



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Entwicklung einer Methode zur Quantifizierung von
Isothiocyanaten in *Eutrema japonicum* (Wasabi) per
UHPSFC-PDA-QDa“

verfasst von / submitted by

Martin Rothauer BSc. BSc.

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magister pharmaciae (Mag.pharm.)

Wien, 2022 / Vienna 2022

Studienkennzahl lt. Studienblatt / degree UA 066 605

programme code as it appears on the student
record sheet:

Studienrichtung lt. Studienblatt / degree Masterstudium Pharmazie

programme as it appears on the student
record sheet:

Betreut von / Supervisor:

PD Mag. Dr. Ulrike Grienke

Vielen Dank,

an **Univ.-Prof. Mag. pharm. Dr. Judith Maria Rollinger** für ihre erquickende, nahbare und freundliche Art in der Betreuung meiner Masterarbeit und dafür, dass sie mich für einige Monate zu einem Teil ihres wirklich wunderbaren Teams gemacht hat.

an **Mag. Dr. Ulrike Grienke** für ihre feine und ruhige Weise, mit der sie mir alles im Department gezeigt und erklärt hat, für ihr stets offenes Ohr bei Schwierigkeiten und nicht zuletzt ihre ruhige, zielgerichtete und wertschätzende Art, ich hätte mir keine bessere Betreuerin wünschen können, die mir einerseits so viel zugetraut hat, bei der ich mir aber auch nie allein gelassen vorgekommen bin.

an **Mag. Julia Langeder, Mag. Julia Zwirchmayr und Mag. Benjamin Kirchweger**, dass sie stets Zeit und ein offenes Ohr hatten, wenn ich im Labor mit der einen oder anderen Schwierigkeit zu kämpfen hatte oder einmal nicht weiterwusste.

an **Theresa und Tobias**, mit denen ich gemeinsam für die Masterarbeit im Labor arbeiten durfte, für die schöne gemeinsame Zeit.

und auch an alle anderen aus dem **Team für Phytochemistry & Biodiscovery**, die mich vom ersten Tag an so selbstverständlich, herzlich und hilfsbereit in ihr Team aufgenommen haben.

an die **Firma PhytonIQ GmbH**, für das Bereitstellen der gefriergetrockneten Wasabi-Proben.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung/Abstract	1
1.1	Zusammenfassung	1
1.2	Abstract	2
2	Zielsetzung	3
3	Allgemeiner Teil	4
3.1	<i>Eutrema japonicum</i>	4
3.2	Glucosinolate und Isothiocyanate	6
3.3	Chromatographie	7
3.3.1	Einleitung und Grundlagen	7
3.3.2	Dünnschichtchromatographie	9
3.3.3	Flüssigchromatographie, HPLC und UPLC	10
3.3.4	Supercritical Fluid Chromatography	11
4	Spezieller Teil/ Ergebnisse	14
4.1	Einleitung	14
4.2	Methodenentwicklung UHPSFC-PDA-QDa	15
4.2.1	Einleitung und erste Versuche	15
4.2.2	Optimierung des Make-up-Solvents	16
4.2.3	Vermessung von nicht-derivatisierten und derivatisierten ITCs	17
4.2.4	Auswahl der Trennsäule	19
4.2.5	Optimierung des Co-Solvents	21
4.2.6	Optimierung des Lösungsmittelgradienten	25
4.2.7	Optimierung des Einspritzvolumens	33
4.2.8	Optimierung des Gegendruckreglers (ABPR)	35
4.2.9	Optimierung der Trennsäulentemperatur	37
4.2.10	Optimierung der Flussrate	37
4.2.11	Optimierung des Single-Ion-Recordings	38

4.3	Extraktion der Pflanzenextrakte.....	40
4.4	Derivatisierung der Pflanzenextrakte.....	42
4.5	Herstellung der ITC-NAC-Standards	43
4.5.1	Herstellung von AITC-NAC, 3-BITC-NAC und 4-PITC-NAC	44
4.5.2	Aufreinigung von 4-PITC-NAC	47
4.6	Quantifizierung	50
4.6.1	Einleitung	50
4.6.2	Quantifizierung von AITC, 3-BITC, 4-PITC und PEITC.....	51
4.6.3	Quantifizierung des Gesamt-ITC-Gehalts in <i>Eutrema japonicum</i>	56
5	Diskussion und Schlussfolgerung/Ausblick.....	59
6	Experimenteller Teil.....	62
6.1	Verwendete Substanzen und Geräte	62
6.2	Methodenentwicklung UHPSFC-PDA-QDa.....	65
6.2.1	Einleitung und erste Versuche	65
6.2.2	Optimierung des Make-up-Solvents.....	66
6.2.3	Vermessung von nicht-derivatisierten und derivatisierten ITCs.....	67
6.2.4	Auswahl der Trennsäule.....	68
6.2.5	Optimierung des Co-Solvents	69
6.2.6	Optimierung des Lösungsmittelgradienten.....	71
6.2.7	Optimierung des Einspritzvolumens.....	75
6.2.8	Optimierung des Gegendruckreglers (ABPR)	76
6.2.9	Optimierung der Trennsäulentemperatur	77
6.2.10	Optimierung der Flussrate.....	78
6.2.11	Optimierung des Single-Ion-Recordings	79
6.3	Extraktion der Pflanzenextrakte.....	80
6.4	Derivatisierung der Pflanzenextrakte.....	81
6.5	Herstellung der ITC-NAC-Standards	81

6.5.1	AITC-NAC.....	81
6.5.2	3-BITC-NAC.....	82
6.5.3	4-PITC-NAC.....	82
6.5.4	Aufreinigung von 4-PITC-NAC	83
6.6	Quantifizierung des Gesamt-ITC-Gehalts	84
6.6.1	Erstellung der Kalibrierfunktion.....	84
6.6.2	Erstellung der Proben und Quantifizierung.....	85
6.7	UHPSFC-PDA-QDa.....	86
7	Literaturverzeichnis	88
Anhang		90

Abkürzungen

AITC	Allylisoithiocyanat
ABPR	Active Back Pressure Regulator
AS	Ameisensäure
3-BITC	3-Butenylisoithiocyanat
BITC	Benzylisoithiocyanat
BDT	Benzol-1,2-dithiol
EIC	Extracted Ion Chromatogramm
ESI	Elektrosprayionisation
GL	Glukosinolat
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
Inj.ID	Injection ID (UPC ² -Laufnummer des jeweiligen Versuchs)
IPA	Isopropanol
ITC	Isoithiocyanat
NAC	N-Acetylcystein
-NAC	Mit N-Acetylcystein derivatisiert
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (=Kernspinresonanz)
PDA	Photodiode Array (=UV-Vis-Detektor)
PEITC	Phenylethylisoithiocyanat
4-PITC	4-Pentenylisoithiocyanat
QDa	Quadrupol Dalton (=Massenspektrometer)
R _f -Wert	Relativer Retentionsfaktor
SFC	Super Critical Fluid Chromatography
SFE	Super Critical Fluid Extraction
SIR	Single-Ion-Recording
SPE	Solid Phase Extraction
UHP	Ultra High Performance (- Chromatography)

1 Zusammenfassung/Abstract

1.1 Zusammenfassung

Isothiocyanate (ITCs), auch als Senföle bezeichnet, sind Abbauprodukte von Glucosinolaten (GLs) wie sie in Wasabi, lat. *Eutrema japonicum*, aber auch in vielen anderen Brassicaceae (Kreuzblütler) vorkommen. Die unter Einwirkung des Enzyms Myrosinase gebildeten ITCs dienen als Schutz gegen Fressfeinde und Krankheitserreger. Für den Menschen sind sie unter anderem wegen ihrer antioxidativen, anti-inflammatorischen, antimikrobiellen und antikanzerogenen Wirkung von Interesse.

Wasabi wurde bereits in verschiedenen wissenschaftlichen Arbeiten untersucht und seine Inhaltsstoffe quantifiziert. Hier nun sollten die ITCs in *E. japonicum* mittels überkritischer Flüssigkeitschromatographie (SFC) in Form ihrer n-Acetylcystein (NAC)-Derivate quantifiziert werden.

Verwendet wurde eine UHPSFC-Anlage (UPC²), welche die Auftrennung mit überkritischem CO₂ und zugesetztem Methanol als mobiler Phase ermöglichte. Detektiert wurde mittels Photodiode Array - und Massendetektor. Durch die Derivatisierung mit NAC sollten die ITCs sowohl besser handhabbar als auch ihre Detektion v.a. mittels Massendetektor erleichtert werden.

Dazu wurde die UPC²-Methode optimiert und anschließend wurden die wichtigsten ITC-NAC-Derivate als Standards hergestellt. Diese wurden für die Erstellung von Kalibrierfunktionen verwendet, wodurch erprobt werden sollte, ob eine indirekte Quantifizierung von ITCs in Wasabi-Materialien möglich ist.

Dafür wurden frische ITC-Extrakte aus den verschiedenen Organen von *E. japonicum* gewonnen, zu ITC-NACs derivatisiert und damit die wichtigsten ITCs in Form ihrer NAC-Derivate quantifiziert. Zusätzlich wurde als Vergleichsmethode der Gesamt-ITC-Gehalt durch Derivatisierung mittels Benzol-1,2-dithiol und Detektion mit UV-Vis-Spektrometer bestimmt.

1.2 Abstract

Isothiocyanates (ITCs), also known as mustard oils, are breakdown products of glucosinolates (GLs) as they are found in wasabi, lat. *Eutrema japonicum*, but also in many other Brassicaceae (cruciferous plants). The ITCs formed under the action of the enzyme myrosinase serve as protection against predators and pathogens. They are of interest to humans because of their antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and anti-cancer effects.

Wasabi has already been examined in various scientific papers and its ingredients have been quantified. Here, the ITCs in *E. japonicum* have been quantified in the form of their n-acetylcysteine (NAC) derivatives using supercritical liquid chromatography (SFC).

A UHPSFC system (UPC²) was used, which enabled the separation with supercritical CO₂ and methanol as the mobile phase. For detection a photodiode array and a mass detector were used. The derivatization with NAC should make the ITCs easier to handle and facilitate their detection, especially using a mass detector.

For this purpose, the UPC² method was optimized and the most important ITC-NAC derivatives were semi-synthesized as standards. These were used to generate calibration functions to test whether an indirect quantification of ITCs in wasabi materials was possible.

For this purpose, fresh ITC extracts were obtained from the different organs of *E. japonicum*, derivatized to ITC-NACs. In this way the most important ITCs were quantified in the form of their NAC derivatives. In addition, as a comparison method, the total ITC content was determined by derivatization using benzene-1,2-dithiol and detection with a UV-Vis spectrometer.

2 Zielsetzung

Bereits in einer vorangegangenen Masterarbeit, von Carola Mihalache (Mihalache, 2021)[1], war versucht worden, eine Methode zur Quantifizierung von Isothiocyanaten (ITCs) in *Eutrema japonicum* (Wasabi) zu entwickeln.

Dabei sollten die unveränderten ITCs direkt, ohne vorherige chemische Veränderung, per superkritischer Flüssigkeitschromatographie (SFC) aufgetrennt und bestimmt werden, was sich jedoch als nicht bzw. nur als sehr schwer durchführbar herausstellte.

Problematisch waren vor allem die Flüchtigkeit der ITCs, als auch, dass sie sich im Massenspektrometer nicht ionisieren und somit auch nicht detektieren ließen.

Das Ziel dieser Masterarbeit sollte es nun sein, eine Methode zur Quantifizierung der in *E. japonicum* enthaltenen ITCs zu finden, wobei als Gerätemethode bereits zuvor UHPSFC-PDA-QDa (= Ultra High Performance – Supercritical Fluid Chromatographie – Photodiode Array – Quadrupol Dalton) festgelegt wurde und die ITCs hierfür mit NAC derivatisiert werden sollten. Die Derivatisierung mit NAC ist auch deshalb von Interesse, da diese bei einer Metabolisierung im menschlichen Organismus erfolgt.

Zwar wurde sowohl *E. japonicum*, als auch die enthaltenen ITCs bereits in anderen Arbeiten thematisiert und untersucht, jedoch noch nicht, wie in dieser Arbeit vorgesehen, als Kombination von SFC und ITCs in Form ihrer NAC-Derivate.

Die Derivatisierung sollte dabei sowohl das Problem der Flüchtigkeit der ITCs als auch deren Detektierbarkeit im Massenspektrometer lösen, da sich in der vorangegangenen Arbeit von Mihalache (2021)[1] gezeigt hatte, dass sich die ITCs als solche nicht ausreichend mittels ESI-Ionenquelle ionisieren lassen.

Im Zuge dieser Arbeit sollten ITC-haltige Extrakte der einzelnen Organe von *E. japonicum* (Rhizoma, Caulis, Folium) hergestellt, mit NAC derivatisiert und parallel eine Methode mittels UHP-SFC-PDA-QDa entwickelt als auch validiert werden.

Es handelt sich bei dieser Arbeit um eine Kooperation mit der Firma PhytonIQ GmbH, die auch das zu analysierende Pflanzenmaterial in Form von gefriergetrockneten Pulvern der verschiedenen Pflanzenorgane zur Verfügung stellte.

3 Allgemeiner Teil

3.1 *Eutrema japonicum*

Ordnung:	Brassicales
Familie:	Brassicaceae
Tribus:	Eutremeae
Gattung:	<i>Eutrema</i>
Art:	<i>Eutrema japonicum</i>



Abbildung 1: *E. japonicum*

Quelle: The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Tsukasa Iwashina (2016)

Eutrema japonicum (Miq.) Koidz. (Abbildung 1), zu dt. Wasabi, gehört zur Familie der Brassicaceae (wie auch Brokkoli, Kren, Weißkohl, schwarzer Senf und Kresse) und kommt endemisch auf der russischen Insel Sachalin und in Japan vor, wo die Pflanze seit langem kultiviert wird. [2] Wild wächst Wasabi dort an sumpfigen, kühlen Rändern von Gebirgsbächen. *E. japonicum* ist eine ausdauernde krautige Pflanze die Wuchshöhen von 20-60 cm erreicht. Die Stängel werden bei kultivierten Exemplaren bis zu 40 cm lang und 5 cm dick und sind nicht verzweigt. Die Blätter sind am Stängel verteilt als auch als grundständige Rosette positioniert, wobei die Blätter herz- bis nierenförmig sind und einen Durchmesser von bis zu etwa 25 cm aufweisen, bei gezähntem bis fast ganzem Blattrand.

Die Pflanze weist einen lockeren, traubigen Blütenstand auf, wobei die Blütezeit von März bis Mai reicht. Die Früchte, in Form von linealen 1-2 cm langen und 1,5 bis 2 mm dicken Schoten reifen dann zwischen Mai und Juni.

Die senkrecht nach unten wachsenden Wurzelstöcke sind fleischig, 3-5 cm dick und bis zu 30 cm lang. [2][3]

Was die Inhaltsstoffe betrifft, so enthält *E. japonicum* verschiedene Klassen an Sekundärmetaboliten wie Flavonoide (Luteolin, Isovitexin, Isoorientin, Rutin, Astragalin), Phenylpropanoide (trans-Ferulasäure, p-Cumarsäure, Vanillinsäure), Terpenoide (Dehydrovomifoliol, cis-Roseosid), Carotenoide (all-trans-Lutein) und GLs [4] [5], wobei Letztere die hier behandelte und wohl auch interessanteste Stoffgruppe darstellen.

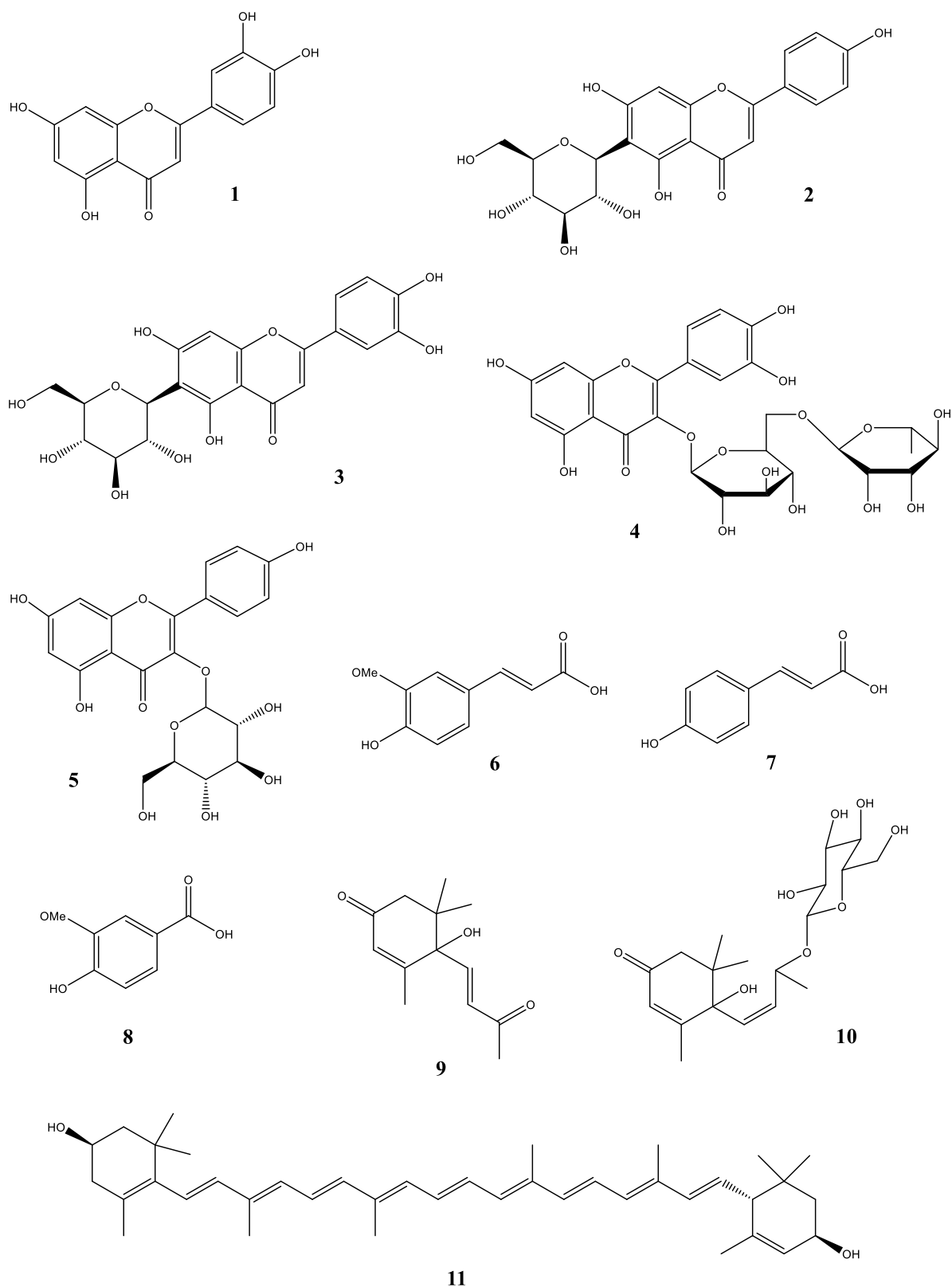


Abbildung 2: Einige der neben den Glukosiolaten in Wasabi enthaltenen Sekundärmetaboliten: Flavonoide (Luteolin (1), Isovitexin (2), Isoorientin (3), Rutin (4), Astragalin (5)), Phenylpropanoide (trans-Ferulasäure (6), p-Cumarsäure (7), Vanillinsäure (8)), Terpenoide (Dehydrovomifoliol (9), cis-Roseosid (10)), Carotenoide (all-trans-Lutein (11))[4][5]

3.2 Glucosinolate und Isothiocyanate

ITCs sind Abbauprodukte von GLs (auch Senfölglykoside genannt) und gelten als deren biologisch aktivste Abbauprodukte. [6] Bei GLs handelt es sich um Sekundärmetabolite von Pflanzen, die hauptsächlich in Vertretern der Familie der Brassicaceae (Kreuzblütler) wie Brokkoli, Weißkohl, Grünkohl, Rotkraut, Wasserkresse, Senf, Meerrettich und eben Wasabi zu finden sind. [6] Diese nutzen die GLs um sich vor Fressfeinden und Krankheitserregern zu schützen [6][7], möglicherweise dienen sie aber auch noch anderen Funktionen. GLs kommen in allen Geweben von Brassicaceen vor; werden diese nun durch Insekten oder andere Störfaktoren verletzt, so werden durch Hydrolyse, katalysiert durch das Enzym Myrosinase (beta-Thioglukosid-Glukohydrolase, EC 3.2.3.1), aus den GLs ITCs und andere Stoffe wie Nitrile, Epithionitrile, Indole, Thiocyanate oder Oxazolidin-2-thione gebildet, wobei die ITCs von all diesen Stoffgruppen die stärkste Wirkung gegen für Pflanzen pathogene Mikroorganismen aufweisen. [6] Damit diese Reaktion nicht unbeabsichtigt ablaufen kann, sind GLs und Myrosinasen in unterschiedlichen Zellen positioniert [8] und kommen erst bei Verletzung dieser Zellen miteinander in Kontakt.

Welche ITCs und andere Stoffe dabei genau aus den GLs gebildet werden, hängt von einer Reihe von Faktoren, wie der Konzentration an Metallionen, pH-Wert, Protein-Kofaktoren und Seitenkettenstruktur ab (siehe Abbildung 3). [8]

Die Metabolisierung von direkt über die Ernährung aufgenommenen oder aus GLs gebildeten ITCs wie zB AITC (Allylisothiocyanat) oder PEITC (Phenylethylisothiocyanate) erfolgt im menschlichen Organismus zuerst über eine Konjugation mit Glutathion, worauf eine Konversion im Zuge des Mercaptursäureweges zu NAC-Derivaten erfolgt, die dann über die Nieren ausgeschieden werden. [9][10]

Wasabi und die darin enthaltenen ITCs sind auch deswegen von Interesse, weil sie zahlreiche positive physiologische Wirkungen aufweisen. So wirken ITCs antiinflammatorisch [5], darunter etwa Anti-neuroinflammatorische und neuroprotektive Wirkungen [11], des Weiteren wirken sie antioxidativ und antikanzerogen, besonders was Lungen-, Darm- und Blasenkrebs anbelangt [12][13][14] und des Weiteren auch thrombozytenaggregationshemmend. [14][15]

Auch konnte für AITC, das durch Einwirkung der Myrosinase am häufigsten aus *E. japonicum* gebildete ITC, eine antimikrobielle Wirkung gegen Bakterien und Pilze nachgewiesen werden. [16]

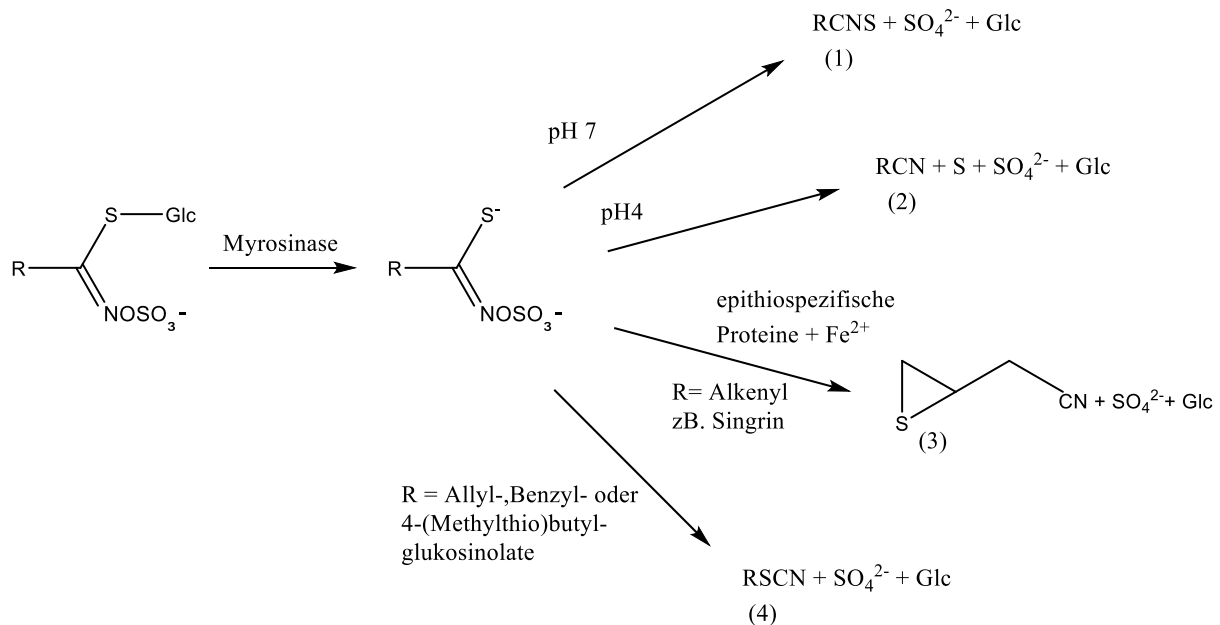


Abbildung 3: Umsetzung der GLs durch Myrosinase und die je nach vorhandenen Bedingungen/Edukten gebildeten Biosyntheseprodukte [8]

3.3 Chromatographie

3.3.1 Einleitung und Grundlagen

Das Prinzip der Chromatographie beruht auf dem Übergang zwischen zwei nicht mischbaren Phasen, der mobilen und der stationären Phase, wobei die mobile Phase flüssig, gasförmig oder eine superkritische Phase sein kann, während sich die stationäre Phase, die fest oder flüssig ist, in der Regel entweder auf einem Flachbett (z.B. Dünnschichtchromatographie (DC)) oder in einer Säule (z.B. Gaschromatographie (GC), Flüssigchromatographie (LC)) befindet. [17]

Man unterscheidet in der Chromatographie zwischen inneren Chromatogrammen, bei denen verschiedene Analyte innerhalb derselben Zeit unterschiedlich weite Strecken auf der stationären Phase zurücklegen, wie z.B. bei der DC und äußeren Chromatogrammen, bei denen verschiedene Analyte für die Strecke durch das Trennbett unterschiedlich lange Zeit (die Retentionszeit) benötigen und so aufgetrennt werden, solche äußeren Chromatogramme findet man z.B. bei der Säulenchromatographie. [17]

Die Trennung erfolgt in der Chromatographie grundsätzlich durch unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit der stationären bzw. der mobilen Phase, wobei sich diese Gleichgewichte über die Laufzeit des Analyten immer wieder neu einstellen, die wichtigsten Trennprinzipien stellen hierbei Verteilung und Adsorption dar. [17]

Die Trennung zweier Analyte kann prinzipiell durch die Beeinflussung der jeweiligen Wanderungsgeschwindigkeiten sowie durch eine möglichst geringe Peakverbreiterung optimiert werden, wobei ersteres mit der Verteilung zwischen stationärer und mobiler Phase zusammenhängt und zweiteres mit der Anzahl der Gleichgewichtseinstellungen über die Länge des chromatographischen Systems hinweg (hohe Anzahl theoretischer Trennböden). Wichtige Faktoren, um auf diese Weise eine gute und gleichzeitig rasche Trennung zu erreichen, sind möglichst homogene Packungen der stationären Phasen, kleine Säulendurchmesser, große Diffusionskoeffizienten der stationären, geringe Diffusionskoeffizienten der mobilen Phase und geringe Korngrößen der Partikel bzw. bei flüssigen stat. Phasen möglichst dünne immobilisierte Filme. [17]

Des Weiteren gibt es grundsätzlich zwei entgegengesetzte Systeme was die chemische Beschaffenheit der Oberfläche der stationären Phase anbelangt. Einmal die Normalphasenchromatographie, bei der die stationäre Phase eine polare Oberfläche aufweist und die mobile Phase von einer weniger polaren oder unpolaren Flüssigkeit gebildet wird. Demgegenüber steht die Umkehrphasenchromatographie, bei der die stationäre Phase eine unpolare Oberfläche hat und die mobile Phase dafür polar ist. Die Umkehrphasenchromatographie stellt hierbei die deutlich häufiger eingesetzte Anordnung dar. [17]

Das am häufigsten eingesetzte Material ist Kieselgel, neben Aluminiumoxid und Ionenaustauscherharzen. Das Kieselgel wird hierfür, je nachdem ob Normal- oder Umkehrphase, an seiner Oberfläche chemisch modifiziert, bei Normalphasen z.B. Diol-, Cyano- oder Amino-Gruppen. Bei Umkehrphasen sind Siloxane mit endständigen C₁₈-Gruppen am häufigsten. [17]

Chromatographische Methoden können sowohl präparativ als auch qualitativ und quantitativ eingesetzt werden. Die qualitative Information liegt bei inneren Chromatogrammen in der Position des Analyten, bei äußeren Chromatogrammen in der Retentionszeit wobei die Reproduzierbarkeit in der Regel deutlich geringer ist als z.B. die Wellenlängengenauigkeit in der Spektroskopie. Jedoch lässt sich, mithilfe einer Standardsubstanz die An- oder Abwesenheit eines bestimmten Analyten gut

nachweisen, wobei zur genaueren Identifizierung oftmals Kopplungen mit UV-Diodenarraydetektoren oder Massenspektrometern erfolgen. [17]

Bei quantitativen Analysen sind ebenfalls Standardsubstanzen nötig, mithilfe derer Kalibrierungen erstellt werden können. Bei inneren Chromatogrammen (DC) wird die gesamte Intensität eines Substanzflecks ausgemessen. Bei äußeren Chromatogrammen wie in der GC oder HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) kann über die Peakhöhe oder die Integration der Peakfläche ausgewertet werden, wobei zweiteres den Vorteil birgt, dass Veränderungen der Peakform nicht so sehr ins Gewicht fallen wie bei ersterem. [17]

3.3.2 Dünnschichtchromatographie

Die DC gehört zu den planaren Techniken, bei denen ein inneres Chromatogramm aufgezeichnet wird, also die Analyte in einer bestimmten Zeit unterschiedlich weit wandern. Eine andere planare Technik stellt z.B. die Elektrochromatographie dar. [17]

In der DC wird meist Kieselgel, in Form einer dünnen Schicht auf einem Träger wie Glas oder Aluminium aufgebracht, als stationäre Phase verwendet, es sind aber ebenso wie in der Säulenchromatographie auch Umkehrphasen möglich. Hierfür wird das Kieselgel in Form feinverteilter Teilchen auf bis zu 20 x 20 cm große Platten aufgebracht, mit Schichtdicken von etwa 200 bis 250 µm und Partikeldurchmessern von 20 µm und mehr. [17]

Eine Weiterentwicklung der DC stellt die Hochleistungs-DC, die HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography) dar, bei der im Unterschied zur gewöhnlichen DC Schichtdicken von 100 µm und Korngrößen von 5 µm und weniger angewandt werden, wodurch man auf gleich langer Laufstrecke eine doppelt so hohe Trennstufenzahl erreicht und sich gleichzeitig die Laufzeit halbieren lässt. Etwas nachteilig ist jedoch, dass man für das Aufbringen der Proben feinere Instrumente bzw. Systeme benötigt als bei der normalen DC. [17]

In der DC werden die Strecken, die die Analyte gewandert sind, vermessen und anschließend ins Verhältnis zur Wanderstrecke der mobilen Phase gesetzt, wodurch man den relativen Retentionsfaktor (R_f -Wert) erhält, mithilfe dessen man, bei Verwendung desselben Lösungsmittelgemisches für die mobilen Phase und derselben stationären Phase unabhängig von der absoluten Laufstrecke des Analyten, Vergleiche mit anderen Experimenten anstellen kann. [17]

Die Detektion erfolgt oft rein optisch, wobei Vergleichssubstanzen auf derselben DC-Platte mitaufgebracht werden, oder man vergleicht die R_f -Werte. Ist der Analyt bzw. die Vergleichssubstanz selbst nicht direkt sichtbar, nutzt man Lumineszenzeigenschaften oder man sprüht die stationäre Phase im Vorhinein mit fluoreszierenden Indikatorstoffen ein, wodurch sich an der Stelle des Analyten eine Fluoreszenzlöschung ergibt, beides lässt sich mithilfe von UV-Lampen sichtbar machen. Eine weitere Möglichkeit ist das Besprühen mit unspezifischen Oxidationsmitteln oder spezifischen Sprühreagentien wie z.B. Ninhydrin. [17]

Angewendet wird die DC oft für Screening-Methoden oder als Vorstufe vor säulenchromatographischen Techniken als auch zur Überwachung von chemischen Reaktionen wobei bei allen diesen Punkten meist nur qualitative oder maximal semi-quantitative Fragen gestellt werden. Es ist aber auch möglich, DC-Platten mithilfe von Scannern photometrisch auszuwerten, was auch quantitative Fragestellungen erlaubt und auch präparative Anwendungen gibt es. [17]

3.3.3 Flüssigchromatographie, HPLC und UPLC

Wie bereits der Name aussagt, verwendet man in der Flüssigkeitschromatographie eine flüssige mobile Phase. In der Vergangenheit wurden Säulen mit 1-5 cm Durchmesser und Längen bis zu 5 m verwendet, bei Korngrößen von 150 bis 200 μm . Dabei erkannte man früh, dass für eine Verbesserung der Trennleistung die Korngröße des Trägermaterials für die stationäre Phase drastisch reduziert werden müsste, was wiederum bedeutete, mit stark erhöhten Drücken zu arbeiten, um trotzdem vertretbare Fließmittelgeschwindigkeiten zu erreichen, wodurch die HPLC geboren war. [17]

In der HPLC ((Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, High Performance Liquid Chromatography) werden für das Trägermaterial Korngrößen von 3-10 μm eingesetzt, weswegen, um akzeptable Fließmittelgeschwindigkeiten (1 ml/min) zu erreichen, Drücke bis zu mehreren hundert Bar nötig sind, was mit Langhub-, Kurzhubkolbenpumpen oder Kolbenmembranpumpen erreicht wird. Standardsäulen sind 250 mm lang und haben einen Innendurchmesser von 4,6 mm, wodurch bei den oben erwähnten Korngrößen Trennstufenzahlen von 50000 pro Meter erzielt werden.

Die verwendeten Trennprinzipien beruhen auf Adsorption, Verteilung, Ionenaustausch und Ausschluss, wobei diese Trennmechanismen kaum isoliert auftreten, sondern zu einem bestimmten Grad gleichzeitig wirken. Die Austauschchromatographie in Form der

Flüssig-Fest-Chromatographie war hierbei das erste genutzte Prinzip. Das Prinzip der Verteilung wird in der Flüssig-Flüssig-Chromatographie eingesetzt. Zum Prinzip Verteilung gehören auch die Normalphasen- und die Umkehrphasenchromatographie, die bereits erwähnt wurden. Zum Ionenaustausch gehört die Ionenchromatographie. Dann bleibt noch das Ausschlussprinzip, das auf dem Molekularsiebprinzip beruht, also, dass nur Verbindungen, die klein genug sind, in die Poren des verwendeten Sorbens eindringen können, die dazugehörige Methode nennt man Gelchromatographie. Es gibt auch noch ein fünftes Prinzip, auf dem die Affinitätschromatographie beruht. [17]

Als Detektoren werden in der HPLC am häufigsten UV-Vis-Detektoren wie z.B. Photodiodenarraydetektoren eingesetzt, des Weiteren gibt es Fluoreszenzdetektoren, Refraktometer, elektrochemische Detektoren oder auch Lichtstreuendetektoren, wie der in dieser Arbeit verwendete ELSD (Evaporative Light Scattering Detector), bei dem die Probe in einem Inertgasstrom zerstäubt und zu Feststoffpartikeln verdampft wird, an denen dann die inelastische Streuung von Laserlicht gemessen wird. Realisiert werden des Weiteren auch Kopplungen mit Atomabsorptions- oder Atomemissionsspektrometern, oder, wie in dieser Arbeit, mit einem Massenspektrometer, was eine Vielzahl an weiteren Möglichkeiten eröffnet. [17]

Eine weitere Entwicklung sind nun UHPLC-Anlagen (Ultra High Performance Chromatography), die eine nochmalige Optimierung der Komponenten von HPLC-Anlagen darstellen. Hierbei wurde die Partikelgröße auf 1,7 μm reduziert, die dazugehörigen Säulen sind nur mehr 100-150 mm lang, bei einem Durchmesser von 3 mm und auch die übrigen Komponenten wurden nochmals verbessert, wodurch sich noch kürzere Trennzeiten realisieren lassen. [17] [18]

3.3.4 Supercritical Fluid Chromatography

Bei der SFC (dt.: superkritischen Flüssig- oder Fluidchromatographie) handelt es sich um eine Art der Chromatographie bei der superkritische bzw. überkritische Flüssigkeiten als mobile Phase eingesetzt werden. [17]

Überkritisch ist eine Substanz dann, wenn sie bis bzw. über ihre kritische Temperatur erhitzt wird, so dass sie eigentlich in den gasförmigen Zustand übergehen müsste, jedoch gleichzeitig ein so hoher Druck, der kritische Druck, angelegt wird, sodass sie nicht gasförmig werden kann. Die betreffende Substanz geht dann in den überkritischen

Zustand über und wird zu einem Fluid, das seinen Eigenschaften nach zwischen flüssig und gasförmig liegt. Der zugehörige Punkt im Druck/Temperaturdiagramm wird kritischer Punkt, im Gegensatz zum Tripelpunkt, genannt. [17]

Die SFC ähnelt grundsätzlich stark einer gewöhnlichen HPLC, jedoch werden statt flüssigen, überkritische fluide Phasen verwendet, wodurch sich die Vorteile der GC und der LC verbinden lassen. [17]

In der vorliegenden Arbeit wurde CO₂ als überkritische mobile Phase verwendet. Dessen kritische Punkte liegen bei 31,0 °C (304.1 K) bzw. 73,8 bar (7.38 MPa). [17]

Die Vorteile von SFC mit CO₂ liegen darin, dass CO₂ inert, nicht-toxisch, nicht brennbar und chemisch stabil ist. Des Weiteren ist es als mobile Phase unpolar (etwa wie n-Hexan) und mischbar mit allen organischen Lösungsmitteln.

Überkritische Fluide weisen generell eine sehr niedrige Viskosität auf, was wiederum höhere Flussraten und kleinere Partikel der stationären Phase erlaubt, wie sie in der UHPLC verwendet werden. [18]

Bei der in dieser Arbeit verwendeten UPC²-Anlage ist es des Weiteren möglich, dem überkritischen CO₂, bis zu einem gewissen Anteil (50% des Gesamtvolumens, darüber würde sich der überkritische Zustand nicht mehr halten lassen) ein weiteres Lösungsmittel (=Co-Solvent) zuzusetzen (isokratisch oder in Form eines Gradienten) um auf diese Weise dessen Polarität zu modulieren, wodurch die Löslichkeit des Analyten in und damit auch die Stärke der Wechselwirkungen mit der mobilen Phase beeinflusst werden können. [17]

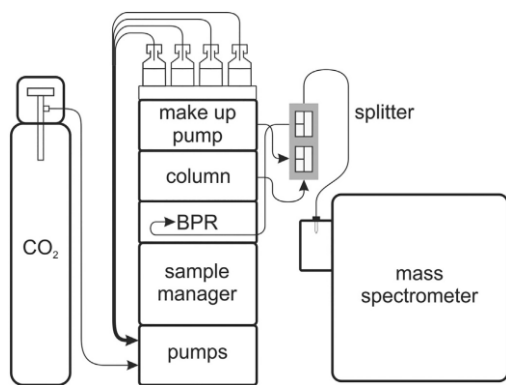


Abbildung 4: Schematische Darstellung einer UHPSFC-MS-Anlage, für Erklärung siehe 6.7
 Quelle: Storbeck et al. (2018) The utility of ultra-high performance supercritical fluid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPSFC-MS/MS) for clinically relevant steroid analysis. *J Chrom B*, 1085, 36-41

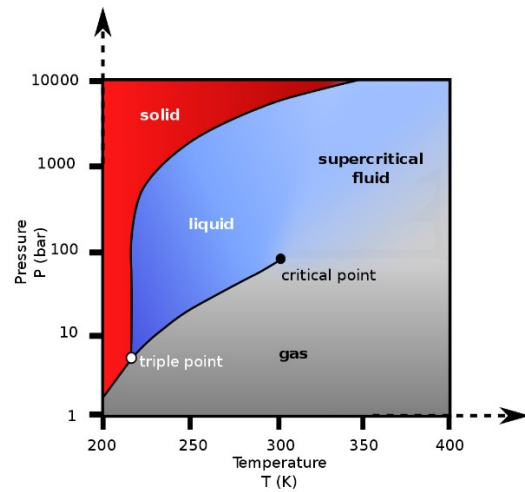


Abbildung 5: Phasendiagramm von CO₂ mit kritischem Punkt und Triplepunkt,
 Quelle: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Carbon_dioxide_pressure-temperature_phase_diagram-en.svg#/media/File:Carbon_dioxide_pressure-temperature_phase_diagram-en.svg

4 Spezieller Teil/ Ergebnisse

4.1 Einleitung

Bereits in einer vorangegangenen Masterarbeit (Mihalache, 2021)[1], ist versucht worden, eine Methode zur Quantifizierung von ITCs aus *E. japonicum* zu entwickeln.

Dabei sollten die unveränderten ITCs direkt, ohne vorherige chemische Veränderung per SFC aufgetrennt und bestimmt werden.

Hierzu wurden sieben der wichtigsten ITCs erworben und eine optimierte Auftrennungsmethode auf der UPC²-Anlage (UltraPerformance Convergence Chromatography™) entwickelt (für genauere Erklärungen siehe 6.7 sowie 3.3.4), wobei als Detektor ein PDA bei 245 nm eingesetzt wurde.

Anschließend wurden verschiedene Extraktionsmethoden getestet, um die enthaltenen GLs möglichst vollständig umzuwandeln und die dabei entstandenen ITCs zu extrahieren. Als Proben sind hierbei sowohl verschiedene Wasabi-Proben als auch andere ITC-haltige Pflanzen verwendet worden.

Alle hergestellten Extrakte wurden daraufhin mittels der zuvor entwickelten Methode analysiert, wobei sich herausstellte, dass eine direkte quantitative Bestimmung der ITCs mittels UV-Vis-Detektor (PDA) aufgrund der zu hohen Nachweisgrenze nicht möglich war.

Deswegen wurde nun in dieser Arbeit ein neuer Ansatz gewählt.

In diesem sollte versucht werden, die ITCs reproduzierbar, mittels eines bereits von Pilipczuk (2017)[6] publizierten Verfahrens, aus den verschiedenen Organen von *E. japonicum* (Rhizoma (dt. Wurzelstock), Caulis (dt. Stängel) und Folium (dt. Blatt) zu extrahieren. Anfangs wurde auch ein anderes Verfahren, nach Rodrigues (2016)[19], zur Extraktion ins Auge gefasst, dann aber aufgrund des Erfolges des bei Pilipczuk (2017)[6] publizierten Verfahrens fallen gelassen.

Anschließend und darin sollte nun auch der große Unterschied zur vorangegangenen Arbeit von Mihalache (2021)[1] liegen - sollten die ITCs in den einzelnen Extrakten jeweils mit NAC derivatisiert werden, um daraufhin ebenfalls auf dem UPC²-Gerät (UHPSFC-PDA-QDa) aufgetrennt und danach detektiert zu werden.

Die Derivatisierung sollte dazu führen, dass die ITCs besser ionisierbar werden sollten, um so eine möglichst niedrige Nachweisgrenze in einem MS-Detektor

(Massenspektrometer = QDa) und damit eine gute Detektierbarkeit zu erreichen. Zusätzlich zur besseren Detektierbarkeit sollte sich daraus noch der Vorteil ergeben, dass die derivatisierten ITCs (= ITC-NAC) nicht mehr flüssig und flüchtig, sondern annähernd fest und somit besser handhabbar werden sollten.

Das zu analysierende Pflanzenmaterial wurde von der Firma PhytonIQ GmbH in Form von gefriergetrockneten Pulvern der verschiedenen Pflanzenorgane zur Verfügung gestellt.

4.2 Methodenentwicklung UHPSFC-PDA-QDa

4.2.1 Einleitung und erste Versuche

Um festzustellen, ob die Derivatisierung der verschiedenen ITCs zu einer Verbesserung der Detektierbarkeit im Massenspektrometer führt, wurden noch vor der ersten Extraktion der pflanzlichen Proben Versuche mit verschiedenen ITC-NAC Standards durchgeführt, um gegebenenfalls frühzeitig auf eine bessere Methodik umsteigen zu können.

Im weiteren Verlauf der Methodenentwicklung wurde immer nur jeweils ein Parameter verändert/optimiert, sämtliche weitere zu den jeweiligen Zeitpunkten eingestellten Parameter sind unter Punkt 6.2 zu finden.

In vielen der Chromatogramme findet sich nach etwa 25-50% der Laufzeit ein spitzer „Geisterpeak“, mit dem sich oftmals auch die Grundlinie erhöht. Hierbei handelt es sich um eine gerätespezifische Anomalie, die jedoch keine weiteren Auswirkungen auf die Messungen hatte und die im Laufe der Messungen ausgemerzt werden konnte.

In einem ersten Schritt wurden zwei zuvor gekaufte ITC-NAC-Standards (mit NAC derivatisiertes Benzylisothiocyanat (= BITC-NAC) bzw. Phenylethylisothiocyanat (= PEITC-NAC)) in Hexan/Isopropanol (IPA) gelöst und auf der UPC² (=UHP-SFC-PDA-QDa) mit PDA- und Massendetektor (=QDa) vermessen.

Dabei wurden auf beiden Detektoren gute Peakintensitäten erreicht.

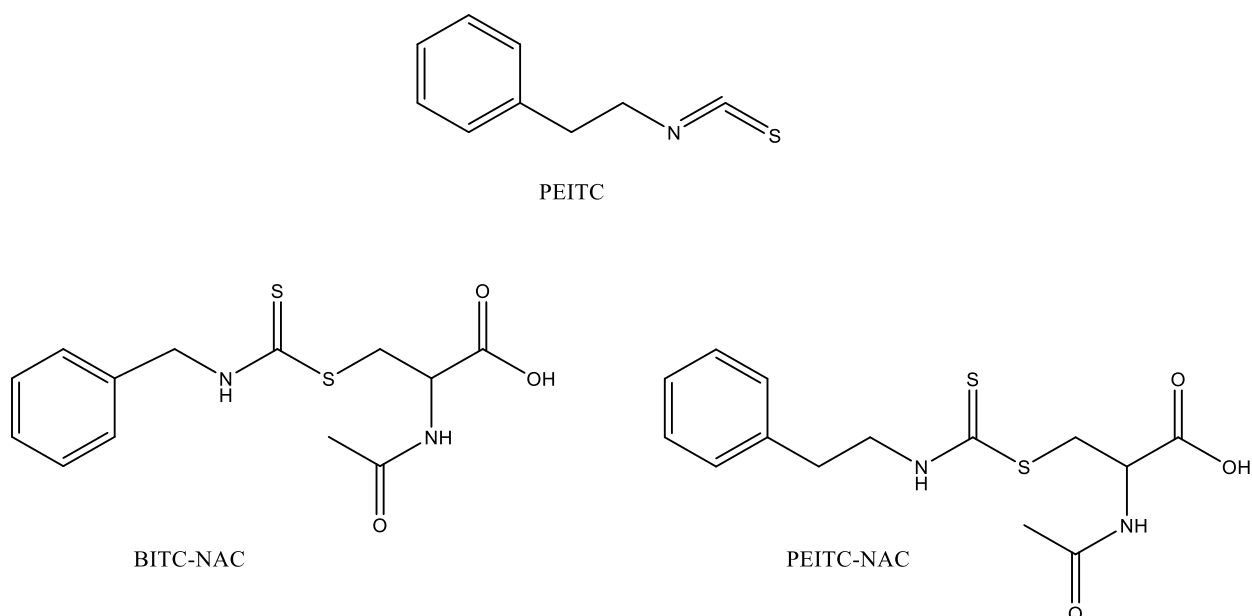


Abbildung 6: Die für die ersten Versuche und Optimierungsschritte gekauften ITC-(PEITC) und ITC-NAC-Standards (BITC-NAC, PEITC-NAC)

4.2.2 Optimierung des Make-up-Solvents

Nach den erfolgreichen ersten Tests mit den beiden ITC-NAC-Standards wurde mit BITC-NAC als Probe die Methodenoptimierung begonnen, als Blank diente jeweils eine Hexan/IPA-Mischung.

Als erstes wurde das Make-up-Solvent (=ISM-Solvent) optimiert, dieses wird der Probe nach der Auftrennung über die SFC zugegeben um eine bessere Ionisierung in der Ionenquelle des Massenspektrometers (=QDa) und damit höhere Signalstärken zu erreichen.

Diese Lösung bestand grundsätzlich aus einem Methanol/Wasser-Gemisch (95:5), dem unterschiedliche Substanzen zugesetzt wurden:

Tabelle 1: Getestete ISM-Solvent-Zusätze und Massenintensitäten der jeweiligen Messungen

ISM-Solvent-Zusatz	Absolute Intensität des höchsten Peaks
ohne Zusatz	$563 \cdot 10^3$
0,1% AS	$440 \cdot 10^3$
0,1% Essigsäure	$240 \cdot 10^3$
<u>10 mM Ammoniumformiat</u>	<u>$3350 \cdot 10^3$</u>
10 mM Ammoniumacetat	$3000 \cdot 10^3$
0,1% Ammoniak-Lösung*	$3300 \cdot 10^3$

*Messung wurde im Gegensatz zu den anderen mit PEITC-NAC statt BITC-NAC durchgeführt, was jedoch nicht sehr ins Gewicht fallen sollte, da das Signal im Massenchromatogramm fast ausschließlich vom NAC-Rest abhängen sollte und die PEITC-NAC-Lösung (0,306 mmol/L) annähernd dieselbe molare Konzentration hatte wie die BITC-NAC-Lösung (0,330 mmol/L) .

Während bei Zugabe der Säuren die Peakhöhe gemindert, bzw. sogar halbiert wurde, ergab eine Zugabe der Ammoniumsalze, sowie der Ammoniak-Lösung eine Verbesserung der Signalstärke um etwa das 6-fache.

Ausgewählt wurde schließlich, aufgrund der höchsten erzielten Peakintensitäten, ein Zusatz von 10 mM Ammoniumformiat zum Methanol/Wasser-Gemisch (95:5) als ISM-Solvent, das in weiterer Folge bei allen Analysen angewandt wurde.

4.2.3 Vermessung von nicht-derivatisierten und derivatisierten ITCs

Um festzustellen, ob die Derivatisierung der ITCs mit NAC im Wasabi Extrakt tatsächlich zu besserer Detektierbarkeit im Massenspektrometer führen würde und damit der für diese Masterarbeit gewählte Ansatz, abgesehen von Matrixeffekten, grundsätzlich funktionieren würde, wurde nun zuerst, noch vor der Extraktion des Pflanzenmaterials, ein ITC, konkret PEITC in derivatisierter und in nicht-derivatisierter Form vermessen.

Hierfür wurden PEITC und PEITC-NAC jeweils in Form gekaufter Standards unter denselben Bedingungen mit PDA- und Massendetektor auf der UPC² analysiert.

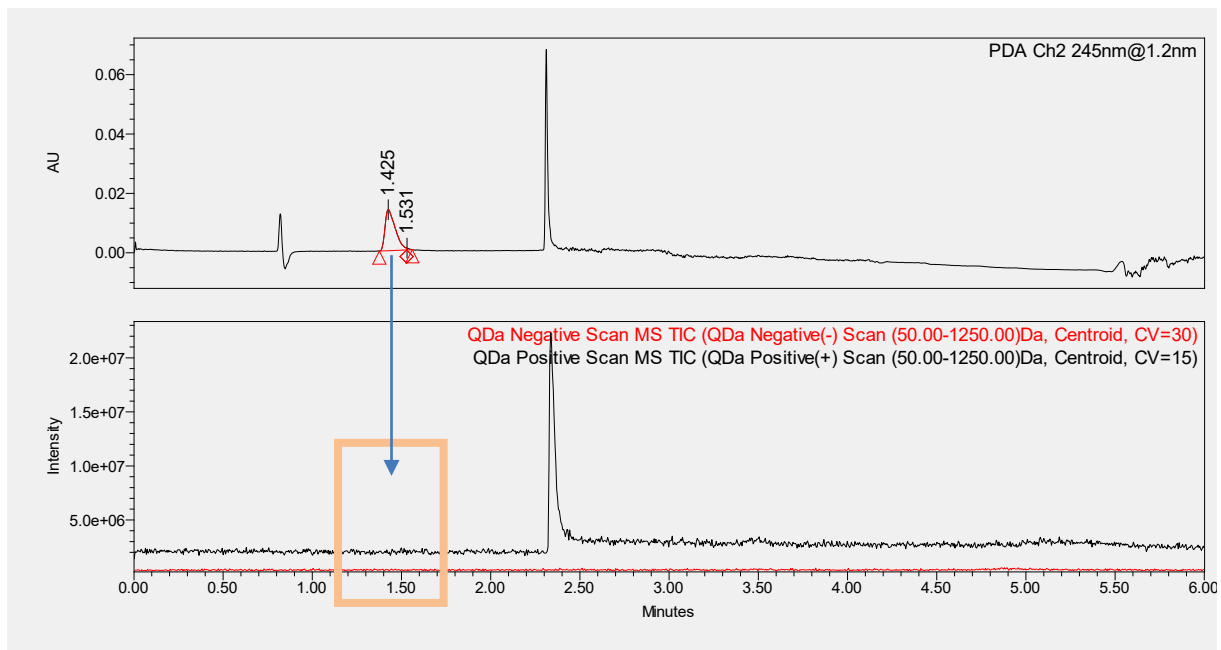


Abbildung 7: UPC²-Chromatogramm einer PEITC-Lösung, oben PDA-Detektor bei 245 nm, unten Massendetektor (TIC-Plot), Inj.ID: 1589

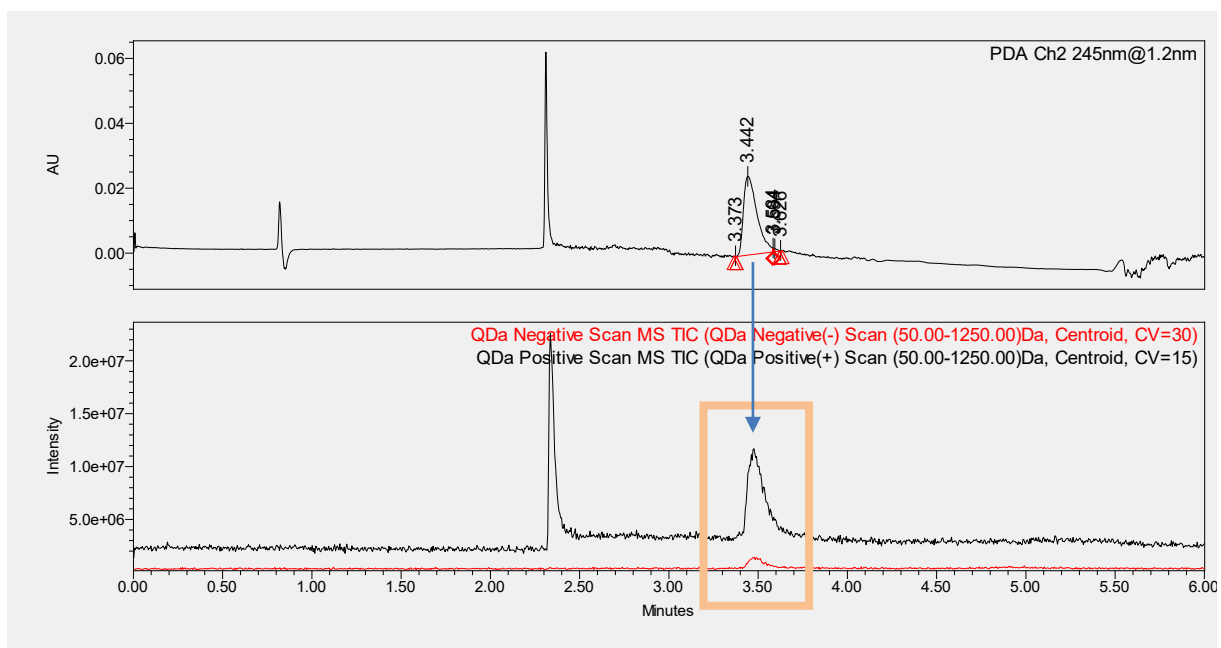


Abbildung 8: Inj.ID: UPC²-Chromatogramm einer PEITC-NAC-Lösung, oben PDA-Detektor bei 245 nm, unten Massendetektor (TIC-Plot), Inj.ID: 1580

Wie in den Abbildungen 7 und 8 zu erkennen ist, lässt sich PEITC zwar mit dem UV-Detektor gut detektieren, ist aber im Massenchromatogramm direkt darunter nicht zu sehen, lässt sich also nicht detektieren, was an einer schlechten Ionisierbarkeit liegen dürfte. Demgegenüber ist bei PEITC-NAC sowohl im UV-Detektor als auch im Massendetektor ein deutlicher Peak zu sehen. Die Peaks bei 0,8 min und 2,3 min sind gerätespezifisch und haben nichts mit den Analyten zu tun.

Es ist also ersichtlich, dass, während sowohl das nicht-derivatisierte ITC PEITC, als auch dessen derivatisierte Form PEITC-NAC im UV-Detektor gut zu sehen waren, nur die derivatisierte Form, also PEITC-NAC, im Massenspektrometer detektiert werden konnte und das obwohl die vermessene PEITC-Lösung (0,968 mmol/L) dreimal höher konzentriert war als die PEITC-NAC-Lösung (0,306 mmol/L).

4.2.4 Auswahl der Trennsäule

Nachdem durch den Vergleich von PEITC und PEITC-NAC als Reinsubstanzen im Massenspektrometer die grundsätzliche Praktikabilität des Ansatzes getestet worden war, wurde nun dazu übergegangen, die Methode anhand des tatsächlichen Probenmaterials, eines der derivatisierten Wasabi-Extrakte, zu optimieren.

Hierzu wurde die erste Charge der Wasabi-Extrakte anhand der in Punkt 4.3 und 4.4 beschriebenen Vorgangsweise extrahiert sowie derivatisiert und anschließend mit dem Rhizom-Extrakt aus dieser ersten Charge die Testung der verschiedenen Trennsäulen und die darauffolgenden Verbesserungen bis zur Optimierung des Co-Solvents vorgenommen, anschließend wurde eine neue Charge an derivatisierten Wasabi Extrakten hergestellt und für die weiteren Versuche verwendet.

Tabelle 2: Getestete Trennsäulen

Trennsäulen	Dimensionen und Partikelgröße
Viridis® BEH	3.0 x 100 mm, 1.7 µm
Viridis® BEH 2-EP	3.0 x 100 mm, 1.7 µm
Viridis® CSH Fluoro-Phenyl	3.0 x 100 mm, 1.7 µm
Viridis® Silica	3.0 x 150 mm, 5.0 µm
Viridis® Silica 2-EP	3.0 x 100 mm, 5.0 µm
Torus® 1-AA	3.0 x 100 mm, 1.7 µm
Torus® 2-PIC	3.0 x 100 mm, 1.7 µm
Torus® DEA	3.0 x 100 mm, 1.7 µm
Torus® DIOL	3.0 x 100 mm, 1.7 µm

Auswahlkriterien waren eine möglichst hohe Trennleistung, sowie möglichst kurze Trennzeiten bzw. eine möglichst kurze Dauer bis zur Elution des ersten Substanzpeaks. Zur Auswertung herangezogen wurde hier der PDA-Detektor bei 210 nm, da die Chromatogramme bei diesem aussagekräftiger waren als die des Massendetektors.

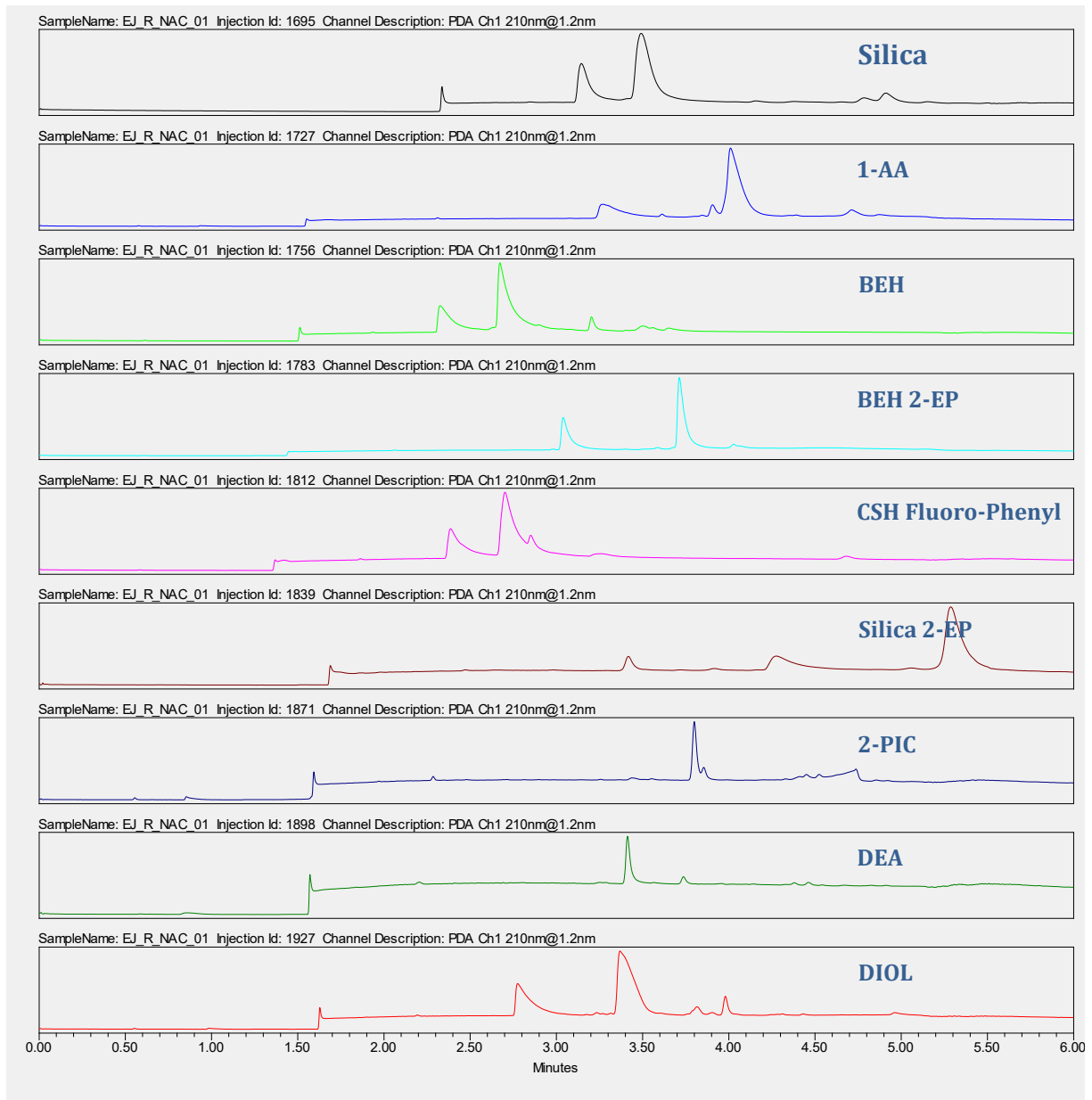


Abbildung 9: UPC²-Chromatogramm der oben angeführten Trennsäulen als UV-Chromatogramme bei 210 nm

Wie aus den Chromatogrammen ersichtlich wird, haben die DEA- und 2-PIC-Säulen zwar scharfe aber nur wenige Peaks.

Die Silica-2-EP-Säule weist die längsten Trennzeiten auf und fällt deshalb auch weg.

Auf den Säulen BEH-2-EP, 1-AA und Silica eluieren die einzelnen Substanzen zwar bereits deutlich früher, aber ebenso deutlich später als bei der BEH- und der CSH Fluoro-Phenyl-Säule.

Beim Vergleich der BEH- und CSH Fluoro-Phenyl-Säule weist die BEH-Säule die kürzere (und über alle Trennsäulen die kürzeste) Dauer bis zur Elution des ersten größeren Substanzpeaks bei 2,00 min (davor nur gerätespezifische „Geisterpeaks“ wie in 4.2.1 erwähnt) auf und hat auch eine deutlich bessere Trennleistung. Sie wurde deshalb zur weiteren Methodenoptimierung herangezogen.

Neben der BEH-Säule wurde auch noch die DIOL-Säule ausgewählt, da sie die drittkürzeste Dauer bis zur Elution des ersten Substanzpeaks aufweist und dabei eine noch bessere Trennleistung als die BEH-Säule hat.

Für die weiteren Analysen wurden zunächst die beiden Trennsäulen BEH und DIOL verwendet.

Nach den Versuchen zu 4.2.5.2 wurde aufgrund ihrer etwas besseren Trennleistung im Gegensatz zur BEH-Säule nur mehr die DIOL-Säule für alle weiteren Analysen verwendet.

4.2.5 Optimierung des Co-Solvents

4.2.5.1 Optimierung des Co-Solvents

In einem weiteren Schritt wurden verschiedene Co-Solventien auf den zuvor ausgewählten Trennsäulen BEH und DIOL getestet.

Wie in Punkt 3.3.4 dargelegt, wird das Co-Solvent verwendet um das unpolare CO₂, das bei der UPC² als mobile Phase dient, in seiner Polarität zu modulieren, indem das Co-Solvent der mobilen Phase mit einem Anteil von bis zu 50% zugesetzt wird. Wie aus den Abbildungen 10 und 11 ersichtlich, ergibt sich hierdurch eine massive Veränderung in der Trennung bzw. Detektierbarkeit der einzelnen Substanzen, insbesondere im Hinblick auf Retentionszeiten und Höhe der Grundlinie.

Es wurden 4 verschiedene Lösungsmittel als Co-Solvents getestet, Methanol, IPA, Ethanol und Acetonitril.

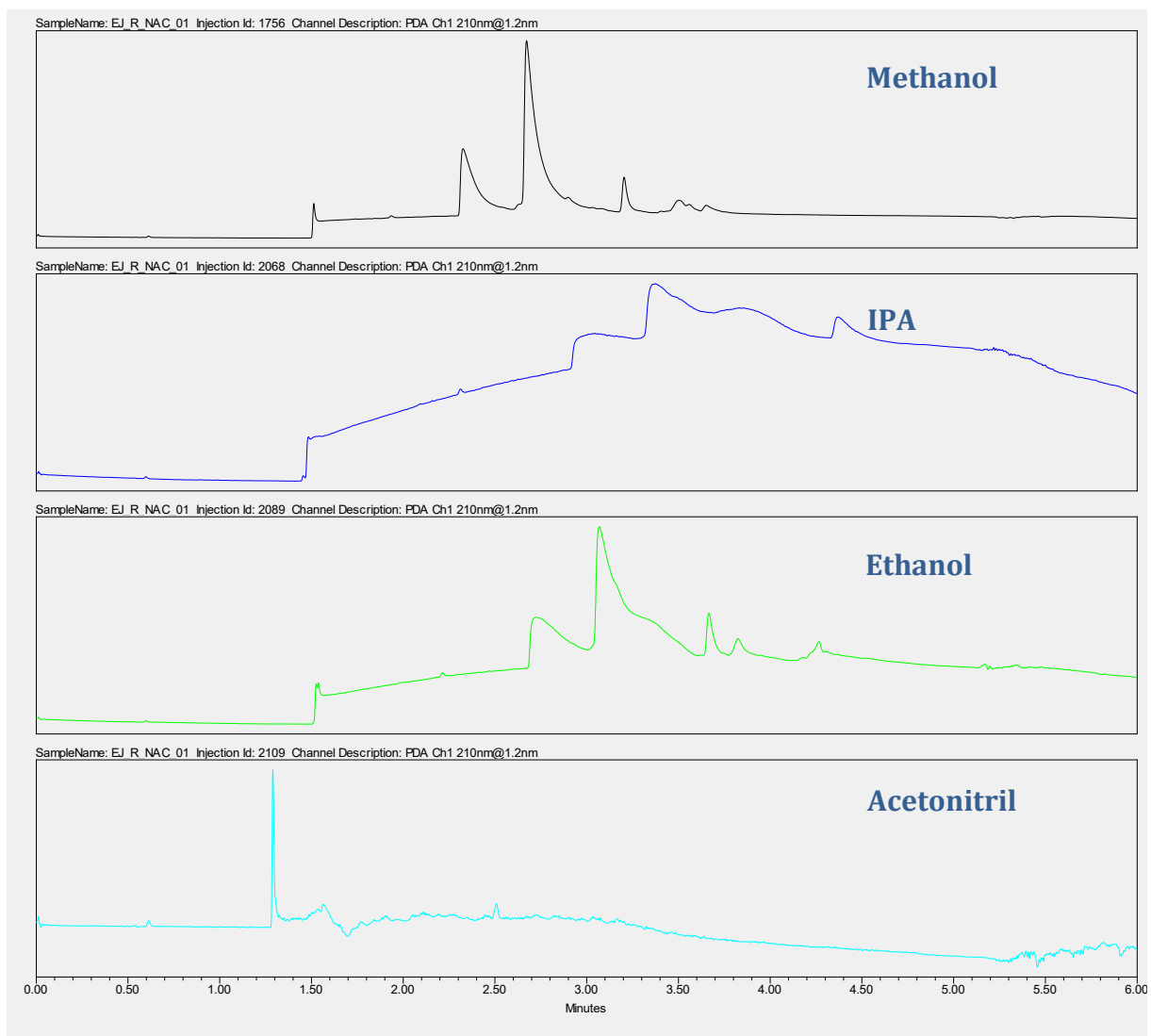


Abbildung 10: UPC²-Chromatogramm mit PDA-Detektor bei 210 nm zur Testung der verschiedenen Co-Solventien auf der BEH-Säule. Von oben nach unten: Inj.ID: 1756, 2068, 2089, 2109

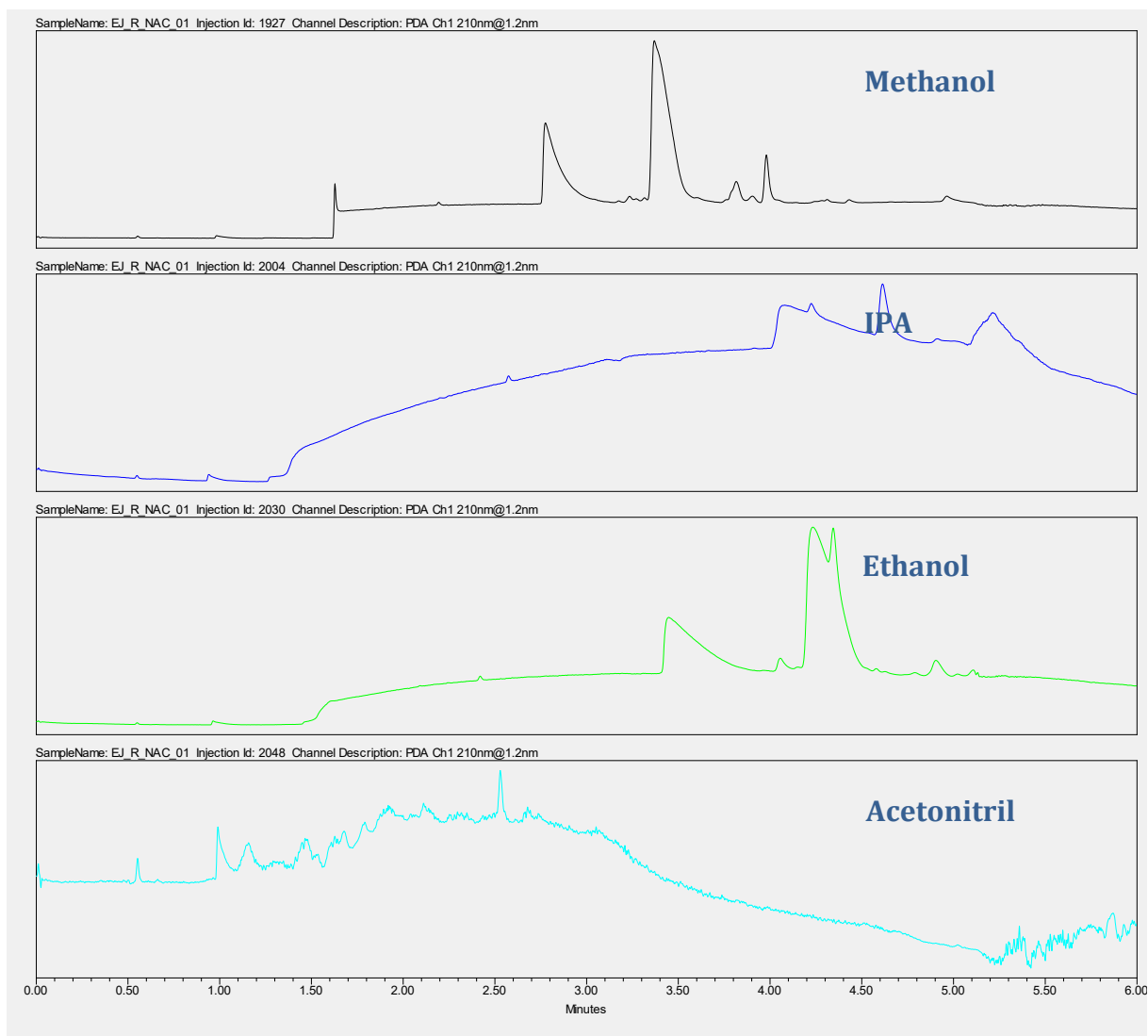


Abbildung 11: UPC²-Chromatogramm mit PDA-Detektor bei 210 nm zur Testung der verschiedenen Co-Solventien auf der DIOL-Säule

Bei Acetonitril traten bei beiden Säulen massive Schwankungen der Grundlinie auf.

Ethanol zeigte zwar eine annähernd konstante Grundlinie, jedoch verlängerte sich die Zeit bis zum Eluieren des ersten Substanzpeaks erheblich.

Bei Verwendung von IPA trat sowohl eine massive Erhöhung der Grundlinie als auch eine, im Vergleich zu Ethanol, noch längere Dauer bis zur Elution des ersten Substanzpeaks auf.

Nach diesen Vorversuchen wurde Methanol als Co-Solvent ausgewählt, da es (zumindest auf der DIOL-Säule) eine konstante Grundlinie, gute Auftrennung der Einzelsubstanzen als auch den kürzesten Zeitraum bis zum Eluieren des ersten Substanzpeaks aufwies.

4.2.5.2 Optimierung des Co-Solvent-Zusatzes

Zusätzlich zur Auswahl von Methanol als Co-Solvent wurde auch noch ein Zusatz von Ameisensäure (AS) zu diesem getestet, um, wenn möglich, die Intensität der Substanzpeaks noch zu erhöhen.

Der erhoffte Effekt der schärferen Substanzpeaks kommt dadurch zustande, dass bei einem (durch AS) erniedrigten pH-Wert nicht zwei verschiedene Formen des Analytmoleküls vorhanden sind, sondern alle Analytmoleküle eher in undissoziiertem oder dissoziiertem Zustand vorliegen.

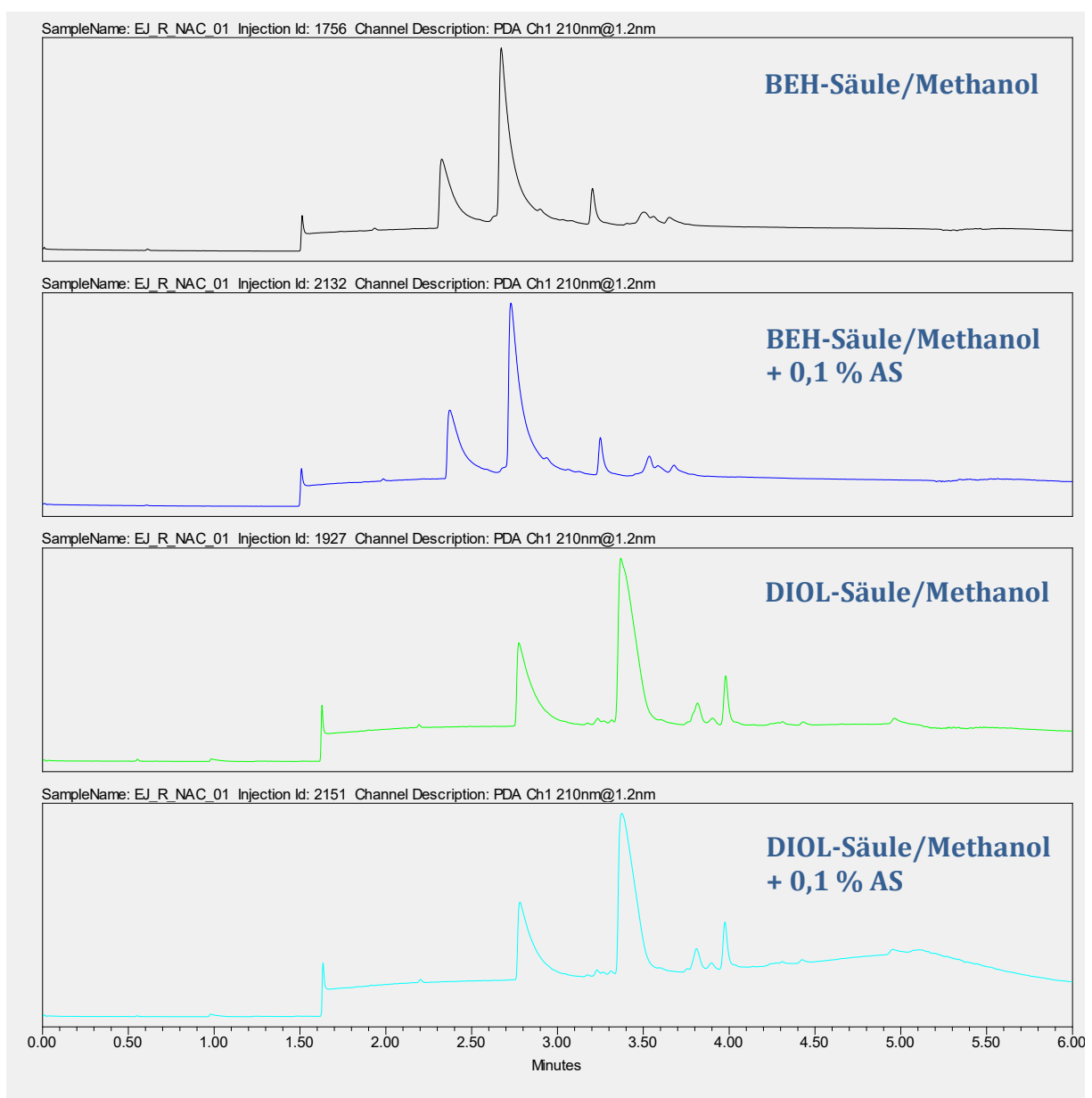


Abbildung 12: UPC²-Chromatogramm mit PDA-Detektor bei 210 nm zur Testung von 0,1 % AS als Co-Solvent-Zusatz auf BEH- und DIOL-Säule

Hierbei wurden Versuche ohne AS, mit 0,1% und mit 0,2% AS verglichen (Versuche mit 0,2% AS hier nicht dargestellt (Inj.ID: 2573)), wobei sich ein Zusatz von 0,1% AS als die beste Wahl herausstellte.

Nach der Optimierung des Co-Solvents wurde eine zweite Charge an Wasabi Extrakten hergestellt und ab der nun folgenden Optimierung des Lösungsmittelgradienten mit dem derivatisierten Rhizom-Extrakt dieser zweiten Charge als Probenmaterial weiter optimiert.

4.2.6 Optimierung des Lösungsmittelgradienten

Die Optimierung des Lösungsmittelgradienten stellte eine der wirksamsten, wenn auch aufwendigsten Optimierungsschritte dar.

Das Ziel dieses Optimierungsschrittes war sowohl eine verbesserte Trennung der gesuchten Analyte, als auch eine möglichst kurze Gesamtdauer des Trennvorgangs.

Hierbei wurde die Menge des zugesetzten Co-Solvents (Methanol mit einem Zusatz von 0,1% AS) optimiert, das der mobilen Phase (CO₂) zugesetzt wurde um dessen Polarität zu verändern und so eine bestmögliche Trennung der einzelnen Substanzen zu erreichen.

Zur Optimierung des Lösungsmittelgradienten wurden diverse Versuche durchgeführt und verschiedene Parameter variiert, wobei der Zusatz an Co-Solventien aus technischen Gründen auf max. 50% begrenzt war (siehe Punkt 3.3.4).

Als Versuchsmaterial diente, wie bereits bei den vorangegangenen Versuchen, derivatisierter Rhizom-Extrakt aus *E. japonicum*, wobei die Versuche Inj.ID 2151 und 2215 noch mit derivatisiertem Rhizom-Extrakt aus der ersten Charge durchgeführt wurden und ab Inj.ID 2344 Extrakt aus der zweiten Charge verwendet wurde.

Da nicht alle laut Literatur am höchsten konzentrierten ITC-NACs Standards käuflich zu erwerben waren, wurden als Kompromiss die zu erwartenden m/z-Werte der ITC-NACs berechnet und dann die Massenchromatogramme für jeden dieser m/z-Werte, zu einem Chromatogramm kombiniert, auch Extracted Ion Chromatogramm (EIC) genannt, um so möglichst gezielt die Trennung der gesuchten acht ITC-NACs vorantreiben zu können.

Da beim verwendeten Massenspektrometer ESI als Ionenquelle verwendet wurde, konnte davon ausgegangen werden, dass die gesuchten ITC-NACs überwiegend nur als

einfach geladene Ionen auftreten würden, die gesuchten m/z-Werte für positive Ionen sich also einfach aus den exakten Massen der jeweiligen ITC-NACs plus 1 (für H⁺) ergeben würden.

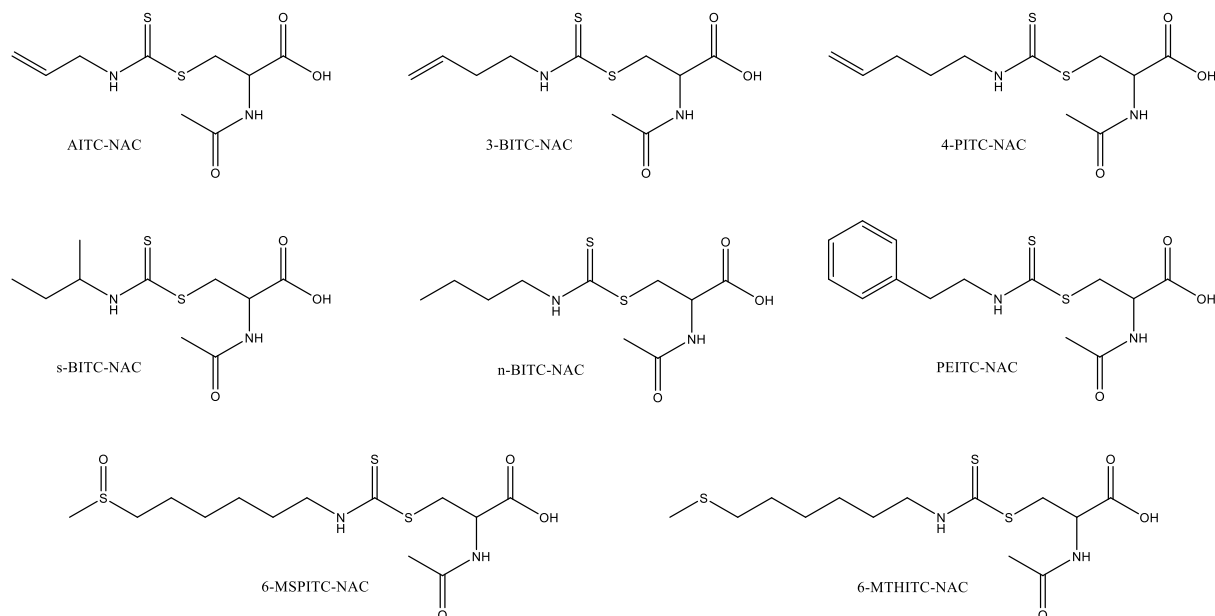


Abbildung 13: Die NAC-Derivate der in *E. japonicum* lt. Literatur am höchsten konzentrierten ITCs

Tabelle 3: Vermutete ITC-NACs, deren Massen und erwartete m/z-Werte

ITC-NAC	Molekulare Masse	Erwartete m/z
AITC-NAC	262	263
3-BITC-NAC	276	277
sBITC/nBITC-NAC*	278	279
4-PITC-NAC	290	291
2-PEITC-NAC	326	327
6-MTHITC-NAC	352	353
6-MSPITC-NAC	368	369

* sBITC-NAC und nBITC-NAC haben dieselbe Masse, da es sich um Strukturisomere handelt

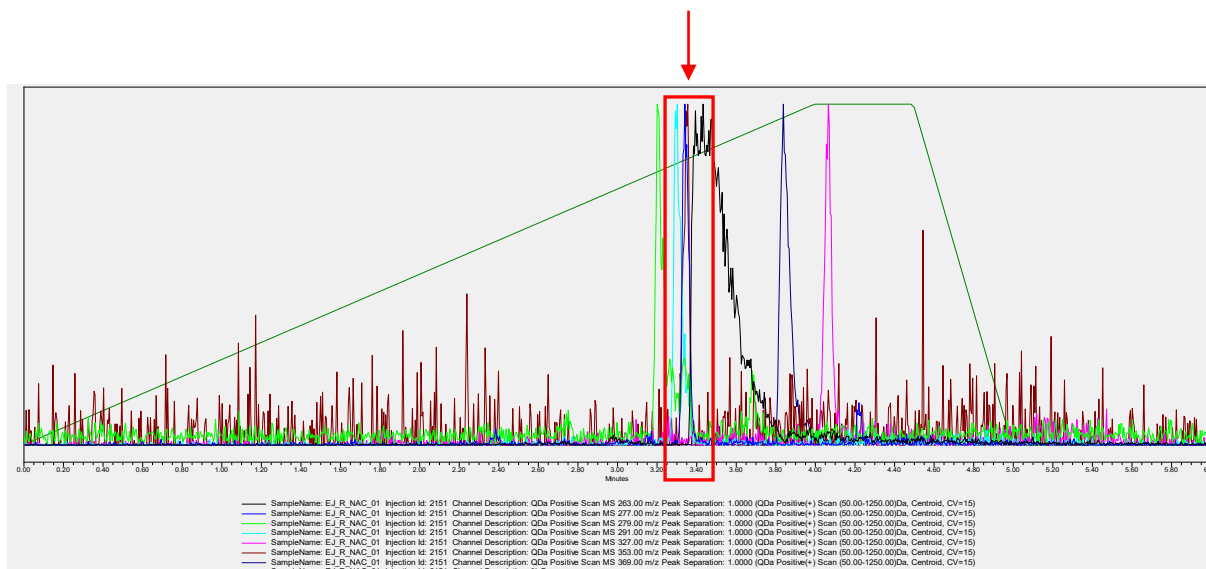


Abbildung 14: UPC²-EIC der vermuteten ITC-NACs, aufgenommen mit dem bisher verwendeten, konstant ansteigenden Gradienten, Inj.ID: 2151

Beim dargestellten Chromatogramm sieht man die kombinierten Chromatogramme der acht gesuchten m/z-Werte, die, jeweils ausgehend von der Höhe des größten Peaks, auf die Y-Achse normalisiert wurden, sodass Peaküberlappungen zwar leicht zu sehen sind, die dargestellten Peakflächen aber nicht den realen Mengenverhältnissen entsprechen. Auch führt dies bei Substanzen, die nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden sind, zu einer starken Verstärkung auch des Rauschens (6-MTHITC-NAC, m/z 353, dunkelbraune Spur im obigen Chromatogramm).

Zusätzlich wurde zur besseren Übersichtlichkeit auch immer der Gradient als zusätzliche Spur abgebildet. Beim in Abbildung 14 zu sehenden Gradienten handelt es sich um den bisher eingesetzten Gradienten.

Wie der in Abbildung 14 rot markierte Bereich zeigt, liegen besonders die zuerst eluierenden Peaks eng beieinander, weshalb auf diesen Bereich bei den folgenden Optimierungsschritten ein besonderes Augenmerk gelegt wurde.

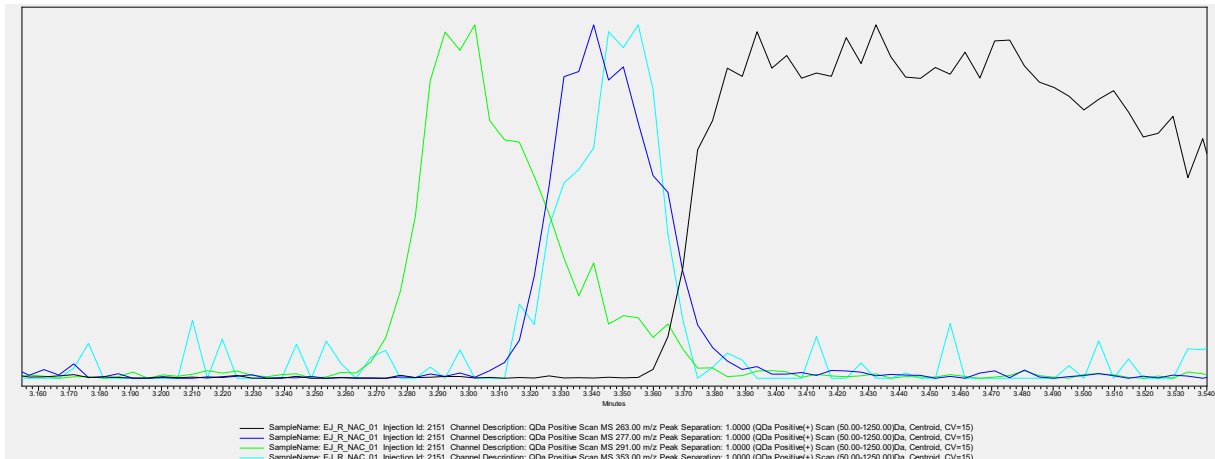


Abbildung 15: UPC²-EIC der in Abbildung 14 rot eingetragenen Peaks, Inj.ID: 2151

Wie aus Abbildung 14 ersichtlich, eluiert der erste Substanzpeak erst nach über 50% der Gesamtdauer des Durchganges.

Diese Zeitspanne sollte beim nächsten Versuch durch eine steile Anfangsphase des Gradienten verkürzt und im selben Schritt ein danach gesetzter flacherer Gradientenanstieg bei gleichzeitiger Verlängerung der Gesamtdauer auf 9,5 min eine verbesserte Peaktrennung bewirken.

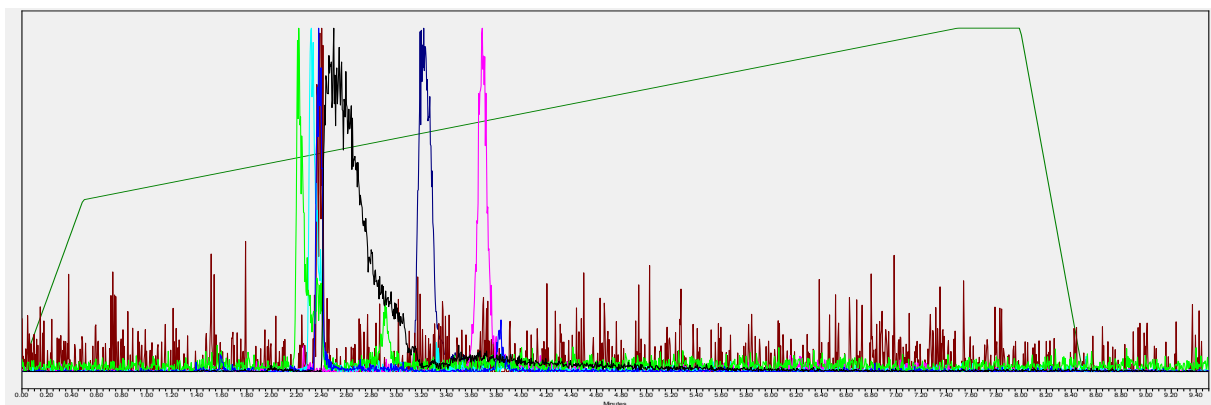


Abbildung 16: UPC²-EIC von Inj.ID: 2215

Wie in Abbildung 16 zu sehen, wurde durch den initial sehr starken Gradientenanstieg die Dauer bis zur Elution des ersten Peaks sehr effektiv verkürzt, die Trennung der eng beieinander liegenden Peaks konnte jedoch noch nicht verbessert werden (Abbildung 17).

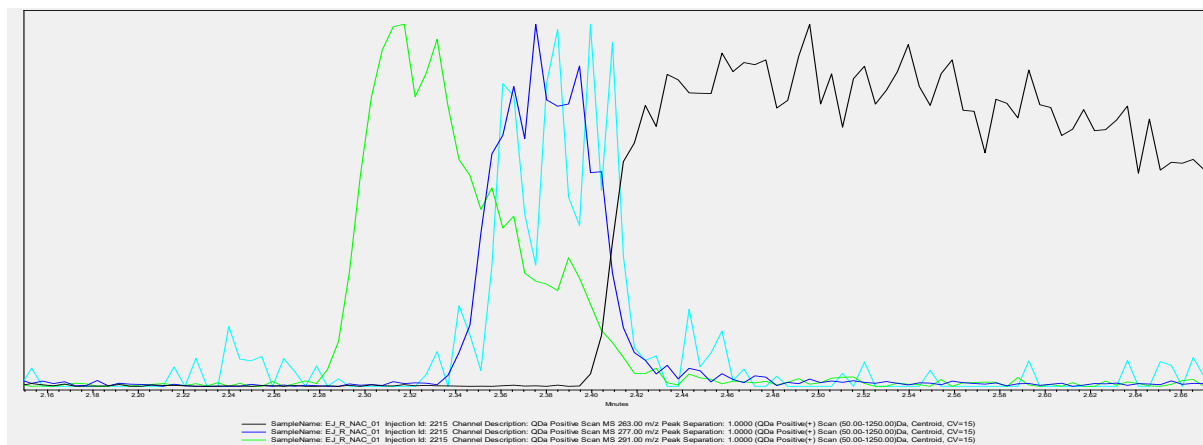


Abbildung 17: UPC²-EIC des in Abbildung 16 zwischen 2,15 min und 2,67 min liegenden Bereichs, Inj.ID: 2215

Um die Trennung der eng beieinanderliegenden Peaks zu verbessern, wurden nun mehrere Versuche durchgeführt, bei denen insbesondere der mittlere Bereich des Gradienten noch stärker abgeflacht wurde.

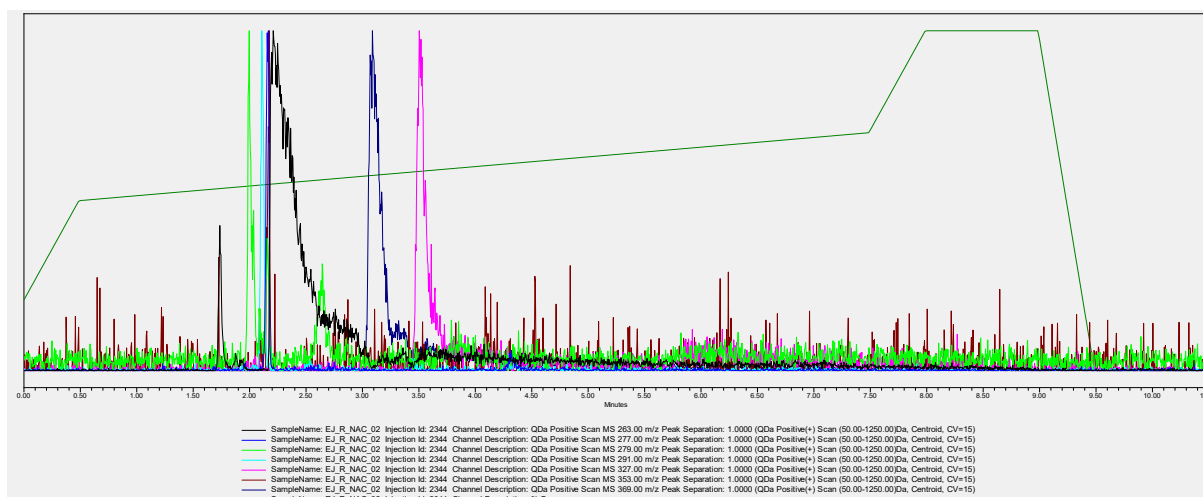


Abbildung 18: UPC²-EIC von Inj.ID: 2344

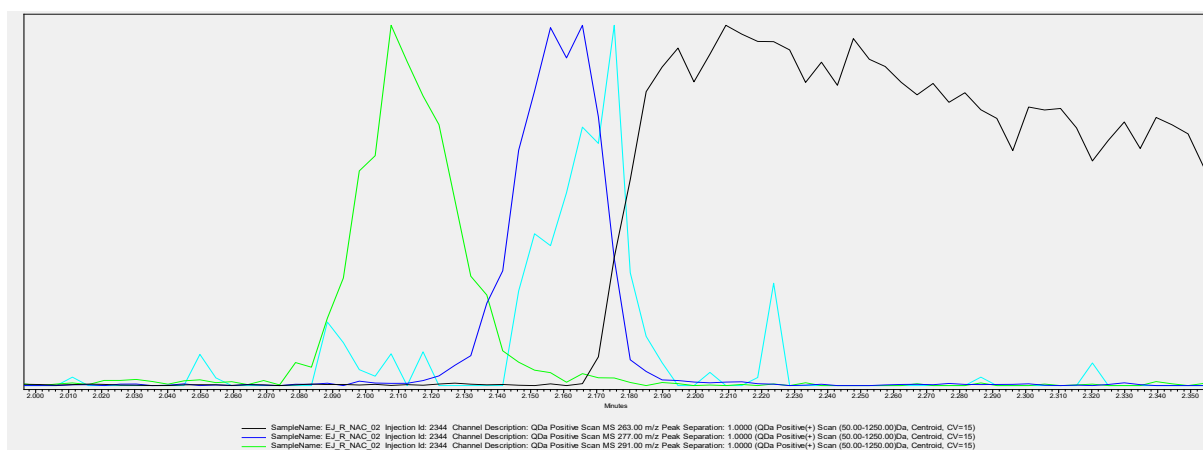


Abbildung 19: UPC²-EIC des in Abbildung 18 zwischen 2,00 min und 2,36 min liegenden Bereichs, Inj.ID: 2344

Wie in Abbildung 18 zu sehen wurde der mittlere Bereich des Gradienten im Vergleich zu Inj.ID: 2215 (Abbildung 16) erheblich gesenkt, wodurch die Trennung der eng stehenden Peaks etwas verbessert werden konnte, auch die Zeit bis zur Elution des ersten Peaks konnte noch etwas verkürzt werden. Die Gesamtanalysedauer wurde um eine Minute verlängert, um trotz flacherem Gradienten sicherzustellen, dass keine Substanzen auf der Säule verbleiben.

Da das Abflachen des mittleren Bereichs des Gradienten gute Ergebnisse zeigte, wurden die Versuche in diese Richtung vorangetrieben.

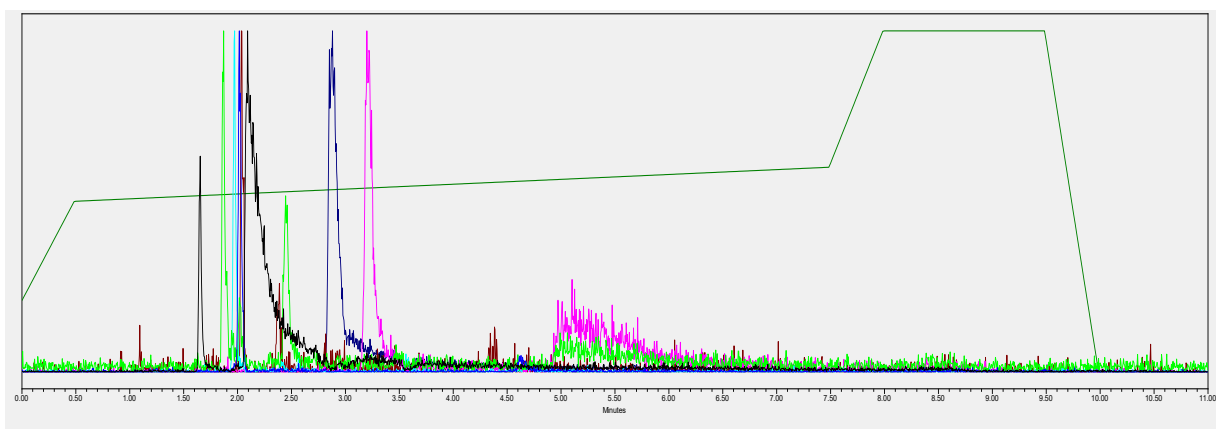


Abbildung 20: UPC²-EIC von Inj.ID: 2689

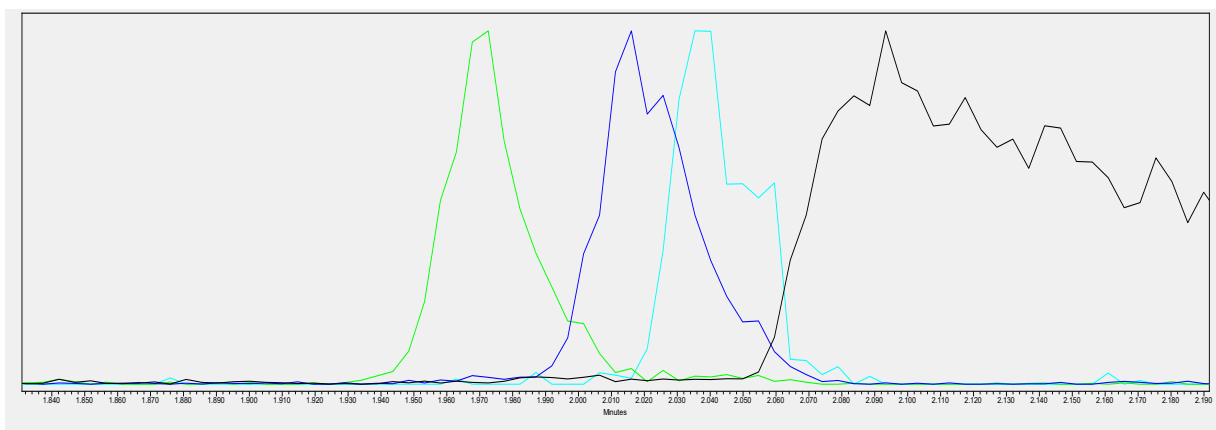


Abbildung 21: UPC²-EIC des in Abbildung 20 zwischen 1,83 min und 2,19 min liegenden Bereichs, Inj.ID: 2689

Durch das nochmalige Abflachen des Gradienten konnte die Trennung, wie in Abbildung 21 zu sehen, nochmals verbessert werden, ebenso wurde auch die Zeit bis zur Elution der ersten Peaks noch einmal verkürzt.

Bei den weiteren Versuchen wurde nun unter anderem noch versucht, die Trennung durch Plateaubereiche im Gradienten zu verbessern, exemplarisch ist hier Inj.ID: 2817 wiedergegeben.

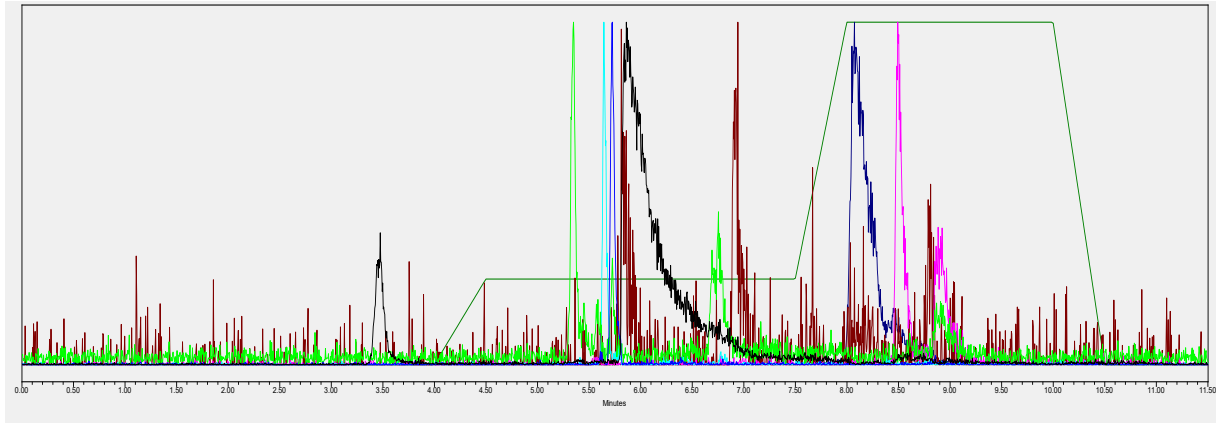


Abbildung 22: UPC²-EIC von Inj.ID: 2817

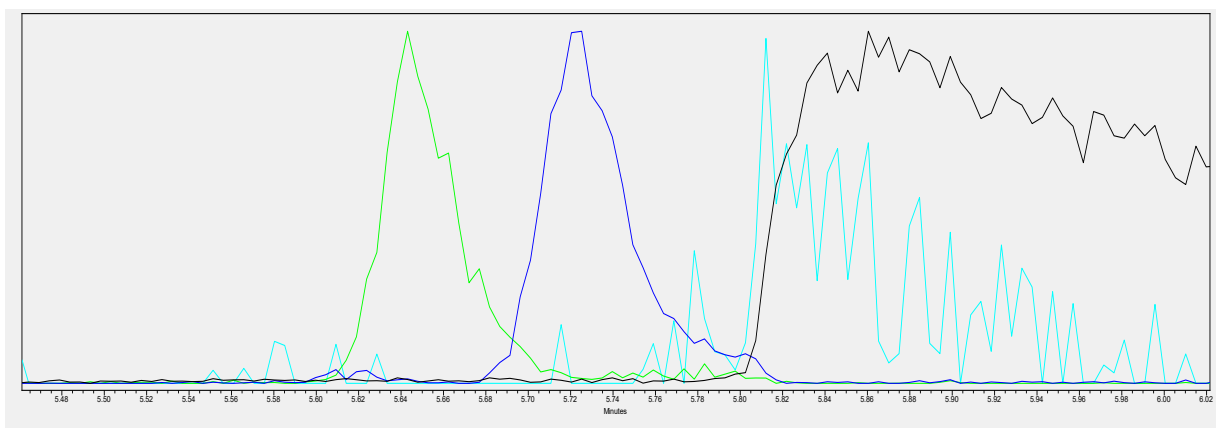


Abbildung 23: UPC²-EIC des in Abbildung 22 zwischen 5,46 min und 6,02 min liegenden Bereichs, Inj.ID: 2817

Wie in den Abbildungen 22 und 23 zu sehen, konnte durch den Einschub von Plateaubereichen in den Gradienten die Trennung zwar teilweise etwas verbessert werden, jedoch wurde dadurch auch die Gesamtdauer der Analyse erheblich verlängert. Dazu eluierte der Peak mit m/z von 353 (hinter dem 6-MTHITC-NAC vermutet wurde) beinahe gleichzeitig mit dem AITC-NAC-Peak, weshalb diese Gradientenform wieder verworfen wurde.

Deshalb wurde für den finalen Gradienten doch an einer geneigten Gradientenform festgehalten, jedoch wurde der mittlere Teil des Gradienten noch etwas abgeflacht, sodass nur mehr eine minimale Steigung vorhanden ist.

Zusätzlich konnte die Gesamtdauer des Gradienten bzw. der Methode auf 7 Minuten reduziert werden, da alle Substanzpeaks innerhalb der ersten 4 Minuten eluieren.

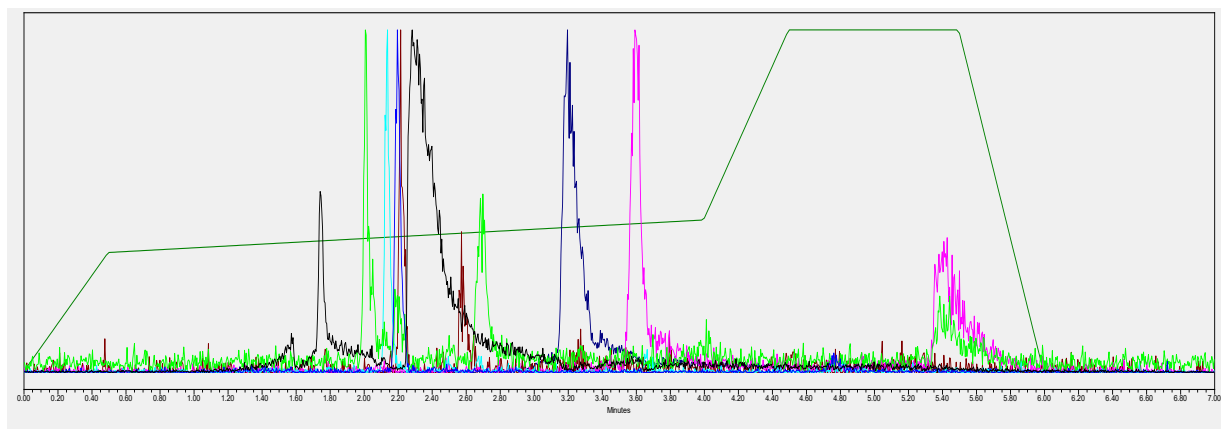


Abbildung 24: UPC²-EIC von Inj.ID: 2992

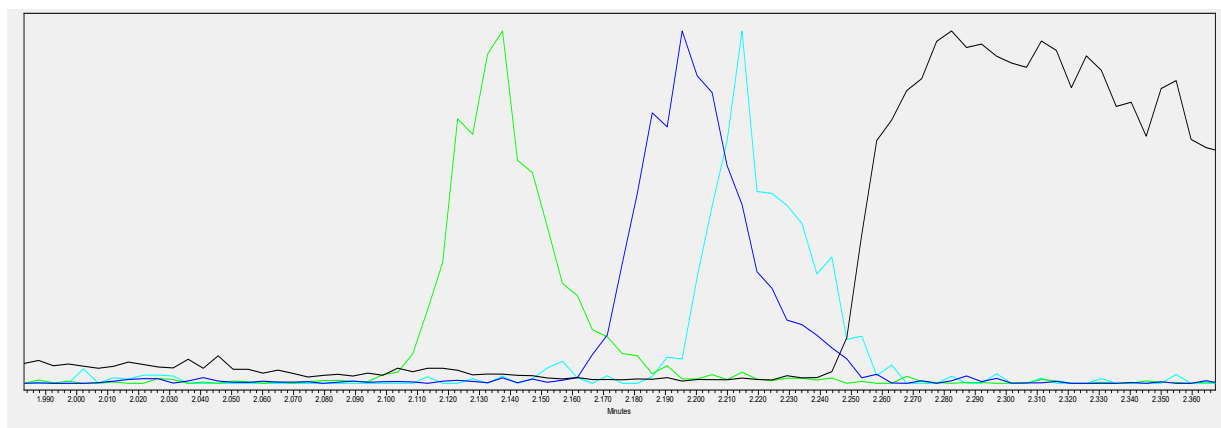


Abbildung 25: UPC²-EIC des in Abbildung 24 zwischen 1,99 min und 2,36 min liegenden Bereichs, Inj.ID: 2992

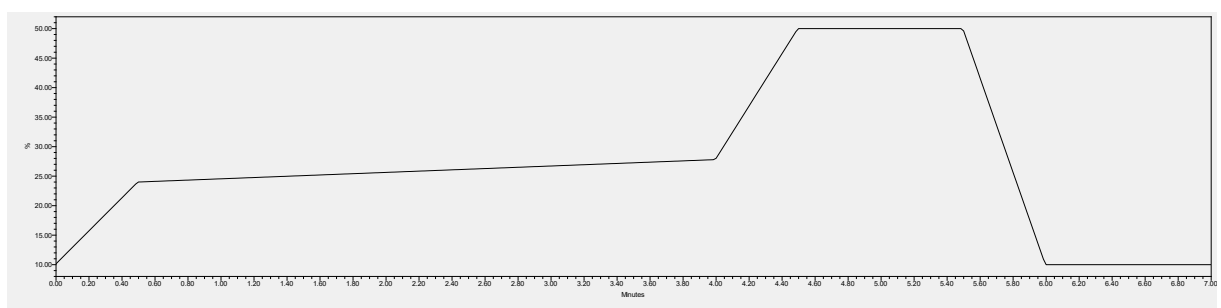


Abbildung 26: Finaler Gradient, Inj.ID: 2992

Zusätzlich zu unterschiedlich geneigten Gradienten wurden auch noch Versuche mit unterschiedlich hohen Anfangskonzentrationen an Co-Solvent durchgeführt (neben 0 und 10% auch Versuche mit 5, 15 und 23,5% Anfangskonzentration), die jedoch zu keinen Verbesserungen in der Peaktrennung führten.

4.2.7 Optimierung des Einspritzvolumens

Parallel zur Optimierung des Lösungsmittelgradienten wurden auch Versuche zur Ermittlung des optimalen Einspritzvolumens, also des pro Trennvorgang auf die Säule aufgetragenen Probenvolumens, durchgeführt.

Tabelle 4: Zur Optimierung des Einspritzvolumens durchgeführte Versuche

1 µl Probenvolumen	Inj.ID: 2732
2 µl Probenvolumen	Inj.ID: 2743
5 µl Probenvolumen	Inj.ID: 2755

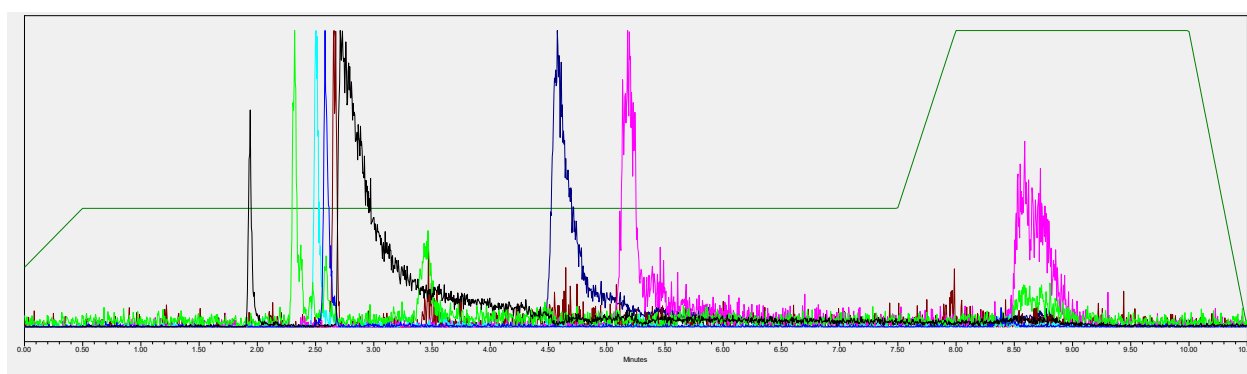


Abbildung 27: UPC²-EIC von Inj.ID: 2732 Einspritzvolumen 1 µl

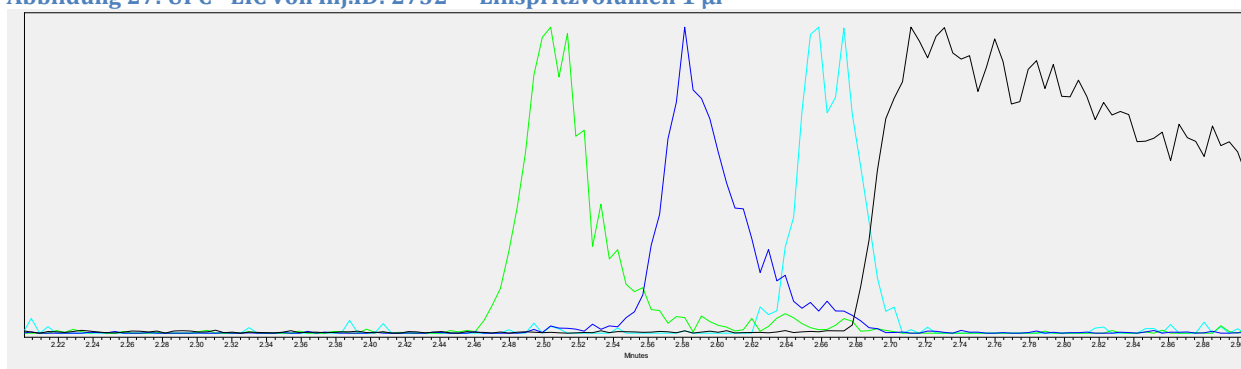


Abbildung 28: UPC²-EIC des in Abbildung 27 zwischen 2,21 min und 2,90 min liegenden Bereichs, Inj.ID: 2732

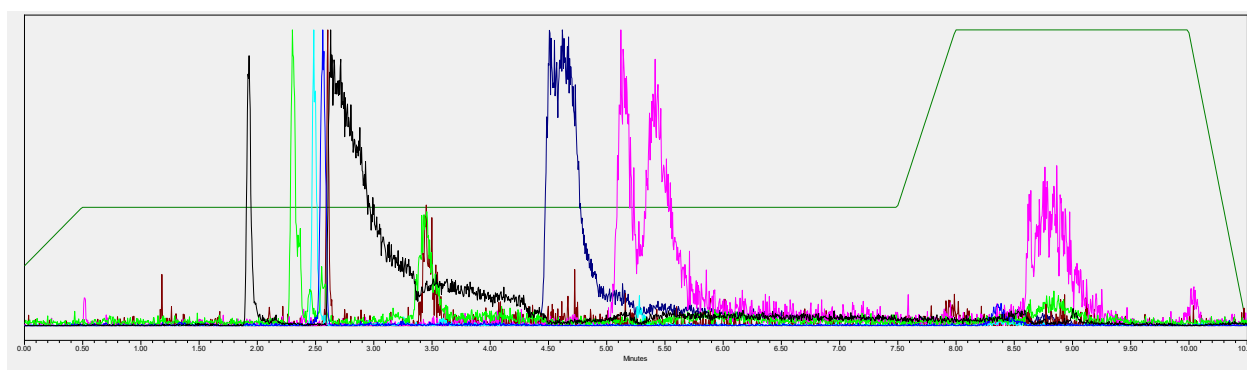


Abbildung 29: UPC²-EIC von Inj.ID: 2743 Einspritzvolumen 2 µl

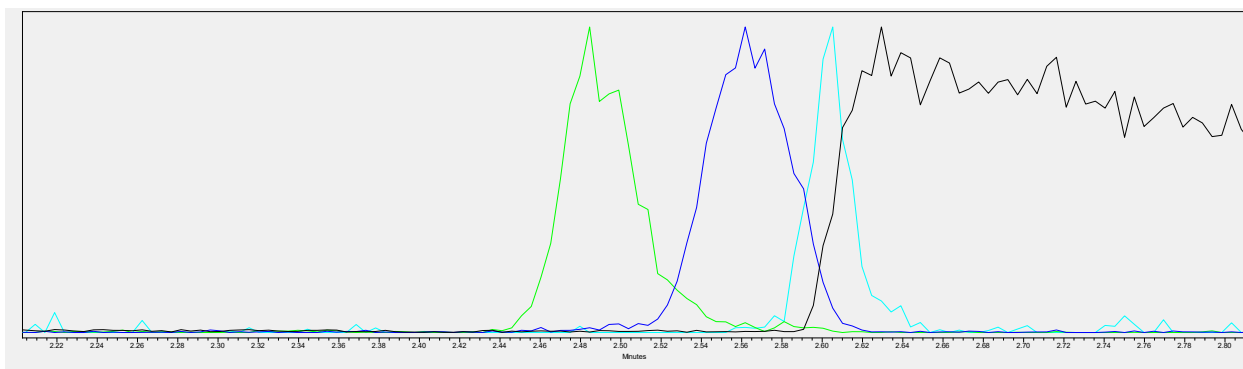


Abbildung 30: UPC²-EIC des in Abbildung 29 zwischen 2,21 min und 2,81 min liegenden Bereichs, Inj.ID: 2743

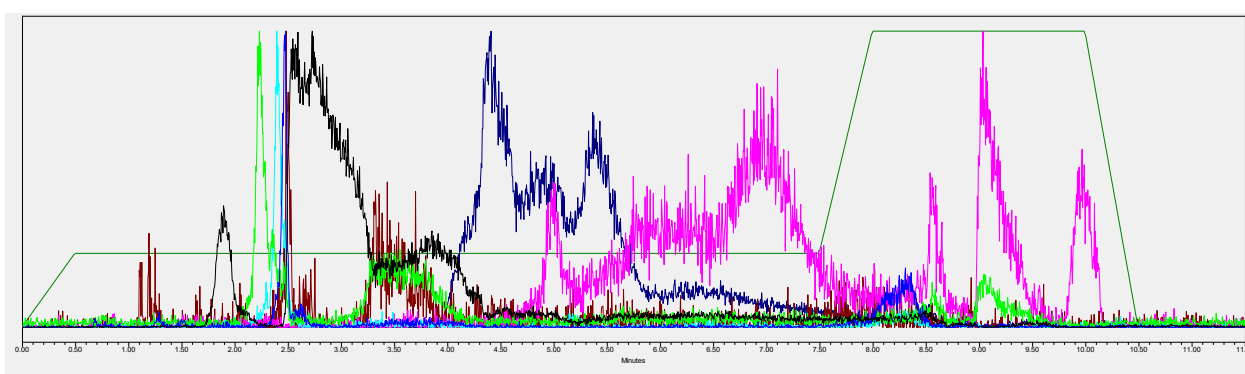


Abbildung 31: UPC²-EIC von Inj.ID: 2755 Einspritzvolumen 5 µl

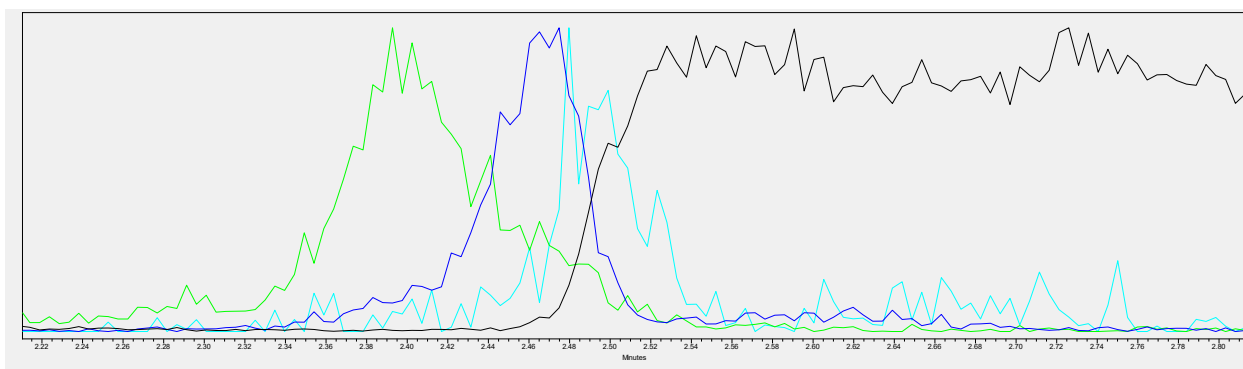


Abbildung 32: UPC²-EIC des in Abbildung 31 zwischen 2,21 min und 2,81 min liegenden Bereichs, Inj.ID: 2755

Wie in den obigen Abbildungen zu erkennen, verschlechtert sich die Peaktrennung bereits bei einer Verdopplung des Einspritzvolumens von 1 µl auf 2 µl deutlich, man beobachtet sowohl eine deutliche Verbreiterung der Peaks (Abbildungen 27 bzw. 29) als auch eine größere Überschneidung der Peaks im kritischen Bereich zwischen 2,30 – 2,80 min (Abbildungen 28 bzw. 30).

Bei 5 µl zeigt sich ein noch viel drastischeres Bild (Abbildungen 31 und 32).

Aus diesen Gründen wurde bei den weiteren Versuchen am bisherigen Einspritzvolumen von 1 µl festgehalten.

4.2.8 Optimierung des Gegendruckreglers (ABPR)

Nach der Festlegung des Lösungsmittelgradienten wurde der Druck des Aktiven Gegendruckreglers (= Active Back Pressure Regulator (ABPR)) (siehe hierzu auch Punkt 6.7) optimiert.

Hierzu wurden folgende Versuche durchgeführt:

Tabelle 5: Zur Optimierung des Gegendruckreglers durchgeführte Versuche

konstanter Druck bei 1885 psi (=130bar)	Inj.ID: 3610
konstanter Druck bei 2000 psi (=140 bar)	Inj.ID: 3601
konstanter Druck bei 2176 psi (=150 bar)	Inj.ID: 3619
Gradient mit steigendem Druck 0,0 → 4,0 1885 psi → 2176 psi 4,0 → 7,0 2176 psi	Inj.ID: 3628
Gradient mit fallendem Druck 0,0 → 4,0 2176 psi → 1885 psi 4,0 → 7,0 1885 psi	Inj.ID: 3637
Später Gradient mit fallendem Druck 0,0 → 1,4 2176 psi 1,4 → 2,4 2176 psi → 1885 psi 2,4 → 7,0 1885 psi	Inj.ID: 3827

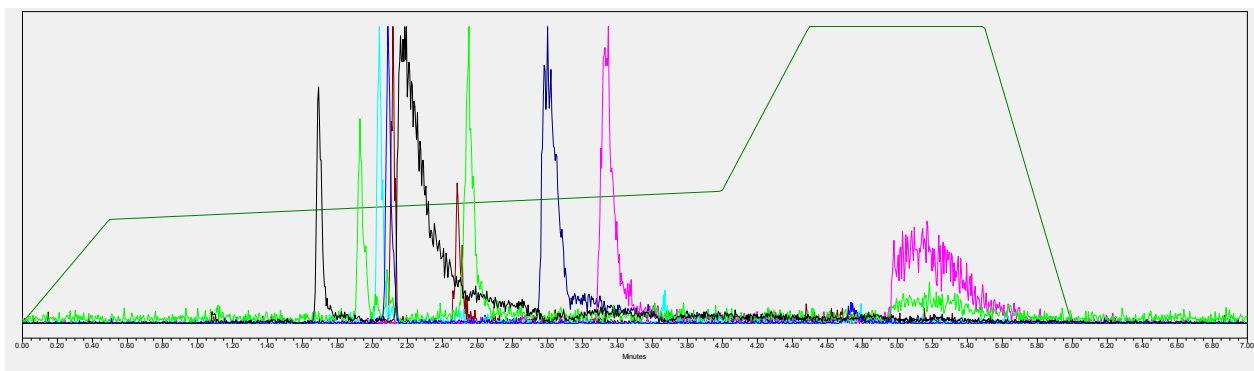


Abbildung 33: UPC²-EIC von Inj.ID: 3601

konstanter Druck bei 2000 psi (=140 bar)

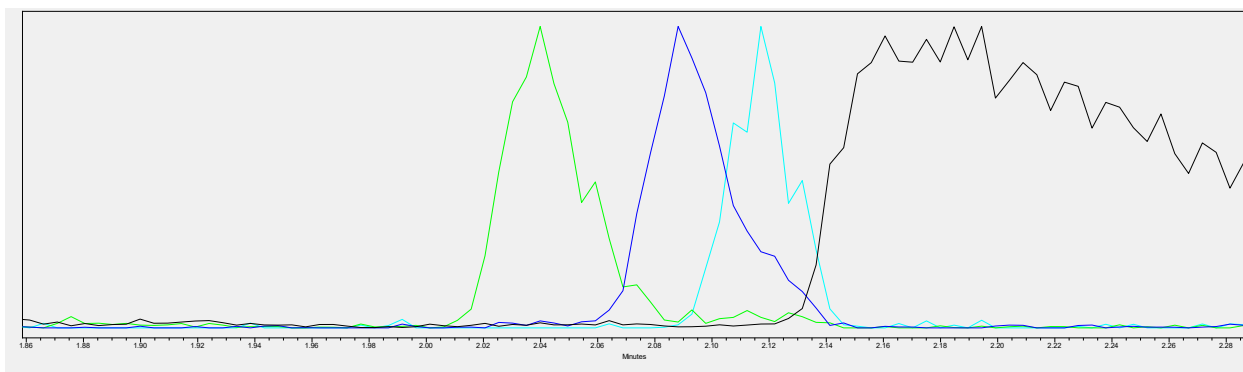


Abbildung 34: UPC²-EIC des in Abbildung 33 zwischen 1,86 min und 2,28 min liegenden Bereichs, Inj.ID: 3601

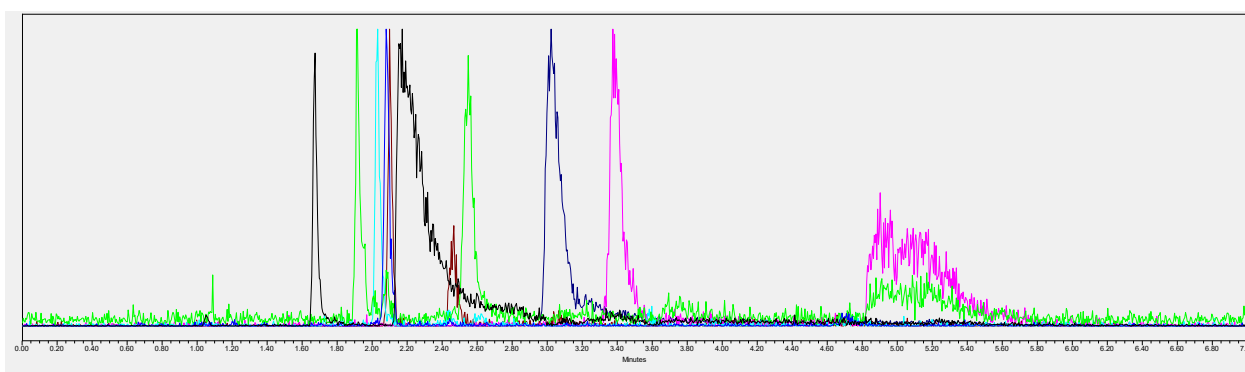


Abbildung 35: UPC²-EIC von Inj.ID: 3827

Gradient mit fallendem Druck

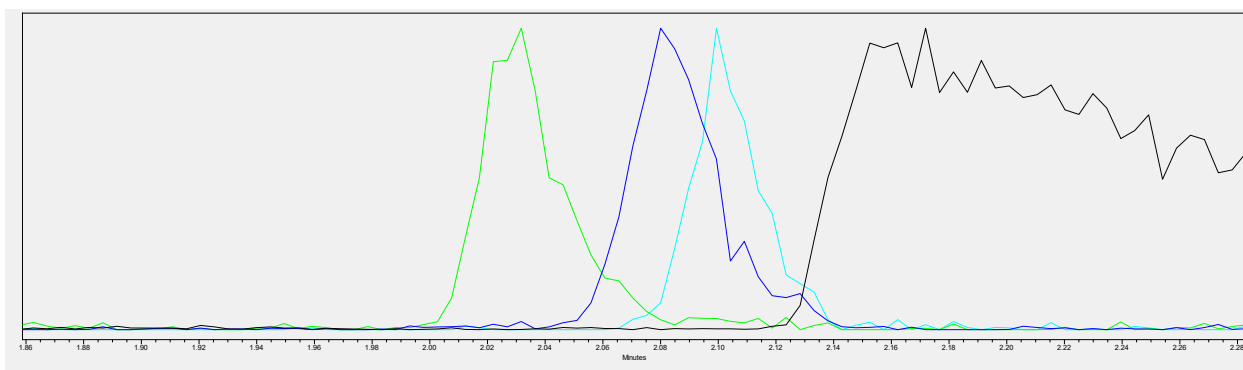


Abbildung 36: UPC²-EIC des in Abbildung 35 zwischen 1,86 min und 2,28 min liegenden Bereichs, Inj.ID: 3827

Von allen oben angeführten Versuchen zur Optimierung des ABPR führte keiner zu einer signifikanten Verbesserung der Trennleistung, wobei eine solche insbesondere bei Versuch 6 (Inj.ID: 3827) hätte eintreten sollen, denn fallender Druck sollte grundsätzlich zu einer späteren Elution führen und beim 6. Versuch wurde der steilste Gradient mit fallendem Druck angesetzt, vergleiche Abbildungen 33/35 bzw. 34/36.

Somit ergab keine der getesteten ABPR-Einstellungen eine merkliche Verbesserung der Trennleistung, weshalb die Einstellung der Methode an diesem Punkt wie zuvor bei konstanten 2000 psi (=140 bar) belassen wurde.

4.2.9 Optimierung der Trennsäulentemperatur

Bei der Säulentemperatur wurden konstante Temperaturen von 35, 40 und 45°C erprobt, wobei höhere Temperaturen erfahrungsgemäß zu längeren Retentionszeiten führen sollten.

Tabelle 6: Abbildungen der durchgeführten Versuche siehe Anhang

Abbildungen 61 und 62 35°C	Inj.ID: 3753
Abbildungen 63 und 64 40°C	Inj.ID: 3727
Abbildungen 65 und 66 45°C	Inj.ID: 3772

Es wurde jedoch keine Veränderungen der Trennleistung festgestellt, weshalb die bisherige Trennsäulentemperatur von 40°C beibehalten wurde.

4.2.10 Optimierung der Flussrate

Bei der Optimierung der Einstellungen wurden konstante Flussraten von 0,8, 1,0, 1,3, und 1,5 ml/min getestet, sowie Gradienten mit fallender sowie steigender Flussrate in einem Bereich von 0,8 – 1,5 ml/min.

Tabelle 7: Zur Optimierung der Flussrate durchgeführte Versuche*

Konstante Flussrate bei 0,8 ml/min	Inj.ID: 4012
Konstante Flussrate bei 1,0 ml/min	Inj.ID: 3935
Konstante Flussrate bei 1,3 ml/min	Inj.ID: 3976
Konstante Flussrate bei 1,5 ml/min	Inj.ID: 3959
Flussraten-Gradient 0 → 4 min 0,8 → 1,5 ml/min 4 → 7 min 1,0 ml/min	Inj.ID: 4048
Flussraten-Gradient 0 → 4 min 1,5 → 0,8 ml/min 4 → 7 min 0,8 ml/min	Inj.ID: 4085

*Für die zugehörigen Abbildungen 67 bis 78 siehe Anhang

Die Veränderung der Flussrate hatte zwar große Auswirkungen auf die Elutionsgeschwindigkeit, die Trennleistung jedoch konnte nicht verbessert werden, weshalb an der bisherigen Flussrate von 1,0 ml/min festgehalten wurde.

4.2.11 Optimierung des Single-Ion-Recordings

Während zu Beginn der Methodenentwicklung im Massenspektrometer immer ein sehr breiter Massenbereich zur Vermessung festgelegt wurde (50-1250 m/z), wurde nun, zur Verbesserung der Leistung des Massenspektrometers, SIR (Single Ion Recording) angewendet.

Beim SIR wird vom Massenspektrometer gezielt nur auf einzelne, zuvor bestimmte, Massen hin analysiert, wodurch eine erhöhte Empfindlichkeit erreicht werden soll. Hierbei kann zusätzlich zur Einstellung auf welche Massen analysiert werden soll, auch angegeben werden, wie viele Punkte pro Sekunde je Masse genommen werden sollen.

Hierfür wurden Scan-Raten von 5, 10 und 15 Punkten pro Sekunde getestet.

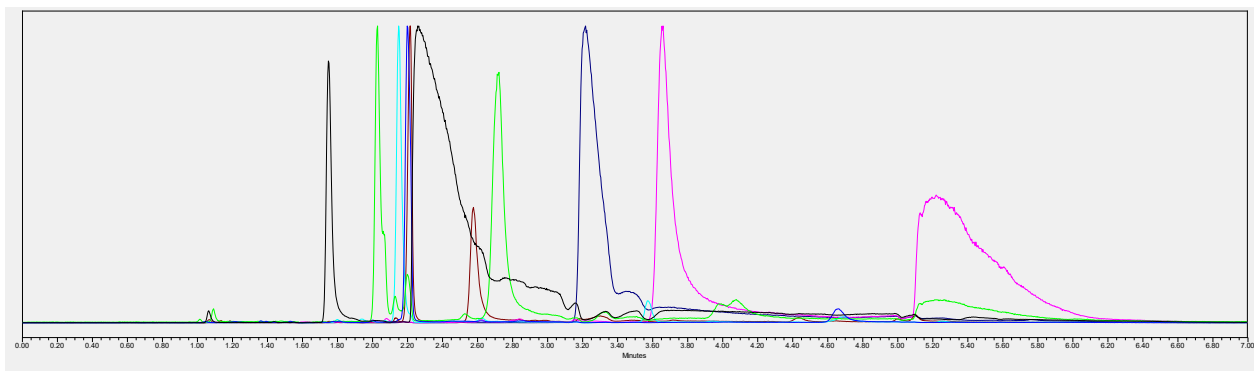


Abbildung 37: UPC²-EIC von Inj.ID: 4311 SIR: 5 Punkte pro Sekunde

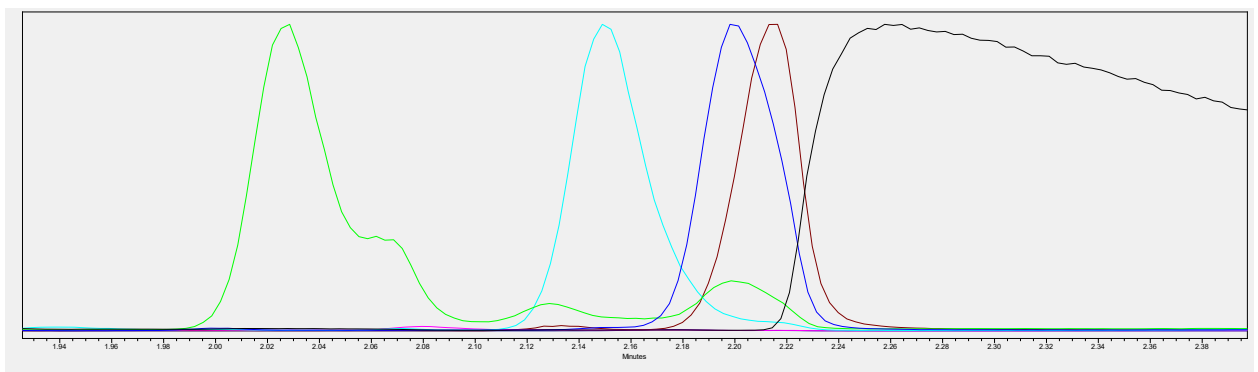


Abbildung 38: UPC²-EIC des in Abbildung 37 zwischen 1,93 min und 2,37 min liegenden Bereichs, Inj.ID: 4311

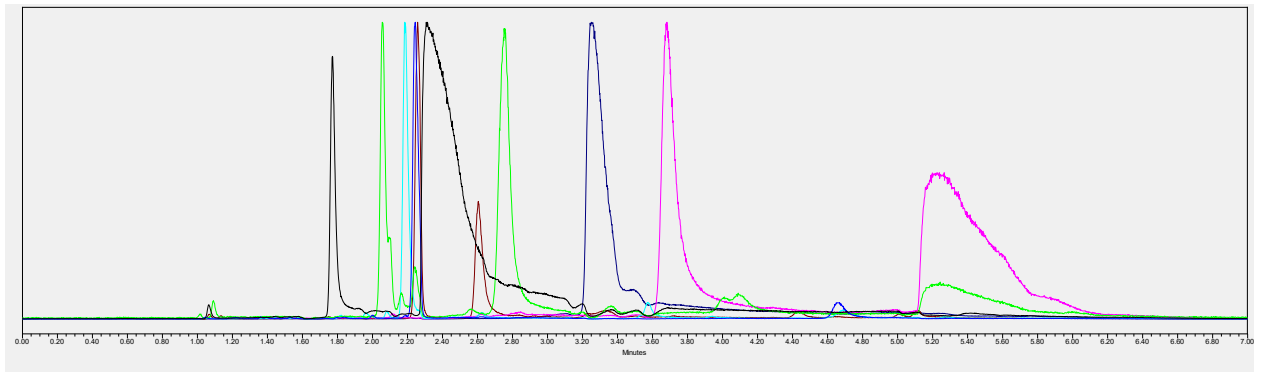


Abbildung 39: UPC²-EIC von Inj.ID: 4326 SIR: 10 Punkte pro Sekunde

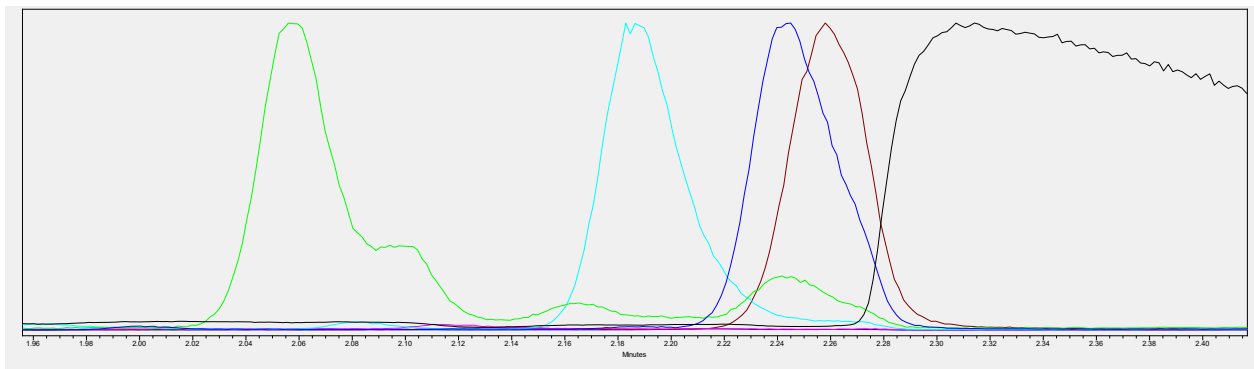


Abbildung 40: UPC²-EIC des in Abbildung 39 zwischen 1,96 min und 2,41 min liegenden Bereichs, Inj.ID: 4326

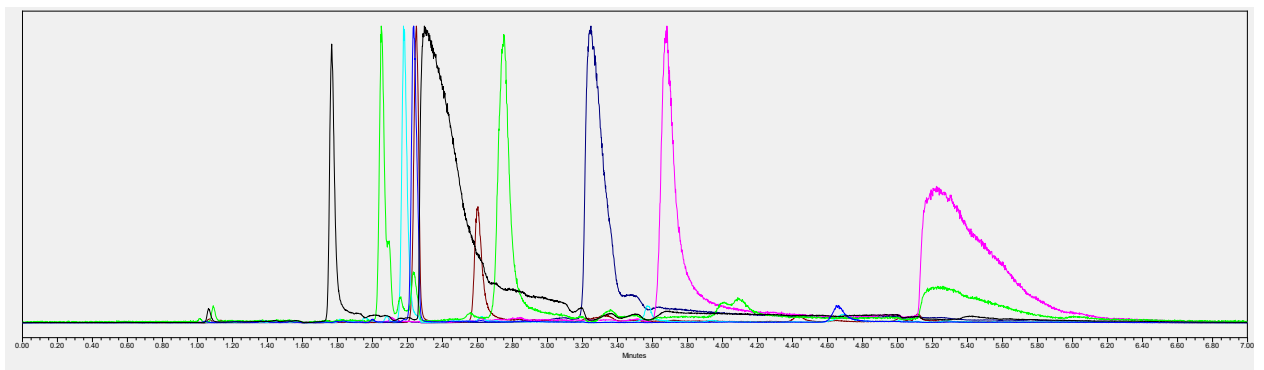


Abbildung 41: UPC²-EIC von Inj.ID: 4341 SIR: 15 Punkte pro Sekunde

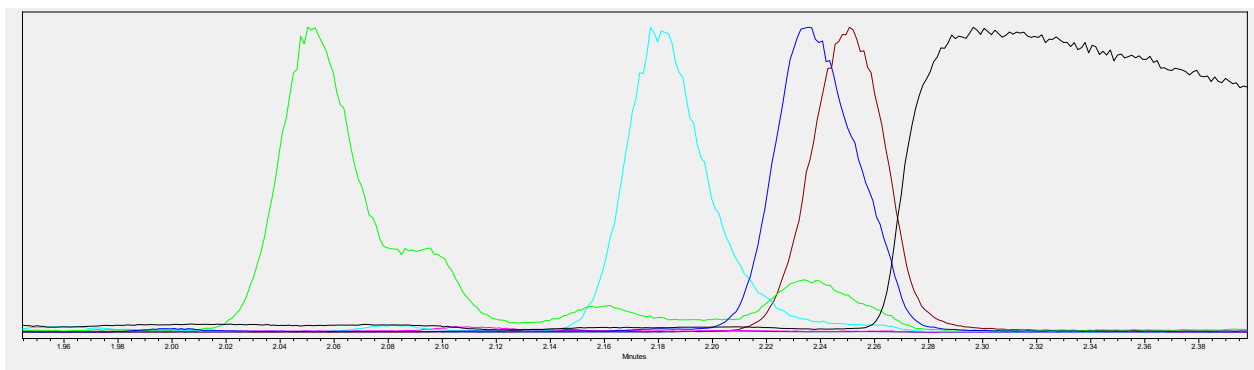


Abbildung 42: UPC²-EIC des in Abbildung 41 zwischen 1,95 min und 2,39 min liegenden Bereichs, Inj.ID: 4341

Wie in den obigen Abbildungen zu sehen, ergibt eine Einstellung von 5 Punkten pro Sekunde die schönsten Peaks, bei 10 und 15 Punkten/s sind die Peaks hingegen etwas ausgefranst.

4.3 Extraktion der Pflanzenextrakte

Um die ITCs quantifizieren zu können, wurden Extrakte der verschiedenen Organe von Wasabi (Folium, Caulis, Rhizoma) hergestellt. Die ersten zwei Chargen wurden parallel zur Optimierung der Methode auf der UPC² erstellt, um diese als Proben verwenden zu können, hierbei wurde jeweils der derivatisierte Rhizom-Extrakt verwendet, da dieser die höchsten Konzentrationen der verschiedenen ITCs aufwies.

Die dritte und vierte Charge dienten als Proben für die Quantifizierung.

Bei der Extraktion wurde nach der von Pilipczuk (2017)[6] publizierten Methode vorgegangen. Hierzu wurde das gefriergetrocknete Pflanzenmaterial (je für Folium, Caulis und Rhizoma) in Form eines feinen weißlich-grauen (Rhizoma) bis dunkelgrünen (Folium) Pulvers jeweils direkt in ein Zentrifugenröhrchen eingewogen (bei erster Charge je 400 mg, ab der zweiten Charge je 800 mg), mit 10 ml Wasser versetzt und dann sofort mit Alufolie und darüber Parafilm verschlossen.

Diese Lösungen wurden anschließend geschüttelt und für 3 Stunden im Wärmeschränk inkubiert, wobei die Ansätze jeweils stündlich geschüttelt wurden.

Durch die Zugabe des Wassers und der 3 h Inkubation wurde es der ebenfalls im gefriergetrockneten Pflanzenmaterial enthaltenen Myrosinase ermöglicht, die enthaltenen GLs in ITCs, wie in Punkt 3.2 beschrieben, umzusetzen.

Danach wurden die Lösungen aus dem Wärmeschränk herausgenommen, für 10 Minuten in den Kühlschränk gegeben und anschließend abzentrifugiert (15 min, 3500/min).



**Abbildung 43: Extrakt-Lösungen nach Inkubation, v.l.n.r.:
Folium, Caulis, Rhizoma**

Nach dem Zentrifugieren wurden die Überstände jeweils per Pipette aus den Zentrifugenröhrchen entnommen und auf SPE- (Solid Phase Extraction) Säulen aufgebracht, um so möglichst viele andere störende Substanzen abzutrennen. Dabei musste sehr vorsichtig vorgegangen werden, um nichts vom Pflanzenmaterial, also dem abgesetzten Wasabi-Pulver, in die Pipette und so auf die SPE-Säulen zu übertragen, da diese sonst verstopft worden wären. Die SPE-Säulen wurden davor jeweils mit 3 ml Methanol und 3 ml Wasser konditioniert.

Ebenso wie die Konditionierungsflüssigkeiten davor, wurden danach die überstehenden Extraktionslösungen jeweils mit einer Geschwindigkeit von 1-2 Tropfen pro Sekunde eluiert, wofür Unterdruck nötig war. Die überstehende Rhizom-Extraktlösung war dabei blass-gelb, bei Caulis rosa-violett und bei Folium hellbraun, alle überstehenden Lösungen waren klar.

Die Größe an auf die SPE-Säulen aufgebrachten Extraktvolumina unterschied sich dabei je nach Extrakt-Art (Rhizoma, Caulis oder Folium) und betrug bei der dritten Charge, die für die Einzel-ITC-NAC-Gehaltsbestimmung herangezogen wurde, für das Rhizompulver 7,1 ml, beim Caulis-Pulver 5,0 ml und vom Folium-Pulver 4,5 ml, der anfangs 10 ml Wasser, mit denen die pulverförmigen Proben jeweils angesetzt worden waren, der Rest ließ sich jeweils auch per Zentrifugation nicht wieder aus dem aufgeschlammten Pulver gewinnen.

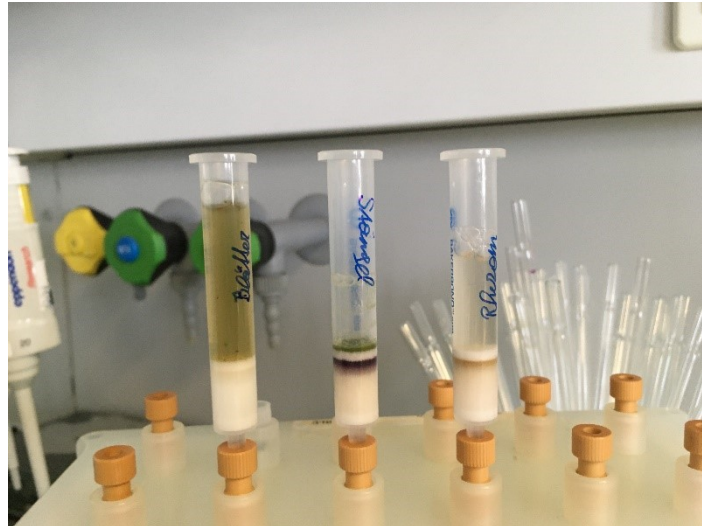


Abbildung 44: SPE-Säulen teilweise mit Extrakt-Lösungen beladen, v.l.n.r: Folium, Caulis, Rhizoma

Nach dem jeweiligen Aufbringen der Extrakt-Lösungen wurden jeweils noch 1 ml doppelt destilliertes Wasser aufgebracht, eluiert und danach 5 min Luft durch die SPE-Säulen gesaugt.

Anschließend wurden die in der Säule zurückgehaltenen ITCs mit je 1 ml IPA eluiert.

4.4 Derivatisierung der Pflanzenextrakte

Auf die Extraktion der ITCs folgte unmittelbar die Derivatisierung derselben mit NAC, diese Schritte wurde hier nur aus thematischen Gründen getrennt. Die Durchführung folgte hier ebenfalls der bei Pilipczuk (2017)[6] beschriebenen Vorgangsweise. Dass hier NAC zur Derivatisierung eingesetzt wird, macht auch deshalb Sinn, weil derselbe Vorgang auch vom menschlichen Organismus zur Metabolisierung von ITCs genutzt wird, siehe Abschnitt 3.2. [9][10]

Der Übergang von der Extraktion zur Derivatisierung stellt den kritischsten Zeitpunkt im gesamten Vorgang dar, da die zuvor als GLs gebundenen ITCs nun in freier und somit flüchtiger Form ungebunden (nachdem sie zuvor in der SPE-Säule gebunden waren) und aufkonzentriert vorliegen.

Aus diesem Grund wurde jeweils bereits vor der Elution der ITCs mit IPA die gepufferte NAC-Derivatisierungslösung, eine wässrige 0,2 M NAC- bzw. NaHCO_3 - Lösung (= 0,2 mmol NAC und 0,2 mmol NaHCO_3 in 1 ml Wasser), vorbereitet.

Zur Derivatisierung wurden schließlich je 0,5 ml der zuvor per SPE-Säule erhaltenen ITC/IPA-Fractionen mit je 0,5 ml der gepufferte NAC-Derivatisierungslösung versetzt und für 1 Stunde bei 50°C inkubiert. Dabei war es etwas schwierig genau 0,5 ml Derivatisierungslösung einzusetzen, da es aufgrund des enthaltenen NaHCO_3 zu Kohlensäurebildung und dadurch zur starken Bildung von CO_2 -Bläschen beim Entnehmen aus dem Vorratsgefäß kam.

Die so hergestellten Lösungen wurden anschließend vor den verschiedenen Messungen teilweise noch verdünnt.

Nach einer Nacht im Kühlschrank konnte beobachtet werden, dass sich teilweise ein weißer Niederschlag bildete, weshalb die Lösungen vor den jeweiligen Messungen geschüttelt wurden, wobei sich der Niederschlag jedoch nicht wieder vollständig in Lösung bringen ließ.

4.5 Herstellung der ITC-NAC-Standards

Um die bei der Trennung und Vermessung der derivatisierten Pflanzenextrakte per UHPSFC-PDA-QDa erhaltenen Peaks identifizieren und quantifizieren zu können, wurden die laut Literatur in *E. japonicum* enthaltenen ITCs gekauft und davon AITC, 3-BITC und 4-PITC mit NAC derivatisiert.

Diese drei stellen drei der vier laut Literatur mengenmäßig am häufigsten in *E. japonicum* vorkommenden ITCs dar.

Die restlichen ITCs wurden aus Kostengründen und aufgrund der geringen Menge nicht derivatisiert. Weitere ITC-NACs waren außer den bereits genannten (BITC-NAC, PEITC-NAC) nicht käuflich zu erwerben.

Bei der Synthese der drei genannten ITC-NACs wurde grundsätzlich wie bei Pilipczuk (2017)[6] verfahren, wobei diese Vorgangsweise wiederum, bis auf das Ausschütteln mit Hexan, von Vermeulen (2003)[20] übernommen worden war.

Da bei Vermeulen (2003)[20] trotz geringerer Konzentration der Edukte eine ähnlich hohe Ausbeute von 83% erreicht werden konnte, wurde auch nun mit derselben, niedrigeren, Konzentration vorgegangen (etwa 0,5 mmol je Edukt und je 1 ml Gesamtreaktionslösung, wobei das jeweilige ITC und NaHCO_3 jeweils in leichtem molaren Überschuss zu NAC eingesetzt wurden).

4.5.1 Herstellung von AITC-NAC, 3-BITC-NAC und 4-PITC-NAC

Für die Derivatisierung von AITC, 3-BITC und 4-PITC wurde die wässrige Derivatisierungslösung, bestehend jeweils aus NAC und NaHCO_3 , in einem Rundkolben vorgelegt und gerührt. Daneben wurde das ITC in Ethanol gelöst und tropfenweise der Derivatisierungslösung zugesetzt. Anschließend wurde für 4 Stunden und 20 Minuten (bzw. für 5 Stunden 30 Minuten bei 3-BITC und 4-PITC) bei Raumtemperatur mit einem Stopfen verschlossen gerührt.

Danach wurde das Ethanol am Rotavapor abgezogen und die zurückgebliebenen wässrigen Phasen mit 2M HCl auf pH 3 angesäuert (überprüft mit pH-Streifen (pH-Bereich 0-7)). Die angesäuerte Lösung wurde dann mit Ethylacetat ausgeschüttelt und die gesammelten Ethylacetat-Phasen einrotiert.

Die Reaktionen wurden jeweils per DC überprüft. Hierzu wurde als Laufmittel Ethylacetat:Wasser:Essigsäure (80:10:8, v/v/v) wie bei Pilipczuk (2017)[6] verwendet. Bei dieser Mischung kam es zwar zur Entmischung des Laufmittels, es funktionierte aber trotzdem um vieles besser als andere getestete Laufmittel.

Sowohl AITC-NAC als auch 3-BITC-NAC wurden in reiner Form erhalten, während 4-PITC-NAC in einem weiteren Schritt per präparativer SFC aufgereinigt werden musste.

Sowohl AITC-NAC als auch 3-BITC-NAC und 4-PITC-NAC bildeten zäh-klebrige Massen, wobei AITC-NAC blass-gelb war, während 3-BITC-NAC und 4-PITC-NAC farblos waren.



Abbildung 45: Synthese von AITC-NAC



Abbildung 46: Fertiges AITC-NAC als zäh-klebrige Masse

Bei 3-BITC-NAC wurde beim Ausschütteln zuerst versehentlich Acetonitril statt Ethylacetat verwendet, dieses wurde am Rotavapor wieder entfernt und dann das Produkt wie vorgesehen mit Ethylacetat ausgeschüttelt.

Bei 4-PITC-NAC ist es möglicherweise zu einem Rückfluss von Ethanol aus dem Rotavapor in den Kolben mit dem Produkt gekommen, was die spätere Verunreinigung erklären würde.



Abbildung 49: DC-Vergleich von AITC-NAC und Edukten
Von links nach rechts: NaHCO_3 , NAC, AITC und AITC-NAC

stationäre Phase: Kieselgel 60
F254-DC-Alufolie
mobile Phase:
Ethylacetat/Wasser/
Essigsäure 80:5:8

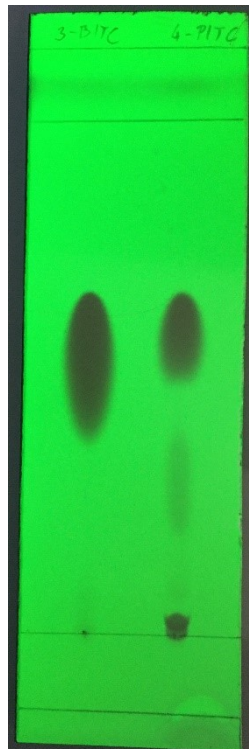


Abbildung 48: 3-BITC-NAC und 4-PITC-NAC
Proben noch vor dem Ansäuern entnommen

stationäre Phase: Kieselgel 60
F254-DC-Alufolie
mobile Phase:
Ethylacetat/Wasser/
Essigsäure 80:5:8

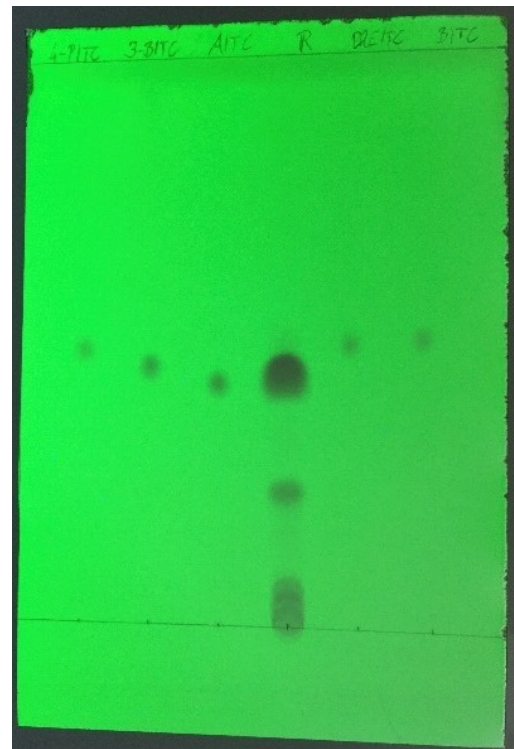


Abbildung 47: DC-Vergleich von ITC-NAC-Standards und derivatisiertem Rhizom-Extrakt

Von links nach rechts: 4-PITC-NAC, 3-BITC-NAC, AITC-NAC, derivatisierter Rhizom-Extrakt, PEITC-NAC und BITC-NAC

stationäre Phase: Kieselgel 60
F254-DC-Alufolie
mobile Phase: Ethylacetat/Wasser/
Essigsäure 80:5:8

Wie in Abbildung 47 zu sehen, ist das Produkt (AITC-NAC) sehr rein, da kein zweiter Spot erkennbar ist. Der zweite Spot beim Edukt AITC rührt möglicherweise von Verunreinigungen her, da auch gekauftes AITC aus Pflanzen gewonnen wird.

Wie in Abbildung 48 zu sehen, ist auch der 3-BITC-NAC-Standard offenbar sehr rein, 4-PITC-NAC hingegen möglicherweise verunreinigt.

Um die Reinheit der hergestellten Standards auch per PDA-Detektor und Massenspektrometer zu überprüfen, wurden alle drei auch noch auf der UPC^2 vermessen. Für die diesbezüglichen Chromatogramme siehe im Anhang Abbildung 79 - 98.

Zusätzlich wurden die drei selbst hergestellten Standards AITC-NAC, 3-BITC-NAC und 4-PITC-NAC auch noch per ^1H NMR (500 MHz, MeOD) vermessen (4-PITC-NAC nach dessen Aufreinigung, siehe 4.5.2), wobei sich für AITC-NAC eine Reinheit von 93%, für 3-BITC-NAC von 94% und bei 4-PITC-NAC eine Reinheit von 84% ergab.

Für die NMR-Spektren siehe im Anhang Abbildungen 103 - 105.

Die Ausbeute betrug bei AITC-NAC 238,70 mg was 61,7 % entspricht und bei 3-BITC-NAC 88,48 mg was 79,2 % entspricht. Für 4-PITC-NAC kann keine Ausbeute angegeben werden, da dieses verunreinigt war und im Laufe der Aufreinigung erhebliche Mengen verloren gingen.

4.5.2 Aufreinigung von 4-PITC-NAC

Wie in den Abbildungen 87 bis 90 von Inj.ID 4365 im Anhang zu sehen ist, war 4-PITC-NAC nicht rein erhalten worden, sondern enthielt noch mindestens zwei Verunreinigungen bzw. Edukte oder andere Reaktionsprodukte.

Aus diesem Grund wurde als erster Lösungsansatz versucht, das verunreinigte 4-PITC-NAC nochmals in Wasser und Ethylacetat zu lösen und es dann nochmals auszuschütteln. Wie in den Abbildungen 91 bis 94 zu Inj.ID 4387 zu sehen, konnten die Verunreinigungen so zwar zum Teil, aber nicht gänzlich entfernt werden.

Deswegen wurde das Produkt nochmals in Wasser und Ethylacetat gelöst, dieses Mal jedoch das Wasser wie nach der Synthese zusätzlich auf pH 3 angesäuert und danach das Produkt in Ethylacetat ausgeschüttelt. Wie aus der anschließenden Vermessung auf der UPC² (Siehe Abbildungen 95 bis 98 zu Inj.ID 4406) ersichtlich, war das Produkt danach allerdings immer noch verunreinigt, weshalb als nächstes die präparative SFC angewandt wurde.

Bei der präparativen SFC handelt es sich um dieselbe Technologie, wie sie auch bei der UPC² zum Einsatz kommt, also die Auftrennung von Substanzen mittels überkritischem CO₂ als mobiler Phase. Der Unterschied liegt lediglich darin, dass die stationäre Phase aus größeren Partikeln besteht und die verwendeten Trennsäulen einen größeren Durchmesser aufweisen und länger sind. Des Weiteren sind die meisten der auf der UPC² verwendeten Säulentypen auch für die präparative SFC verfügbar, nur in größerer Dimensionierung, sodass zuvor auf der UPC² optimierte Methoden größtenteils übernommen werden können.

Von jeder Säule sind hierbei zwei Größen in der präparativen SFC Anlage verbaut, eine mit 4,6 mm Durchmesser für analytische Zwecke bzw. zur Anpassung der Methode und eine mit 10 mm Durchmesser für die präparative Auftrennung, beide mit 5 μ m Partikelgröße und 250 mm Länge. Im Gegensatz zu 3 mm Durchmesser, 1,7 μ m Partikelgröße und 100 bzw. 150 mm Säulenlänge bei den auf der UPC² verwendeten Säulen.

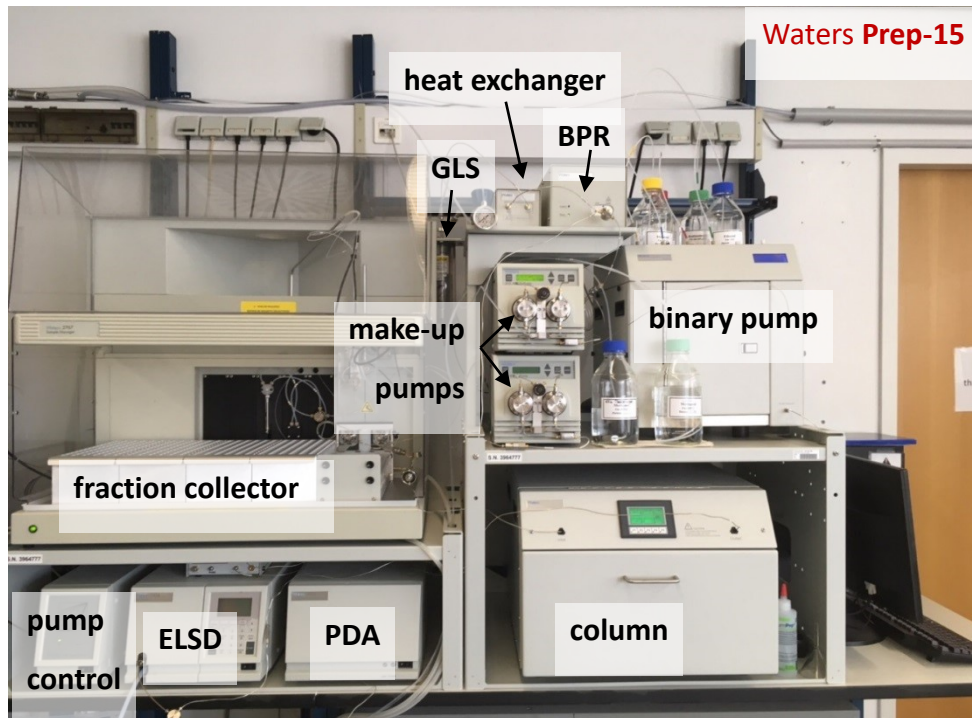


Abbildung 50: Aufbau präparative SFC-Anlage © Ulrike Grienke

Was die Aufreinigung von 4-PITC-NAC betrifft, so war die bisher auf der UPC² verwendete DIOL-Säule nicht für die präparative SFC vorhanden, weswegen stattdessen die BEH-Säule verwendet wurde. Da die Methodenoptimierung für die BEH-Säule ab der Optimierung des Lösungsmittelgradienten nicht mehr weitergeführt wurde, wurde nun die fertige Methode für die DIOL-Säule auf die BEH-Säule angepasst. Hierzu wurde das verunreinigte 4-PITC-NAC in IPA auf eine Konzentration von 8,5 mg/ml hin gelöst. Anschließend wurde die Methode für die präparative SFC modifiziert.

Mithilfe des im Methodenteil unter Punkt 6.5.4 angeführten Gradienten konnte eine Auftrennung der 3 enthaltenen Substanzen erreicht werden. Im nächsten Schritt wurde ein Durchgang auf der präparativen Trennsäule durchgeführt, um die exakten

Durchlaufzeiten der 3 Substanzen auf dieser Trennsäule zu erhalten. Anschließend wurden die Zonen dieser 3 Substanzen im per ELSD aufgenommenen Chromatogramm markiert und die präparative Trennung durchgeführt.

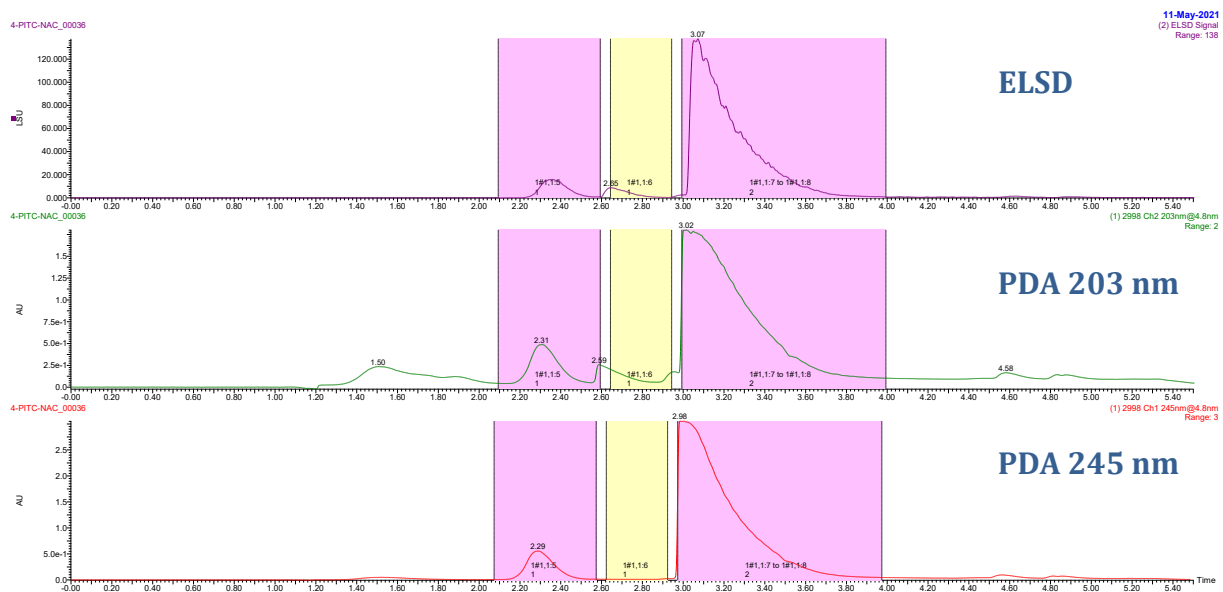


Abbildung 51: Optimierung der Trennung auf präp. SFC mit BEH-Säule. Oben: ELSD-Signal, Mitte und Unten: PDA bei 203 bzw. 245 nm

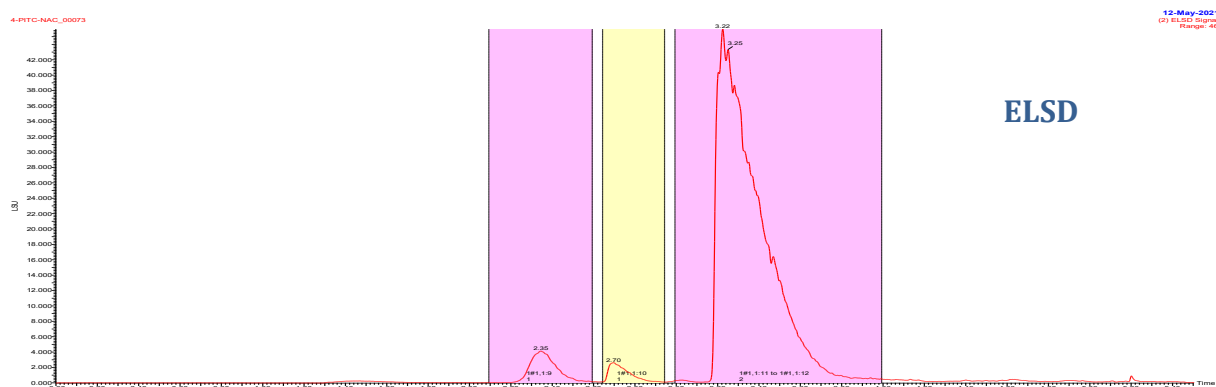


Abbildung 52: Für die Trennung markierte Zeit-Zonen im per ELSD aufgezeichneten Chromatogramm

Das auf diese Weise aufgereinigte 4-PITC-NAC wurde anschließend noch einmal zur Kontrolle auf der UPC² mit der fertigen Methode vermessen, mit dem Ergebnis, das zwar noch Verunreinigungen vorhanden waren, aber in einem akzeptablen Ausmaß (siehe Abbildung 53 bzw. Anhang Abbildungen 99 - 102).

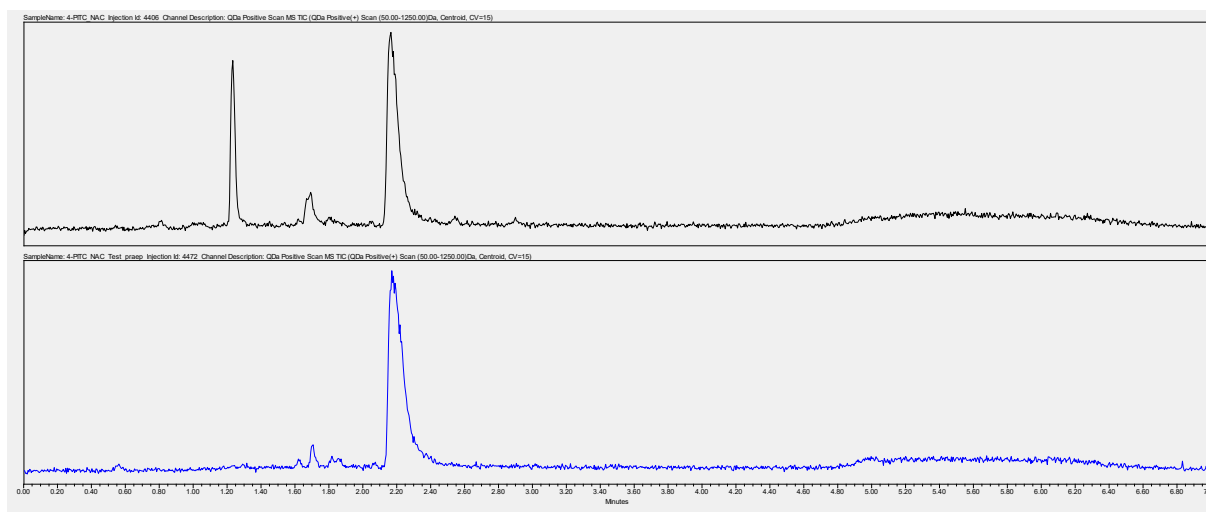


Abbildung 53: 4-PITC-NAC-Standard, Messung vor und nach Aufreinigung durch präp. SFC
Massenchromatogramm TIC-Plot (Positive Mode) oben: Inj.ID: 4406, unten Inj.ID:4472

4.6 Quantifizierung

4.6.1 Einleitung

Nachdem die Trennmethode optimiert und die Standards hergestellt waren, konnte nun mit der eigentlichen Quantifizierung begonnen werden.

Die Quantifizierung wurde auf zwei unterschiedlichen Geräten, mithilfe zweier unterschiedlicher Detektoren durchgeführt. Auch die Derivatisierung der verwendeten Proben war verschieden.

Für die erste Quantifizierung, die mithilfe der UPC² durchgeführt und für die ein Massenspektrometer als Detektor verwendet wurde, wurden für 4 einzelne ITC-NACs zuerst Verdünnungsreihen der Standards, sowie frische Extrakte hergestellt und derivatisiert und beides anschließend vermessen.

Bei der zweiten Quantifizierung, die eine Gesamtquantifizierung der in *E. japonicum* enthaltenen ITCs darstellte, wurde eine Verdünnungsreihe aus AITC als Standard hergestellt und diese, sowie frische Extrakte (3. und 4. Charge) aus *E. japonicum* mit BDT derivatisiert und mittels UV-Vis Detektor vermessen.

4.6.2 Quantifizierung von AITC, 3-BITC, 4-PITC und PEITC

Für die Quantifizierung der einzelnen ITCs in Form ihrer ITC-NACs wurde die UPC² zur Auftrennung und Detektion genutzt, die Substanzen wurden also per SFC getrennt und anschließend per Massenspektrometer detektiert.

Für die Quantifizierung der ITCs AITC, 3-BITC, 4-PITC und PEITC wurden zuerst Verdünnungsreihen der hergestellten Standards erstellt. Um die dabei verwendeten Ausgangskonzentrationen zu ermitteln, wurden die Peakflächen der Peaks vorangegangener Vermessungen der einzelnen Extrakte aus *E. japonicum* (Rhizoma, Caulis, Folium) mit den Peakflächen der jeweiligen Standards verglichen und so die Mindestkonzentrationen für die Ausgangslösungen ermittelt. Aus technischen Gründen wurden anschließend Lösungen mit jeweils etwa 1 mg Substanz/10 ml hergestellt.

Tabelle 8: Errechnete und eingesetzte Standard-Konzentrationen

ITC-NAC	Errechnete Menge Substanz /10 ml	Eingewogene Menge Substanz
AITC-NAC	8,52 mg	5,15 mg*
3-BITC-NAC	0,49 mg	0,93 mg
4-PITC-NAC	0,14 mg	1,30 mg
PEITC-NAC	0,04 mg	1,01 mg

* Da Konzentration sonst zu hoch

Die eingewogenen Mengen wurden in je 10 ml Hexan/IPA (70/30) gelöst und damit dann die Verdünnungsreihen mit je 9 Verdünnungsstufen (jeweils 1:3 verdünnt) hergestellt. Dafür wurde jeweils 1 ml Lösung mit 2 ml Lösungsmittelgemisch verdünnt.

Tabelle 9: Verdünnungsfaktor

Verdünnung (Level)	Verdünnungsfaktor
0	1
1	3
2	9
3	27
4	81
5	243
6	729
7	2187
8	6561
9	19683

Die so hergestellten Verdünnungsreihen wurden anschließend auf der UPC² vermessen (wobei jedes Level jeder Substanz 3-mal vermessen wurde) und mittels des Programms Empower, das gleichzeitig die Betriebssoftware der UPC²-Anlage darstellte, ausgewertet, wodurch die jeweiligen quadratischen Kalibrierfunktionen erhalten wurden.

Tabelle 10: Regressionsgleichungen und Korrelationskoeffizienten der einzelnen Kalibrierfunktionen

	Regressionsgleichung	Korrelationskoeffizient (R ²)
AITC-NAC	$Y = -6.10e+08 X^2 + 5.88e+08 X + 1.29e+06$	0,995329
3-BITC-NAC	$Y = -4.38e+09 X^2 + 1.30e+09 X - 2.17e+06$	0,997587
4-PITC-NAC	$Y = -3.52e+09 X^2 + 1.33e+09 X - 3.33e+06$	0,996832
PEITC-NAC	$Y = -4.48e+09 X^2 + 2.08e+09 X - 6.51e+06$	0,996899

Nach dem Erstellen der Kalibrierfunktionen wurden neue Extrakte aus den verschiedenen Organen von *E. japonicum* (Folium, Caulis, Rhizoma) hergestellt sowie derivatisiert (3. Charge). Aufgrund des offensichtlichen Konzentrationsunterschiedes der verschiedenen ITCs in Wasabi wurden für die einzelnen ITC-NACs unterschiedliche Verdünnungen der derivatisierten Extrakte hergestellt, bevor diese für die Quantifizierung vermessen wurden. Anschließend wurden die drei Extrakte für die Quantifizierung von AITC-NAC in Form einer 1:100-Verdünnung vermessen, für 3-BITC-NAC, 4-PITC-NAC und PEITC-NAC wurde der Folium-Extrakt unverdünnt, der Caulis-Extrakt 1:6 verdünnt und der Rhizom-Extrakt 1:10 verdünnt vermessen.

Daraufhin wurden die erhaltenen Ergebnisse ausgewertet und der jeweilige Gehalt an ITCs- bzw. ITC-NACs berechnet.

Tabelle 11: ITC-Konzentrationen in den verschiedenen Pflanzenorgane mit Standardabweichung

	AITC [mg/g]	3-BITC [mg/g]	4-PITC [mg/g]	PEITC [mg/g]
Rhizoma	13,7937±0,0774	0,1413±0,0012	0,1147±0,0015	n.d.
Caulis	6,8862±0,0468	0,0662±0,0010	0,0664±0,0010	n.d.
Folium	2,8570±0,0049	0,0099±0,0011	0,0097±0,0000	n.d.

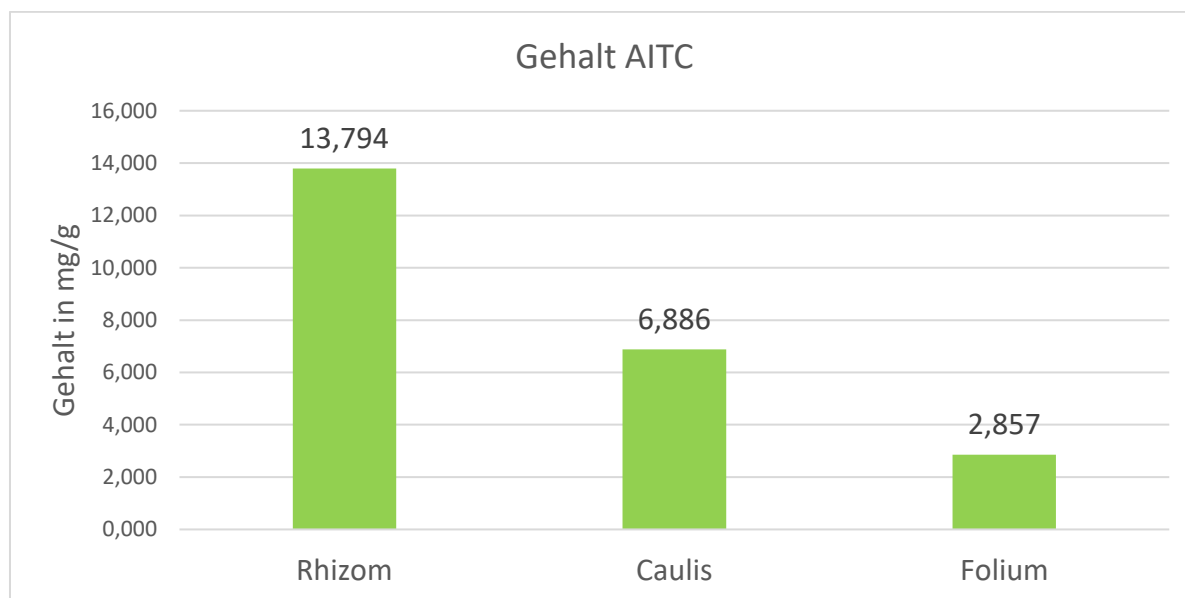


Abbildung 54: Gehalt an AITC berechnet in Milligramm pro Gramm gefriergetrocknetes Pulver

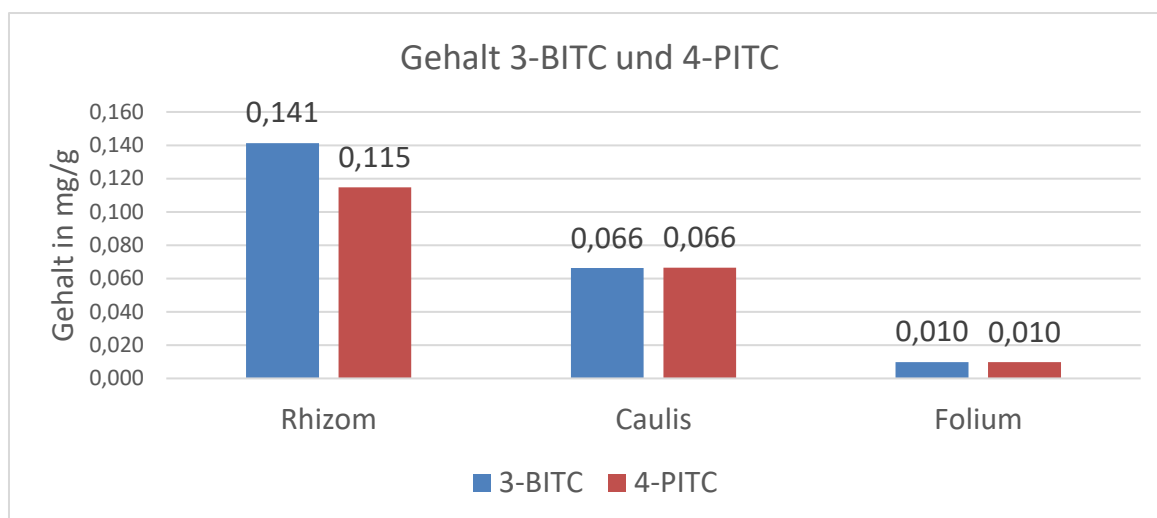


Abbildung 55: Gehalt an 3-BITC und 4-PITC berechnet in Milligramm pro Gramm gefriergetrocknetes Pulver

Wie aus dem Vergleich der Peakflächen bereits zu erwarten war, ist AITC das mit Abstand am höchsten konzentrierte ITC in *E. japonicum*. Wobei sich durch die Quantifizierung zeigte, dass AITC jeweils etwa 100-fach höher konzentriert ist als 3-BITC und 4-PITC, die laut Literatur das 3. bzw. 4. – wichtigste ITC darstellen. Die Mengen wurden in Milligramm ITC pro Gramm berechnet, bezogen auf das eingesetzte gefriergetrocknete Pulver von Rhizoma, Caulis oder Folium (wobei beispielsweise beim Rhizoma-Pulver ein Gramm gefriergetrocknetes Pulver etwa 4 Gramm frischer Probe entsprechen).

PEITC war offenbar nicht oder nur in Spuren vorhanden. Im Massenchromatogramm wurde zwar ein Peak mit der erwarteten Masse detektiert, dessen Retentionszeit stimmte jedoch nicht mit der des Standards überein.

Ebenfalls zu sehen ist, dass zwar wie erwartet im Wurzelstock die höchsten Konzentrationen an ITCs vorhanden sind, jedoch auch die Blätter und vor allem die Stängel, mit etwa 50% im Vergleich zum Wurzelstock, erhebliche Mengen an ITCs aufweisen.

In den Abbildungen 56 bis 58 sind die EICs der Extrakte zu sehen, die für die Quantifizierung der Einzelsubstanzen verwendet wurden (Extraktionscharge 3). Außerdem wurden in diesen Abbildungen im Gegensatz zu den anderen EIC-Abbildungen die Peakhöhen nicht auf den jeweils höchsten Substanzpeak normalisiert. Dadurch lassen sich (auch wenn die abgebildeten Peaks aufgrund unterschiedlicher Fragmentierungsraten mit Vorsicht zu genießen sind) hier, die in den einzelnen Organen

von *E. japonicum* unterschiedlich großen Mengen der verschiedenen ITCs (hier in ihrer ITC-NAC-Form) gut abschätzen.

Wie zu sehen ist, handelt es sich bei AITC-NAC tatsächlich um das mit Abstand häufigste ITC-NAC, als nächstes folgt, ebenfalls wie in der Literatur angegeben 6-MSPITC-NAC, am 3.- und 4.-häufigsten, wenn auch offensichtlich um ein Vielfaches niedriger konzentriert als die ersten beiden, sind dann 3-BITC-NAC und 4-PITC-NAC.

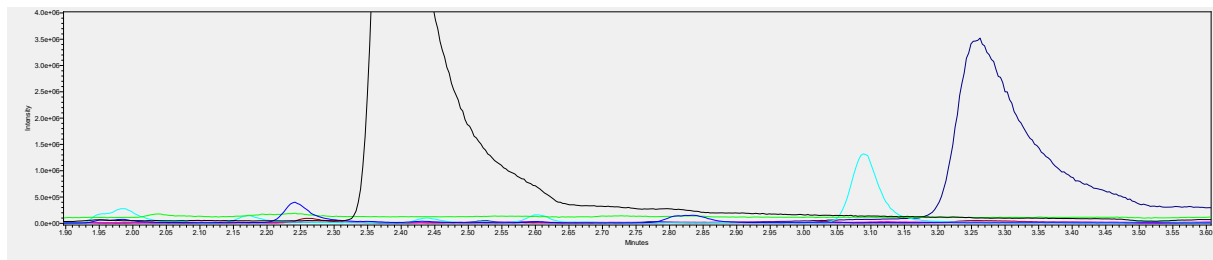


Abbildung 56: UPC²-EIC von Inj.ID: 6415

Folium

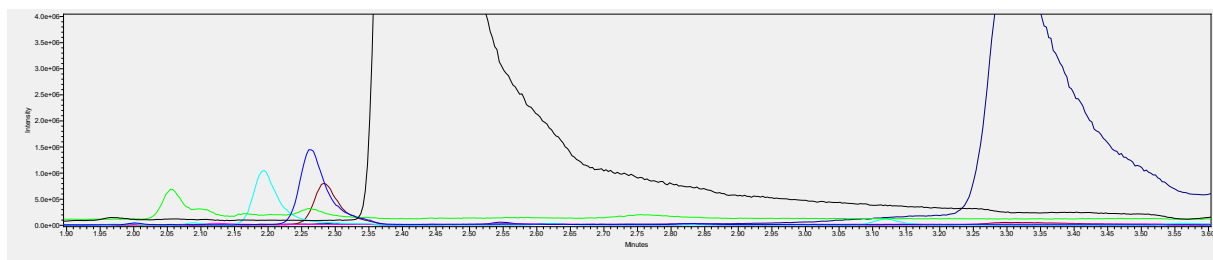


Abbildung 57: UPC²-EIC von Inj.ID: 6190

Caulis

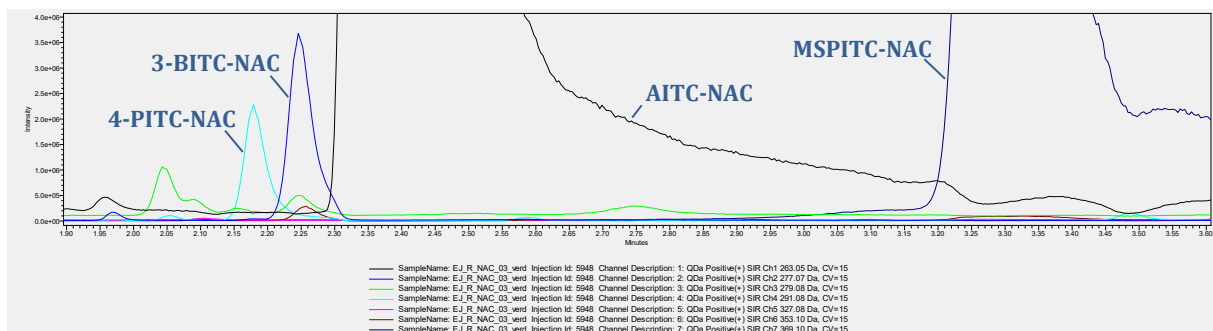


Abbildung 58: UPC²-EIC von Inj.ID: 5948

Rhizoma

Tabelle 12: Validierung der auf der UPC² durchgeführten Quantifizierung der einzelnen ITC-NACs

	AITC-NAC	3-BITC-NAC	4-PITC-NAC	PEITC-NAC
Regressionsgleichung (y=)	$4.67e+08 X + 9.78e+05$	$-4.38e+09 X^2 + 1.30e+09 X - 2.17e+06$	$-3.52e+09 X^2 + 1.33e+09 X - 3.33e+06$	$-4.48e+09 X^2 + 2.08e+09 X - 6.51e+06$
Korrelationskoeffizient (R ² =)	0.994737	0.997587	0.996832	0.996899
Konzentrationsbereich [µg/ml]	0,2355 - 171,7	0,3827 - 93,0	0,5350 - 130,0	1,2469 - 101,1
LOD [µg/ml]	0,19	0,38	0,53	1,25
LOQ [µg/ml]	0,44	0,61	0,86	1,3
Intraday ^a	0,025	0,011	0,014	n.d.
Interday ^b	0,054	0,047	0,072	n.d.
^a Standardabweichung innerhalb eines Tages basierend auf der Peakfläche in Prozent (n=5).				
^b Standardabweichung über 3 Tage basierend auf der Peakfläche in Prozent (n=3).				

4.6.3 Quantifizierung des Gesamt-ITC-Gehalts in *Eutrema japonicum*

Neben der Quantifizierung einzelner ITCs bzw. ITC-NACs mithilfe der UPC² wurde auch noch eine Gesamtquantifizierung aller enthaltenen ITCs mittels UV-Vis-Spektrometrie durchgeführt.

Hierfür wurden die ITCs ebenfalls derivatisiert, jedoch statt mit NAC mit BDT nach Zhang (1996)[21] und bei 365 nm mit einem UV-Vis-Spektrometer vermessen, wobei die gewählten Konzentrationen von Pilipczuk (2017)[6] übernommen wurden.

Für die Kalibrierlösung wurde als Standard AITC eingesetzt, wobei mit 6 Konzentrationsstufen von 2000 µM bis 62,5 µM gearbeitet wurde. Die Verdünnung erfolgte jeweils mit IPA.

Von diesen 6 Lösungen wurden für die Messungen jeweils 100 µl entnommen und mit je 900 µl Kaliumphosphatpuffer (1M), 900 µl IPA und 100 µl BDT-Lösung versetzt. Das BDT wurde mit einer Konzentration von 60 mM eingesetzt.

Für die Blanks wurden idente Lösungen hergestellt, bei denen die je 100 µl BDT durch IPA ersetzt wurden, also je 100 µl AITC-Lösung mit 900 µl Kaliumphosphatpuffer (1M), und 1000 µl IPA. Zusätzlich wurde zur Kontrolle eine Lösung ohne AITC vermessen, bestehend aus 900 µL µl Kaliumphosphatpuffer (1M), 1000 µl IPA und 100 µl BDT, sodass am Ende bei allen Lösungen 2 ml Gesamtvolumen erhalten wurden.

Zusätzlich wurden 2 ml reines IPA als Blank abgefüllt.

Diese 14 Lösungen wurden anschließend für eine Stunde bei 65°C in einen Wärmeschrank gegeben. Nach dem Abkühlen wurden jeweils 250 µl dieser Lösungen in Wells einer 96-Well Platte gefüllt und mithilfe eines Plate Readers (UV-Vis-Detektor) vermessen.

Tabelle 13: Konzentrationen der Kalibrierlösungen für die Gesamt-ITC-Quantifizierung

Konzentrationsstufe	Konzentration [µM]
Level 0	2000
Level 1	1000
Level 2	500
Level 3	250
Level 4	125
Level 5	62,5

Tabelle 14: Regressionsgleichung und Korrelationskoeffizient der Kalibrierfunktion für den Gesamt-ITC-Gehalt

	Gesamt-ITC-Gehalt
Regressionsgleichung (y=)	0,00007327x + 0,05813750
Korrelationskoeffizient (R ² =)	0,94365210

Für die Proben mussten, wie bereits zuvor für die Quantifizierung der einzelnen ITC-NACs, auch hier frische Extrakte aus den verschiedenen Organen von *E. japonicum* hergestellt werden (4. Charge), wobei wie bereits in Punkt 4.3 beschrieben vorgegangen wurde.

Von diesen ITC/IPA-Eluaten wurden jeweils bestimmte, zuvor abgeschätzte Mengen entnommen und verdünnt, um bei den anschließenden Messungen jeweils Messwerte im linearen Bereich der Kalibrierfunktionen zu erhalten.

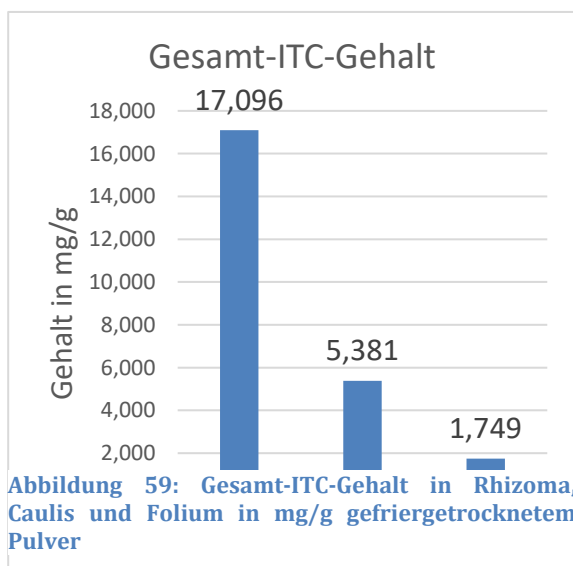
Daraufhin wurden jeweils 3 Lösungen hergestellt. Eine Probenlösung bestehend aus 100 µl verdünntem ITC/IPA-Eluat versetzt mit 900 µl Kaliumphosphatpuffer (1M), 900 µl IPA und 100 µl BDT-Lösung (analog Kalibrierlösung Level 0), eine Blanklösung bestehend aus 100 µl verdünntem ITC/IPA-Eluat, 900 µl Kaliumphosphatpuffer (1M)

und 1000 µl IPA (analog Kalibrations-Blank Level 0) und einmal 2 ml IPA. Diese wurden wie auch die Kalibrierlösungen für eine Stunde auf 65°C erhitzt.

Die so hergestellten Proben- und Blanklösungen wurden anschließend, analog zu den Konzentrationen der Kalibrierlösungen, bis Level 5 herunterverdünnt, wobei dafür jeweils 500 µl Lösung mit 500 µl eines 1:1 Gemisches aus IPA und Kaliumphosphatpuffer (1M) versetzt wurde. Dies erfolgte, da es bei vorangegangenen Probenmessungen durch Verdünnung mit reinem IPA zu einer nicht proportionalen Eintrübung der Lösungen gekommen war.

Die so hergestellten 13 Lösungen (6x Probe, 6x Blank, 1x IPA) wurden anschließend zu je 250 µl in Wells einer 96-Well Platte in einem Plate Reader vermessen.

Aus diesen Messungen wurden jeweils die Absorptionen herausgenommen, die im Bereich der zuvor erstellten Kalibrierfunktionen lagen und mithilfe dieser jeweils der Gesamt-ITC-Gehalt der einzelnen Organe (Rhizoma, Caulis, Folium) berechnet.



5 Diskussion und Schlussfolgerung/Ausblick

Ziel dieser Masterarbeit war es gewesen, eine Methode zur Quantifizierung von ITCs aus *E. japonicum* in Form ihrer NAC-Derivate mittels UHPSFC-PDA-QDa- bzw. UPC²-Anlage zu entwickeln.

Das erste Ziel war hierbei, zu ermitteln, ob die Derivatisierung mit NAC überhaupt zu einer Verbesserung der Detektierbarkeit im Vergleich zu nicht derivatisierten ITCs führt, was bestätigt werden konnte.

In einem zweiten Schritt erfolgte die Methodenoptimierung auf der UPC². Hierbei konnte erfolgreich eine Methode mit lediglich 7 Minuten Laufzeit generiert werden, bei der Methanol unter Zusatz von 0,1% AS als Co-Solvent gemeinsam mit CO₂ als mobiler Phase in Form eines flachen Gradienten auf einer DIOL-Säule eingesetzt wurde. Als Detektor wurde ein QDa (Massenspektrometer)-Detektor mit Methanol/Wasser (95:5) unter Zusatz von 10 mM Ammoniumformiat als Make-up-Solvent gewählt, wobei zusätzlich SIR zur Erzeugung von EICs eingesetzt wurde, um auf diese Weise unabhängig von Peaküberschneidungen quantifizieren zu können.

Auch die Extraktion der ITCs aus den verschiedenen Organen von Wasabi sowie deren Derivatisierung konnte erfolgreich durchgeführt werden.

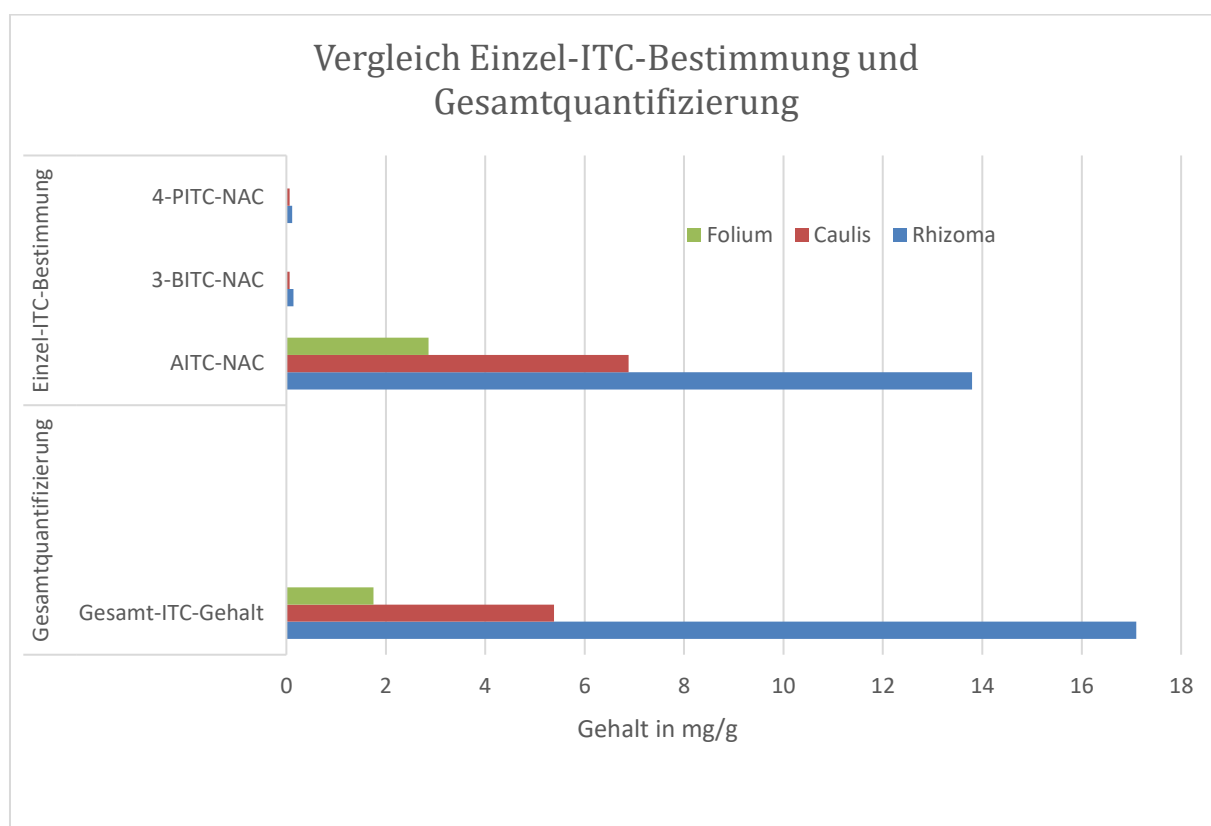
Bei der Synthese der Standards konnten zum Teil sehr gute Ausbeuten, mit 61,7% bei AITC-NAC bzw. 79,2% bei 3-BITC-NAC erreicht werden, lediglich bei 4-PITC-NAC war Aufgrund von Verunreinigungen eine weitere Aufreinigung nötig, die die Syntheseausbeute erheblich schmälerte. Es konnte jedoch trotzdem genug Substanz für die Quantifizierung als auch für die NMR-Analysen der Standards erhalten werden.

Der Standard für die vierte zu quantifizierende Substanz PEITC-NAC konnte käuflich erworben werden.

Daraufhin erfolgte die Quantifizierung, die in zwei Teile geteilt wurde. Im ersten Teil wurden vier der in *E. japonicum* enthaltenen ITCs in Form ihrer ITC-NACs quantifiziert, wobei dies nur bei AITC-NAC, 3-BITC-NAC und 4-PITC-NAC gelang, da PEITC-NAC offenbar gar nicht oder nur in Spuren vorhanden war und der Peak mit der für PEITC-

NAC erwarteten Masse im Massenchromatogramm die falsche Retentionszeit im Vergleich zum PEITC-NAC-Standard aufwies, es sich also offenbar um eine andere Substanz handelte.

Um zusätzlich noch den Gesamtgehalt der jeweils in Folium, Caulis und Rhizoma vorhanden ITCs bestimmen zu können, wurde ein bereits aus der Literatur bekanntes Verfahren mit BDT als Derivatisierungsreagens und einem UV-Vis-Detektor zur Detektion angewandt. Das Interessante hierbei war unter anderem auch, auf diese Weise einen Vergleich mit einem Verfahren zu erhalten, das sich sowohl in der Wahl des Derivatisierungsreagens als auch des Detektors von der Quantifizierung der einzelnen ITCs in Form ihrer ITC-NACs unterschied.



Betrachtet man die Werte für den Gesamtgehalt an ITC, so fällt auf, dass der Wert für den Gesamtgehalt mit 17,1 mg ITC je Gramm gefriergetrocknetes Rhizompulver um etwa 20 % höher liegt als der Wert für AITC mit 13,8 mg je Gramm gefriergetrocknetes Rhizompulver, was, vergleicht man die Peakflächen der einzelnen ITCs bzw. ITC-NACs, durchaus plausibel erscheint. Jedoch sind die Werte bei Caulis und Folium für den Gesamt-ITC-Gehalt jeweils niedriger als die für AITC allein erhaltenen Werte.

Mögliche Ursachen hierfür könnten die unterschiedlichen Detektoren bzw. Trennsysteme sein (SFC und Massenspektrometer im Gegensatz zu UV-Vis-Spektrometer) oder auch unterschiedliche Ausbeuten bei den Extraktionen, des Weiteren kann auch ein Einfluss der verschiedenen Derivatisierungsmethoden als Erklärung herangezogen werden, ebenso wie eine Kombination aus mehreren dieser Einflussfaktoren.

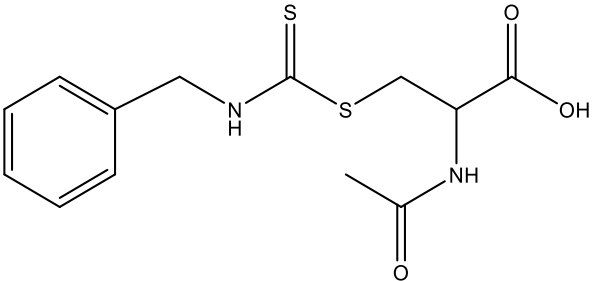
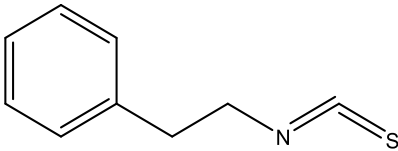
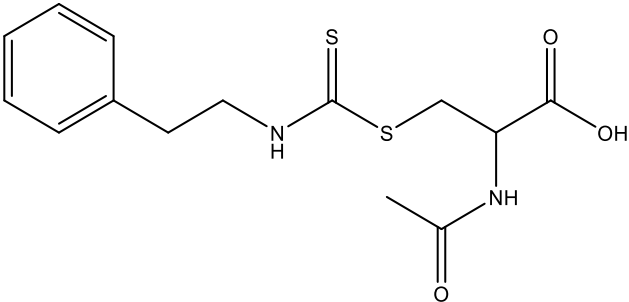
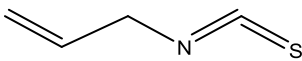
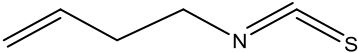
Nachdem alle gesteckten Ziele erreicht wurden, kann diese Arbeit grundsätzlich als abgeschlossen gelten, es gäbe jedoch noch Möglichkeiten die erhaltenen Ergebnisse zu verfeinern. Der erste und interessanteste Ansatz wäre mit Sicherheit, für die Quantifizierung nicht nur jeweils eine Charge an Extrakten herzustellen, sondern 5-10 Chargen und diese parallel zu vermessen, da die Extraktion aufgrund des Vorliegens der ITCs in ihrer freien und somit flüchtigen Form, ein Teil des Verfahrens noch dazu notwendigerweise in Wasser als Lösungsmittel, einen sehr kritischen Punkt der Quantifizierung darstellt.

Ein weiterer interessanter Ansatz wäre eine Überprüfung der eingesetzten Standards über einen gewissen Zeitraum, da herausgefunden wurde, dass es bei diesen, auch bei den käuflichen Standards, zum Teil zu einer Aufspaltung in ihre Edukte, also die Abspaltung von NAC, kommt, was auch zu einer Verfälschung der Ergebnisse der Quantifizierung führen kann.

6 Experimenteller Teil

6.1 Verwendete Substanzen und Geräte

Tabelle 15: Gekaufte Standards bzw. Ausgangssubstanzen

BITC-NAC CAS Number: - Gekauft von: Abcam Menge: 25 mg Molekulargewicht: 312,40 Summenformel: $C_{13}H_{16}N_2O_3S_2$	
PEITC CAS Number: 2257-09-2 Gekauft von: Sigma Aldrich Menge: 250 mg Molekulargewicht: 163,24 Summenformel: C_9H_9NS	
PEITC-NAC CAS Number: 131918-97-3 Gekauft von: Abcam Menge: 25 mg Molekulargewicht: 326,43 Summenformel: $C_{14}H_{18}N_2O_3S_2$	
AITC CAS Number: 57-06-7 Gekauft von: Sigma Aldrich Menge: 1 g Molekulargewicht: 99,15 Summenformel: C_4H_5NS	
3-BITC CAS Number: 3386-97-8 Gekauft von: Sigma Aldrich Menge: 100 mg Molekulargewicht: 113,18 Summenformel: C_5H_7NS	

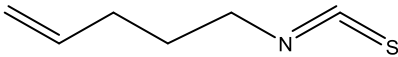
4-PITC CAS Nummer: 18060-79-2 Gekauft von: Sigma Aldrich Menge: 100 mg Molekulargewicht: 127.21 Summenformel: C ₆ H ₉ N S	
--	--

Tabelle 16: Verwendete Substanzen und Lösungsmittel:

Substanz	Hersteller
Methanol	Normapur, distilled VWR Chemicals, HiPerSolv Chromanorm
Ethanol 96%	Destilliert am Department für Pharmazeutische Wissenschaften, Division Pharmakognosie, Universität Wien
IPA (2-Propanol)	Normapur, for analysis
Acetonitril	Chromanorm Super Gradient
Ammoniumacetat	EMSURE ACS for analysis, Merck
Ammoniumformiat	HiPerSolv Chromanorm
Ammoniak	Gatt-Koller, 24%
Essigsäure	Carl Roth, Rotipuran 100%
AS	Gatt-Koller
Dichlormethan	Normapur, for analysis
n-Hexan	Normapur, for analysis

Verwendete Geräte:

- ACQUITY UPC², Waters (Module: sample manager, isocratic solvent manager, convergence manager, binary solvent manager, column manager, PDA detector and QDa detector), Software: Empower
- Präparative HPLC-SFC: Waters Prep 15 SFC System
- Plate Reader: Tecan GENios
- Zentrifuge: Labofuge 400 FUNCTION-line, Heraeus Instruments
- Rotavapor: R II, BÜCHI
- Vakuumpumpe: V-600, BÜCHI
- UV-Lampe: CAMAG, 245-315 nm
- DC Silica gel 60 F254
- SPE-Säulen: Backerbond Octadecyl (C18) 3 ml 500 mg per Column
- Ultraschallbad: Transsonic T460, Elma

Tabelle 17: Verwendete Trennsäulen UPC²

Säule	Dimension and Partikelgröße
Viridis® BEH (Bridged-Ethylene-Hybrid)	3.0 x 100 mm, 1.7 µm
Viridis® BEH 2-EP (Bridged-Ethylene-Hybrid 2-Ethylpyridine)	3.0 x 100 mm, 1.7 µm
Viridis® CSH Fluoro-Phenyl (CHarged-Surface-Hybrid Fluoro-Phenyl)	3.0 x 100 mm, 1.7 µm
Viridis® Silica 2-EP (Silica 2-Ethylpyridine)	3.0 x 100 mm, 5.0 µm
Viridis® Silica 2-EP	3.0 x 150 mm, 5.0 µm
Viridis® Silica	3.0 x 150 mm, 5.0 µm
Torus® 1-AA (1-Aminoanthracene)	3.0 x 100 mm, 1.7 µm
Torus® 2-PIC (2-Picolylamine)	3.0 x 100 mm, 1.7 µm
Torus® DEA (Diethylamine)	3.0 x 100 mm, 1.7 µm
Torus® DIOL (High-density DIOL)	3.0 x 100 mm, 1.7 µm

Tabelle 18: Verwendete Trennsäulen für präp. SFC

Säule	Dimension and Partikelgröße
Viridis® BEH (Bridged-Ethylene-Hybrid)	4,6 x 250 mm, 5,0 µm, sphärisch
Viridis® BEH (Bridged-Ethylene-Hybrid)	10,0 x 250 mm, 5,0 µm, sphärisch

6.2 Methodenentwicklung UHPSFC-PDA-QDa

6.2.1 Einleitung und erste Versuche

Im weiteren Verlauf von 6.2 finden sich die während der einzelnen Optimierungsschritte verwendeten Einstellungen, wobei die in Optimierung befindliche Einstellung jeweils fettgedruckt und unterstrichen ist.

Erste Versuche:

Verwendete Proben:

BITC-NAC 0,103 mg/ml

PEITC-NAC 0,100 mg/ml

Lösungsmittel: Hexan/IPA 70:30

Verwendete Methode	
Mobile Phase A	CO ₂
Mobile Phase B	Methanol
Gradient:	
Zeit [min]	Mobile Phase B [%]
0,0 – 4,0	0,0 → 50,0
4,0 – 4,5	50,0 → 50,0
4,5 – 5,0	50,0 → 0,0
5,0 – 6,0	0,0 → 0,0
Trennsäule	Silica (3.0x150 mm, 5.0 µm)
Make-up-Solvent	Methanol/Wasser (95:5)
Flussrate:	Co-Solvent: 1,0 ml/min
	Make-up Solvent: 0,6 ml/min
Injektionsvolumen	1 µl
Säulentemperatur	40°C
ABPR-Druck	2000 psi (=140 bar)

Detektoren	PDA 210 nm
	PDA 245 nm
	QDa 50 – 1250 Da
SIR	nicht verwendet

6.2.2 Optimierung des Make-up-Solvents

Verwendete Proben:

BITC-NAC	0,103 mg/ml
PEITC-NAC	0,100 mg/ml (nur für Methanol/Wasser 95:5 + 0,1 % Ammoniak verwendet)

Lösungsmittel: Hexan/IPA 70:30

Getestete Make-up-Solvent-Gemische:

- a) Methanol/Wasser 95:5
- b) Methanol/Wasser 95:5 + 0,1 % AS
- c) Methanol/Wasser 95:5 + 0,1 % Essigsäure
- d) Methanol/Wasser 95:5 + 0,1 % Ammoniak
- e) Methanol/Wasser 95:5 + 10 mM Ammoniumformiat
- f) Methanol/Wasser 95:5 + 10 mM Ammoniumacetat

Verwendete Methode	
Mobile Phase A	CO ₂
Mobile Phase B	Methanol
Gradient:	
Zeit [min]	Mobile Phase B [%]
0,0 – 4,0	0,0 → 50,0
4,0 – 4,5	50,0 → 50,0
4,5 – 5,0	50,0 → 0,0
5,0 – 6,0	0,0 → 0,0
Trennsäule	Silica (3.0x150 mm, 5.0 µm)
Make-up-Solvent	Methanol/Wasser (95:5) + getestete Zusätze

Flussrate:	Co-Solvent:	1,0 ml/min
	Make-up Solvent:	0,6 ml/min
Injektionsvolumen	1 µl	
Säulentemperatur	40°C	
ABPR-Druck	2000 psi (=140 bar)	
Detektoren	PDA 210 nm	
	PDA 245 nm	
	QDa 50 – 1250 Da	
SIR	nicht verwendet	

6.2.3 Vermessung von nicht-derivatisierten und derivatisierten ITCs

Verwendete Proben:

PEITC-NAC 0,100 mg/ml

PEITC 0,158 mg/ml

Lösungsmittel: Hexan/IPA 70:30

Verwendete Methode	
Mobile Phase A	CO ₂
Mobile Phase B	Methanol
Gradient:	
Zeit [min]	Mobile Phase B [%]
0,0 – 4,0	0,0 → 50,0
4,0 – 4,5	50,0 → 50,0
4,5 – 5,0	50,0 → 0,0
5,0 – 6,0	0,0 → 0,0
Trennsäule	Silica (3.0x150 mm, 5.0 µm)
Make-up-Solvent	Methanol/Wasser (95:5) + 10 mM Ammoniumformiat
Flussrate:	Co-Solvent: 1,0 ml/min
	Make-up Solvent: 0,6 ml/min
Injektionsvolumen	1 µl
Säulentemperatur	40°C

ABPR-Druck	2000 psi (=140 bar)
Detektoren	PDA 210 nm PDA 245 nm QDa 50 – 1250 Da
SIR	nicht verwendet

6.2.4 Auswahl der Trennsäule

Verwendete Probe:

derivatisierter Rhizom-Extrakt (Charge 1)

Getestete Säulen:

- a) DIOL
- b) DEA
- c) 2-PIC
- d) Silica 2-EP (100mm)
- e) CSH Fluoro-Phenyl
- f) BEH 2-EP
- g) BEH
- h) 1-AA
- i) Silica

Verwendete Methode	
Mobile Phase A	CO ₂
Mobile Phase B	Methanol
Gradient:	
Zeit [min]	Mobile Phase B [%]
0,0 – 4,0	0,0 → 50,0
4,0 – 4,5	50,0 → 50,0
4,5 – 5,0	50,0 → 0,0
5,0 – 6,0	0,0 → 0,0
Trennsäule	<u>getestete Säule</u>

Make-up-Solvent	Methanol/Wasser (95:5) + 10 mM Ammoniumformiat	
Flussrate:	Co-Solvent:	1,0 ml/min
	Make-up Solvent:	0,6 ml/min
Injektionsvolumen	1 µl	
Säulentemperatur	40°C	
ABPR-Druck	2000 psi (=140 bar)	
Detektoren	PDA	210 nm
	PDA	245 nm
	QDa	50 – 1250 Da
SIR	nicht verwendet	

6.2.5 Optimierung des Co-Solvents

6.2.5.1 Optimierung des Co-Solvents

Verwendete Probe:

derivatisierter Rhizom-Extrakt (Charge 1)

Getestete Co-Solventien (= mobile Phase B):

- a) Methanol
- b) IPA
- c) Ethanol
- d) Acetonitril

Verwendete Methode	
Mobile Phase A	CO ₂
Mobile Phase B	<u>getestetes Co-Solvent</u>
Gradient:	
Zeit [min]	Mobile Phase B [%]
0,0 – 4,0	0,0 → 50,0
4,0 – 4,5	50,0 → 50,0
4,5 – 5,0	50,0 → 0,0
5,0 – 6,0	0,0 → 0,0

Trennsäule	BEH und DIOL	
Make-up-Solvent	Methanol/Wasser (95:5) + 10 mM Ammoniumformiat	
Flussrate:	Co-Solvent:	1,0 ml/min
	Make-up Solvent:	0,6 ml/min
Injektionsvolumen	1 µl	
Säulentemperatur	40°C	
ABPR-Druck	2000 psi (=140 bar)	
Detektoren	PDA	210 nm
	PDA	245 nm
	QDa	50 – 1250 Da
SIR	nicht verwendet	

6.2.5.2 Optimierung des Co-Solvent-Zusatzes

Verwendete Probe:

derivatisierter Rhizom-Extrakt (Charge 1)

Getestete Co-Solventien:

- a) Methanol
- b) Methanol + 0,1 % AS
- c) Methanol + 0,2 % AS

Verwendete Methode	
Mobile Phase A	CO ₂
Mobile Phase B	Methanol + <u>getesteter Zusatz</u>
Gradient:	
Zeit [min]	Mobile Phase B [%]
0,0 – 4,0	0,0 → 50,0
4,0 – 4,5	50,0 → 50,0
4,5 – 5,0	50,0 → 0,0
5,0 – 6,0	0,0 → 0,0
Trennsäule	BEH und DIOL

Make-up-Solvent	Methanol/Wasser (95:5) + 10 mM Ammoniumformiat	
Flussrate:	Co-Solvent:	1,0 ml/min
	Make-up Solvent:	0,6 ml/min
Injektionsvolumen	1 µl	
Säulentemperatur	40°C	
ABPR-Druck	2000 psi (=140 bar)	
Detektoren	PDA	210 nm
	PDA	245 nm
	QDa	50 – 1250 Da
SIR	nicht verwendet	

6.2.6 Optimierung des Lösungsmittelgradienten

Verwendete Probe:

derivatisierter Rhizom-Extrakt (Charge 2)

Getestete Anfangsparameter: 0, 5, 10, 15 und 20% Co-Solvent

Maximaler Co-Solvent-Zusatz: 50%

Verwendete Methode	
Mobile Phase A	CO ₂
Mobile Phase B	Methanol + 0,1% AS
Gradient	<u>Getesteter Gradient</u>
Trennsäule	DIOL
Make-up-Solvent	Methanol/Wasser (95:5) + 10 mM Ammoniumformiat
Flussrate:	Co-Solvent: 1,0 ml/min
	Make-up Solvent: 0,6 ml/min
Injektionsvolumen	1 µl
Säulentemperatur	40°C
ABPR-Druck	2000 psi (=140 bar)

Detektoren	PDA	210 nm
	PDA	245 nm
	QDa	50 – 1250 Da
SIR	5 Punkte/Sekunde	

Tabelle 19: Bisher verwendeter Lösungsmittelgradient (siehe Abb. 14 u. 15)

Inj.ID: 2151	Zeit	%A (CO ₂)	%B (Methanol+AS)
Start mit 0% Co-Solvent			
Gradient mit 12,5/min	0	100	0
	4	50	50
	4,5	50	50
	5	100	0
	6	100	0

Tabelle 20: Abgeflachter Gradient mit steiler Anfangsphase (siehe Abb. 16 u. 17)

Inj.ID: 2215	Zeit	%A (CO ₂)	%B (Methanol+AS)
Start mit 0% Co-Solvent			
	0	100	0
1. Gradient mit 50%/min für 0,5 Minuten	0,5	75	25
	7,5	50	50
2. Gradient mit 3,57%/min für 7 Minuten	8	50	50
	8,5	100	0
	9,5	100	100

Tabelle 21: Noch stärker abgeflachter Gradient (siehe Abb. 18 u. 19)

Inj.ID: 2344	Zeit	%A (CO ₂)	%B (Methanol+AS)
Start mit 10% Co-Solvent	0	90	10
1. Gradient mit 30%/min für 0,5 Minuten	0,5	75	25
	7,5	65	35
2. Gradient mit 1,43%/min für 7 Minuten	8,0	50	50
	9,0	50	50
	9,5	100	0
	10,5	100	0

Tabelle 22: Nochmals abgeflachter Gradient (siehe Abb. 20 u. 21)

Inj.ID: 2689	Zeit	%A (CO ₂)	%B (Methanol+AS)
Start mit 10% Co-Solvent	0	90	10
1. Gradient mit 30%/min für 0,5 Minuten	0,5	75	25
	7,5	70	30
2. Gradient mit 1,43%/min für 7 Minuten	8,0	50	50
	9,5	50	50
	10,0	100	0
	11,0	100	0

Tabelle 23: Gradient mit Plateauphase (siehe Abb. 22 u. 23)

Inj.ID: 2817	Zeit	%A (CO ₂)	%B (Methanol+AS)
Start mit 10% Co-Solvent	0	90	10
1. Plateau 10% Co-Solvent für 4 Minuten	4,0	90	10
	4,5	80	20
Gradient mit 20%/min für 0,5 Minuten (4,0 - 4,5 min)	7,5	80	20
	8,0	50	50
2. Plateau 20% Co-Solvent für 3 Minuten	10,0	50	50
	10,5	90	10
	11,5	90	10

Tabelle 24: Fertiger Gradient (siehe Abb. 24, 25 u. 26)

Inj.ID: 2992	Zeit	%A (CO ₂)	%B (Methanol+AS)
Start mit 10% Co-Solvent	0	90	10
1. Gradient mit 28%/min für 0,5 Minuten	0,5	76	24
	4,0	72,2	27,8
2. Gradient mit 1,09%/min für 3,5 Minuten	4,5	50	50
	5,5	50	50
	6,0	90	10
	7,0	90	10

6.2.7 Optimierung des Einspritzvolumens

Verwendete Probe:

derivatisierter Rhizom-Extrakt (Charge 2)

Getestete Einspritzvolumina: 1 µl
2 µl
5 µl

Verwendete Methode	
Mobile Phase A	CO ₂
Mobile Phase B	Methanol + 0,1% AS
Gradient	
Zeit [min]	%-Co-Solvent-Zusatz
0,0 – 0,5	10,0 → 24,0
0,5 – 4,0	24,0 → 27,8
4,0 – 4,5	27,8 → 50,0
4,5 – 5,5	50,0 → 50,0
5,5 – 6,0	50,0 → 10,0
6,0 – 7,0	10,0 → 10,0
Trennsäule	DIOL
Make-up-Solvent	Methanol/Wasser (95:5) + 10 mM Ammoniumformiat
Flussrate:	Co-Solvent: 1,0 ml/min Make-up Solvent: 0,6 ml/min
Injektionsvolumen	<u>getestete Volumina</u>
Säulentemperatur	40°C
ABPR-Druck	2000 psi (=140 bar)
Detektoren	PDA 210 nm PDA 245 nm QDa 50 – 1250 Da
SIR	5 Punkte/Sekunde

6.2.8 Optimierung des Gegendruckreglers (ABPR)

Verwendete Probe:

derivatisierter Rhizom-Extrakt (Charge 2)

Getestete Parameter:

- a) 2000 psi (= Standardbedingungen)
- b) 1885 psi
- c) 2176 psi
- d) Gradient 0,0 → 4,0 min 1885 → 2176 psi
- e) Gradient 0,0 → 4,0 min 2176 → 1885 psi
- f) Gradient 0,0 → 1,4 min 2176 psi
- 1,4 → 2,4 min 2176 → 1885 psi
- 2,4 → 4,0 min 1885 psi

Verwendete Methode	
Mobile Phase A	CO ₂
Mobile Phase B	Methanol + 0,1% AS
Gradient	
Zeit [min]	%-Co-Solvent-Zusatz
0,0 – 0,5	10,0 → 24,0
0,5 – 4,0	24,0 → 27,8
4,0 – 4,5	27,8 → 50,0
4,5 – 5,5	50,0 → 50,0
5,5 – 6,0	50,0 → 10,0
6,0 – 7,0	10,0 → 10,0
Trennsäule	DIOL
Make-up-Solvent	Methanol/Wasser (95:5) + 10 mM Ammoniumformiat
Flussrate:	Co-Solvent: 1,0 ml/min
	Make-up Solvent: 0,6 ml/min
Injektionsvolumen	1 µl
Säulentemperatur	40°C
ABPR-Druck	<u>getestete Drücke</u>

Detektoren	PDA 210 nm
	PDA 245 nm
	QDa 50 – 1250 Da
SIR	5 Punkte/Sekunde

6.2.9 Optimierung der Trennsäulentemperatur

Verwendete Probe:

derivatisierter Rhizom-Extrakt (Charge 2)

Getestete Parameter:

- a) 40°C (= Standardbedingungen)
- b) 35°C
- c) 45°C

Verwendete Methode	
Mobile Phase A	CO ₂
Mobile Phase B	Methanol + 0,1% AS
Gradient	
Zeit [min]	%-Co-Solvent-Zusatz
0,0 – 0,5	10,0 → 24,0
0,5 – 4,0	24,0 → 27,8
4,0 – 4,5	27,8 → 50,0
4,5 – 5,5	50,0 → 50,0
5,5 – 6,0	50,0 → 10,0
6,0 – 7,0	10,0 → 10,0
Trennsäule	DIOL
Make-up-Solvent	Methanol/Wasser (95:5) + 10 mM Ammoniumformiat
Flussrate:	Co-Solvent: 1,0 ml/min
	Make-up Solvent: 0,6 ml/min
Injektionsvolumen	1 µl
Säulentemperatur	<u>getestete Temperaturen</u>
ABPR-Druck	2000 psi (=140 bar)

Detektoren	PDA	210 nm
	PDA	245 nm
	QDa	50 – 1250 Da
SIR	5 Punkte/Sekunde	

6.2.10 Optimierung der Flussrate

Verwendete Probe:

derivatisierter Rhizom-Extrakt (Charge 2)

Getestete Parameter:

- | | | |
|----|------------|-------------------------------------|
| a) | 1,0 mL/min | (= Standardbedingungen) |
| b) | 1,5 mL/min | |
| c) | 1,3 mL/min | |
| d) | 0,8 mL/min | |
| e) | Gradient | 0,0 → 4,0 min 0,8 → 1,5 mL/min |
| | | 4,0 → 7,0 min 1,0 mL/min |
| f) | Gradient | 0,0 → 4,0 min 1,5 → 0,8 mL/min |
| | | 4,0 → 7,0 min 0,8 mL/min |

Verwendete Methode	
Mobile Phase A	CO ₂
Mobile Phase B	Methanol + 0,1% AS

Gradient

Zeit [min]	%-Co-Solvent-Zusatz
0,0 – 0,5	10,0 → 24,0
0,5 – 4,0	24,0 → 27,8
4,0 – 4,5	27,8 → 50,0
4,5 – 5,5	50,0 → 50,0
5,5 – 6,0	50,0 → 10,0
6,0 – 7,0	10,0 → 10,0

Trennsäule	DIOL
Make-up-Solvent	Methanol/Wasser (95:5) + 10 mM Ammoniumformiat

Flussrate:	<u>Co-Solvent:</u>	<u>getestete Flussraten</u>
	Make-up Solvent:	0,6 ml/min
Injektionsvolumen	1 µl	
Säulentemperatur	40 °C	
ABPR-Druck	2000 psi (=140 bar)	
Detektoren	PDA 210 nm	
	PDA 245 nm	
	QDa 50 – 1250 Da	
SIR	5 Punkte/Sekunde	

6.2.11 Optimierung des Single-Ion-Recordings

Verwendete Probe:

derivatisierter Rhizom-Extrakt (Charge 2)

Getestete Parameter:

- 5 Punkte/Sekunde
- 10 Punkte/Sekunde
- 15 Punkte/Sekunde

Verwendete Methode	
Mobile Phase A	CO ₂
Mobile Phase B	Methanol + 0,1% AS
Gradient	
Zeit [min]	%-Co-Solvent-Zusatz
0,0 – 0,5	10,0 → 24,0
0,5 – 4,0	24,0 → 27,8
4,0 – 4,5	27,8 → 50,0
4,5 – 5,5	50,0 → 50,0
5,5 – 6,0	50,0 → 10,0
6,0 – 7,0	10,0 → 10,0
Trennsäule	DIOL
Make-up-Solvent	Methanol/Wasser (95:5) + 10 mM Ammoniumformiat
Flussrate:	Co-Solvent: 1,0 ml/min
	Make-up Solvent: 0,6 ml/min
Injektionsvolumen	1 µl
Säulentemperatur	40 °C
ABPR-Druck	2000 psi (=140 bar)
Detektoren	PDA 210 nm
	PDA 245 nm
	QDa 50 – 1250 Da
SIR	<u>getestete Punkte/Sekunde</u>

6.3 Extraktion der Pflanzenextrakte

- 800 mg (jeweils für Rhizoma, Caulis und Folium) gefriergetrocknetes Pulver wurde in 10 ml destilliertem Wasser bei 37°C für 3 Stunden, in einem Zentrifugenröhrchen verschlossen (mit Alufolie und darüber Parafilm), inkubiert, wobei am Anfang und jeweils stündlich geschüttelt wurde.
- Abzentrifugieren (15 min bei 3500 rpm)
- SPE-Säule konditionieren:

1.) 3 ml MeOH

2.) 3 ml dest. Wasser

Wobei für besseren Durchfluss jeweils Unterdruck angewendet wurde.

- d) Überstand der abzentrifugierten Lösung auf SPE-Säule aufbracht und extrahiert, danach 5 min Luft durch SPE-Säule gesaugt und anschließend die ITCs mit 1 ml IPA eluiert.

6.4 Derivatisierung der Pflanzenextrakte

a) Je 0,2 mmol NAC und NaHCO_3 in 1 ml dest. Wasser gelöst

b) 0,5 ml des ITC/IPA-Eluats mit 0,5 ml der NAC- NaHCO_3 -Lösung versetzt und für 1h bei 50°C inkubiert

6.5 Herstellung der ITC-NAC-Standards

6.5.1 AITC-NAC

Ansatz:

1,650 mmol AITC = 163,6 mg gelöst in 1,5 ml Ethanol

1,474 mmol NAC = 240,6 mg

1,621 mmol NaCO_3 = 136,2 mg NAC und NaCO_3 gelöst in 1,5 ml dest. Wasser

Durchführung:

NAC/ NaCO_3 -Lösung wurde in einem 10 ml -Rundkolben vorgelegt und bei Raumtemperatur mit einem Magnetrührer gerührt. Die AITC-Lösung wurde tropfenweise hinzugefügt, der Rundkolben mit einem Stopfen verschlossen und für 4 Stunden und 20 min gerührt. Daraufhin das Ethanol am Rotavapor abgezogen, der wässrige Rückstand mit HCL 2M auf pH 3 angesäuert und mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinigten Ethylacetatphasen wurden am Rotavapor zum Trockenen gebracht und das Produkt im Exsikkator getrocknet.

Produkt: blass-gelbe, sehr zäh-klebrige Masse

Ausbeute: 238,70 mg was 61,7 % entspricht, bei einer Reinheit von 93 %

6.5.2 3-BITC-NAC

0,442 mmol 3-BITC = 50,0 mg gelöst in 401 μ L Ethanol

0,395 mmol NAC = 64,44 mg

0,434 mmol NaCO_3 = 36,48 mg NAC und NaCO_3 gelöst in 401 μ L dest. Wasser

Durchführung:

NAC/ NaCO_3 -Lösung wurde in einem 10 ml -Rundkolben vorgelegt und bei Raumtemperatur mit einem Magnetrührer gerührt. Die 3-BITC-Lösung wurde tropfenweise hinzugefügt, der Rundkolben mit einem Stopfen verschlossen und für 5 Stunden und 30 min gerührt. Daraufhin das Ethanol am Rotavapor abgezogen, der wässrige Rückstand mit HCL 2M auf pH 3 angesäuert und mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinigten Ethylacetatphasen wurden am Rotavapor zum Trockenen gebracht und das Produkt im Exsikkator getrocknet.

Produkt: farblose, sehr zäh-klebrige Masse

Ausbeute: 88,48 mg was 79,2 % entspricht, bei einer Reinheit von 94 %

6.5.3 4-PITC-NAC

0,393 mmol 4-PITC = 50,0 mg gelöst in 357 μ L Ethanol

0,351 mmol NAC = 57,31mg

0,386 mmol NaCO_3 = 32,44mg NAC und NaCO_3 gelöst in 357 μ L dest.

Durchführung:

NAC/ NaCO_3 -Lösung wurde in einem 10 ml -Rundkolben vorgelegt und bei Raumtemperatur mit einem Magnetrührer gerührt. Die 4-PITC-Lösung wurde tropfenweise hinzugefügt, der Rundkolben mit einem Stopfen verschlossen und für 5 Stunden und 30 min gerührt. Daraufhin das Ethanol am Rotavapor abgezogen, der wässrige Rückstand mit HCL 2M auf pH 3 angesäuert und mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinigten Ethylacetatphasen wurden am Rotavapor zum Trockenen gebracht und das Produkt im Exsikkator getrocknet.

Produkt: farblose, sehr zäh-klebrige Masse

Ausbeute: kann aufgrund von Verunreinigungen im Produkt nicht angegeben werden

6.5.4 Aufreinigung von 4-PITC-NAC

Zur Aufreinigung von 4-PITC-NAC mittels präp. SFC verwendete Methode:

Verwendetes Co-Solvent:	Methanol (ohne Zusatz)
Eingespritztes Volumen analytisch:	10 µl
Eingespritztes Volumen präparativ:	100µl
Flussrate analytisch:	5ml/min
Flussrate präparativ:	15 ml/min
Trennsäule analytisch:	BEH (4,6 mm Durchmesser, 250 mm Länge, Partikelgröße 5 µm, Partikelform: sphärisch)
Trennsäule präparativ:	BEH (10 mm Durchmesser, 250 mm Länge, Partikelgröße 5 µm, Partikelform: sphärisch)
Detektoren:	ELSD PDA 203 nm PDA 245 nm

Tabelle 25: Gradient für die präparative Trennung von 4-PITC-NAC

	Zeit	%A (CO ₂)	%B (Methanol)
Start mit 10% Co-Solvent			
Gradient mit 12,5/min			
	0	90	10
	4,3	76	24
	4,5	90	10
	5,5	90	10

6.6 Quantifizierung des Gesamt-ITC-Gehalts

6.6.1 Erstellung der Kalibrierfunktion

Für die Kalibrierfunktion wurde AITC als Standard verwendet, wobei 6 Konzentrationsstufen erstellt wurden:

Tabelle 26: Hergestellte und vermessene Konzentrationsstufen

Konzentrationsstufe	Konzentration [μM]*
Level 0	2000
Level 1	1000
Level 2	500
Level 3	250
Level 4	125
Level 5	62,5

*Verdünnung jeweils mit IPA

Verwendete Lösungen:

- Kaliumphosphatpuffer 1 M:

Für 100 ml: 1,628 g K_2HPO_4

89 mg KH_2PO_4

- BDT 60 mM:

10 μl 1,2-BDT in 1,448 ml IPA

- IPA

- AITC 2000 μM

Für 100 ml: 19,58 μg AITC in 100 ml IPA

Kalibrierlösungen zu je 2 ml (Level 0-5):

900 μl Puffer-Lösung

900 μl IPA

100 μl AITC-Lösungen (Level 0-5)

100 μl 1,2-BDT-Lösung

Blanks zu je 2 ml (Level 0-5):

900 µl Puffer-Lösung

1000 µl IPA

100 µl AITC-Lösungen (Level 0-5)

Weitere Blanks:

Blank ohne AITC:

900 µl Puffer-Lösung

1000 µl IPA

100 µl 1,2-BDT-Lösung

IPA-Blank:

2000 µl IPA

Diese 14 Lösungen wurden für eine Stunde bei 65°C in einen Wärmeschrank gegeben. Nach dem Abkühlen wurden jeweils 250 µl dieser Lösungen in Wells einer 96-Well Platte gefüllt und mittels eines Plate Readers (=UV-Vis-Detektor) vermessen.

6.6.2 Erstellung der Proben und Quantifizierung

Folium-, Caulis- und Rhizomaextrakte wurden wie in 6.3 beschrieben extrahiert.

Aus diesen 3 Extrakten (=ITC/IPA-Eluat) wurden folgende Stammlösungen erstellt:

289 µl Folium- ITC/IPA-Eluat in 2 ml IPA

450 µl Caulis- ITC/IPA-Eluat in 10 ml IPA

150 µl Rhizoma- ITC/IPA-Eluat in 10 ml IPA

Aus diesen wurden jeweils 100 µl für die Erstellung der jeweiligen Lösungen entnommen:

Proben:

900 µl Puffer-Lösung

900 µl IPA

100 µl jeweilige Stammlösung (Folium-, Caulis- oder Rhizoma-Stammlösung)

100 µl 1,2-BDT-Lösung

1,2-BDT-Blank:

900 µl Puffer-Lösung

1000 µl IPA

100 µl 1,2-BDT-Lösung

IPA-Blank:

2000 µl IPA

Die drei Proben-Lösungen und die zwei Blanks wurden anschließend für eine Stunde bei 65°C in einen Wärmeschrank gegeben. Nach dem Abkühlen wurden sie jeweils bis Level 5 herunterverdünnt, wobei dafür je 500 µl Lösung mit 500 µl eines 1:1 Gemisches aus IPA und Kaliumphosphatpuffer (1M) versetzt wurde.

250 µl dieser Lösungen wurden daraufhin in Wells einer 96-Well Platte gefüllt und mittels eines Plate Readers (UV-Vis-Detektor) vermessen.

6.7 UHPSFC-PDA-QDa

In der vorliegenden Arbeit wurde eine UHPSFC-PDA-QDa- bzw. UPC²-Anlage verwendet. UHP steht hierbei für Ultra High Performance und weist darauf hin, dass die bei der HPLC, also der High Performance Chromatography angewendeten Materialien und Bedingungen noch einmal optimiert wurden. So werden hier mit 1,7 µm noch kleinere Partikel als in der HPLC mit ca. 3 – 5 µm für die stationäre Phase angewendet (für nähere Erklärungen siehe Punkt 3.3.3).

SFC steht, wie bereits bei Punkt 3.3.4 beschrieben, für Supercritical Fluid Chromatography, PDA und QDA stehen für die eingesetzten Detektoren, PDA also Photodiode Array, ein UV-Vis-Detektor und bei QDa handelt es sich um ein Massenspektrometer, genauer ein Massenspektrometer mit ESI als Ionenquelle und einem Quadrupol-Analysator.

Die UPC²-Anlage verfügte weiters auch noch über einen ELSD, einen Evaporative Light Scattering Detector, der jedoch nicht verwendet wurde (im Gegensatz zur präpartiven SFC, siehe 4.5.2).

Die UPC² besteht aus verschiedenen Bauteilen; einem Sample Manager für die Injektion der Proben, einem Binary Solvent Manager, für das Pumpen des CO₂ (=mobile Phase A) ins System und dem Hinzufügen einer variablen Menge Co-Solvent (=mobile Phase B), dem Convergence Manager, der den CO₂-Einlass und den aktiven Gegendruckregler (= Active Back Pressure Regulator (ABPR), um den Druck stehts auf dem für das überkritische Fluid nötigen Niveau zu halten) beherbergt, dem Säulenofen, der die Trennsäulen beherbergt und deren Temperierung ermöglicht, einem ELSD (Evaporative Light Scattering Detector), einem PDA-Detektor (UV-Vis-Detektor), der Make-up-Pumpe um das Make-up Solvent vor dem Massenspektrometer zur Probe hinzuzufügen und dem Massenspektrometer (=QDa). [18]

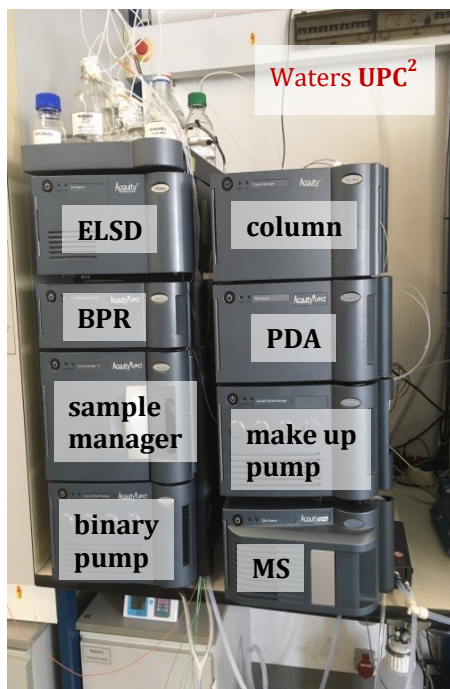


Abbildung 60: UPC²-Anlage © Ulrike Grienke

7 Literaturverzeichnis

- [1] Mihalache C (2021) Analysis of isothiocyanates from wasabi, Diplomarbeit, Univ. Wien.
- [2] Chadwick CI, Lumpkin TA, Elberson LR (1993) The botany, uses and production of *Wasabia japonica* (Miq.) (Cruciferae) Matsum. *Econ. Bot.* 47, 113–135.
- [3] <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Wasabi&oldid=215783253>, abgerufen am 20.10.2021
- [4] Kurata T, Misawa N, Hosoya T, Yamada-Kato T, Okunishi I, Kumazawa S (2019) Isolation and Identification of Components from Wasabi (*Wasabia japonica* Matsumura) Flowers and Investigation of Their Antioxidant and Anti-inflammatory Activities. *Food Sci. Technol. Res.* 25, 449–457.
- [5] Yoshida S, Hosoya T, Inui S, Masuda H, Kumazawa S (2015) Component analysis of wasabi leaves and an evaluation of their anti-inflammatory activity. *Food Sci. Technol. Res.* 21, 247– 253.
- [6] Pilipczuk T, Kusznierevicz B, Chmiel T, Przychodzeń W, Bartoszek A (2017) Simultaneous determination of individual isothiocyanates in plant samples by HPLC-DAD-MS following SPE and derivatization with N-acetyl-L-cysteine. *Food Chem.* 214, 587–596.
- [7] Andini S, Araya-Cloutier C, Sanders M, & Vincken JP (2020) Simultaneous Analysis of Glucosinolates and Isothiocyanates by Reversed-Phase Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Electron Spray Ionization-Tandem Mass Spectrometry. *J. Agr. Food Chem.* 68, 3121–3131.
- [8] Bones AM, Rossiter JT (1996) The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiol. Plant.* 97, 194–208.
- [9] Hwang E S, Lee H J (2006) Phenylethyl isothiocyanate and its N-acetylcysteine conjugate suppress the metastasis of SK-Hep1 human hepatoma cells. *Journal of Nutritional Biochemistry* 17, 837– 846.
- [10] Hwang E S, Jeffery E H (2003) Evaluation of urinary N-acetyl cysteinyl allyl isothiocyanate as a biomarker for intake and bioactivity of Brussels sprouts. *Food and Chemical Toxicology* 41, 1817–1825.
- [11] Subedi L, Venkatesan R, Kim SY (2017) Neuroprotective and Anti-Inflammatory Activities of Allyl Isothiocyanate through Attenuation of JNK/NF- κ B/TNF- α Signaling. *Int. J Mol. Sci.* 18(7), 1423
- [12] Knasmüller S (2014) Krebs und Ernährung: Risiken und Prävention - wissenschaftliche Grundlagen und Ernährungsempfehlungen, 1. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S. 339 - 350
- [13] Tanida N, Kawaura A, Takahashi A, Sawada K, Shimoyama T (1991) Suppressive effect of wasabi (pungent Japanese spice) on gastric carcinogenesis induced by MNNG in rats. *Nutr. Cancer* 16, 53-58.
- [14] Morimitsu Y, Hayashi K, Nakagawa Y, Fujii H, Horio F, Uchida K, Osawa T (2000) Antiplatelet and anticancer isothiocyanates in Japanese domestic horseradish, Wasabi. *Mech. Ageing Dev.* 116, 125-134.

- [15] Kumagai H, Kashima N, Seki T, Sakurai H, Ishii K, Ariga T (1994) Analysis of volatile components in essential oil of upland wasabi and their inhibitory effects on platelet aggregation. *Biosci. Biotech. Bioch.* 58, 2131-2135 .
- [16] Kinae N, Masuda H, Shin I, Furugori M and Shimoi K (2000). Functional properties of wasabi and horseradish. *Biofactors* 13, 265- 269.
- [17] Otto M (2011) Analytische Chemie, 4. Auflage, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, S. 367-466
- [18] <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720001136en.pdf>,
abgerufen am 14.12.2021
- [19] Rodrigues L, Silva I, Poejo J, Serra A T, Matias A A, Simplício A L, ... & Duarte C M (2016) Recovery of antioxidant and antiproliferative compounds from watercress using pressurized fluid extraction. *RSC advances* 6(37), 30905-30918.
- [20] Vermeulen M, Zwanenburg B, Chittenden G J F, & Verhagen H (2003) Synthesis of isothiocyanate-derived mercapturic acids. *European Journal of Medicinal Chemistry* 38(7-8), 729-737.
- [21] Zhang Y, Wade K L, Prestera T, & Talalay P (1996) Quantitative determination of isothiocyanates, dithiocarbamates, carbon disulfide, and related thiocarbonyl compounds by cyclocondensation with 1,2-benzenedithiol. *Analytical Biochemistry* 239(2), 160-167.

Anhang

UPC²-EI-Chromatogramme zur Optimierung der Säulentemperatur (siehe 4.2.9)

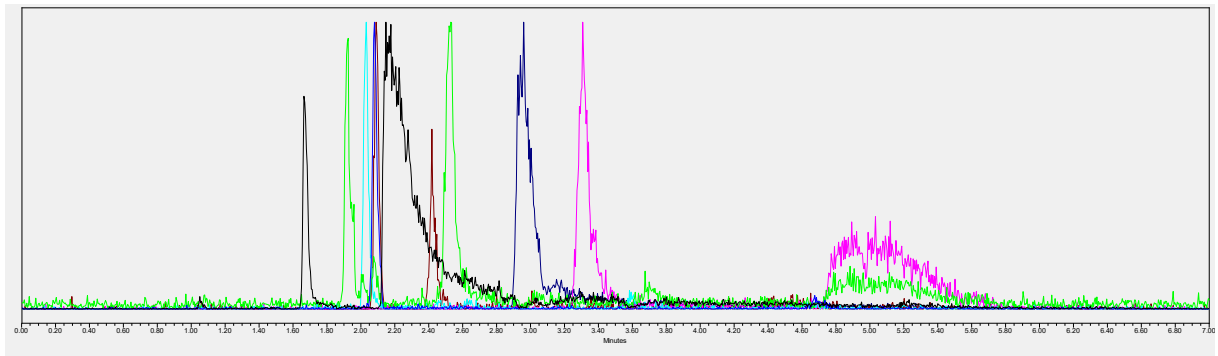


Abbildung 61: UPC²-EIC von Inj.ID: 3753

Säulentemperatur 35 °C

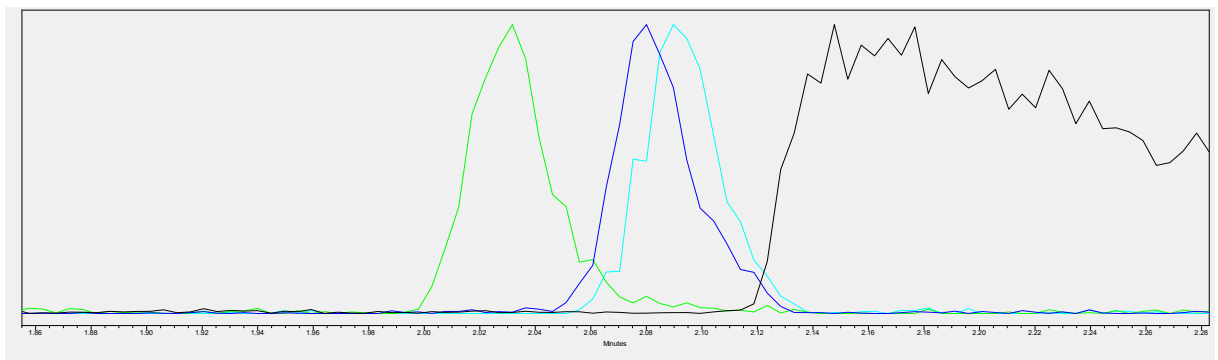


Abbildung 62: UPC²-EIC des in Abbildung 61 zwischen 1,86 min und 2,28 min liegenden Bereichs

Inj.ID: 3753

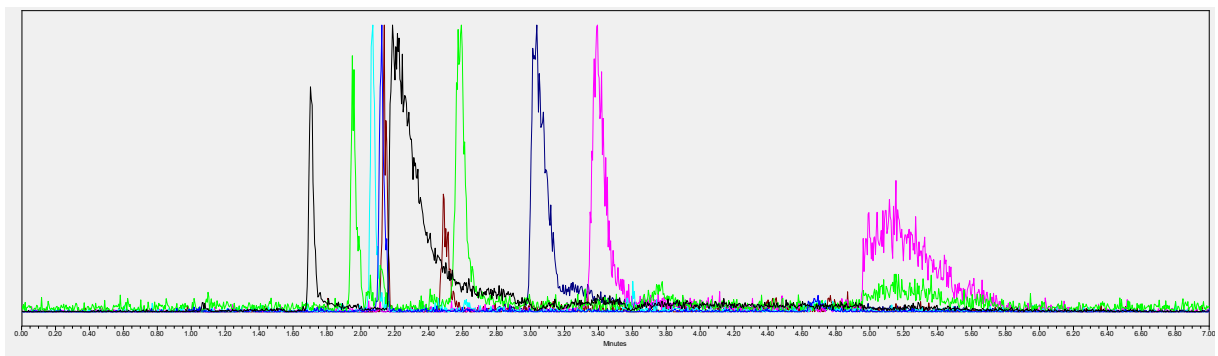


Abbildung 63: UPC²-EIC von Inj.ID: 3727

Säulentemperatur 40 °C

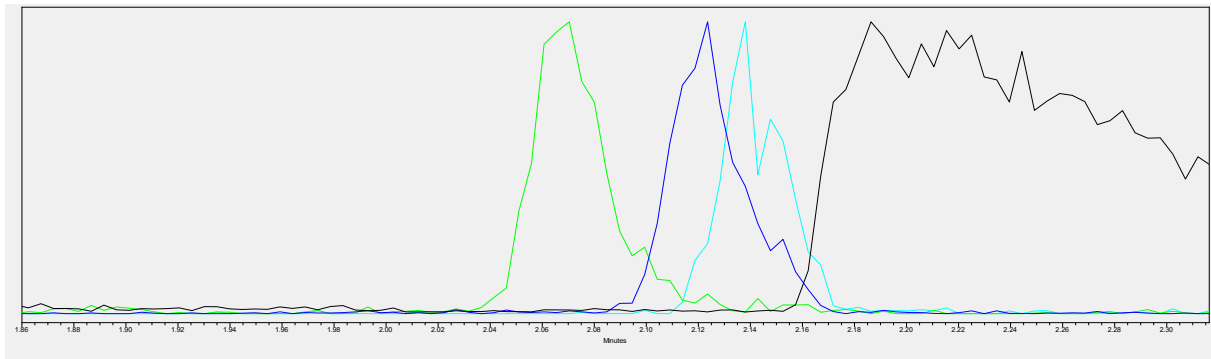


Abbildung 64: UPC²-EIC des in Abbildung 63 zwischen 1,88 min und 2,32 min liegenden Bereichs

Inj.ID: 3727

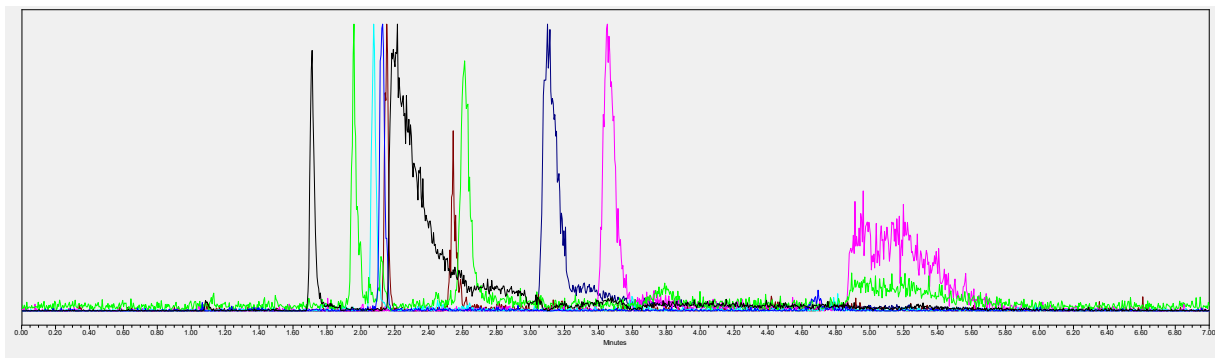


Abbildung 65: UPC²-EIC von Inj.ID: 3772

Säulentemperatur 45°C

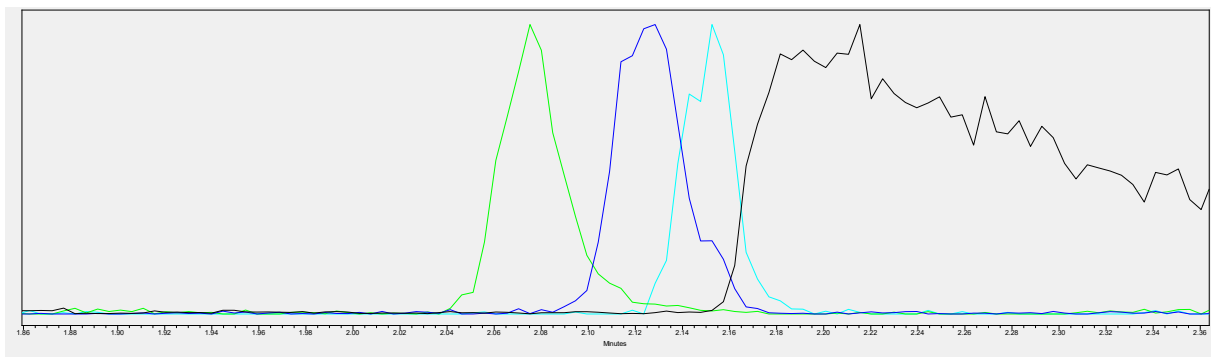


Abbildung 66: UPC²-EIC des in Abbildung 65 zwischen 1,86 min und 2,36 min liegenden Bereichs

Inj.ID: 3772

UPC²-EI-Chromatogramme zur Optimierung der Flussrate (siehe 4.2.10)

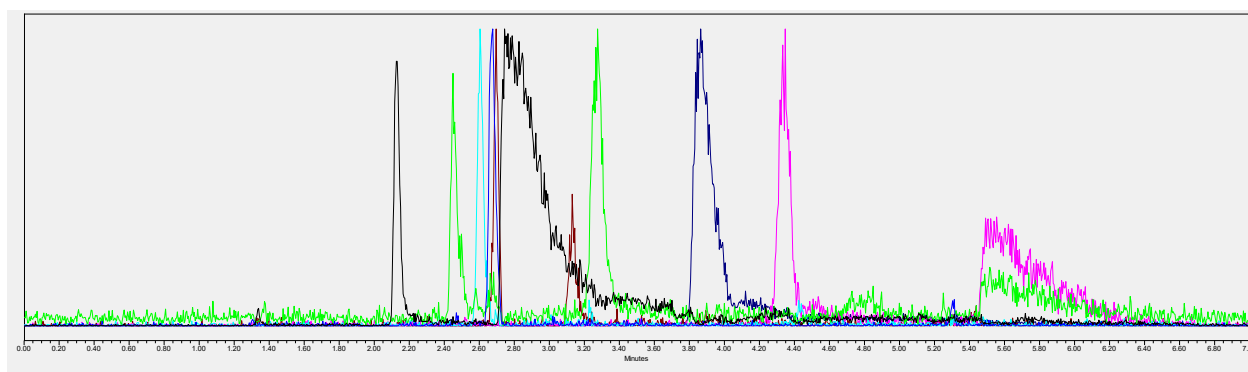


Abbildung 67: UPC²-EIC von Inj.ID: 4012

Flussrate 0,8 ml/min

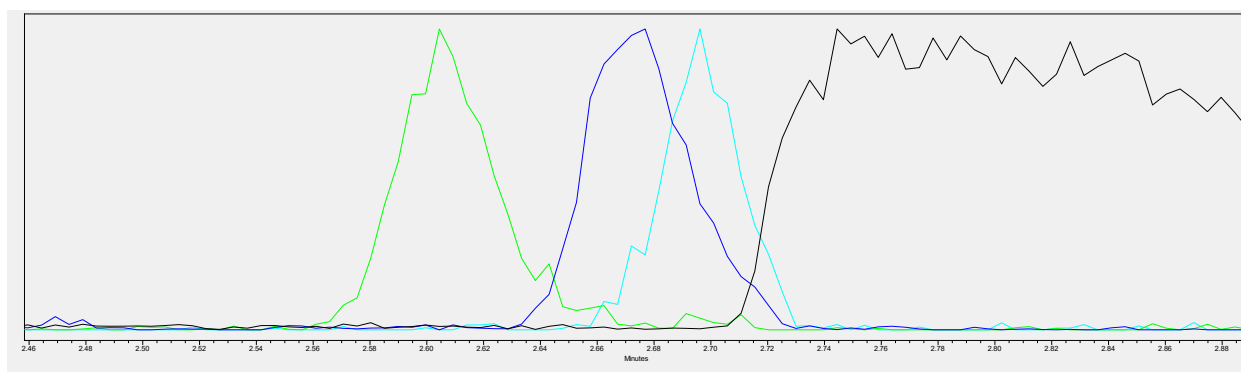


Abbildung 68: UPC²-EIC des in Abbildung 67 zwischen 2,46 min und 2,88 min liegenden Bereichs

Inj.ID: 4012

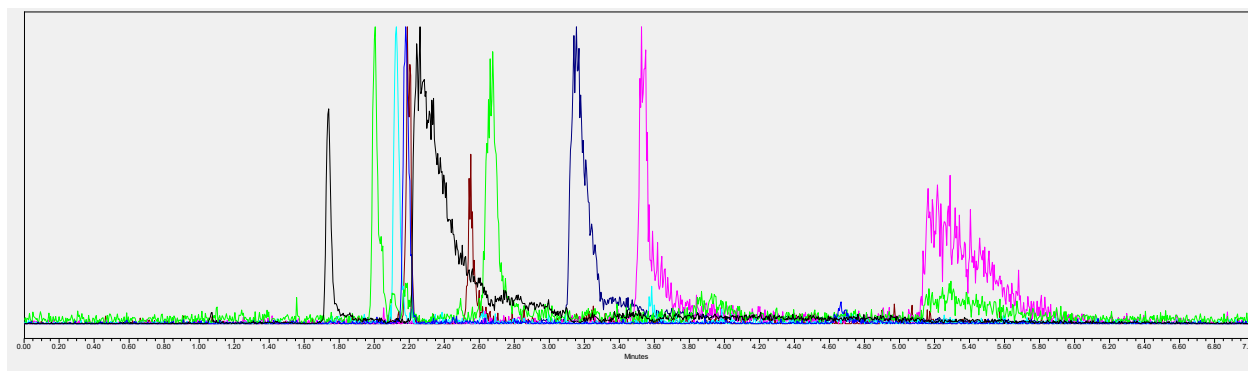


Abbildung 69: UPC²-EIC von Inj.ID: 3935

Flussrate 1,0 ml/min

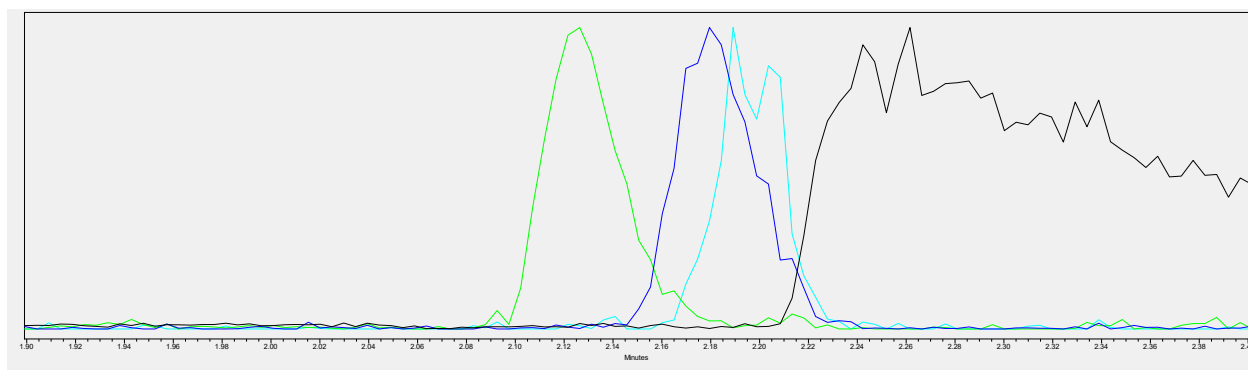


Abbildung 70: UPC²-EIC des in Abbildung 69 zwischen 1,90 min und 2,40 min liegenden Bereichs

Inj.ID: 3935

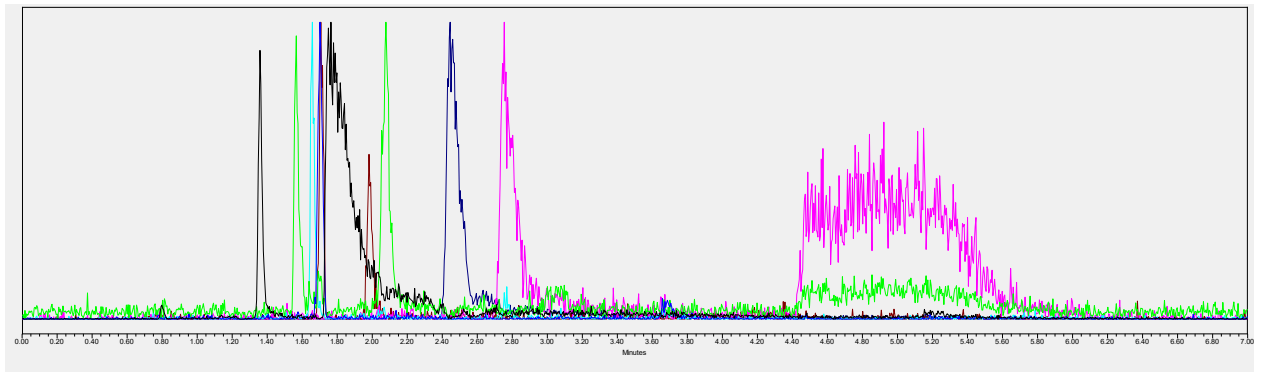


Abbildung 71: UPC²-EIC von Inj.ID: 3976

Flussrate 1,3 ml/min

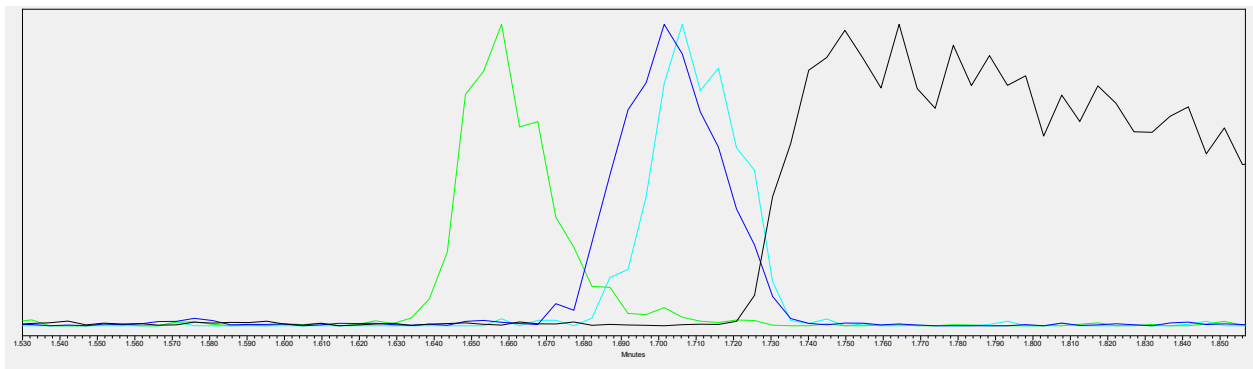


Abbildung 72: UPC²-EIC des in Abbildung 72 zwischen 1,53 min und 1,85 min liegenden Bereichs

Inj.ID: 3976

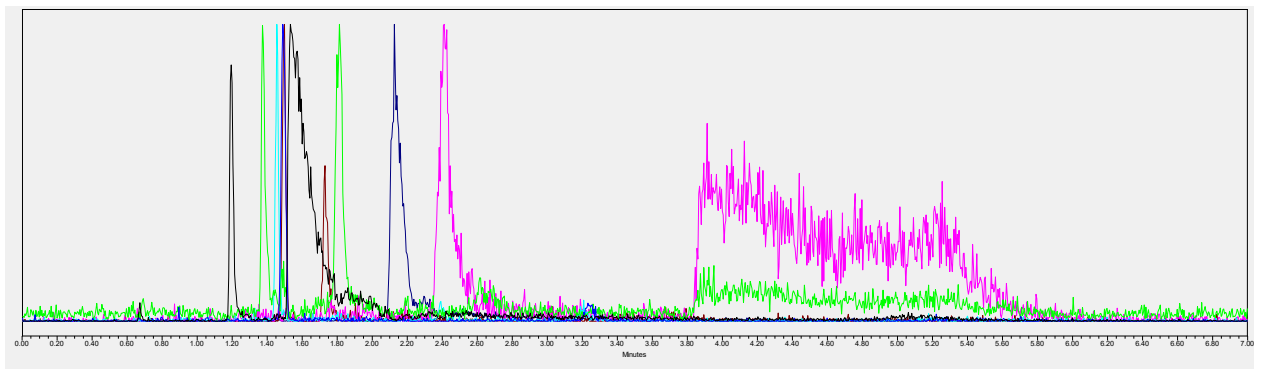


Abbildung 73: UPC²-EIC von Inj.ID: 3959

Flussrate 1,5 ml/min

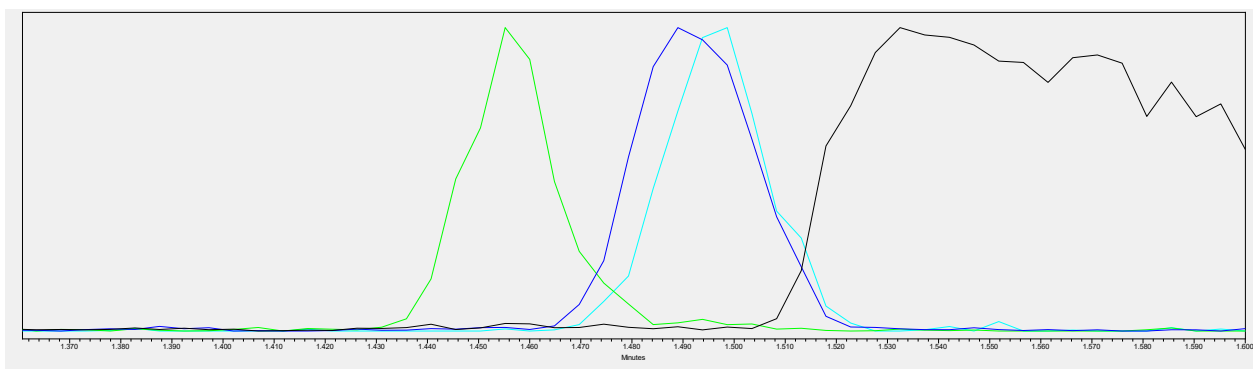


Abbildung 74: UPC²-EIC des in Abbildung 74 zwischen 1,36 min und 1,60 min liegenden Bereichs

Inj.ID: 3959

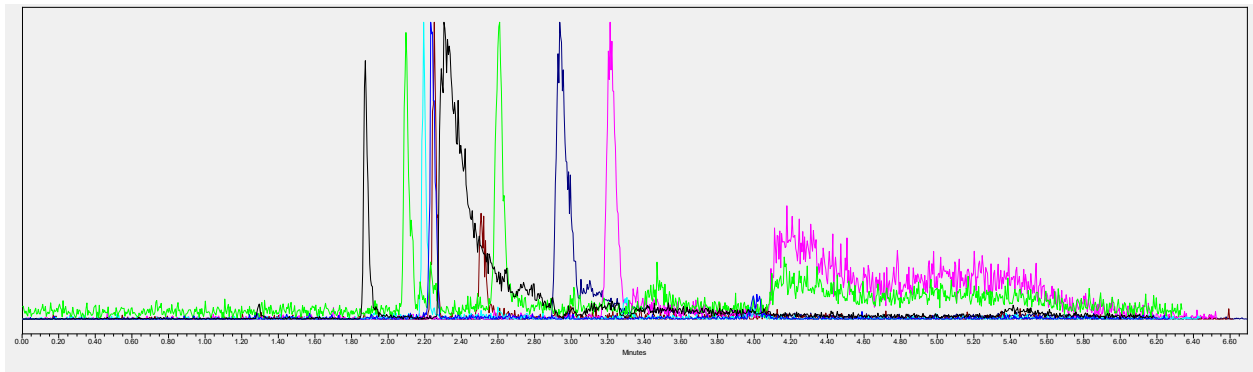


Abbildung 75: UPC²-EIC von Inj.ID: 4048

steigende Flussrate 0,8 → 1,5 ml/min

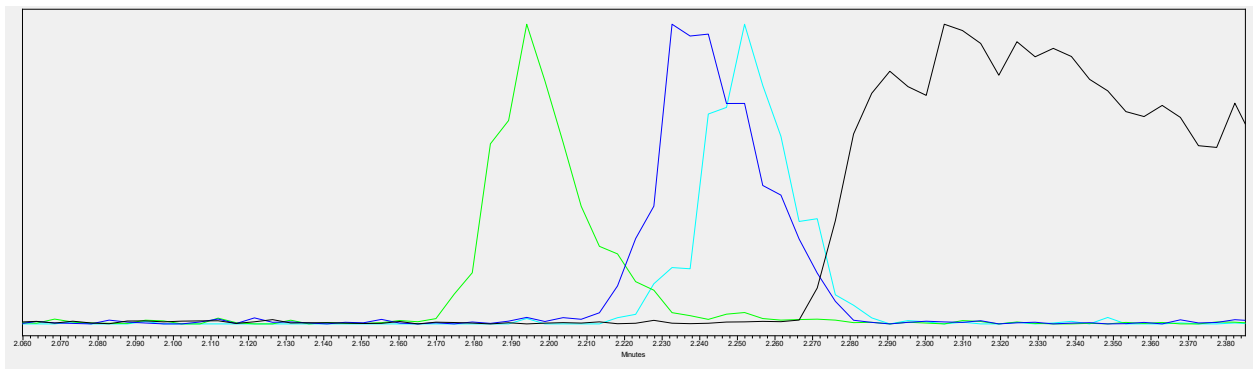


Abbildung 76: UPC²-EIC des in Abbildung 75 zwischen 2,06 min und 2,38 min liegenden Bereichs

Inj.ID: 4048

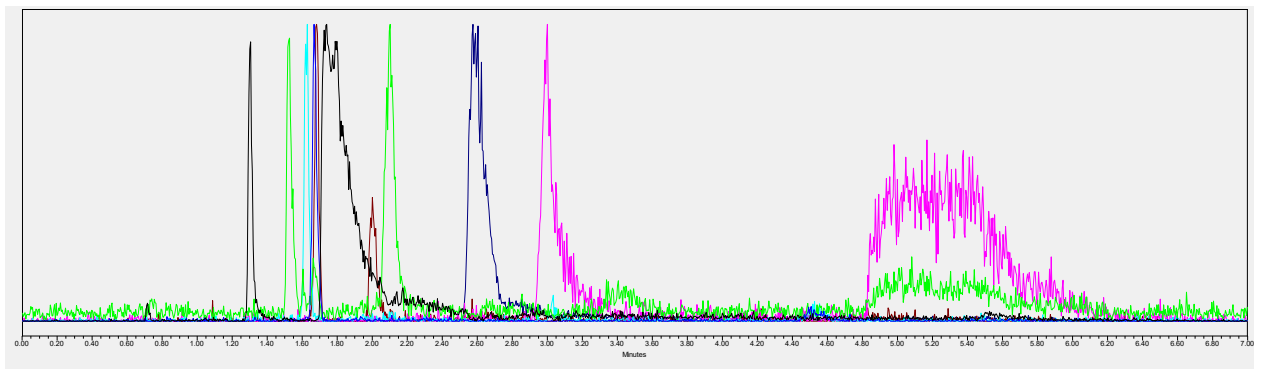


Abbildung 77: UPC²-EIC von Inj.ID: 4085

fallende Flussrate 1,5 → 0,8 ml/min

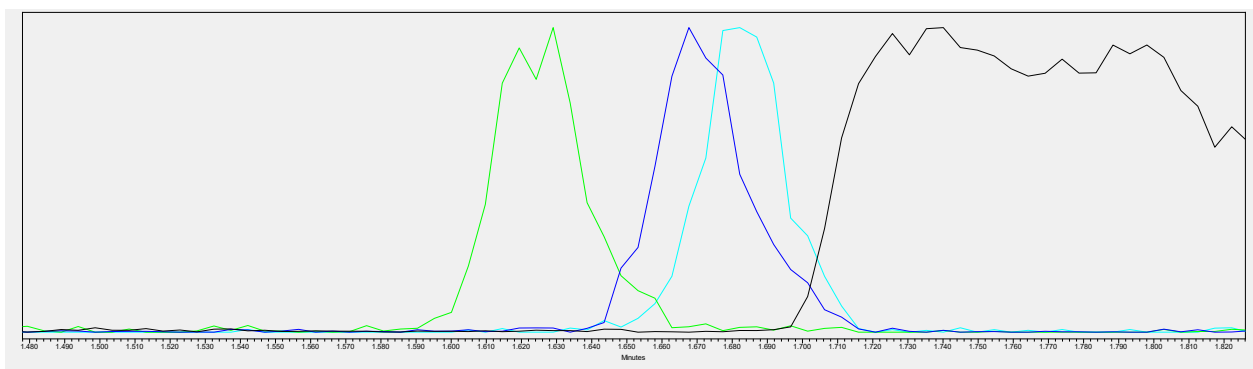


Abbildung 78: UPC²-EIC des in Abbildung 77 zwischen 1,86 min und 2,36 min liegenden Bereichs

Inj.ID: 4085

Reinheit der Standards (siehe 4.5.1 und 4.5.2)

AITC-NAC

Inj.ID: 3532

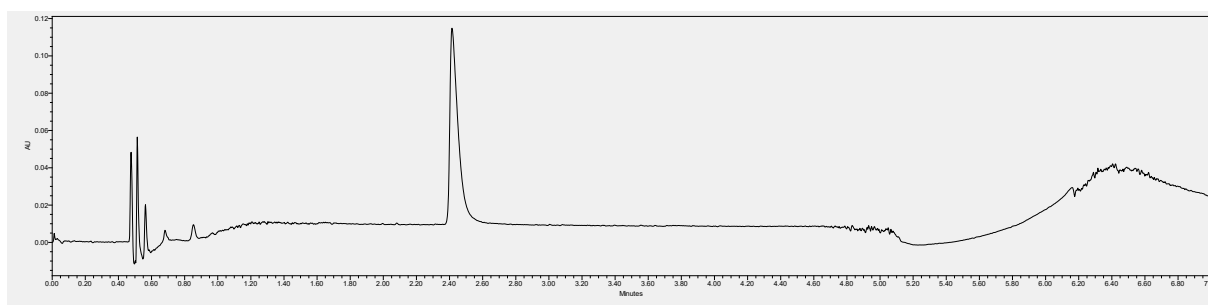


Abbildung 79: AITC-NAC-Standard

PDA 210 nm

Inj.ID: 3532

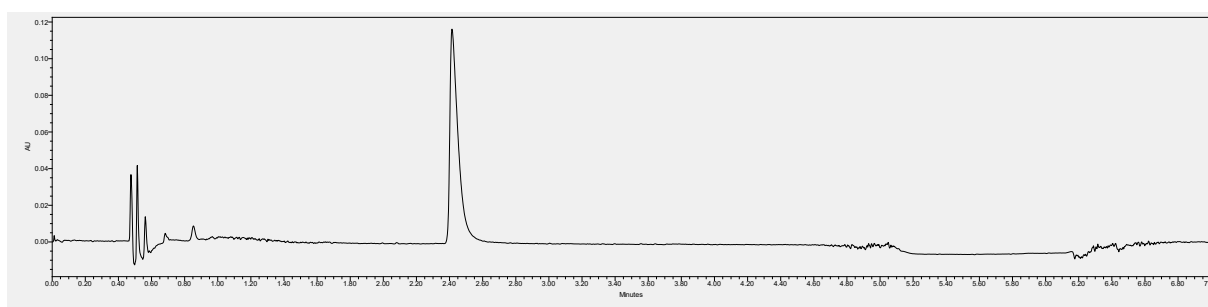


Abbildung 80: AITC-NAC-Standard PDA 245 nm

Inj.ID: 3532

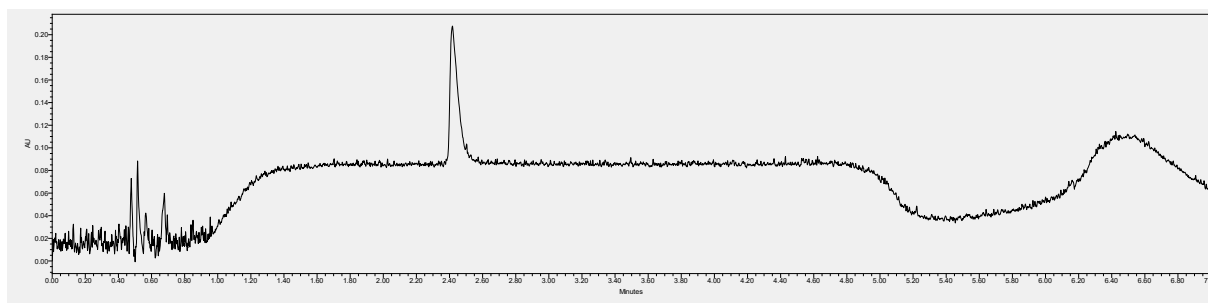


Abbildung 81: AITC-NAC-Standard

PDA-MAXPlot (190-600 nm)

Inj.ID: 3532

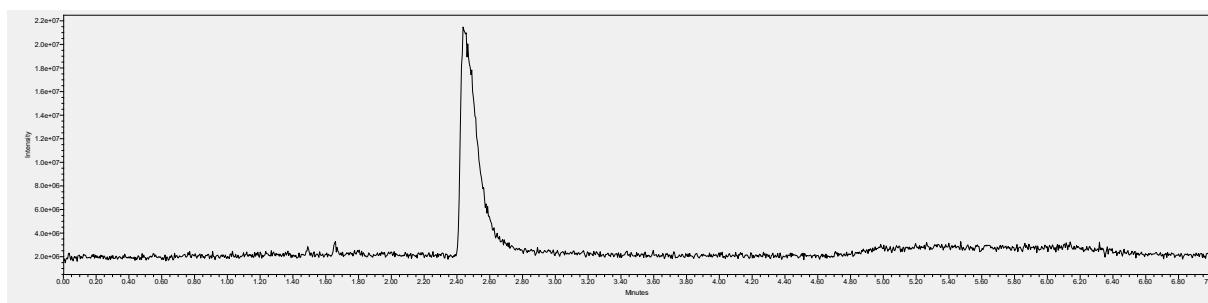


Abbildung 82: AITC-NAC-Standard

Massenchromatogramm TIC-Plot (Positive Mode) Inj.ID: 3532

3-BITC-NAC

Inj.ID: 4356

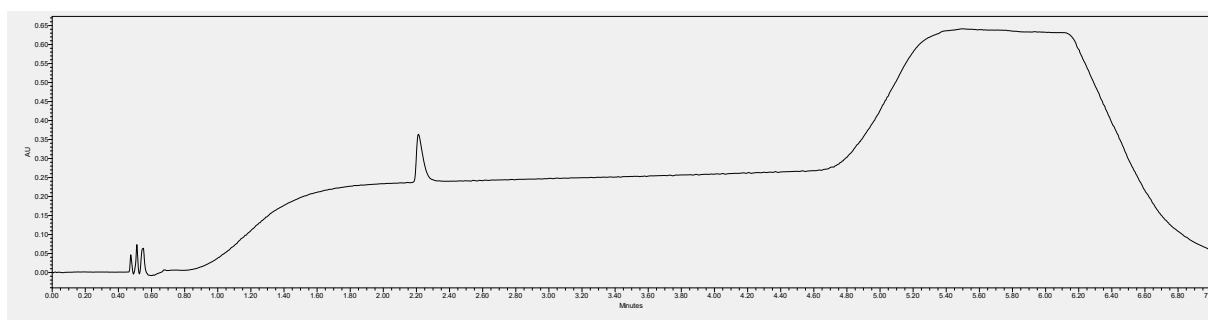


Abbildung 83: 3-BITC-NAC-Standard

PDA 210 nm

Inj.ID: 4356

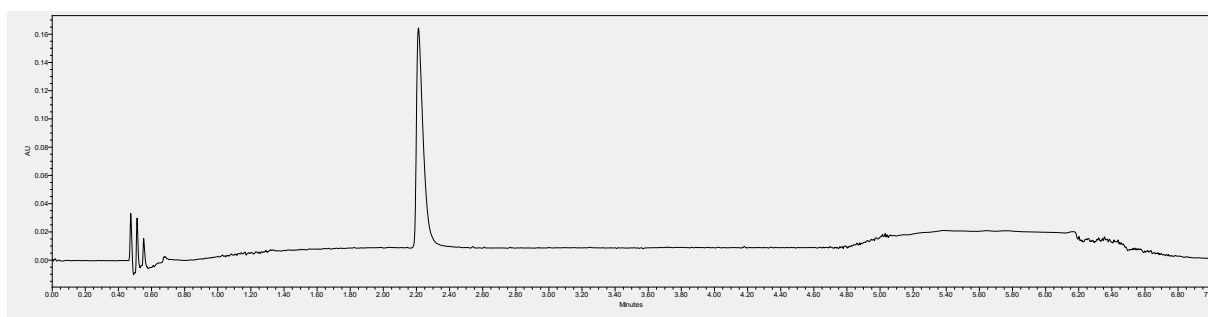


Abbildung 84: 3-BITC-NAC-Standard

PDA 245 nm

Inj.ID: 4356

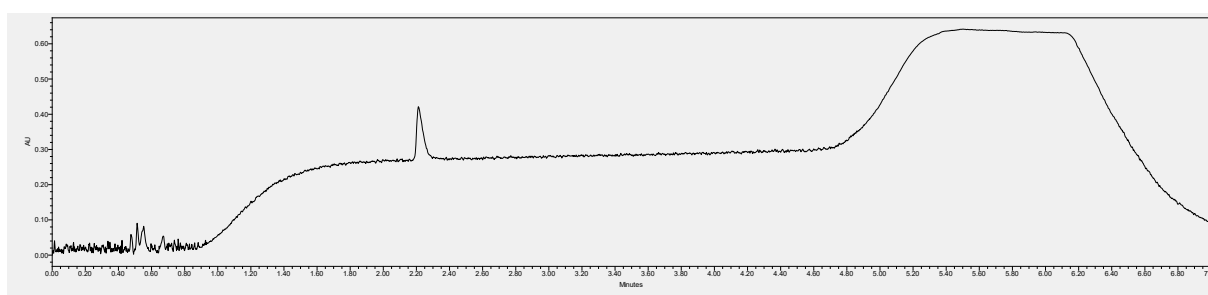


Abbildung 85: 3-BITC-NAC-Standard

PDA-MAXPlot (190-600 nm)

Inj.ID: 4356

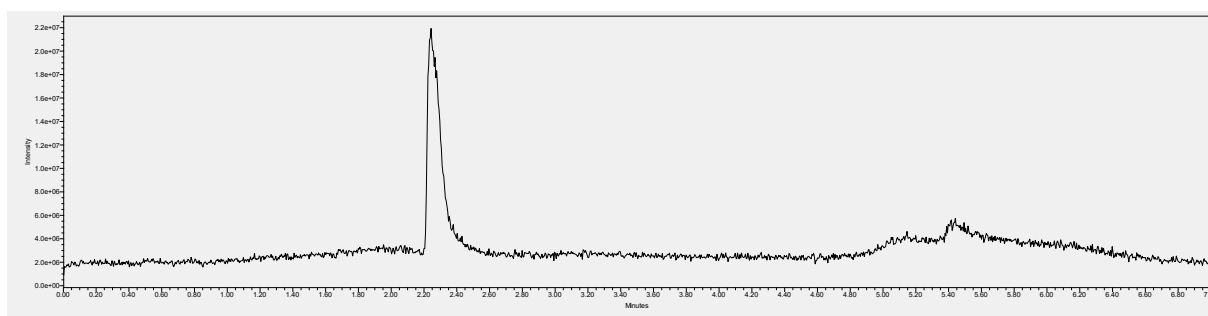


Abbildung 86: 3-BITC-NAC-Standard

Massenchromatogramm TIC-Plot (Positive Mode)

Inj.ID: 4356

4-PITC-NAC

Inj.ID: 4365

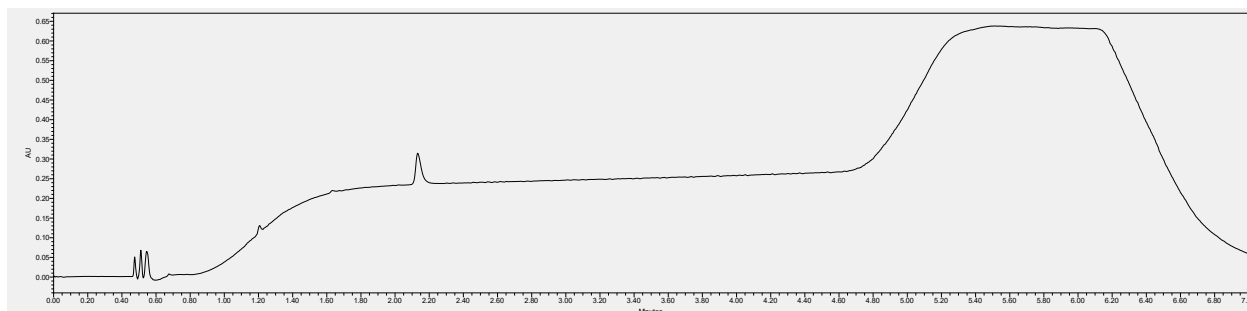


Abbildung 87: 4-PITC-NAC-Standard

PDA 210 nm

Inj.ID: 4365

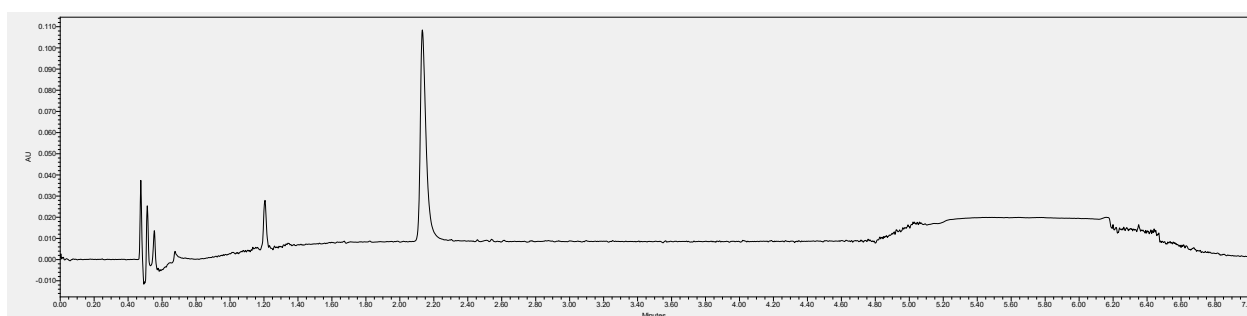


Abbildung 88: 4-PITC-NAC-Standard

PDA 245 nm

Inj.ID: 4365

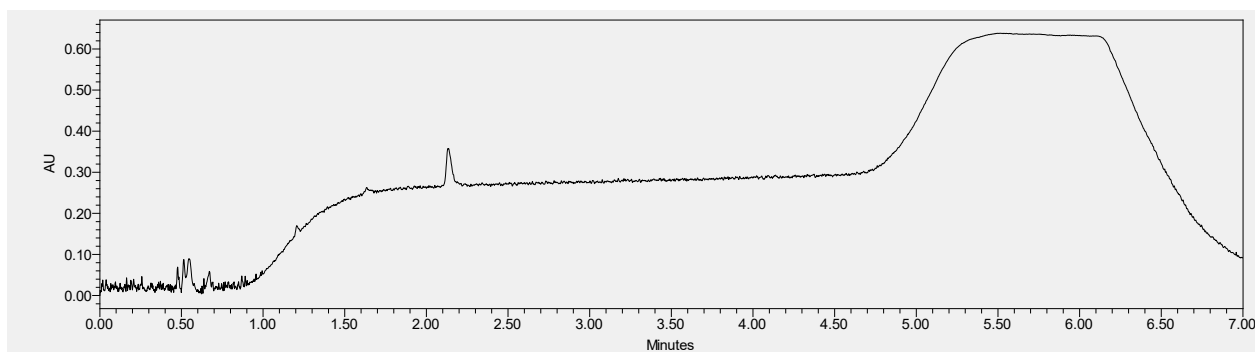


Abbildung 89: 4-PITC-NAC-Standard

PDA-MAXPlot (190-600 nm)

Inj.ID: 4365

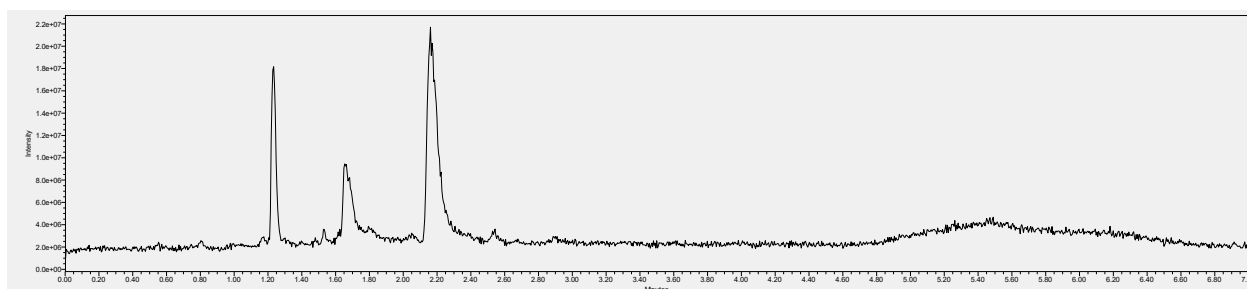


Abbildung 90: 4-PITC-NAC-Standard

Massenchromatogramm TIC-Plot (Positive Mode)

Inj.ID: 4365

Inj.ID: 4387

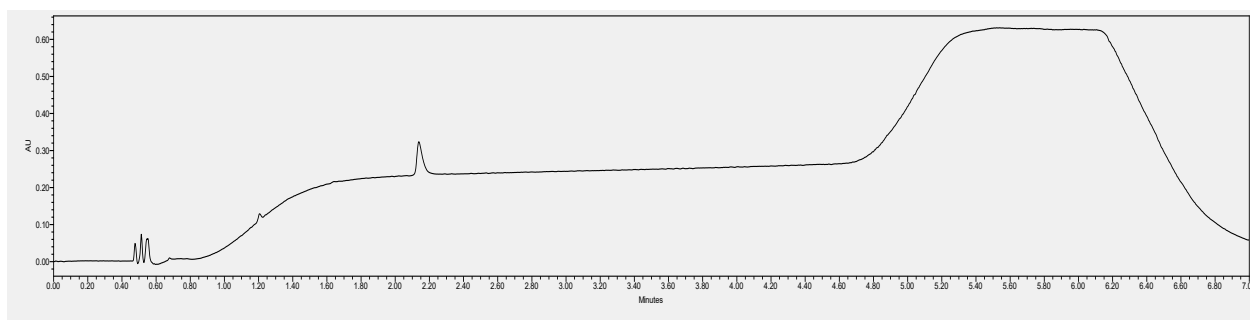


Abbildung 91: 4-PITC-NAC-Standard

PDA 210 nm

Inj.ID: 4387

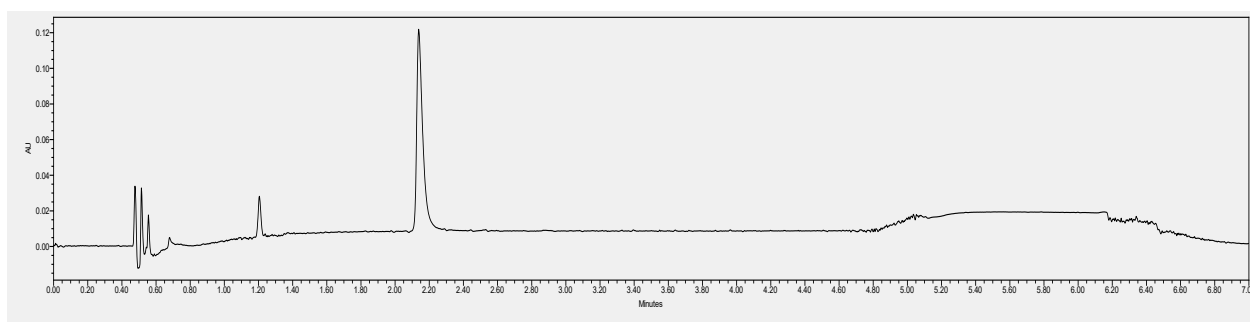


Abbildung 92: 4-PITC-NAC-Standard

PDA 245 nm

Inj.ID: 4387

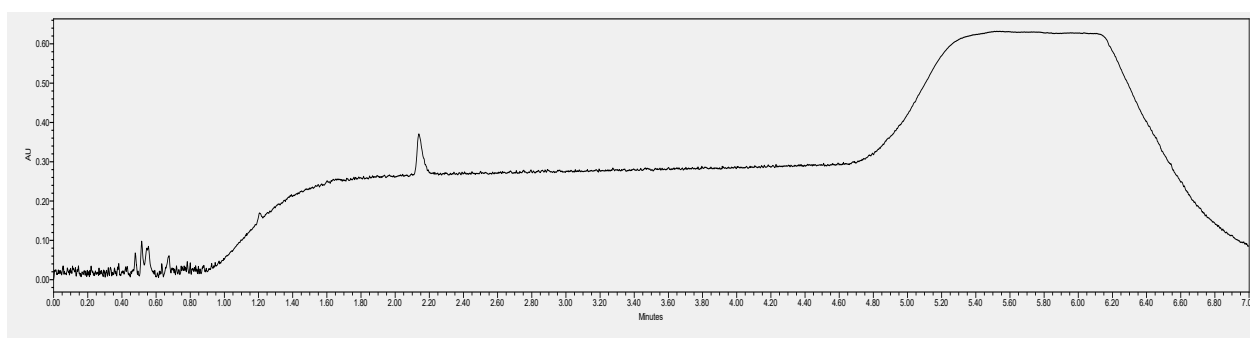


Abbildung 93: 4-PITC-NAC-Standard

PDA-MAXPlot (190-600 nm)

Inj.ID: 4387

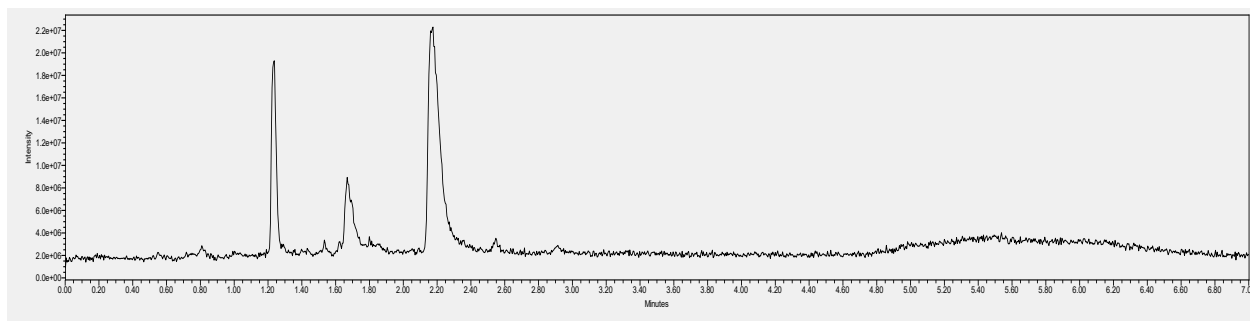


Abbildung 94: 4-PITC-NAC-Standard

Massenchromatogramm TIC-Plot (Positive Mode)

Inj.ID: 4387

Inj.ID: 4406

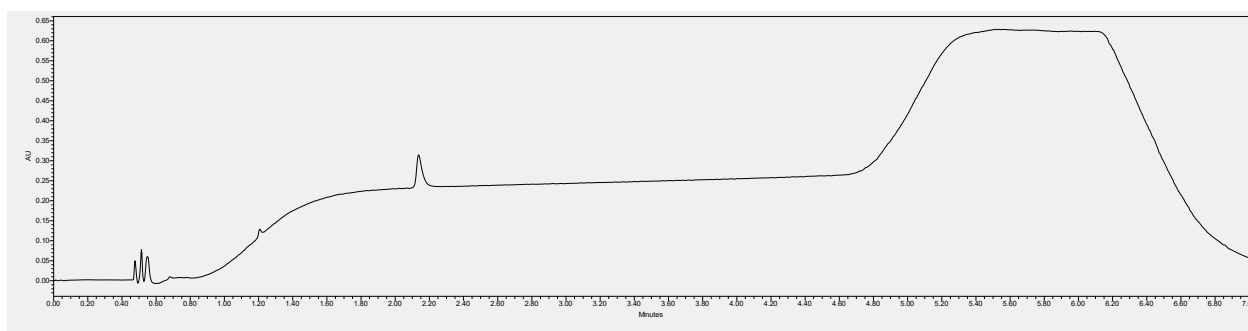


Abbildung 95: 4-PITC-NAC-Standard

PDA 210 nm

Inj.ID: 4406

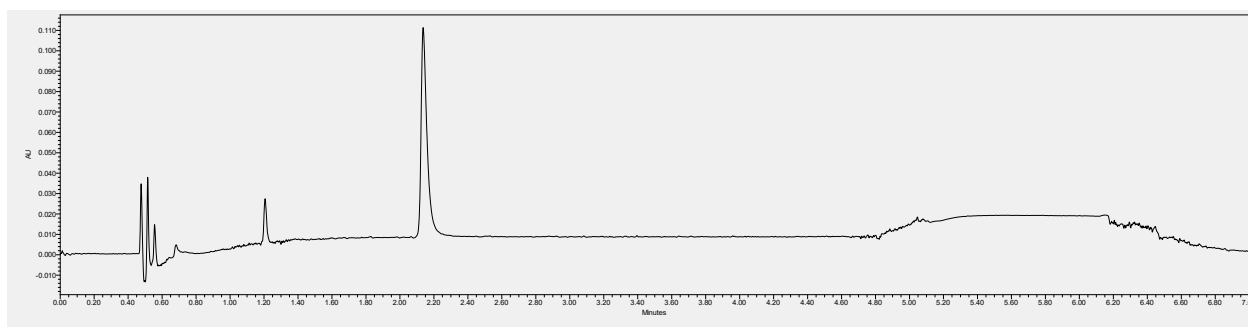


Abbildung 96: : 4-PITC-NAC-Standard

PDA 245 nm

Inj.ID: 4406

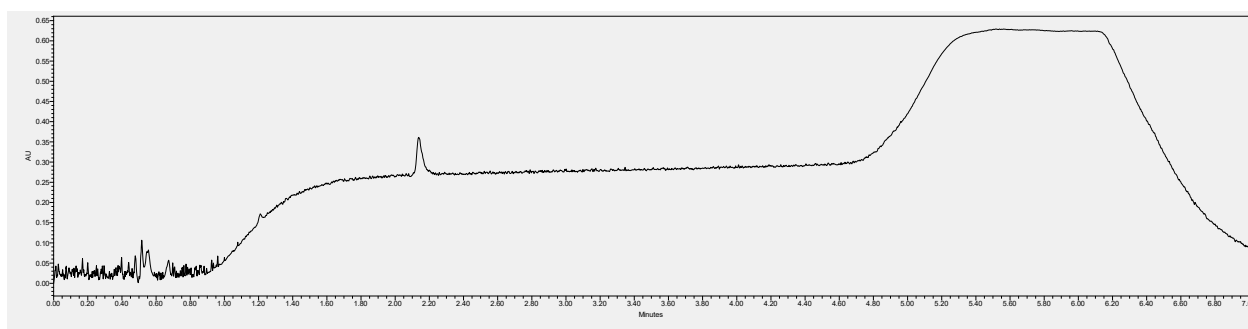


Abbildung 97: 4-PITC-NAC-Standard

PDA-MAXPlot (190-600 nm)

Inj.ID: 4406

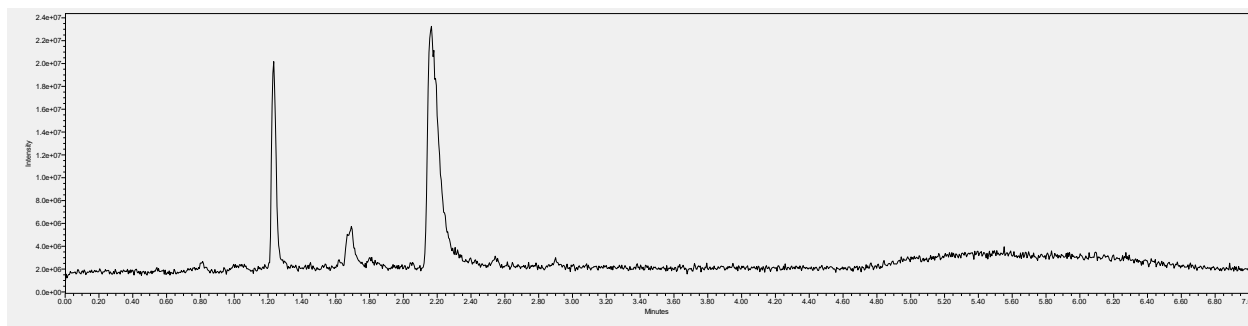


Abbildung 98: 4-PITC-NAC-Standard

Massenchromatogramm TIC-Plot (Positive Mode)

Inj.ID: 4406

Inj.ID: 4472

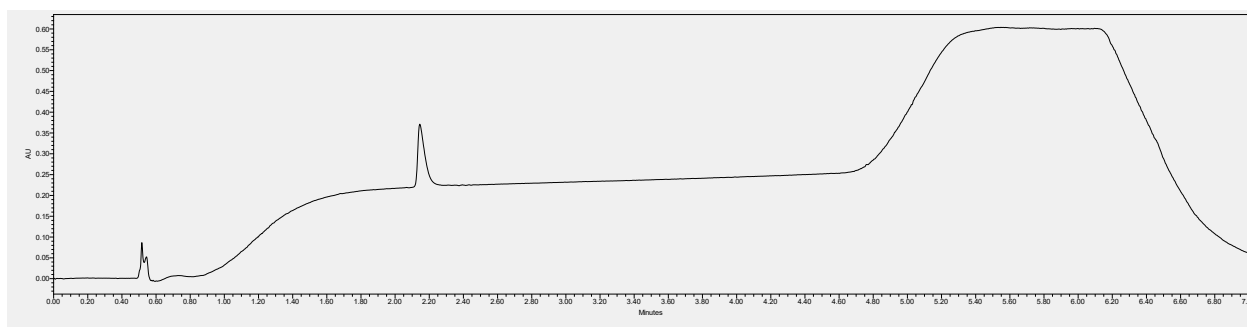


Abbildung 99: 4-PITC-NAC-Standard

PDA 210 nm

Inj.ID: 4472

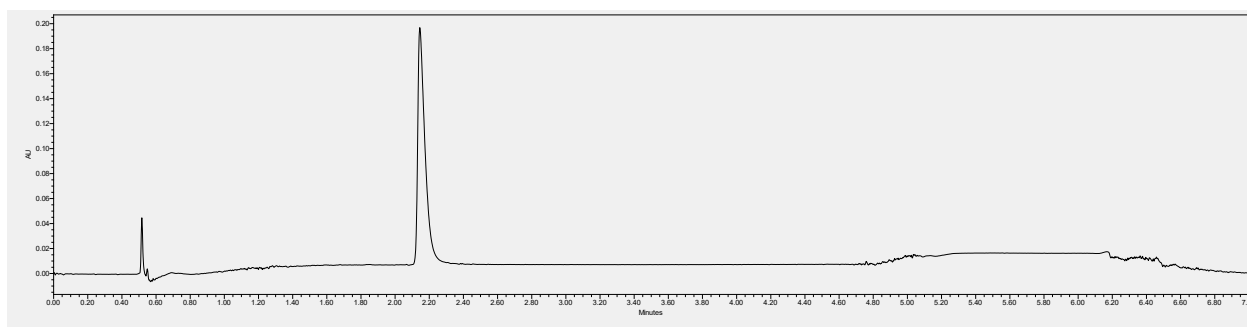


Abbildung 100: 4-PITC-NAC-Standard

PDA 245 nm

Inj.ID: 4472

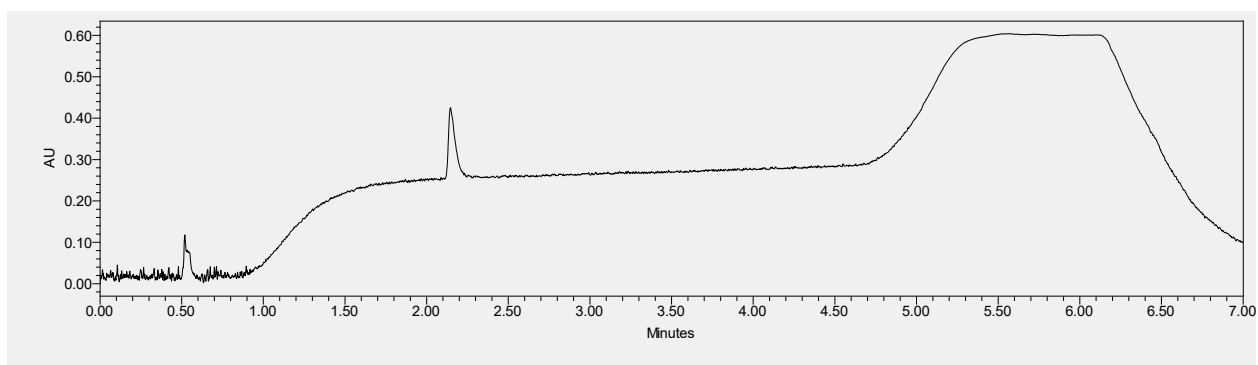


Abbildung 101: 4-PITC-NAC-Standard

PDA-MAXPlot (190-600 nm)

Inj.ID: 4472

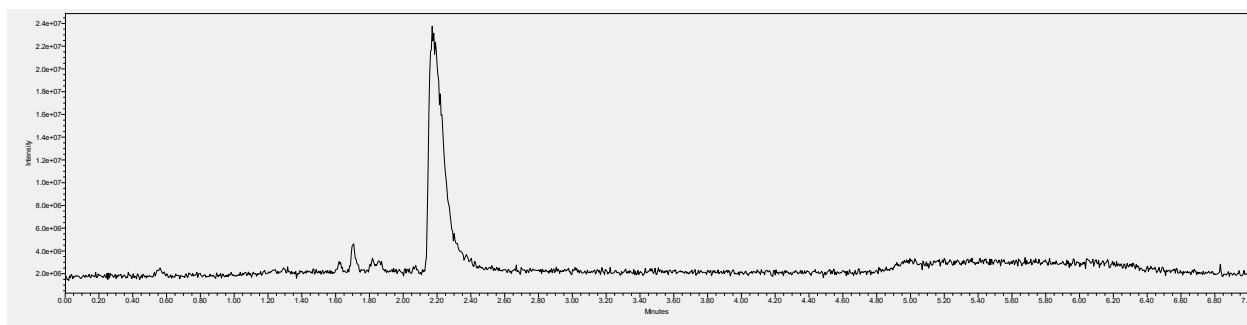
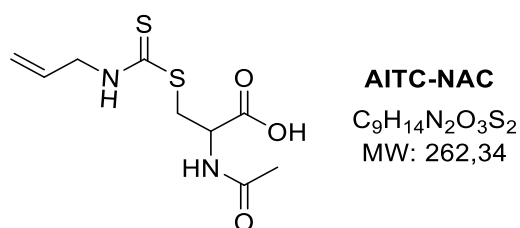


Abbildung 102: 4-PITC-NAC-Standard

Massenchromatogramm TIC-Plot (Positive Mode)

Inj.ID: 4472

AITC-NAC (Purity by NMR: 93%)



^1H NMR (500 MHz, MeOD) δ 5.90 (ddt, J = 17.1, 10.3, 5.8 Hz, 1H), 5.22 (dq, J = 17.2, 1.6 Hz, 1H), 5.15 (dq, J = 10.3, 1.4 Hz, 1H), 4.67 (dd, J = 8.6, 4.7 Hz, 1H), 4.37 – 4.23 (m, 2H), 3.97 (dd, J = 14.1, 4.7 Hz, 1H), 3.53 (dd, J = 14.1, 8.6 Hz, 1H), 1.96 (s, 3H).

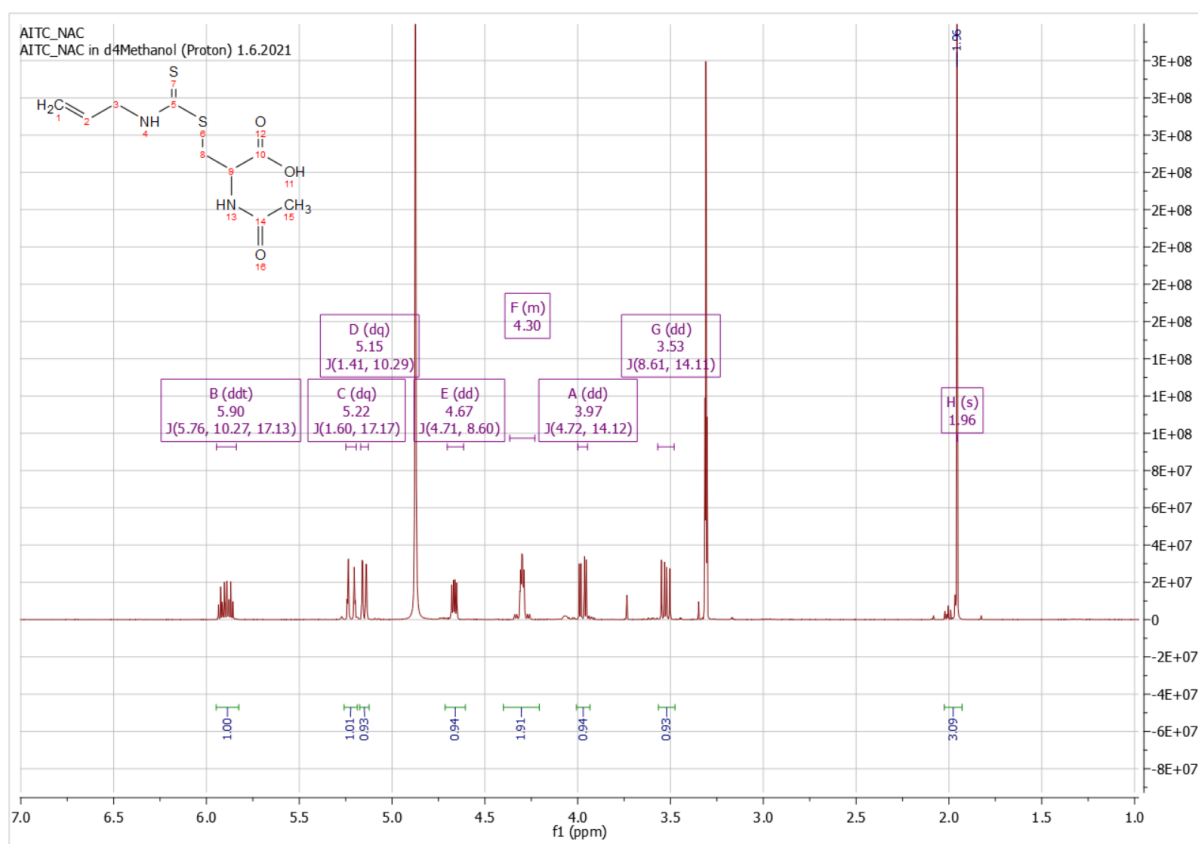
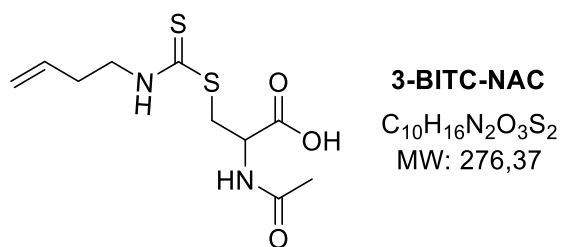


Abbildung 103: ^1H -NMR des selbst synthetisierten AITC-NAC-Standards

Literaturvergleich: Pilipczuk (2017)[6]

^1H NMR (500 MHz, CD₃OD): 1.98 (s, 3H, COCH₃), 3.59 (dd, JAB = 13.9 Hz, JBX = 8.0 Hz, 1H, CHB), 3.95 (dd, JAX = 5.0 Hz, JAB = 13.9 Hz, 1H, CHA), 4.32 (m, 2H, N-CH₂), 4.61 (br m, 1H, CHx), 5.17 (dd, J = 10.3 Hz, 1H, CH=CH₂ cis), 5.24 (d, J = 17.1 Hz, 1H, CH=CH₂ trans), 5.92 (m, 1H, CH=CH₂)

3-BITC-NAC (Purity by NMR: 94%)



^1H NMR (500 MHz, MeOD) δ 5.82 (ddt, $J = 17.1, 10.3, 6.8$ Hz, 1H), 5.10 (ddd, $J = 17.2, 3.4, 1.6$ Hz, 1H), 5.04 (ddd, $J = 10.3, 3.0, 1.2$ Hz, 1H), 4.66 (dd, $J = 8.7, 4.8$ Hz, 1H), 3.96 (dd, $J = 14.1, 4.8$ Hz, 1H), 3.78 – 3.65 (m, 2H), 3.51 (dd, $J = 14.1, 8.7$ Hz, 1H), 2.39 (qt, $J = 7.2, 1.3$ Hz, 2H), 1.96 (s, 3H).

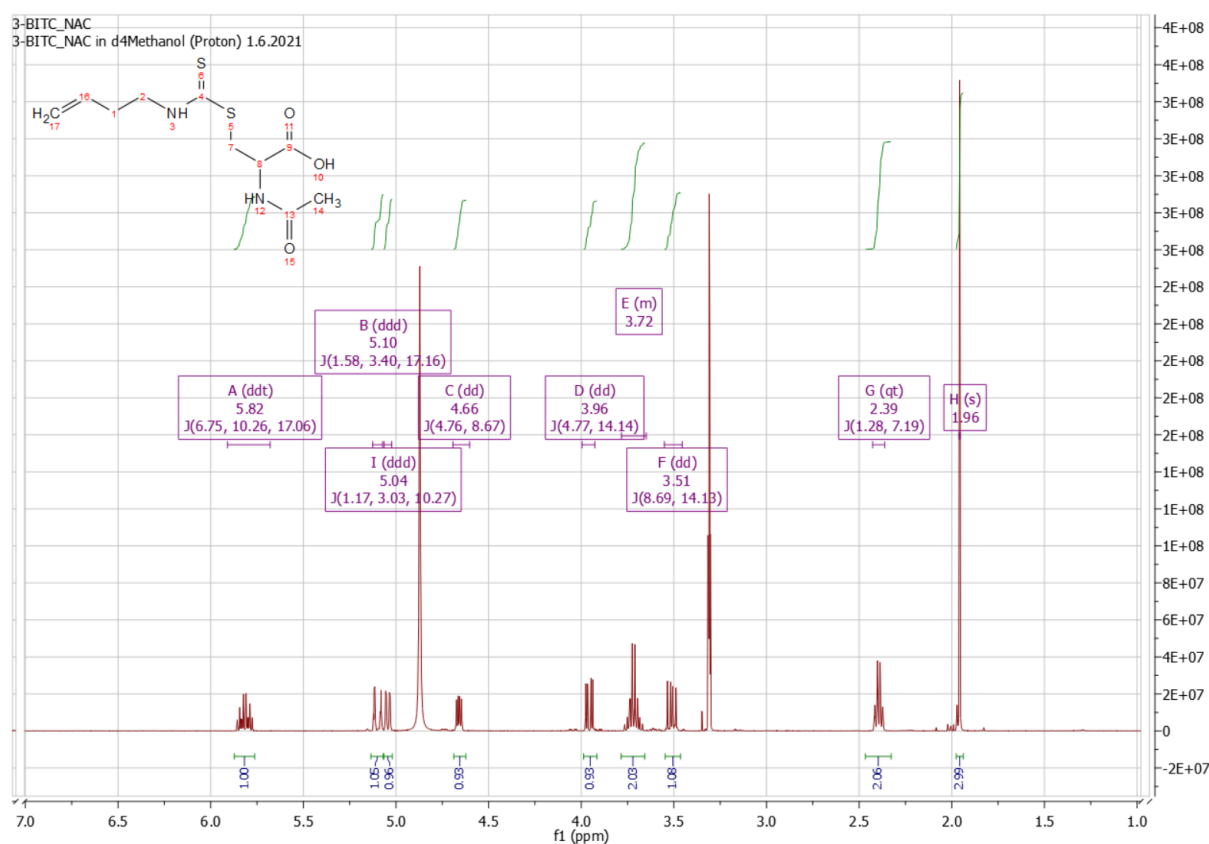
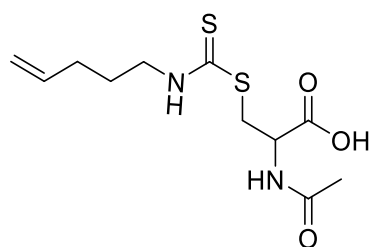


Abbildung 104: ^1H -NMR des selbst synthetisierten 3-BITC-NAC-Standards

Literaturvergleich: Vermeulen (2003)[20]

^1H NMR (100 MHz, DMSO- d_6) 1.82 (s, 3H, C(O)CH₃), 2.31 (m, 2H, NCCH₂), 3.28 (dd, 1H, JAB_/ 13.6 Hz, JBX_/9.2 Hz, CHB), 3.61 (m, 2H, NCH₂), 3.75 (dd, 1H, JAX_/5.1 Hz, CHA), 4.38 (m, 1H, CHX), 5.05 (dd, 2H, CH₂_/C), 5.78 (m, 1H, C_/CH), 8.31 (d, 1H, J_/8.0 Hz, OCNH), 10.03 (t, 1H, SCNH), 12.84 (s, 1H, OH)

4-PITC-NAC (Purity by NMR: 84%)



4-PITC-NAC

$C_{11}H_{18}N_2O_3S_2$
MW: 290,39600

^1H NMR (500 MHz, MeOD) δ 5.83 (ddt, $J = 17.0, 10.2, 6.7$ Hz, 1H), 5.05 (ddd, $J = 17.1, 3.5, 1.6$ Hz, 1H), 4.97 (ddt, $J = 10.2, 2.1, 1.2$ Hz, 1H), 4.64 (dd, $J = 8.5, 4.7$ Hz, 1H), 3.94 (dd, $J = 14.1, 4.7$ Hz, 1H), 3.75 – 3.60 (m, 2H), 3.53 (dd, $J = 14.1, 8.5$ Hz, 1H), 2.14 – 2.06 (m, 2H), 1.95 (s, 3H), 1.73 (p, $J = 7.3$ Hz, 2H).

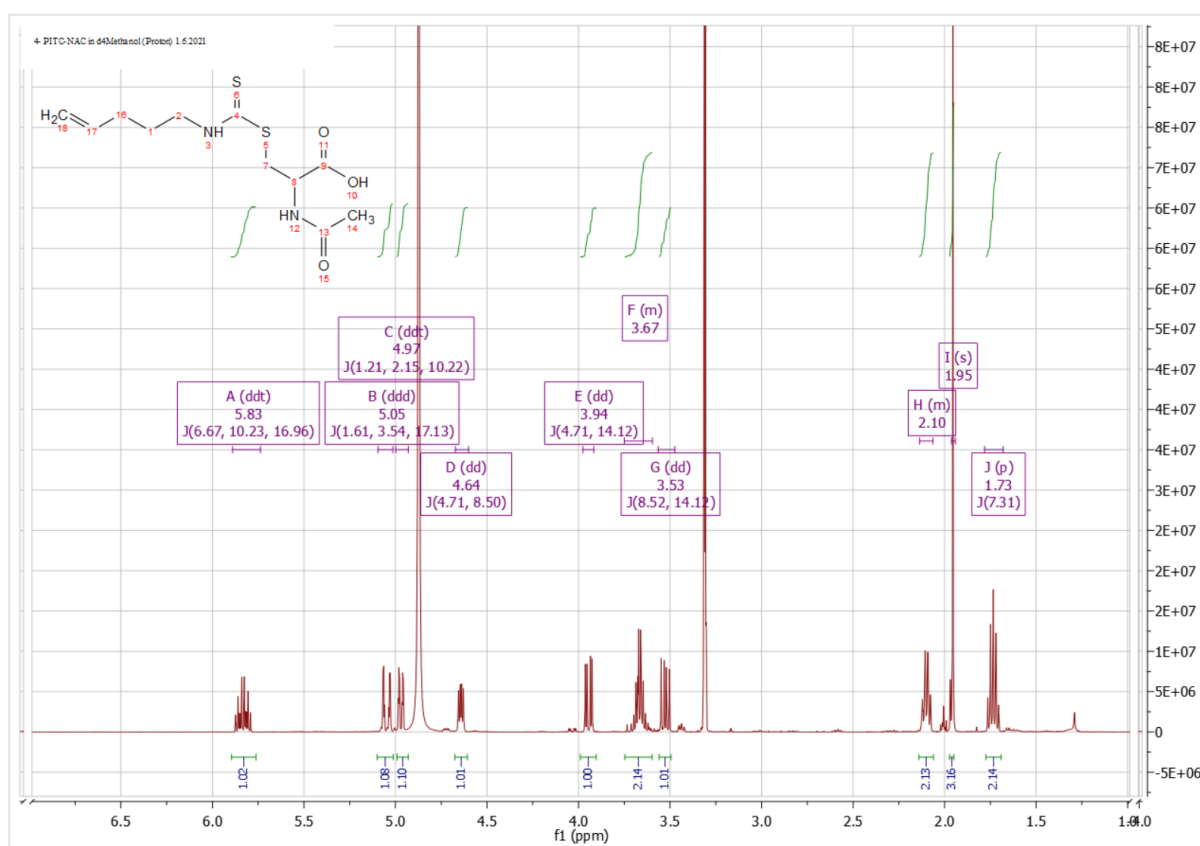


Abbildung 105: ^1H -NMR des selbst synthetisierten 4-PITC-NAC-Standards

Literaturvergleich: Vermeulen (2003)[20]

^1H NMR (100 MHz, DMSO- d_6) 1.66 (m, 2H, $NCCH_2$), 1.82 (s, 3H, $C(O)CH_3$), 2.03 (m, 2H, $NCCCH_2$), 3.28 (dd, 1H, $J_{AB}/13.6$ Hz, $J_{BX}/9.2$ Hz, CHB), 3.54 (m, 2H, NCH_2), 3.76 (dd, 1H, $J_{AX}/5.0$ Hz, CHA), 4.37 (m, 1H, CHX), 5.01 (dd, 2H, CH_2/C), 5.77 (m, 1H, $C_/CH$), 8.32 (d, 1H, $J_/8.1$ Hz, OCNH), 10.02 (t, 1H, SCNH), 12.85 (s, 1H, OH)