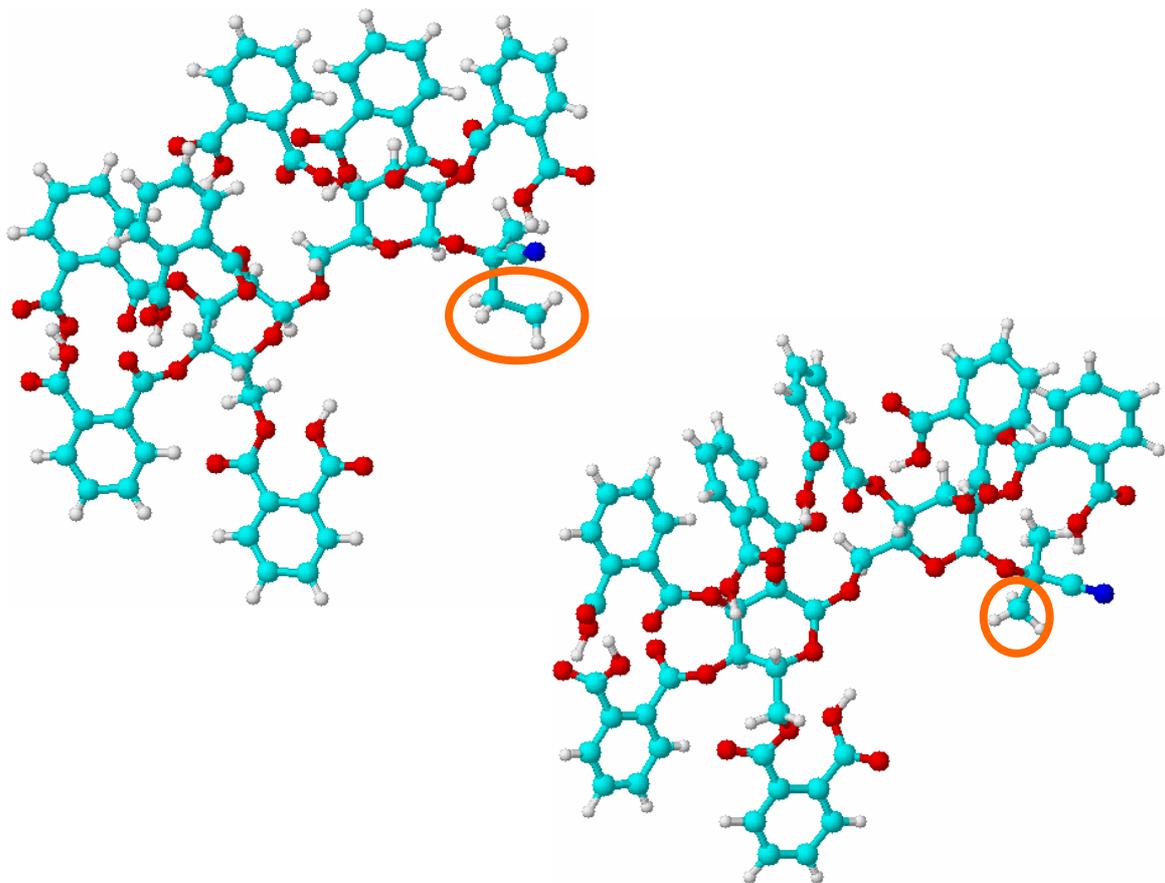
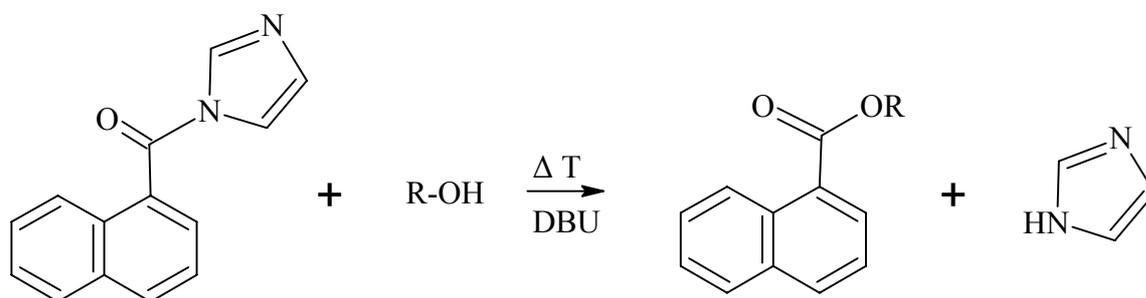


Abb.II.34b: Phthalsäurederivate von Linustatin (19, r.) und Neolinustatin (21, l.)

Die farbigen Umrandungen in den obigen Abbildungen *Abb.II.34a* und *-b* zeigen die im Verhältnis zur Gesamtmolekülgröße sehr kleinen strukturellen Unterschiede der jeweils beiden Mono- bzw. Diglykoside, der in der C<sub>2</sub>-ständigen Methyl- bzw. Ethylgruppe liegt.

### 10.3.2 Derivatisierung mit Naphthoylimidazol zur Einführung eines fluorogenen Chromophors

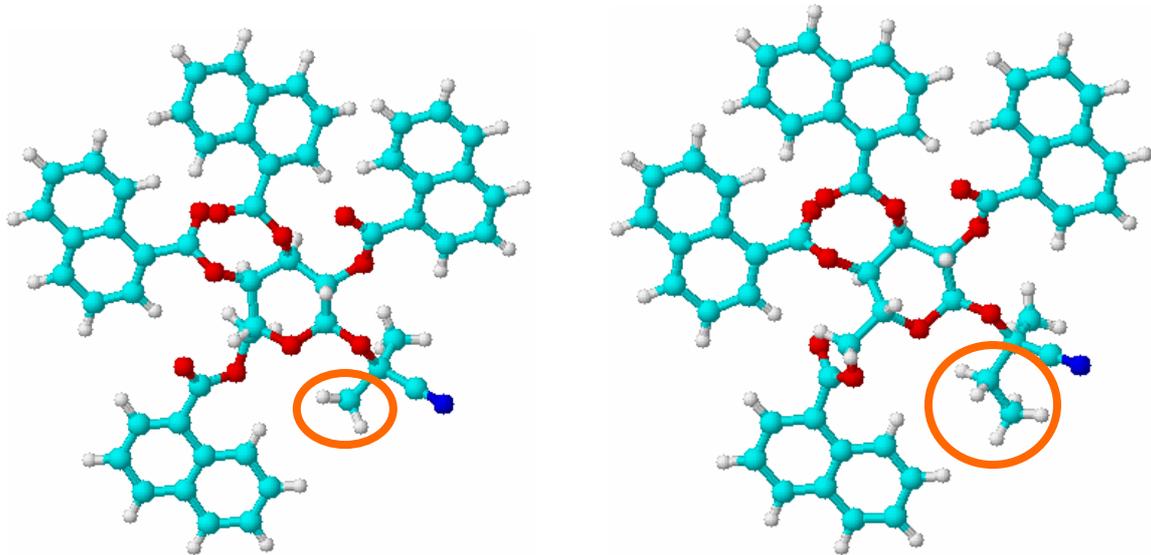
Für die Entwicklung einer möglichst sensitiven HPLC-Methode wurden die vorliegenden aliphatischen Cyanglykoside Linamarin, Lotaustralin, Linustatin und Neolinustatin mit Naphthoylimidazol derivatisiert (s. Ex.-Teil, 2.3.2.2). Da für die Trennung per HPLC, im Gegensatz zur CZE, keine funktionelle Gruppe erforderlich ist, wurde an dieser Stelle nach einer Derivatisierungsmöglichkeit gesucht, die die Entwicklung einer möglichst empfindlichen Methode erlaubt. Somit fiel die Wahl auf die Einführung eines Naphthoylrests, da dies den Einsatz des Fluoreszenzdetektors der HPLC ermöglicht, der deutlich empfindlicher ist als ein herkömmlicher PDA- oder UV-Detektor. Die Veröffentlichung [IKEMOTO et al., 1992] über diese Derivatisierungsmöglichkeit beschreibt den Nachweis von Naphthoyl-Derivaten von Hexosen bis in den Subpicomol-Bereich. Die Derivate zeigen bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 234 nm sehr starke Fluoreszenz bei 374 nm. Die Einführung einer fluorophoren Gruppe zur Verbesserung der Detektierbarkeit von Analyten verschiedener Stoffklassen in geringen Konzentrationsbereichen ist ein häufig praktizierter analytischer Schritt. Der Vorteil dieser Methode ist außerdem, dass sie im Mikromaßstab durchgeführt werden konnte, da außer im Falle des kommerziell erhältlichen Linamarins nur limitierte Menge an Cyanglykosiden zur Methodenentwicklung zur Verfügung standen.



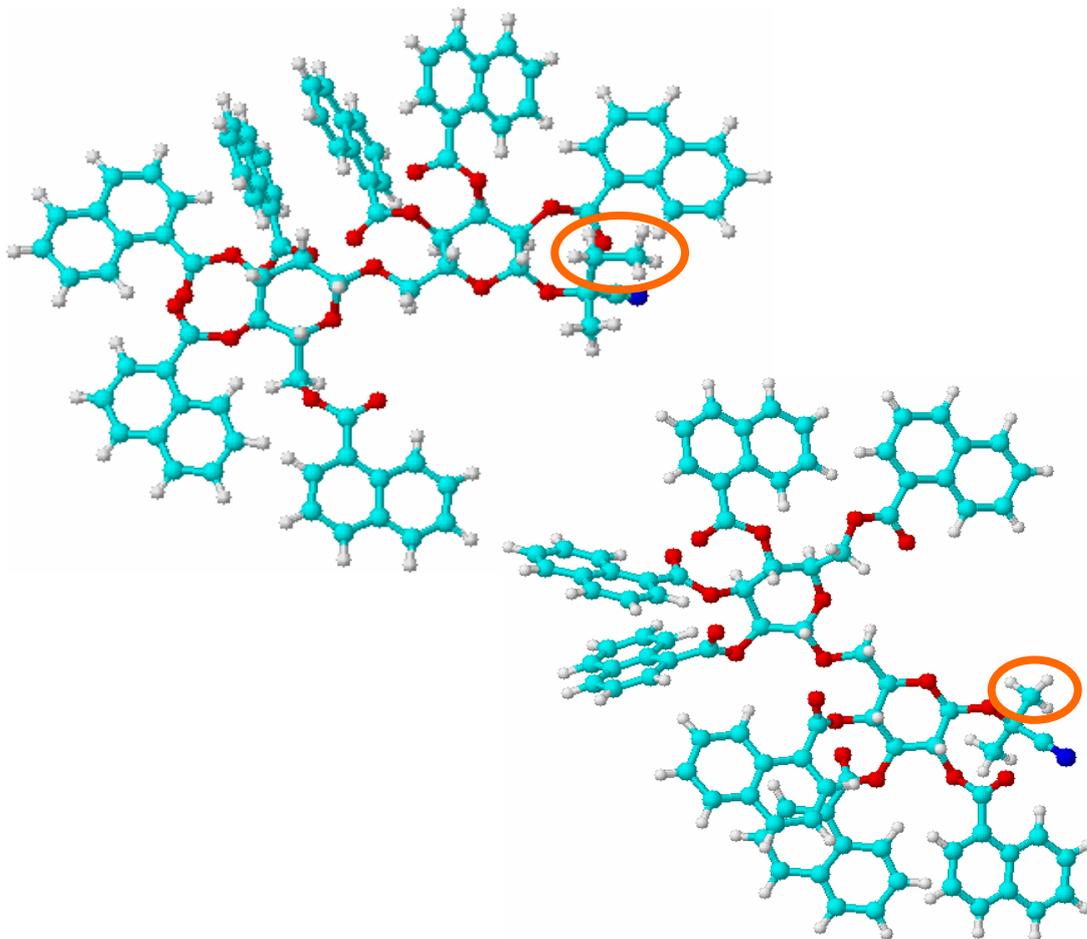
*Abb.II.35: Derivatisierung von aliphatischen Hydroxylgruppen mit Naphthoylimidazol*

DBU: 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en

Die hier erhaltenen Derivate sind unabhängig vom gewählten pH-Wert neutral. Nachstehend sind sie zur Veranschaulichung der resultierenden Molekülgröße, ihrer räumlichen Struktur und der nur noch sehr geringen Unterschiede der Mono- bzw. Diglykoside untereinander (s. *Abb.II.36*) dargestellt.



*Abb.II.36a: Naphthoyl-Derivate von Linamarin (22, l.) und Lotaustralin (24, r.)*



*Abb.II.36b: Naphthoyl-Derivate von Linustatin (23, r.) und Neolinustatin (25, l.)*

Zur kapillarelektrophoretischen Trennung ist somit der Zusatz von Mizellbildnern o.ä. erforderlich. Die Derivate weisen ein ausgeprägtes Absorptionsmaximum bei 238 nm auf, sie bieten sich daher sowohl zur UV-Detektion bei der CE an, als auch aufgrund ihres Fluorophors zur deutlich empfindlicheren Detektion bei der HPLC mit Fluoreszenz-Detektion oder Laserinduzierten Fluoreszenz-Detektion (LIF) an.

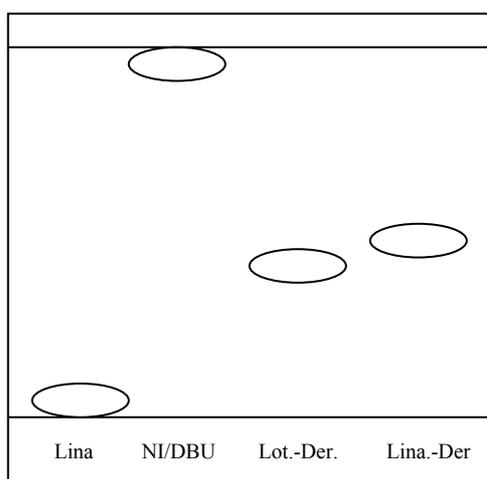
### 10.3.3 Überprüfung der vollständigen Derivatisierung

#### 10.3.3.1 Überprüfung auf quantitative Umsetzung per Dünnschichtchromatographie

Zur Gewährleistung einer quantitativen Umsetzung des zu derivatisierenden Glykosids war bei der Derivatisierung mit Phthalsäureanhydrid ein mindestens zehnfacher Überschuß des Derivatisierungsreagenzes erforderlich. So fiel nach der Derivatisierung das überschüssige, nicht umgesetzte aber ebenfalls zur Phthalsäure hydrolysierte Phthalsäureanhydrid als Nebenprodukt an, das in erheblichen Konzentrationen im Endprodukt enthalten war. Zur Methodenentwicklung per CE musste die entstandene Phthalsäure jedoch nicht abgetrennt werden, da sie bei den gewählten, an Literaturangaben angelehnten Vorschriften, die Trennung der Phthalsäure-Ester aufgrund ihres völlig anderen Migrationsverhaltens nicht störte; näheres hierzu s. 1.4.2.

Gemäß Literatur [IKEMOTO et al., 1992] gliedert sich an die Derivatisierungsvorschrift für die Umsetzung mit Naphthoylimidazol ein Aufreinigungsschritt an einer SPE-Kartusche an, so dass hier störende Nebenprodukte vor der HPLC-Untersuchung abgetrennt werden. Per DC wurde bei beiden Arten der Derivatisierung überprüft, ob das eingesetzte Glykosid quantitativ umgesetzt wurde und ob ein einheitliches Derivatisierungsprodukt erhalten wurde.

*Abb.II.37* zeigt ein typisches DC der Naphthoyl-Derivate; hier wurde als Vergleiche für das derivatisierte Linamarin und Lotaustralin die eingesetzten Derivatisierungsreagenzien Naphthoylimidazol (NI) und 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) aufgetragen und freies Linamarin. So konnte anhand des DC auf einen Blick überprüft werden, ob die Umsetzung weitestgehend quantitativ verlaufen ist, ob sich außer des erwünschten Produktes weitere Produkte gebildet haben, ob durch die Derivatisierungsbedingungen evtl. Linamarin zersetzt wurde und ob durch den Aufarbeitungsschritt das überschüssige Derivatisierungsreagenz Naphthoylimidazol und der Katalysator DBU (1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en) abgetrennt wurden.



*Fließmittel:* Toluol, s. Exp. Teil **2.3.2.3**

*Detektion:* UV, s. Exp. Teil **8.1**

*Lina.:* freies Linamarin

*NI/DBU:* Naphthoylimidazol/

1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en

*Lot-Der.:* Naphthoylderivat von

Lotaustralin

*Lina-Der.:* Naphthoylderivat von

Linamarin

*Abb.II.37: Skizze der DC zur Kontrolle der Naphthoyl-Derivatisierung von Linamarin*

### 10.3.3.2 Überprüfung der quantitativen Umsetzung der Naphthoyl-Derivatisierung mit ESI-Quadrupol-Massenspektrometrie

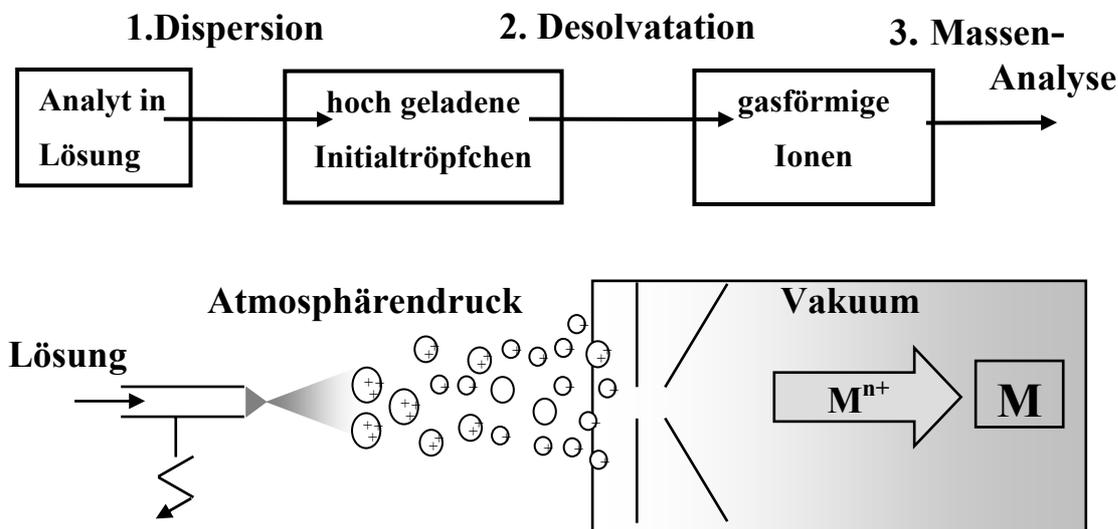
Elektrospray-Ionisierung (ESI) nutzt den physikalischen Effekt, dass sich Flüssigkeiten unter bestimmten Bedingungen in einem elektrischen Feld ausreichender Stärke zu einem Nebel feinsten und hoch geladener Tröpfchen versprühen lassen [YAMASHITA und FENN, 1984; FENN et al.,1989]. Die Probe liegt gelöst vor in einer Mischung aus Wasser und einem organischen Lösungsmittel, meist Methanol, Isopropanol oder Acetonitril (hier verwendet).

Bei einer ES-Ionenquelle erfolgt das Versprühen der Analyten-Lösung unter Atmosphärendruck außerhalb des Vakuums des MS-Systems (s. *Abb.II.38*). Die Analytionen werden über eine Transferkapillare, I.D. 100-500 µm, in den Hochvakuumbereich des Massenspektrometers gebracht. Ein Gegenstrom von warmem Stickstoff unterstützt hierbei die Desolvation der Ionen.

Ein Quadrupol-Massenanalysator besteht aus vier parallelen Stäben, die gegenüberliegend paarweise verbunden sind. An das eine Paar wird eine Wechselspannung mit überlagerter Gleichspannung angelegt, an das andere Paar wird dieselbe Wechselspannung angelegt, überlagert von einer um 180° phasenverschobenen Gleichspannung entgegengesetzter Polarität. Für bestimmte Kombinationen der Wechselspannung und der Gleichspannung haben verschiedene Ionen eines definierten Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses eine stabile Flugbahn durch den Quadrupol-Massenanalysator zum Detektor geleitet. Alle anderen Ionen haben instabile Flugbahnen und können das Quadrupol nicht passieren. Durch Veränderungen der Wechsel- und der Gleichspannung können sukzessive alle Ionen auf

stabile Flugbahnen gebracht durch den Quadrupol-Massenanalysator und somit zum Detektor geleitet werden [PAUL, 1990; PAUL et al., 1958].

Bei einem Gerät mit hinreichend hoher Massenauflösung kann man die Ladung  $n$  eines Ions am Abstand der Isotopen bestimmen, bei einfach geladenen Ionen haben die Isotopenpeaks 1 Da Abstand (s. *Abb.II.39a und -b*).



*Abb.II.38: Aufbau einer ESI-Ionenquelle, nach LEHMANN, 1997*

Mit der ESI-Quadrupol-MS-Untersuchung zur Bestimmung des Molekulargewichtes wird belegt, dass bei der Derivatisierung mit Naphthoylimidazol alle aliphatischen OH-Gruppen erfasst wurden. Die in diesen Untersuchungen ermittelten Massen stimmen alle mit den zuvor theoretisch berechneten überein, so dass diese Ergebnisse zusammen mit den DC-Ergebnissen und der Tatsache, dass die vier Naphthoylderivate von Linamarin, Lotaustralin, Linustatin und Neolinustatin jeweils einzeln eingespritzt im HPLC-Chromatogramm nur einen (Haupt-)Peak ergeben, als Beweis für die quantitative und vollständige Umsetzung angesehen werden können.

Beispielhaft werden untenstehend zwei Massenspektren gezeigt, *Abb.II.39a* zeigt das des Naphthoylderivates von Linamarin (monoisotopische Masse: 863,3 Da) und *Abb.II.39b* zeigt das des Naphthoylderivates von Linustatin (monoisotopische Masse: 1487,7 Da). Die Molekülpeaks der beiden Derivate sind als Anlagerungen des  $\text{Na}^+$  zu sehen und weisen daher eine um 23,0 Da erhöhte Masse auf.

Aufgenommen wurden die ESI-Q-MS-Spektren von Herrn Dr. H. Luftman, Institut für Organische Chemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster mit einem Quadrupolmassenspektrometer Quattro LC-Z der Firma MICROMASS.

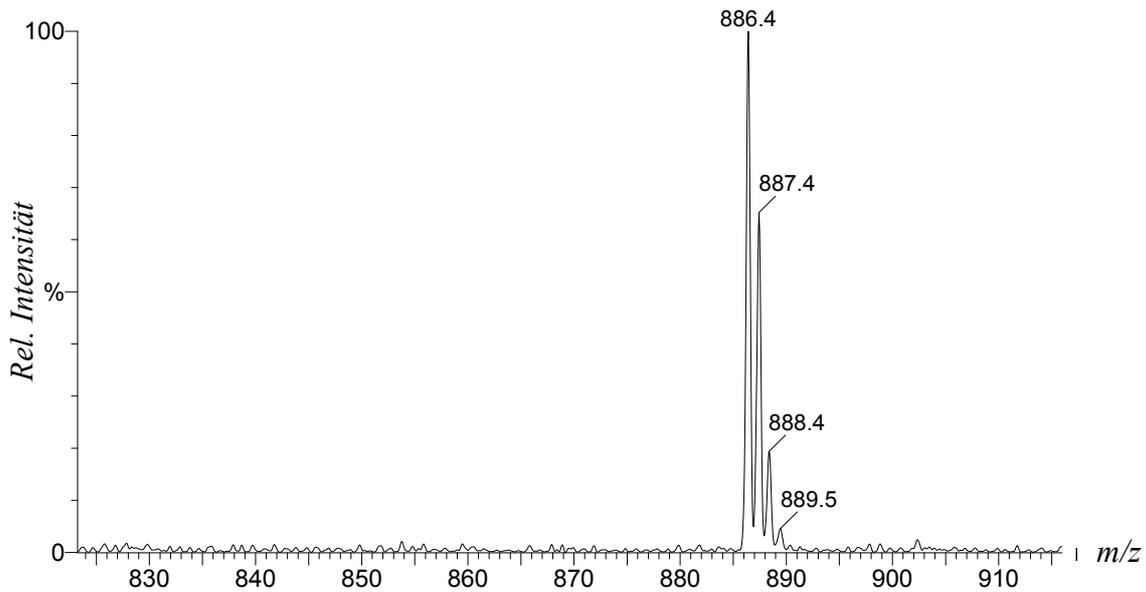


Abb.II.39a: ESI-Q-MS-Spektrum des Naphthoylderivates von Linamarin

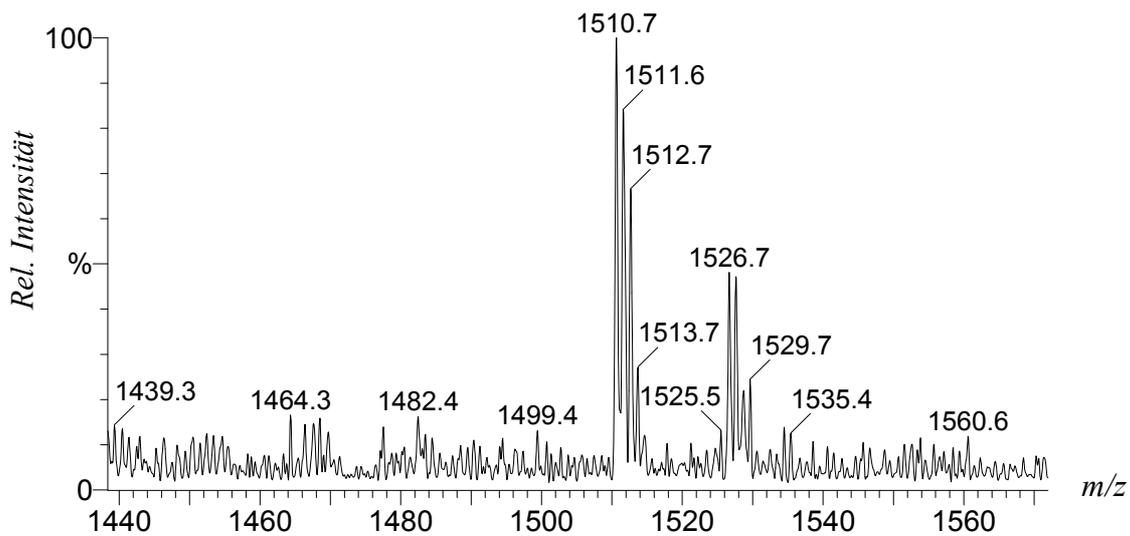


Abb.II.39b: ESI-Q-MS-Spektrum des Naphthoylderivates von Linustatin

Da in der Massenspektrometrie die Massen von Atomen und Molekülen gemessen werden und Atome häufig aus mehreren Isotopen bestehen, besitzen organische Moleküle eine charakteristische Isotopenverteilung. Jeweils der Peak mit der höchsten Intensität (886,4 Da für das Naphthoylderivat von Linamarin; 1510,7 Da für das Naphthoylderivat von Linustatin) entspricht der monoisotopischen Masse als Natriumaddukt, bei dem alle Kohlenstoffe  $^{12}\text{C}$ -Atome, alle H-Atome  $^1\text{H}$ , alle N-Atome  $^{14}\text{N}$  und alle O-Atome  $^{16}\text{O}$  sind. Beim nächsten Peak, dessen Masse um ca. 1 Da erhöht ist, ist ein  $^{12}\text{C}$  gegen ein  $^{13}\text{C}$  ausgetauscht, beim nächsten Peak finden sich bereits 2  $^{13}\text{C}$ -Atome usw. Genau genommen müssen bereits geringe Anteile von  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  und auch  $^{18}\text{O}$  berücksichtigt werden, diese

leisten allerdings wegen ihrer deutlich geringeren Häufigkeit nur einen geringen Beitrag zum Signal.

Im Spektrum des Derivates von Linustatin (s. *Abb.II.39b*) ist zusätzlich zum Molekül-Peak außerdem ein Peak zu sehen, dessen Masse um genau 16 Da erhöht ist. Die Massenanlagerung entspricht der Anlagerung eines Sauerstoffes (in Folge von Oxidation), eventuell ist also das Molekül oxidiert worden, vorstellbar wäre hier die Oxidation der Cyanogruppe an C<sub>2</sub> des Aglykons (s. *Abb.II.36b*).

## **10.4 Kapillarelektrophoretische Untersuchungen der Phthalsäure- und Naphthoylderivate von Linamarin, Lotaustralin, Linustatin und Neolinustatin**

### **10.4.1 Methodenentwicklung zur Trennung der Naphthoylderivate von Linamarin, Lotaustralin, Linustatin und Neolinustatin in der CE**

Aufgrund ihrer hohen molekularen Massen und ihrer Lipophilie stand zu Beginn der Entwicklung einer kapillarelektrophoretischen Methode zur Trennung dieser vier Derivate die Überlegung, ob diese Verbindungen überhaupt in einem wässrigen Puffersystem, auch mit Zusatz von Löslichkeitsverbessernden Additiven, analysierbar sind. Auf jeden Fall ist aber wegen des unabhängig vom pH-Wert neutralen Charakters der Naphthoylderivate von Linamarin, Lotaustralin, Linustatin und Neolinustatin der Einsatz von ionischen Pufferzusätzen erforderlich.

Da es aufgrund massiver technischer Probleme mit dem MDQ-Gerät nicht möglich war, systematisch für die verschiedenen Puffer kontinuierliche Pufferreihen (Konzentration des Puffers, pH-Wert, Zusatz verschiedener Additive in jeweils aufsteigenden Konzentrationen) zu messen, wurde darauf zurückgegriffen, verschiedene, in der Literatur bereits beschriebene Methoden für Naphthyl-, Naphthoylderivate oder ähnliche Verbindungen für das obige Trennproblem auszutesten, um eventuell durch Änderung verschiedener Parameter eine Trennung erzielen zu können.

Zunächst wurde eine Trennung mittels Einsatz von Mikroemulsion (hier: 0,81 % Octanol; 6,61 % 1-Butanol; 3,31 % SDS; 89,27 % 0,01 M Na<sub>2</sub>B<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-Puffer, zur Herstellung s. Exp. Teil unter **6.5.2**) angestrebt, denn diese Trennmethodik erlaubt das Lösen der zu trennenden Analyten in der organischen Phase der Emulsion [KLAMPFL, 2003]. Setzt man als Trennelektrolyt eine solche Mikroemulsion ein, spricht man auch von MEEKC: „Microemulsion electrokinetic chromatography“ [ALTRIA et al.; 2003, ALTRIA, 1999].

Zwar liessen sich die Naphthoyl-Derivate gut in Butanol lösen, dem organischen Bestandteil der Mikroemulsion, aber leider waren die erzielten Antrennungen bzgl. der Migrationszeiten nicht reproduzierbar und es traten auch regelmäßig Stromzusammenbrüche auf, weil sich die Emulsion kurze Zeit nach Anlegen der Spannung trennte. Die Unregelmäßigkeiten im Stromverlauf während eines Laufes konnten in diesem Fall durch gleichzeitiges Anlegen eines geringen Drucks auf das Ein- und Auslaß-Vial parallel zur angelegten Spannung behoben werden (s. Abb.II.40a und-b). Das Problem der spontanen Entmischung der beiden Phasen wenige Minuten nach Anlegen der Spannung konnte weder durch Änderung der angelegten Spannung (10 – 25 kV), noch durch Änderung der Temperatur (10 – 40° C) der Kapillare beseitigt werden. Somit wurde diese Möglichkeit zur Trennung der Naphthoylderivate nicht weiter verfolgt.

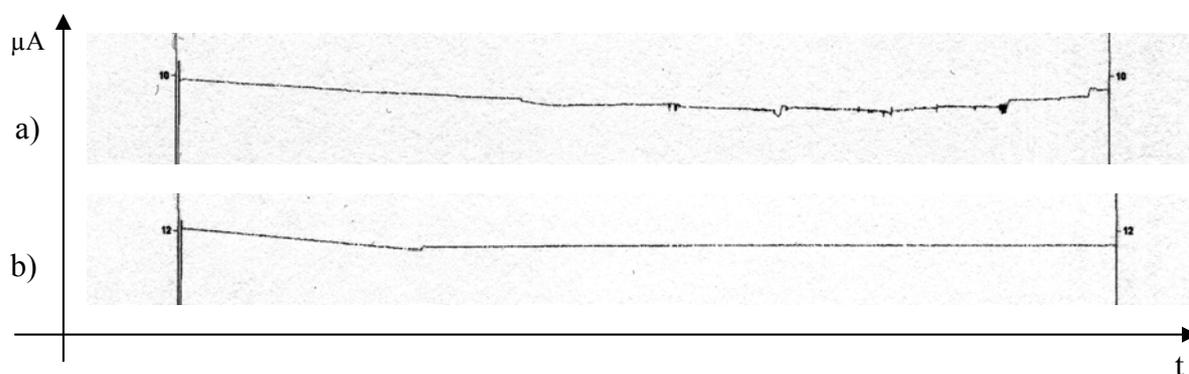


Abb.II.40a und -b: Strom ohne (a) und mit (b) parallel zur Spannung angelegtem Druck

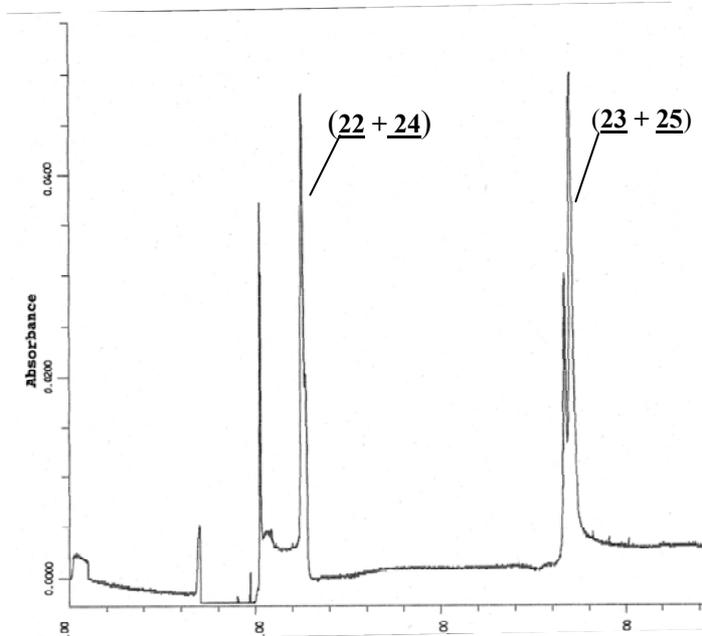
Trennbedingungen: Puffer: Mikroemulsion (s.o.), Spannung: 10 kV, Länge/ID: 60 cm, 50 µm, (Druck: 0.1 psi)

Anschließend wurde ein Phosphat-SDS-Puffer verwendet, wobei als Lösemittel anstatt H<sub>2</sub>O bidest. 90 %iger Methanol verwendet wurde. Dieser Puffer wurde bereits beschrieben für die Trennung verschiedener nicht-ionischer, organischer Verbindungen [FRITZ und LI, 1999]. Leider zeigte auch dieser Puffer keine vielversprechende Antrennung.

Daraufhin wurde ein herkömmlicher 20 mM Natriumtetraborat-Puffer unter Zusatz von 30 % Tetrahydrofuran (THF) getestet, da eine Beschreibung dieses Puffers für die Trennung von Phthalsäure-Derivaten von Oligosaccchariden und Polyethylenglykolen vorlag [VANHOENACKER et al., 2001]. Dies sind Verbindungen, die ein ähnliches Molekulargewicht und eine ähnliche Hydrophobizität wie die vorliegenden Naphthoylderivate der Cyanglykoside aufweisen. Lediglich wurden hier verschiedene Pufferadditive zugesetzt, da die Naphthoylderivate als Neutralteilchen keine eigene elektrophoretische Mobilität besitzen. Sowohl SDS und Taurodesoxycholol (TDC) als negativ geladene Mizellbildner als auch sulfatiertes β-Cyclodextrin wurden ausgetestet, in

unterschiedlichen Konzentrationen und bei verschiedenen Spannungen. Auch hier wurde aufgrund des hohen Anteils an organischem Modifier parallel zur Spannung immer auf die beiden Vials des Trennelektrolyten Druck angelegt. Da das MDQ-Gerät während dieser Methodenentwicklung leider vollständig ausfiel, wurde versucht, die Methode auf das P/ACE-Gerät zu übertragen. Mit Zusatz von 25 mM TDC ließ sich auch hier eine Auftrennung der Mono- von den Diglykosiden erzielen, jedoch keine Antrennung der beiden Mono- bzw. Diglykoside untereinander. Es ist auch fraglich, ob dies überhaupt möglich ist, da sich die Naphthoylderivate der beiden Mono- und der beiden Diglykoside jeweils nur um eine Methylgruppe unterscheiden (s. *Abb.II.36a und-b*) und es zweifelhaft ist, ob dieser sehr kleine Strukturunterschied für eine Trennung per CE ausreicht.

Die folgende Darstellung (s. *Abb.II.41*) zeigt die Auftrennung der Mono- von den Diglykosiden. Mit der bis hier entwickelten Methode besteht also die Möglichkeit der Gruppentrennung und folglich im weiteren auch deren Quantifizierung, jedoch können nicht Linamarin, Lotaustralin, Linustatin und Neolinustatin einzeln bestimmt werden. Die im Elektropherogramm erkennbar unruhige Basislinie ist vermutlich auf den hohen Anteil organischer Lösemittel im Trennpuffer zurückzuführen. Diese Schwankungen traten am MDQ-Gerät beim Anlegen von Druck während der Trennung nicht auf. Im Gegensatz zum MDQ-Gerät kann beim P/ACE 5510 kein Druck parallel zur Spannung angelegt werden.



*Trennbedingungen:*

*Puffer:* 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>2</sub>O<sub>7</sub>,

30 % THF, 25 mM TDC

*Spannung:* 30 kV

*Detektion:* 234 nm

*Länge/ID:* 50/57 cm, 50 µm

*Injektion:* je 3s Naphthoyl-

derivat von Linamarin

(22)/ Lotaustralin (24)

und Linustatin (23)/

Neolinustatin (25)

*Abb.II.41: Trennung der naphthoylierten. Mono- (22 + 24) und Diglykoside (23 + 25)*

Auch hier wurde die Zuordnung der Peaks, wie in allen anderen Fällen auch, über Additionsexperimente und den Vergleich der Elektropherogramme der einzeln injizierten derivatisierten Reinsubstanzen mit denen der Mischungen mehrerer Derivate getroffen.

Der Peak unmittelbar vor den Diglykosiden (**23** + **25**) stammt von mitderivatisierten Verunreinigungen der zur Methodenentwicklung eingesetzten Vergleiche.

#### **10.4.2 Methodenentwicklung zur Trennung der Phthalsäurederivate von Linamarin, Lotaustralin, Linustatin und Neolinustatin in der CE**

Da die Methodenentwicklung für die kapillarelektrophoretische Trennung der für die HPLC ausgesuchten Derivatisierungsprodukte mit Naphthoylimidazol aufgrund ihrer extrem schlechten Wasserlöslichkeit große Probleme bereitete, wurde parallel eine alternative Derivatisierung für aliphatische OH-Gruppen mit Phthalsäureanhydrid [WELLONS et al.; 1980, VANHOENACKER et al., 2001] erprobt. Wie bereits eingangs erwähnt, bietet diese Methodik gegenüber der Derivatisierung mit Naphthoylimidazol den für die Trennung per CE entscheidenden Vorteil, außer einem Chromophor gleichzeitig eine ionische Gruppe einzuführen, so dass u.U. auf den Einsatz von ionischen Pufferadditiven verzichtet werden kann. Der in dieser Veröffentlichung für die Trennung von derivatisierten Polyethylenglykolen (PEGs) beschriebene Trennelektrolyt (200 mM  $\text{Na}_2\text{BO}_4$ -Puffer) führte hier nicht zu einer Trennung der Phthalsäure-Derivate von Linamarin, Lotaustralin, Linustatin und Neolinustatin, sondern lediglich zu einer Antrennung der Mono- von den Diglykosiden. Allerdings konnte bei Verwendung eines deutlich niedriger konzentrierten Boratpuffers unter Zusatz von Tetrahydrofuran (20 mM  $\text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_7$ -Puffer, 30 % THF) eine Auftrennung der Mono- von den Diglykosiden erzielt werden (s. *Abb.II.42*).

Auch hier konnte weder durch eine Änderung der angelegten Spannung, noch durch Änderung der Konzentration des Boratpuffers oder des Anteils verschiedener organischer Modifier (außer THF noch Methanol, Acetonitril) und auch nicht durch den Zusatz von SDS, TDC,  $\beta$ -CD oder sulfatiertem  $\beta$ -CD eine Antrennung der Mono- oder der Diglykoside untereinander erreicht werden. Auch die Phthalsäureester der Mono- bzw. Diglykoside unterscheiden sich bei ihrem relativ hohen Molekulargewicht nur in einer Methylgruppe (s. *Abb.II.34*).

Dies erhärtet den bereits unter **1.4.1** im Zuge der Methodenentwicklung für die Trennung der Naphthoylderivate geäußerten Verdacht, dass es für eine Trennung von Verbindungen mit derart geringen Massen- bzw. Strukturunterschieden geeigneter analytische Möglichkeiten gibt als die CE. Ein Beispiel für eine gelungene Trennung der Monoglykoside ist die im nächsten Kapitel beschriebene Trennung der Naphthoylderivate von Linamarin und Lotaustralin per HPLC.

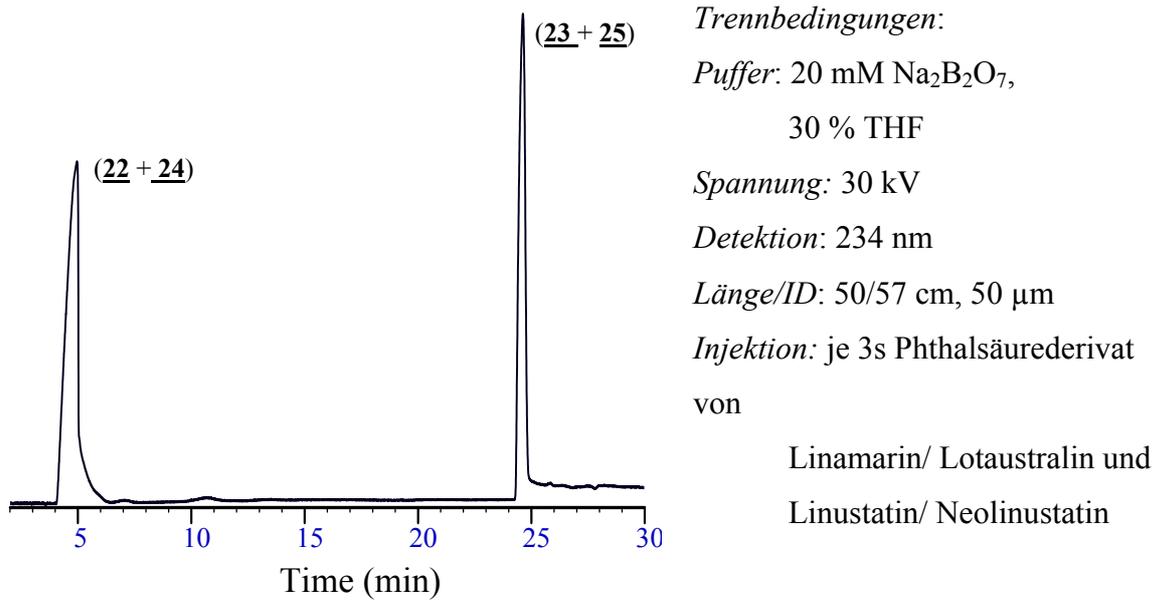


Abb.II.42: Trennung der Phthalsäure-derivatisierten Mono- (22 + 24) von den Diglykosiden (23 + 25)

Es wurde des Weiteren die Trennung der Phthalsäureester mittels Einsatz kationische Tensiden ausgetestet. Der erste Einsatz kationischer Tenside wurde erstmals von OTSUKA et al. beschrieben [OTSUKA et al., 1985]. Sie adsorbieren an den dissoziierten negativen Silanolgruppen der Kapillarenwand, so dass bei einer Erhöhung der Konzentration über die zur Absättigung der dissoziierten Silanolgruppen erforderliche hinaus der EOF umgekehrt wird. Folglich wird bei dieser Arbeitsweise die Polarität der Elektroden umgekehrt und die Probenaufgabe erfolgt am kathodischen Ende und die Detektion am anodischen Ende [DWORSCHAK, 2000]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) als kationisches Tensid eingesetzt. Da die zu trennenden Analyten im alkalischen Milieu negativ geladen vorliegen, wurden als Basistrennelektrolyt sowohl Natriumtetraborat- als auch Heptansulfonsäurepuffer jeweils in unterschiedlichen Konzentrationen gewählt. Der pH-Wert dieser Trennelektrolyten liegt bei 9-10, in diesem Bereich ist die (kritische Mizellbildende Konzentration (CMC) von CTAB mit 0,75 mmol/l [DWORSCHAK, 2000] relativ gering. Probleme bereitete allerdings die außerordentlich schlechte Löslichkeit des CTABs bei Raumtemperatur. Sie liegt gemäß Herstellerangaben bei 20 ° C in reinem Wasser bei 9 mmol [MERCK-KATALOG, 2003]. Für die Trennung wäre aber eine wesentliche höhere Konzentration notwendig. Aufgrund massiver Gelbildung schon ab Konzentrationen von 20 mmol und daraus resultierender

Probleme im routinemäßigen Arbeiten mit diesem Puffer wurde dieses Verfahren nicht weiter verfolgt.

### **10.5 HPLC-Methode zur Quantifizierung der aliphatischen Cyanglycoside Linamarin, Lotaustralin, Linustatin und Neolinustatin nach Derivatisierung mit Naphthoylimidazol**

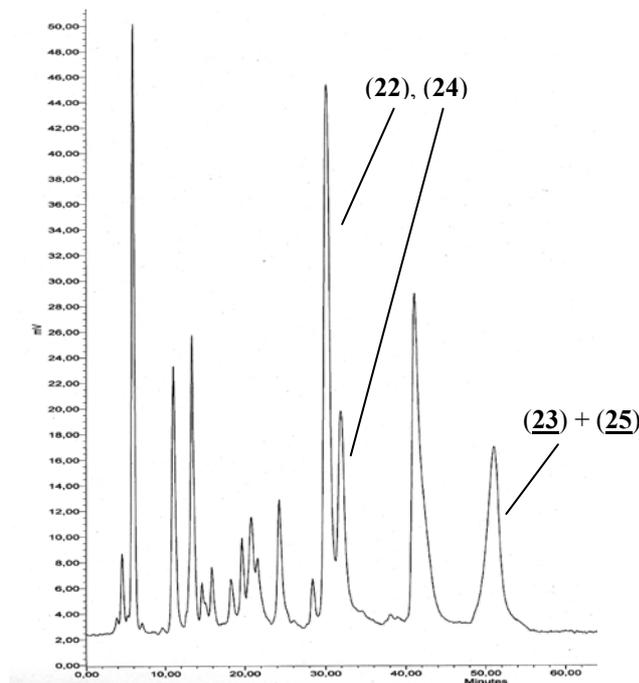
Für die aliphatischen Cyanglykoside Linamarin, Lotaustralin, Linustatin und Neolinustatin wurde nach Derivatisierung dieser Glykoside mit Naphthoylimidazol eine HPLC-Methode entwickelt. Durch die Einführung der fluorogenen Naphthoylgruppe bietet sich hier neben der UV-Detektion auch die Fluoreszenzdetektion an. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass durch die Derivatisierung alle Analyten dasselbe UV-Absorptionsverhalten aufweisen und somit alle Analyten bei derselben Wellenlänge in ihrem Maximum erfasst werden (s. *Abb.II.47*).

In der Literatur wurde die Methode angewendet zur Bestimmung von zwölf Hexosen [IKEMOTO et al., 1992]. Diese unterscheiden sich im Gegensatz zu den hier umgesetzten Glykosiden jedoch in der sterischen Anordnung ihrer Hydroxylgruppen. Das vorliegende Trennproblem stellt also insofern eine Herausforderung dar, da sowohl die beiden Monoglykoside Linamarin und Lotaustralin und als auch die beiden Diglykoside Linustatin und Neolinustatin untereinander jeweils dieselbe sterische Anordnung der Naphthoylgruppen zeigen. Es bestehen also nur minimale Unterschiede in der Lipophilie bzw. Lösungseigenschaften, die durch den  $\alpha$ -ständigen Methyl- bzw. Ethylrest hervorgerufen werden (s. *Abb.II.34a und -b* und *Abb.II.36a und -b*), um eine Trennung zu erzielen.

Zunächst wurde gemäß der Literaturangabe [PHILLIPS et al., 1995] eine isokratische Trennung der derivatisierten Substanzen an einer RP-18 Säule angestrebt, wobei sich zwar erwartungsgemäß die Mono- von den Diglykosiden, nicht jedoch die beiden Mono- bzw. Diglykoside voneinander trennen ließen. Es wurden im Weiteren verschiedene andere Phasen ausgetestet, sowohl verschiedene RP-18-Phasen als auch RP-Phasen mit unterschiedlichen Kohlenstoffkettenlängen (C8-, C4- oder C2-Reste), ebenso wurden substituierte Säulen zur Trennung herangezogen, u.a. mit Phenyl- oder Cyanogruppen als Substituenten der eingesetzten Matrix. Alle verwendeten Säulen wiesen einen ID von 4 mm auf. Das Auflösungsvermögen in der HPLC ist in einem sehr hohen Masse vom ID der eingesetzten Säule abhängig. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht untersucht werden,

ob durch Verwendung der oben beschriebenen Packungsmatrizes bei verringertem ID der Säulen eine Auftrennung hätte erzielt werden können.

Die Wahl fiel schließlich auf eine Nucleosil-300-5-C4-Säule (150 x 4 mm). Zunächst wurde versucht, die vier zu analysierenden Cyanglykoside mittels eines einfachen Methanol-Wasser-Gradienten zu trennen. Hier konnte zwar eine Antrennung der Monoglykoside erzielt werden, nicht jedoch der Diglykoside (s. *Abb.II.43*).



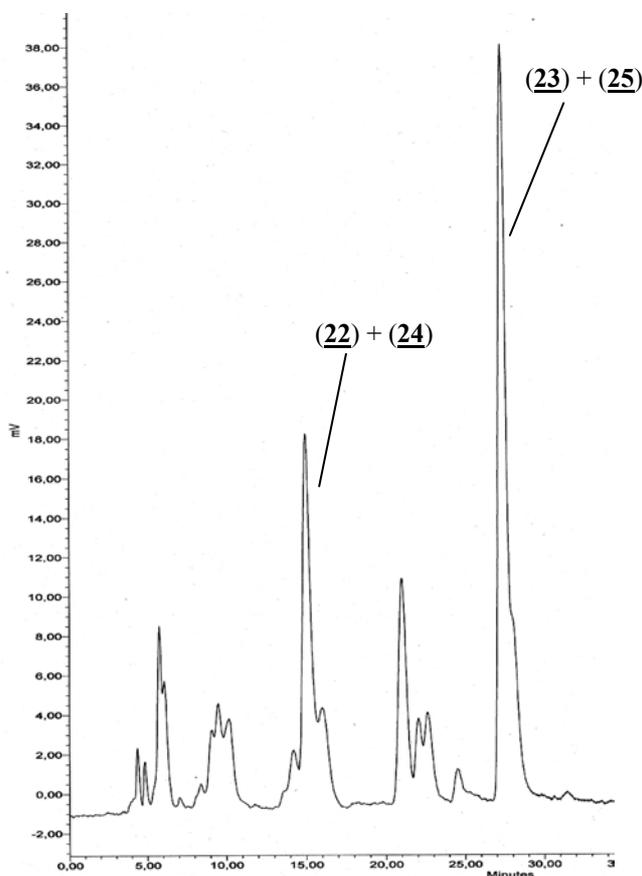
*Säule:* Nucleosil 300-5-C4, 150 x 4 mm  
*Flow:* 0,5 ml/min  
*Gradient:* MeOH /H<sub>2</sub>O (s. Ex.-Teil, 6.2.1)

*Abb.II.43:* Antrennung der Naphthoylderivate von Linamarin (22), Lotaustralin (24), sowie Linustatin (23) und Neolinustatin (25) in einem Signal

Die *Abb.II.43* nicht zugeordneten Peaks stammen von mitderivatisierten Verunreinigungen der Vergleiche. Zur Methodenentwicklung wurden aufgrund des begrenzten Vorhandenseins wirklich reiner Vergleiche isolierte Cyanglykosid-Fractionen mit Verunreinigungen bis zu 15 oder sogar 20 % eingesetzt. Das Gleiche gilt auch für die im weiteren Verlauf der Methodenentwicklung gezeigten Chromatogramme (s. *Abb.II.44* und *Abb.II.45*).

Um auch noch die beiden Derivate von Linustatin und Neolinustatin zu trennen, wurde versucht, die Methode, auch hinsichtlich der Analysendauer, durch den Einsatz anderer Lösemittel zu verbessern. Zuerst wurde der Einsatz von stark die Polarität beeinflussenden Lösemitteln wie Isopropanol getestet. Dabei wurde zwar die Analysenzeit deutlich verbessert, jedoch ließen sich bei diesem Zusatz noch nichteinmal mehr Linamarin und

Lotaustralin trennen, außerdem konnten immer noch nicht die Diglykoside Linustatin und Neolinustatin angetrennt werden (s. *Abb.II.44*).



*Säule:* Nucleosil 300-5-C4, 150 x 4 mm

*Flow:* 0,5 ml/min

*Gradient:* MeOH/H<sub>2</sub>O/Isopropanol  
(s. Ex.-Teil, 6.2.2)

*Abb.II.44:* Antrennung der Naphthoyl-derivatisierten Monoglykoside Linamarin (22) und Lotaustralin (24) von den Diglykosiden Linustatin (23) und Neolinustatin (25)

Das gradielle Zumischen von Acetonitril führte zu einer Verbesserung der Laufzeit um ca. 10 % und Linamarin und Lotaustralin konnten durch den Zusatz von Acetonitril Basislinien-getrennt werden. Durch Zusatz von Trifluoressigsäure (TFA) und Tetrahydrofuran (THF) konnten weder die Signalschärfe noch die Trennung sichtbar verbessert werden. Jedoch konnten auch hier Linustatin und Neolinustatin nicht ansatzweise getrennt werden, wohl aber konnte ihr Signal deutlich von den unerwünschten Nebenpeaks abgetrennt werden, die wie bereits erwähnt, vom Einsatz nicht völlig reiner Vergleichssubstanzen herrührten. Somit erlaubt die hier entwickelte Methode die Quantifizierung von Linamarin und Lotaustralin, sowie die Summenbestimmung der beiden Diglykoside Linustatin und Neolinustatin. Die folgende Abbildung (s. *Abb.II.45*) zeigt die entwickelte Methode zur Trennung der vier Naphthoyl-derivatisierten,

aliphatischen Cyanglykoside Linamarin, Lotaustralin, Linustatin und Neolinustatin mit Zusatz des internen Standards Erythrol.

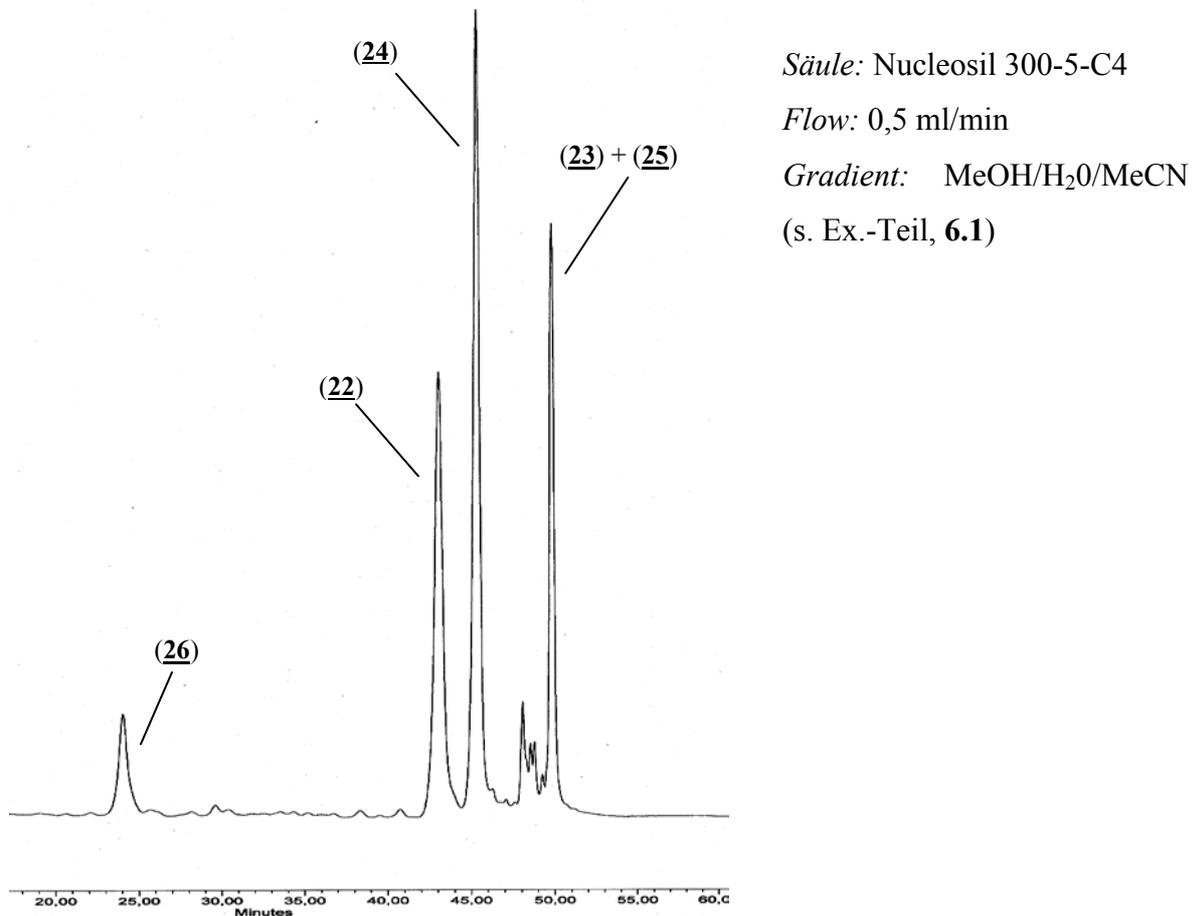
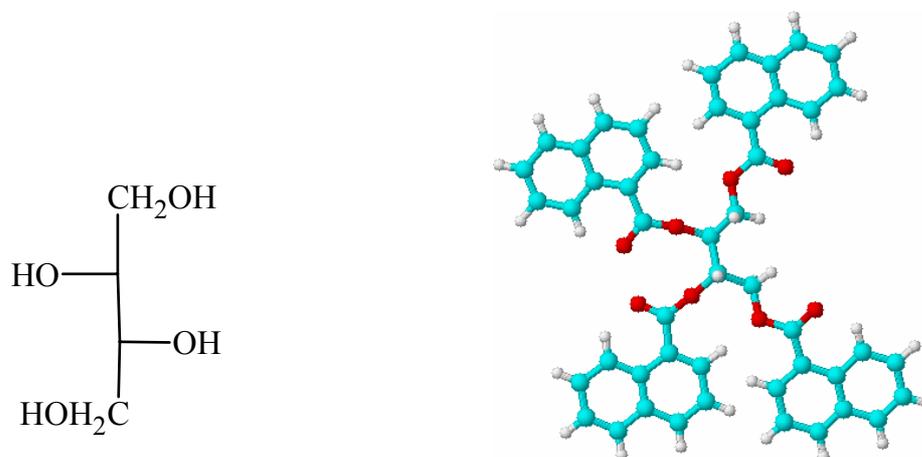


Abb.II.45: Trennung der Naphthoylesterivate von Linamarin (22), Lotaustralin (24), Linustatin (23) und Neolinustatin (25), Erythrol als ISTD (26)

## 10.6 Wahl des internen Standards

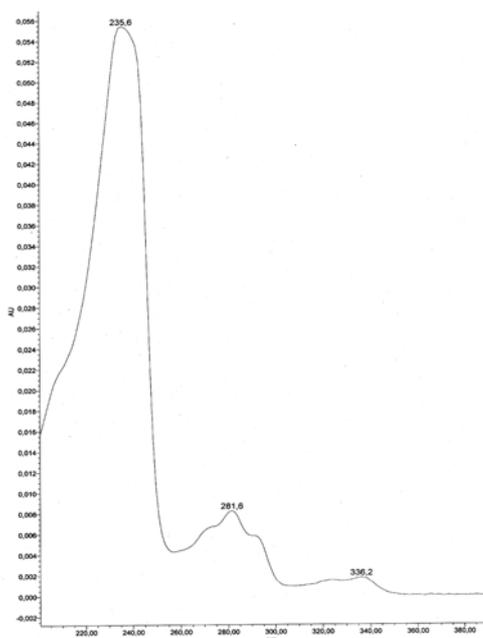
Für die entwickelte HPLC-Methode wurde Erythrol (nach Derivatisierung) als interner Standard gewählt. Die dahinterstehende Vorüberlegung war die, dass Erythrol ebenso wie die beiden Monoglykoside vier OH-Gruppen besitzt, jedoch keinen aliphatischen Rest, so dass sich das Naphthoylesterivat von Erythrol deutlich in seiner Retentionszeit von den Derivaten von Linamarin und Lotaustralin unterscheiden musste. Das Naphthoylester-Derivat von Erythrol wird vor den zu quantifizierenden Analyten eluiert.

Zur Veranschaulichung der Molekülgröße und der sterischen Anordnung der Naphthoylreste wird auch dieses Derivat, ebenso wie bereits oben (s. *Abb.II.34a und -b* und *Abb.II.36a und -b*) die verschiedenen Derivate von Linamarin, Lotaustralin, Linustatin und Neolinustatin, nachstehend dreidimensional dargestellt.



*Abb.II.46: meso-Erythrol, Naphthoyl-Derivat von Erythrol (26)*

Im Folgenden ist das UV-Spektrum des internen Standards nach der Derivatisierung mit Naphthoylimidazol dargestellt (s. *Abb.II.47*). Sein Verlauf ist identisch mit dem der Spektren der Derivate von Linamarin, Lotaustralin, Linustatin und Neolinustatin, so dass alle zu bestimmenden Verbindungen bei dieser Methode bei jeder Wellenlänge in derselben Intensität erfasst werden.



Absorptionsmaximum: 238 nm

Nebenmaximum: 284 nm

*Abb.II.47: UV-Spektrum des Naphthoyl-Derivats von Erythrol*

## 11 Validierung der HPLC-Methode

### 11.1 Spezifität

Die Spezifität der entwickelten Methode wurde durch Additionsexperimente und Vergleich der Chromatogramme der einzelnen derivatisierten Reinsubstanzen mit den Chromatogrammen der Extrakte sichergestellt. Ein Teil der Quantifizierungen erfolgte mittels Standardzusatzverfahren (SZV), d.h. bei gleich bleibender Menge an zugegebenem Standard werden dem zu untersuchenden Extrakt steigende Konzentrationen der zu bestimmenden Substanz zugesetzt. Dieses Verfahren unterstreicht die Richtigkeit der zu validierenden Methode. Da es bei der Untersuchung von Maniok-Extrakten zunächst darum ging, die quantitative Extraktion von Linamarin und Lotaustralin sicherzustellen, wurde für diese Experimente aus Kostengründen auf die Durchführung eines SZVs verzichtet und der Gehalt der extrahierten cyanogenen Glykoside nur über die zuvor ermittelte Kalibrationsgerade berechnet.

In allen anderen Fällen wurden die über die Kalibriergerade ermittelten Gehalte an Cyanglykosiden in den zu untersuchenden Pflanzenextrakte mit denen aus den zugehörigen SZV-Experimenten verglichen.

### 11.2 Kalibration

Mit Hilfe von 6 Referenzlösungen wurde die unter 1.3 entwickelte Methode im Bereich von 5 ng/ml bis 60 µg/ml für Linamarin kalibriert. Die Gehalte der anderen zu bestimmenden Analyten, Lotaustralin, Linustatin und Neolinustatin, werden als Linamarin berechnet angegeben.

Den Kalibrierlösungen wurde als interner Standard jeweils eine konstante Menge des Naphthoylderivats von Erythrol zugesetzt.

Jede Kalibrierlösung wurde fünfmal analysiert und es wurden die Quotienten der jeweiligen korrigierten Peakflächen (CPA) der Analyten und des internen Standards (ISTD) gebildet. Die Kalibrierfunktion wurde erhalten, indem die arithmetischen Mittelwerte dieser Flächenverhältnisse aus den jeweils fünf Einzelmessungen gegen die Konzentrationsverhältnisse der Naphthoylderivate von Linamarin und Erythrol (ISTD) aufgetragen wurden (*Abb.II.48*).

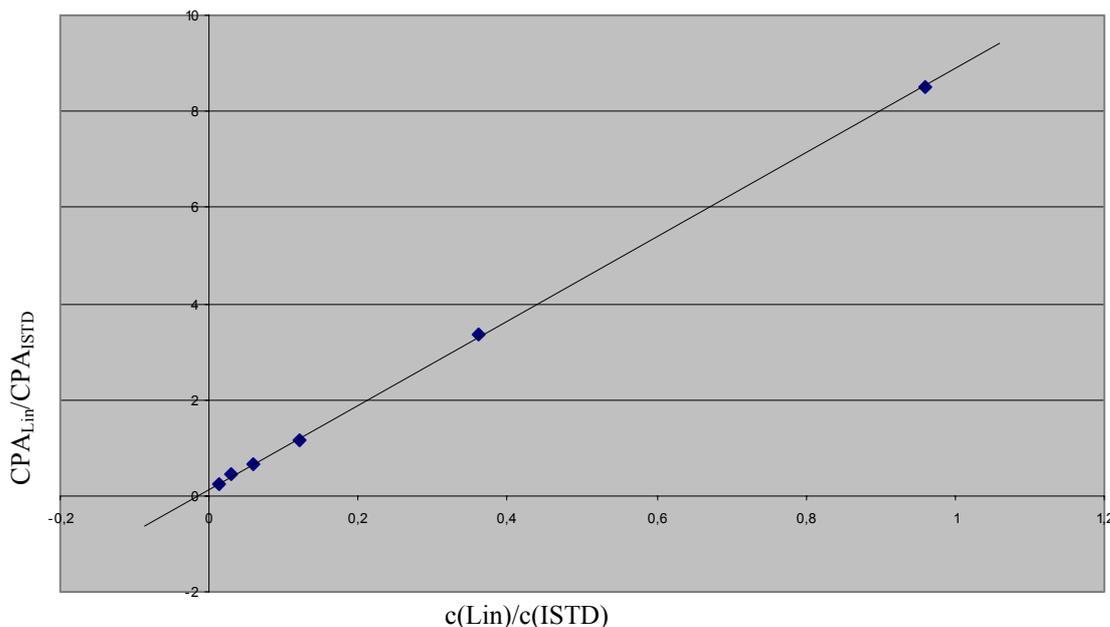


Abb.II.48: Kalibrationsgerade von Linamarin (Naphthoyl-Derivat)

$$\text{Geradengleichung: } y = 8,744x + 0,1483, r^2 = 0,9998$$

### 11.3 Bestimmungs- und Nachweisgrenze

Die Bestimmungsgrenze (Limit of Quantification, LOQ) der Methode wurde für Linamarin mit 50 pg/ml festgelegt, basierend auf einem Signal-Rausch-Verhältnis von 9:1. Bei diesen Konzentrationen können noch akzeptable Präzisions- und Richtigkeitswerte bestimmt werden.

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD) liegt für Linamarin bei 25 pg/ml, basierend auf einem Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1 [KROMIDAS, 1999].

Diese Angaben beziehen sich auf die Auswertung mit dem an die HPLC-Anlage angeschlossenen PDA-Detektor, würde nur der Fluoreszenz-Detektor berücksichtigt, läge die Nachweisgrenze um den Faktor 20 unter der hier angegebenen.

### 11.4 Richtigkeit und Präzision der Kalibrierung

Richtigkeit und Präzision (zur Definition dieser Begriffe s. Allg. Teil 3.2.3.4) der entwickelten Methode wurden sowohl „intraday“ als auch „interday“ bestimmt. Hierzu wurde unter Verwendung stets frisch hergestellter Stammlösungen des Naphthoyl-Derivats von Linamarin vier Lösungen bekannten Gehalts auf verschiedenen Konzentrationsniveaus, die den gesamten Arbeitsbereich abdecken (0,10 ng/ml, 0,50 ng/ml, 1,25 ng/ml, 2,50 ng/ml) hergestellt, mit der entsprechenden Menge an internem

Standard (6,25 ng/ml) versetzt und jeweils dreimal analysiert. Weitere Einzelheiten zur Bestimmung von Richtigkeit und Präzision der entwickelten Methode sind dem Experimentellen Teil unter 6.4 zu entnehmen.

Es wurde auf das separate Herstellen von Referenzlösungen für jedes einzelne Konzentrationsniveau verzichtet, jedoch wurde für jeden Tag eine neue Derivatisierung von Linamarin und Erythrol durchgeführt. Es wurde als ausreichend angesehen, aus jeder Probe fünfmal zu injizieren.

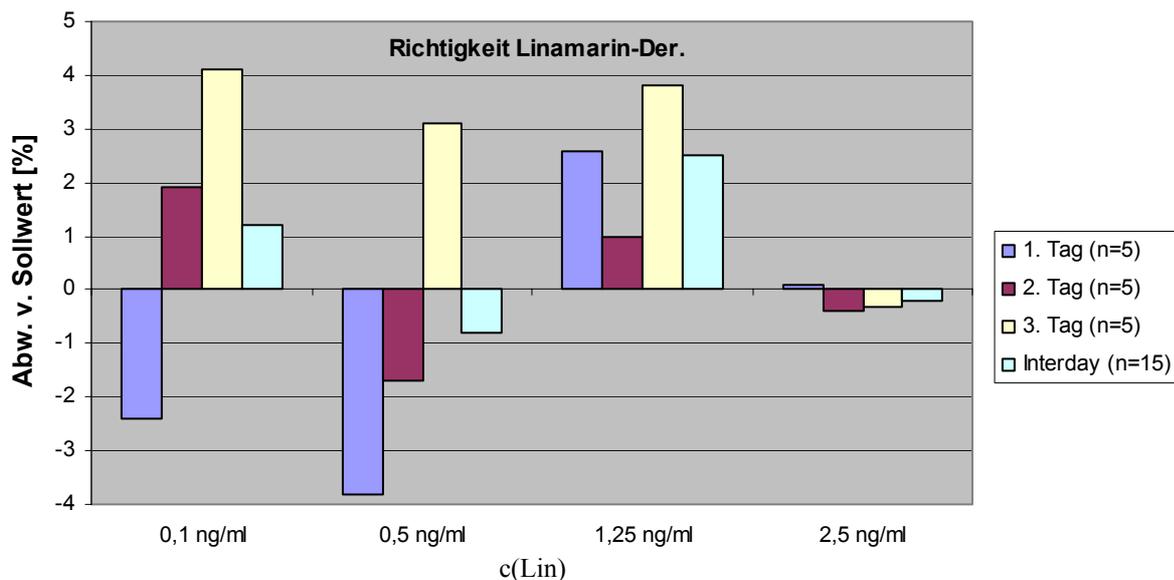


Abb.II.50a: Validierungsdaten für Linamarin

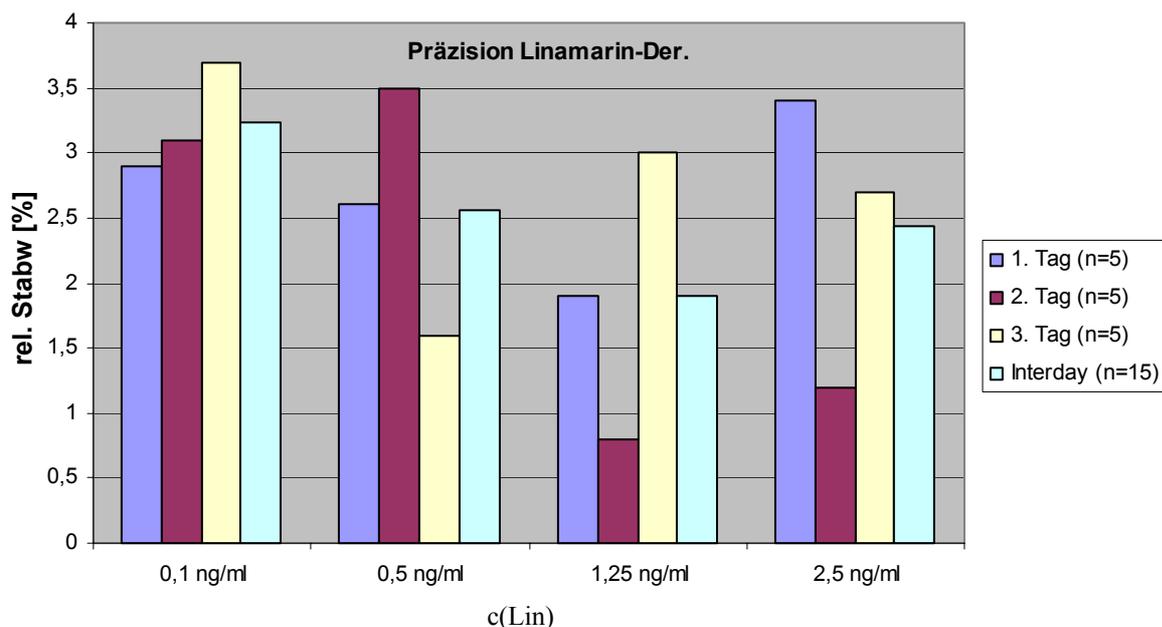


Abb.II.50b: Validierungsdaten zu Linamarin

Zur Bestimmung der interday-Richtigkeit und -Präzision wurde das Verfahren insgesamt dreimal an drei verschiedenen Tagen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Balkendiagrammen (*Abb.II.50a und -b*) zusammenfassend dargestellt.

Die Richtigkeit liegt für Linamarin zwischen 96,2 % und 104,1 %. Die Präzision, ausgedrückt durch den Variationskoeffizienten (= relative Standardabweichung) der Einzelmessungen, lag bei den oberen Konzentrationsstufen stets unter 3,5 %. An der LOQ wurden 3,7 % nicht überschritten.

Somit entspricht die entwickelte Methode voll den im Allgemeinen Teil unter **3.2.3.4** formulierten Anforderungen an Richtigkeit und Präzision.

## **12 Bestimmung von Linamarin, Lotaustralin, Linustatin und Neolinustatin in Pflanzenextrakten**

Mit Hilfe der vorstehend entwickelten Methode wurden Pflanzenextrakte verschiedener cyanogener Pflanzen analysiert und somit weitere Validierungsdaten erhoben. Vier Extrakte wurden per Standardzusatzverfahren (SZV) analysiert, d.h. es wurden fünf Lösungen des Pflanzenextraktes vorbereitet, denen nach Zugabe einer konstanten Menge an Internem Standard steigende Mengen Linamarin (nach Derivatisierung) zugegeben wurde. Diese Vorgehensweise hat zum einen die Spezifität der Methode bestätigt, außerdem konnte so gezeigt werden, dass die entwickelte und bereits auf Richtigkeit und Präzision überprüfte Methode unanfällig ist für Matrixeffekte, zum Beispiel durch weitere Bestandteile des Pflanzenmaterials. Somit liefert das SZV einen weiteren Beitrag zur Überprüfung der Richtigkeit dieser Methode und zur Wiederfindung.

Untersucht wurden handelsübliche Proben von Leinsamen, Limabohnen und Maniok aus Vietnam, Thailand und Brasilien. In Übereinstimmung mit der Literatur konnte an den drei Beispielen für Maniok gezeigt werden, wie stark sich die Gehalte an Linamarin und Lotaustralin in Maniok voneinander unterscheiden [Franke, 1997]. Trotz der unterschiedlichen Gehalte an Linamarin und Lotaustralin liegen diese Werte alle noch in einem Bereich, der darauf schließen läßt, dass es sich in allen Fällen um süßen Maniok (enthält deutlich weniger cyanogene Glykoside als bitterer) handelt. Die Maniok-Knollen aus Vietnam stammen von einem städtischen Wochenmarkt aus Ho-Chi-Minh-City, die aus Thailand stammen aus einem Supermarkt aus Bangkok und die Maniok-Knollen aus Brasilien stammen von einem brasilianischen Markt in Maringá.

## 12.1 Bestimmung von Linustatin und Neolinustatin in Leinsamen

Wie im Experimentellen Teil unter 2.4.2.1 beschrieben, wurde der Leinsamen gefriergetrocknet und hieraus ein methanolischer Extrakt hergestellt. In Voruntersuchungen wurde zunächst der ungefähre Gehalt an Linustatin und Neolinustatin über die Peakintensität abgeschätzt und danach die Probe mittels Standardzusatzverfahren analysiert.

Abb.II.49 zeigt ein typisches HPLC-Chromatogramm eines Leinsamen-Extraktes.

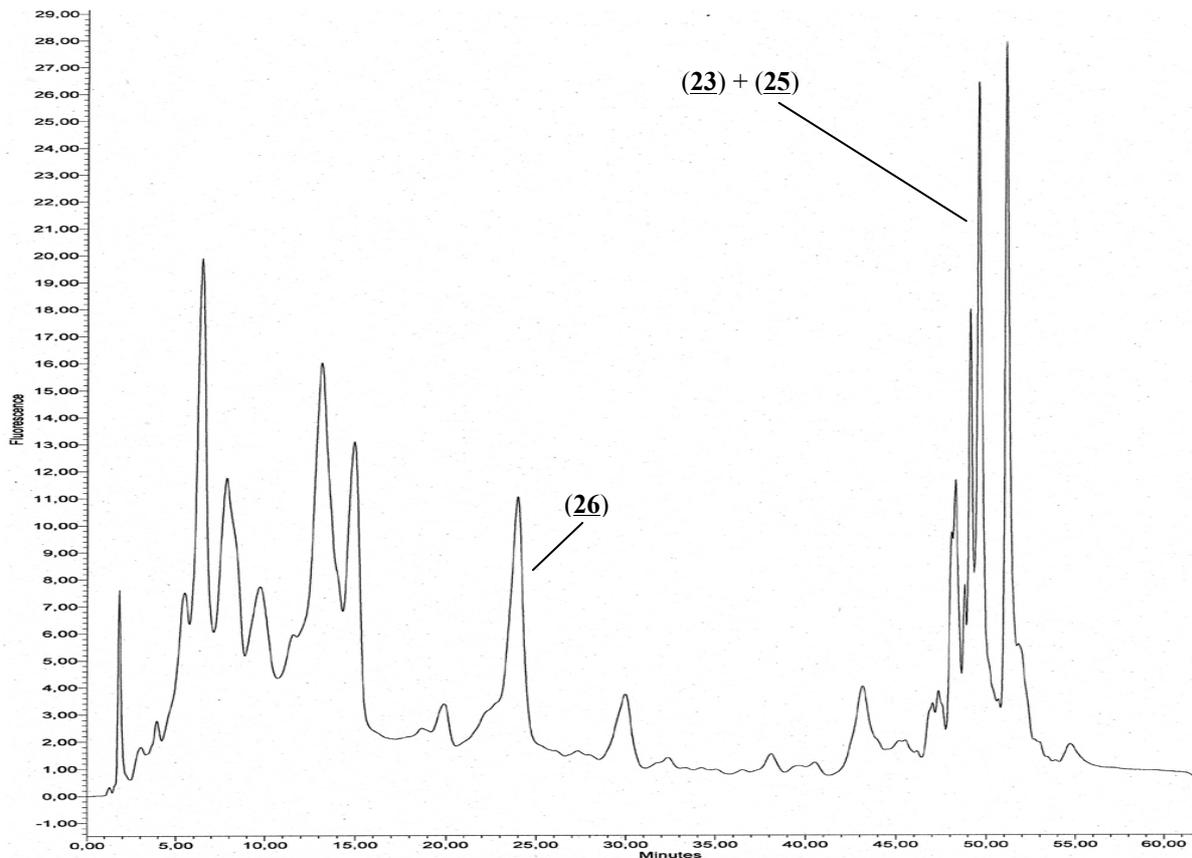


Abb.II.49: Leinsamen – Extrakt nach Naphtoyl-Derivatisierung mit ISTD (26), sowie Linustatin (23) und Neolinustatin (25) in einem Signal

Trennbedingungen: s. Abb.II.45, Injektion: 50 µl Extrakt 1:1000, 50 µl ISTD 1:1000

Untersuchung des Leinsamen-Extraktes:

Untersuchungsobjekt	Gehalt an Linu. + Neo. [mg/100g TM] nach SZV	Gehalt an Linu. + Neo. [mg/100g TM] über Kalib.Gerade	Geradegleichung des SZV
Leinsamen	16,83	17,11 (+ 1,7 %)	$y = 7,6989x + 1,5137$ $r^2 = 0,9994$

Tab.II.10: Gehalt an Linustatin und Neolinustatin, berechnet als Linamarin, in Leinsamen

Angegeben ist jeweils der Gehalt an cyanogenen Glykosiden bezogen auf die Trockenmasse (TM), d.h. das gefriergetrocknete Material. Die genauen Daten zur Berechnung ebenso wie die Darstellung der einzelnen Geraden zu den verschiedenen analysierten Extrakten sind dem Experimentellen Teil unter **6.5** zu entnehmen.

## 12.2 Bestimmung von Linamarin und Lotaustralin in Pflanzenextrakten

Zur Bestimmung von Linamarin und Lotaustralin in Pflanzenextrakten wurden folgende Pflanzen untersucht: Maniok aus Brasilien, Thailand und Vietnam und Limabohnen.

Maniok wird in Südostasien und Südamerika verwendet zur Herstellung von Mehl (Tapioka), wird aber teilweise auch gekocht als kohlenhydrathaltiges Gericht verzehrt.

Limabohnen werden als Hülsenfrüchte in Südamerika aufgrund ihres Protein- und Kohlenhydratgehaltes gegessen. Alle zu analysierenden Pflanzenteile (Knollen von Maniok, Samen der Limabohne) wurden zunächst gefriergetrocknet, danach zu methanolischen Extrakten weiterverarbeitet und anschließend analysiert (s. *Tab.II.11*).

Im Falle von Maniok wurden verschiedene Extraktionsverfahren ausgetestet mit unterschiedlichen Anteilen von Ethylacetat zum Extraktionsmittel Methanol. Diese Versuche wurden durchgeführt, um sicherzustellen, dass die glykosidischen Verbindungen Linamarin und Lotaustralin neben einem sehr hohen Anteil an Stärke quantitativ extrahiert wurden, ohne aber die anwesende Stärke auch zu extrahieren. Diese würde bei der sich an diesen Schritt anschließenden Derivatisierung ebenfalls umgesetzt werden und so die Quantifizierung erschweren, wenn nicht sogar unmöglich machen würde. Für diese Experimente wurde zur Ermittlung des extrahierten Linamarin- und Lotaustralin-Gehaltes kein Standardzusatzverfahren angewendet, die Gehalte wurden hier über die unter **11.2** erstellte Kalibrationsgerade berechnet.

<i>Untersuchungsobjekt</i>	<i>Gehalt an Lin. + Lot. [mg/100g TM] nach SZV</i>	<i>Gehalt an Lin. + Lot. [mg/100g TM] über Kalib.-Gerade</i>	<i>Geradengleichung des SZV</i>
Limabohne	28,8	30,0 (+ 4,2 %)	$y = 8,0564x + 1,8213$ $r^2 = 0,9998$
Maniok (Thailand)	0,136	0,145 (+ 6,1 %)	$y = 7,9896x + 3,4655$ $r^2 = 0,9994$
Maniok (Brasilien)	0,029	0,030 (+ 3,2 %)	$y = 6,5872x + 1,1143$ $r^2 = 0,9999$

*Tab.II.11: Gesamtgehalt an Linamarin und Lotaustralin, ber. als Linamarin in Limabohnen und Maniok*

Nachstehend ist ein Chromatogramm von Limabohne abgebildet, hier kann man auch das neben Linamarin (**22**) enthaltene Lotaustralin (**24**) deutlich erkennen. Die anderen Peaks sind weiteren, mitderivatisierten und demnach aliphatische OH- oder primäre Amino-Gruppen enthaltenden Pflanzeninhaltsstoffen zuzuordnen.

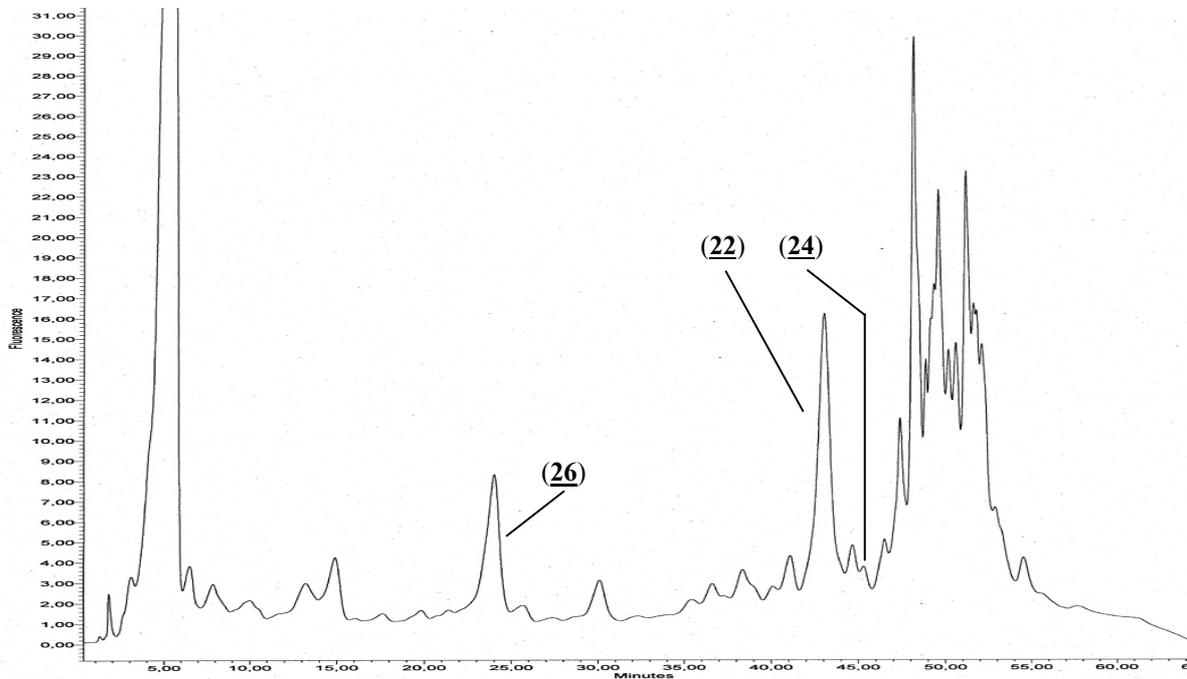


Abb.II.50: Chromatogramm des Naphthoyl-derivatisierten Extraktes von Limabohne: Linamarin (**22**) und Lotaustralin (**24**), Erythrol als ISTD (**26**)

Aus dem Vergleich der nachstehend abgebildeten Chromatogramme (s. Abb.II.51a-d) kann man die Abhängigkeit der extrahierten Menge an cyanogenen Glykosiden von der Wahl der Extraktionsmethode sehen. Das gefriergetrocknete Pflanzenmaterial wurde mit 100 %igem Methanol (M100), mit Methanol/Ethylacetat 80:20 (M80) bzw. 50:50 (M50) und per Soxhlet-Verfahren mit Methanol/Ethylacetat 19:81 (MSOX) extrahiert. Die Extrakte anderer Extraktionsmethoden, wie zB der Extraktion mit 70 %igem, 80 %igem oder 90 %igem Methanol, wurden nach der Derivatisierung und der orientierenden HPLC-Voruntersuchung auf den ungefähren Gehalt an cyanogenen Glykosiden nicht weiter analysiert, weil ein zu hoher Anteil an weiteren Inhaltsstoffen mitderivatisiert worden war, wahrscheinlich Stärke. Dies äußerte sich darin, dass unerwünschte Signale so große Intensitäten aufwiesen, dass daneben eine Quantifizierung von Linamarin oder gar Lotaustralin unmöglich war, denn die Intensität dieser Peaks hob sich nicht nennenswert vom Basislinienrauschen ab.

Bei den oben angegebenen, vier verschiedenen Extraktionsmethoden konnte jedoch der Anteil dieser die Quantifizierung sehr störenden Begleitsubstanzen so niedrig gehalten

werden, dass hier der Gehalt an Linamarin und Lotaustralin quantifiziert werden konnte. Deutlich ist zu erkennen (s. *Abb.II.51a-d*), dass mit steigendem Ethylacetat-Gehalt im Extraktions-Lösemittelgemisch immer weniger Linamarin bzw. Lotaustralin extrahiert wurde. Jedoch geht aus der Darstellung auch hervor, dass durch die dreistündige Extraktion bei 54° C (Sdp. des azeotropen Gemisches aus MeOH/EtOAc) trotz des extrem geringen Anteils an MeOH durch die Wärme ein deutlich höherer Gehalt an cyanogenen Glykosiden erfaßt werden konnte: Immerhin mehr als doppelt so viel wie bei Zusatz von nur 20 % EtOAc. Zusätzlich zu den Chromatogrammen ist eine erklärende tabellarische Auflistung (s. *Tab.II.12*) der über die Kalibrationsgerade ermittelten Gehalte für die unterschiedlichen Extraktionsweisen zu finden.

<i>Extraktionsmethode</i>	<i>Gehalt an Linamarin bzw. Lotaustralin (HPLC) [mg/ 100g TM]</i>		
	<i>Linamarin</i>	<i>Lotaustralin</i>	<i>Summe</i>
Maniok (Vietnam), 100M	0,570	0,042	<b>0,612</b>
Maniok (Vietnam), 80M	0,093	/	<b>0,093</b>
Maniok (Vietnam), 50M	0,012	/	<b>0,012</b>
Maniok (Vietnam), Soxhlett	0,182	0,024	<b>0,206</b>

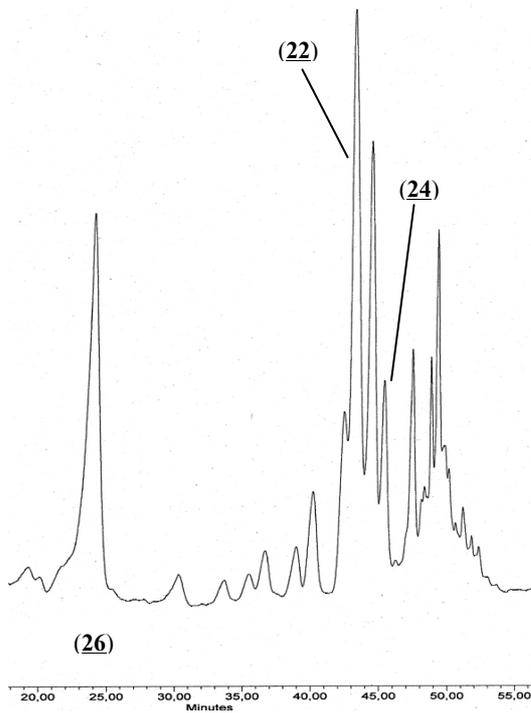
*Tab.II.12: Unterschiedliche Gehalte an Linamarin und Lotaustralin in Abhängigkeit von der Extraktionsweise*

*M100*: 100 % MeOH; *M80*: 8+2 (MeOH + EtOAc); *M50*: 5+5 (MeOH + EtOAc)

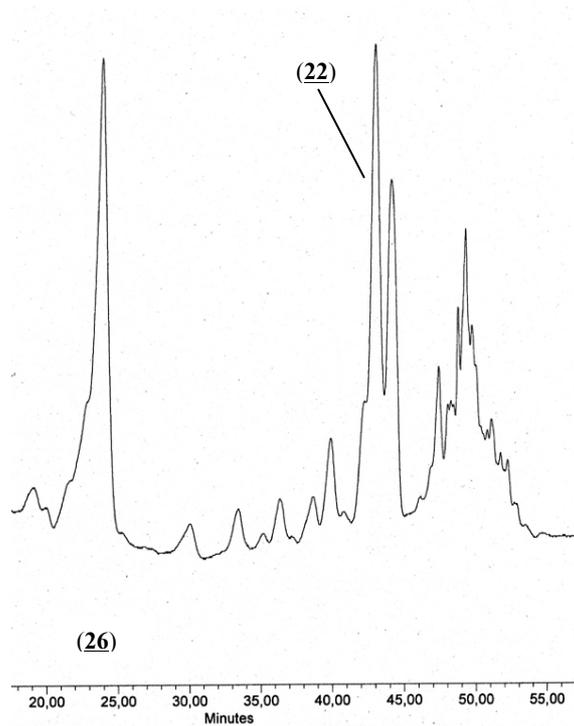
*MSOX*: Soxhlet-Extr. mit 19 + 81 (MeOH+EtOAc)

Bereits bei einem Zusatz von nur 20 % Ethylacetat konnte Lotaustralin nicht mehr in detektierbaren Spuren extrahiert werden. Es konnten hier schon nur noch 15 % der mit reinem Methanol extrahierbaren Menge an cyanogenen Glykosiden erfaßt werden. Für die im Kalten extrahierten Extrakte wurden jeweils 100 µl Extrakt und 50 µl ISTD injiziert, bei der Analyse des Soxhlett-Extraktes wurden ebenfalls 100 µl Extrakt, aber nur 20 µl ISTD injiziert. Dies ist bei der Interpretation der nachfolgenden Chromatogramme zu beachten.

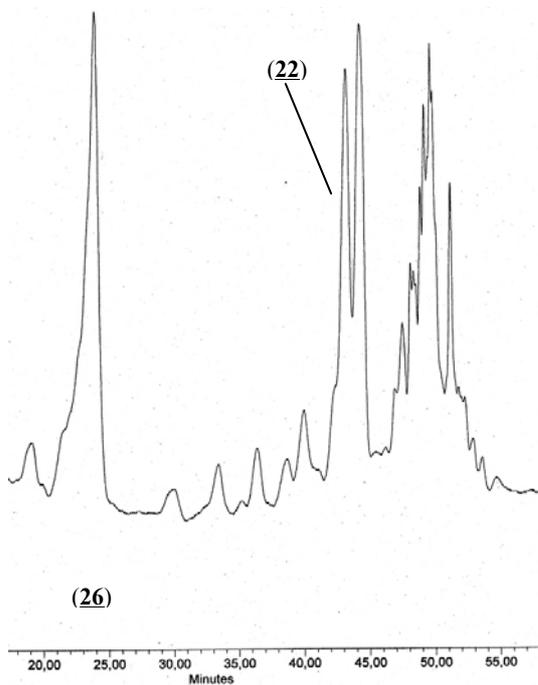
a) M100



b) M80



c) M50



d) M\_Sox

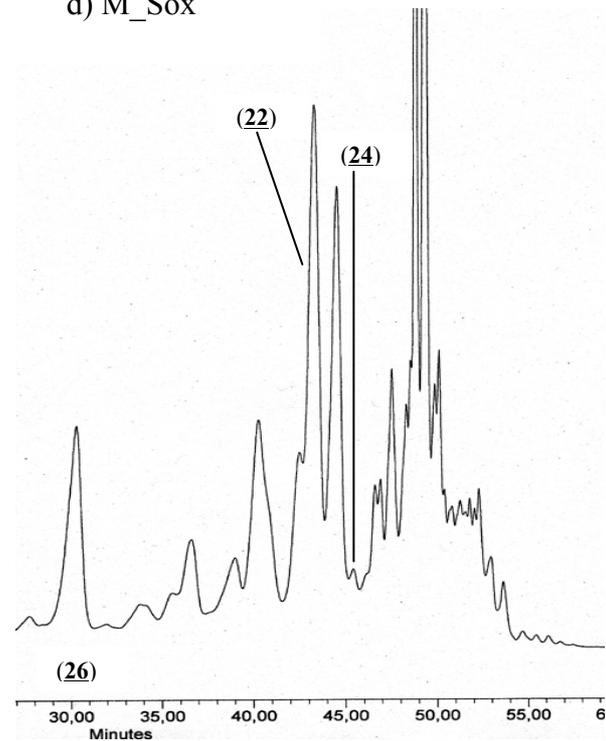


Abb.II.51a-d: Unterschiedliche Gehalte an Linamarin (22) und Lotaustralin (24) in Abhängigkeit von der Extraktionsweise, ISTD: (26)

M100: 100 % MeOH; M80: 8+2 (MeOH + EtOAc); M50: 5+5 (MeOH + EtOAc)

M\_SOX: Soxhlet-Extr. mit 19 + 81 (MeOH+EtOAc)

## 13 HCN-Bestimmung nach ALDRIGE und Vergleich den Ergebnissen der HPLC-Quantifizierung

Zur Verifizierung der nach Derivatisierung per HPLC ermittelten Gehalte an cyanogenen Glykosiden in den oben beschriebenen Untersuchungsobjekten wurde der Cyanid-Gehalt dieser Extrakte auch nach der sehr empfindlichen Methode nach ALDRIGE, modifiziert nach NAHRSTEDT, bestimmt [NAHRSTEDT, 1977, ALDRIGE, 1944]. Da für die Validierung der hier entwickelten HPLC-Methode kein definierter Vergleich zur Verfügung steht, kann in dem Vergleich mit einer, auf einem völlig anderen Prinzip basierenden Methode ein weiterer Beitrag zur Bestätigung der Richtigkeit gesehen werden. Dies ist insbesondere als Beleg der Richtigkeit der entwickelten HPLC-Methode zu sehen: Für die HPLC-Methode wird ein nach der Derivatisierung noch aufgearbeiteter Extrakt eingesetzt, für die photometrische Bestimmung nach ALDRIGE wird ein reiner, methanolischer Pflanzenextrakt zur Bestimmung eingesetzt.

Auch hier ist wieder zu beachten, dass mit dieser Bestimmungsmethode der Gesamt-Cyanid-Gehalt der Probe bestimmt wird. Bei der vorliegenden Methode ist – im Gegensatz zu den zuvor entwickelten CE-Methoden- auch im Falle von Epimerisierungen der cyanogenen Glykoside Lotaustralin oder Neolinustatin aus folgenden Gründen nicht mit höheren Werten bei dieser Bestimmung zu rechnen:

1. Lotaustralin und Neolinustatin liegen jeweils in deutlich geringeren Konzentrationen vor als Linamarin bzw. Linustatin (Ausnahme: Leinsamen)
2. Im Falle einer Epimerisierung wäre für das Derivat des Epilotaustralins zu klären, ob es sich in der Retentionszeit überhaupt von seinem derivatisierten Epimer Lotaustralin unterscheidet. Dies ist sehr unwahrscheinlich.
3. Für Epineolinustatin ist dies auszuschließen, da sich im Verlaufe der Methodenentwicklung noch nicht einmal die beiden sich in einer Methylgruppe unterscheidenden Diglykoside Linustatin und Neolinustatin antrennen ließen, so dass es als höchst unwahrscheinlich angesehen wird, dass das Derivat von Neolinustatin ein von seinem Epimer abweichendes Retentionsverhalten zeigen würde.

Die nachstehende Tabelle gibt einen Überblick über den Vergleich der auf die beiden beschriebenen Arten ermittelten Gehalte an Linamarin und Lotaustralin. Dass die Werte der Bestimmung nach ALDRIGE alle über denen der HPLC-Bestimmung liegen, ist dadurch

zu erklären, dass für die Bestimmung nach Aldrige keinerlei Aufarbeitungsschritt erforderlich ist, im Gegensatz zu der HPLC-Bestimmung.

<i>Pflanze</i>	<i>Cyanid-Gehalt nach [Aldrige], ber. als Lin.</i>	<i>Gehalt an Linamarin und Lotaustralin (HPLC)</i>	<i>Differenz der Bestimmungen</i>
Limabohne	30,1 mg/100g TM	28,8 mg/100g TM	+ 4,5 %
Maniok (Thailand)	0,150 mg/100g TM	0,136 mg/100g TM	+ 9,1 %
Maniok (Brasilien)	0,031 mg/100g TM	0,029 mg/100g TM	+ 9,3 %
Maniok (Vietnam), 100M	0,645 mg/100g TM	0,612 mg/100g TM	+ 5,4 %
Maniok (Vietnam), 80M	0,101 mg/100g TM	0,093 mg/100g TM	+ 8,6 %
Maniok (Vietnam), 50M	0,013 mg/100g TM	0,012 mg/100g TM	+ 9,2 %
Maniok (Vietnam), Soxhlet	0,218 mg/100g TM	0,206 mg/100g TM	+ 5,9 %

*Tab.II.13: Vergleich der ermittelten Cyanidgehalte der untersuchten Pflanzen*

Es ist deutlich zu erkennen, dass mit abnehmender Konzentration der zu quantifizierenden Glykoside die Abweichung vom nach ALDRIGE bestimmten Vergleichswert zunimmt. Dies ist logisch, wenn man bedenkt, dass die leichten Minderbefunde vermutlich daraus resultieren, dass ein geringer Anteil der derivatisierten Glykoside am RP-18-Material, das zur Aufreinigung eingesetzt wird, adsorbiert und somit der Bestimmung entzogen wird. Da die Menge an RP-18-Material in den verwendeten RP-18-Kartuschen nicht in Relation zum Gehalt an Cyanglykosiden in der Probe variiert, wird also wahrscheinlich bei geringeren Gehalten an Cyanglykosiden prozentual mehr zurückgehalten.

## 14 Diskussion der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Möglichkeiten zur schnellen und sicheren Identifizierung und Quantifizierung von cyanogenen Glykosiden aufgezeigt. Zudem wurde eine hochempfindliche Methode entwickelt, die eine Bestimmung der aliphatischen Cyanglykoside Linamarin, Lotaustralin, Linustatin und Neolinstatin nach Fluoreszenz-Derivatisierung bis in den unteren Pico-Mol-Bereich erlaubt.

Der Vorteil der hier entwickelten und validierten kapillarelektrophoretischen Methoden gegenüber bereits bestehenden liegt auf der Hand: Die Analytik ist im Mikromaßstab durchführbar, es werden nur minimale Mengen an Extrakt benötigt, da die erforderliche Injektionsmenge im Nanoliter-Bereich liegt und auch von dem eingesetzten Puffer und den für die Methode benötigten Spüllösungen für die CE werden nur Milliliter benötigt. Außerdem handelt es sich aufgrund der eingesetzten wäßrigen Trennelektrolyte um eine kostengünstige und umweltfreundliche Methodik.

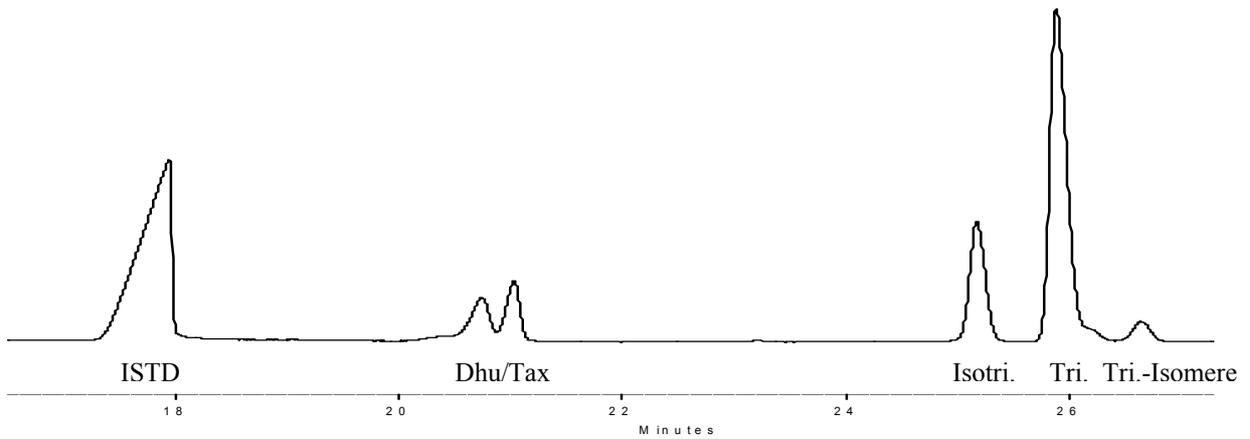
Zur Identifizierung und Quantifizierung von cyanogenen Glykosiden gibt es bereits einige etablierte Methoden [NAHRSTEDT, 1981; BRIMER, 1988]. Besonders bewährt hat sich die gaschromatographische Bestimmung mit parallel zum FID- gleichzeitig verwendeten PND-Detektor [NAHRSTEDT, 1973A/ 1977/ 1988; SCHENK, 1998; FRYE, 2000]. Hier werden vom PND nur die Stickstoff-haltigen Substanzen erfasst. Angewandt wird aber auch die GC-MS-Kopplung [MORAES et al.; 2000, CHASSANGE et al., 1996; MELLON und FENWICK, 1984], dies erübrigt jedoch nicht die der gaschromatographischen Bestimmung vorgeschaltete Silylierung.

Des Weiteren stehen diverse HPLC-Methoden zur Quantifizierung von cyanogenen Glykosiden zur Verfügung [NAHRSTEDT, 1978; FUKUDA et al., 2003].

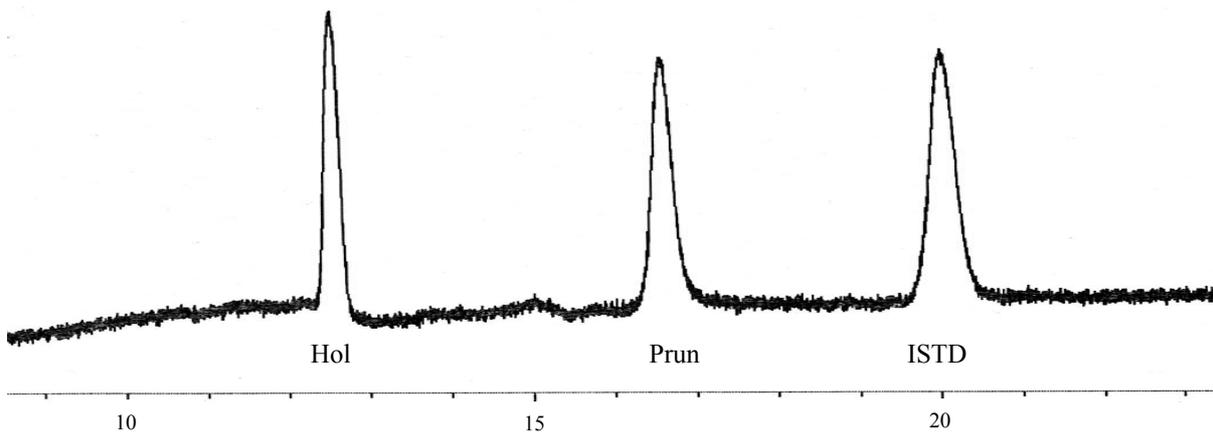
Zur Bestimmung des absoluten Cyanid-Gehaltes kann zudem noch die Blausäure-Bestimmung nach Aldrige, modifiziert nach Nahrstedt, als photometrische Messung zurückgegriffen werden [NAHRSTEDT, 1977; ALDRIGE, 1944]. Des Weiteren sind für die Bestimmung des absoluten Cyanid-Gehaltes in Cassava weitere kolorimetrische Methoden beschrieben [SAKA et al.; 1998, BRIMER et al., 1998], u.a. zur Quantifizierung des Cyanid-Gehaltes in Human-Urin [BRIMER und ROSLING, 1993], außerdem wurde der Einsatz von Cyanid-selektiven Biosensoren beschrieben [KEUSGEN, 2002; SMIT und CASS, 1990].

*nächste Doppelseite: Abb.II.52: Übersicht der validierten Methoden, gezeigt wird jeweils ein Kalibrationslauf*

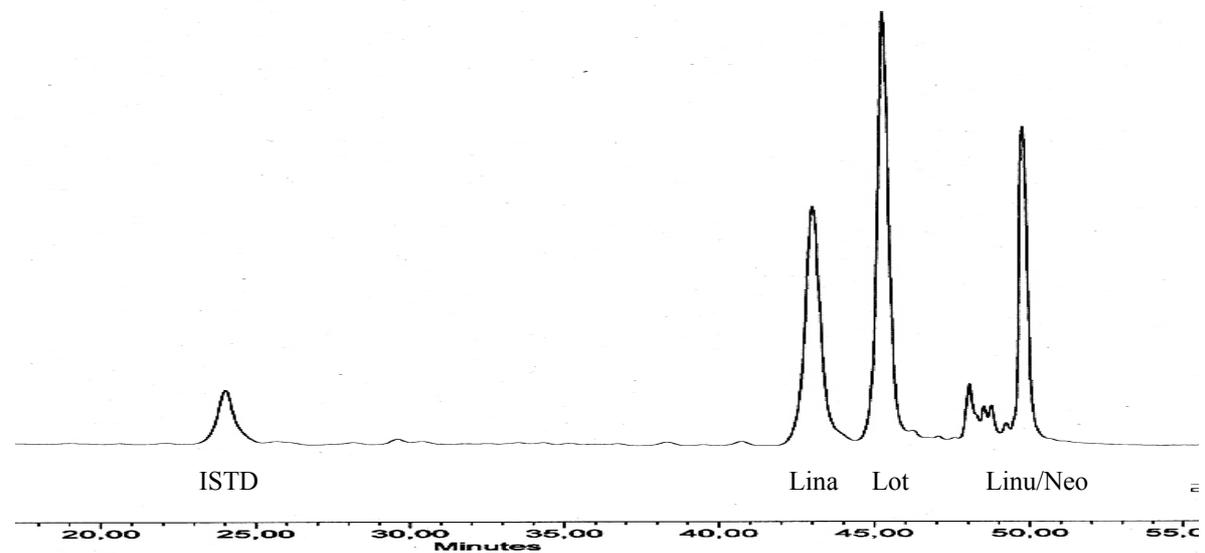
**I. Bestimmung von Dhurrin/ Taxiphyllin und Triglochinin (CE)**



**II. Bestimmung von Prunasin, Sambunigrin und Holocalin, Zierin bzw. Amygdalin/ Neoamygdalin (CE)**



**II. Bestimmung von Linamarin, Lotaustralin, Linustatin und Neolinustatin (HPLC)**



**Durchschnittliche Migrationszeiten:**

*ISTD (Salicylsäure):* 17,8 min

*Dhurrin:* 20,6 min

*Taxiphyllin:* 21,0 min

*Triglochinin:* 25,8 min

*Detektionswellenlänge*  $\lambda = 230$  nm

**Vorkommen:** Bambus, Hirse, Taro, Eschscholtzia

*Trennbedingungen:* s. Ex.Teil **3.1**, *Tab.III.2*

**Durchschnittliche Migrationszeiten:**

*ISTD (Nikotinsäure):* 20,7 min

*Holocalin:* 12,6 min

*Prunasin:* 16,3 min

hier nicht zu sehen: *Amygdalin:* 13,1 min

*Neoamygdalin:* 13,9 min

*Detektionswellenlänge*  $\lambda = 205$  nm

**Vorkommen:** Holunder, bittere Mandeln, Aprikosenkerne

*Trennbedingungen:* s. Ex.Teil **5.1**, *Tab.III.10*

**Durchschnittliche Retentionszeiten:**

*ISTD (Erythrol-Naphthoylderivat):* 23,9 min

*Linamarin-Naphthoylderivat:* 43,1 min

*Lotaustralin-Naphthoylderivat:* 45,4 min

*Linustatin-/ Neolinustatin-Naphthoylderivat:* 49,9 min

*Detektionswellenlänge*  $\lambda = 238$  nm

**Vorkommen:** Cassava, Leinsamen, Limabohne

*Trennbedingungen:* s. Ex.Teil **6.1**, *Tab.III.15*

## 14.1 Übersicht

Zunächst gibt die vorhergehende Doppelseite eine Übersicht über die drei hier entwickelten, validierten Methoden und zeigt zu jeder Methode einen Kalibrationslauf. Im Folgenden werden die einzelnen Methoden zusammenfassend diskutiert.

## 14.2 Zusammenfassung und Diskussion der einzelnen Methoden

### 14.2.1 Taxiphyllin/Dhurrin/Triglochinin

Zur Bestimmung der für Taxiphyllin, Dhurrin, Triglochinin und dessen Isomere ist bisher eine etablierte HPLC-Methode, für das Epimerenpaar Dhurrin und Taxiphyllin ist auch ein gaschromatographisches System und weitere HPLC-Methoden verfügbar.

Die bestehende GC-Methode liefert eine Basislinientrennung der Trimethylsilyl-Ether (TMS-Ether) an einer relativ polaren OV-225-Säule (Phenyl-Cyanopropyl-Methyl-Silicone) [NAHRSTEDT et al., 1978; REAY und CONN, 1974], allerdings ist es für die gaschromatographische Untersuchung erforderlich, den hergestellten Pflanzenextrakt vor der Silylierung zunächst aufzureinigen, bzw. die im Extrakt vorhandenen cyanogenen Glykoside aufzukonzentrieren [NAHRSTEDT, 1972; ZILG und CONN, 1974]. Sowie in allen bis dato beschriebenen GC-Systemen eluiert hier das (R)-konfigurierte Epimer Taxiphyllin vor dem (S)-konfigurierten Dhurrin [NAHRSTEDT, 1981]. Triglochinin ist aufgrund seiner thermischen Instabilität nicht gaschromatographisch bestimmbar [NAHRSTEDT, 1981].

Die HPLC-Methode liefert eine Auftrennung von Dhurrin, Taxiphyllin, Triglochinin und seinen Isomeren in einem Lauf, getrennt wird hier mit einem Gradienten aus H<sub>2</sub>O, MeCN und Eisessig an RP-18 Material [NAHRSTEDT, 1979]. In Weiterführung der oben bereits besprochenen GC-Regel, dass die (R)-konfigurierten Glykoside vor den (S)-konfigurierten eluiert werden, wird hier bei Einsatz einer Umkehrphase (HPLC) das (S)- vor dem (R)-Epimeren eluiert [Nahrstedt, 1981].

Im Vergleich mit diesen beiden Methoden liegt der Vorteil der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode für die simultane Bestimmung von Taxiphyllin, Dhurrin, Triglochinin und seinen Isomeren in der einfachen Handhabung. Hierdurch wird ermöglicht, sehr geringe Mengen methanolischer oder anderer Pflanzen-Extrakte ohne weitere Aufarbeitung innerhalb von 30 Minuten identifizieren und quantifizieren zu können.

Das für die Trennung von Dhurrin, Taxiphyllin, Triglochinin und seinen Isomeren entwickelte System besteht aus einem alkalischen Trennelektrolyten (100 mM Na<sub>2</sub>B<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)

mit einem Zusatz von 20 mM des neutralen mizellbildenden Emulgators Brij 35. In diesem System liegen die Analyten aufgrund des pH-Wertes von  $\sim 9$  negativ geladen vor. Der Zusatz des Emulgators als Mizellbildners dient der Auftrennung des Epimerenpaars, da Taxiphyllin und Dhurrin unterschiedliche Affinitäten zu diesen Mizellen haben und somit getrennt werden können. Die Nachweisgrenze der entwickelten Methode liegt bei 10  $\mu\text{g}$  für Triglochinin und bei 25  $\mu\text{g}$  für Dhurrin und Taxiphyllin.

#### 14.2.2 Prunasin/Sambunigrin, Holocalin/Zierin, Amygdalin/Neoamygdalin

Auch für die Bestimmung der drei Epimerenpaare Prunasin/Sambunigrin, Holocalin/Zierin und Amygdalin/Neoamygdalin sind schon mehrere HPLC- und auch GC-Methoden beschrieben worden, ebenso steht für die Trennung von Prunasin/Sambunigrin zusammen mit Amygdalin/Neoamygdalin bereits eine CE-Methode zur Verfügung [CAMP A et al., 2000]. Wie bereits unter 6.3 erläutert mangelt es dieser Methode allerdings an Reproduzierbarkeit.

Gaschromatographisch lassen sich auch diese sechs aromatischen cyanogenen Glykoside nach Silylierung als Trimethylsilyl-Ether bestimmen, ebenso wie Dhurrin und Taxiphyllin an einer OV-225-Säule [NAHRSTEDT, 1973; SCHENK, 1998]. Hier ist wieder eine Aufreinigung vor der Silylierung erforderlich.

Ebenfalls stehen HPLC-Systeme zur Wahl. Hier ist eine gleichzeitige Bestimmung von allen sechs Verbindungen an Silicagel mit einem Ethylacetat/Methanol-Gemisch möglich, wobei Amygdalin und Neoamygdalin nur mäßig gut getrennt wurden [NAHRSTEDT, 1978]. Für dieses Epimerenpaar steht aber eine weitere Option, die Trennung mit 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  an RP-18-Material, zur Verfügung [CULCASI et al., 1978]. In allen Methoden gilt auch für die drei Epimerenpaare Prunasin/Sambunigrin, Holocalin/Zierin und Amygdalin/Neoamygdalin, dass das (R)-Epimer vor dem (S)-Epimer eluiert, bzw. dass sich diese Reihenfolge bei Einsatz einer RP-Säule umkehrt [NAHRSTEDT, 1981].

Die entwickelte kapillarelektrophoretische Methode hat diesen Methoden gegenüber den Vorteil, dass auch hier der Aufarbeitungsschritt entfällt, außerdem ist die Analysendauer, auch unter der zeitlichen Einbeziehung der vorher durchzuführenden Reinigungsprozedur, kürzer. Desweiteren gilt im Vergleich mit der HPLC hier wieder, dass die CE-Methode aufgrund des verwendeten Trennelektrolyten ungleich umweltverträglicher ist und wegen des vergleichsweise geringen Verbrauchs an Trennpuffer auch weniger kostenintensiv ist.

Bei dem hier entwickelten System handelt es sich um einen schwach sauren Acetat-Puffer (100 mM, pH-Wert 5,2), auch die phenolischen Analyten liegen somit undissoziiert und

somit elektrisch neutral vor. Durch den Zusatz von 100 mM des negativ geladenen Mizellbildneres SDS werden die Glykoside in Abhängigkeit von ihrer Affinität zu diesen Mizellen aufgetrennt.

### 14.2.3 Linamarin/Lotaustralin/Linustatin/Neolinustatin

Für die aliphatischen Cyanglykoside Linamarin, Lotaustralin, Linustatin und Neolinustatin wurde eine hochempfindliche Methode zur Bestimmung auch geringster Mengen dieser Inhaltstoffe entwickelt. Zur Diskussion stehen hier zunächst ebenfalls die bereits vorhandenen Möglichkeiten zur Analyse dieser Verbindungen. Die Literatur beschreibt eine gaschromatographische Trennung des Epimerenpaares Lotaustralin/Epilotaustralin [NAHRSTEDT und DAVIS, 1981] bzw. der beiden Cyanglykoside Linamarin und Lotaustralin [FRYE, 2000]. Für Linustatin und Neolinustatin liegen keine veröffentlichten Methoden zur gaschromatographischen Bestimmung vor. Ebenso wie in den unter 1.2 und 1.3 erläuterten Fällen ist auch für diese Bestimmung eine Aufreinigung von Extrakten vor deren Silylierung notwendig [ZILG und CONN, 1974]. Die Auftrennung per HPLC wurde sowohl für die Monoglykoside [DAVIS und NAHRSTEDT, 1979] als auch für die Diglykoside [NAHRSTEDT, 1981; SMITH et al., 1980] an RP-18-Material mit H<sub>2</sub>O/Acetonitril beschrieben, allerdings nicht die Trennung aller vier Cyanglykoside in einem Lauf, sondern nur jeweils „päarchenweise“. Alle diese Methoden sind geeignet für die Analytik der underivatisierten Glykoside.

Nach der Einführung einer fluorogenen Gruppe durch die Derivatisierung mit Naphthoylimidazol konnte mit der hier vorgestellten Methode für Linamarin, Lotaustralin, Linustatin und Neolinustatin eine Möglichkeit gezeigt werden, diese cyanogenen Glykoside selbst in geringsten Konzentrationen nachweisen zu können, bzw. sie selbst in kleinsten Probenmengen analysieren zu können.

Mikromethoden sind hervorragend geeignet, um bspw. die Verteilung sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe in verschiedenen Pflanzenorganen zu untersuchen. So bestünde die Möglichkeit, für Biosynthese-Untersuchungen einzelne Blätter oder sogar einzelne Abschnitte von Blättern auf ihren Gehalt an cyanogenen Glykosiden und deren Lokalisierung zu untersuchen. Ebenso könnte somit für einzelne Pflanzen sogar einzelne Pflanzenteile (Wurzeln, Rhizom, Stengel, Blatt, Blüte) untersucht werden, um die Verteilung innerhalb einer Pflanze zu untersuchen.

Im Gegensatz zu der bereits erwähnten, aus der Literatur bekannten GC- bzw. HPLC-Grundregel, dass die (R)-konfigurierten Epimere vor den (S)-konfigurierten eluieren, ist die Aufstellung einer solchen Regel für die kapillarelektrophoretische Analytik nicht

---

möglich: Bei der Trennung der Epimerenpaare Prunasin/Sambunigrin und Amygdalin/Neoamygdalin ist die Migrationsreihenfolge sogar innerhalb einer Bestimmung verschieden, beim zuerst migrierenden Paar eluiert (S) vor (R), beim darauffolgenden Paar ist die Reihenfolge umgekehrt.

Für die vier aliphatischen Cyanglykoside Linamarin, Lotaustralin, Linustatin und Neolinustatin konnte nach verschiedenen Derivatisierungen keine Trennungen der Mono- bzw. Diglykoside untereinander erzielt werden. Wie bereits unter **10.4** diskutiert, ist das Auftrennungsvermögen der Kapillarelektrophorese offensichtlich ausreichend, um Moleküle gleicher Ladung und nur derart kleiner struktureller Unterschieden zu trennen.

### ***III. Experimenteller Teil***

# 1 Allgemeines zur Kapillarelektrophorese

## 1.1 Herstellung der Puffer für die Kapillarelektrophorese

Zur Herstellung von Puffern für die Kapillarelektrophorese wurden die Substanzen in doppelt destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert durch Zusatz der in den einzelnen Vorschriften angegebenen Säure oder Base eingestellt. Da die Temperaturabhängigkeit des pH-Wertes für die Pufferlösungen nicht bekannt war, wurde deren pH-Wert unabhängig von der Raumtemperatur auf den jeweiligen Sollwert eingestellt. Bei Puffern mit Additiven wurde zunächst der additivfreie „Leerpuffer“ hergestellt und dessen pH-Wert eingestellt. Das jeweilige Additiv wurde dann danach zugesetzt.

Vor Gebrauch wurden die Puffer 5-10 Minuten im Ultraschallbad entgast und anschließend mikrofiltriert (Maschengröße 45  $\mu\text{m}$ ).

## 1.2 Konditionierung von neuen CE-Kapillaren

Jede neue CE-Kapillare wurde nach dem Einbau in die entsprechende Kartusche zunächst jeweils 15 min mit 2 N HCl, dann 1 N NaOH, dann bidest. H<sub>2</sub>O und anschließend eine Stunde lang mit 0,1 M NaOH gespült. Dabei wurde bei den Beckman P/ACE-Geräten ein Druck von 20 psi (1 psi = 6894,76 Pa) angelegt. Danach wurde die Kapillare 10 min mit 0,25 N NaOH gespült und 5 min durch Anlegen einer Spannung von 5 kV konditioniert.

Diese Prozedur wurde auch durchgeführt, wenn eine Kapillare nach längerer Lagerungsdauer (mehr als zwei Wochen) erneut benutzt wurde. Ansonsten wurden die Kapillaren jeden Tag oder zu Beginn einer neuen Sequenz 10 min mit 0,25 N NaOH gespült und anschließend bei 5 kV 5 min konditioniert.

## 1.3 Testmethode Funktionsfähigkeit

Vor dem ersten Einsatz, nach längerer Lagerung (länger als 4 Wochen) oder bei Auftreten von sporadischen, auf den ersten Blick nicht erklärbaren Stromzusammenbrüchen während der Methodenentwicklung wurde die Kapillare mit folgender Methode auf ihre Funktionsfähigkeit überprüft:

System:	Beckman P/ACE MDQ mit PDA-Detektor
Kapillare:	fused silica, I.D. 50 $\mu\text{m}$
Laufpuffer:	100 mM Natriumtetraborat, pH $\sim$ 9,3 (ohne pH-Einstellung)
Injektion:	hydrodynamisch, 5 s bei 0,5 psi (1 psi = 6894,76 Pa)
Spannung:	30 kV
Temperatur:	Kapillare 20 $^{\circ}\text{C}$ , Probenkühlelement 10 $^{\circ}\text{C}$
Detektion:	PDA, Maxplot – Modus bzw. 254 nm
Auswertung:	Software 32 Karat Gold®, Beckman - Coulter

Tab.III.1: Testmethode Funktionsfähigkeit

Ausgewertet wurden Migrationszeit, Peakintensität und -höhe und Schärfe der Peaks, womit auch eine Überprüfung des selbstgebrannten Fensters möglich war; unscharfe Peaks können ein Hinweis auf eine Verschmutzung oder ein verkratztes Fenster sein. Es werden die Parabene *p*-Hydroxybenzoesäuremethylester, -ethylester und -propylester, jeweils 10,0 mg/ml, injiziert, der Trennelektrolyt ist ein 100 mM Natriumtetraborapuffer ohne pH-Wert-Einstellung, die angelegte Spannung beträgt unabhängig von der Kapillarlänge 30kV.

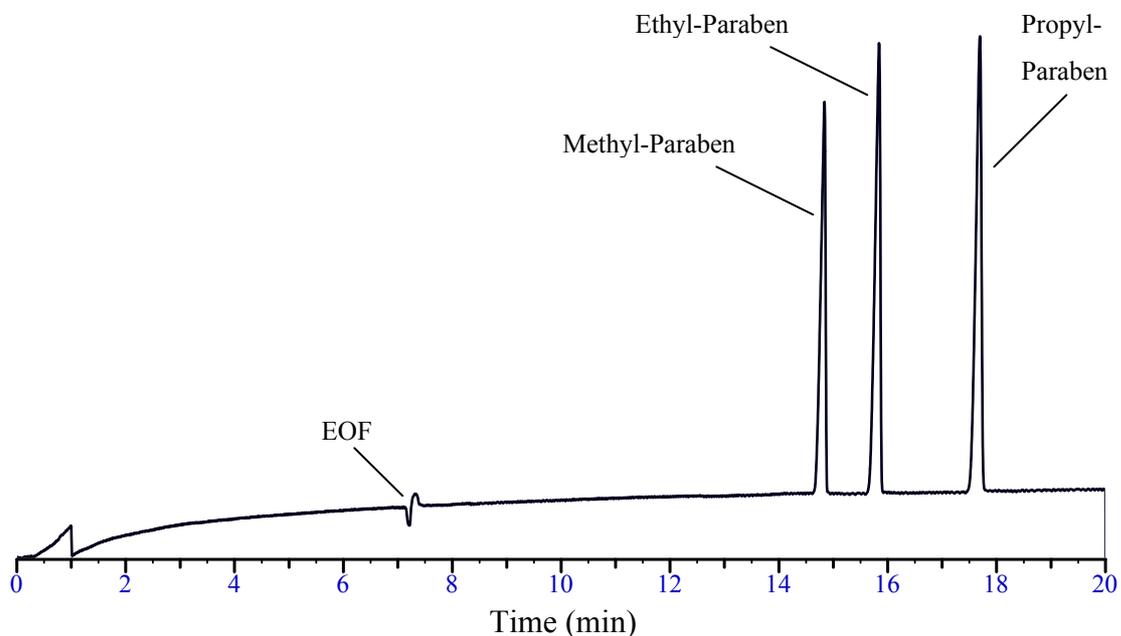


Abb.III.1: Testmethode zur Überprüfung von Kapillaren, Bedingungen s. Tab.III.1

## 1.4 Weitere Spülverfahren

Während der verschiedenen Methodenentwicklungen wurden unter anderem auch kationische Tenside verwendet, die aufgrund ihrer Abhäsion an die Kapillarwand den EOF umkehren. Bei Einsatz dieser Pufferadditive sind länger andauernde Spülschritte notwendig als bei Verwendung anionischer Tenside, Cyclodextrine oder neutraler Pufferadditive. Auch ist es in diesen Fällen nicht ausreichend, mit Puffer ohne Additive oder Natronlauge zu spülen. Als effektiv und reproduzierbar hat sich dreiminütiges Spülen mit 1 N HCl, gefolgt von fünfminütigem Spülen mit H<sub>2</sub>O bidest. erwiesen.

# 2 Allgemeines zu den Methodenentwicklungen

## 2.1 Allgemeines zur Methodenentwicklung

In allen Fällen wurde zu Beginn jeden Laufes zuerst zwei Minuten mit 0,25 N NaOH gespült, im Falle der Verwendung von sauren oder neutralen Puffern zwei Minuten mit bidestilliertem Wasser.

## 2.2 Geräte

Soweit nicht anders vermerkt ist, wurden die Methodenentwicklungen am MDQ-Gerät durchgeführt, validiert werden mußte aufgrund massiver Probleme mit diesem Gerät am P/ACE 5510. Bei der Methodenentwicklung am MDQ-Gerät wurde prinzipiell mit dem PDA-Detektor gearbeitet und im Max-Plot-Modus detektiert. Für die Analytik am P/ACE 5510 sind die gewählten Detektionswellenlängen den einzelnen Methodenbeschreibungen zu entnehmen.

Unabhängig vom Gerät wurden standardmäßig immer mit hydrodynamisch mit 0,5 psi injiziert, außerdem wurde nach jeder Injektion für 0,5 s bei 0,1 psi H<sub>2</sub>O bidest. als Samplestacking injiziert.

## 2.3 Vergleiche

Die zur Methodenentwicklung eingesetzten Vergleiche wurden im Rahmen zuvor unter Leitung von Prof. Dr. A. Nahrstedt durchgeführter Dissertationen aus verschiedenen Pflanzen oder Insekten isoliert. Die Reinheit dieser Substanzen wurde vor der Verwendung

prinzipiell per DC überprüft. Stark verunreinigte Verbindungen (Reinheitsgrad  $\leq 95\%$ ) oder isolierte Fraktionen von Pflanzenextrakten wurden nach Möglichkeit nicht verwendet oder aber nur zur Methodenentwicklung eingesetzt. Zur Kalibration wurden prinzipiell nur Substanzen mit einem Reinheitsgrad von mind. 98 % eingesetzt.

Die zur Methodenentwicklung eingesetzten Lösungen der Vergleichssubstanzen hatten prinzipiell eine Konzentration von 1-2 mg/ml.

### 2.3.1 Epimerisierung der Cyanglykoside

Die Cyanglykoside Prunasin und Amygdalin wurden in 0,005 N  $\text{NH}_3$  (346  $\mu\text{l}$   $\text{NH}_3$  konz. auf 1000 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ) bei  $37^\circ\text{C}$  über Nacht epimerisiert, um für die zu entwickelnden Methoden Gemische zur Verfügung zu haben, in denen (S)- und (R)-Form in ähnlichen Anteilen vorliegen. Nach der Epimerisierung wurde der verd.  $\text{NH}_3$  unter Stickstoff abgeblasen, das Gemisch gefriergetrocknet und in einer definierten Menge  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. aufgenommen und bis zur Verwendung bei  $-18^\circ\text{C}$  gelagert.

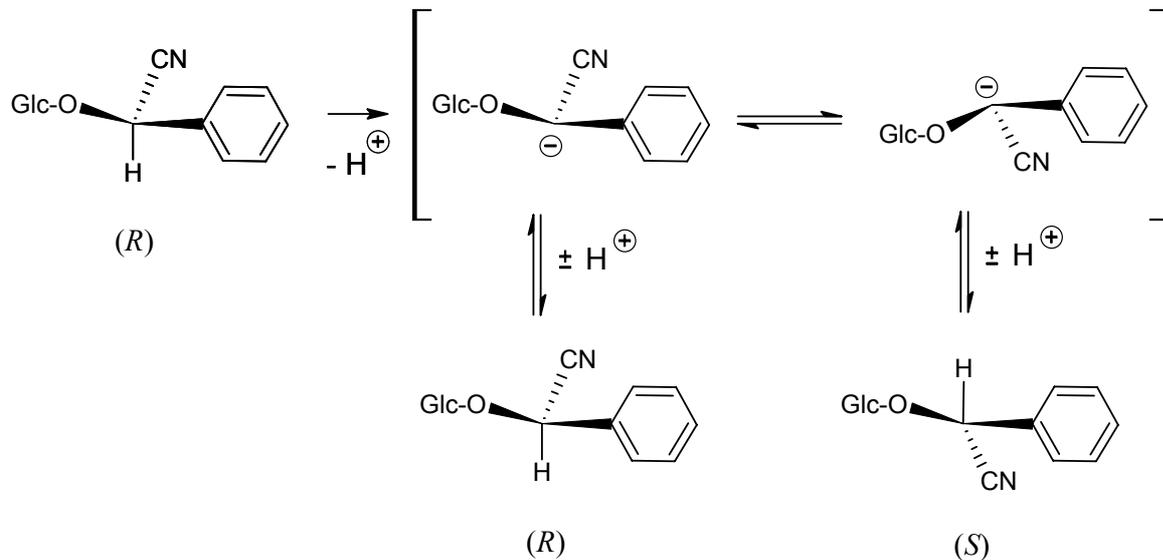


Abb.III.2: Reaktionsmechanismus der Isomerisierung von Benzaldehydcyanhydringlykosiden (verändert nach Nahrstedt, 1975)

Holocalin wurde zwar auch bei  $37^\circ\text{C}$ , jedoch nur für ca. 4h in 0,0005 N  $\text{NH}_3$  stehen gelassen, Taxiphyllin bzw. Dhurrin wurden wegen ihrer Thermolabilität zur Epimerisierung sogar nur 0,5 – 2h bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend sofort gefriergetrocknet. Im Weiteren wurde so wie mit Prunasin und Amygdalin verfahren.

## 2.3.2 Derivatisierungen

### 2.3.2.1 Derivatisierung mit Phthalsäureanhydrid

Derivatisierungsreagenz:

1. 16,3 g Phthalsäureanhydrid in 100 ml Pyridin (getrocknet) in einem Braunglasgefäß lösen
2. 2,5 g Imidazol zugeben, unter Rühren vollständig lösen
3. Reagenz über Nacht stehen lassen

Für die Derivatisierung werden ca. 1-2 mg ( $\approx$  4-10  $\mu$ mol) Cyanglykosid mit 50–10  $\mu$ l Derivatisierungsreagenz (abhängig von der Anzahl umzusetzender OH-Gruppen) in einer verschweißten Ampulle 1 h bei 85° C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Ampulle geöffnet und dem Gemisch 3 ml MeCN/H<sub>2</sub>O (2+1) zugesetzt, um die Reaktion zu stoppen und das überschüssige Phthalsäureanhydrid zu hydrolysieren.

Die Proben sind bei 4° C ca. 4 Monate lang haltbar. Vor der Injektion müssen die Proben fünf- bis zehnfach verdünnt werden mit H<sub>2</sub>O/Isopropanol (9+1).

### 2.3.2.2 Derivatisierung mit Naphthoylimidazol

1–2 mg Cyanglykosid ( $\approx$  4-10  $\mu$ mol) werden mit 5 mg Naphthoylimidazol ( $\approx$  25  $\mu$ mol) und 2,5  $\mu$ l DBU (1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en) in 1 ml wasserfreiem Acetonitril gelöst, für ca. 15 min in ein Ultraschallbad gestellt, um die relativ polaren Canglykoside vollständig in dem Reaktionsgemisch zu lösen und anschließend 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wird die Reaktion durch Zugabe von 1 ml MeCN/H<sub>2</sub>O (1+4) durch Hydrolyse des überschüssigen Naphthoylimidazols gestoppt. Diese Lösung wird an einer RP18-Kartusche (3ml) in 3 Schritten aufgereinigt:

- 1.) 4 ml MeCN/H<sub>2</sub>O (1+4)
- 2.) 10 ml MeCN/H<sub>2</sub>O (2+3)
- 3.) MeCN/H<sub>2</sub>O (1+1)

Anschließend wird mit 5 ml reinem Acetonitril eluiert und die Probe mit Acetonitril auf ein definiertes Volumen von 5,0 oder 10,0 ml aufgefüllt.

### 2.3.2.3 Überprüfung der vollständigen Derivatisierung per DC

Zur Kontrolle, ob die Derivatisierung mit Naphthoylimidazol quantitativ stattgefunden hat und das überschüssige Derivatisierungsreagenz durch den an die Derivatisierung angeschlossenen Aufreinigungsschritt vollständig entfernt wurde, wurden DCs angefertigt.

*Fließmittel:* Toluol

*Detektion:* UV-Detektion bei 254 nm, Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz

## 2.4 Extrakte

Vor der Extraktion wurden das Pflanzenmaterial mit FEIGL-ANGER-Papier oder per Sandwich-Test auf seine cyanogene Aktivität geprüft. Diese Methodik wird unter 7.2 näher erläutert.

### 2.4.1 Extraktionsmethoden

#### 2.4.1.1 Methanolisch-wäßrige Extraktion

Ca. 2-3 g gefriergetrocknetes Pflanzenmaterial werden mit 70 oder 80 %igem Methanol fünfmal (erschöpfend) mit jeweils 50ml Lösungsmittel am Ultra-Turrax extrahiert. Da durch den Wasseranteil des eingesetzten Lösungsmittels auch Stärke, wenn sie in hohem Überschuß zu den zu bestimmenden cyanogenen Glykosiden vorliegt wie z.B. in den Wurzelknollen von Maniok in deutlichen Mengen mitextrahiert wurde, mußte dieser Extrakt weiter aufgearbeitet werden.

*Abtrennung von Stärke an Extrelut:*

Der unter oben beschriebenen Bedingungen hergestellte Extrakt wurde am Rotationsverdampfer schonend ( $T \leq 30^\circ \text{C}$ ) fast bis zur Trockene eingeengt, in 20,0 ml 5 %igem MeOH aufgenommen und auf die zuvor mit H<sub>2</sub>O/MeOH (95+5) konditionierte Extrelut-Säule (h=8 cm, Durchmesser= 1,6 cm) aufgebracht. Die Suspension verbleibt ca. 20 min auf der Säule, anschließend wird der Extrakt zunächst mit 5 %igem MeOH von weiterer Stärke befreit, im Anschluß daran wurden die cyanogenen Glykoside mit wassergesättigtem Ethylacetat eluiert. Da durch diesen Aufreinigungsschritt die Stärke nicht quantitativ abgetrennt werden konnte, ist diese Extraktionsmethode für sehr stärkehaltiges Pflanzenmaterial ungeeignet.

#### **2.4.1.2 Methanolische Extraktion**

Zur Extraktion der cyanogenen Glykoside wurde ca. 2g des Pflanzenmaterials fünfmal mit jeweils 50 ml MeOH jeweils 3 min mittels Ultra-Turrax extrahiert und durch Papierfilter abfiltriert (585). Anschließend wurden die vereinigten Extrakte schonend am Rotationsverdampfer ( $T \leq 30^\circ \text{C}$ ) nicht ganz bis zur Trockene eingeengt und daraufhin mit MeOH auf ein definiertes Volumen aufgefüllt.

#### **2.4.1.3 Extraktion mit Methanol und Ethylacetat**

Um Cyanglykoside aus stärkereichem Untersuchungsmaterial zu extrahieren, wurde eine Mischung von Methanol und Ethylacetat (80/20 bzw. 50/50 (V/V)) verwendet. Die Extraktion wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

#### **2.4.1.4 Soxhlett-Extraktion**

Ca. 2 g Pflanzenmaterial wurde drei Stunden im Soxhlet-Extraktor mit einer azeotropen Mischung aus Methanol und Ethylacetat (19/81 (V/V);  $Sdp=54^\circ \text{C}$ ) extrahiert. Das Azeotrop bietet den Vorteil, aus sehr stärkehaltigem Pflanzenmaterial Cyanglykoside von Stärke abzutrennen. Anschließend wurde fast bis zur Trockene einrotiert und der Extrakt in Methanol aufgenommen und auf ein definiertes Volumen gebracht.

## 3 Taxiphyllin und Dhurrin, Triglochinin und seine Isomere

### 3.1 Validierte Methode

System:	Beckman P/ACE MDQ mit PDA-Detektor
Kapillare:	fused silica, 60/70 cm, I.D. 50 µm
Laufpuffer:	100 mM Natriumtetraborat, pH ~ 9,3 (ohne pH-Einstellung) 20 mM Brij 35
Injektion:	hydrodynamisch, 3 - 5 s bei 0,5 psi
Spannung:	30 kV
Temperatur:	Kapillare 20 °C, Probenkühlelement 10 °C
Detektion:	PDA, Maxplot-Modus bzw. 230 nm und 334 nm

Tab.III.2: validierte Methode zur Trennung von Dhurrin, Taxiphyllin, Triglochinin

### 3.2 Methodenentwicklung

#### 3.2.1 Acetatpuffer

Acetatpuffer mit verschiedenen pH-Werten wurden nach folgender Tabelle erstellt:

Stammlösung A:	8,2 g Na-Acetat, wasserfrei, auf 1000,0 ml H <sub>2</sub> O dest. 100 mM Na-Acetat-Lösung
Stammlösung B:	5,8 ml Eisessig auf 1000,0 ml H <sub>2</sub> O dest. 100 mM Essigsäure

Um Acetatpuffer eines bestimmten pH-Wertes zu erhalten, sind die oben angegebenen Stammlösungen in den unten aufgeführten Verhältnissen zu mischen.

<i>pH-Wert</i>	<i>Stammlösung A [ml]</i>	<i>Stammlösung B [ml]</i>
3,6	15	185
4,0	36	164
4,4	74	126
4,8	120	80
5,2	158	42
5,6	181	19

Tab.III.3: Herstellung des Acetatpuffers

Um Puffer verschiedener Molaritäten zu erhalten, sind die Lösungen nach dem Mischen entsprechend zu verdünnen.

### 3.2.2 Phosphatpuffer (Sørensen)

Phosphatpuffer mit verschiedenen pH-Werten wurden nach folgender Tabelle erstellt:

Stammlösung A: 13,61 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  auf 1000,0 ml  $\text{H}_2\text{O}$  dest.

100 mM Kaliumdihydrogenphosphat -Lösung

Stammlösung B: 17,8 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  auf 1000,0 ml  $\text{H}_2\text{O}$  dest.

100 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung

Um Phosphatpuffer eines bestimmten pH-Wertes zu erhalten, sind die oben angegebenen Stammlösungen in folgenden Verhältnissen zu mischen. Um Puffer verschiedener Molaritäten zu erhalten, sind die Lösungen nach dem Mischen entsprechend zu verdünnen.

<i>pH-Wert</i>	<i>Stammlösung A [ml]</i>	<i>Stammlösung B [ml]</i>
5,3	97,5	2,5
6,24	80	20
6,64	60	40
7,17	30	70
8,04	5	95

*Tab.III.4: Herstellung des Phosphatpuffers*

Die nach obigen Schemata angefertigten Puffer wurden mit den nachfolgend aufgelisteten Pufferadditiven versetzt, teilweise wurden auch zwei Additive kombiniert:

- SDS 10–100 und 180 mM
- TDC 10–100 mM
- $\beta$ -Cyclodextrin 0,1–1 %
- sulfatiertes  $\beta$ -Cyclodextrin 0,1–2 %

### 3.2.3 Borat-Puffer

Außer den Acetat- und Phosphatpuffern wurden außerdem Boratpuffer verschiedener pH-Werte ausgetestet. Da für die Herstellung dieser Puffer keine Liste zur Verfügung stand, wurde hier ein jeweils  $\text{H}_3\text{BO}_3$  - bzw.  $\text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_7$ -Lösung der gewünschten Konzentration

vorgelegt und mittels pH-Meter auf einen bestimmten pH-Wert eingestellt (pH 5,5/6,5/7,5/8,5/9,3).

Auch hier wurden im Verlauf der Methodenentwicklung verschiedene Puffer-Additive in unterschiedlichen Konzentrationen und auch teilweise kombiniert eingesetzt:

- SDS 10 – 50 mM
- Tween 20 10 – 50 mM
- Natriumtaurodesoxycholat 10 – 50 mM
- $\beta$  – Cyclodextrin 0.1 – 1 %
- Methyl -  $\beta$  – Cyclodextrin, 0.1 – 1 %
- $\alpha$ - Cyclodextrin

### 3.3 Kalibration für Taxiphyllin und Triglochinin

eingesetzte Lösungen:

Taxiphyllin: 6,05 mg/ml

Triglochinin: 5,01 mg/ml

ISTD (Salicylsäure): 1,08 mg/ml

#### 3.3.1 Pipettierschema

	$V (ISTD)$	$V (Tri)$	$V (Tax)$	$V (H_2O)$	$c (ISTD)$	$c (Tri)$	$c (Tax)$
<b>A</b>	75	400	400	125	0.081	2.295	2.52
<b>B</b>	75	350	350	225	0.081	1.785	1.96
<b>C</b>	75	250	250	425	0.081	1.275	1.4
<b>D</b>	75	175	175	575	0.081	0.8925	0.98
<b>E</b>	75	100	100	725	0.081	0.51	0.56
<b>F</b>	75	75	75	775	0.081	0.3825	0.42
<b>G</b>	75	50	50	825	0.081	0.255	0.28
<b>H</b>	75	25	25	875	0.081	0.1275	0.14
<b>I</b>	75	10	10	905	0.081	0.051	0.056
<b>K</b>	75	5	5	915	0.081	0.0255	0.028
<b>L</b>	75	2	2	921	0.081	0.0102	0.0112

Tab.III.5: Pipettierschema für die Kalibration von Triglochinin und Taxiphyllin,

Angaben (V) in  $\mu$ l, (c) in mg/ml

Zur Kalibration von Taxiphyllin wurden die Lösungen A und D-I verwendet, zur Kalibration von Triglochinin die Lösungen B und C-K eingesetzt. Die Lösungen mit der jeweils niedrigsten eingesetzten Konzentration sowie die Lösungen der Konzentrationsstufe L wurden analysiert, um die Bestimmungs- und Nachweisgrenze festzulegen.

### 3.3.2 Kalibrationsgeraden

#### 1. Taxiphyllin

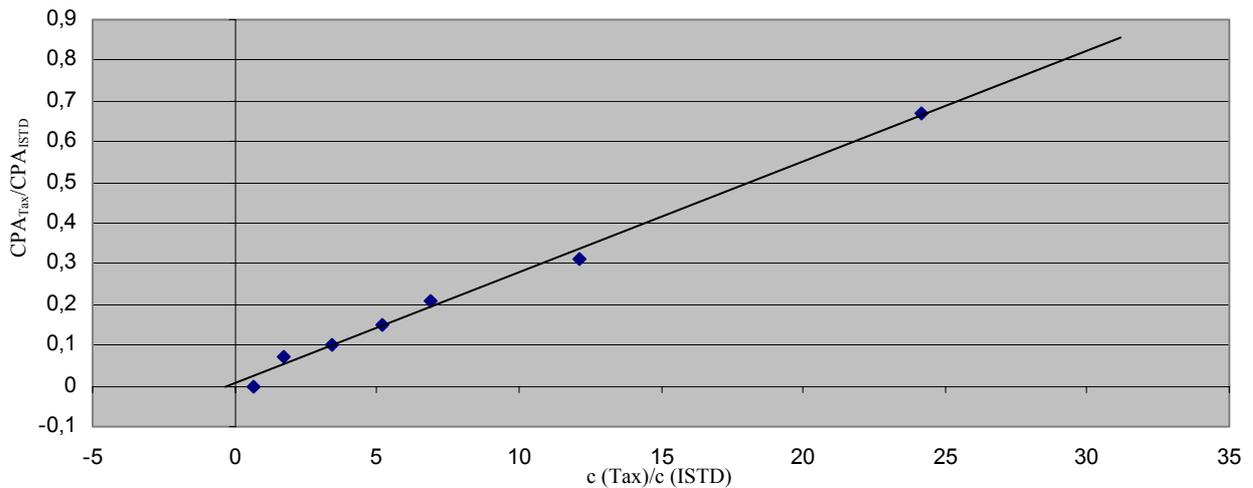


Abb.III.3: Kalibrationsgerade Taxiphyllin

$$\text{Geradengleichung: } y = 0,0272x + 0,0051; r^2 = 0,9947$$

#### 2. Triglochinin

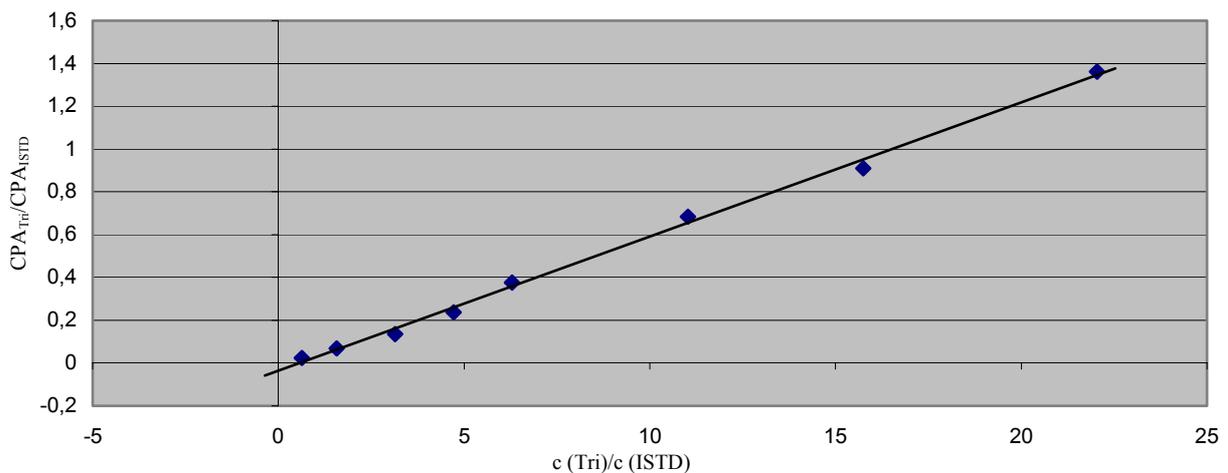


Abb.III.4: Kalibrationsgerade Triglochinin

$$\text{Geradengleichung: } y = 0,0627x - 0,0358; r^2 = 0,997$$

### 3.4 Daten zur Richtigkeit und Präzision für Triglochinin und Taxiphyllin/Dhurrin

Richtigkeit und Präzision der Methode wurden für Taxiphyllin und Triglochinin jeweils an drei verschiedenen Tagen in vier unterschiedlichen Konzentrationen, die den gesamten Kalibrationsbereich abdecken, bestimmt. Hierzu wurden mit frisch hergestellten Stammlösungen der Referenzsubstanzen Kalibrierlösungen pipettiert, mit internem Standard versetzt und jeweils viermal injiziert und analysiert.

#### 3.4.1 Pipettierschema

Einwaagen:

ISTD (Salicylsäure): 1,0 mg/ml

Triglochinin: 5,0 mg/ml

Taxiphyllin: 5,05 mg/ml

	$V$ (ISTD)	$V$ (Tri)	$V$ (Tax)	$V$ (H <sub>2</sub> O)	$c$ (ISTD)	$c$ (Tri)	$c$ (Tax)
A	75	250	250	425	0,075	1,250	1,250
B	75	100	100	725	0,075	0,500	0,500
C	75	25	25	875	0,075	0,100	0,100
D	75	5	5	915	0,075	0,025	0,025

Tab.III.6: Pipettierschema für die Bestimmung von Richtigkeit und Präzision von Triglochinin und Taxiphyllin (Angaben (V) in  $\mu$ l, (c) in mg/ml)

Die graphische Darstellung ebenso wie die Diskussion der experimentell ermittelten Daten sind dem Speziellen Teil unter **8.3** zu entnehmen. Untenstehend werden die ermittelten Daten nur tabellarisch aufgelistet.

Richtigkeit/Präzision Taxiphyllin

Sollkonzentration Taxiphyllin

	0,025 mg/ml	0,1 mg/ml	0,5 mg/ml	1,25 mg/ml
--	-------------	-----------	-----------	------------

Gefundene Konzentration (arithmetischer Mittelwert) [mg/ml]

1. Tag (n=4)	0,02435	0,10201	0,52313	1,19654
2. Tag (n=4)	0,02365	0,09597	0,47652	1,26489
3. Tag (n=4)	0,02381	0,10425	0,51932	1,25836
Interday (n=12)	0,02394	0,10074	0,50632	1,23993

## Richtigkeit (arithmetischer Mittelwert) [%]

1. Tag (n=4)	97,4	102,0	104,6	95,7
2. Tag (n=4)	94,6	96,0	95,3	101,2
3. Tag (n=4)	95,2	104,6	103,8	100,7
Interday (n=12)	95,7	100,7	101,3	99,2

## Präzision (relative Standardabweichung) [%]

1. Tag (n=4)	8,24	4,58	4,87	4,36
2. Tag (n=4)	13,12	2,39	2,03	2,41
3. Tag (n=4)	7,64	3,82	6,11	3,09
Interday (n=12)	6,93	5,18	5,90	4,32

Tab.III.7: Daten zu Richtigkeit und Präzision für Taxiphyllin

## Richtigkeit/Präzision Triglochinin

## Sollkonzentration Triglochinin

0,025 mg/ml	0,1 mg/ml	0,5 mg/ml	1,25 mg/ml
-------------	-----------	-----------	------------

## Gefundene Konzentration (arithmetischer Mittelwert) [mg/ml]

1. Tag (n=4)	0,02337	0,10373	0,47777	1,27998
2. Tag (n=4)	0,02718	0,10021	0,48591	1,25686
3. Tag (n=4)	0,02598	0,09689	0,51950	1,19501
Interday (n=12)	0,02551	0,10028	0,49439	1,24395

## Richtigkeit (arithmetischer Mittelwert) [%]

1. Tag (n=4)	93,5	103,7	95,5	102,4
2. Tag (n=4)	108,7	100,2	97,2	100,6
3. Tag (n=4)	103,9	96,9	103,9	95,6
Interday (n=12)	102,1	100,3	98,8	99,5

## Präzision (relative Standardabweichung) [%]

1. Tag (n=4)	4,98	3,89	4,20	4,76
2. Tag (n=4)	8,96	5,31	1,99	3,43
3. Tag (n=4)	8,12	2,55	7,11	2,79
Interday (n=12)	7,63	3,99	6,23	4,91

Tab.III.8: Daten zu Richtigkeit und Präzision für Triglochinin

### 3.5 Dhurrin – Abbau

Um zu zeigen, dass während der kapillarelektrophoretischen Quantifizierung Dhurrin oder Taxiphyllin nicht epimerisieren oder anderweitig abbauen, wurde untersucht, wie schnell sich der Abbau von Dhurrin im verwendeten Puffer ( $\text{pH} \approx 9,3$ ) vollzieht. Dazu wurde Dhurrin in 100 mM Natriumtetraboratpuffer gelöst. Unmittelbar nach Solubilisierung der Probe erfolgte die erste Injektion, weitere fünf erfolgten in jeweils einstündigem Abstand.

Aus unten gezeigtem Diagramm geht eindeutig hervor, dass in der Zeit bis zur Detektion von Dhurrin oder Taxiphyllin noch keine Epimerisierung stattfindet. Die Epimerisierung setzt unter den oben beschriebenen Trennbedingungen erst nach mehr als einer Stunde ein. Da die Proben für die Methodenentwicklung bzw. Kalibration in  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und aufbewahrt wurden und für die Bestimmung der Cyanglykoside in Pflanzenextrakten in MeOH, wurde diese Untersuchung nur durchgeführt, um sicherzustellen, dass sich im Laufe einer Analyse das Molekül noch nicht verändert oder zersetzt.

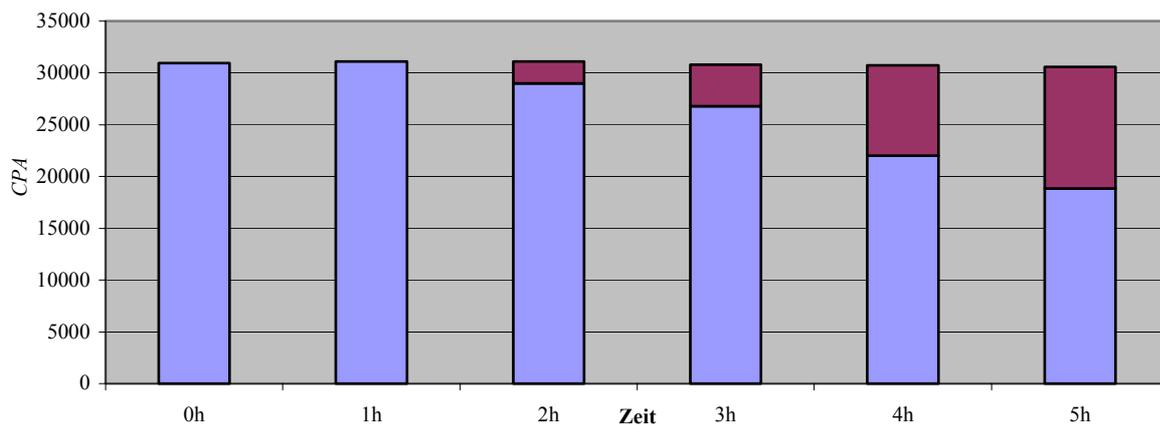


Abb.III.5: Zeitabhängiger Abbau (Epimerisierung) von Dhurrin im verwendeten Puffer

blau: Dhurrin

rot: Taxiphyllin

### 3.6 Daten zur Untersuchung der Extrakte

Die Extrakte wurden nach dem Standardzusatzverfahren analysiert. Hierbei wird der Extrakt mit einer gleich bleibenden, definierten Menge an internem Standard (Salicylsäure) und steigenden Konzentrationen des zu bestimmenden cyanogenen Glykosids versetzt. Die vier so hergestellten Lösungen wurden jeweils fünfmal injiziert.

### 3.6.1 Bambus

#### 3.6.1.1 Bambus1-Stumpf (Vietnam)

Stammlösungen:

Extrakt: 2,0506 mg/20ml

Taxiphyllin: 6,05 mg/ml

ISTD: 1,02 mg/ml

Lösungsmittel: 100 % MeOH

Pipettierschema

	$V$ (ISTD)	$V$ (Extrakt)	$V$ (Tax)	$V$ (MeOH)	$c$ (ISTD)	$c$ (Tax)
A	150	200	350	300	0,0765	1,05875
B	150	200	100	550	0,0765	0,3025
C	150	200	20	630	0,0765	0,0605
D	150	200	0	650	0,0765	0

Tab.III.9: Pipettierschema für das SZV von Bambus 1 (Vietnam), Stumpf

Angaben ( $V$ ) in  $\mu\text{l}$ , ( $c$ ) in mg/ml

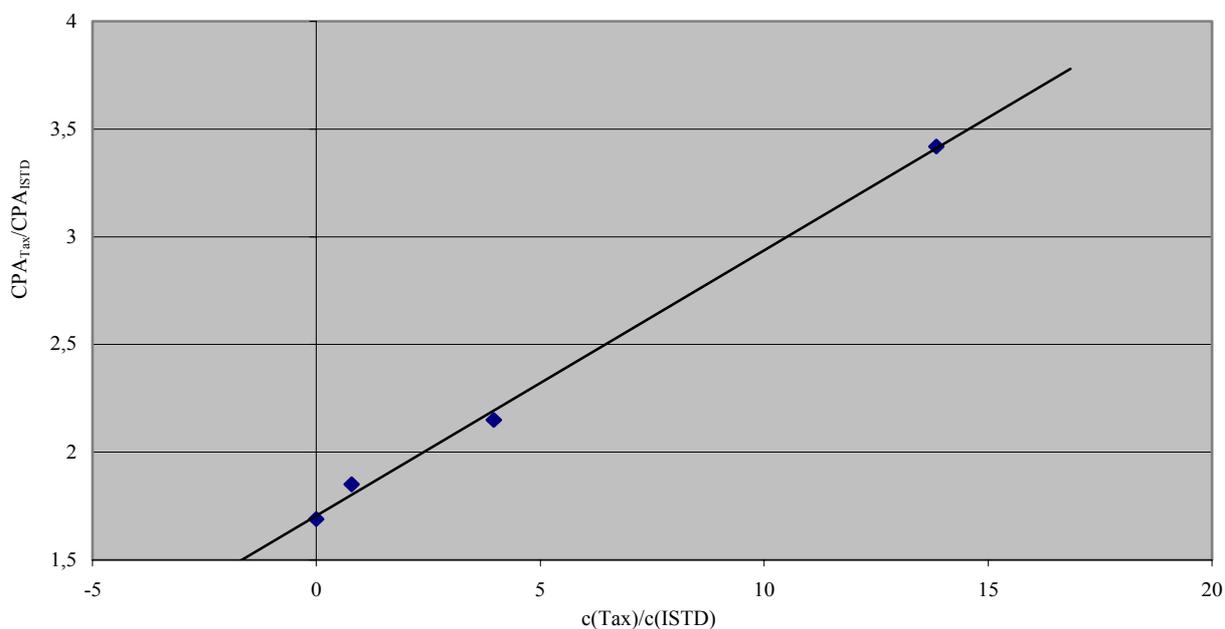


Abb.III.6: SZV von Bambus 1 (Vietnam), Stumpf

$$y = 0,1231x + 1,7058; r^2 = 0,9975$$

### 3.6.1.2 Bambus1-Spitze (Vietnam)

Stammlösungen:

Extrakt: 1,6535 mg/20ml

Taxiphyllin: 6,05 mg/ml

ISTD: 1,02 mg/ml

Lösungsmittel: 100 % MeOH

Pipettierschema

	$V$ (Extrakt)	$V$ (ISTD)	$V$ (Tax)	$V$ (MeOH)	$c$ (ISTD)	$c$ (Tax)
A	250	500	0	1250	0,51	0
B	250	500	20	1230	0,51	0,121
C	250	500	100	1150	0,51	0,605
D	250	500	250	1000	0,51	1,5125

Tab.III.10: Pipettierschema für das SZV von Bambus 1 (Vietnam), Spitze

Angaben (V) in  $\mu\text{l}$ , (c) in mg/ml

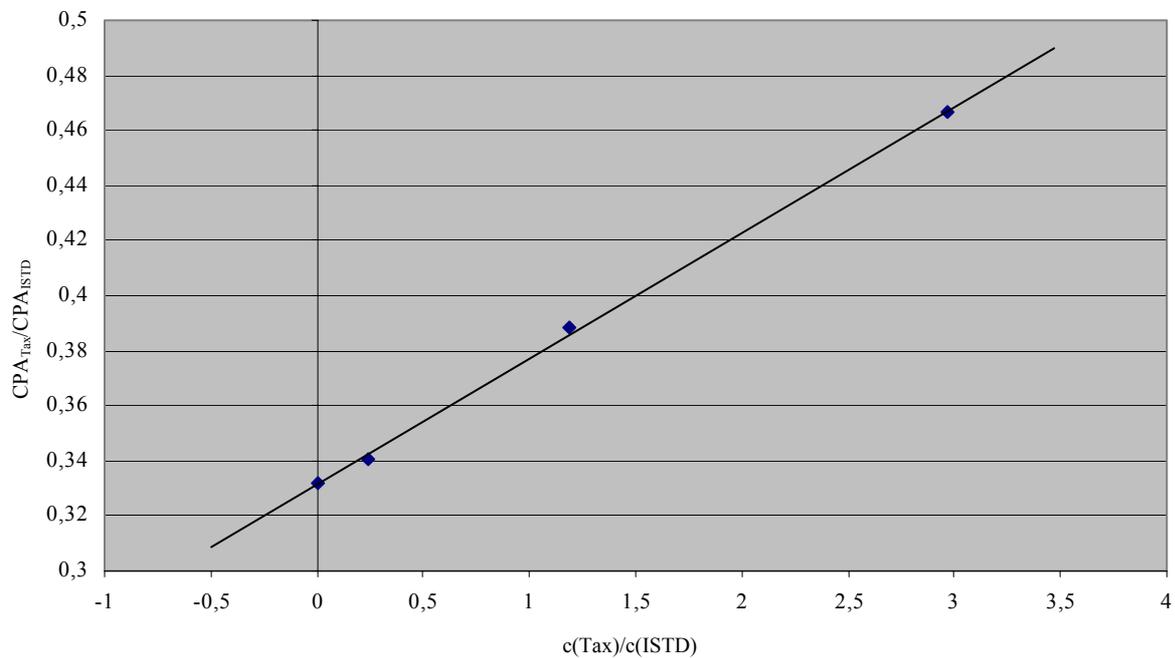


Abb.III.7: SZV von Bambus 1 (Vietnam), Spitze

$$y = 0,0457x + 0,3316 ; r^2 = 0,9992$$

### 3.6.1.3 Bambus2-Stumpf (Vietnam)

Stammlösungen:

Extrakt: 2,0110 mg/20ml

Taxiphyllin: 6,05 mg/ml

ISTD: 1,02 mg/ml

Lösungsmittel: 100 % MeOH

Pipettierschema

	$V$ (ISTD)	$V$ (Extrakt)	$V$ (Tax)	$V$ (MeOH)	$c$ (ISTD)	$c$ (Tax)
A	150	200	350	300	0,0765	1,05875
B	150	200	100	550	0,0765	0,3025
C	150	200	20	630	0,0765	0,0605
D	150	200	0	650	0,0765	0

Tab.III.11: Pipettierschema für das SZV von Bambus 2 (Vietnam), Stumpf

Angaben ( $V$ ) in  $\mu\text{l}$ , ( $c$ ) in mg/ml

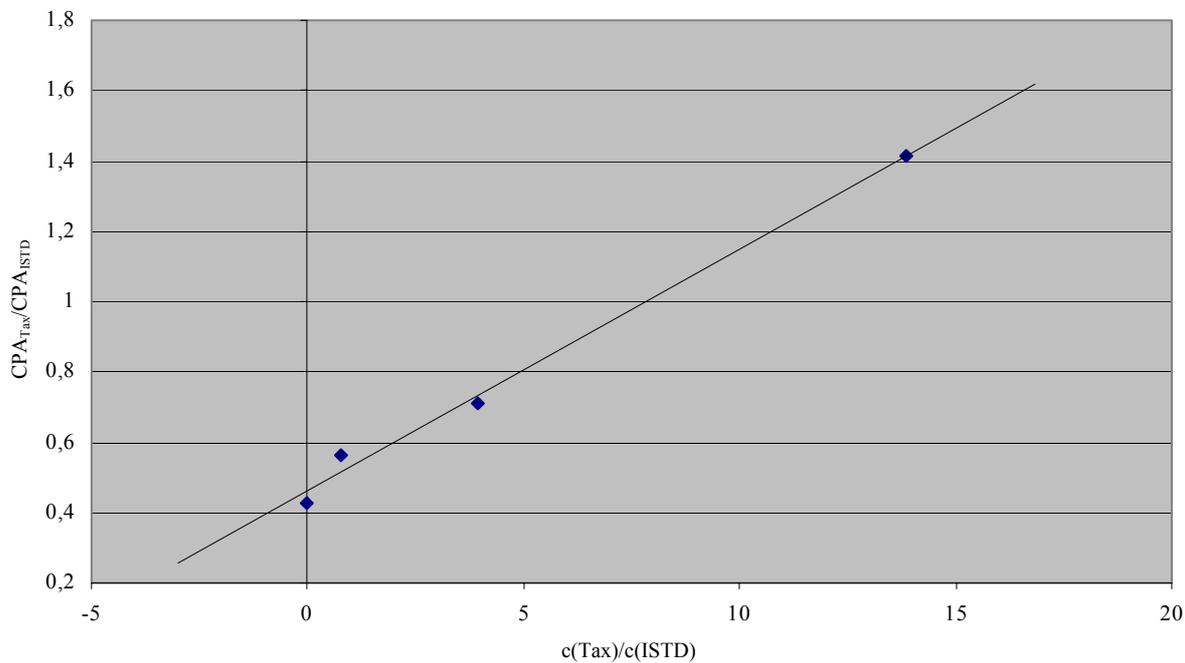


Abb.III.8: SZV von Bambus 2 (Vietnam), Stumpf

$$y = 0,0686x + 0,4613; r^2 = 0,9934$$

### 3.6.2 Bambus2-Spitze (Vietnam)

Stammlösungen:

Extrakt: 1,7196 mg/20ml

Taxiphyllin: 6,05 mg/ml

ISTD: 1,02 mg/ml

Lösungsmittel: 100 % MeOH

Pipettierschema

	$V$ (Extrakt)	$V$ (ISTD)	$V$ (Tax)	$V$ (MeOH)	$c$ (ISTD)	$c$ (Tax)
A	250	400	0	350	0,408	0
B	250	400	20	330	0,408	0,121
C	250	400	100	250	0,408	0,605
D	250	400	250	100	0,408	1,5125

Tab.III.12: Pipettierschema für das SZV von Bambus 2 (Vietnam), Spitze

Angaben (V) in  $\mu\text{l}$ , (c) in mg/ml

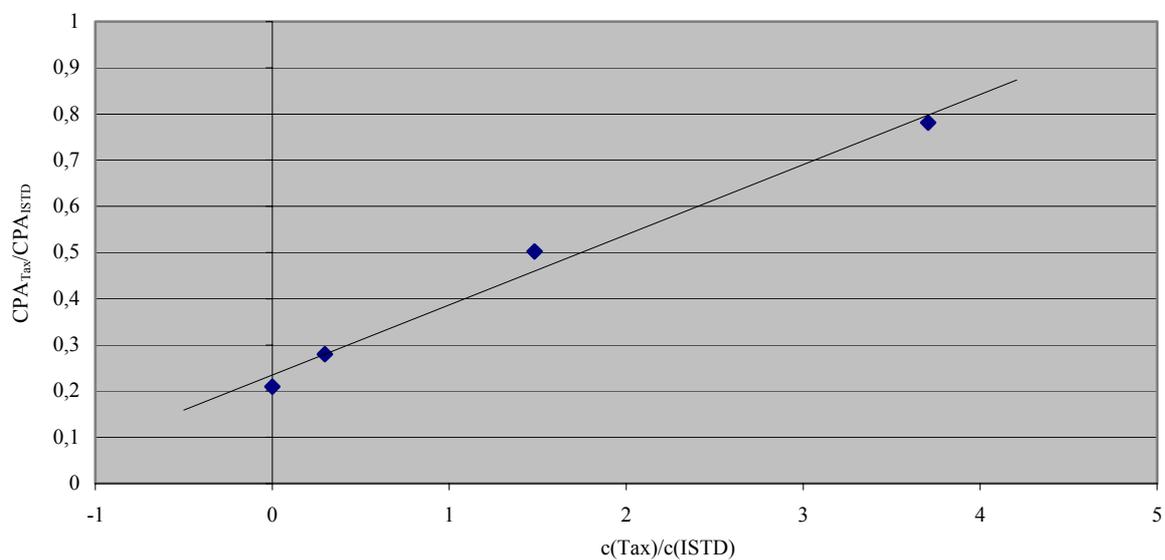


Abb.III.9: SZV von Bambus 2 (Vietnam), Spitze

$$y = 0,1517x + 0,2351; r^2 = 0,9865$$

### 3.6.3 Bambus, ganz, Thailand

Stammlösungen:

Extrakt: 2,7860 mg/20ml

Taxiphyllin: 6,05 mg/ml

ISTD: 1,02 mg/ml

Lösungsmittel: 100 % MeOH

Pipettierschema

	$V$ (Extrakt)	$V$ (ISTD)	$V$ (Tax)	$V$ (MeOH)	$c$ (ISTD)	$c$ (Tax)
A	250	500	0	1250	0,51	0
B	250	500	20	1230	0,51	0,121
C	250	500	100	1150	0,51	0,605
D	250	500	250	1000	0,51	1,5125

Tab.III.13: Pipettierschema für das SZV von Bambus (Thailand)

Angaben ( $V$ ) in  $\mu\text{l}$ , ( $c$ ) in mg/ml

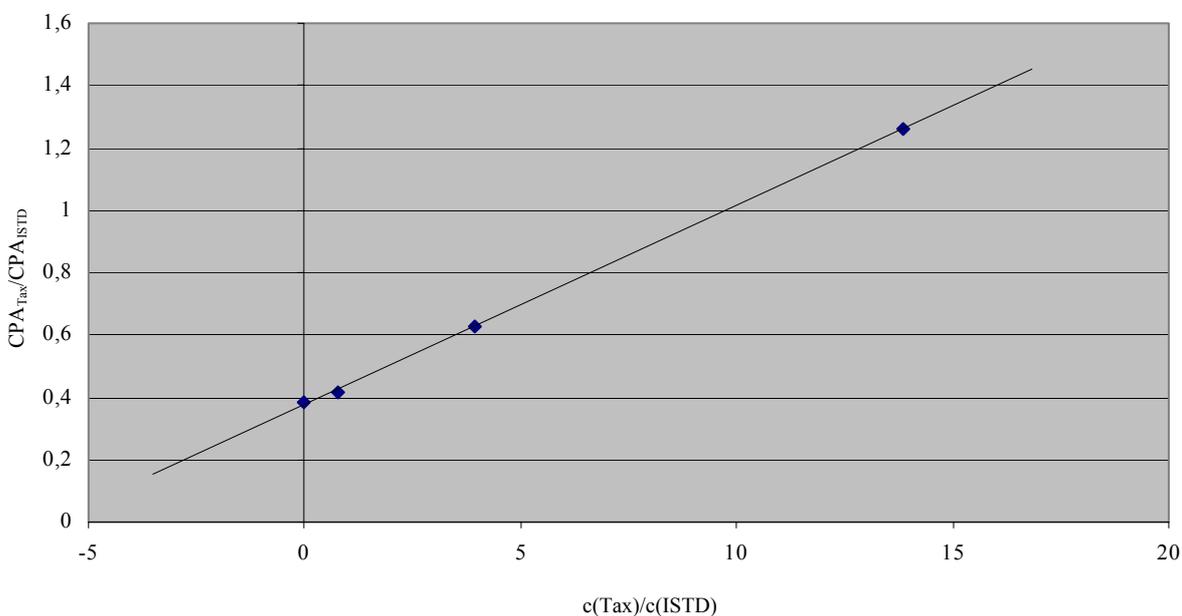


Abb.III.10: SZV von Bambus (Thailand)

$$y = 0,0638x + 0,3760; r^2 = 0,9995$$

### 3.6.4 Eschscholtzia californica

Stammlösungen:

Extrakt: 1,7110 mg/10ml

Triglochinin: 8,09 mg/ml

ISTD: 1,02 mg/ml

Lösungsmittel: 100 % MeOH

Pipettierschema

	$V$ (Extrakt)	$V$ (ISTD)	$V$ (Tri)	$V$ (MeOH)	$c$ (Tri)	$c$ (ISTD)
A	250	200	0	550	0	0,204
B	250	200	50	500	0,20225	0,204
C	250	200	100	450	0,4045	0,204
D	250	200	200	350	0,809	0,204

Tab.III.14: Pipettierschema für das SZV von *Eschscholtzia californica*

Angaben ( $V$ ) in  $\mu\text{l}$ , ( $c$ ) in mg/ml

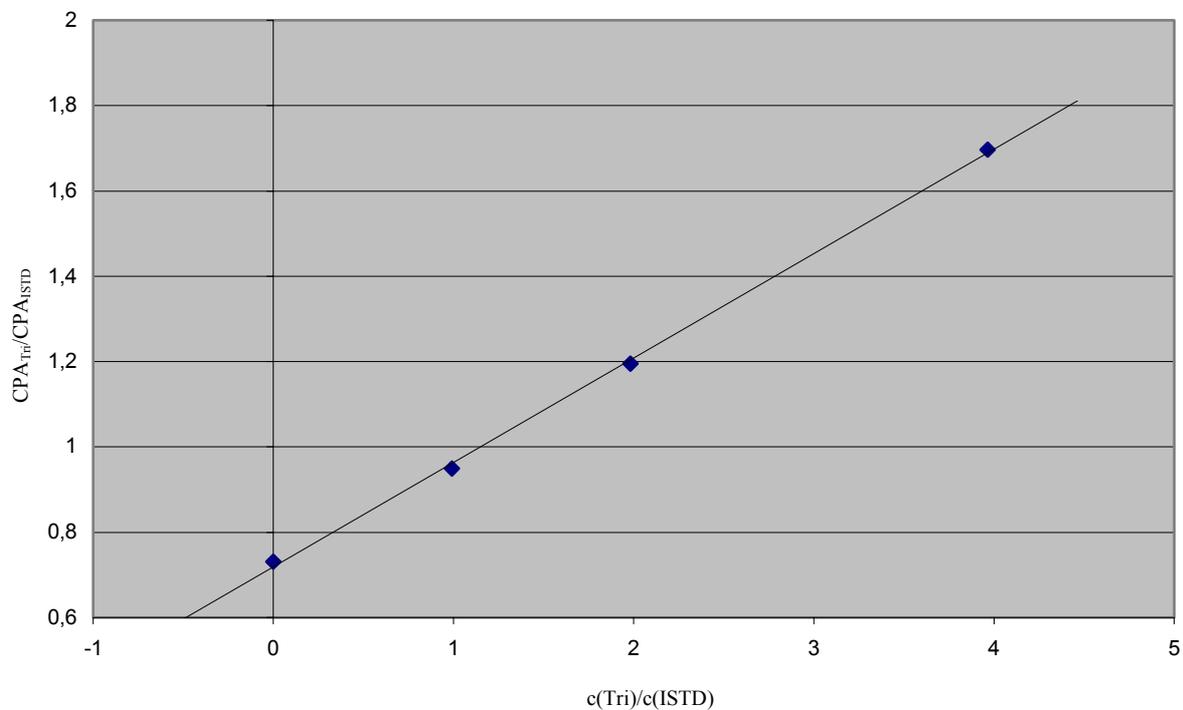


Abb.III.11: SZV von *Eschscholtzia californica*

$$y = 0,2435x + 0,7247; r^2 = 0,9995$$

---

## 4 Holocalin und Zierin

### 4.1 Entwickelte Methode

Für Holocalin und Zierin als einzelnes Epimerenpaar wurde lediglich eine Möglichkeit zu Trennung aufgezeigt, ohne diese Methode zu validieren. Eine validierte Methode wurde zusammen mit Prunasin und Sambunigrin entwickelt.

---

System:	Beckman P/ACE MDQ mit PDA-Detektor
Kapillare:	fused silica, 60/70 cm, I.D. 50 µm
Laufpuffer:	200 mM Natriumtetraborat, pH ~ 9,3 (ohne pH-Einstellung) 1 % α-Cyclodextrin
Injektion:	hydrodynamisch, 5 s bei 0,5 psi
Spannung:	25 kV
Temperatur:	Kapillare 20 °C, Probenkühlelement 10 °C
Detektion:	PDA, Maxplot – Modus bzw. 205 nm

---

*Tab.III.15: etablierte Methode zur Trennung von Holocalin und Zierin*

## 5 Prunasin, Sambunigrin, Amygdalin, Neoamygdalin, Holocalin und Zierin

### 5.1 Validierte Methode

---

System:	Beckman P/ACE 5000 mit UV-Detektor
Kapillare:	fused silica, 60/70 cm I.D. 50 µm
Laufpuffer:	100 mM Acetatpuffer, pH = 5,2 100 mM SDS
Injektion:	hydrodynamisch, 5 s bei 0,5 psi
Spannung:	25 kV
Temperatur:	Kapillare 20 °C
Detektion:	UV-Detektor, 195 und 274 nm

---

*Tab.III.16: etablierte Methode zur Trennung von Prunasin, Sambunigrin, Amygdalin, Neoamygdalin, Holocalin und Zierin*

## 5.2 Methodenentwicklung

Die Herstellung der Puffer ist der Methodenentwicklung für Taxiphyllin, Dhurrin, Triglochinin und seinen Isomeren zu entnehmen.

Da für die Herstellung des Carbonat-Puffers keine Liste zur Verfügung stand, wurde hier ein jeweils  $\text{Na}_3\text{CO}_3$  - bzw.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung der gewünschten Konzentration vorgelegt und mittels pH-Meter auf einen bestimmten pH-Wert eingestellt, die genaue Einstellung des pH-Wertes mittels pH-Meter erfolgte mit NaOH in der dem Puffer entsprechenden Konzentration.

## 5.3 Kalibration für Prunasin und Holocalin

eingesetzte Lösungen:

Prunasin: 6,05 mg/ml

Holocalin: 5,01 mg/ml

ISTD (Nikotinsäure): 1,08 mg/ml

Lösungsmittel:  $\text{H}_2\text{O}$  dest.

### 5.3.1 Pipettierschema

	$V$ (ISTD)	$V$ (Tri)	$V$ (Tax)	$V$ ( $\text{H}_2\text{O}$ )	$c$ (ISTD)	$c$ (Tri)	$c$ (Tax)
<b>A</b>	75	400	400	125	0.081	2.295	2.52
<b>B</b>	75	350	350	225	0.081	1.785	1.96
<b>C</b>	75	250	250	425	0.081	1.275	1.4
<b>D</b>	75	175	175	575	0.081	0.8925	0.98
<b>E</b>	75	100	100	725	0.081	0.51	0.56
<b>F</b>	75	75	75	775	0.081	0.3825	0.42
<b>G</b>	75	50	50	825	0.081	0.255	0.28
<b>H</b>	75	25	25	875	0.081	0.1275	0.14

Tab.III.17: Pipettierschema für die Kalibration von Prunasin und Holocalin

Angaben (V) in  $\mu\text{l}$ , (c) in mg/ml

### 5.3.2 Kalibrationsgeraden

#### 1. Prunasin

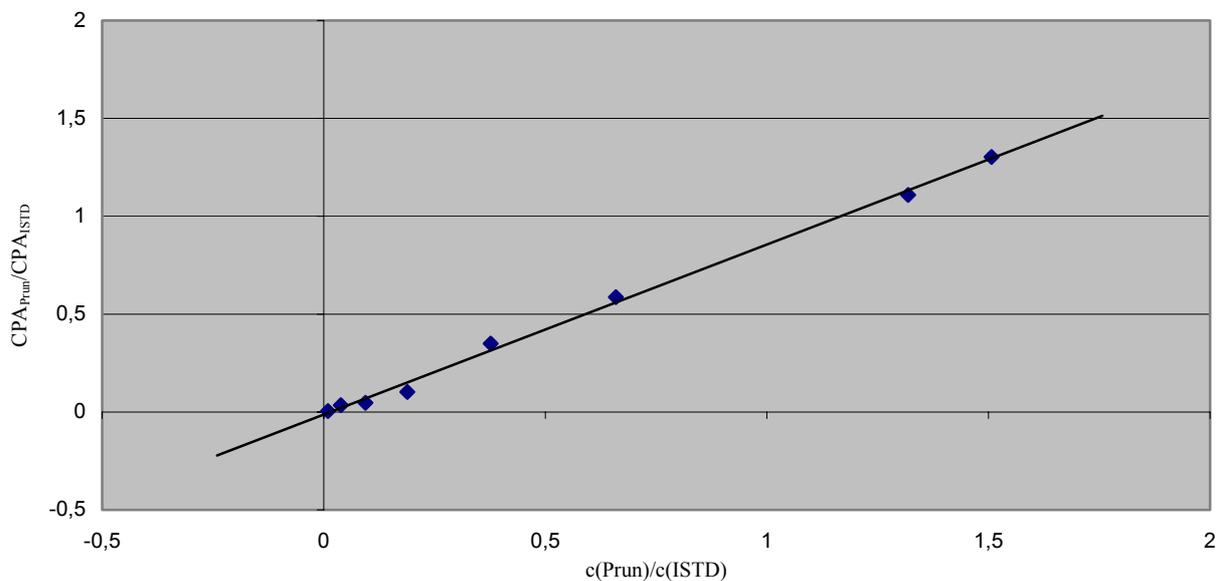


Abb.III.12a: Kalibrationsgerade Prunasin

Geradengleichung:  $y = 0,8687x - 0,0131$ ;  $r^2 = 0,996$

#### 2. Holocalin

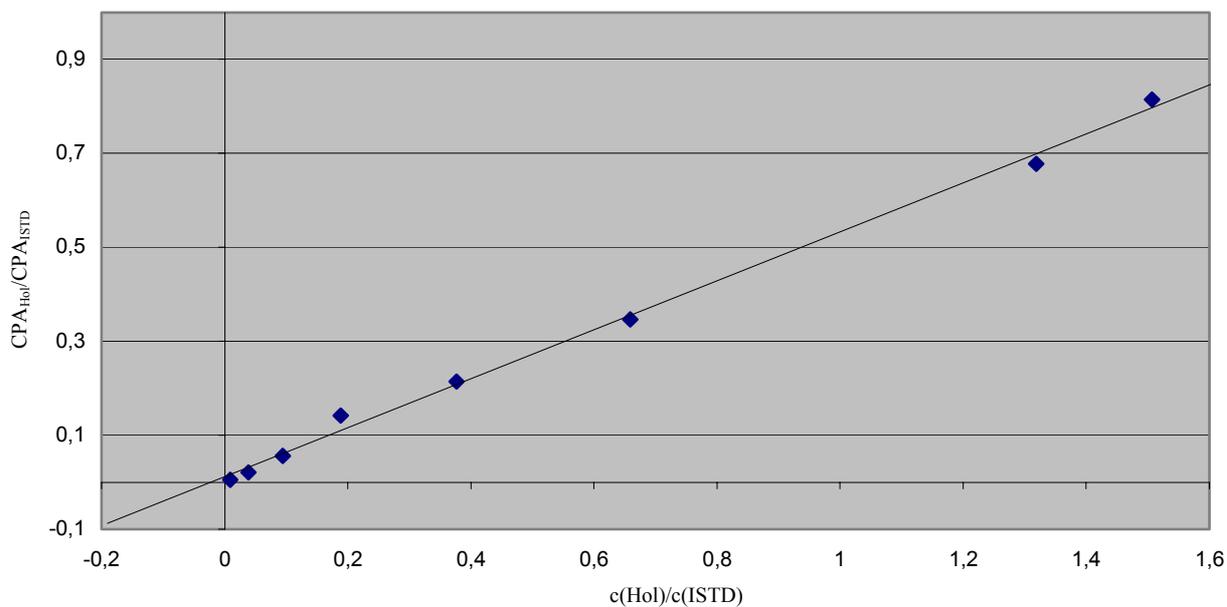


Abb.III.12b: Kalibrationsgerade Holocalin

Geradengleichung:  $y = 0,5214x + 0,0116$ ;  $r^2 = 0,9967$

## 5.4 Daten zur Richtigkeit und Präzision für Holocalin und Prunasin

Richtigkeit und Präzision der Methode wurden für Prunasin und Holocalin jeweils an drei verschiedenen Tagen in vier unterschiedlichen Konzentrationen, die den gesamten Kalibrationsbereich abdecken, bestimmt. Hierzu wurden mit frisch hergestellten Stammlösungen der Referenzsubstanzen Kalibrierlösungen pipettiert, mit internem Standard versetzt und jeweils fünfmal injiziert und analysiert.

### 5.4.1 Pipettierschema

Einwaagen:

ISTD (Nikotinsäure): 1,0 mg/ml

Prunasin: 5,0 mg/ml

Holocalin: 5,05 mg/ml

Lösungsmittel: H<sub>2</sub>O dest.

	<i>V (ISTD)</i>	<i>V (Tri)</i>	<i>V (Tax)</i>	<i>V (H<sub>2</sub>O)</i>	<i>c (ISTD)</i>	<i>c (Tri)</i>	<i>c (Tax)</i>
A	75	250	250	425	0,075	1,25	1,25
B	75	100	100	725	0,075	0,5	0,5
C	75	25	25	875	0,075	0,1	0,1
D	75	5	5	915	0,075	0,025	0,025

Tab.III.18: Pipettierschema für die Bestimmung von Richtigkeit und Präzision von Prunasin und Holocalin

Angaben (V) in µl, (c) in mg/ml

Die graphische Darstellung ebenso wie die Diskussion der experimentell ermittelten Daten sind dem Speziellen Teil unter 8.3 zu entnehmen. Untenstehend werden die ermittelten Daten nur tabellarisch aufgelistet.

Richtigkeit/Präzision Prunasin

Sollkonzentration Prunasin				
	0,03775 mg/ml	0,3775 mg/ml	0,755 mg/ml	1,3213 mg/ml
Gefundene Konzentration (arithmetischer Mittelwert) [mg/ml]				
1. Tag (n=5)	0,03695	0,4043	0,7762	1,3932
2. Tag (n=5)	0,03620	0,3895	0,8042	1,4131
3. Tag (n=5)	0,03907	0,4035	0,7525	1,3360
Interday (n=15)	0,03740	0,3991	0,7776	1,3808

## Richtigkeit (arithmetischer Mittelwert) [%]

1. Tag (n=5)	97,9	107,1	102,8	105,4
2. Tag (n=5)	95,9	103,2	106,5	106,9
3. Tag (n=5)	103,5	106,9	99,7	101,1
Interday (n=15)	99,1	105,7	103,0	104,5

## Präzision (relative Standardabweichung) [%]

1. Tag (n=5)	2,8	2,7	7,6	2,9
2. Tag (n=5)	8,1	6,1	3,8	6,4
3. Tag (n=5)	3,5	5,3	4,2	4,7
Interday (n=15)	4,7	3,6	5,6	5,8

Tab.III.19: Daten zu Richtigkeit und Präzision für Prunasin

## Richtigkeit/Präzision Holocalin

## Sollkonzentration Holocalin

0,03775 mg/ml	0,3775 mg/ml	0,755 mg/ml	1,3213 mg/ml
---------------	--------------	-------------	--------------

## Gefundene Konzentration (arithmetischer Mittelwert) [mg/ml]

1. Tag (n=5)	0,03537	0,3545	0,7564	1,3181
2. Tag (n=5)	0,03729	0,3639	0,6981	1,2667
3. Tag (n=5)	0,03952	0,3669	0,7012	1,3013
Interday (n=15)	0,03739	0,36177	0,7186	1,2954

## Richtigkeit (arithmetischer Mittelwert) [%]

1. Tag (n=5)	93,7	93,9	100,2	99,8
2. Tag (n=5)	98,8	96,4	92,5	95,9
3. Tag (n=5)	104,7	97,2	92,9	98,5
Interday (n=15)	99,1	95,8	95,2	98,0

## Präzision (relative Standardabweichung) [%]

1. Tag (n=5)	4,2	4,2	4,3	5,3
2. Tag (n=5)	2,9	3,8	4,6	6,7
3. Tag (n=5)	4,0	4,3	2,2	4,2
Interday (n=15)	7,8	5,8	7,6	6,1

Tab.III.20: Daten zu Richtigkeit und Präzision für Holocalin

## 5.5 Daten zur Untersuchung der Extrakte

Die Extrakte wurden nach dem Standardzusatzverfahren analysiert. Hierbei wird der Extrakt mit einer gleich bleibenden, definierten Menge an internem Standard (Salicylsäure) und steigenden Konzentrationen des zu bestimmenden cyanogenen Glykosids versetzt. Die vier so hergestellten Lösungen wurden jeweils fünfmal injiziert.

### 5.5.1 Holunder

Stammlösungen:

Extrakt: 5,8199 mg/10ml

Prunasin: 7,7 mg/ml

ISTD: 10,0 mg/ml

Lösungsmittel: 100 % MeOH

#### Pipettierschema

	$V(\text{Extrakt})$	$V(\text{ISTD})$	$V(\text{Prun})$	$V(\text{MeOH})$	$c(\text{Prun})$	$c(\text{ISTD})$
A	500	100	0	150	1,3333	0
B	500	100	10	140	1,3333	0,1026
C	500	100	25	125	1,3333	0,2565
D	500	100	50	100	1,3333	0,513

Tab.III.21: Pipettierschema für das SZV von *Sambucus nigra*

Angaben (V) in  $\mu\text{l}$ , (c) in mg/ml

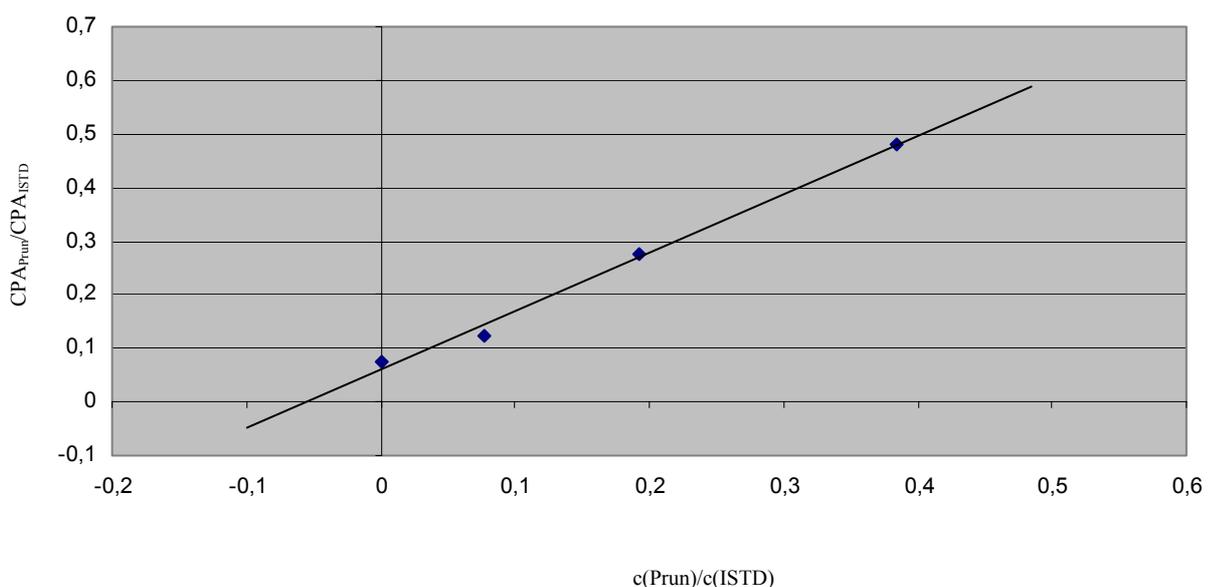


Abb.III.13: SZV von *Sambucus nigra*

$$y = 1,0852x + 0,062, r^2 = 0,9930$$

### 5.5.2 *Holocalyx balansae*

Stammlösungen:

Extrakt: 2,0548 mg/10ml

Prunasin: 7,7 mg/ml

ISTD: 10,0 mg/ml

Lösungsmittel: 100 % MeOH

#### Pipettierschema

	$V$ (Extrakt)	$V$ (ISTD)	$V$ (Prun)	$V$ (MeOH)	$c$ (Prun)	$c$ (ISTD)
A	750	50	0	200	0,51	1,6
B	750	50	50	150	0,51	1,2
C	750	50	100	100	0,51	0,8
D	750	50	200	0	0,51	0

Tab.III.22: Pipettierschema für das SZV von *Holocalyx balansae*

Angaben (V) in  $\mu\text{l}$ , (c) in mg/ml

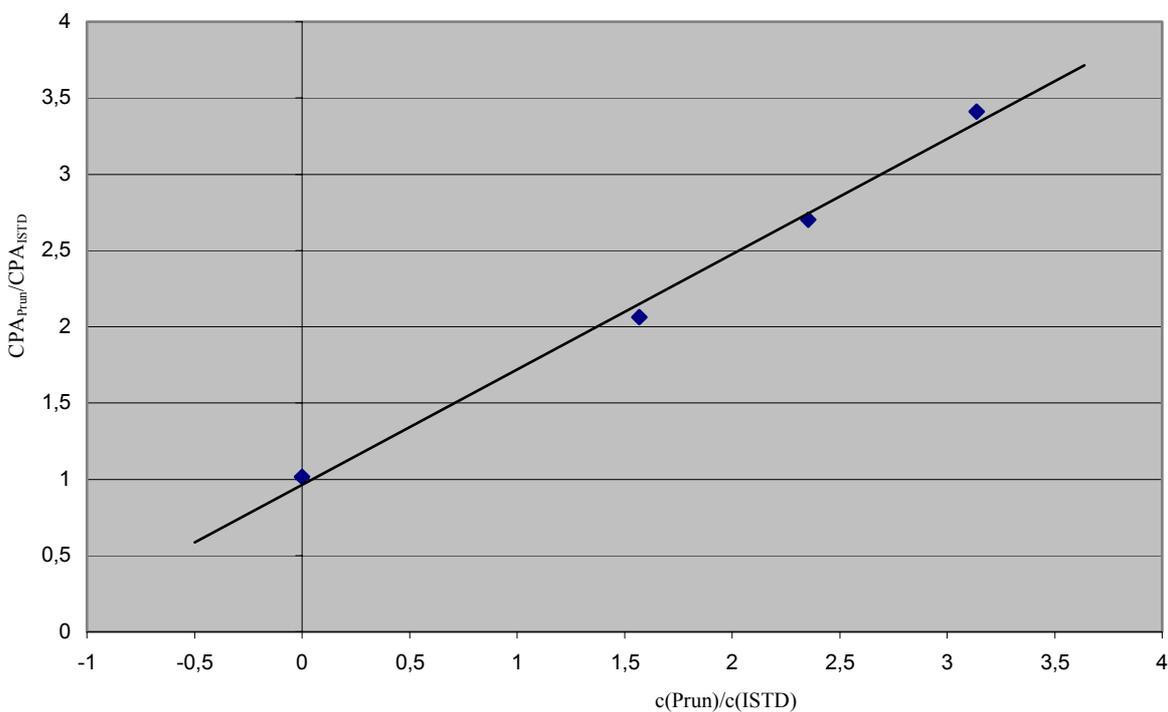


Abb.III.14: SZV von *Holocalyx balansae*

$$y = 0,7563x + 0,9636, r^2 = 0,9944$$

## 6 Linamarin, Lotaustralin, Linustatin, Neolinustatin

### 6.1 Validierte Methode

System:	Waters 2690 Alliance™ separations module
Säule:	Nucleosil 300-5-C4, 150 x 4 mm
Fließmittel:	MeOH/H <sub>2</sub> O/MeCN-Gradient
Flow:	0,5 ml/min
Injektion:	2 – 20 µl
Temperatur:	Säule 20 °C, Autosampler nicht temperiert
Detektion:	PDA 238 nm, Fluoreszenz-Det.: ex: 234 nm, ex: 374 nm

Tab.III.23: etablierte HPLC-Methode zur Trennung von Linamarin, Lotaustralin, Linustatin und Neolinustatin

Gradient:	Time [min]	Flow [ml/min]	MeOH	H <sub>2</sub> O	MeCN
	0	0,5	60	40	0
	40	0,5	75	25	0
	45	0,5	80	10	10
	50	0,5	80	10	10
	55	0,5	85	5	10
	57	0,5	85	5	10
	60	0,5	60	40	0
	65	0,5	60	40	0

Tab.III.24: Fließmittel-Gradient der etablierten Methode

### 6.2 HPLC-Methodenentwicklung

Weitere HPLC-Gradienten wurden im Laufe der Methodenentwicklung ausgetestet. Hierbei wurde versucht, die Trennung durch den Zusatz weiterer, die Polarität beeinflussende Lösungsmittel zu optimieren. Aufgeführt werden die Gradienten zu den Abbildungen im Speziellen Teil, s. dort **10.5**.

### 6.2.1 MeOH-H<sub>2</sub>O-Gradient

Gradient 1:	<i>time [min]</i>	<i>Flow [ml/min]</i>	<i>MeOH</i>	<i>H<sub>2</sub>O</i>
	0	0,5	60	40
	5	0,5	60	40
	10	0,5	70	30
	35	0,5	80	20
	45	0,5	83	17
	50	0,5	83	17
	55	0,5	60	40
	60	0,5	60	40

*Tab.III.25: MeOH-H<sub>2</sub>O-Gradient*

### 6.2.2 MeCN-(H<sub>2</sub>O/0,1 %TFA)-Isopropanol-Gradient

Gradient 2:	<i>time [min]</i>	<i>Flow [ml/min]</i>	<i>MeCN</i>	<i>H<sub>2</sub>O/0,1 % TFA</i>	<i>Isopropanol</i>
	0	0,5	55	35	5
	10	0,5	60	30	10
	50	0,5	98	1	1
	58	0,5	55	35	5
	60	0,5	55	35	5

*Tab.III.26: MeCN-H<sub>2</sub>O/0,1 %TFA-Isopropanol-Gradient*

## 6.3 Kalibration für Linamarin

eingesetzte Lösungen:

Linamarin: 2,4 mg/10 ml

ISTD (Erythrol): 2,5 mg/10 ml

Lösungsmittel: Acetonitril

### 6.3.1 Pipettier-Schema Kalibration

	<i>V (ISTD)</i>	<i>V (Linamarin)</i>	<i>V (MeCN)</i>	<i>c (ISTD)</i>	<i>c (Lina)</i>	<i>c(ISTD/LIN)</i>
A	20 µl (1:1000)	20µl (1:1000)	60µl	5,00	4,80	0,96
B	20 µl (1:1000)	7,5µl (1:1000)	72,5µl	5,00	1,8	0,36
C	20 µl (1:1000)	25µl (1:10000)	55µl	5,00	0,6	0,12
D	20 µl (1:1000)	12,5µl (1:10000)	67,5µl	5,00	0,3	0,06
E	20 µl (1:1000)	6µl (1:10000)	74µl	5,00	0,144	0,0288
F	20 µl (1:1000)	2,5µl (1:10000)	77,5µl	5,00	0,06	0,012

Tab.III.27: Pipettierschema für die Kalibration von Linamarin

Angaben (V) in µl, (c) in ng/ml

### 6.3.2 Kalibrationsgerade Linamarin

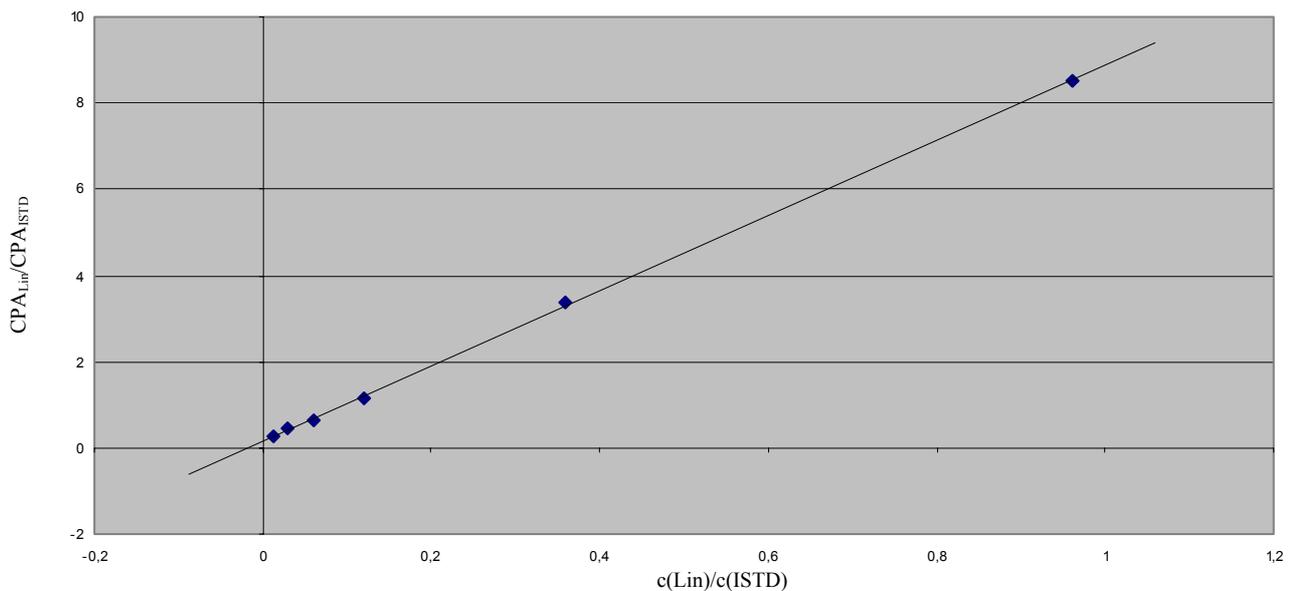


Abb.III.15: Kalibrationsgerade von Linamarin (Naphthoyl-Derivat)

Geradengleichung:  $y = 8,744x + 0,1483$ ,  $r^2 = 0,9998$

## 6.4 Daten zur Richtigkeit und Präzision für Linamarin

Richtigkeit und Präzision der Methode wurden für Linamarin jeweils an drei verschiedenen Tagen in vier unterschiedlichen Konzentrationen, die den gesamten Kalibrationsbereich abdecken, bestimmt. Hierzu wurden mit frisch hergestellten Stammlösungen der Referenzsubstanzen Kalibrierlösungen pipettiert, mit internem Standard versetzt und jeweils fünfmal injiziert und analysiert.

### 6.4.1 Pipettierschema

Einwaagen:

Linamarin: 1,0 mg/10 ml

ISTD (Erythrol): 2,5 mg/10 ml

Lösungsmittel: Acetonitril

	$V$ (ISTD)	$V$ (Linamarin)	$V$ (MeCN)	$c$ (ISTD)	$c$ (Lina)	$c$ (Lin/ISTD)
A	25 $\mu$ l (1:1000)	25 $\mu$ l (1:1000)	50 $\mu$ l	6,25	2,5	0,768
B	25 $\mu$ l (1:1000)	12,5 $\mu$ l (1:1000)	62,5 $\mu$ l	6,25	1,25	0,288
C	25 $\mu$ l (1:1000)	50 $\mu$ l (1:10000)	25 $\mu$ l	6,25	0,5	0,096
D	25 $\mu$ l (1:1000)	10 $\mu$ l (1:10000)	65 $\mu$ l	6,25	0,1	0,048

Tab.III.28: Pipettierschema für Richtigkeit und Präzision

Angaben (V) in  $\mu$ l, (c) in ng/ml

#### Richtigkeit/Präzision Linamarin

	Sollkonzentration Linamarin [ng/ $\mu$ l]			
	0,1 ng/ml	0,5 ng/ml	1,25 ng/ml	2,5 ng/ml
Gefundene Konzentration (arithmetischer Mittelwert) [ng/ $\mu$ l]				
1. Tag (n=5)	0,0976	0,4811	1,2824	2,5025
2. Tag (n=5)	0,1019	0,4915	1,2625	2,4912
3. Tag (n=5)	0,1041	0,5155	1,2976	2,4924
Interday (n=15)	0,1012	0,496	1,2813	2,505
Richtigkeit (arithmetischer Mittelwert) [%]				
1. Tag (n=5)	97,6	96,2	102,6	100,1
2. Tag (n=5)	101,9	98,3	101	99,6
3. Tag (n=5)	104,1	103,1	103,8	99,7
Interday (n=15)	101,2	99,2	102,5	99,8
Präzision (relative Standardabweichung) [%]				
1. Tag (n=5)	2,9	2,6	1,9	3,4
2. Tag (n=5)	3,1	3,5	0,8	1,2
3. Tag (n=5)	3,7	1,6	3	2,7
Interday (n=15)	3,2	2,6	1,9	2,4

Tab.III.29: Daten zu Richtigkeit und Präzision für Linamarin

## 6.5 Daten zur Untersuchung der Extrakte

Alle Extrakte außer den unter **6.5.1** beschriebenen wurden nach dem Standardzusatzverfahren analysiert. Hierbei wird der Extrakt mit einer gleich bleibenden, definierten Menge an internem Standard (Naphthoyl-Derivat von Erythrol) und steigenden Konzentrationen des zu bestimmenden cyanogenen Glykosids (Naphthoyl-Derivat von Linamarin) versetzt. Die fünf so hergestellten Lösungen wurden jeweils fünfmal injiziert. Der Gehalt an cyanogenen Glykosiden wurde anschließend über die so erhaltenen Geraden errechnet.

### 6.5.1 Untersuchungen zur Extrahierbarkeit

Die Untersuchungen an Maniok zur Extrahierbarkeit der cyanogenen Glykoside Linamarin und Lotaustralin in Anwesenheit großer Mengen von Stärke wurden folgendermaßen durchgeführt: Zunächst wurden verschiedene Extrakte nach den Beschreibungen unter **2.4.1** hergestellt und dann umgesetzt mit Naphthoylimidazol. Der derivatisierte Extrakt wurde analysiert, um den Gehalt an cyanogenen Glykosiden abzuschätzen und die optimale Zugabe an internem Standard. Nach Zugabe des ISTD (Naphthoylderivat des Erythrols) wurde jede Probe fünfmal injiziert. Der Gehalt an cyanogenen Glykosiden wurde über die unter **6.3** angegebene Kalibrationsgerade für Linamarin berechnet.

Einwaagen für die verschiedenen Extraktionsweisen:

<i>Extraktionsweise</i>	<i>Einwaage</i>
M100: 100 % MeOH	1,9633 mg/10ml
M80: 80 % MeOH, 20 % EtOAc	1,9524 mg/10ml
M50: 50 % MeOH, 50 % EtOAc	1,8277 mg/10ml
MSOX: 19 % MeOH, 81 % EtOAc	1,4601 mg/10ml

*Tab.III.30: Einwaagen für die Untersuchungen zur Extrahierbarkeit*

### 6.5.2 Leinsamen

Stammlösungen:

Extrakt: 2,0548 mg/10ml

Linamarin: 2,4 mg/10ml

ISTD: 2,5 mg/10ml

Lösungsmittel: Acetonitril

#### Pipettierschemata

	$V$ (ISTD)	$V$ (Linamarin)	$V$ (Extrakt)	$V$ (MeCN)	$c$ (ISTD)	$c$ (Lina)
A	50 $\mu$ l (1:1000)	25 $\mu$ l (1:1000)	50 $\mu$ l (1:1000)	25 $\mu$ l	12,5	2,5
B	50 $\mu$ l (1:1000)	12,5 $\mu$ l (1:1000)	50 $\mu$ l (1:1000)	37,5 $\mu$ l	12,5	1,25
C	50 $\mu$ l (1:1000)	50 $\mu$ l (1:10000)	50 $\mu$ l (1:1000)	/	12,5	0,5
D	50 $\mu$ l (1:1000)	10 $\mu$ l (1:10000)	50 $\mu$ l (1:1000)	40 $\mu$ l	12,5	0,1
E	50 $\mu$ l (1:1000)	/	50 $\mu$ l (1:1000)	50 $\mu$ l	12,5	

Tab.III.31: Pipettierschema für das SZV von Leinsamen

Angaben (V) in  $\mu$ l, (c) in ng/ml

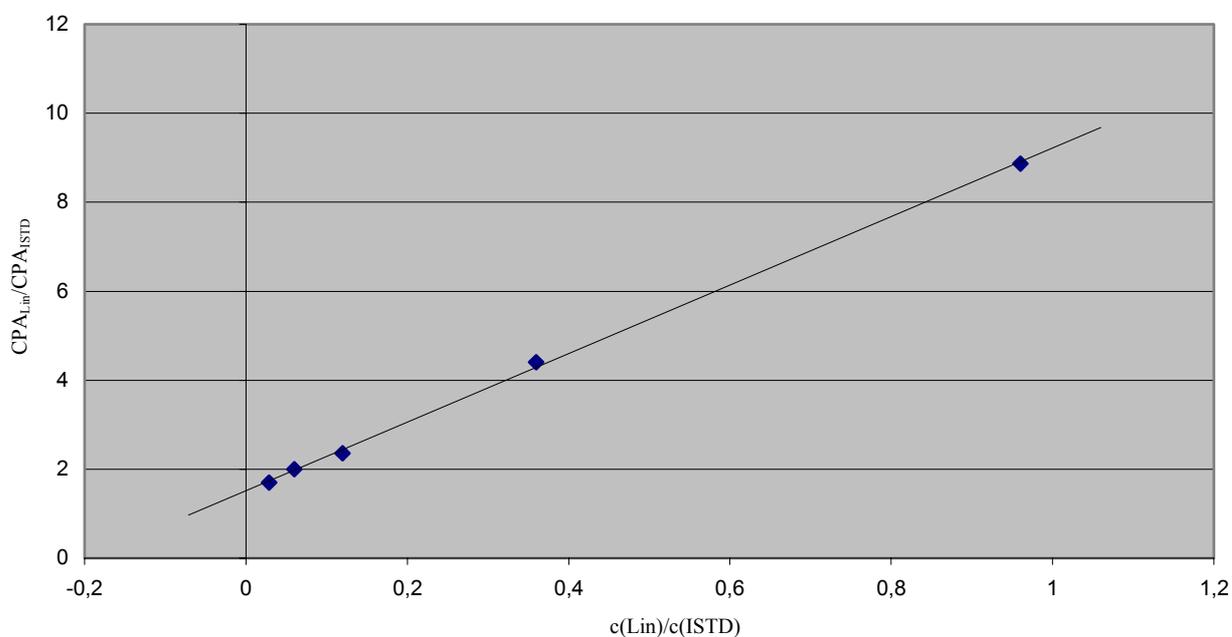


Abb.III.16: SZV von Leinsamen

$$y = 7,6989x + 1,5137, r^2 = 0,9994$$

### 6.5.3 Limabohne

Stammlösungen:

Extrakt: 2,0154 mg/10ml

Linamarin: 2,4 mg/10ml

ISTD: 2,5 mg/10ml

Lösungsmittel: Acetonitril

Pipettierschemata

	$V$ (ISTD)	$V$ (Linamarin)	$V$ (Extrakt)	$V$ (MeCN)	$c$ (ISTD)	$c$ (Lina)
A	50 $\mu$ l (1:1000)	25 $\mu$ l (1:1000)	50 $\mu$ l (1:100)	25 $\mu$ l	12,5	2,5
B	50 $\mu$ l (1:1000)	12,5 $\mu$ l (1:1000)	50 $\mu$ l (1:100)	37,5 $\mu$ l	12,5	1,25
C	50 $\mu$ l (1:1000)	50 $\mu$ l (1:10000)	50 $\mu$ l (1:100)	/	12,5	0,5
D	50 $\mu$ l (1:1000)	10 $\mu$ l (1:10000)	50 $\mu$ l (1:100)	40 $\mu$ l	12,5	0,1
E	50 $\mu$ l (1:1000)	/	50 $\mu$ l (1:100)	50 $\mu$ l	12,5	

Tab.III.32: Pipettierschema für das SZV von Limabohne

Angaben (V) in  $\mu$ l, (c) in ng/ml

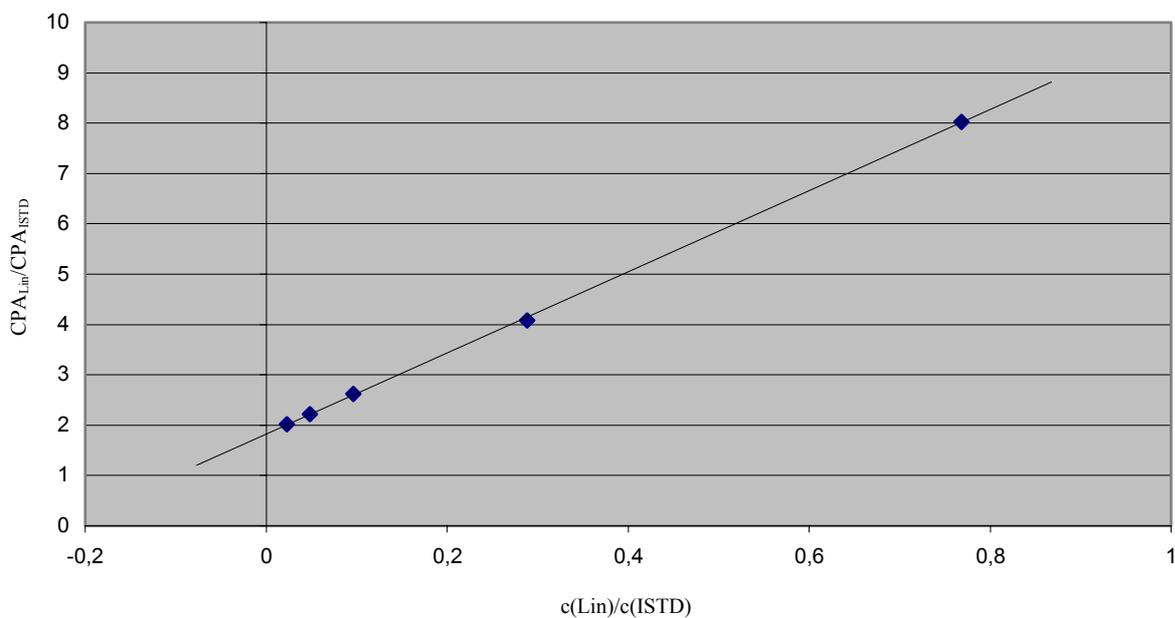


Abb.III.17: SZV von Limabohne

$$y = 8,0564x + 1,8213, r^2 = 0,9998$$

### 6.5.4 Maniok Thailand

Stammlösungen:

Extrakt: 2,4125 mg/10ml

Linamarin: 2,4 mg/10ml

ISTD: 2,5 mg/10ml

Lösungsmittel: Acetonitril

#### Pipettierschemata

	$V$ (ISTD)	$V$ (Linamarin)	$V$ (Extrakt)	$V$ (MeCN)	$c$ (ISTD)	$c$ (Lina)
A	50 $\mu$ l (1:1000)	25 $\mu$ l (1:1000)	50 $\mu$ l (1:100)	25 $\mu$ l	12,5	2,5
B	50 $\mu$ l (1:1000)	12,5 $\mu$ l (1:1000)	50 $\mu$ l (1:100)	37,5 $\mu$ l	12,5	1,25
C	50 $\mu$ l (1:1000)	50 $\mu$ l (1:10000)	50 $\mu$ l (1:100)	/	12,5	0,5
D	50 $\mu$ l (1:1000)	10 $\mu$ l (1:10000)	50 $\mu$ l (1:100)	40 $\mu$ l	12,5	0,1
E	50 $\mu$ l (1:1000)	/	50 $\mu$ l (1:100)	50 $\mu$ l	12,5	

Tab.III.33: Pipettierschema für das SZV von Maniok (Thailand)

Angaben (V) in  $\mu$ l, (c) in ng/ml

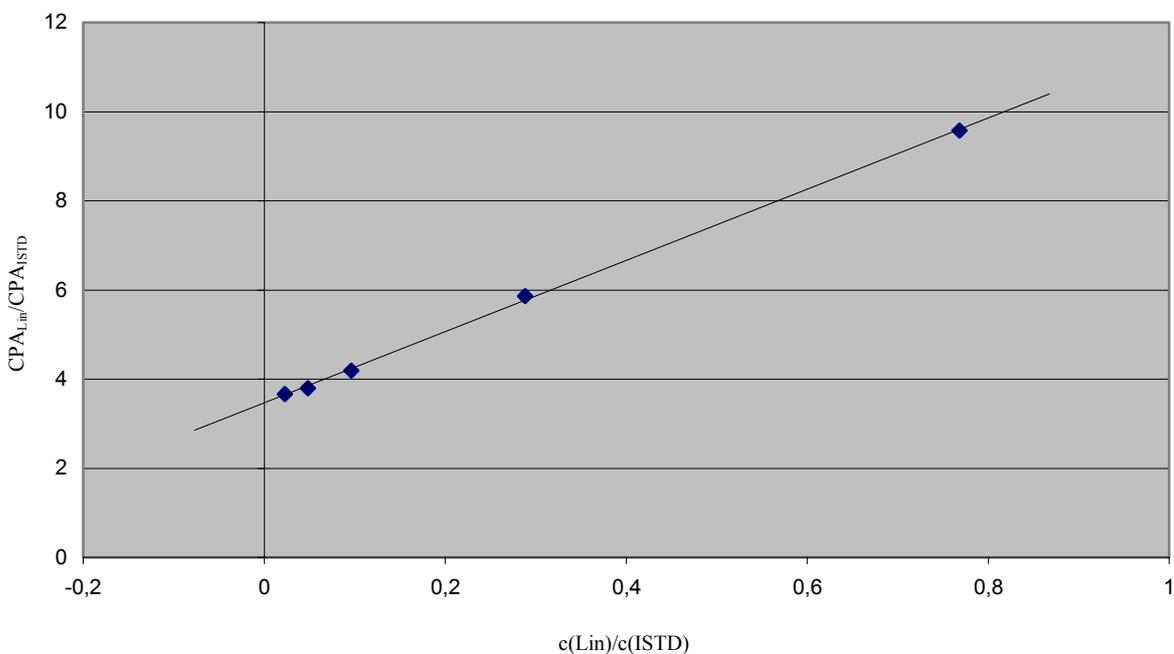


Abb.III.18: SZV von Maniok (Thailand)

$$y = 7,9896x + 3,4655, r^2 = 0,9994$$

### 6.5.5 Maniok Brasilien

Stammlösungen:

Extrakt: 2,2339 mg/10ml

Linamarin: 2,4 mg/10ml

ISTD: 2,5 mg/10ml

Lösungsmittel: Acetonitril

Pipettierschemata

	$V$ (ISTD)	$V$ (Linamarin)	$V$ (Extrakt)	$V$ (MeCN)	$c$ (ISTD)	$c$ (Lina)
A	50 $\mu$ l (1:1000)	25 $\mu$ l (1:1000)	50 $\mu$ l (1:100)	25 $\mu$ l	12,5	2,5
B	50 $\mu$ l (1:1000)	12,5 $\mu$ l (1:1000)	50 $\mu$ l (1:100)	37,5 $\mu$ l	12,5	1,25
C	50 $\mu$ l (1:1000)	50 $\mu$ l (1:10000)	50 $\mu$ l (1:100)	/	12,5	0,5
D	50 $\mu$ l (1:1000)	10 $\mu$ l (1:10000)	50 $\mu$ l (1:100)	40 $\mu$ l	12,5	0,1
E	50 $\mu$ l (1:1000)	/	50 $\mu$ l (1:100)	50 $\mu$ l	12,5	

Tab.III.34: Pipettierschema für das SZV von Maniok (Brasilien)

Angaben (V) in  $\mu$ l, (c) in ng/ml

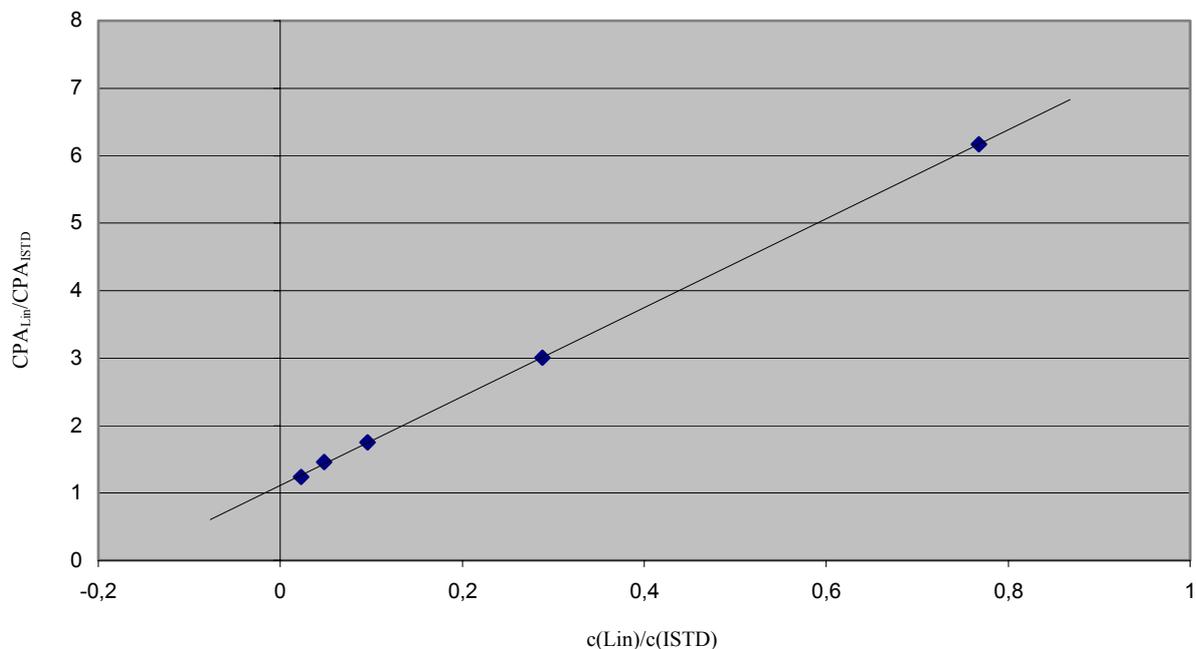


Abb.III.19: SZV von Maniok (Brasilien)

$$y = 6,5872x + 1,1143, r^2 = 0,9999$$

## 6.6 CE-Methodenentwicklung für die Derivate

### 6.6.1 Puffer

Zur Herstellung der Borat- und Phosphatpuffer s. 3.2. Abweichend von der dortigen Arbeitsvorschrift wurde der Phosphat-Puffer nicht mit reinem H<sub>2</sub>O hergestellt, sondern mit 90 %igem MeOH.

### 6.6.2 Mikroemulsion (nach ALTRIA, 1999)

0,81 % (w/w) Octanol

6,61 % (w/w) Butan-1-ol

3,31 % (w/w) SDS

89,27 % (w/w) 10 mM Na<sub>2</sub>B<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (H<sub>2</sub>O bidest.)

## 7 Blausäure-Bestimmungen

### 7.1 Quantitative Blausäurebestimmung

Die Cyanglykosidhaltigen Rohextrakte wurden in methanolischer Lösung in das Zentrum einer Conwaykammer eingebracht. Diese besteht aus zwei konzentrischen Glasbehältnissen, von denen das äussere gasdicht verschlossen wird.

Nach Abdampfen des Lösungsmittels im inneren Ring wurde der Rückstand in Phosphat-Citratpuffer pH 6 aufgenommen, mit einer Enzymlösung versetzt und 24h bei 39°C in der verschlossenen Conwaykammer inkubiert. Die freigesetzte Blausäure diffundiert in eine im äusseren Ring befindliche 1 N Natronlaugefalle und wird somit als Natriumcyanid gebunden. Die alkalische Falle wird quantitativ in einen 10 ml Kolben überführt und mit der Farbreaktion nach ALDRIGE [ALDRIGE, 1944], modifiziert nach NAHRSTEDT [NAHRSTEDT, 1977], kolorimetrisch bestimmt (s. *Abb.III.11*).

Zur quantitativen Cyanglykosidbestimmung wurde eine Präparation aus 20 mg „Roehm-Enzym“ in 10 ml Phosphat-Citrat-Puffer pH 6 eingesetzt. Zur Validierung des Cyanidtests wurde HCN aus bekannten Mengen Kaliumcyanid freigesetzt, mit der modifizierten Aldrige-Methode umgesetzt und der Gehalt mit einer Kalibrationsgeraden bestimmt.

Durchführung der Farbreaktion (ALDRIGE, modifiziert nach NAHRSTEDT, 1977; ABS-Methode; Entstehung eines König'schen Salzes):

- Die CN<sup>-</sup>-haltige Laugenfalle aus der Conwaykammer wird quantitativ in einen 10ml-Messkolben überführt.
- Zugabe von 2 Tropfen Methylrotlösung (0,02 % in Ethanol); tropfenweise Zugabe von 1N-Salzsäure bis zum Farbumschlag.
- Zugabe von 0,5 ml gesättigtem Bromwasser; 5 min warten.
- Zugabe von 0,5 ml 5 %iger Ascorbinsäurelösung, 5 min warten.
- Zugabe von 3,5 ml einer Mischung von 1 Teil 2-Aminobenzoesäurelösung (6,85 g 2-ABS in 24 ml Salzsäure 25 %, mit Wasser auf 100,0 ml aufgefüllt) und 4 Teilen Pyridinreagenz (350 ml Pyridin gemischt mit 50 ml Salzsäure 37 %).
- Auffüllen des Messkolbens bis zur Eichmarke, umschütteln, im Dunkeln bei Raumtemperatur exakt 10 min reagieren lassen.
- Extinktionsmessung im Maximum des gebildeten Farbstoffes (520 nm, 1 cm Glasküvetten).

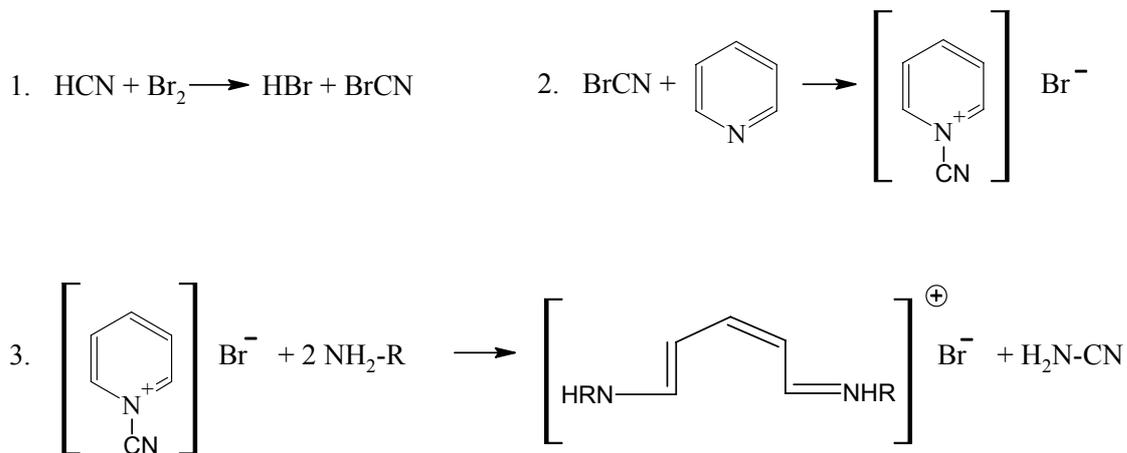


Abb.III.20: Entstehung eines König'schen Salzes

## 7.2 Qualitative Blausäurebestimmungen

### 7.2.1 Qualitativer Nachweis mit dem FEIGL-ANGER-Test

Der Nachweis der Anwesenheit von Cyanglykosiden in Pflanzenmaterial erfolgte mittels des FEIGL-ANGER-Tests [FEIGEL UND ANGER, 1966]. Frisches oder gefriergetrocknetes Pflanzenmaterial wurde in ein Schnappdeckelglas angemessener Grösse eingebracht, gegebenenfalls in Wasser aufgenommen und nach Einhängen eines präparierten

Filterpapierstreifens dicht verschlossen. Je nach Umsatzgeschwindigkeit und Cyanglykosidmenge, bzw. Menge des anwesenden korrespondierenden Enzyms wird durch Blaufärbung des Filterpapierstreifens nach wenigen Minuten bis mehreren Stunden eine positive Reaktion angezeigt. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 0,5 mg HCN/Testansatz.

*Herstellung des Filterpapiers und Durchführung:*

Je 500 mg 4,4'-Tetramethyldiaminodiphenylmethan-Kupfer(II)ethylacetoacetat werden in 50 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst. Mit dieser Lösung wird Filterpapier durchtränkt und getrocknet. Dieser Vorgang wird dreimal wiederholt, anschließend wird das Filterpapier in kleine Streifen geschnitten und luftdicht sowie lichtgeschützt aufbewahrt.

Die zu untersuchenden Proben werden in ein 2ml-Ampullenglas gegeben und so mit einem Stopfen verschlossen, dass sich der Teststreifen im Gasraum über der Probensuspension befindet. Nach Art und Menge des vorhandenen Glykosids und des umsetzenden Enzyms wird eine positive Reaktion nach 20 min bis 15h beobachtet. Dauert die Umsetzung extrem lange, so ist das Ergebnis anderweitig zu verifizieren, da stark verzögerte Blaufärbung oft ein falsch-positives Ergebnis vortäuscht.

### **7.2.2 Qualitativer Nachweis mittels Pikrat- bzw. Sandwich-Test**

Als weiterer qualitativer Test auf Blausäure wurde der GUIGNARD–MIRANDE -Test (Pikrattest) [GUIGNARD, 1906; MIRANDE, 1909] angewandt. Im Gegensatz zum FEIGL-ANGER-Test wird der im Gasraum über der Probe befindliche Teststreifen zunächst angefeuchtet. Bei Anwesenheit von Blausäure färbt sich der Streifen orange bis rot. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 4 mg HCN/Testansatz. Die Gefahr falsch-positiver Nachweise ist beim Pikrattest größer als beim vergleichbaren FEIGL-ANGER-Test [NAHRSTEDT, 1980; HEGNAUER, 1986; BRINKER UND SEIGLER, 1989].

*Herstellung der Teststreifen und Durchführung:*

Filterpapier wird nacheinander mit 0,5 %iger Pikrinsäurelösung und einer 5 %igen  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung getränkt und anschließend getrocknet. Daraufhin wird das Papier in kleine Streifen geschnitten und dunkel sowie lichtgeschützt aufbewahrt.

Die so präparierten Streifen werden nach Anfeuchten mit Wasser oder  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung wie das FEIGL-ANGER-Papier verwendet.

### *Sandwich-Test*

Für die dünnschichtchromatographische Untersuchung cyanogener Proben kann der Pikrattest auch in der sogenannten Sandwichtechnik genutzt werden [BRIMER et al., 1983; BRINKER UND SEIGLER, 1989]. Der Sandwich besteht aus einer Kieselgel-DC-Folie und einer mit Ionenaustauschermaterial beschichteten Folie, die zuvor in Pikrinsäure- und  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung getaucht wurde. Auf der Kieselgelfolie wird eine vermutlich cyanogene Probe mittels herkömmlicher DC-Verfahren getrennt. Nach Abtrocknen des DC wird die Kieselgelschicht mit „Röhm-Enzympräparation“ besprüht und mit der Ionenaustauscherfolie abgedeckt. Dieser „Sandwich“ wird zwischen zwei Glasplatten fixiert und für mehrere Stunden bei  $39^\circ\text{C}$  inkubiert. Cyanogene Zonen können an der Rotfärbung auf der durchscheinenden Pikratplatte erkannt und markiert werden. Wurde ein zweiteiliges DC angefertigt, dh alle Substanzen wurden doppelt aufgetragen, so kann der eine Teil für den eben beschriebenen „Sandwich-Test“ verwendet werden und der andere zur Detektion mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz besprüht werden. Auf diese Weise erhält man Informationen über die Anwesenheit cyanogener Verbindungen und deren Lage im DC.

### *Herstellung der Pikratplatten:*

Die Ionenaustauscherfolie (Polygram® Ionex-25 SB-Ac) wird im Tauchbad mit gesättigter Pikrinsäurelösung getränkt und unter kaltem Luftstrom getrocknet. Anschließend wird die Folie in eine 1M Natriumcarbonatlösung getaucht. Nach erneutem Trocknen wird gleichmäßig eine 2%ige Lösung von Cethylalkohol in Ethanol aufgesprüht. Nach Verdampfen des Ethanols sind die Platten einsatzbereit, sie können trocken und lichtgeschützt bis zu drei Wochen verwendet werden.

## **8 Dünnschichtchromatographie**

Die Dünnschichtchromatographie wurde ausschließlich für qualitative Aussagen verwendet. Sie wurde eingesetzt zur Charakterisierung von Gesamtextrakten („fingerprint“-DC), zur Prüfung isolierter Einzelstoffe und der Umsetzung nach der Derivatisierung von Reinsubstanzen oder Pflanzenextrakten.

Die handelsüblichen 20 x 20 cm DC-Aluminiumfertigplatten wurden halbiert, so dass nach Abzug der Höhen bis zur Startzone bzw. zur Laufmittelfront eine effektive Trennstrecke von 7-8 cm verbleibt.

*Überprüfung der Extrakte auf das Vorkommen aromatischer cyanogener Glykoside*


---

Stationäre Phase:	DC-Aluminiumfolien, 10x20 cm, Kieselgel 60 F <sub>254</sub> , 0.2 mm
Entwicklung:	Aufsteigend, mit Kammersättigung
Auftragung:	Reinsubstanzen: bandenförmig 1 cm, 5-10 µl Extrakte: bandenförmig, 1 cm, 20-40 µl
Mobile Phase:	Ethylacetat/Methanol/H <sub>2</sub> O 79+11+10 (H <sub>2</sub> O schrittweise zugeben, um eine temperatur- oder luftdruckabhängige Trennung des Fließmittels zu vermeiden)
Detektion 1:	UV-Licht: 254 nm: Fluoreszenzlöschung 366 nm: Eigenfluoreszenz
Detektion 2:	Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz
Detektion 3:	Pikrattest

---

*Tab.III.35: DC zum Nachweis aromatischer Cyanglykoside***8.1 Detektionsverfahren****8.1.1 Betrachtung unter UV-Licht**

Farblose Substanzen können Strahlung einer bestimmten Wellenlänge (unterhalb des sichtbaren Spektralbereiches) absorbieren und dabei zur Fluoreszenz oder Lumineszenz angeregt werden, so dass sie durch Bestrahlung mit Licht der entsprechenden Wellenlänge sichtbar gemacht werden können. Bei der Detektion dieser Substanzen auf DC-Platten mit eingearbeitetem Fluoreszenzmarker (z.B. F<sub>254</sub>) wird durch solche UV-aktiven Substanzen das eingestrahlte UV-Licht (dem Fluoreszenz-Indikator entsprechend 254 nm) absorbiert und sie werden als dunkle Zonen auf dem DC erkennbar.

*254 nm:* Bei der Wellenlänge 254 nm sind alle Substanzen mit fluoreszenzmindernden Eigenschaften zu sehen. Diese Zonen werden vorsichtig mit Bleistift auf dem DC markiert.

*365 nm:* Bei dieser Wellenlänge sind alle Substanzen mit Eigenfluoreszenz zu sehen. Auch diese Zonen werden vorsichtig auf dem DC markiert.

### **8.1.2 Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz**

0,5 ml Anisaldehyd werden mit 10,0 ml Eisessig, 85 ml Methanol und 5 ml Schwefelsäure (96 %) in der angegebenen Reihenfolge unter ständigem Rühren und Eiskühlung des Gefäßes gelöst. Die Reaktionsabläufe während der Detektion sind noch nicht vollständig geklärt, postuliert wird die Überlagerung mehrerer nicht quantitativ ablaufender Schritte mit Cyclopentenylkationen als Zwischenstufe. Für aromatische Verbindungen ist die Bildung von Triphenylmethanfarbstoffen wahrscheinlich [JORK et al., 1989]. Eine optimale Farbentwicklung der besprühten DCs ergibt sich nach 6minütigem Erhitzen des DC's auf 120° C, längere Erhitzungszeiten führen schnell zu einer rötlichen Verfärbung des Untergrundes. Die Auswertung erfolgt bei Tageslicht.

Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz ist ein Universal-Reagenz für Naturstoffe, das durch Farbdifferenzierung Rückschlüsse auf die untersuchten Verbindungen oder Stoffklassen erlaubt [JORK et al., 1989]. So färben sich viele cyanogene Glykoside grün ( Prunasin, Amygdalin, Linamarin), hydroxilierte aromatische Cyanglykoside (Dhurrin, Taxiphyllin, Zierin, Holocalin) hingegen zeigen charakteristische Rosafärbungen mit violetter Hof. Zu bemerken ist die Abhängigkeit des Farbwertes von der Konzentration und der exakten Einhaltung der Reaktionsbedingungen (aufgesprühte Reagenzmenge, Temperatur, Zeit).

## 9 Herkunft des Pflanzenmaterials

Untersucht wurden, soweit erhältlich, handelsübliche Proben. Die hauptsächlich in Südostasien oder Südamerika verwendeten Nutzpflanzen wie Bambus oder Cassava, wurden dort auf Wochenmärkten gekauft. Andere heimische Pflanzen wurden soweit möglich aus dem institutseigenen Arznei- und Nutzpflanzengarten bezogen oder von anderen botanischen Instituten zur Verfügung gestellt.

Trivialname	Bot. Name	Herkunft/ Herbar-Nr.
Bambus	<i>Bambusa spec.</i>	Ho-Chi-Minh-City, Vietnam; Nr. 190/191 Bangkok, Thailand; Nr. 189
Cassava	<i>Manihot esculenta</i>	Ho-Chi-Minh-City, Vietnam; Nr. 197 Maringá, Brasilien; Nr. 196 Bangkok, Thailand; Nr. 195
Eschscholtzia	<i>Eschscholtzia californica</i>	Arzneipflanzengarten, Institut für Pharm. Biologie, WWU Münster; Nr. 178
Holocalyx	<i>Holocalyx balansae</i>	Botanische Gärten Dahlem, Universität Berlin–Dahlem; Nr. 193
Leinsamen	<i>Linum usitatissimum</i>	Fa. Phönix, Bondorf; Nr. 198
Limabohne	<i>Phaseolus lunatus</i>	Botanische Gärten Dahlem, Universität Berlin–Dahlem; Nr. 194
Holunderbeeren	<i>Sambucus nigra</i>	Arzneipflanzengarten, Institut für Pharm. Biologie, WWU Münster; Nr. 192

Tab.III.36: Herkunft des analysierten Pflanzenmaterials

## 10 Material und Methoden

### 10.1 Geräte

CE Gerät 1: P/ACE-MDQ Capillary Electrophoresis System, Beckman Coulter  
PDA-Detektor

Software: Karat<sup>32</sup>, Fa. Beckman Coulter

CE Gerät 2: P/ACE System 5510, Fa. Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA: heute  
Beckman Coulter

Detektor: UV-DAD  
Software: System GOLD Software  
HPLC: Waters 2690 Alliance<sup>TM</sup> separations module, Milford, MA, USA  
PDA-Detektor: Waters 996 PDA  
Fluoreszenz-Detektor: Waters 474/ Waters 247  
Software: Millennium<sup>32</sup> Version 3.20, Waters Corporation  
MALDI-MS: Institut für Organische Chemie  
Quadrupolmassenspektrometer Quattro LC-Z, Fa. MICROMASS,  
Manchester, U.K.

## 10.2 Allgemeine Laborgeräte

Ultra-Turrax: Ultra-Turrax T25/n und T50, Fa. Christ, Osterode  
Ultraschallbad: Sonorex RK 106 und RK 102, Fa. Bandelin, Berlin  
Rotationsverdampfer: Rotavapor-R, Büche Laboratoriumstechnik, Fa. Flawil, Schweiz  
Vakuumpumpe: Membranvakuumpumpe MZ2C, Vacuubrand, Wertheim  
Gefriertrocknung: Alpha I-5; Beta 1-16 und Gamma 1, Fa. Christ, Osterode  
Trockenschrank: WTC, Fa. Binder, Tuttlingen  
pH-Meter: Microprocessor pH-Meter, pH 537, Weilheim  
Analysenwaagen: Sartorius MC I: RC 250 S, LC 2200 S, 2. Stock  
Mikrowaage: Mikrowaage Typ 440, Fa. Sartorius, Göttingen

## 10.3 CE-Materialien

### 10.3.1 Puffer-Chemikalien

#### *Acetat-Puffer:*

1. Natriumacetat-Trihydrat p.a., Merck KgaA, Darmstadt, Germany
2. Essigsäure, 98 %, Merck KgaA, Darmstadt, Germany

#### *Phosphat-Puffer:*

1. Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat p.a., Merck KgaA, Darmstadt, Germany
2. di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Merck KgaA, Darmstadt, Germany

#### *Borat-Puffer:*

1. di-Natriumtetraborat p.a., Merck KgaA, Darmstadt, Germany
2. Borsäure p.a., Merck KgaA, Darmstadt, Germany

*Heptansulfonsäure – Puffer:*

1. Heptansulfonsäure, Merck KgaA, Darmstadt, Germany

*Zur pH-Wert-Einstellung:*

1. Natriumhydroxid, Merck KgaA, Darmstadt, Germany
2. Salzsäure, Merck KgaA, Darmstadt, Germany

**10.3.2 Additive****10.3.2.1 Micellbildner**

1. Dodecylsulfat Natriumsalz (für biochemische Zwecke und Tensiduntersuchungen), Merck KgaA, Darmstadt, Germany
2. Taurodesoxycholic acid Sodium salt Monohydrate, Fluka Chemie GmbH CH-9471 Buchs, Schweiz
3. CHAPS (3-[(3-Cholamido-propyl)-dimethylammonio]-propane-sulfonate), Merck KgaA, Darmstadt, Germany

**10.3.2.2 Chirale Selektoren**

1.  $\alpha$ -Cyclodextrin, Wacker, Burghausen, Germany
2.  $\beta$ -Cyclodextrin hydrate 99 % (Schardinger-Beta-dextrin Hydrat), Acros Organics, New Jersey, USA
3.  $\gamma$ -Cyclodextrin, Wacker, Burghausen, Germany
4. sulfatiertes  $\beta$ -Cyclodextrin, Aldrich, Milwaukee, WI, USA
5. Hydroxy-Propyl- $\beta$ -Cyclodextrin, Wacker, Burghausen
6. O-Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin, Wacker, Burghausen

**10.3.2.3 Emulgatoren**

1. Brij 35, Acros Organics, New Jersey, USA
2. Tween 20, Acros Organics, New Jersey, USA
3. Triton® (Triton® X-100 p.a.), Merck KgaA, Darmstadt, Germany

**10.3.2.4 Weitere Additive**

1. Harnstoff p.a., Merck KgaA, Darmstadt, Germany
2. Dextrin 15 [Maltodextrin], Fluka Chemie GmbH CH-9471 Buchs, Schweiz
3. Tetramethylammoniumbromide, Fluka Chemie GmbH CH-9471 Buchs, Schweiz

## 10.4 HPLC-Materialien

### 10.4.1 Lösungsmittel und Lösungen

1. Aqua millipore, p.a., Merck KgaA, Darmstadt, Germany
2. Acetonitril, p.a., Merck KgaA, Darmstadt, Germany
3. Methanol, p.a., Merck KgaA, Darmstadt, Germany
4. Isopropanol, p.a., Merck KgaA, Darmstadt, Germany
5. Tetrahydrofuran, p.a., Merck KgaA, Darmstadt, Germany
6. Trifluoressigsäure, p.a., Merck KgaA, Darmstadt, Germany

## 10.5 Weitere Chemikalien und Zubereitungen

1. Roehm-Enzym:  $\beta$ -Glucosidase-Präparation der Fa. Röhm GmbH/Darmstadt  
 $\beta$ -Glucosidase- und Esterase-Aktivität
2. McIlvaine-Puffer: 100 ml Stammlösung A (35,6 g Dinatriummonohydrogenphosphat x 2 H<sub>2</sub>O ad 1000 ml H<sub>2</sub>O bidest) wurden mit 62,6 ml Stammlösung B (21,0 g Citronensäure x H<sub>2</sub>O ad 1000 ml demineralisiertes Wasser) gemischt. Anschließend wurde der pH-Wert auf pH 6,0 (Glaselektrode) eingestellt.  
Der hergestellte Puffer ist auch unter Kühlung nur begrenzt haltbar.

***IV. Anhang***

# 1 Allgemeine physikalische Größen

$U$ [V]	Spannung
$I$ [A]	Stromstärke
$E$ [V·cm <sup>-1</sup> ]	elektrische Feldstärke
$\epsilon_r$	relative Dielektrizitätskonstante
$t$ [s, min, h]	Zeit
$p$ [Pa]	Druck
$V$ [l]	Volumen
$T$ [°C]	Temperatur
$F$ [N]	Kraft
$E$ [J]	Energie, Arbeit
$P$ [W]	Leistung
$\eta$ [Pa s]	Viskosität
$n$ [mol]	Stoffmenge
$c$ [mol l <sup>-1</sup> , M]	Stoffmengenkonzentration
$M_r$ [g mol <sup>-1</sup> ]	Molekulargewicht
$c$ [g l <sup>-1</sup> ]	Massenkonzentration
$\lambda$ [nm]	Wellenlänge
$\lambda_{ex}$ [nm]	Anregungswellenlänge
$\lambda_{em}$ [nm]	Emissionswellenlänge
$m/z$	Masse-Ladungsverhältnis
$z$	Anzahl der Elementarladungen

# 2 Physikalische Konstanten

Elementarladung	$e = 1,6 \times 10^{-19} \text{ C}$
elektrische Feldkonstante	$\epsilon_0 = 8,855 \times 10^{-12} \text{ C V}^{-1} \text{ m}^{-1}$

### 3 Elektrophoretische Kenngrößen

$l_{ges}$	[cm]	gesamte Kapillarlänge
$l_{eff}$	[cm]	effektive Kapillarlänge
$t_m$	[min]	Migrationszeit
$v$	[cm s <sup>-1</sup> ]	Migrationsgeschwindigkeit
$v_{app}$	[cm s <sup>-1</sup> ]	scheinbare Migrationsgeschwindigkeit
$v_{EOF}$	[cm s <sup>-1</sup> ]	Geschwindigkeit des EOF
$\mu$	[cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	elektrophoretische Mobilität
$\mu_{app}$	[cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	scheinbare elektrophoretische Mobilität
$\mu_{EOF}$	[cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Mobilität des EOF
$\xi$	[mV]	Zeta-Potential
$PA$		Peakfläche (peak area)
$CPA$		korrigierte Peakfläche (corrected peak area)
$\alpha$		Trennfaktor

### 4 Statistische Kenngrößen

$x_i$	$x$ -Koordinate eines Messwertes
$y_i$	$y$ -Koordinate eines Messwertes
$n$	Anzahl der Messwerte
$\bar{x}$	Mittelwert
$s$	Standardabweichung
$s_{rel.}$	relative Standardabweichung (Variationskoeffizient)
$m$	Steigung einer Regressionsgerade
$b$	Achsenabschnitt einer Regressionsgerade
$r$	Korrelationskoeffizient

## 5 Abkürzungen

Å	Ångström (1 Å = 0,1 nm)
Abb.	Abbildung
AUC	area under curve
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Cyclodextrin
β-CD	β-Cyclodextrin
CE	Kapillarelektrophorese
CEC	Kapillarelektrochromatographie
CGE	Kapillargelelektrophorese
CIEF	kapillarisoelektrische Fokussierung
CM-β-CD	Carboxymethyl-β-Cyclodextrin
CYP	Cytochrom P
CZE	Kapillarzonenelektrophorese
DAD	Diodenarray-Detektor
DC	Dünschichtchromatogramm(e)
EOF	elektroosmotischer Fluss
ESI	Elektrospray-Ionisation
Fa.	Firma
FDA	Food and Drug Administration
GC	Gaschromatographie
Gl.	Gleichung
HE-β-CD	Hydroxyethyl-β-Cyclodextrin
HP-α-CD	Hydroxypropyl-α-Cyclodextrin
HP-β-CD	Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin
HP-γ-CD	Hydroxypropyl-γ-Cyclodextrin
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HS-β-CD	sulfatiertes β-Cyclodextrin
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
ID	innerer Durchmesser

---

i.d.R.	in der Regel
IEP	isoelektrischer Punkt
ISTD	interner Standard
k.A.	keine Angabe
LOD	Nachweisgrenze (limit of detection)
LOQ	Bestimmungsgrenze (limit of quantification)
max.	maximal
Me- $\beta$ -CD	$\beta$ -Methyl-Cyclodextrin
MEEKC	Micro-emulsion-electrkinetic chromatographie
MEKC	mizellare elektrokinetische Chromatographie
MS	Massenspektrometrie
n. n.	nicht nachweisbar
OD	äußerer Durchmesser
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
<i>p</i> Ks	negativ dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
ppm	parts per million
psi	pounds per square inch
rel.	relativ
RP	reversed phase
rpm	Umdrehungen pro Minute
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
sog.	sogenannt
SPE	Festphasenextraktion (solid phase extraction)
SZV	Standardzusatzverfahren
TDC	Natriumtaurodesoxycholsäure
TM	Trockenmasse
u.a.	und andere
USP	United States Pharmacopoeia
u.U.	unter Umständen
UV	ultraviolett
vgl.	vergleiche
VO	Verordnung
z.B.	zum Beispiel

*V. Literaturverzeichnis*

**AEBERSOLD, R. UND MORRISON, H.D.**

Analysis of dilute peptide samples by capillary zone electrophoresis  
*Journal of Chromatography*, **516** (1990), 79-88

**ADAMSON, A.W.**

*Physical chemistry of surfaces, 4. Aufl.*  
Wiley, New York (1982), ISBN 0-471-07877-8

**ALDRIGE, W.N.**

A new method for the estimation of micro quantities of cyanide and thiocyanate  
*Analyst*, **69** (1944), 262

**ALTRIA, K.D**

Application of microemulsion electrokinetic chromatography to the analysis of a wide range of pharmaceuticals and excipients  
*Journal of Chromatography A*, **844** (1999), 371-386

**ALTRIA, K.D., MAHUZIER, P.E., CLARK, B.J**

Background and operating parameters in microemulsion electrokinetic chromatography  
*Electrophoresis*, **24** (2003), 315-324

**ANDERSEN, L., CLAUSEN, V., OKETCH-RABAH, H.A., LECHTENBERG, M., ADERSEN, A., NAHRSTEDT, A., JAROSZEWSKI, J.W.**

Natural cyclopentanoid cyanohydrin glycosides. Part 18. Gynocardin and cyclopentenylglycine in *Rawsonia lucida*  
*Biochemical Systematics and Ecology*, **29** (2001), 219-222

**ANDERSEN, M.D., BUSK, P.K., SVENDSEN, I.B., MØLLER, B.L.**

Cytochromes P-450 from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) catalyzing the first steps in the biosynthesis of the cyanogenic glycosides linamarin and lotaustralin: Cloning, functional expression in *Pichia pastoris*, and substrate specificity of the isolated recombinant enzymes  
*Journal of Biological Chemistry*, **275** (2000), 1966-1975

**ARAI, T., NIMURA, N., KINOSHITA, T.**

Investigation of enantioselective separation of quinolonecarboxylic acids by capillary zone electrophoresis using vancomycin as a chiral selector  
*Journal of Chromatography A*, **736** (1996), 303-311

**BAHR, U., PFENNINGER, A., KARAS, M., STAHL, B.**

High-sensitivity analysis of neutral underivatized oligosaccharides by nanoelectrospray mass spectrometry.  
*Analytical Chemistry*, **22** (1997), 4530-4535

**BISSETT, F.H., CLAPP, R.C., COBURN, R.A., ETTLINGER, M.G., LONG JR., L.**

Cyanogenesis in *Manioc*: Concerning Lotaustralin  
*Phytochemistry*, **8** (1969), 2235-2247

**BOURQUELOT, E. UND HERISSEY, H.**

Isoméris dans les glucosides cyanhydriques, sambunigrine et prulaurasine  
*Journal du Pharmacie et Chimie*, **26** (1907), 5-12

**BOYCE, M.C.**

Determination of additives in food by capillary electrophoresis  
*Electrophoresis*, **22** (2001), 1447-1459

**BRIMER, L., ABRAHAMSSON, MLINGLI, N., ROSLING, H.**

A modified microdiffusion assay with solid-state detection for the determination of total cyanogens (CNp) in cassava flour. Comparison to the Method of O'Brien *et al.* (1991)  
*Food Chemistry*, **62** (1998), 239-242

**BRIMER, L., ROSLING, H.**

Microdiffusion method with solid-state detection for determination of cyanogenic glycosides from cassava in human urine  
*Food and Chemical Toxicology*, **31** (1993), 599-603

**BUSCH, S., KRAAK, J.C UND POPPE, H.**

Chiral separations by complexation with proteins in capillary zone electrophoresis  
*Journal of Chromatography*, **635** (1993), 119-126

**CAMPA, C., SCHMITT-KOPPLIN, P., CATALDI, T.R., BUFO, S., FREITAG, D., KETTRUP, A.**

Analysis of cyanogenic glycosides by micellar capillary electrophoresis  
*Journal of Chromatography B*, **739** (2000), 95-100

**CEREDA, M.P., MATTOS, M.C.Y.**

Linamarin – the toxic compound of cassava  
*Journal of Venomous Animals and Toxins*, **2** (1996), 6-12

**CHANKVETADZE, B.**

*Capillary electrophoresis in chiral analysis*  
Wiley, Chichester (1997), ISBN 0-471-97415-3

**CHANKVETADZE, B. UND BLASCHKE, G.**

Selector-selectand inter-actions in chiral capillary electrophoresis  
*Electrophoresis*, **20** (1999), 2592-2604

**CHERVET, J.P., SOEST, R.E.J.V. UND URSEM, M.**

Z-Shaped flow cell for UV detection in capillary electrophoresis  
*Journal of Chromatography*, **543** (1991), 439-449

**COHEN, A.S. UND KARGER, B.L.**

High-performance sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel capillary electrophoresis of peptides and proteins  
*Journal of Chromatography*, **397** (1987), 409-417

**COLLINGE, D.B. UND HUGHES, M.A.**

Evidence that linamarin and lotaustralin, the two cyanogenic glycosides of *Trifolium repens* L., are synthesized by a single set of microsomal enzymes controlled by the Ac/ac locus  
*Plant Science Letters*, **34** (1984), 119-25

**CONN, E.E.***Cyanogenic Glycosides*

In: The Biochemistry of Plants (Secondary Plant Products), Hrsg.: Conn, E.E.

Academic Press New York, 1981, pp. 479-500

**COUDERC, F., CAUSSEÉ, E. UND BAYLE, C.**

Drug analysis by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection

*Electrophoresis*, **19** (1998), 2777-2790**CROSBY, D.; EL RASSI, Z.**

Micellar electrokinetic capillary chromatography with cationic surfactants

*Journal of Liquid Chromatography*, **16** (1993), 2161**CULCASI, M., CHEUNG, A., SINGAI, E., JEE, J., LIM, P.**

Determination of amygdalinamide, amygdalin acid and 2-propanol in amygdalin dosage forms from Mexico

*Journal of Pharmaceutical Sciences*, **67** (1978), 1190-1192**CUTLER, A.J., HOSEL, W., STERNBERG, M. UND CONN, E.E.**The in vitro biosynthesis of taxiphyllin and the chaneling of intermediates in *Triglochin maritima**Journal of Biochemical Chemistry*, **256** (1981), 4253**DAVIS, R.H., NAHRSTEDT, A.**The occurrence of the cyanogenic glycosides, linamarin and lotaustralin, in *Acraea* and *Heliconius* butterflies*Comparative in Biochemical Physiology*, **64B** (1979), 395-397**DELLAGRECA, M., FIORENTINO, A., MONACO, P., PREVITERA, L., SIMONET, A.M.**Cyanogenic Glycosides from *Sambucus nigra**Natural Product Letters*, **14** (2000), 175-182**DIN 55 350 (Teil 13)***Begriffe der Qualitätssicherung und Statistik: Begriffe zur Genauigkeit von Ermittlungsverfahren und Ermittlungsergebnissen*

Beuth Verlag GmbH Berlin, 1987

**DOLNÍK, V.**

Recent developments in capillary zone electrophoresis of proteins

*Electrophoresis*, **20** (1999), 3106-3115**DU, L.; BOKANGA, M. ; LINDBERG-MØLLER, B.; HALKIER, B.A.**

The Biosynthesis of Cyanogenic Glukosides in Roots of Cassava

*Phytochemistry*, **39** (1995), 323-326**DUNSTAN, W.R., HENRY, T.A.**Cyanogenesis in Plants, Part II. The Great Millet, *Sorghum vulgare*.*Phil. Trans. Royal Society*, **A199** (1902), 399-410

**DWORSCHAK, A.**

*Einsatzmöglichkeiten der Micellaren Elektrokinetischen Chromatographie*  
Dissertation, Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg (2000)

**Eyjolfsson, R.**

Isolation and structure elucidation of triglochinin, a new cyanogenic glycoside from  
*Triglochin maritima*  
*Phytochemistry*, **9** (1970), 845 - 851

**ENGELHARDT, H., BECK, W. UND SCHMITT, T.**

*Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten*  
Vieweg, Braunschweig (1994), ISBN 3-528-06597-4.

**FEIGL, F., ANGER, V.**

Replacement of Benzidine by Copper Ethylacetoacetate and Tetra Base as Spot-test  
Reagent for Hydrogen Cyanide and Cyanogen  
*Analyst*, **91** (1966), 282-284

**FILLET, M., HUBERT, P. UND CROMMEN, J.**

Method development strategies for the enantioseparation of drugs by capillary electro-  
phoresis using cyclodextrines as chiral additives  
*Electrophoresis*, **19** (1998), 2834-2840

**FINNEMORE, H., COOPER, J.M.**

Cyanogenetic Glucosides in Australian Plants  
*Australian Journal of Chemistry*, **15** (1936), 177

**FRITZ, J.S., LI, J.**

Nonaqueous media for separation of nonionic organic compounds by capillary  
electrophoresis  
*Electrophoresis*, **20** (1999), 84-91

**FROBÖSE, R.**

Cyclodextrine als vielfältige Transportmoleküle  
*Naturwissenschaftliche Rundschau*, **56** (2003), 488-490

**FROMHERZ, P.**

Tensid-Mizellen: Ihr molekulares Gefüge  
*Nachrichten aus Chemie, Technik und Labor*, **29** (1981), 537

**FRYE, H.**

*Cyanglykoside bei Zygaena trifolii: Aufnahme von extern zugeführtem Linamarin und*  
*Lotaustralin und deren Einfluß auf die endogene Synthese*  
Dissertation, Fachbereich Chemie und Pharmazie der WWU Münster (1998)

**GEBAUER, P. UND BOČEK, P.**

Recent progress in capillary isotachophoresis  
*Electrophoresis*, **23** (2002), 3858-3864

**GIERSCHNER, G., SCHWEINFURTH, R., FISCHER, J.**

Nutzung endogener Enzyme zur Detoxifikation und zur Erleichterung des Trocknungsprozesses von Cassava  
*Lebensmittelchemie*, **48** (1994), 106-107

**GILGES, M., KLEEMISS, M.H. UND SCHOMBURG, G.**

Capillary zone electrophoresis of basic and acidic proteins using poly (vinyl alcohol) coatings in fused silica capillaries  
*Analytical Chemistry*, **66** (1994), 2038-2046

**GLEADOW, R., M. UND WOODROW, I.**

Constraints on effectiveness of cyanogenic glycosides in herbivore defense  
*Journal of Chemical Ecology*, **28** (2002), 1301-1313

**GMELIN, R., SCHÜLER, M., BORDAS, E.**

Holocalin: Ein neues cyanogenes Glykosid aus *Holocalyx balansae*  
*Phytochemistry*, **12** (1973), 457-461

**GREEN, M.J.**

A Practical Guide to Analytical Method Validation  
*Analytical Chemistry*, **68** (1996), 305A-309A

**Guidance for Industry: Analytic Procedures and Methods Validation**

U. S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, 2000

**GUTTMANN, A., COHEN, A.S., HEIGER, D.N. UND KARGER, B.L.**

Analytical and micropreparative ultrahigh resolution of oligo-nucleotides by polyacrylamide gel high-performance capillary electro-phoresis  
*Analytical Chemistry*, **62** (1990), 137-141

**HARRIS, D.**

*Kapillarelektrophorese in: Lehrbuch der quantitativen Analyse*  
Wiesbaden: Vieweg, 1997

**HALKIER, B.A., MØLLER, B.L.**

The biosynthesis of cyanogenic glucosides in higher plants  
*The Journal of Biological Chemistry*, **256** (1990), 21114

**HEMPEL, G.**

Strategies to improve the sensitivity in capillary electro-phoresis for the analysis of drugs in biological fluids  
*Electrophoresis*, **21** (2000), 691-698

**HENRY, T.A.**

Cyanogenesis in *Lotus arabicus*  
*Journal of the Society of Chemical Industry*, **57** (1938), 248-249

**D'HULST, A. UND VERBEKE, N.**

Chiral separation by capillary electro-phoresis with oligosaccharides  
*Journal of Chromatography*, **608** (1992), 275-287

**HOFFSTETTER-KUHN, S., PAULUS, A., GASSMANN, E., WIDMER, H.M.**  
Influence of Borate Complexation on the Electrophoretic Behavior of Carbohydrates in Capillary Electrophoresis  
*Analytical Chemistry*, **63** (1991), 1541-1547

**ICH Harmonised Tripartite Guideline (Q2A): Text on Validation of Analytical Procedures** (1994), International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.  
Internet: <http://www.ifpma.org/ich5q.html>.

**ICH Harmonised Tripartite Guideline (Q2B): Validation of Analytical Procedures: Methodology** (1996), International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.  
Internet: <http://www.ifpma.org/ich5q.html>

**IKEMOTO, N., LO, L.-C., NAKANISHI, K.**  
Nachweis von Verbindungen mit Hydroxy- und Aminogruppen im Subpicomol-Bereich mit 2-Naphthoylimidazol als Fluoreszenzmarker  
*Angewandte Chemie*, **104** (1992), 918-919

**ISSAQ, H.J.**  
A decade of capillary electrophoresis  
*Electrophoresis*, **21** (2000), 1921-1939

**JONES, D.A.**  
Why are so many foodplants cyanogenic?  
*Phytochemistry*, **47** (1998), 155-162

**JORGENSEN, J.W. UND LUKACS, K.D.**  
Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries  
*Analytical Chemistry*, **53** (1981), 1298-1302

**JORGENSEN, J.W. UND LUKACS, K.D.**  
High-resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis  
*Journal of Chromatography*, **218** (1981), 209-216

**JONES, P.R., ANDERSEN, M.D., NIELSEN, J.S., HOJ, P.B., MØLLER, B.L.**  
The biosynthesis, degradation, transport and possible function of cyanogenic glycosides  
*Recent Advances in Phytochemistry*, **34** (2000), 191-247

**JORK, H., FUNK, W., FISCHER, W., WIMMER, H.**  
*Dünschichtchromatographie, Reagenzien und Nachweismethoden*  
*Bd.1a: Physikalische und chemische Nachweismethoden: Grundlagen, Reagenzien I*  
*Bd.1b: Physikalische und chemische Nachweismethoden: Aktivierungsreaktionen, Reagenzfolgen, Reagenzien II*  
Wiley-VCH Weinheim New York Chichester (1989), ISBN 3-527-26848-0

**HELLER, C.**  
Principles of DNA separation with capillary electrophoresis  
*Electrophoresis*, **22** (2001), 629-643

**HEGNAUER, R.***Cyanogene Verbindungen*

In: Chemotaxonomie der Pflanzen, Vol.7, Hrsg.: Hegnauer, R.  
Birkhäuser Verlag, Basel, 1986

**HJERTÉN, S.**

Free zone electrophoresis

*Chromatographic Review*, **9** (1967), 122-219**KARAS, M., GLÜCKMANN, M. UND SCHÄFER, J.**

Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors

*Journal of Mass Spectrometry*, **35** (2000), 1-12**KARAS, M. UND HILLENKAMP, F.**

Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10 000 daltons

*Analytical Chemistry*, **60** (1988), 2299-2301**KARCHER, A. UND EL RASSI, Z.**

Capillary electrophoresis and electro-chromatography of pesticides and metabolites

*Electrophoresis*, **20** (1999), 3280-3296**KAŠIÈKA, V.**

Capillary electrophoresis of peptides

*Electrophoresis*, **20** (1999), 3084-3105**KEUSGEN, M.**

Biosensors: new approaches in drug analysis

*Naturwissenschaften*, **89** (2002), 433-444**KINGSBURY, J., M.***Poisonous Plants of the United States and Canada*

Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 1964

**KLAMPFL, C.W.**

Solvent effects in microemulsion electrokinetic chromatography

*Electrophoresis*, **24** (2003), 1537-1543**KOHLRAUSCH, F.**

Ueber Concentrations-Verschiebungen durch Electrolyse im Inneren von Lösungen und Lösungsgemischen

*Annual for Physics and Chemistry*, **62** (1897), 209-239**KROMIDAS, S.***Validierung in der Analytik*, Hrsg.: Gruber, U., Klein, W.

Wiley-VCH Weinheim New York Chichester (1999), ISBN 3-527-28748-5

**KROMIDAS, S., KLINKNER, R., MERTENS, R.**

Methodenvalidierung im analytischen Labor

*Nachrichten aus Chemie, Technik und Labor*, **43** (1995), 669-676

**KUHN, R.**

Enantiomeric separation by capillary electrophoresis using a crown ether as chiral selector  
*Electrophoresis*, **20** (1999), 2605-2613.

**KUHN, R. UND HOFFSTETTER-KUHN, S.**

*Capillary electrophoresis: Principles and Practice*  
Springer, Berlin (1993), ISBN 3-540-56434-9

**KUNKEL, A., WÄTZIG, H.**

Micellar electrokinetic capillary chromatography as a powerful tool for pharmacological investigations without sample pretreatment: A precise technique providing cost advantages and limits of detection to the low nanomolecular range  
*Electrophoresis*, **20** (1999), 2379-2389

**LIAO, J.-L., ABRAMSON, J. UND HJERTÉN, S.**

A highly stable methyl cellulose coating for capillary electrophoresis  
*Journal of Capillary Electrophoresis*, **2** (1995), 191-196

**LEHMANN, E.**

Über das Amygdalin in den Fruchtkernen der Kirschen, Pflaumen, Pfirsiche und Äpfel und über den Blausäure liefernden Bestandteil der Faulbaumrinde und der Kirschchlorbeerblätter  
*Botanischer Jahresbericht*, **2** (1874), 823-824

**LINDNER, E.**

*Toxikologie der Nahrungsmittel*  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1990), 4. Aufl.

**LÜLLMANN, H., MOHR, K.**

*Taschenatlas der Pharmakologie*  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (2001), 4. Aufl

**MANABE, T.**

Capillary electrophoresis of proteins for proteomic studies  
*Electrophoresis*, **20** (1999), 3116-3121

**MAO, C.H., BLOCHER, J.P., ANDERSON, L., SMITH, D.C.**

Cyanogenesis in *Sorghum vulgare* – I.  
An improved method for the isolation of Dhurrin; Physical properties of Dhurrin  
*Phytochemistry*, **4** (1965), 297-303

**MIKKERS, F.E.P., EVERAERTS, F.M. UND VERHEGGEN, T.P.E.M.**

High-performance zone electrophoresis  
*Journal of Chromatography*, **169** (1979), 11-20

**MØLLER, B.L. UND POULTON, J.E.**

7 Cyanogenic Glycosides  
*Methods in Plant Biochemistry*, **9** (1993), 183-207

**MØLLER, B.L. UND SEIGLER, D.S.**

*Biosynthesis of Cyanogenic Glycosides, Cyanolipids and Related Compounds*

In: *Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology*, Hrsg.: B. Singh

Marcel Dekker New York, 1999, p. 563-609

**MONTGOMERY, R.D.**

The medical significance of cyanogen in plant foodstuff

*American Journal of Clinical Nutrition*, **17** (1965), 103-113

**MORIN, P., VILLARD, F., DREUX, M.**

I. Separation of flavanoid-7-O-glycosides differing in their flavonoid aglycone

*Journal of Chromatography*, **628** (1993), 153-160

**MORIN, P., VILLARD, F., DREUX, M.**

II. Separation of flavanoid-7-O-glycosides differing in their flavonoid aglycone

*Journal of Chromatography*, **628** (1993), 161-169

**NAHRSTEDT, A.**

Cyanogenesis of *Prunus avium*

*Phytochemistry*, **11** (1972), 3121-3126

**NAHRSTEDT, A.**

Zur Konfiguration des Cyanglykosides Holocalin

*Phytochemistry*, **12** (1973), 2799-2800

**NAHRSTEDT, A.**

Gaschromatographie diastereomerer Benzaldehydcyanhydrine

*Planta Medica*, **24** (1973), 83

**NAHRSTEDT, A.**

Triglochinin in *Arum maculatum*

*Phytochemistry*, **14** (1975), 1870-1871

**NAHRSTEDT, A.**

Prunasin in *Holocalyx Balansae*

*Phytochemistry*, **15** (1976), 1983-1984

**NAHRSTEDT, A.**

Ersatz karzinogener und allergener Amine in der Cyanid-Bestimmung nach Aldrige

*Deutsche Apotheker Zeitung*, **117** (1977), 1357-1359

**NAHRSTEDT, A.**

Hochleistungsflüssigkeitschromatographische Trennung einiger

Benzaldehydcyanhydringlykoside sowie ihrer Epimere

*Journal of Chromatography*, **152** (1978), 265

**NAHRSTEDT, A.**

*Isolation and structure elucidation of cyanogenic glycosides*

in: *Cyanide in Biology*, Hrsg.: Wennesland, Conn, Knowles, Westley, Wissing

Academic Press London New York Toronto, 1981

**NAHRSTEDT, A.**

*Recent developments in chemistry, distribution and biology of the cyanogenic glycosides*

In: Biologically Active Natural Products, Hrsg: Hostettmann, Lea  
Clarendon Press, Oxford (1987)

**NAHRSTEDT, A.**

*The biology of the cyanogenic glycosides: new developments*

In: Nitrogen Metabolism of Plants, Hrsg.: Pilbeam, Mengel  
Oxford University Press, 1992

**NAHRSTEDT, A.**

*Cyanogenesis and foodplants*

In: Phytochemistry and Agriculture – Proceedings of the Phytochemical Society of Europe,  
Hrsg: van Beek, Bretler  
Clarendon Press, Oxford, 1993

**NAHRSTEDT, A., HÜBEL, W.**

Cyanogenic compounds from heterodendron oleaefolium  
*Phytochemistry*, **17** (1978), 314-315

**NAHRSTEDT, A., KANT, J.D., HÖSEL, W.**

Characterization of cyanogenic glycosides and  $\beta$ -Glucosidases in *Triglochin maritima*  
seedlings  
*Phytochemistry*, **18** (1979), 1137-1141

**NAHRSTEDT, A., KANT, J.D., HÖSEL, W.**

Aspects of the biosynthesis of the cyanogenic glucoside, triglochinin, in *Triglochin maritima*  
*Planta Medica*, **50** (1984), 394-98

**NAHRSTEDT, A., SCHWIND, PH.**

Phenylalanine is the biogenetic Precursor of meta-hydroxylated Zierin, the aromatic cyanogenic Glucoside of unripe Akenes of *Xeranthemum Cylindraceum*  
*Phytochemistry*, **31** (1992), 1997

**NASHIDA, Z.T., SHIRAISHI, T., UDA, Y.**

Enzymatic analysis of cyanogenic glycosides. II. A simple method by using a microdiffusional apparatus  
*Chemical und Pharmaceutical Bulletin*, **36** (1988), 249-253

**NIELSEN, J.S., MØLLER, B.L.**

Biosynthesis of Cyanogenic Glucosides in *Triglochin maritima* and the Involvement of Cytochrome P450 Enzymes  
*Archives of Biochemistry and Biophysics*, **368** (1999), 121-130

**NISHI, H.**

Capillary electrophoresis of drugs  
*Electrophoresis*, **20** (1999), 3237-3258

**NISHI, H., FUKUYAMA, T. UND MATSUO, M.**

Chiral separation of diltiazem, trimetoquinol and related compounds by micellar electrokinetic chromatography with bile salts

*Journal of Chromatography*, **515** (1990), 233-243

**NISHI, H.; TERABE, S.**

Micellar elektrokinetic chromatography: Perspectives in drug analysis

*Journal of Chromatography A*, **735** (1996), 3-27

**OOMAH, B.D; MAZZA, G.; KENASCHUK, E.O.**

Cyanogenic compounds in Flaxseed

*Journal for Agriculture and Food Chemistry*, **40** (1992), 1346-1348

**OTSUKA, K.; TERABE, S.; ANDO, T.**

Elektrokinetic chromatography with micellar solutions, separation of phenylhydantoin-amino acids

*Journal of Chromatography*, **332** (1985), 219

**OZAKI, H.; ICHIHARA, A.; TERABE, S.**

Micellar elektrokinetic chromatography using high-molecular-mass surfactants: comparison between anionic and cationic surfactants and effects of modifiers

*Journal of Chromatography A*, **709** (1995), 3-10

**PHILLIPS, L.R., SUPKO, J.G., WOLFE, T.L., MALSPEIS, L**

Precolumn derivatisation of hydroxy compounds with 7-[(imidazolomethanoyl)methoxy]-4-methylcoumarin (IMMC) and LC/TSP-MS of the resulting esters

*Proc.Am.Soc.Mass.Spectrom.*, **43** (1995), 163-164

**REAY, P.F., CONN, E.E.**

The purification and properties of a uridine diphosphate glucose: aldehyde cyanohydrin beta-glucosyltransferase from sorghum seedlings

*Journal of Biological Chemistry*, **249** (1974), 5826-5830

**ROBIQUET, F. UND BOUTRON-CHALARD, A.F.B.**

Nouvelles expériences sur les amandes amères et sur l'huile volatile qu'elles fournissent

*Annuel du Chimie et Physique*, **44** (1830), 352-382

**SACHS, L.**

*Statistische Methoden: Planung und Auswertung*, 7. Aufl.

Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1997), ISBN: ????

**SAKA, J.D.K., MHONE, A.R.K., BRIMER, L**

An Improved Microdiffusion Method with Solid-Phase Detection for the Determination of Total Cyanogens in Fresh Cassava. Comparison to the Method of Cooke (1978)

*Journal of Science in Food Agriculture*, **76** (1998), 334-340

**SCHENK, A.**

*Zur Biogenese hydroxylierter aromatischer cyanogener Glykoside*

Dissertation, Fachbereich Chemie und Pharmazie der WWU Münster (1998)

**SCHMID, M.G. UND GÜBITZ, G.**

Capillary zone electrophoretic separation of the enantiomers of dipeptides based on host-guest complexation with a chiral crown ether

*Journal of Chromatography A*, **709** (1995), 81-88

**SCHWIND, P.**

*Die cyanogenen Glykoside von Chlorophytum comosum (Anthericaceae) und Xenoranthemum cylindraceum (Asteraceae) sowie Untersuchungen zur biogenetischen Vorstufe m-hydroxylierter aromatischer Cyanglykoside*

Dissertation, Fachbereich Chemie und Pharmazie der WWU Münster (1990)

**SELMAR, D.**

*Biosynthesis of cyanogenic glycoside, glucosinolates and nonprotein amino acids*

In: *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*, Hrsg.: Wink

Academic Press Sheffield, 1999, p.79-150

**SHIMURA, K.**

Recent advances in capillary isoelectric focusing: 1997-2001

*Electrophoresis*, **23** (2002), 3847-3857

**SLATER, G.W., KIST, T.B.L., REN, H. UND DROUIN, G.**

Recent developments in DNA electrophoretic separations

*Electrophoresis*, **19** (1998), 1525-1541

**SMIT, M.H., CASS, A.E.**

Cyanide detection using a substrate regenerating, peroxidase-based biosensor

*Analytical Chemistry*, **62** (1990), 2429-2436

**SMITH JR., C.R., WEISLEDER, D., MILLER, R.W., PALMER, I.S., OLSEN, O.E.**

Linustatin and neolinustatin: cyanogenic glycosides of linseed meal that protect animals against selenium toxicity

*Journal of Organic Chemistry*, **45** (1980), 507-510

**SOLOMONSON, L.P.**

*Cyanide as a metabolic inhibitor*

in: *Cyanide in Biology*, Hrsg.: Wennesland, Conn, Knowles, Westley, Wissing

Academic Press London New York Toronto, 1981

**SUBBULAKSHMI, G., CHITRA, L.**

Methods for Determining Nutrients in Food: A critical Appraisal

*Journal of Food Science and Technology*, **33** (1996), 267-284

**STOLTENOW, C., LARDY, C.**

Prussic acid poisoning

*North Dakota State University Extension Service V-1150*, 1998

[www.ag.ndsu.nodak.edu](http://www.ag.ndsu.nodak.edu)

**SWINNEY, K. UND BORNHOP, D.J.**

Detection in capillary electrophoresis

*Electrophoresis*, **21** (2000), 1239-1250

- SZENTE, L.; MIKUNI, K.; HASHIMOTO, H.; SZETJTLI, J.**  
Stabilization and Solubilization of Lipophilic Natural Colorants with Cyclodextrins  
*Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in chemistry*, **32** (1998), 81-9
- TÄUFEL, A., TERNES, W., TUNGER, L., ZOBEL, M.**  
*Lebensmittelexikon*  
Behr's Verlag Hamburg, 1993
- TERABE, S., OTSUKA, K. UND ANDO, T.**  
Electrokinetic chromato-graphy with micellar solution and open-tubular capillary  
*Analytical Chemistry*, **57** (1985), 834-841
- TEUSCHER, E., LINDEQUIST, U.**  
*Biogene Gifte – Biologie, Chemie und Pharmakologie*  
G. Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, 1994
- THORMANN, W. UND CASLAVSKA, J.**  
Capillary electrophoresis in drug analysis  
*Electrophoresis*, **19** (1998), 2691-2694
- TIMERBAEV, A.R.**  
Recent advances and trends in capillary electro-phoresis of inorganic ions  
*Electrophoresis*, **23** (2002), 3884-3906
- TIMERBAEV, A.R. UND SHIPGUN, O.A.**  
Recent progress in capillary electrophoresis of metal ions  
*Electrophoresis*, **21** (2000), 4179-4191
- TOR-AGBIDYE, J., PALMER, V.S., LASAREV, M.R., CRAIG, A.M., BLYTHE, L.L., SABRI, M.I., SPENCER, P.S.**  
Bioactivation of cyanide to cyanate in sulfur amino acid deficiency: relevance to neurological disease in humans subsisting on cassava  
*Toxilogical Sciences*, **50** (1999), 228-235
- TOWERS, G.H.N., MCINNES, A.G., NEISH, A.C.**  
The absolute configuration of the phenolic cyanogenic glucosides taxiphyllin and dhurrin  
*Tetrahedron*, **20** (1964), 71-77
- VANHOENACKER, G., DE KEUKELEIRE, D., SANDRA, P.**  
Capillary zone electrophoresis for the analysis of phthalate-derivatized hydroxyl- and amino-containing compounds  
*Journal of Separation Science*, **24** (2001), 651-657
- VESPALEC, R. UND BOČEK, P.**  
Chiral separations in capillary electrophoresis  
*Electrophoresis*, **20** (1999), 2579-2591
- VETTER, J.**  
Plant cyanogenic glycosides  
*Toxicon*, **38** (2000), 11-36

**WÄTZIG, H., DEGENHARD, M., KUNKEL, A.**

Strategies for capillary electrophoresis: Method development and validation for pharmaceutical and biological applications

*Electrophoresis*, **19** (1998), 2695-2752

**WELLONS, S.L., CAREY, M.A., ELDER, D.K.**

Determination of hydroxyl content of polyurethane polyols and other alcohols

*Analytical Chemistry*, **52** (1980), 1374-1376

**WÖHLER, F. UND LIEBIG, J.**

Über die Bildung des Bittermandelöls

*Poggendorfs Annalen der Physik und Chemie*, **41** (1837), 345-366

**WU, C.-M., FAIRCHILD, E.H., BEAL, J.L., TOMIMATSU, T., DOSKOTCH, R., W.**

Lithospermoside and Dasycarponin, Cyanoglucosides from *Thalictrum*

*Journal of Natural Products*, **42** (1979), 500-511

**WU, C.-M., LIU, W.-L., CHEN, C.-C.**

The identification of taxiphyllin in *Dendrocalamus latiflorus* MUNRO and its heat degradation products

*Instrumental Analysis of Foods*, **1** (1983), 303-304

**ZANDER**

*Handwörterbuch der Pflanzennamen*

Hrsg.: Encke, F., Buchheim, G., Seybold, S.

Eugen-Ulmer-Verlag, Stuttgart, 15. Aufl., 1994

**ZENOBI, R. UND KNOCHENMUSS, R.**

Ion formation in MALDI mass spectrometry

*Mass Spectrometry Reviews*, **17** (1998), 337-366

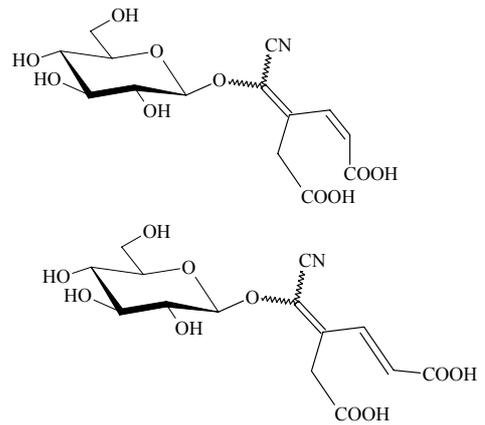
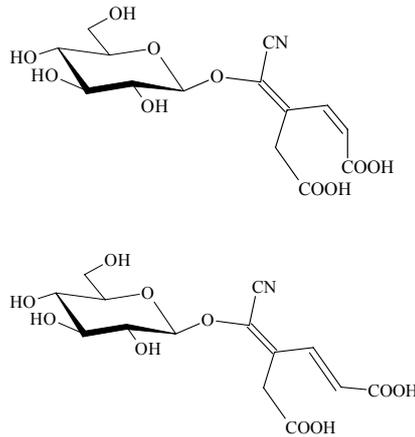
**ZILG, H., CONN, E.E.**

Stereochemical aspects of lotaustralin biosynthesis

*Journal of Biological Chemistry*, **249** (1974), 3112-3115

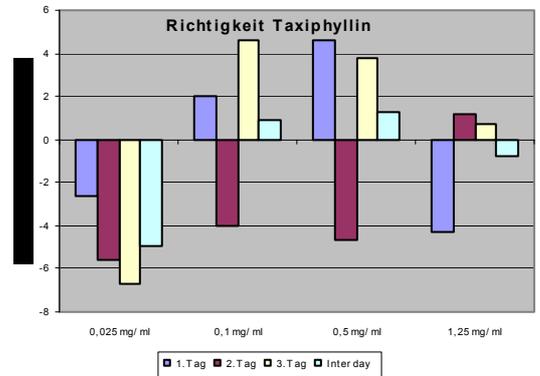
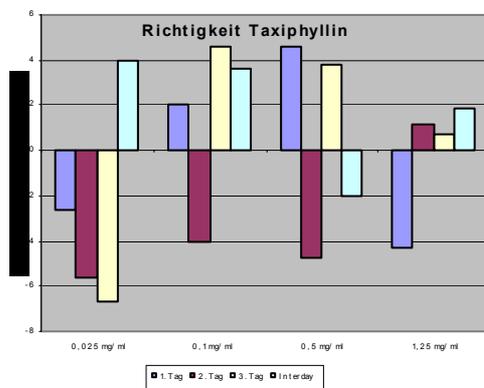
# ERRATA

Seite:	Druckfehler:	Zu ersetzen durch:
S. 25; Z. 14	stereospezifisch	meist stereo- und substratspezifisch
S. 38; Abb.II.2	Triglochinin-Isomere <b>(5a)</b> + <b>(5b)</b>	Triglochinin-Isomere <b>(5a)</b> + <b>(5b)</b>



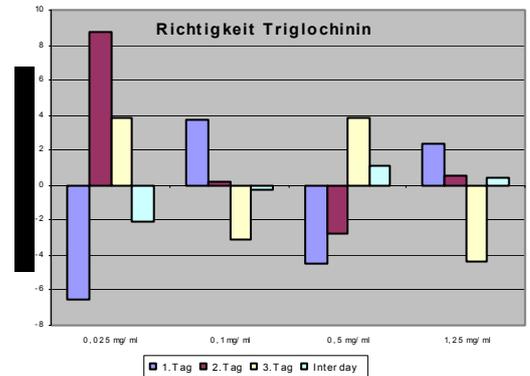
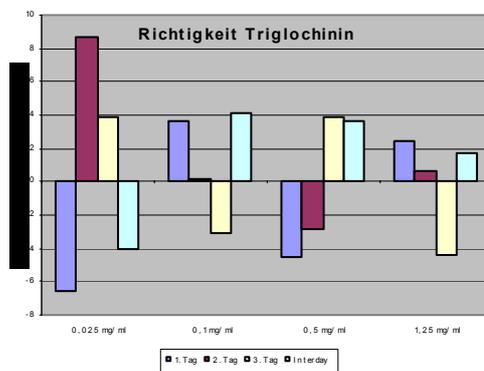
S. 53; Abb.II.3a *Abb.II.3a: Richtigkeit Taxiphyllin*

*Abb.II.3a: Richtigkeit Taxiphyllin*



S. 54; Abb.II.3b *Abb.II.3b: Richtigkeit Triglochinin*

*Abb.II.3b: Richtigkeit Triglochinin*



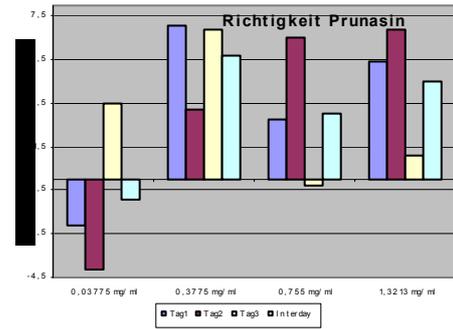
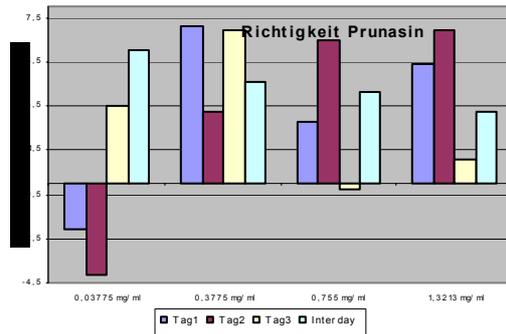
S. 76; Z. 3

*Abb.II.28 b: Kalibrationsgerade*

*Abb.II.28 b: Kalibriergerade*

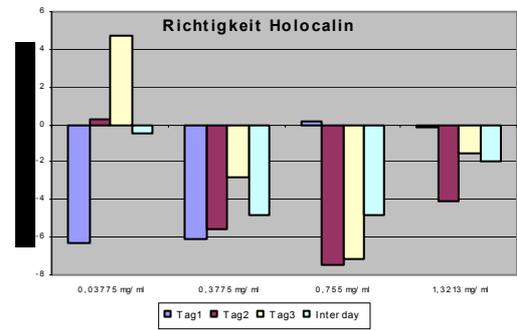
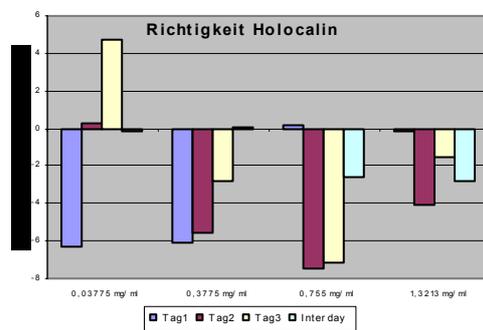
S. 78; *Abb.II.29a* *Abb.II.29a: Richtigkeit Prunasin*

*Abb.II.29a: Richtigkeit Prunasin*



S. 79; *Abb.II.29b* *Abb.II.29b: Richtigkeit Holocalin*

*Abb.II.29b: Richtigkeit Holocalin*



S. 81; *Abb.II.31* In der Skalierung der x-Achse ist die Null zu streichen

S. 84; *Tab.II.9* 2-β-D-[1→6-β-D-Glucopyranosyl-  
Glucopyranosyloxy]-2-methyl-  
propionitril

2-β-D-[1→6-β-D-Glucopyranosyl-  
Glucopyranosyloxy]-2-ethyl-  
propionitril

S. 85; Z. 8 Monoglykoside

Monoglucoside

S. 101; Z. 8 *Abb.II.44: ... Naphthoyl- ...*

*Abb.II.44: ... Naphthoyl- ...*

S. 111; *Tab.II.12* Soxhlett

Soxhlet

S. 117; Z. 24 Limabohne

Limabohne

S. 121; Z. 8 ausreichend

nicht ausreichend

S. 129; Z. 11 Soxhlett

Soxhlet

## CURRICULUM VITAE

Name: Petra Demmer  
Geburtsdatum/ -ort: 20. Juni 1974 in Köln  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Schullaufbahn

1980 – 1984 Gemeinschaftsgrundschule Morsbroich, Leverkusen  
1984 – 1993 Freiherr – vom – Stein – Gymnasium, Leverkusen  
06/1993 Abitur

### Studium

10/1993 – 11/1998 Universität Münster: Studium der Lebensmittelchemie  
09/1996 Zwischenprüfung Lebensmittelchemie  
11/1998 1. Staatsexamen: Lebensmittelchemikerin  
01/1999 – 02/2000 Praktisches Jahr als Lebensmittelchemikerin  
03/2000 2. Staatsexamen: Staatlich anerkannte Lebensmittelchemikerin

### Dissertation

05/2000 Beginn der Promotion am Institut für Pharmazeutische Biologie und Phytochemie, Universität Münster; Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Nahrstedt; Thema: "Kapillarelektrophoretische Untersuchungen an cyanogenen Glykosiden"  
05/2000 – 07/2000 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Pharmazeutische Biologie und Phytochemie, Universität Münster  
seit 08/2000 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazeutische Biologie und Phytochemie, Universität Münster  
10/2001 – 06/2002 Universität Münster: dreisemestriges Seminar: Betriebswirtschaftslehre für Doktoranden der Naturwissenschaften

