

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie der
Ludwig-Maximilians-Universität München



**Δ^7 -Sterole und Δ^7 -Sterolglykoside
aus Samen von *Cucurbita pepo* L.:
Isolierung und Strukturaufklärung**

von

Matthias Strobl

aus

Memmingen

2004

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4
der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998
von Prof. Dr. F. Bracher betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.



Matthias Strobl
München, 26. Januar 2004

Dissertation eingereicht am: 26. Januar 2004
1. Gutachter: Prof. Dr. F. Bracher
2. Gutachter: Prof. Dr. E. Reimann
Mündliche Prüfung am: 11. Februar 2004

„Ha, ha!“

Shakespeare W. *Hamlet* ~1601, Act III/1, Z. 120

Meinen Eltern gewidmet,
ohne die nichts von alldem
möglich gewesen wäre.

Danksagung

Förderung, Unterstützung, Motivation und tatkräftige Hilfe von vielerlei Seite haben es mir ermöglicht, diese Arbeit in den vergangenen drei Jahren entstehen zu lassen. Dafür danke ich allen, die auf solche oder andere Art und Weise zum schließlichen Gelingen beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Franz Bracher gebührt die Nennung an erster Stelle. Als ehemaliger HiWi in seinem Arbeitskreis hatte ich mich für die Doktorandenstelle beworben und – seiner Aussage nach – mit dem Wunsch nach einer analytisch-chemischen Aufgabenstellung „offene Türen eingerannt“. Diese Türen blieben mir stets geöffnet, und durch seine fachkundige Beratung und zahlreiche Denkanstöße wurde mir auch über die eine oder andere Schwelle geholfen.

Herrn Prof. Dr. Eberhard Reimann danke ich sehr herzlich für die bereitwillige Übernahme des Korreferats.

Meinem Laborkollegen, Herrn Dr. Jürgen Krauss, danke ich für den Rat des gewieften alten Hasen, den ich immer gebrauchen konnte; vor allem aber für seine außerordentliche Hilfsbereitschaft in allen Lebenslagen.

Dem NMR-Team schulde ich Dank für die viele Meßzeit, die für meine paarhundert Mikrogramm anderswo abgezwaht wurde. Außerdem freue ich mich, mit Holger Lerche die Rückkehr zur Kammermusik gefunden zu haben, auch wenn leider (bis jetzt!) viel zu wenig Zeit dafür blieb.

Herrn Dr. Samtleben danke herzlich ich für die Beratung in Fragen der Enzympräparation und für das bereitwillige Verleihen diverser Gerätschaften.

Besten Dank an die Herren Dr. Müller, Dr. Theurer und Dr. Kuhlmann sowie Frau Pfitzer von GSK Consumer Healthcare. Die Grundlage meiner Arbeit wurde durch diese Kooperation gelegt und durch Ihre Unterstützung gefestigt. Für meine Fragen fand ich bei Ihnen offene Ohren, und die finanzielle Förderung meiner Arbeit ermöglichte oder erleichterte manche Anschaffung.

Viele meiner zukünftigen Erinnerungen an C2.028 werden sich mit dem blonden Yuengling Wolfram Eisenreich verbinden, der mir nicht nur das Geheimnis der besten Flash preisgab, sondern auch zu meiner weltmännischen Reifung im Land der unbegrenzten Möglichkeiten beigetragen hat.

Ein herzlicher Dank ergeht an meine Kollegin Doris Unterreitmeier für unterhaltsame Arbeitstage und -abende. Weiter im dritten Stockwerk: Dort tagt die Kaffeerrunde der zahlreichen Rituale. Vielen Dank für Eure unermüdliche Hilfe bei der regelmäßigen Überwindung des Mittagslochs an Christine, Susanne, Matthias, Benny und Nouha.

Ungezählte Coffeinextrakte lassen mich auch in der Schuld von H-P Keiß stehen, mit dem mich neben dem Hang zu *latte macchiato* Notdienste, Alpenüberquerung und ausgiebiges, sinnloses Schwafeln verbinden. Eine Disziplin, die meisterlich auch beherrscht wird von den Kollegen Robert, Stelio und Rothäusè, die ebenfalls dazu beigetragen haben, daß dies hier nicht nur ein Job war.

Mein besonderer Dank gilt natürlich Frank Dombeck, der mich mit seinem enzyklopädischen Wissen und seiner großen Erfahrung oft einen Schritt weitergebracht hat. Und außerdem, Frankman, bist Du einfach ein Wahnsinnstyp.

Durch den PDM kam ich in Kontakt mit den Kollegen Tobi, Elvis und Leiki (Du – subber Sache!) aus Haus B, eine Bereicherung in jeder Hinsicht. Heute wäre schon beinahe keine Doktorfeier mehr ohne den Verein denkbar. Wo stehen wir in zwanzig Jahren?

Vielen Dank zu guter Letzt auch an das Apotheken-Team. Das Leben ist halt nicht nur Wissenschaft, und hier habe ich eine gute Portion vom ganzen Rest mitbekommen. Ganz besonders danke ich Alex für seine Großzügigkeit und für seine Art, der Chef zu sein. Da kann jeder noch viel lernen. Roger, dafür, daß Du mein ältester Freund bist. Rita – ohne Dich wäre es einfach nicht das gleiche, ääh ... selbe. Oder was? Und natürlich Annie, einfach für alles.

INHALTSVERZEICHNIS

ALLGEMEINER TEIL

1	<u>EINFÜHRUNG</u>	1
1.1	DER ARZNEIKÜRBIS <i>CUCURBITA PEPO</i> IN DER PHYTOTHERAPIE	1
1.2	BENIGNE PROSTATAHYPERPLASIE	1
1.2.1	Pathogenese und Symptomatik	1
1.2.2	Medikamentöse Therapie	3
1.2.3	Phytotherapie der BPH	5
1.2.3.1	Hypoxis rooperi	6
1.2.3.2	Sägepalmenfrüchte	6
1.2.3.3	Brennesselwurzel	7
1.2.3.4	Roggenpollenextrakt	7
1.2.3.5	Kürbissamen	8
1.3	INHALTSSTOFFE VON KÜRBISSAMEN	10
1.3.1	Literaturübersicht	10
1.3.2	Vorkommen von Δ^7 -Sterolen	12
1.3.3	Sterole: Nomenklatur	12
1.4	ZIEL DER ARBEIT	17
2	<u>ISOLIERUNG UND AUFKLÄRUNG DER STRUKTUREN VON STEROLAGLYKA</u>	20
2.1	ISOLIERUNG FREIER STEROLE AUS KÜRBISSAMENEXTRAKT	20
2.2	CHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG	24
2.3	STRUKTURAUFKLÄRUNG	27
2.4	BIOSYNTHESE VON STEROLEN IN PFLANZEN	36
3	<u>ISOLIERUNG UND AUFKLÄRUNG DER STRUKTUREN VON STEROLGLYKOSIDEN</u>	38
3.1	SYNTHESE EINER MODELLSUBSTANZ	38

3.2	GRUNDLAGEN DER HPLC-MS UND MS/MS-EXPERIMENTE	44
3.2.1	ESI	45
3.2.2	APCI	46
3.2.3	Curtain Gas Interface	46
3.2.4	MS/MS-Experimente	47
3.3	METHODENENTWICKLUNG MIT DER MODELLSUBSTANZ	49
3.3.1	HPLC-Trennung	49
3.3.2	Kalibrierung des MS-Systems	49
3.3.3	Ionisierung und Fragmentierung der Sterolglykoside	50
3.4	ISOLIERUNG VON STEROLGLYKOSIDEN	53
3.5	STRUKTURAUFKLÄRUNG DER STEROLGLYKOSIDE	55
3.5.1	Untersuchung von Sterolglykosiden mit HPLC-APCI-MS(/MS)	55
3.5.2	Problemstellung	58
3.5.3	Enzymatische Hydrolyse mit Glucosidasen	58
3.5.3.1	Festphasenextraktion von Sterolaglyka	59
3.5.3.2	Versuche mit β -Glucosidase aus Mandeln (Emulsin)	59
3.5.3.3	Versuche mit Glucosidase aus <i>Aspergillus niger</i>	60
3.5.3.4	Versuche mit 4-Nitrophenylglucosid als Substrat	60
3.5.3.5	Isolierung einer Steryl- β -D-glucosidase	61
3.5.3.6	Enzymatische Hydrolyse extrahierter Kürbisterolglucoside mit Steryl- β -D-glucosidase	63
3.5.4	Aufklärung der Strukturen der Aglyka	63
3.5.5	Aufklärung von Struktur und Verknüpfung des Zuckeranteils	64
<u>4</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>68</u>
<u>5</u>	<u>EXPERIMENTELLER TEIL</u>	<u>71</u>
5.1	ALLGEMEINE ANGABEN	71
5.2	ANGABEN ZUM EXTRAKT	71
5.3	METHODEN, GERÄTE UND PARAMETER	72
5.3.1	Dünnschichtchromatographie	72
5.3.2	Analytische HPLC	72
5.3.3	Präparative HPLC	73
5.3.4	HPLC-MS/MS	73
5.3.5	GC-MS	75
5.3.6	NMR	76

5.3.7	Sonstige Geräte	77
5.3.8	Verbrauchsmaterial	77
5.4	ARBEITSVORSCHRIFTEN	78
5.4.1	Isolierung freier Sterole aus <i>C. pepo</i>	78
5.4.2	Synthese von α - und β -Cholesterylglucosid	79
5.4.3	Isolierung von Sterolglykosiden	80
5.4.4	Isolierung einer Sterol- β -D-glucosidase aus <i>Sinapis alba</i>	82
5.4.5	Enzymatische Spaltung von 4-Nitrophenylglucosid	83
5.4.6	Enzymatische Spaltung von Δ^7 -Sterol- β -D-glucosiden	83
5.4.7	Festphasenextraktion von Sterolen aus alkoholisch-wässriger Lösung	83
5.4.8	Untersuchung sterolhaltiger Proben mit GC-MS	84
5.4.9	Untersuchung von Proben mit HPLC-MS	84
5.5	DATENBLÄTTER	85
5.5.1	Δ^7 -Sterole	85
5.5.1.1	(22 <i>E</i>)-(24 <i>S</i>)-Ethyl-5 α -cholesta-7,22-dien-3 β -ol (3A)	86
5.5.1.2	(24 <i>S</i>)-Ethyl-5 α -cholesta-7,25-dien-3 β -ol (4A)	88
5.5.1.3	(22 <i>E</i>)-(24 <i>S</i>)-Ethyl-5 α -cholesta-7,22,25-trien-3 β -ol (5A)	90
5.5.1.4	(24 <i>Z</i>)-Ethyl-5 α -cholesta-7,24(24 ¹)-dien-3 β -ol (1)	92
5.5.1.5	(24 <i>R</i>)-Ethyl-5 α -cholest-7-en-3 β -ol (2A)	94
5.5.2	Weitere Inhaltsstoffe des Unverseifbaren Anteils	95
5.5.2.1	Squalen	95
5.5.2.2	γ -Tocopherol	96
5.5.3	Synthetisierte Sterolglucoside	97
5.5.3.1	Cholesteryl- α -D-tetra-O-acetylglucopyranosid (6A)	98
5.5.3.2	Cholesteryl- β -D-tetra-O-acetylglucopyranosid (6B)	100
5.5.3.3	Cholesteryl- α -D-glucopyranosid (10A)	102
5.5.3.4	Cholesteryl- β -D-glucopyranosid (10B)	104
5.5.4	Isolierte Sterolglucoside	106
5.5.4.1	(22 <i>E</i>)-(24 <i>S</i>)-Ethyl-5 α -cholesta-7,22-dien-3 β -yl- β -D-glucopyranosid (3B)	106
5.5.4.2	(24 <i>S</i>)-Ethyl-5 α -cholesta-7,25-dien-3 β -yl- β -D-glucopyranosid (4B)	108
5.5.4.3	(22 <i>E</i>)-(24 <i>S</i>)-Ethyl-5 α -cholesta-7,22,25-trien-3 β -yl- β -D-glucopyranosid (5B)	110
5.5.4.4	(24 <i>R</i>)-Ethyl-5 α -cholest-7-en-3 β -yl- β -D-glucopyranosid (2B)	112
6	ANHANG	114
6.1	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN	114
6.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	116
6.3	LITERATURVERZEICHNIS	118

ALLGEMEINER TEIL

1 EINFÜHRUNG

1.1 DER ARZNEIKÜRBIS *CUCURBITA PEPO* IN DER PHYTOTHERAPIE

Bereits in der Antike wurden die Samen verschiedener Kürbisarten als Heilmittel erwähnt, so bei Galenus, Hippokrates, Plinius und Dioskurides (in Form von Umschlägen bei Ödemen). Später kam die Verwendung bei Nierenentzündung, Schwindsucht oder als Wundheilungsmittel hinzu. 1820 wurde erstmals die Anwendung als Bandwurmmittel beschrieben – über die Wirksamkeit existieren widersprüchliche Berichte. Heute sind Präparate aus den Samen des Arzneikürbis als Mittel zur Behandlung der Reizblase und vor allem der Benigen Prostatahyperplasie (BPH) indiziert.

Auf die anatomisch-physiologischen Grundlagen dieser Erkrankung sowie ihre Therapie soll im folgenden, unter besonderer Berücksichtigung von Kürbissamen und deren Inhaltsstoffen, eingegangen werden.

1.2 BENIGNE PROSTATAHYPERPLASIE

1.2.1 Pathogenese und Symptomatik

Die Prostata ist Teil des männlichen Geschlechtsapparats und besteht aus Drüsen-, Muskel- und Bindegewebe. Sie umschließt die hintere Harnröhre (Urethra) und wiegt ca. 20-30 g. Über die Physiologie der Prostata liegen nur wenige wissenschaftliche Erkenntnisse vor. Neben der Mitwirkung beim Verschluss des Blasenhalses erfüllt sie als Drüse exokrine Funktionen bei der Ejakulation. Als enzymatisches Sekretionsprodukt wirkt PSA (prostataspezifisches Antigen) aktivierend auf die Spermienmotilität, indem das gelartige Ejakulat verflüssigt wird. Dieser Vorgang ist entscheidend für die Lebensfähigkeit der Spermien und damit für die Fertilität. In der medizinischen Diagnostik wird PSA als organspezifischer Marker verwendet.

Bestimmte Zellen im periurethralen Drüsengewebe neigen zur Ausbildung einer adenomatösen Hyperplasie. Ab dem 40. Lebensjahr kommt es zu Strukturveränderungen, die schnell fortschreiten und zur makroskopischen Vergrößerung der Prostata führen können. Diverse Studien ermitteln bei 60 % aller Männer im Alter von 60 Jahren eine klinisch signifikante BPH¹.

Die Vergrößerung der Prostata führt zu einer Einengung der Harnröhre, welche für den Patienten irritative und obstruktive Miktionsbeschwerden mit sich bringt. Dieser „statischen Komponente“ ist eine Kongestion durch ödematöse Stromaverquellung, Sekret-

stau in den Drüsen sowie Hyperämie überlagert, die zusammen mit dem Tonus der glatten Muskulatur in Prostata und Blasenhalsh ebenfalls Einfluß auf das Ausmaß der Obstruktion hat („dynamische Komponente“). Es muß betont werden, daß dabei keine direkte Korrelation zwischen Größe der Prostata und Intensität der Beschwerden besteht.

Die Beschwerden werden in neueren Studien als *lower urinary tract symptoms* (LUTS) erfaßt und nach dem *international prostate symptom score* (IPSS) bewertet. Dieser „Goldstandard“ wurde 1993 vom *International Consensus Committee on BPH* vorgeschlagen und basiert auf Patientenäußerungen anhand eines standardisierten Fragebogens². Neben der Erfassung und Bewertung der Symptome spielt die Beurteilung der Beeinträchtigung seiner Lebensqualität (QOL, *quality of life*) durch den Patienten eine zunehmende Rolle. Auf dieser Basis ist in gewissen Grenzen ein direkter Vergleich klinischer Studien zu unterschiedlichen Therapieformen möglich.

Neben der Erfassung subjektiver Symptome werden in der Diagnostik objektive, meßbare Parameter ausgewertet. Einen Überblick gibt Abb. 1-1.

Subjektive Symptome

obstruktiv

Startverzögerung

Harnstrahlabschwächung

Harnstrahlunterbrechung

Nachtröpfeln

Restharngefühl

irritativ

imperativer Harndrang

Pollakisurie

Nykturie

Harninkontinenz

Objektive Parameter

tastbare Vergrößerung der Prostata

Reduktion der Harnflußrate (maximaler und mittlerer Flow)

Hämaturie

meßbarer Restharn

Verdickung der Blasenwand

Blasensteine

Dilatation der oberen Harnwege

chronische und rezidivierende Harnwegsinfekte

Niereninsuffizienz

Abb. 1-1: Subjektive und objektive Symptome bei Patienten mit BPH.

Anhand der Befunde wird die BPH nach *Alken*³ in drei Stadien eingeteilt. In Stadium I (Reizstadium) ist eine Behandlung gewöhnlich nicht erforderlich. Stadium II (Restharnstadium) legt eine medikamentöse Therapie nahe, wobei hier überwiegend 5 α -Reduktasehemmer oder α -Adrenozeptorenblocker eingesetzt werden. Versagen diese medikamentösen Therapieoptionen, so ist wie in Stadium III ein operativer Eingriff indiziert. Die Therapie mit Phytopharmaka empfiehlt sich vor allem bei Patienten im Stadium I mit hohem subjektivem Leidensdruck bzw. adjuvant in Stadium II.

Stadium	Befund	OP-Indikation
I	Reizstadium Dysurie, obstruktive/irritative Miktionsbeschwerden, vollständige Blasenentleerung	keine
II	Restharnstadium Restharn > 50 ml, Detrusorhypertrophie	fakultativ
III	Dekompensation Überlaufblase, akuter Harnverhalt, Harnstauung, Niereninsuffizienz	obligat

Abb. 1-2: Stadieneinteilung der BPH

1.2.2 Medikamentöse Therapie

Das Wachstum der Prostata im fortgeschrittenen Alter wird durch eine Änderung des Hormonstatus ausgelöst. Die Testosteron-Plasmakonzentration nimmt aufgrund geringerer Synthese im Hoden und verstärkter Umwandlung in Östrogene graduell ab, während die Konzentration an Dihydrotestosteron (DHT) etwa gleich bleibt (siehe auch Abb. 1-3). Der Östrogen/Androgen-Quotient nimmt folglich zu, was zu einer erhöhten Ausschüttung von Sexualhormonbindendem Globulin (SBHG) führt. Da Östrogene eine höhere Affinität zu diesem besitzen als Androgene, steigt der Quotient weiter an.

Testosteron stellt dabei für die Prostata nur ein Pro-Hormon dar. Durch 5 α -Reduktase wird im Zytoplasma der Prostatazelle die Reduktion zu DHT katalysiert (Abb. 1-3), welches das androgene Signal vermittelt.

Während das Wachstum des Drüsengewebes vor allem unter dem Einfluß von DHT steht, werden Östrogene mit einer Stimulation des Wachstums von Stromazellen in Verbindung gebracht. Behandlung der BPH mit Aromatasehemmern⁴ brachte allerdings trotz Senkung des Östrogen/Androgen-Quotienten und Volumenreduktion der Prostata keine Verbesserung der Symptome oder klinischer Parameter.

Hingegen führt die Behandlung mit dem 5 α -Reduktasehemmer Finasterid zu einer deutlichen Volumenreduktion der Prostata, einer Zunahme der mittleren maximalen

Harnflußrate sowie zur signifikanten Besserung subjektiver Symptome⁵. Die Wirkung beruht auf der Hemmung der Umwandlung von Testosteron zu DHT, welches mit 3- bis 10-fach höherer Affinität als Testosteron an den Androgenrezeptor der Prostatazellen bindet⁶ und deren Wachstum stimuliert. Eine relevante Besserung tritt allerdings nur bei weniger als 50 % aller therapierten Männer ein, wobei der Erfolg erst nach sechsmonatiger Einnahme abgeschätzt werden kann. Eine Vorhersage, welche Patienten auf die Finasterid-Therapie ansprechen, ist nicht möglich. Da ein Absetzen der Medikation zu erneutem Prostatawachstum führt, ist eine Langzeittherapie erforderlich. Vor dem Hintergrund der Nebenwirkungen (Libido-, Potenz- und Ejakulationsstörungen, Häufigkeit ca. 5 %) ist eine Therapie deshalb nur bei deutlich vergrößerter Prostata sinnvoll. Die Wahrscheinlichkeit einer Prostataoperation wird dabei um 55 % verringert⁷.

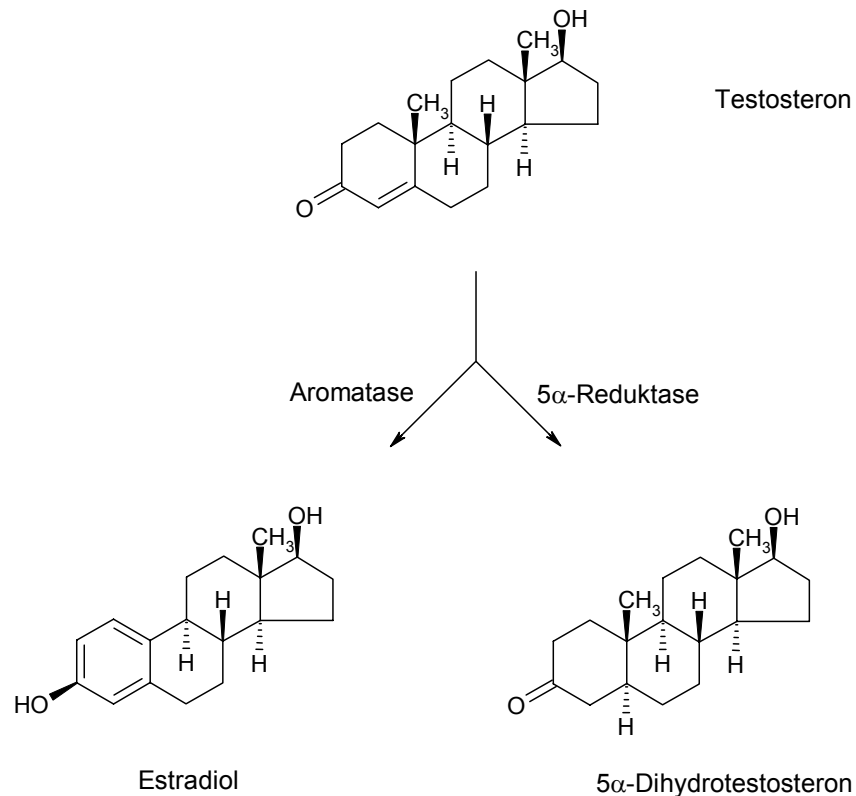


Abb. 1-3: Metabolisierung von Testosteron

Ein weiterer Therapieansatz ist die Senkung des Tonus der glatten Muskulatur in der Prostata. Diese bewirkt eine Absenkung des Widerstands im Bereich der prostatistischen Harnröhre und damit eine erleichterte Miktion.

Der Tonus der glatten Muskulatur der Prostata wird über α -Rezeptoren gesteuert. Eine Stimulation postsynaptischer α_1 -Rezeptoren durch Noradrenalin führt zur Tonussteigerung und damit zur Kontraktion. Gleichzeitig vermittelt die Stimulation

präsynaptischer α_2 -Rezeptoren, in der Art eines Regelkreises, eine Verminderung der Noradrenalinausschüttung.

α -Adrenozeptorenblocker, die ursprünglich aus dem Indikationsgebiet Hypertonie stammen, vermitteln folglich eine Relaxation der Muskulatur in Blasenhalshals und Prostata. Die ersten eingesetzten Substanzen erzeugten dabei als nicht-selektive α_1/α_2 -Rezeptorenblocker Nebenwirkungen (Tachykardie, Benommenheit, orthostatische Störungen) durch die Unterbrechung des lokalen Regelkreises und gesteigerte Noradrenalin-freisetzung.

Neuere, selektive α_1 -Adrenozeptorenblocker wie Terazosin, Doxazosin und Prazosin (ebenfalls aus der Bluthochdrucktherapie) verursachen diese unerwünschten Wirkungen in deutlich geringerem Ausmaß. Hier kann dennoch zu Behandlungsbeginn Blutdruckabfall mit Schwindel, Müdigkeit und Herzklopfen auftreten. Deshalb wurde nach „uro-selektiven“ α_1 -Adrenozeptorenblockern gesucht. Mit Alfuzosin und Tamsulosin stehen zwei Wirkstoffe zur Verfügung, die diesen Anspruch erfüllen sollen und deutlich seltener zum Auftreten vasodilatatorisch bedingter Nebenwirkungen führen.

Die Wirkung von Adrenozeptorenblockern setzt bereits nach kurzer Zeit ein; über Langzeitbehandlungen liegen inzwischen ausreichende Erkenntnisse vor. Indiziert sind sie, solange keine Verschlechterung der objektiven Befunde eintritt. Eine regelmäßige urologische Kontrolle ist erforderlich, damit ggf. eine operative Behandlung rechtzeitig eingeleitet werden kann. Da durch α -Rezeptorenblocker eine Volumenreduktion der Prostata nicht bewirkt wird, ist die Therapie nicht indiziert bei überwiegend *mechanisch* obstruierenden Hyperplasien.

1.2.3 Phytotherapie der BPH

Für die Behandlung moderater Beschwerden in den frühen Stadien der BPH steht eine Reihe von Phytopharmaka zur Verfügung. Diese stellen bei günstigen Therapiekosten und weitestgehender Vermeidung unerwünschter Nebenwirkungen⁸ eine „natürliche“ Alternative dar, die eine deutliche Besserung der Miktions-symptomatik bewirken kann. Dabei ist – wie übrigens auch bei der Therapie mit synthetischen Wirkstoffen – der Placeboeffekt allerdings nicht zu unterschätzen.

Dennoch ist auch durch klinische Studien nach international anerkannten Kriterien die Wirksamkeit von Phytopharmaka bei der Behandlung der BPH erwiesen. Die Grenzen dieser Behandlung müssen jedoch richtig eingeschätzt werden. Phytopharmaka können eine BPH nicht rückgängig machen. Eine echte Hemmung des Prostatawachstums oder eine Reduktion des Drüsenvolumens findet nicht statt. Im Vordergrund der Phytotherapie steht eine spürbare subjektive Erhöhung der Lebensqualität für den Patienten. Insbesondere phytosterolhaltige Präparate zeigen deutliche Verbesserung von IPSS und QOL – z. B. Extrakte aus Sägepalmenfrüchten (*Serenoa repens*, Syn.: *Sabal ser-*

mulata)^{2,9,10,11,12} und Präparate aus den Samen des Arzneikürbis^{13,14,15} – weswegen pflanzliche Prostatamittel eine eindeutige Berechtigung in der Therapie haben.

Ein objektiver Vergleich der Präparate ist schwierig, da sie komplexe Stoffgemische darstellen, deren Zusammensetzung natürlichen Schwankungen unterliegt und zudem sehr stark von der Methode der Extraktbereitung abhängt. In den meisten Fällen sind die für den therapeutischen Effekt verantwortlichen Inhaltsstoffe und die Wirkprinzipien nicht bekannt. Als sicherster Qualitätsnachweis gilt deshalb der Beleg der Wirksamkeit in randomisierten, plazebokontrollierten Doppelblindstudien mit ausreichender Probandenzahl, langer Studiendauer und Nachbeobachtungsphase sowie der Beurteilung der subjektiven und objektiven Erfolgsparameter anhand eines validierten Scoresystems (z. B. IPSS).

Im folgenden soll eine Übersicht über die wichtigsten BPH-Phytopharmaka gegeben werden. Neben den vier von der Kommission E positiv monographierten Drogen (Sägepalmenfrüchte, Brennesselwurzel, Roggenpollen, Kürbissamen) besitzen nur noch „Phytosterol“-Präparate Bedeutung. Im Handel sind dabei immer weniger Kombinationspräparate zu finden. Die Tagesdosis wird zunehmend häufiger in einer einzigen Tablette oder Kapsel verabreicht, was die Compliance verbessert.

1.2.3.1 *Hypoxis rooperi*

Wurzelknollen der Kafferntulpe (Syn.: afrikanischer Milchstern)

Auszüge aus *Hypoxis rooperi* enthalten ein Gemisch verschiedener Phytosterole (Hauptkomponente β -Sitosterol, daneben dessen 3-O-Glucosid und die Sterole Campesterol, Sitostanol und Ergosterol).

Zahlreiche Studien konnten bis heute weder den Wirkmechanismus noch den für die Wirksamkeit verantwortlichen Inhaltsstoff zweifelsfrei ermitteln. Neueren Hypothesen zufolge soll β -Sitosterol- β -D-glucosid die aktive Wirkkomponente des Handelpräparates Harzol[®] sein. Dieses ist in jeder Kapsel in einer Menge von 0,1 mg enthalten. Gegenüber Plazebo konnte jedoch in einer über sechs Monate laufenden Doppelblindstudie keine Überlegenheit hinsichtlich urodynamischer Kriterien nachgewiesen werden¹⁶. In zwei neuen Doppelblindstudien mit Harzol[®] und Azuprostat[®], die den aktuellen Anforderungen der WHO für Therapiestudien weitgehend genügen, wurde eine signifikante Besserung subjektiver und objektiver Parameter belegt. Eine Reduktion des Prostatavolumens trat erwartungsgemäß nicht auf^{17,18}.

1.2.3.2 Sägepalmenfrüchte

Sabal fructus, Früchte der Säge- oder Zwergpalme (*Serenoa repens*, Syn.: *Sabal serrulata*), sowie deren Zubereitungen in wirksamer Dosierung.

Die Droge enthält fettes Öl mit Phytosterolen und Polysaccharide.

Extraktgewinnung: Die Kommission E sieht für die Gewinnung des „lipophilen Extrakts“ die Lösungsmittel Hexan und Ethanol (90 % v/v) vor. Hexanextrakte haben aufgrund der höheren Lipophilie des Extraktionsmittels einen höheren Phytosterolgehalt. Polysaccharide sind in den lipophilen Extrakten nicht enthalten. Der lipophile Extrakt in Talso[®] zeigt im Vergleich zu Plazebo eine signifikante Abnahme des Restharnvolumens und der Zahl der Nykturien¹⁹. Eine Reduktion des Prostatavolumens war nicht zu beobachten. Der Hexanextrakt Permixon[®] (in Deutschland nicht erhältlich) zeigte bezüglich IPSS und Uroflow vergleichbare Resultate wie Finasterid. Prostatavolumen und PSA-Wert wurden jedoch nicht verringert⁹. In-vitro-Experimente beschreiben für den Hexanextrakt eine Hemmung der 5 α -Reduktase²⁰, allerdings mit klinisch irrelevanten IC₅₀-Werten (siehe Seite 8f). Der mit hyperkritischem Kohlendioxid gewonnene Extrakt (Talso[®]) hemmt darüber hinaus Cyclooxygenase und 5-Lipoxygenase. Verschiedene Sägepalmenextrakte erwiesen sich in vitro als α -Adrenozeptorenblocker. Die therapeutische Relevanz dieser Ergebnisse ist aufgrund mangelnder Erkenntnisse über Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik der Extraktbestandteile jedoch ungewiß¹².

1.2.3.3 Brennesselwurzel

Urticae radix, Brennesselwurzel (Unterirdische Teile von *Urtica dioica* oder *Urtica urens* und/oder deren Hybriden) sowie Zubereitungen aus Brennesselwurzel in wirksamer Dosierung.

Die Droge enthält β -Sitosterol in glykosidisch gebundener Form sowie Scopoletin.

In einer Studie mit Bazoton[®] (wässrig-alkoholischer Extrakt) fand man bei BPH-Patienten eine Senkung der Östradiol-, Östron- und SHBG-Blutspiegel²¹. Als Ursache wurde eine Hemmung der Aromatase vermutet. Da aber mit potenten synthetischen Aromatasehemmern bisher in der BPH-Behandlung keine durchschlagenden klinischen Erfolge erzielt werden konnten, ist die therapeutische Relevanz dieses „Wirkprinzips“ fraglich. Die antiphlogistische Wirksamkeit von Urticaextrakten ist durch bekannte niedermolekulare Inhaltsstoffe nicht hinreichend zu erklären. Möglicherweise spielt hierbei ein säurestabiles Lektin (Urtica-dioica-Agglutinin, UDA) auf immunologischer Ebene eine Rolle²². Die in der Monographie genannten Phytosterole kommen aufgrund ihrer sehr geringen Konzentration in Urtica-Extrakten ($\leq 0,01$ % gegenüber 0,2 - 0,5 % in verschiedenen Pflanzenölen) für eine Hauptwirkung bei der Behandlung der BPH wohl kaum in Frage.

1.2.3.4 Roggenpollenextrakt

Extrakt (2,5:1) aus Gräserpollen (Secale cereale : Phleum pratense : Zea mays = 30:1,5:1), extrahiert mit 1.) Wasser/Aceton (100+5 v/v) und 2.) Aceton.

Der native Extrakt besteht aus ca. 87 % wasser- und 13 % acetonlöslichen Bestandteilen.

Experimentell wurden nachgewiesen: Dosisabhängige in-vitro-Hemmung der Cyclooxygenase ($IC_{50} = 0,005$ mg/ml) sowie der Lipoxygenase ($IC_{50} = 0,08$ mg/ml) durch die acetonlösliche Fraktion des Pollenextrakts. Spasmolytischer Effekt am isolierten Meerschweinchen-Ileum ab einer Konzentration von 3×10^{-4} g/ml.

Der Extrakt im Fertigarzneimittel Cernilton® enthält bis zu 20 % Aminosäuren, etwa 1 % Phytosterole und außerdem Kohlenhydrate und Fettsäuren.

Er wird auch von Allergikern ohne besondere Nebenwirkungen vertragen, da hochmolekulare Substanzen mit antigener Wirkung abgetrennt werden.

1.2.3.5 Kürbissamen

Die Positivmonographie der Kommission E beschreibt die Droge als die reifen, getrockneten Samen von *Cucurbita pepo* und davon abgeleiteter Kultursorten. Reproduzierbare wissenschaftliche Untersuchungen existieren erst seit der Verwendung einer genau definierten Kultursorte aus der Steiermark (*Cucurbita pepo* L. convar. *citrullinina* var. *styriaca*; *Steirischer Ölkürbis*). Ihre weichschaligen, dunkelgrünen Samen weisen im Vergleich zu den hartschaligen, weißen Kürbissamen einen höheren Gehalt an Δ^7 -Sterolen auf.

Kürbissamen und daraus gewonnene Extrakte stellen ein komplexes Stoffgemisch dar, dessen Wirkungen möglicherweise nicht einigen definierten Inhaltsstoffen zugeschrieben werden können. Daher gilt, wie für alle Phytopharmaka, daß Studien mit einem bestimmten Präparat nicht ohne weiteres auf „wirkstoffgleiche“ Arzneimittel übertragen werden können. Zu viele Parameter, z. B. Herkunft des Pflanzenmaterials, Erntezeitpunkt, Herstellungstechnik, verwendete Extraktionsmittel etc. beeinflussen die pharmazeutische Qualität mitunter signifikant.

Δ^7 -Sterole, die charakteristischen Inhaltsstoffe von Kürbissamen, werden als bedeutsam für eine rationale Behandlung der Benigenen Prostatahyperplasie angesehen. Daneben wird dem in Kürbissamen enthaltenen Citrullin eine antiödematöse Wirkung zugeschrieben⁸. Weitere, teils nicht näher beschriebene Inhaltsstoffe werden in Zusammenhang gebracht mit antimikrobieller und antiphlogistischer Wirkung sowie mit regulatorischen Vorgängen an der Blasenmuskulatur²³.

Der Grund für die prostatotrope Wirksamkeit der Δ^7 -Sterole wird in ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu DHT vermutet. Nach oraler Aufnahme können diese im menschlichen Prostatagewebe nachgewiesen werden. Der Serumspiegel von saurer Phosphatase und prostataspezifischem Antigen wird gesenkt, die Dihydrotestosteronkonzentration im Prostatagewebe ist signifikant erniedrigt²⁴. Darüber hinaus wurde für sterolhaltige Präparate eine messbare Hemmung der 5α -Reduktase beschrieben, die allerdings keine

klinische Relevanz besitzen dürfte. Einem IC_{50} -Wert von 1 ng/ml für Finasterid stehen Werte von 7000 bis 40000 ng/ml (Sabal-Extrakte) und > 500000 ng/ml (sitosterolhaltiger Extrakt aus *Hypoxis rooperi*) gegenüber⁷.

Als weitere wirksame Inhaltsstoffe von Kürbissamen werden Selen, Linolsäure, Tocopherole, Carotinoide und Magnesiumsalze genannt²³. Da es sich hier jedoch um ubiquitär verbreitete Substanzen handelt, ist ein signifikanter Beitrag zur Linderung der BPH-assoziierten Beschwerden eher fraglich.

Derzeit sind im Handel folgende Kürbissamen-Monopräparate zur Therapie der BPH erhältlich:

Nomon mono[®] Kapseln (Hoyer-Madaus)

175 mg Trockenextrakt (20:1) pro Kapsel

Prosta Fink[®] forte Kapseln (GSK)

500 mg Dickextrakt (15-25:1, Auszugsmittel Ethanol 92 % v/v) pro Kapsel

Urgenin[®] Cucurbitae oleum Kapseln (Hoyer-Madaus)

583 mg Kürbissamenöl pro Kapsel

Vesiherb[®] Filmtabletten (Cesra)

152 mg Trockenextrakt (25-40:1, Auszugsmittel Ethanol 60 % v/v) pro Filmtablette

Als Kombinationspräparat ist verfügbar:

Prostamed[®] Tabletten (Klein)

200 mg Kürbissamenmehl

100 mg Kürbisglobulin

2,6 mg Trockenextrakt aus Goldrutenkraut (5-8:1, Auszugsmittel Ethanol 60 % v/v)

6,3 mg Trockenextrakt aus Zitterpappelblättern (5-8:1, Auszugsmittel Ethanol 60 % v/v)

1.3 INHALTSSTOFFE VON KÜRBISSAMEN

1.3.1 Literaturübersicht

Die Inhaltsstoffe von Cucurbitaceen werden als Forschungsgebiet bereits seit vielen Jahrzehnten bearbeitet. Besonders interessant ist ihr Gehalt an seltenen Δ^7 -Sterolen. Die vielfältige Verwendung des Kürbis als Lebensmittel, des Kürbiskernöls als hochwertiges Salatöl sowie die Wirksamkeit von Kürbissamen gegen Benigne Prostatahyperplasie haben im Bereich der Lebensmittelchemie und Pharmazie zur Untersuchung von Kürbis-Inhaltsstoffen geführt.

Neben Kohlenhydraten und Proteinen enthält der Kürbissamen ungefähr 50 % fettes Öl, welches sich hauptsächlich aus einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren zusammensetzt, v. a. Ölsäure (ca. 21-47 %) und Linolsäure (ca. 36-61 %). Zusammen mit Palmitin- und Stearinsäure stellen diese ca. 98 % des gesamten Fettsäureanteils²⁵.

Kürbissamen enthalten nach Murkovic 41 bis 620 mg γ -Tocopherol pro kg und fünf bis zehn Mal weniger α -Tocopherol (0 bis 91 mg/kg). β - und δ -Tocopherol kommen sporadisch und nur in sehr geringen Mengen vor²⁶. Sauter beschreibt daneben das Vorkommen von β -Carotin und Lutein²⁷. El-Adawy untersuchte den Gehalt der Elemente Kupfer, Zink, Eisen, Mangan, Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium und Phosphor²⁸.

Δ^5 -Sterole, wie Brassicasterol, Campesterol und Stigmasterol^{29,69} sowie β -Sitosterol²⁹ sind nur in sehr geringen Mengen enthalten. Außerdem liegt in Kürbissamen die Vorstufe der Sterole, Squalen, vor²⁷. Identifizierte Δ^7 -Sterole besitzen den Grundkörper des Stigmastans (24 α -Ethyl) bzw. Poriferastans (24 β -Ethyl). Sauter²⁷ nennt ausschließlich Stigmastan-Derivate (5 α -Stigmasta-7,22-dien-3 β -ol, 5 α -Stigmasta-7,25-dien-3 β -ol, 5 α -Stigmasta-7,22,25-trien-3 β -ol, 5 α -Stigmasta-7,Z24(28)-dien-3 β -ol); laut Untersuchungen von Breinhölder²⁹ und Rodriguez⁶⁹ liegen die 7,25- und 7,22,25-ungesättigten Verbindungen in der Poriferastan-Konfiguration vor. Rodriguez nennt darüber hinaus 5 α -Stigmast-7-en-3 β -ol und 24-Methylcholest-7-en-3 β -ol, wobei über die Stereochemie an C-24 der zuletzt genannten Verbindung keine Aussage gemacht wird.

Bekannt sind darüber hinaus 3-O- β -D-Glucoside von Δ^7 -Sterolen. Sauter isolierte die Glucoside von 5 α -Stigmasta-7,22-dien-3 β -ol, 5 α -Stigmasta-7,25-dien-3 β -ol und 5 α -Stigmasta-7,22,25-trien-3 β -ol. Breinhölder nennt die Glucoside von Stigmasta-7,22-dien-3 β -ol, Stigmasta-7,Z24(28)-dien-3 β -ol, Poriferasta-7,25-dienol, Poriferasta-7,22,25-trienol und, in kleinsten Mengen, 5 α -Stigmast-7-en-3 β -ol.



Abb. 1-4: Kürbisanbau in Ungarn; einzelne Frucht von *C. pepo*

1.3.2 Vorkommen von Δ^7 -Sterolen

Δ^5 -Sterole sind im Pflanzenreich ubiquitär verbreitet. Dagegen kommen Δ^7 -Sterole nur selten und meist in Spuren vor, beispielsweise in Caryophyllales, Solanaceen (Paprika, Aubergine), Asteraceen (Sonnenblumenkerne, *Vernonia anthelmintica*) sowie in Teesamen- und Weizenkeimöl⁴⁰. In Pflanzen aus der Familie der Kürbisgewächse (Cucurbitaceae) hingegen sind Δ^7 -Sterole häufiger zu finden. Dabei ist die Konzentration in den Samen besonders hoch. Die Samen des Arzneikürbis und der daraus hervorgegangenen Zuchtsorten enthalten bis zu mehreren Milligramm Δ^7 -Sterole pro Gramm Droge.

1.3.3 Sterole: Nomenklatur

Das erste bekannte Sterol, Cholesterin (Cholesterol), erhielt seinen Namen aufgrund seines Vorkommens in Gallensteinen (griechisch *chole* = Galle, *stereos* = fest, starr). Die Trivialnamen vieler Sterole leiten sich von ihrer natürlichen Herkunft ab. Aus historischen Gründen, sicherlich aber auch aufgrund der Unhandlichkeit der systematischen Bezeichnungen, werden auch heute vielfach noch die Trivialnamen verwendet.

In diesem Abschnitt soll auf die Bezeichnung von Sterolen anhand der IUPAC-Nomenklatur (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) eingegangen werden. Die Beschäftigung mit der Literatur zu Sterolen erfordert Kenntnisse über die Fortentwicklung der Nomenklaturregeln. Einerseits wurden in den IUPAC-Empfehlungen Änderungen bezüglich der Bezifferung vorgenommen; auf der anderen Seite wurde bei der Angabe der Stereochemie der Seitenkette früher auf die Fischer-Projektion Bezug genommen, während heute die absolute Konfiguration auf Basis der CIP-Regeln beschrieben wird. Dies wird allerdings nicht von allen Autoren konsequent beachtet. In der Literatur herrscht demzufolge ein buntes Durcheinander bei der Benennung der Sterole.

Erstmals wurden Empfehlungen der IUPAC *Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry* und der IUPAC-*International Union of Biochemistry* (IUB) *Commission on Biochemical Nomenclature* (CBN) 1967 herausgegeben. 1989 wurden diese durch die IUPAC-IUB *Joint Commission on Biochemical Nomenclature* (JCBN) überarbeitet³⁰. Hier werden Steroide als Verbindungen definiert, die die Grundstruktur eines Cyclopenta[a]phenanthrens (Abb. 1-5) besitzen. Methylgruppen an C-10 und C-13 können ebenso wie eine Alkyl-Seitenkette an C-17 vorhanden sein. Sterole tragen nach dieser Definition darüber hinaus auch eine Hydroxylgruppe an C-3.

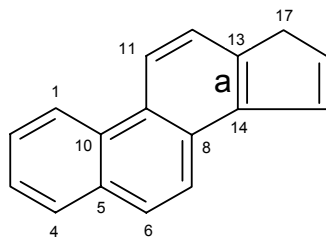


Abb. 1-5: 17H-Cyclopenta[a]phenanthren

Im vollständig gesättigten Perhydro-cyclopenta[a]phenanthren (Gonan, Abb. 1-6) sind die Ringe B/C ebenso wie die Ringe C/D *trans*-verknüpft. Nach Fieser und Fieser^{31,32} werden Substituenten unterhalb der Ringebene als α -, oberhalb als β -ständig bezeichnet und mit gestrichelten respektive keilförmigen (häufig auch einfach durchgezogenen) Bindungen dargestellt. Die β -Stellung der H-Atome an C-8, C-9, C-10, C-13 und C-14 ist im Trivialnamen Gonan schon eingeschlossen. Zur genauen sterischen Beschreibung ist nur noch die Anordnung des H-Atoms an C-5 anzugeben: 5 α -Gonan (A/B *trans*) oder 5 β -Gonan (A/B *cis*).

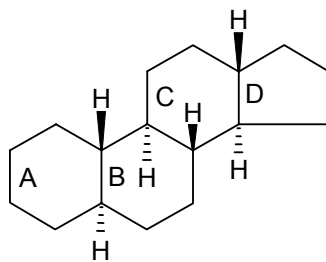


Abb. 1-6: 5 α -Gonan

Alle in dieser Arbeit behandelten Sterole und Sterolderivate sind Vertreter der 5 α -Reihe und enthalten eine OH-Gruppe (oder ein Glykosid davon) in der 3 β -Position. Zusammen mit den β -ständigen Methylgruppen an C-10 und C-13 ergibt sich folgende räumliche Struktur des Grundkörpers:

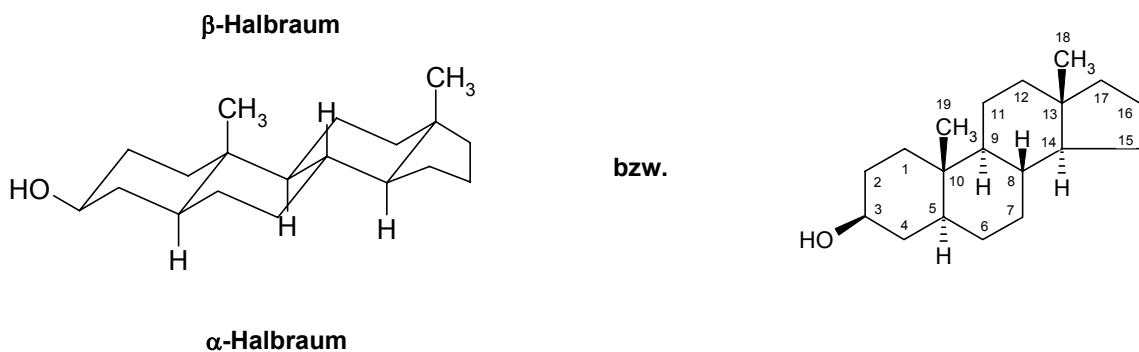


Abb. 1-7: Grundstruktur eines Sterols (5 α -Androstan-3 β -ol)

Die Einführung einer Doppelbindung im Sterolgrundgerüst hat eine gewisse „Einebnung“ dieser Struktur von vormals ausschließlich Sesselkonformationen zur Folge.

Unter weiterer Berücksichtigung der Alkyl-Seitenkette stellt sich die Lokantenbezeichnung für Sterole nach den IUPAC-IUB-Regeln von 1967 wie folgt dar:

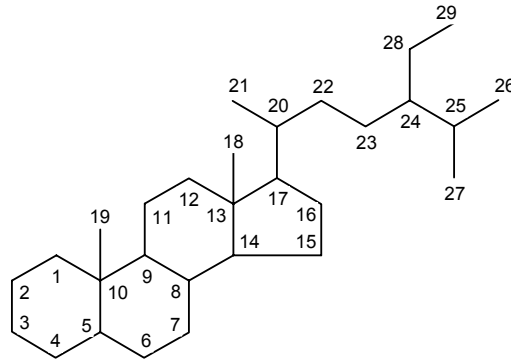


Abb. 1-8: IUPAC-IUB Bezeichnung (1967)

Die C-Atome der Methylgruppen von 4,4-Dimethylsterolen wurden mit den Ziffern 30 und 31 versehen. Mit der Revision der Nomenklatur 1989 einigte man sich darauf, weitere Alkylsubstituenten der iso-Oktan-Seitenkette mit der Nummer des C-Atoms der Verzweigungsstelle und zusätzlichen, fortlaufenden Hochzahlen zu bezeichnen:

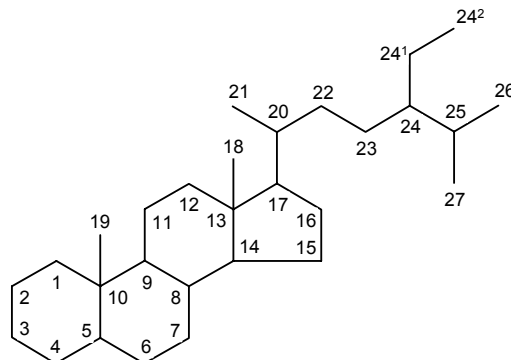


Abb. 1-9: IUPAC-IUB Bezeichnung (1989)

Ist dabei ein „potentielles“ Stereozentrum Dimethyl-substituiert, so erhält das C-Atom der *pro-R*-Methylgruppe die Bezeichnung C-24¹, das *pro-S*-ständige die Bezeichnung C-24¹.

Zwischen C-26 und C-27 wird von der IUPAC-IUB JCBN nicht differenziert (sofern keine Unsatigung an C-25 vorliegt), so daß beim Vergleich spektroskopischer Literaturdaten durchaus mit Unterschieden gerechnet werden muß.

Die Lokanten 28 und 29 werden nach dieser Revision der Nomenklaturregeln für die Methylgruppen von 4,4-Dimethylsterolen frei.

Stereozentren in der Seitenkette werden heute üblicherweise durch ihre absolute Konfiguration beschrieben, z. B. (24*S*)- oder (24*R*). In der frühen Sterolnomenklatur, z. T. aber auch noch heute, wird von der durch Fieser und Fieser^{31,32} eingeführten α -/ β -Bezeichnung Gebrauch gemacht. Diese hat allerdings nichts mit den oben beschriebenen Teilräumen oberhalb und unterhalb der Ringebene des Sterolgrundgerüsts zu tun und darf nicht damit verwechselt werden. Vielmehr handelt es sich um eine Bezeichnung basierend auf der Fischer-Projektion der Seitenkette, dargestellt in Abb. 1-10. Die längste Kohlenstoffkette ist wie üblich vertikal angeordnet und liegt in der Papierebene, wie auch in der konventionellen Darstellung von Sterolen (dies ist auch der Grund dafür, weshalb in Strukturformeln die Bindung zwischen C-17 und C-20 nicht keilförmig geschrieben wird). Die Methylgruppe am asymmetrischen C-20 steht dann auf der linken Seite der Kette und wird als β -ständig bezeichnet. Analog gelten Substituenten auf der rechten Seite der Kette als α -orientiert.

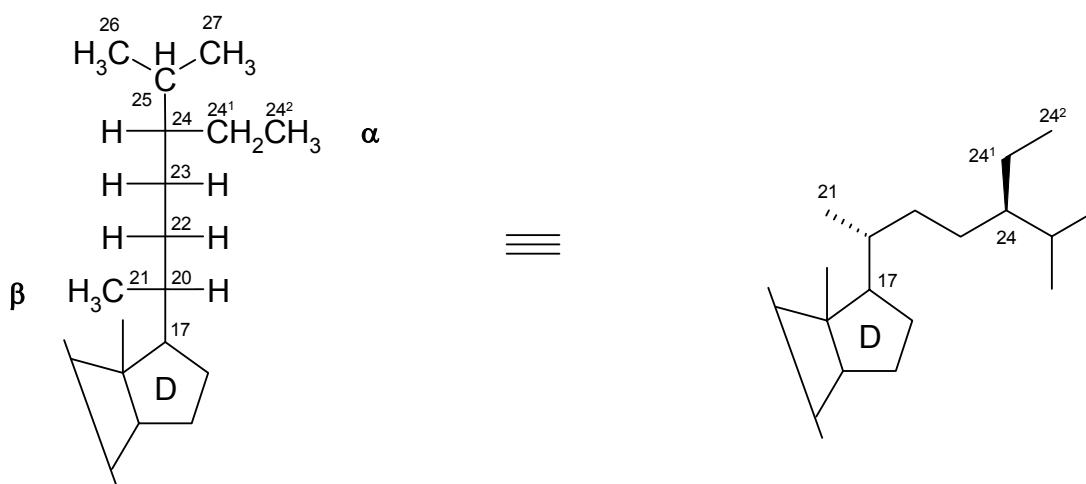


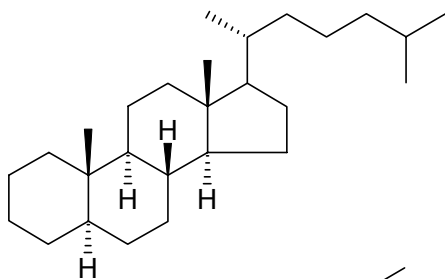
Abb. 1-10: Fischer-Projektion der Alkyl-Seitenkette; konventionelle Darstellung

In der konventionellen Darstellung werden α -ständige Substituenten in der Seitenkette mit keilförmigen, β -ständige mit gestrichelten Bindungen geschrieben (also genau entgegengesetzt zur Schreibweise im Grundgerüst).

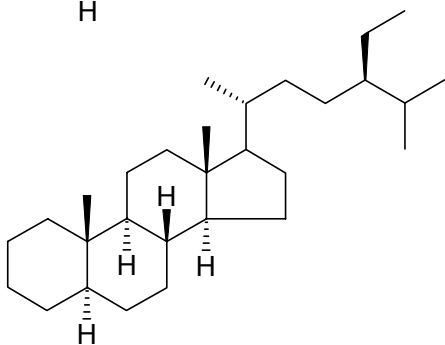
Da die systematische Rückführung von Sterolbezeichnungen auf Cyclopenta[*a*]phenanthren sehr unhandliche Namen ergäbe, wird auch in der IUPAC-Nomenklatur auf Trivialnamen von Grundstrukturen (*parent hydrocarbon rings and side chains*) zurückgegriffen. Die IUPAC-Bezeichnungen der in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Sterole und ihrer Glykoside beinhalten die Grundkörper des 5 α -Cholestans, 5 α -

Stigmastans und 5α -Poriferastans. Die in den Trivialnamen festgelegten sterischen Verknüpfungen sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

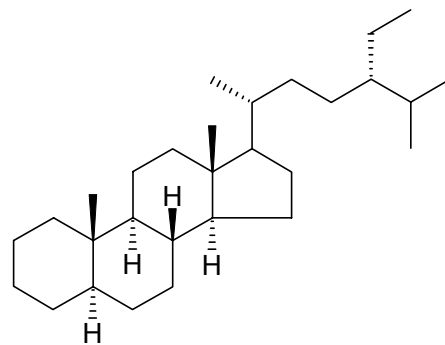
Grundstruktur	Stereochemie
5α -Cholestan	$5\alpha, 8\beta, 9\alpha, 10\beta, 13\beta, 14\alpha, 17\beta, 20R$
5α -Stigmastan	$5\alpha, 8\beta, 9\alpha, 10\beta, 13\beta, 14\alpha, 17\beta, 20R, 24R (= 24\alpha)$
5α -Poriferastan	$5\alpha, 8\beta, 9\alpha, 10\beta, 13\beta, 14\alpha, 17\beta, 20R, 24S (= 24\beta)$



5α -Cholestan



5α -Stigmastan



5α -Poriferastan

1.4 ZIEL DER ARBEIT

Die vorliegende Dissertation wurde angefertigt in Kooperation mit der GlaxoSmithKline Consumer Healthcare GmbH & Co. KG. Ziel der Arbeit war die Isolierung und Identifizierung der chemischen Struktur von Δ^7 -Sterolen und deren Glykosiden aus einem alkoholischen Dickextrakt von Kürbisamen (*Cucurbita pepo* L. convar. *citrullinina* var. *styriaca*), der mit Indikationsstellung *Prostataadenom Stadium I bis II* sowie *Reizblase* als „Prosta Fink® forte“ im Handel ist.

Dabei sollten freie sowie durch Hydrolyse aus Sterolestern freigesetzte Sterole isoliert und deren Struktur durch GC-MS und NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden. Die erhaltenen Daten sollten dann die eindeutige Identifizierung der Analyten in Gaschromatogrammen ermöglichen, die im Rahmen der Qualitätskontrolle beim Hersteller angefertigt werden.

In einer früheren Arbeit³³ waren Extrakte der gleichen Kürbisvarietät wie in der vorliegenden Dissertation bearbeitet worden. Für die GC-MS-Signale der damals gefundenen Sterole waren, nur auf den massenspektrometrischen Daten basierend, Strukturen vorgeschlagen worden (Abb. 1-11, Abb. 1-12). Die Richtigkeit und korrekte Zuordnung dieser hypothetischen Strukturen sollte anhand der eigenen analytischen Erkenntnisse überprüft und ggf. korrigiert werden.

Für die Analytik von Sterolglykosiden mit HPLC-MS/MS sollte zunächst eine Modellsubstanz zur Methodenentwicklung synthetisiert werden. Aus dem Extrakt isolierte Sterolglykoside sollten anschließend anhand ihrer Massenspektren und/oder NMR-Spektren identifiziert werden. Eine weitere geplante Strategie zur Stukturaufklärung der Glykoside war die Hydrolyse zu Aglykon und Zucker und deren getrennte Identifizierung.

Damit sollte auch eine Methode erarbeitet werden, die es ermöglicht, Sterolglykoside aus *C. pepo* eindeutig zu identifizieren und zu quantifizieren, um die Qualitätskontrolle von Kürbissamenextrakten auf die vermutlich therapeutisch relevanten Sterolglykoside zu erweitern.

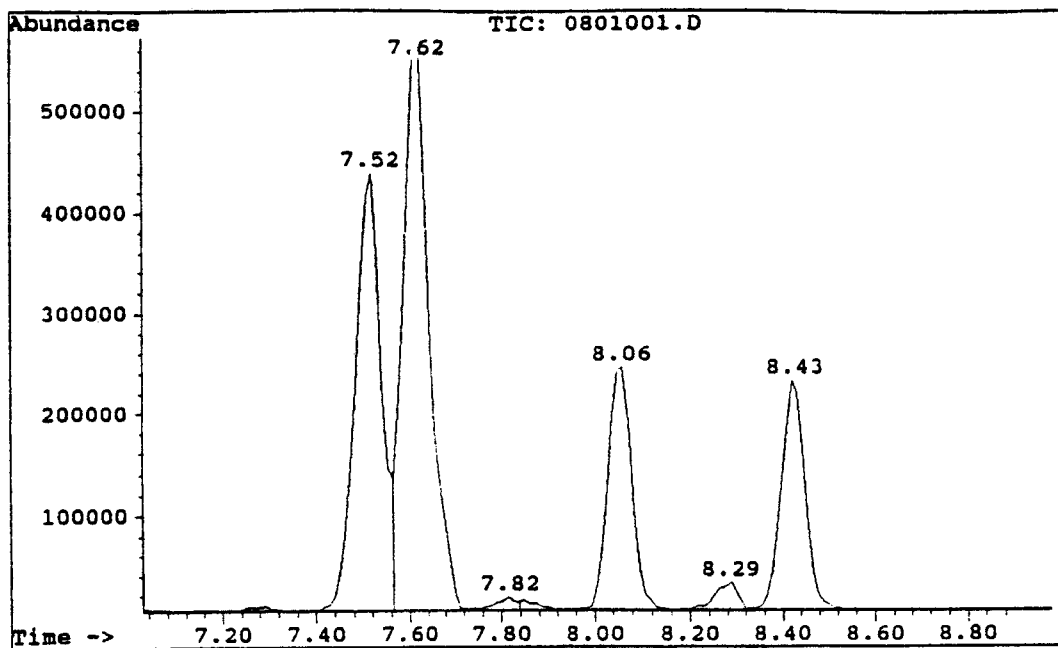


Abb. 1-11: Gaschromatogramm von Kürbissterolen (A. Torun, 1994, Säule: DB-1, 300 °C)

t_R [min]	m/z (M^+)	interne Bezeichnung ³³	Struktur
7,52	410	“Sterol 1”	24 β -Ethyl-5 α -cholesta-7,22,25-trien-3 β -ol
7,62	412	“Sterol 2”	24Z-Ethyliden-5 α -cholest-7-en-3 β -ol
8,06	412	“Sterol 3”	24 α -Ethyl-5 α -cholesta-7,22-dien-3 β -ol
8,29	414	“Sterol 4”	24 α -Ethyl-5 α -cholest-7-en-3 β -ol
8,43	412	“Sterol 5”	24 ξ -Ethyl-5 α -cholest-7-en-3 β -ol

Abb. 1-12: Bisherige Zuordnung von Strukturen zum Gaschromatogramm (A. Torun, 1994)

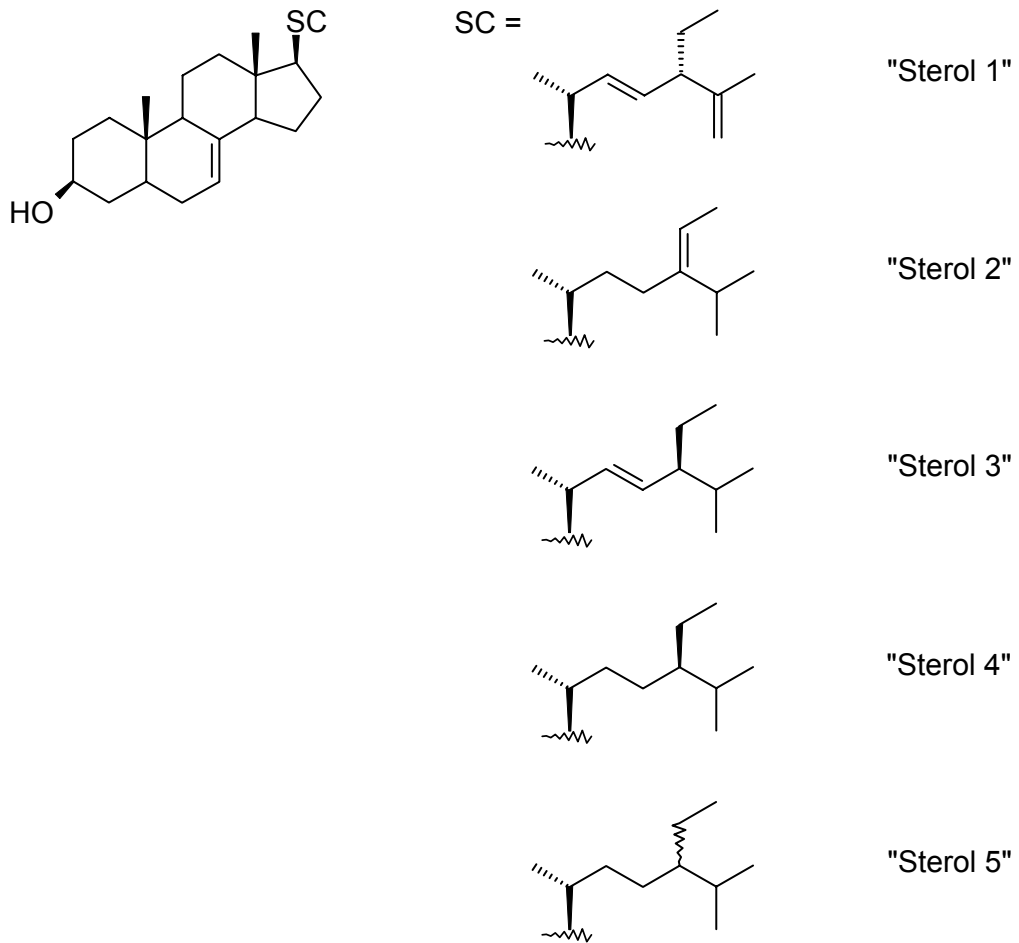


Abb. 1-13: Formelbilder der von Torun vorgeschlagenen Strukturen

2 ISOLIERUNG UND AUFKLÄRUNG DER STRUKTUREN VON STEROLAGLYKA

2.1 ISOLIERUNG FREIER STEROLE AUS KÜRBISSAMENEXTRAKT

Erstes Ziel dieser Arbeit war die Isolierung von Δ^7 -Sterolen aus dem zur Verfügung gestellten Kürbissamenextrakt. Für die Gewinnung von Sterolen aus Drogen und deren Extrakten sind in der Literatur zahllose Beispiele zu finden (z. B. aus Spermatophyten.^{34,35,36,37}). Die meisten Verfahren machen sich zunutze, daß durch alkalische Hydrolyse ein Großteil der in der komplexen Matrix enthaltenen Stoffe hydrophilisiert wird (beispielsweise Verseifung von Triglyceriden zu Glycerin und Fettsäuresalzen), während die unveränderten Sterole lipophile Eigenschaften besitzen. Deshalb wird häufig als erster Schritt der „Unverseifbare Anteil“ durch Hydrolyse und anschließende Extraktion mit lipophilen Lösungsmitteln hergestellt.

Dabei bedient man sich zur Gewinnung des Rohextrakts zunächst geeigneter Lösungsmittel, die Pflanzenzellen effizient extrahieren (v. a. Gemische aus Alkoholen und Wasser) bzw. einen möglichst großen Anteil der enthaltenen Stoffe lösen können. Im allgemeinen erfolgt im Anschluß an die Hydrolyse eine Aufreinigung und Trennung des Stoffgemischs durch Flüssig-Flüssig-Extraktion (Ausschütteln), Dünnschichtchromatographie oder Flash-Säulenchromatographie (FSC). Die alkalische Hydrolyse liefert dabei – neben bereits frei vorliegenden Aglyka – Sterole, die aus Sterolestern freigesetzt wurden. Sterolglykoside sind aufgrund ihrer Acetalstruktur stabil gegen Basen.

Eine Arbeitsvorschrift von GSK Consumer Healthcare zur quantitativen Bestimmung von Sterolen im Kürbissamenextrakt³⁸ beruht auf alkalischer Hydrolyse und der anschließenden Verteilung der Analyten im Lösungsmittelsystem Methanol/Wasser/Hexan. Diese Methode sollte hier zur Gewinnung von Sterolen im präparativen Maßstab adaptiert werden. Im Laufe der Versuche stellte sich jedoch heraus, daß ein *upscaling* nicht ohne weiteres möglich ist. Aufgrund der großen Menge an grenzflächenaktiven Stoffen, die bei der Hydrolyse entstehen (in erster Linie Fettsäuresalze der Stearin-, Palmitin, Öl- und Linolsäure), bilden sich hartnäckige Emulsionen und eine Phasentrennung ist nicht zu erreichen.

Deshalb folgte der Ansatz, das nach alkalischer Hydrolyse vorliegende Stoffgemisch durch Flash-Säulenchromatographie zu trennen. Hier traten Probleme auf, da in lipophilen Eluenten die genannten Salze ausfielen. Durch Neutralisieren des pH-Werts würde der Anteil lipophiler Matrixbestandteile wiederum erhöht, was die Abtrennung der Sterole weiter erschwert hätte.

Um diese Problematik zu umgehen, wurde das gesamte Reaktionsgemisch nach der alkalischen Hydrolyse an Kieselgel fixiert. Dadurch konnten aus dem stark alkalischen Ansatz mittels lipophiler Lösungsmittel problemlos die gewünschten Analyten von der Festphase eluiert werden. Als Eluenten wurden die Systeme Hexan/Essigsäureethylester und Hexan/Diethylether in verschiedenen Mischungsverhältnissen erprobt. Gute Ergebnisse wurden mit Hexan/Diethylether 1:1 erzielt. Hier erfolgte, wie später gaschromatographisch bestätigt, vollständige Elution der Sterole.

Das erhaltene Eluat wurde gaschromatographisch untersucht und die einzelnen Substanzen durch massenspektrometrische Detektion identifiziert. Erkannt wurden Squalen (Abb. 2-2, $t_R = 15,8$ min, $m/z = 410$), γ -Tocopherol (Abb. 2-3, $t_R = 18,1$ min, $m/z = 416$) und geringe Mengen des Δ^5 -Sterols Stigmasterol (Abb. 2-4, $t_R = 21,2$ min, $m/z = 412$). Die Identifizierung dieser ubiquitär vorkommenden Naturstoffe erfolgte durch Vergleich ihrer Massenspektren mit denjenigen aus Datenbanken.

Darüber hinaus fanden sich drei Signale ($t_R = 21,6 / 22,2 / 22,7$ min), deren Molekülpeaks ($m/z = 410$ bzw. 412) und Fragmentierungsmuster vermuten ließen, daß es sich um Vertreter aus der Substanzklasse der Sterole handelt.

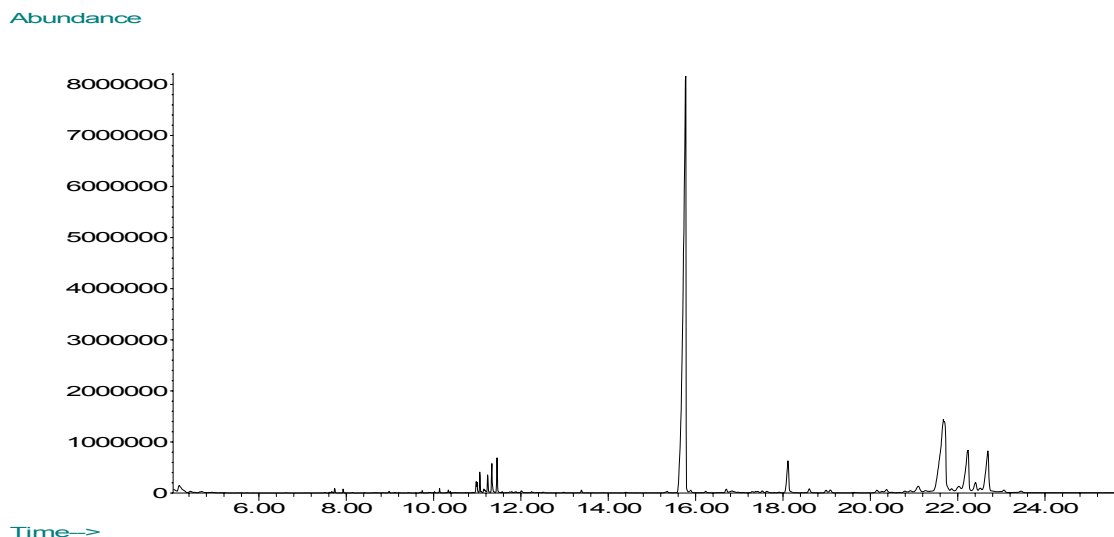


Abb. 2-1: Totalionenchromatogramm (TIC) des UVA nach Festphasenextraktion an Kieselgel

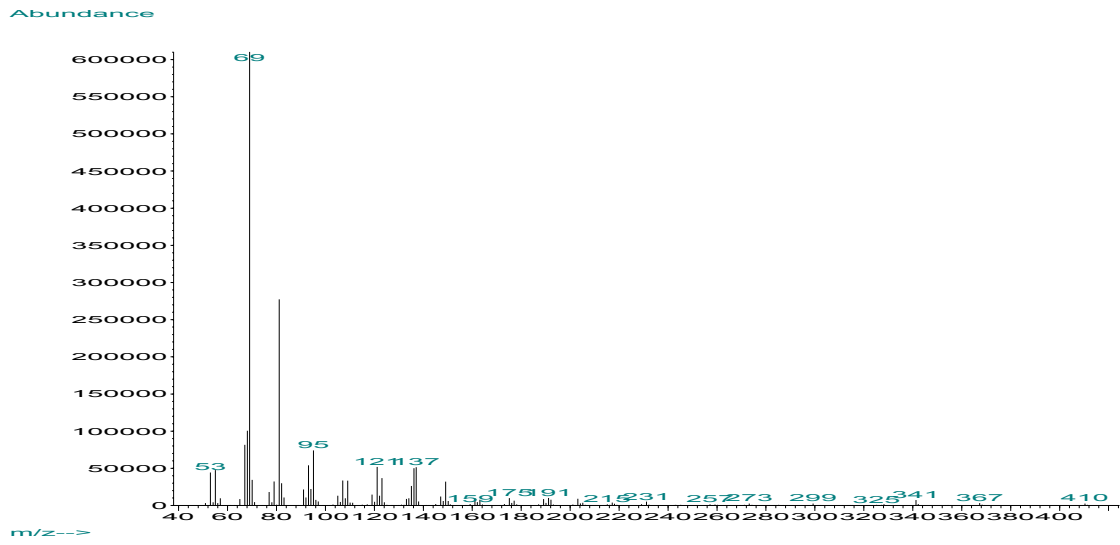


Abb. 2-2: Massenspektrum von Squalen ($t_R = 15,8$ min, $M^+ = 410$)

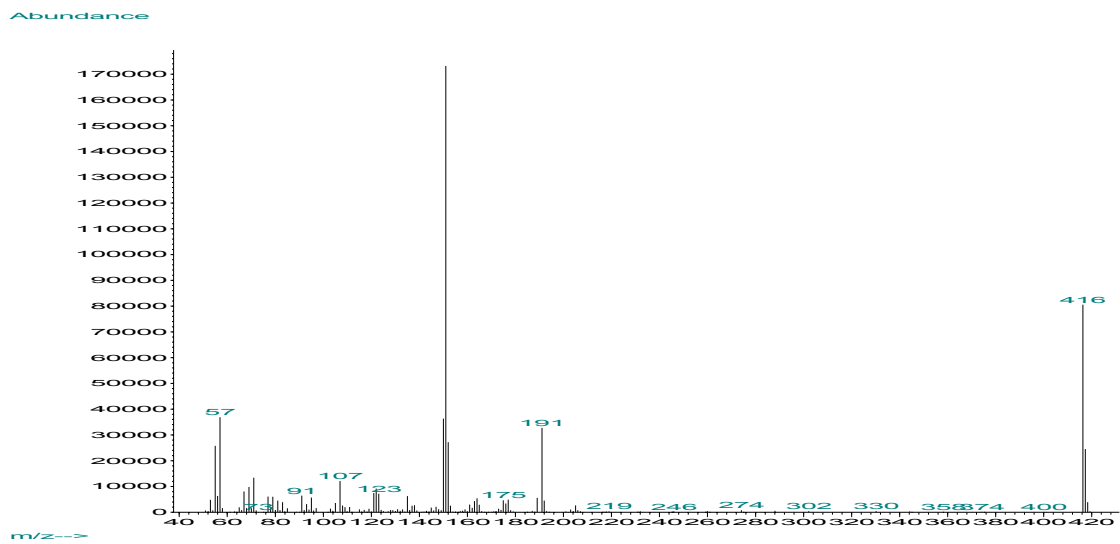


Abb. 2-3: Massenspektrum von γ -Tocopherol ($t_R = 18,1$ min, $M^+ = 416$)

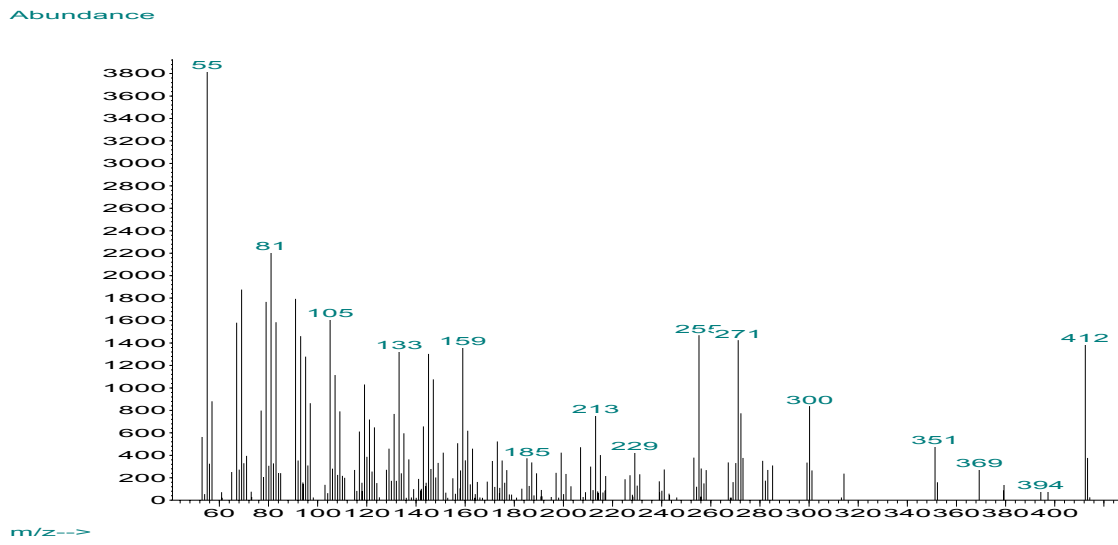


Abb. 2-4: Massenspektrum von Δ^5 -Stigmasterol ($t_R = 21,2$ min, $M^+ = 412$)

2.2 CHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG

Die einzelnen Sterole sollten nun im präparativen Maßstab chromatographisch voneinander getrennt werden. Vorversuche mit (u. a. präparativer) Dünnschichtchromatographie zeigten schnell, daß sich zwar der Sterolkomplex gut von Begleitstoffen trennen läßt (System 2, Detektion B); aufgrund ihrer sehr ähnlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften war jedoch in unterschiedlichsten Laufmittelsystemen keine Auftrennung der einzelnen Sterole zu erreichen. Auch die Verwendung von RP-Material erbrachte keinen Vorteil.

In der Literatur ist die Chromatographie von Sterolen an Normalphasen-Kieselgel beschrieben, welches mit Silbernitratlösung imprägniert ist³⁹. Aufgrund der unterschiedlich starken Wechselwirkung der π -Elektronen der Doppelbindungen in Sterolgrundkörper und/oder -seitenkette mit den am Kieselgel fixierten Ag^+ -Ionen sowie aufgrund sterischer Effekte je nach Substitution der Doppelbindungen ist die Affinität der Analyten zur stationären Phase unterschiedlich stark. Mit steigender Anzahl der Doppelbindungen verlängert sich die Retentionszeit; *cis*-/*trans*-Isomere können voneinander getrennt werden⁴⁰. Anwendung findet diese sogenannte *argentation chromatography* sowohl in DC, FSC als auch HPLC⁴¹. Eigene Versuche mit derartig modifizierten DC-Folien ergaben jedoch keine verwertbaren Resultate. Aus finanziellen Erwägungen wurde deshalb davon abgesehen, eine HPLC-Säule (irreversibel) mit Silbernitrat zu beladen.

Stattdessen wurde eine HPLC-Trennung an *reversed phase* Material versucht. Die relativ „übersichtlichen“ Gaschromatogramme und die überlegene Trennleistung von HPLC-Systemen gegenüber DC und FSC ließen erwarten, daß so eine Auftrennung des Sterolkomplexes möglich sein sollte.

Das Eluat der Festphasenextraktion wurde eingeeengt und über eine analytische RP-18-HPLC-Säule geführt. Es wurde mit Methanol/Wasser-Gemischen als Eluenten experimentiert. Wasserzusatz von einigen Prozent verlängerte zwar die Retention, erbrachte aber eine bessere Peaktrennung. Fünf Analyten im Retentionsbereich 6,1 bis 9,3 Minuten (Säulendimension 125-4) bzw. 13,1 bis 20,7 Minuten (Säulendimension 250-4, siehe Chromatogramme Abb. 2-5 und Abb. 2-6) zeigten bei Detektion mit Diodenarray höchste UV-Absorption bei ca. 203 nm, was auf isolierte Doppelbindungen in den Molekülen hinweist.

Diese Methode wurde anschließend auf ein System im präparativen Maßstab übertragen. Um kürzere Laufzeiten und damit verbunden die Einsparung von Lösungsmittel zu erreichen, wurde für die HPLC reines Methanol ohne Zusatz von Wasser verwendet. Die Trennung war dabei noch ausreichend. Mit einer Merck Hibar[®] RP-18-Fertigsäule bei einem Fluß von 30 ml/min konnten fünf aus dem Unverseifbaren Anteil des Kürbissamen-

Chrom Type: Fixed WL Chromatogram, 203 nm

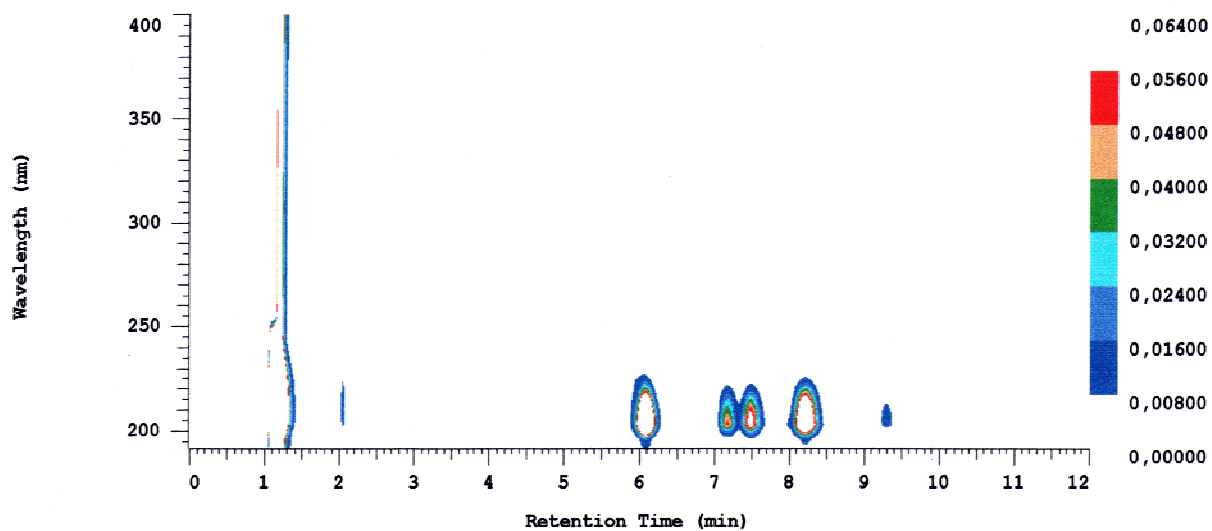
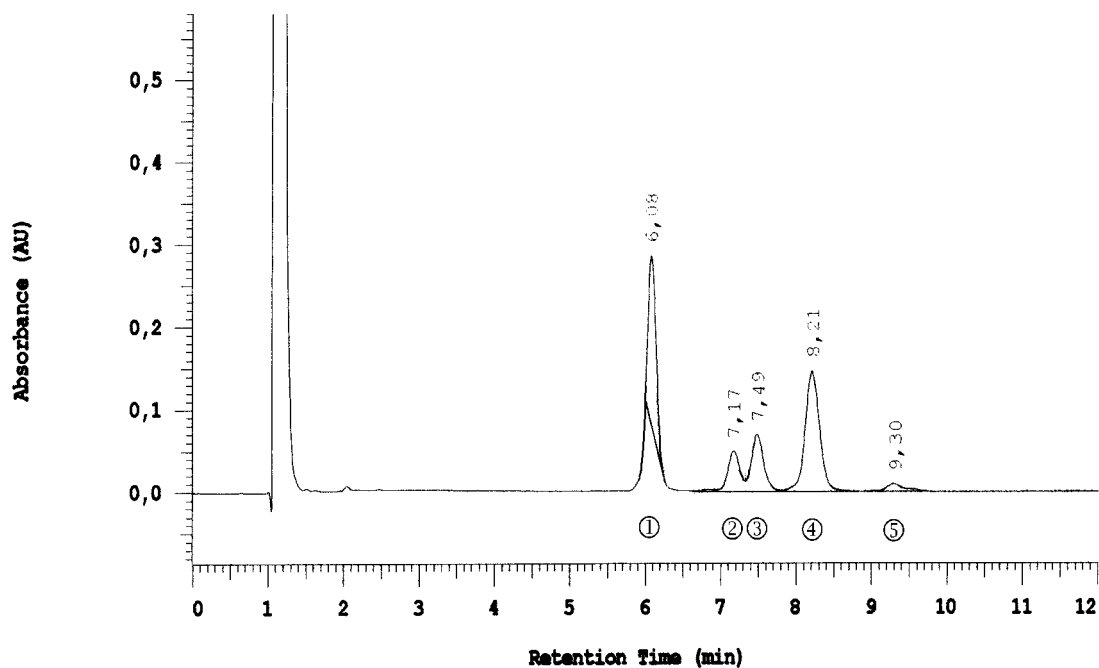
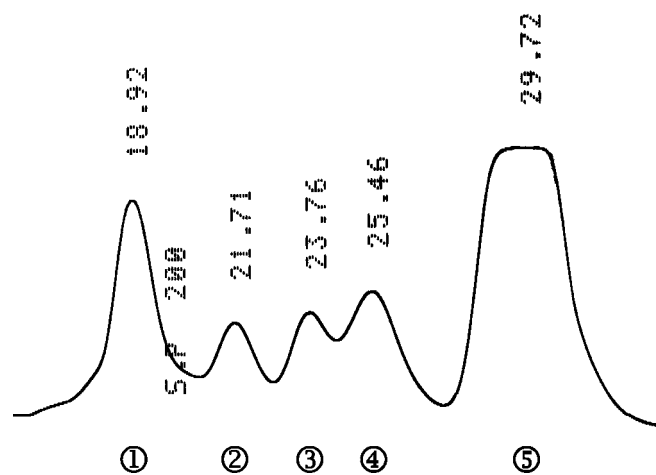


Abb. 2-5: HPLC-DAD-Chromatogramm des isolierten Sterolkomplexes

extrakts stammende Naturstoffe mit UV-Absorption bei 203 nm grob voneinander getrennt werden. Durch erneute HPLC-Fraktionierung und anschließendes Umkristallisieren wurden diese – mit Ausnahme der fünften, öligen Fraktion – weiter aufgereinigt. Es wurden vier weiße, kristalline Feststoffe erhalten (Fraktionen 1 bis 4, Abb. 2-6). Das Signal für Fraktion 5 ist in Abb. 2-5 (analytische HPLC) aufgrund eines vor der Analyse erfolgten Umkristallisierens deutlich kleiner.

Die Ausbeuten, ausgehend von 30 g Kürbissamenextrakt, waren 7,8 mg (Fraktion 1), 5,1 mg (Fraktion 2), 4,2 mg (Fraktion 3) und 11,3 mg (Fraktion 4).



**Abb. 2-6: Fraktionierung des Sterolkomplexes mit präparativer HPLC
(Detektion bei $\lambda = 203$ nm)**

2.3 STRUKTURAUFKLÄRUNG

Die umkristallisierten Analyten sowie die ölige Substanz wurden nun gaschromatographisch untersucht. Wie sich bei den Voruntersuchungen gezeigt hatte, war eine Derivatisierung von Sterolen – wie häufig beispielsweise durch Acetylierung durchgeführt – nicht erforderlich, um diese „GC-gängig“ zu machen. Die Trennung wurde an einer unpolaren DB-5 ((5%-Phenyl)-methylpolysiloxan) bzw. OV-1701 ((14%-Cyanopropyl)-methylpolysiloxan) Kapillarsäule mit einem Temperaturgradienten von 55 bis 300 °C innerhalb 25 Minuten erzielt. Bei isothermer Trennung waren die Signale stark verbreitert und akzeptable Trennergebnisse nicht erreichbar. Der Grund dafür liegt in der explosionsartigen Verdampfung des mitinjizierten Lösungsmittels, die eine bis zu 400-fache Volumenzunahme gegenüber dem flüssigen Zustand zur Folge hat. Bei hohen Säulentemperaturen kommt es durch diese rasche Ausdehnung entlang der Kapillarsäule zur Verstreuung der Analyten über einen größeren Bereich und damit zu breiten, flachen Signalen. Durch Injektion der Probe bei einer Säulentemperatur unterhalb des Siedepunktes des Lösungsmittels kann dieser Effekt vermieden werden.

Die im folgenden aufgeführten Ergebnisse beziehen sich auf das Agilent-GC-MS-System (s. 5.3.5). Für die vier Feststoff-Fractionen wurden Signale im Retentionsbereich 21,6 bis 22,7 min erhalten. Die fünfte, ölige Fraktion, zeigte deutlich niedrigere Retention (15,92 min). Der Vergleich mit elektronischen Datenbanken der NIST (*National Institute of Standards and Technology*) und Literaturdaten^{42,69} führte zum folgenden Ergebnis:

HPLC-Fraktion	t _R HPLC [min]	t _R GC [min]	m/z (M ⁺)	Struktur
1	18,92	21,59	410	5A (22E)-(24S)-Ethyl-5 α -cholesta-7,22,25-trien-3 β -ol
2	21,71	22,25	412	4A (24S)-Ethyl-5 α -cholesta-7,25-dien-3 β -ol
3	23,76	22,69	412	1 (24Z)-Ethyl-5 α -cholesta-7,24(24 ¹)-dien-3 β -ol
4	25,46	21,61	412	3A (22E)-(24S)-Ethyl-5 α -cholesta-7,22-dien-3 β -ol
5	29,72	15,80	410	6 Squalen

Abb. 2-7: Fraktionen der präparativen HPLC, untersucht mit GC-MS

Bei den vier isolierten Feststoffen handelt es sich um Δ^7 -Sterole. Fraktion 5 enthält demzufolge die biosynthetische Vorstufe der Sterole, Squalen. Die Strukturformeln der identifizierten Δ^7 -Sterole sind in Abb. 2-8 dargestellt.

Die nahezu identischen GC-Retentionszeiten der HPLC-Fractionen 1 und 4 erklären, weshalb in den Vorversuchen mit Analytgemischen aus dem Unverseifbaren Anteil nur drei Sterolpeaks anstatt vier gefunden werden konnten. Hier liegt eine Coelution vor, die

auch bei anderen Trennbedingungen nicht vermieden werden konnte (Abb. 2-13, $t_R \approx 21,6$ min). Eine genaue MS-Analyse des betroffenen Signals zu Peakbeginn und -ende erlaubt jedoch auch im Gemisch eine zweifelsfreie Zuordnung, zumal sich die beiden Sterole in ihrer Relativen Molekülmasse unterscheiden (410 bzw. 412 Da).

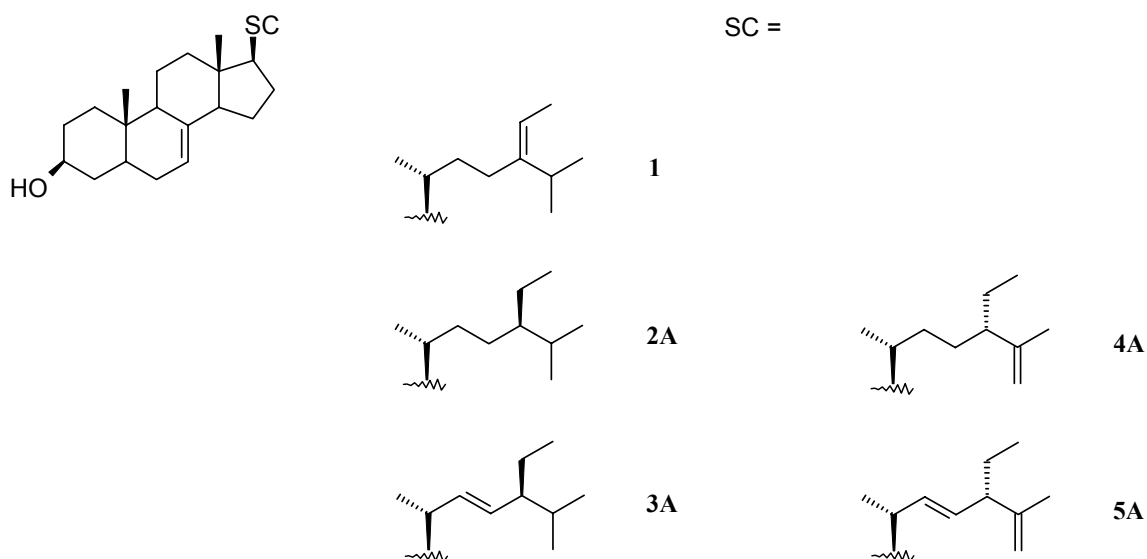
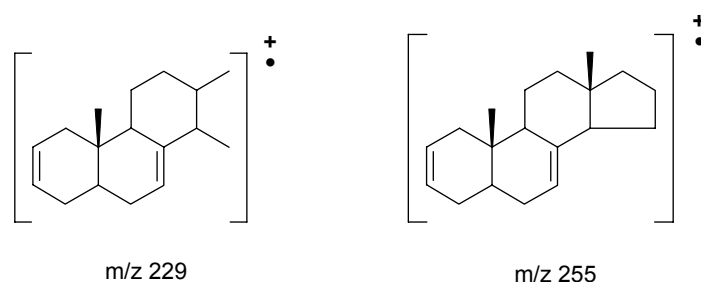


Abb. 2-8: Identifizierte Δ^7 -Sterole

Der Literaturvergleich von Massendaten, insbesondere anhand von Software-Datenbanken, liefert – vor allem, wenn über die Natur des Analyten wenig Anhaltspunkte vorhanden sind – wertvolle Informationen zur Struktur. Bekannte Analyten können schnell und komfortabel zugeordnet werden. Darüber hinaus lassen sich bei der Analytik von Sterolen auch anhand charakteristischer Fragmentationen Strukturinformationen erhalten.

Sterole liefern im allgemeinen einen deutlichen Molekülpeak $[M]^+$. Durch Abspaltung einer Methylgruppe (meist C-19) entsteht das Ion mit der Masse $[M-15]^+$. Der Verlust der OH-Gruppe als Wasser erzeugt das häufig vorkommende Signal $[M-18]^+$.

Wird die Seitenkette eines Sterols als Fragment abgespalten, so erhält man für die vorliegenden Δ^7 -Sterole das Ion $[M-SC]^+$ mit $m/z = 273$. Charakteristisch ist das Signal $[M-SC-2H]^+$ ($m/z = 271$), daneben auch $[M-SC-H_2O]^+$ bei 255 amu.



Δ^5 - und Δ^7 -Sterole zeigen gleicherweise das Fragment $m/z = 229$, das sich durch die Abspaltung der Seitenkette zusammen mit C-16, C-17 und Wasser ergibt. Die meisten Sterole gehen eine Fragmentierung ein, bei der die Seitenkette sowie C-15, C-16, C-17 und ggf. anschließend noch Wasser abgespalten werden. Es resultieren die Fragmentionen $[M-SC-42]^+$ (m/z 231 für Δ^7 -Sterole) bzw. $[M-SC-60]^+$ (m/z 213). Der Mechanismus ist in Abb. 2-9 dargestellt.

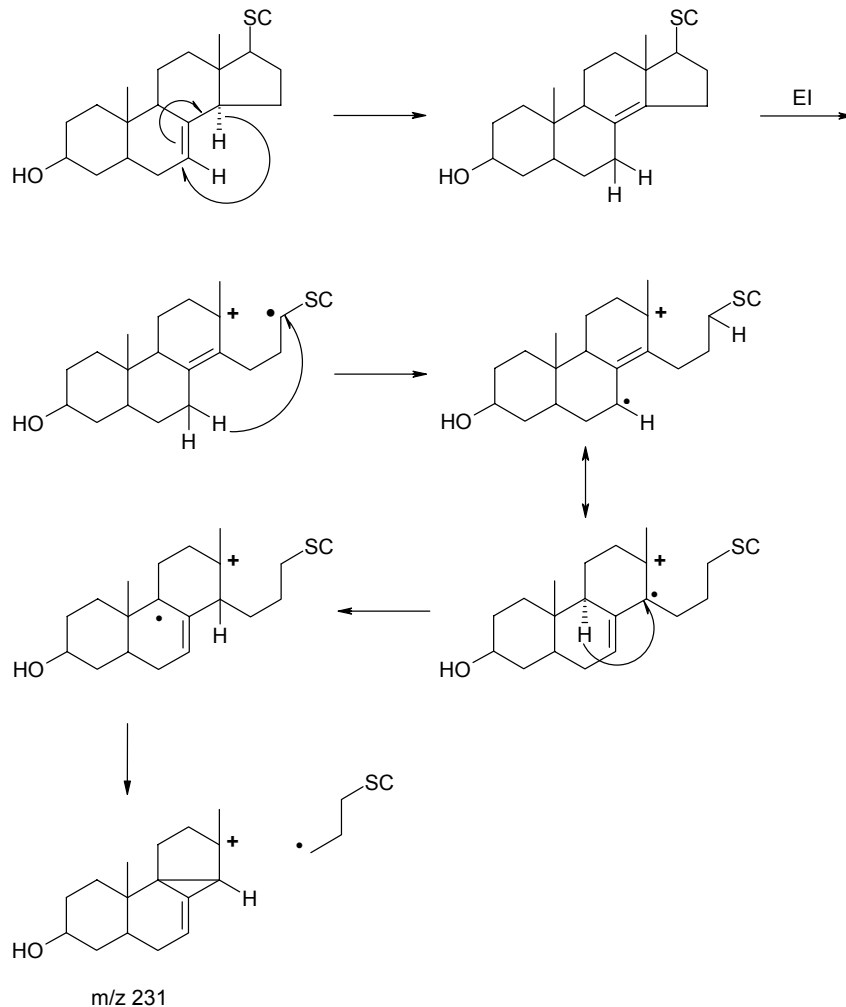


Abb. 2-9: Mechanismus für den Verlust der Seitenkette zusammen mit C-15, C-16 und C-17

Weitere Informationen liefert die Fragmentierung der Seitenkette. Je nach Anzahl und Position der Doppelbindungen treten hier ebenfalls charakteristische Fragmente auf. Bei Δ^{22} -Sterolen beobachtet man den Verlust der terminalen Isopropylgruppe: $[M-43]^+$ (siehe Abb. 2-15, $m/z = 369$).

$\Delta^{24(24-1)}$ -Sterole weisen ein typisches Fragmentation auf, das durch eine McLafferty-Umlagerung wie in Abb. 2-10 entsteht. Im Massenspektrum von (24Z)-Ethyl-5 α -cholesta-

7,24(24¹)-dien-3 β -ol (Abb. 2-17) ist das Signal bei 314 amu deutlich erkennbar. Der weitere Verlust einer Methylgruppe oder von Wasser liefert die Fragmente 299 bzw. 296.

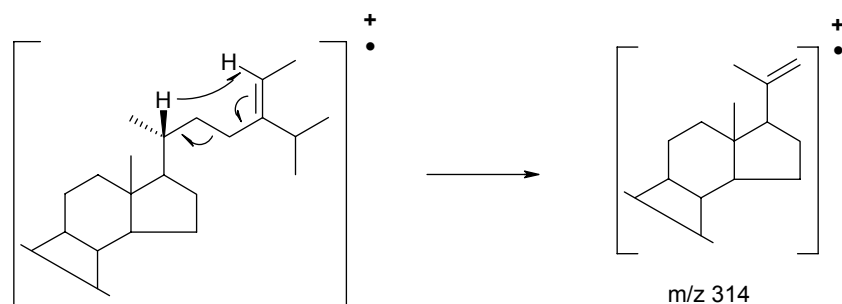


Abb. 2-10: Verlust eines Teils der Seitenkette durch McLafferty-Umlagerung an einem $\Delta^{24}(24^1)$ -Sterol

Von den vier isolierten Δ^7 -Sterolen wurden weiterhin ¹H-, ¹³C und 2D-NMR-Spektren aufgenommen, welche die Strukturaussagen der Massenspektren bestätigten und ebenfalls mit Literaturwerten abgeglichen wurden (siehe 5.5.1.1 bis 5.5.1.4).

Eine eingehende Analyse der Gaschromatogramme des UVA aus mehreren Ansätzen ergab, daß noch ein weiteres Δ^7 -Sterol der Relativen Molekülmasse 414, allerdings nur in Spuren, vorliegt. Basierend auf den auftretenden Fragmentierungen und dem Vergleich der EI-MS-Daten mit Literaturspektren⁴³ wurde dieses fünfte Sterol als (24R)-Ethyl-5 α -cholesta-7-en-3 β -ol (5 α -Stigmast-7-en-3 β -ol) identifiziert (Abb. 2-8, 2A). Dieses unter dem Trivialnamen „Schottenol“ bekannte Δ^7 -Sterol kommt u. a. in den Früchten und dem daraus gewonnenen Öl von *Argania spinosa* (Ziegenbaum) vor und stellt darin, neben Spinasterol, den Hauptbestandteil der Sterolfraktion dar⁴⁴. Der Ziegenbaum ist ausschließlich in Marokko beheimatet, wo das Arganenöl als traditionelles Heilmittel in der Berbermedizin (z. B. gegen Magen-Darm-Beschwerden), zur Pflege der Haut und Haare sowie als Nahrungsmittel verwendet wird. Zufälligerweise von einem Marokko-Aufenthalt mitgebrachtes Arganenöl wurde nach Gewinnung des UVA gaschromatographisch untersucht. Dabei fand sich ein Δ^7 -Sterol der Masse 414, dessen Retention (22,42 min) mit jener des „Kürbissterols“ identisch war. Wichtige Fragmentierungen des Massenspektrums stimmen überein, was als weitere Bestätigung der gefundenen Struktur angesehen wurde (Abb. 2-11, Abb. 2-12). Auffällig ist im Massenspektrum der Molekülpeak bei m/z = 414 mit höchster Intensität (100 %). Die vollständig gesättigte Seitenkette neigt nicht zu Zerfallsreaktionen, weshalb das Molekül bei der Elektronenstoß-Ionisation häufiger intakt bleibt, als Sterole mit Doppelbindungen in der Seitenkette.

Akihisa beschreibt das Vorliegen von (24R)- und (24S)-Ethyl-5 α -cholesta-7-en-3 β -ol in *C. pepo* im Verhältnis 9:1⁴⁵, was ebenfalls für die angenommene Konfiguration spricht. Das 24S-Isomer wurde bei den vorliegenden Untersuchungen allerdings nicht gefunden.

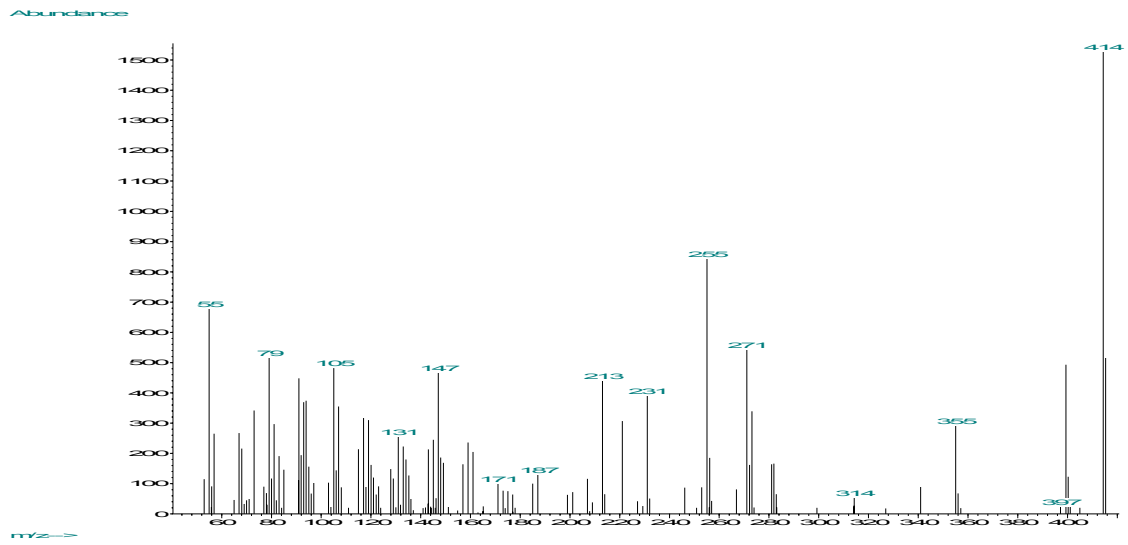


Abb. 2-11: Massenspektrum von (24R)-5α-Cholesta-7-en-3β-ol aus *C. pepo*

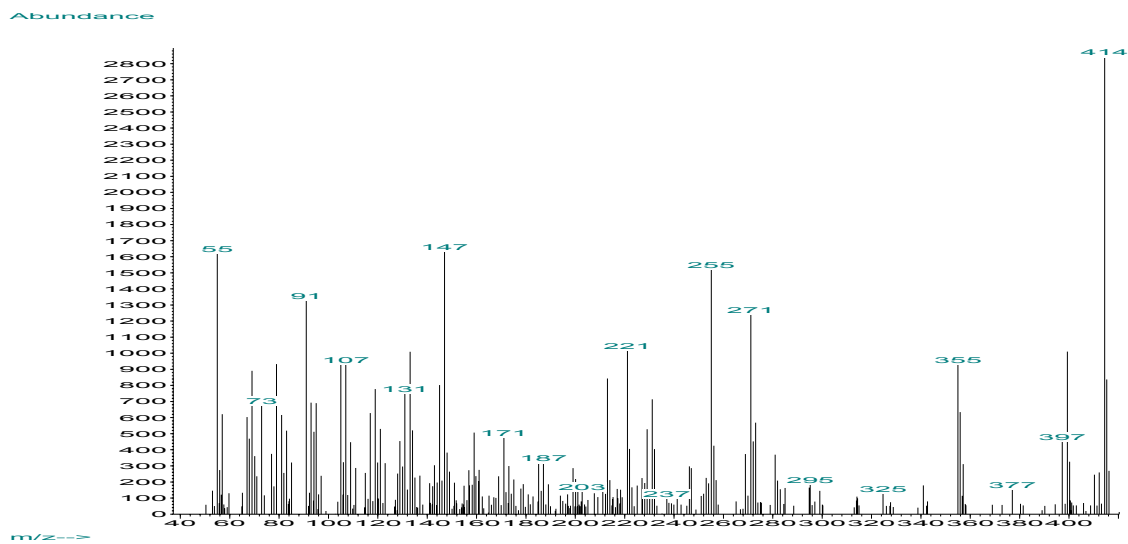


Abb. 2-12: Massenspektrum von (24R)-5α-Cholesta-7-en-3β-ol aus *A. spinosa*

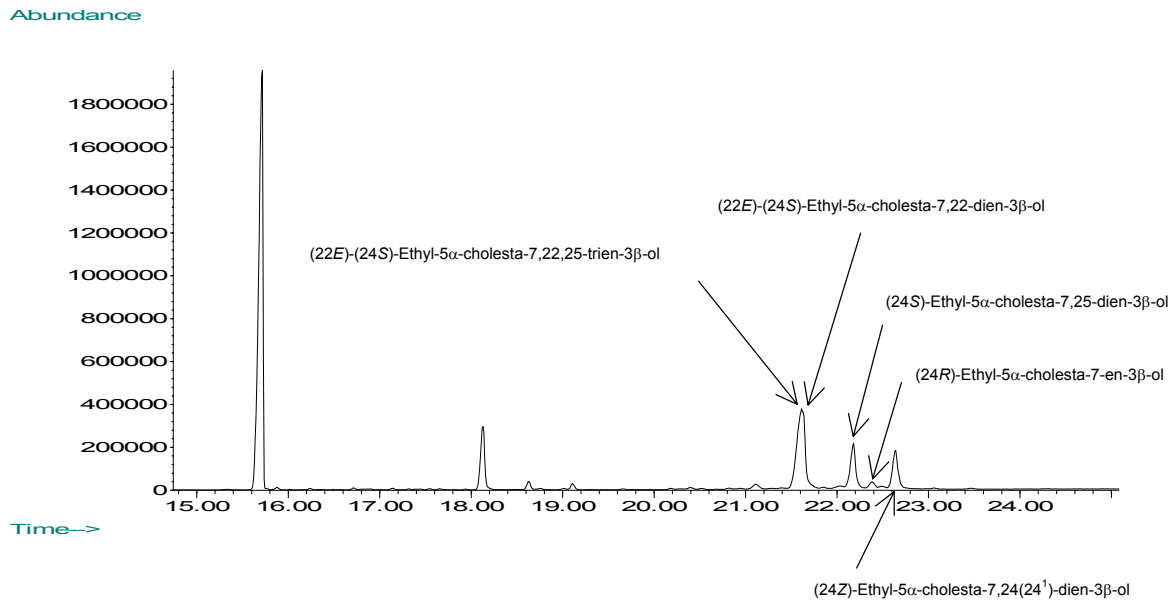


Abb. 2-13: Gaschromatogramm der Δ^7 -Sterole mit Struktur-Zuordnung

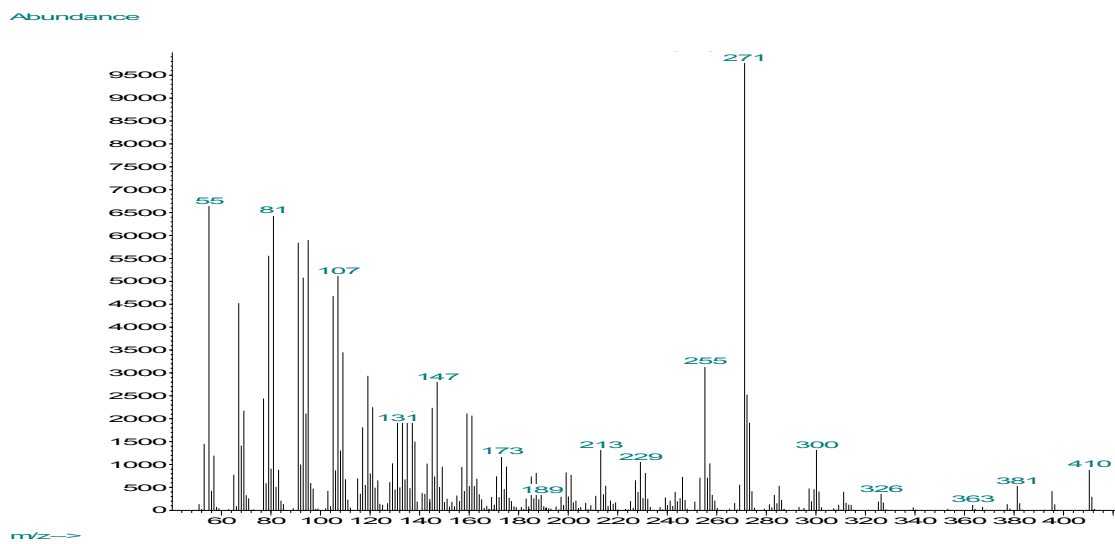


Abb. 2-14: EI-Massenspektrum von (22E)-(24S)-Ethyl-5 α -cholesta-7,22,25-trien-3 β -ol (5A)
 $t_R = 21,59$ min, $M^+ = 410$

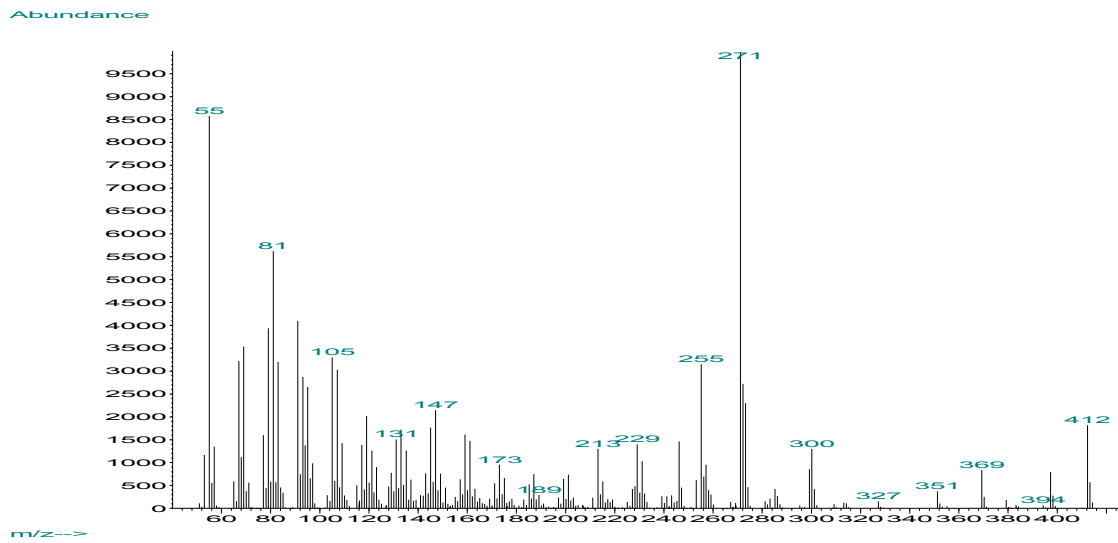


Abb. 2-15: EI-Massenspektrum von (22E)-(24S)-Ethyl-5 α -cholesta-7,22-dien-3 β -ol (3A)
 $t_R = 21,61$ min, $M^+ = 412$

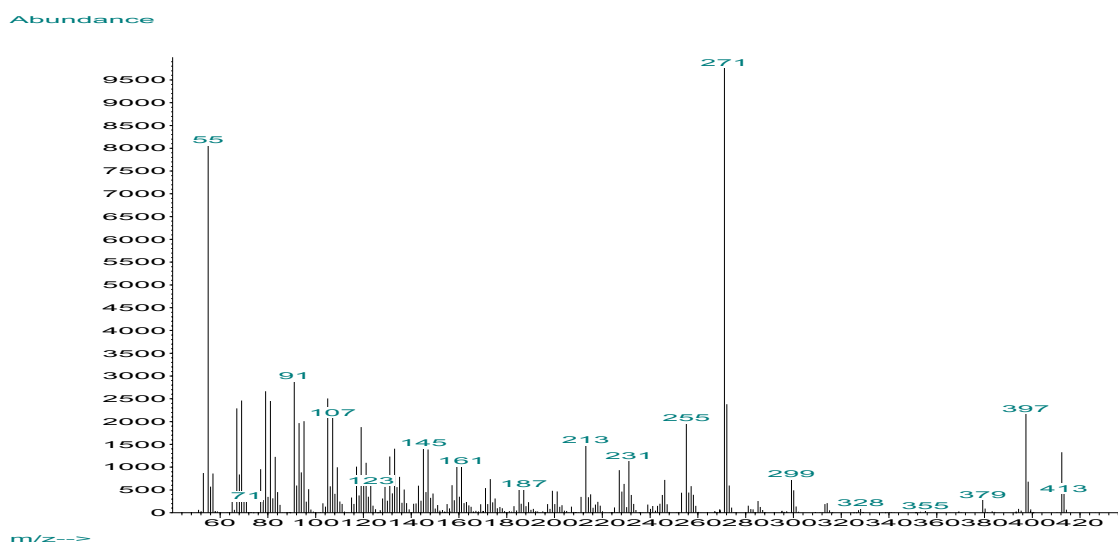


Abb. 2-16: EI-Massenspektrum von (24S)-Ethyl-5 α -cholesta-7,25-dien-3 β -ol (4A)
 $t_R = 22,25$ min, $M^+ = 412$

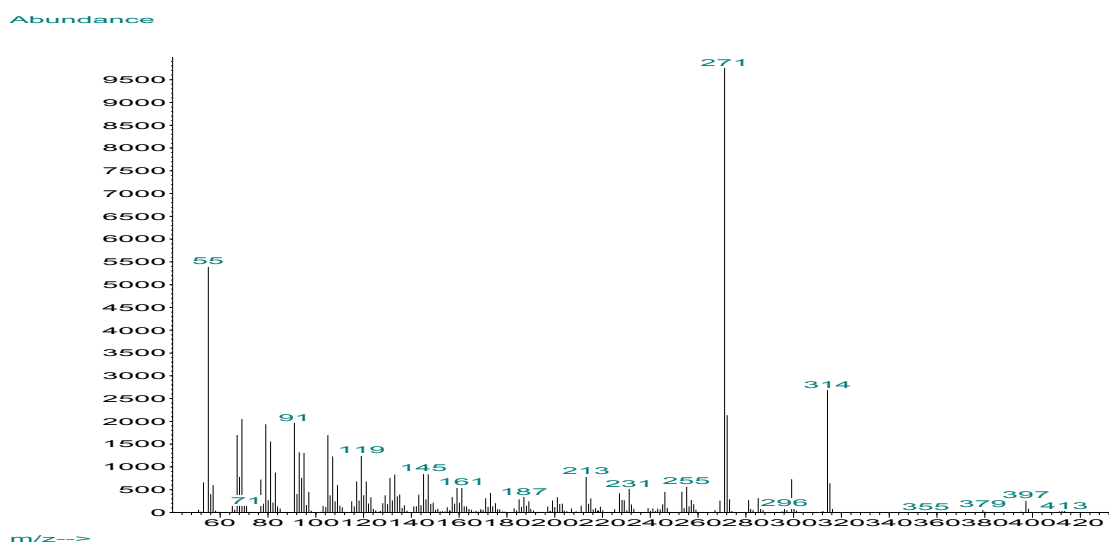


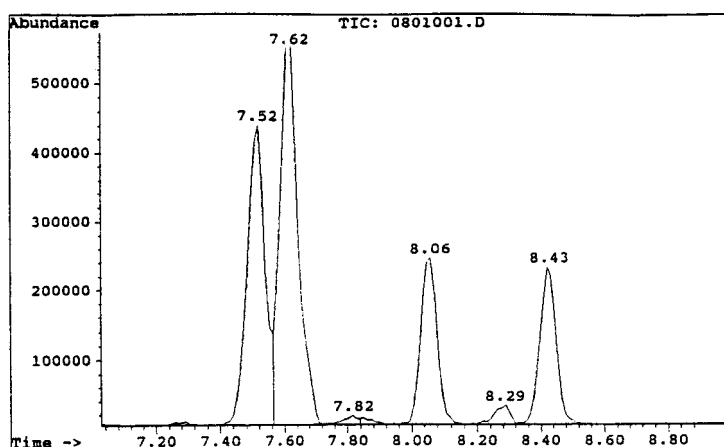
Abb. 2-17: EI-Massenspektrum von (24Z)-Ethyl-5 α -cholesta-7,24(24¹)-dien-3 β -ol (1)
 $t_R = 22,69$ min, $M^+ = 412$

Wie bereits unter 1.4 erwähnt, sollte die von A. Torun getroffene Zuordnung von Strukturen zu Sterol-Signalen in Gaschromatogrammen überprüft werden. Die damals verwendete analytische Methode wird bis heute beim Hersteller zur routinemäßigen Gehaltsprüfung von Droge und Extrakt eingesetzt.

Da hierbei ein anderes Trennsystem zum Einsatz kommt als in der vorliegenden Arbeit (Säulentyp DB-1 (100% Dimethylpolysiloxan), isothermes Trennprogramm bei 300 °C), weichen Elutionsreihenfolge und Retentionszeiten von den hier vorliegenden Ergebnissen ab. Durch den Vergleich der eigenen Massendaten mit den von Torun aufgenommenen Spektren kann jedoch eine eindeutige Zuordnung der Strukturen zum Chromatogramm getroffen werden.

Im Ergebnis sind zwei von fünf Verbindungen in Toruns Arbeit richtig zugeordnet. Zwei weitere damals vorgeschlagene Δ^7 -Sterole liegen tatsächlich im Extrakt vor, sind aber den falschen Signalen zugeordnet. Etwas verwirrend ist die genannte Struktur des 24 ξ -Ethyl-5 α -cholest-7-en-3 β -ols mit nicht definierter Stereochemie am C-24. Torun nennt zusätzlich das 24 α -Ethyl-5 α -cholest-7-en-3 β -ol, welches eines der beiden Stereoisomere von 24 ξ -Ethyl-5 α -cholest-7-en-3 β -ol darstellt. Weiter ist diese Struktur einem Signal mit einem Molekülpeak von 412 Da zugeordnet, obwohl sie ein Sterol mit der Relativen Molekülmasse 414 bezeichnet. Dem schwachen Signal bei 7,82 min ist in der Arbeit kein Massenspektrum zugeordnet. Möglicherweise handelt es sich um Δ^5 -Stigmasterol.

Abb. 2-18 zeigt nochmals tabellarisch die vergleichende Strukturzuordnung.



t_R [min]	m/z (M^+)	vorschlagene Struktur von Torun	bestätigte Struktur	
7,52	410	24 β -Ethyl-5 α -cholesta-7,22,25-trien-3 β -ol	5A 24 β -Ethyl-5 α -cholesta-7,22,25-trien-3 β -ol	<input checked="" type="checkbox"/>
7,62	412	(24Z)-Ethyliden-5 α -cholest-7-en-3 β -ol	3A 24 α -Ethyl-5 α -cholesta-7,22-dien-3 β -ol	<input type="checkbox"/>
8,06	412	24 α -Ethyl-5 α -cholesta-7,22-dien-3 β -ol	4A 24 β -Ethyl-5 α -cholesta-7,25-dien-3 β -ol	<input type="checkbox"/>
8,29	414	24 α -Ethyl-5 α -cholest-7-en-3 β -ol	2A 24 α -Ethyl-5 α -cholest-7-en-3 β -ol	<input checked="" type="checkbox"/>
8,43	412	24 ξ -Ethyl-5 α -cholest-7-en-3 β -ol	1 (24Z)-Ethyliden-5 α -cholest-7-en-3 β -ol	<input type="checkbox"/>

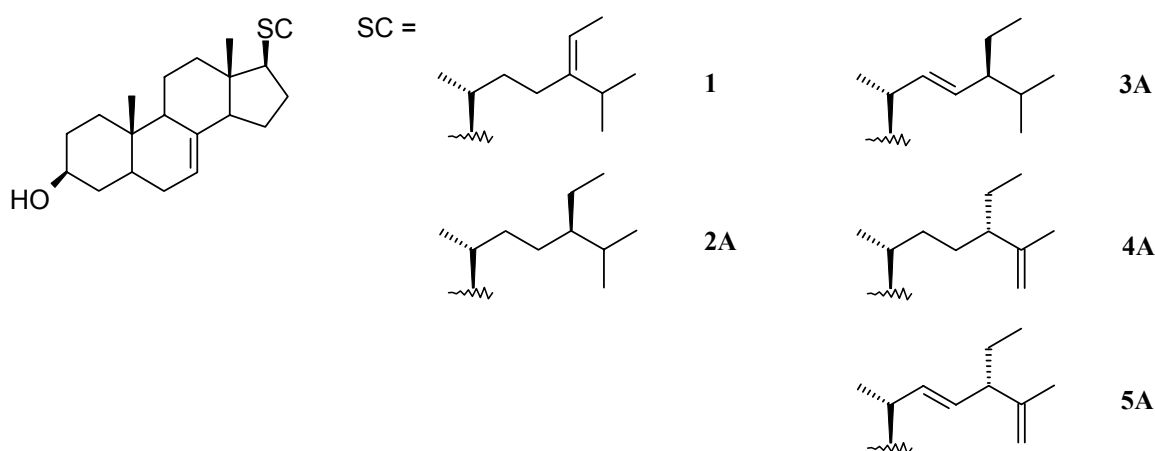


Abb. 2-18: Vergleichende Struktur-Zuordnung der Δ^7 -Sterole

2.4 BIOSYNTHESE VON STEROLEN IN PFLANZEN

Allen identifizierten Δ^7 -Sterolen liegt die Struktur eines 24-Ethyl-5 α -cholest-7-enols zugrunde. Besondere Beachtung verdient die Konfiguration am C-24. Im Falle von (24*Z*)-Ethyl-5 α -cholesta-7,24(24¹)-dien-3 β -ol (Avenasterol, **1**) ist dieses Ethyliden-substituiert und stellt somit kein Asymmetriezentrum dar. Alle anderen Sterole sowie ihre Glucoside weisen in der Seitenkette an C-24 entweder die (*R*)- oder die (*S*)-Konfiguration auf, besitzen also eine α - oder β -ständige Ethylgruppe. In keinem Fall wurden α - und β -Form einer Grundstruktur nebeneinander gefunden.

Eine mögliche Erklärung dafür fand sich beim Studium von Arbeiten zur Biosynthese von Sterolen in Anthophyta (Blütenpflanzen). Auf dieser Basis wurde eine Hypothese zur Entstehung der im Kürbissamenextrakt gefundenen Sterole bzw. Sterolglucoside aufgestellt. Die Synthesepfade sind bis heute nur teilweise aufgeklärt und differieren in unterschiedlichen Pflanzen. Versuche mit ³H- und ¹⁴C-markierten Substraten von Goad et al.⁴⁶ sowie McKean und Nes⁴⁷ zeigen jedoch, daß die Einführung der 24-Ethylgruppe in die Seitenkette für das α - und das β -Epimer auf verschiedenen Wegen erfolgen muß.

Bei der Modifikation der Cycloartenol-Seitenkette fungiert S-Adenosylmethionin als Methylgruppendonator; durch Transmethylierung entstehende Carbeniumionen werden jeweils durch Abspaltung eines Protons stabilisiert. Ein Intermediat mit Ethylidenrest entsteht nur beim „ α -Weg“ (**1**). Durch anschließende Isomerisierung und Reduktion wird die Stereochemie determiniert. Bei der Entstehung der 24 β -Ethyl-Seitenkette entfällt die Isomerisierung zum $\Delta^{24(25)}$ -Sterol, die Festlegung der Konfiguration erfolgt bereits bei der Alkylierung.

Allgemein wird in Pflanzen beobachtet, daß die β -Ständigkeit des Ethylrests mit einer Unsättigung in Position 25 assoziiert ist^{48,49,50}. Dies ist, wie aus Abb. 2-19 ersichtlich, auf den Ablauf der Biosynthese zurückzuführen. Die Einführung der Doppelbindung in Position 22 erfolgt erst später durch eine bislang nicht näher bekannte Dehydrogenase⁴⁰ (Verbindungen **3A**, **5A**).

24 α - und 24 β -Ethyl- Δ^7 -Sterole sind im untersuchten Extrakt in etwa gleicher Quantität vertreten (siehe S. 78). Dies steht im Einklang mit Ergebnissen früherer Arbeiten, die in Kürbissamen ein Mengenverhältnis von etwa 50 : 50 beschreiben. Bei der Keimung und Entwicklung der Pflanze verschiebt sich das Verhältnis zugunsten der 24 α -Ethyl-Sterole⁵¹.

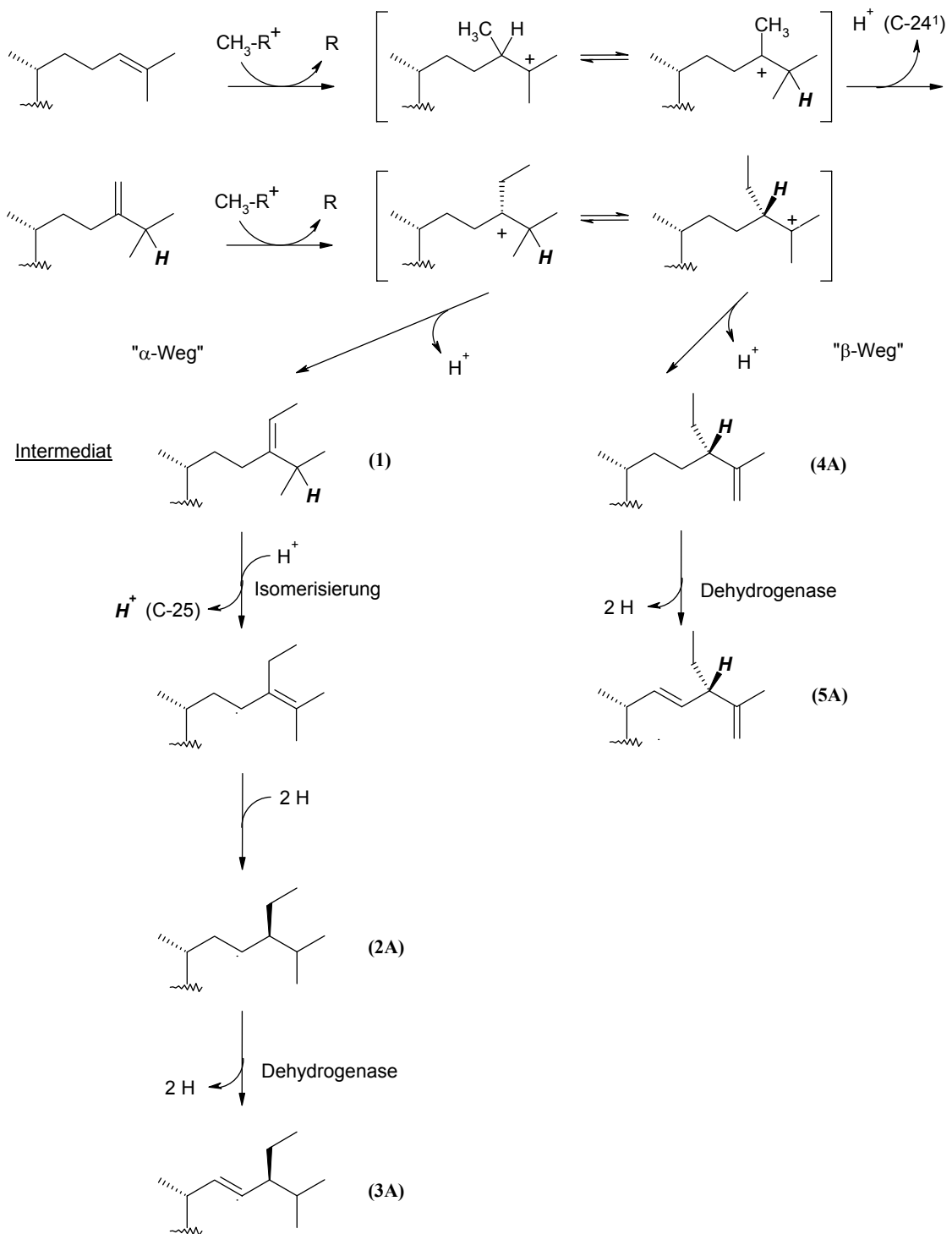


Abb. 2-19: Hypothetischer Weg der Sterolbiosynthese in *C. pepo*

3 ISOLIERUNG UND AUFKLÄRUNG DER STRUKTUREN VON STEROLGLYKOSIDEN

Sterolglykoside als neutrale Lipide werden aus Pflanzenmaterial üblicherweise durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Aceton extrahiert und von Begleitsubstanzen gereinigt^{52,53}. Aufgrund der komplexen Matrix des Kürbissamendickextrakts und des hohen Anteils an Chlorophyll wurden erste Versuche mit dieser Methodik jedoch bald eingestellt: Sterolglykoside waren aus den erhaltenen Fraktionen mit herkömmlichen Mitteln wie der Flüssig-Flüssig-Extraktion nicht zu isolieren, da grenzflächenaktive Begleitstoffe dies verhinderten.

Aufgrund der äußerst geringen Mengen an Sterolglykosiden in der Matrix wurde eine Anreicherung über präparative DC nicht in Betracht gezogen. Die Verunreinigung der Fraktionen, insbesondere mit Chlorophyll, schloß Versuche mit präparativer HPLC ebenfalls aus. Deshalb sollte zunächst ein Verfahren gefunden werden, mit dem die gesuchten Analyten weitestgehend von störenden Begleitsubstanzen befreit werden können.

Ein weiteres Problem stellte das Fehlen geeigneter Referenzsubstanzen für die Chromatographie dar. Die gaschromatographische Analytik – mit Strukturaussage durch massenspektrometrische Detektion – bietet für Sterolglykoside keinen Zugang, da diese nicht unzersetzt verdampfbar sind. Bei der Komplexizität der Matrix und den relativ unspezifischen Nachweisreagenzien für Sterolglykoside konnte zu Beginn der Versuchsreihen mit DC/FSC keinerlei Aussage getroffen werden, ob in einer isolierten Fraktion die Zielverbindungen überhaupt enthalten waren.

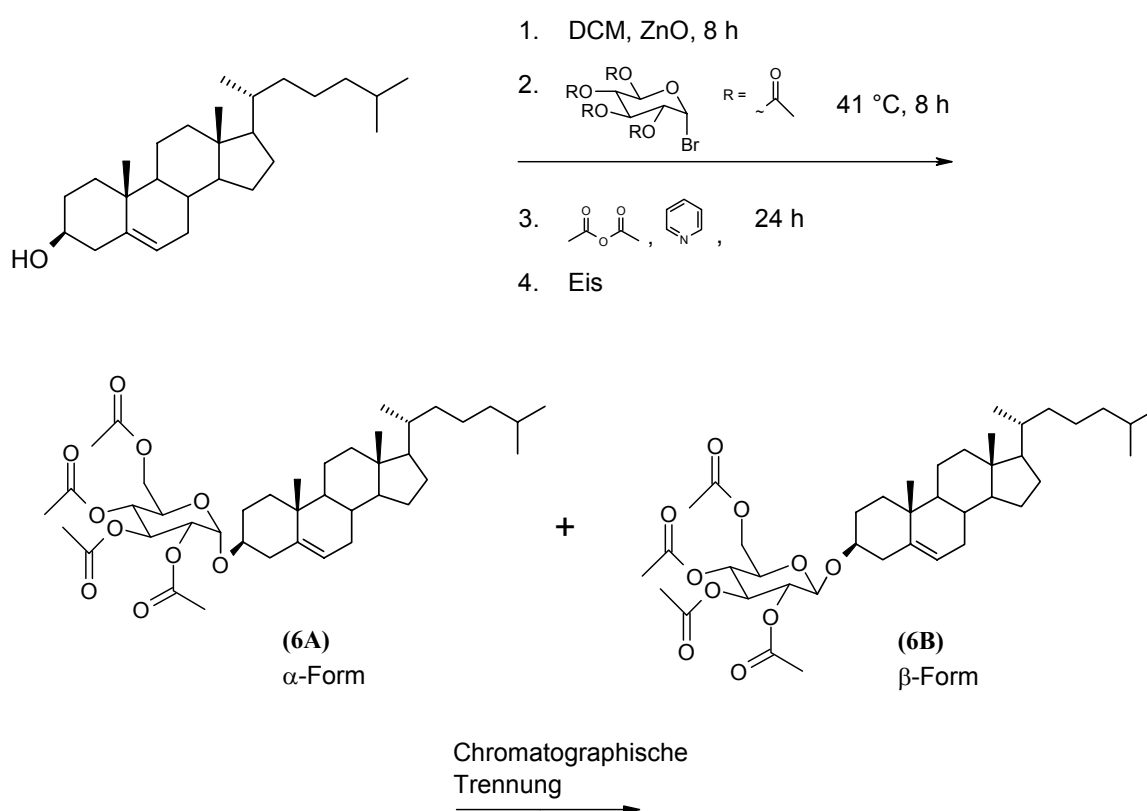
Recherche in der Literatur, Chemikalien- und Biochemika-Katalogen und im Internet lieferten keine Bezugsquelle für Sterolglykoside. Daher wurde die Entscheidung getroffen, eine Modellsubstanz selbst darzustellen. Mit ihrer Hilfe sollten dann der dünnschichtchromatographische Nachweis ermöglicht sowie die geeignete Probenvorbereitung und HPLC-Analytik entwickelt werden.

3.1 SYNTHESE EINER MODELLSUBSTANZ

Da in der Literatur ausschließlich auf monoglykosidische Sterolverbindungen als Inhaltsstoffe von *C. pepo* verwiesen wird und das Aglykon hierbei immer mit Glucose verknüpft ist, wurde nach einer Synthese für Sterolglucoside gesucht. Als Ausgangssubstanz wurde das kommerziell günstig erhältliche Cholesterol gewählt. Aus diesem Δ^5 -Sterol sollte nun das Mono-O-Glucosid hergestellt werden.

Eine Synthesevorschrift, die mit nur zwei grundlegenden Schritten in einem Eintopfverfahren auskommt, fand sich in Nagarajans Arbeit von 1998⁵⁴. Cholesterol wird hierbei in Gegenwart von Zinkoxid mit 2,3,4,6-Tetra-O-Acetyl- α -D-glucopyranosylbromid (Acetobromglucose) umgesetzt. Um evtl. „verlorengegangene“ Acetylgruppen wieder zu „ergänzen“ und damit ein einheitliches Gemisch von tetraacetyliertem α - und β -Anomer zu erhalten, wird anschließend mit Acetanhydrid/Pyridin acetyliert.

Auf der Stufe dieser Zwischenprodukte (**6A**, **6B**) kann dann eine chromatographische Trennung von α - und β -Anomer vorgenommen werden.



In ersten Versuchen fand keine Umsetzung zu den gewünschten Produkten statt (Kontrolle: DC; System 3, Detektion C). Die gaschromatographische Untersuchung des Reaktionsgemischs ergab, daß Cholesterol offensichtlich unter diesen Reaktionsbedingungen unter Dehydratisierung zu Cholesta-3,5-dien umgewandelt wurde. Neben der Identifizierung durch das Massenspektrum wurde eine Verfärbung des reinweißen Ansatzes über hell- und dunkelblau nach tiefviolett beobachtet, was vermutlich auf die Dimerisierung von Cholesta-3,5-dien (**7**) und anschließende oxidative Bildung farbiger Kohlenwasserstoffe in der Art einer Liebermann-Burchard-Reaktion⁵⁵ zurückzuführen ist (Abb. 3-1). Diese Farbreaktion auf Sterole wird üblicherweise in saurem, oxidierendem

Medium durchgeföhrt. Dabei entstehen über oxidative Kupplung Polyene, welche zu mesomeriestabilisierten Carbeniumionen weiteroxidiert werden.

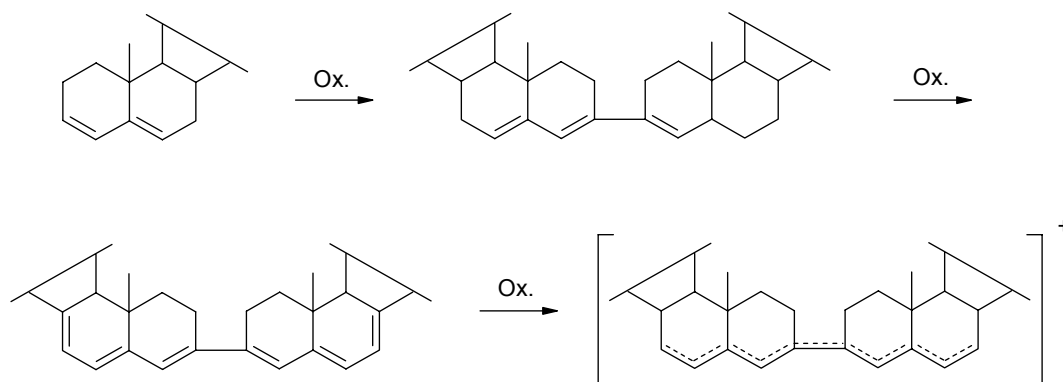


Abb. 3-1: Reaktion nach Liebermann-Burchard

Aus der eingesetzten Acetobromglucose hatten sich 1,2,3,4,6-Penta-O-acetylglucose (8) sowie 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-methoxyglucose (9) gebildet, welche ebenfalls über ihre Massenspektren identifiziert wurden.

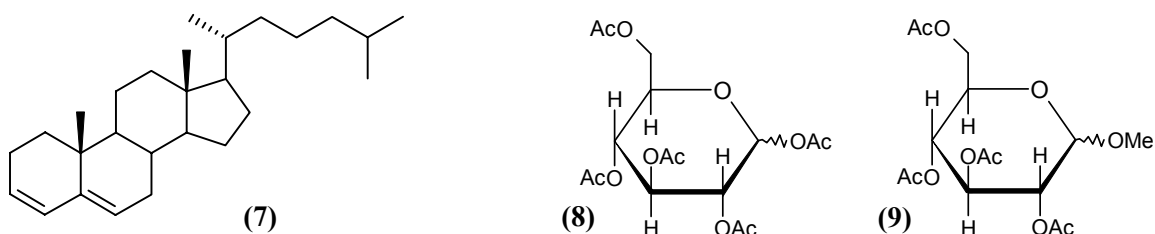


Abb. 3-2: Abbauprodukte Cholesta-3,5-dien, Acetylglucose-Derivate

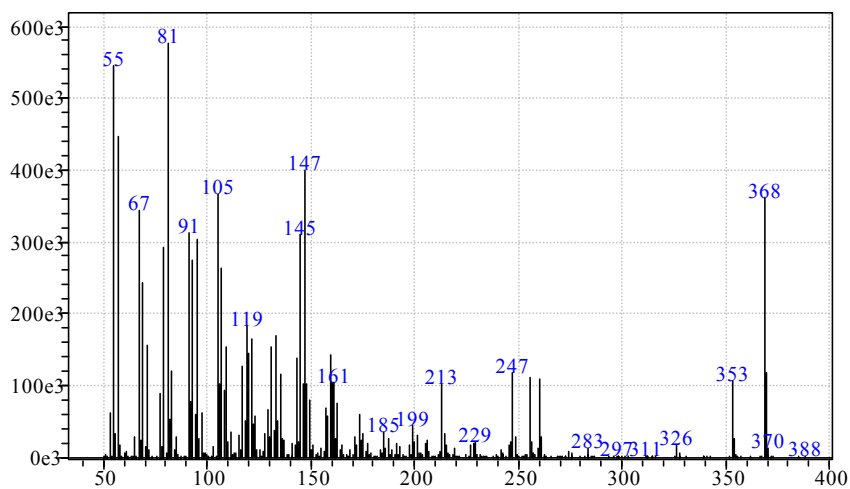


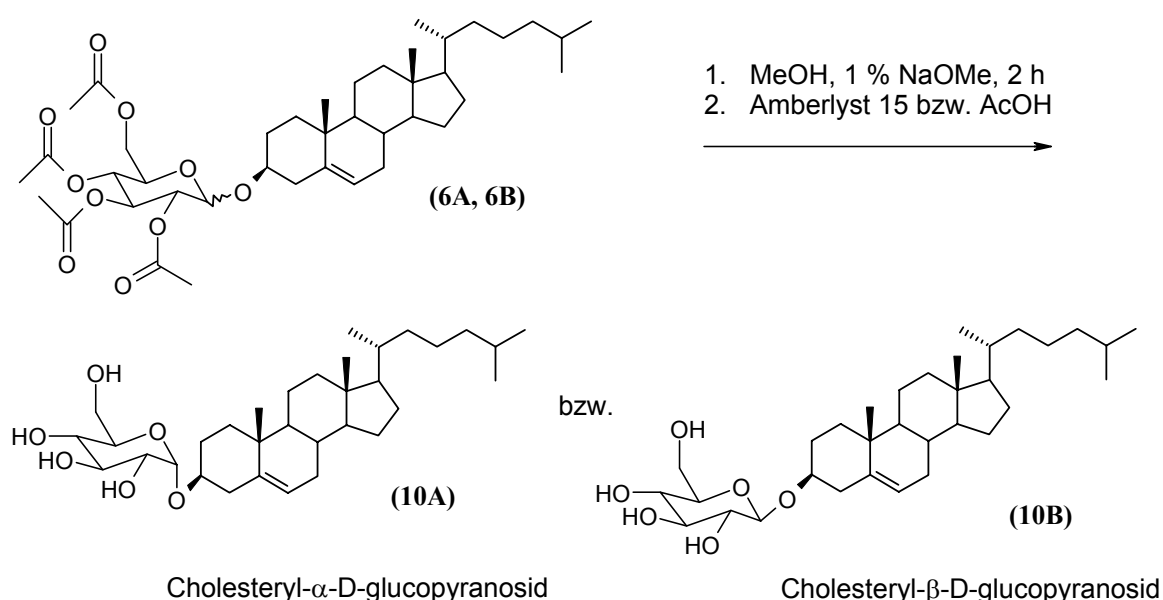
Abb. 3-3: EI-Massenspektrum von Cholesta-3,5-dien (7)

Eine Erklärung findet sich vermutlich in der Instabilität von Acetobromglucose gegen Feuchtigkeit. Die Umsetzung wurde mit einer neuen, in Kühlkette gelieferten Charge von Merck unter bestmöglich wasserfreien Bedingungen durchgeführt (getrocknetes Lösungsmittel, ausgeheizte Kolben, Begasung mit getrocknetem Stickstoff).

Nach mehreren erfolglosen Ansätzen wurde auch noch ein Modellversuch mit Cyclohexanol durchgeführt. Auch hier wurde kein Glucosid erhalten, sondern nur Abbauprodukte.

Es folgten noch Versuche mit Katalysatorzusatz, so z. B. mit Zinkacetylacetonat in Anlehnung an Nishizawa⁵⁶ und mit Silber- sowie Quecksilbersalzen (AgNO_3 , HgBr_2), die ebenfalls nicht zum Erfolg führten.

Letztendlich wurde ein Ansatz mit hoher Edukt-Stoffmenge gewählt, der dann das Gemisch von α - und β -Form des tetraacetylierten Zwischenprodukts lieferte – wenn auch in äußerst geringen Ausbeuten. Nach der Umsetzung von Cholesterol und Acetobromglucose wurde der Ansatz über Kieselgur filtriert, um dispergiertes Zinkoxid und Zinkhydroxid abzutrennen und anschließend acetyliert. Die anomeren Zwischenprodukte wurde durch FSC an Kieselgel mit Hexan/Essigsäureethylester (3:1) voneinander getrennt (DC-Kontrolle: System 1, Detektion A). Das zuerst eluierende β -Anomer wurde in einer Ausbeute von 1,59 % erhalten, das α -Anomer in einer Ausbeute von 1,15 % (Lit.⁵⁴: Cholesterol-(α/β)-D-tetra-O-acetylglucosid 73 %). Dies entspricht einer β -Selektivität von 58 % (Lit.⁵⁴: 88 %).



Die anschließende Alkohololyse des Cholesteryl-tetra-O-acetyl- α - bzw. - β -D-glucopyranosids mit Methanol/NaOMe verlief quantitativ – allerdings erst nach zahlreichen erfolglosen Versuchen. Für die erfolgreiche Desacetylierung war es essentiell, frisch aus

Natrium und Methanol hergestellte Natriummethanolatlösung zu verwenden. Außerdem mußte der Lösung aufgrund der schlechten Löslichkeit der Edukte 50 % Dichlormethan zugesetzt werden. Statt Amberlyst wurde Eisessig zur Neutralisation verwendet, da von dem Ionenaustauscher sehr große Mengen benötigt wurden.

Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt, je nach Edukt α - bzw. β -Cholesterylglucosid (**10A**, **10B**), aus Essigsäureethylester umkristallisiert. Die Ausbeute der Desacetylierungs-Reaktion lag jeweils bei annähernd 100 %.

Die Identität der Produkte wurde durch $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestätigt. Das Signal (Dublett) für das Proton am anomeren C-Atom (C-1') weist in der α -Form eine deutlich kleinere Kopplungskonstante zum Proton an C-2' auf (equatorial/axiale Kopplung; $^3J_\alpha = 3,9$ Hz), als in der β -Form (axial/axiale Kopplung; $^3J_\beta = 7,9$ Hz).

$\delta_{\text{H-1}'}$ ist damit 4,98 ppm für Cholesteryl- α -D-glucopyranosid und 4,41 ppm für Cholesteryl- β -D-glucopyranosid (siehe Abb. 3-4).

Hieraus ergab sich außerdem, daß die Schmelzpunkte der α - und β -Anomere in Nagarajans Publikation offenbar versehentlich vertauscht worden sind.

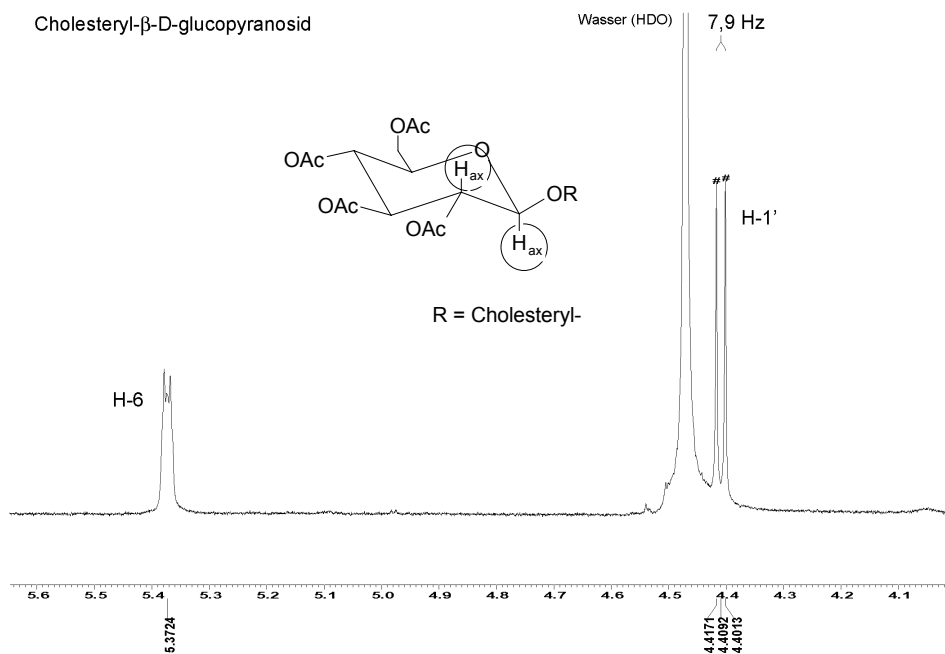
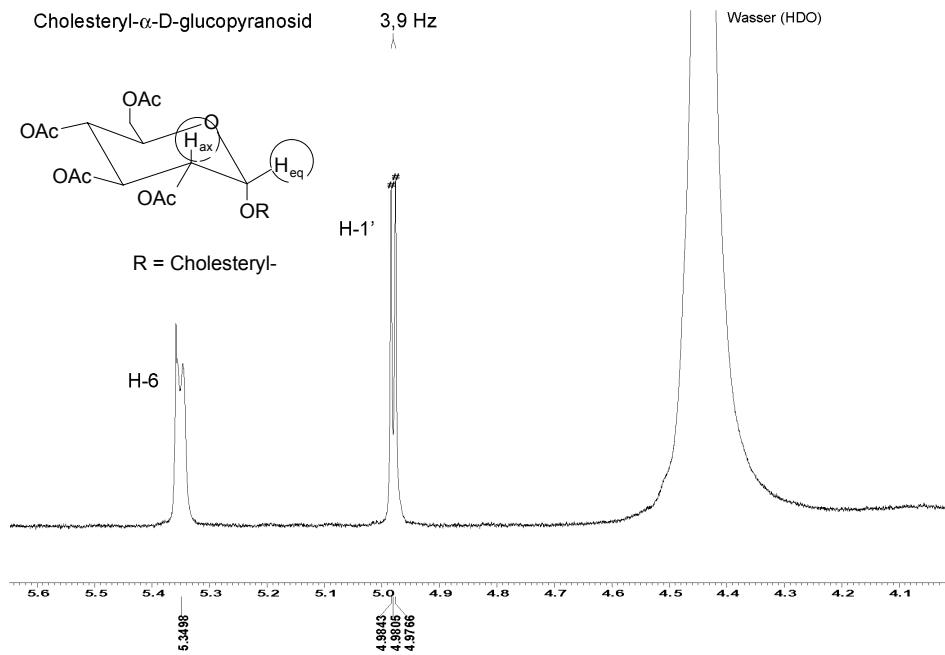


Abb. 3-4: ^1H -NMR-Spektren (Ausschnitte) von Cholesteryl- α -D-glucopyranosid (10A) und Cholesteryl- β -D-glucopyranosid (10B)

3.2 GRUNDLAGEN DER HPLC-MS UND MS/MS-EXPERIMENTE

Die synthetisierten Modellsubstanzen wurde im folgenden eingesetzt, um R_f-Werte und Nachweisreaktionen für die Dünnschichtchromatographie zu prüfen sowie Methoden zur HPLC-Analytik zu entwickeln.

HPLC/DAD-Versuche mit Sterolaglyka hatten einen Nachteil dieser Targets aufgezeigt: Da die Strukturen der gefundenen Substanzen jeweils lediglich zwei oder drei isolierte Doppelbindungen als Chromophore aufweisen, ist eine UV-Detektion nur über die Absorption bei etwa 200 nm Wellenlänge möglich. Eine weitere Unterscheidbarkeit einzelner Analyten durch ihre UV-Spektren ist nicht gegeben. Die Methode der Wahl zur Analytik von freien Sterolen ist deshalb die Gaschromatographie, die zusammen mit massenspektrometrischer Detektion hohe Trennleistung und aussagefähige Daten zur Struktur der einzelnen Analyten liefert.

Für die Stoffklasse der Sterolglykoside scheidet eine Analytik über GC-MS aus, da diese nicht unzersetzt in die Gasphase überführt werden können. Mit einem neu angeschafften Gerät von Applied Biosystems stand jedoch die Kopplungstechnik der HPLC-MS zur Verfügung, so daß doch noch von den in der Sterolanalytik besonders wertvollen Möglichkeiten der Massenspektrometrie Gebrauch gemacht werden konnte.

Im Vergleich zu GC-MS stellt die HPLC-MS ein relativ neues Verfahren dar. Die Arbeitsbedingungen eines Massenspektrometers (Hochvakuum, hohe Temperatur, geringe Flußrate) sind diametral entgegengesetzt zu denen der HPLC (Atmosphärendruck, meist Raumtemperatur, hoher Fluß). Kopplungstechniken für MS und HPLC sind deshalb erst in jüngerer Zeit entstanden⁵⁷.

Die zu analysierenden Spezies werden auch hier in der mobilen Phase des vorgeschalteten Chromatographie-Systems in das MS-System eingebracht. Im Gegensatz zur Gaschromatographie mit verhältnismäßig geringen Flüssen inerten Gase und gasförmigen Analyten, die im MS durch das Hochvakuumssystem leicht abgesaugt werden können, muß hier jedoch der HPLC-übliche Flow von bis zu 1 ml/min u. U. schwer verdampfbarer Flüssigkeit (Wasser) verkraftet werden. Deshalb beschreitet die Ionisierungstechnik der HPLC-MS neue Wege. Sie erfolgt außerhalb des evakuierten MS bei Atmosphärendruck und ermöglicht auch die Ionisierung nicht flüchtiger bzw. sehr empfindlicher Substanzen (z. B. Proteine), wobei das Eluens vor Eintritt ins Vakuum entfernt wird. Die Eluenten sollten dabei möglichst leicht verdampfbar sein. Pufferlösungen unterliegen der Einschränkung, daß die verwendeten Salze möglichst thermolabil oder flüchtig sein sollten, da es sonst zur Kontamination des MS kommt. Insbesondere bei ESI wird durch Zusatz von Salzen die Effizienz des Ionisierungsprozesses erhöht. Gängig sind Ammoniumformiat oder -acetat (2-10 mM). Toleriert werden Konzentrationen bis 50 mM. Zur Steigerung der Ionisationsausbeute werden dem Eluenten häufig auch Ameisen- oder Essigsäure in Konzentrationen von 0,1 bis 1 % zugesetzt.

Die beiden gängigen und hier zur Verfügung stehenden Verfahren der ESI (*electrospray ionisation*) und APCI (*atmospheric pressure chemical ionisation*) sollen im folgenden kurz dargestellt werden. Im Anschluß wird auf die Funktionsweise des verwendeten MS/MS-Systems (Quadrupolgerät) eingegangen.

3.2.1 ESI

ESI nutzt den physikalischen Effekt, daß sich Flüssigkeiten unter bestimmten Bedingungen im elektrischen Feld zu einem Nebel feinsten, hochgeladener Tröpfchen versprühen lassen. Die gelöst vorliegende Probe (hier: HPLC-Flow) wird unter Normaldruckbedingungen durch eine Stahlkapillare geführt. Liegt an dieser eine positive Spannung an (z. B. 5 kV), so entstehen Tropfen, die an Ihrer Oberfläche eine positive Ladung (z. B. durch H_3O^+ -Ionen) und im Inneren die Analyt-Ionen tragen. Das Lösungsmittel verdampft (ggf. durch zusätzliches Beheizen des Sprays), so daß die Tropfen immer kleiner werden und es aufgrund der starken Abstoßungskräfte zu einem explosionsartigen Zerfall (Coulomb-Explosion) in kleinere Tröpfchen kommt. Dies passiert mehrmals, so daß die Tropfengröße weiter abnimmt und zum Schluß nur noch einzelne Teilchen in einer Solvathülle vorliegen. Durch Kollision mit Stickstoffmolekülen auf dem Weg in den Massenanalysator (s. u.) werden die Analyten schließlich vollständig desolvatisiert. Ein Teilchen ist dabei umso höher geladen, je größer es ist (Faustregel: eine Ladung je 1000 Dalton). In analoger Weise lassen sich Moleküle durch Anlegen einer entsprechenden Spannung negativ ionisieren.

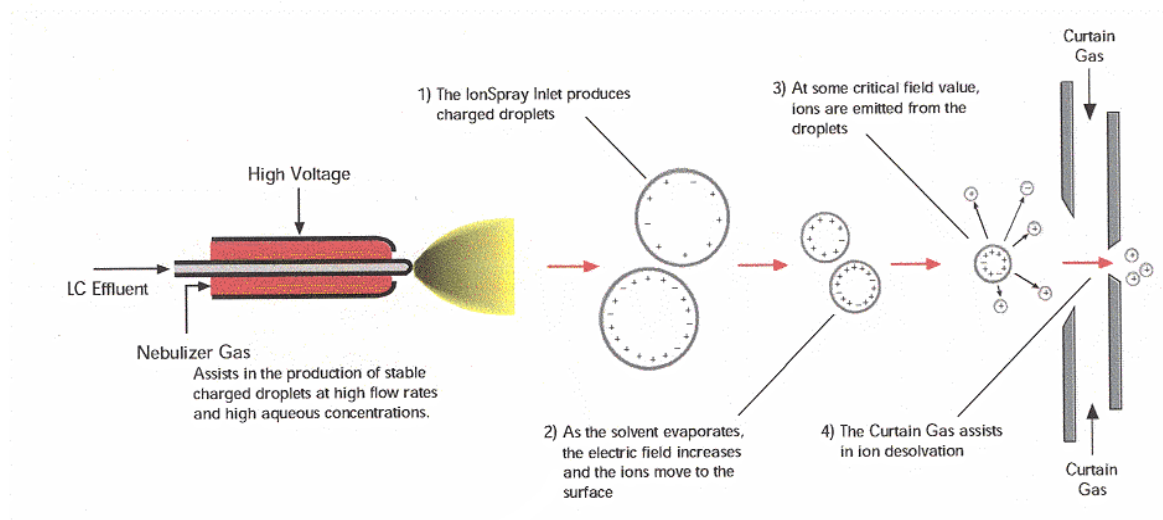


Abb. 3-5: Erzeugung von Molekülionen durch ESI

Wegen der notwendigen Bildung der Ionen bereits in der flüssigen Phase eignet sich ESI v. a. zur Untersuchung polarer und ionischer Verbindungen. Die Ionisation kann dabei schon bei Raumtemperatur erfolgen. Damit ist dieses Verfahren ideal geeignet für thermolabile Substanzen wie Proteine. Durch die hohe Aufladung großer Moleküle

ergeben sich geringe Masse-Ladungs-Verhältnisse (m/z), was die Verwendung von Analysatoren mit begrenztem Massenbereich zuläßt (Quadrupole, Ionenfallen). So erhält beispielsweise ein Protein mit einem Molekulargewicht von 30 kDa und einer 30fachen positiven Ladung lediglich $m/z = 1000$.

3.2.2 APCI

Die Technik der APCI verwendet etwas „härtere“ Ionisationsbedingungen als ESI. Der HPLC-Strom wird durch verschiedene Gasflüsse (*nebulizer* und *auxiliary gas*) zerstäubt, fokussiert und anschließend durch Erhitzen verdampft. Im Austrittsbereich des Gasstroms liegt die Corona, eine Metallnadel, an der eine Hochspannung angelegt ist. Dadurch entstehen aus den Lösungsmittelmolekülen Reaktandionen, die im Anschluß Analytmoleküle ionisieren.

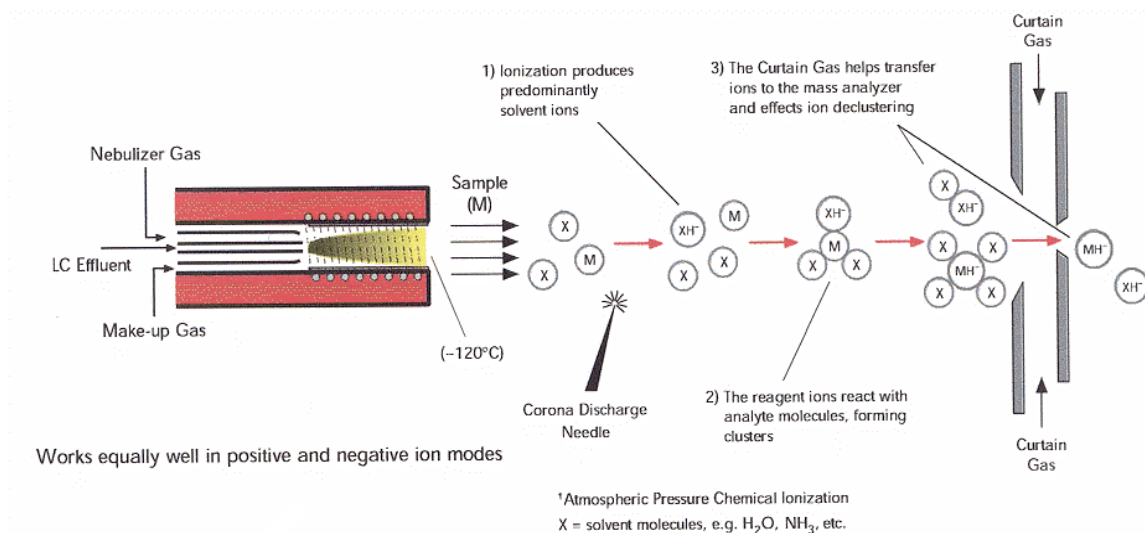


Abb. 3-6: Erzeugung von Molekülionen durch APCI

Die Ionenausbeute wird bei der APCI durch Temperatur und Gasflüsse stark beeinflusst. Diese Parameter müssen deshalb dem jeweiligen Analysenproblem angepaßt werden. APCI eignet sich im Vergleich zu ESI auch für weniger polare Spezies. Da hier keine mehrfach geladenen Ionen entstehen, ist die Technik zweckmäßig für relativ kleine Moleküle.

3.2.3 Curtain Gas Interface

Die erzeugten Ionen, ggf. umgeben von einer Solvathülle, müssen nun in das Hochvakuum des MS eingebracht werden. Zunächst passieren sie einen Stickstoff-Vorhang (*curtain gas*), der ungeladene Teilchen am Eintritt ins MS hindert, während geladene Spezies durch die jenseitig anliegende Beschleunigungsspannung

(umgekehrtes Vorzeichen zur Analytladung) hineingezogen werden: An der *orifice plate*, sozusagen die Eingangstüre des MS, liegt das *declusterung potential* DP an, welches bis ca. 60 V Teilchen unfragmentiert passieren läßt. Der Druck liegt hier in der Größenordnung von 10^2 Pa. Eine ringförmige Elektrode, der *focussing ring*, bündelt den Teilchenstrahl, der durch den sog. *skimmer* ins Hochvakuum eintritt (1 Pa) und durch Q0, eine Art kurzen Vor-Quadrupol mit anliegendem *entrance potential*, nochmals fokussiert und an das eigentliche Quadrupolsystem weitergeleitet wird.

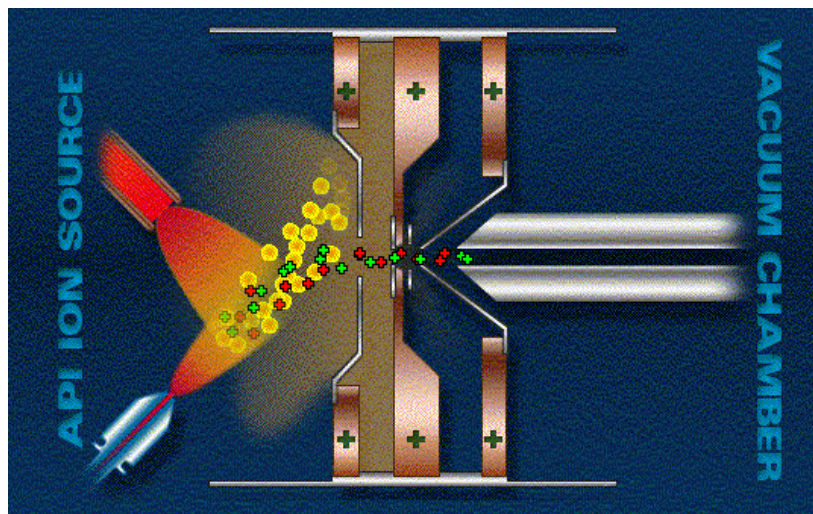


Abb. 3-7: Ionentransfer von der Ionenquelle (Normaldruck) ins Hochvakuum des MS

3.2.4 MS/MS-Experimente

Das für die Analytik der Sterolglucoside eingesetzte API 2000-Gerät von Applied Biosystems stellt ein sogenanntes *triple quad*-System dar. Zusätzlich zum Aufbau eines „normalen“ *single*-Quadrupolsystems (Q1) sind hier nachfolgend eine Stoßzelle (Q2) und ein weiterer Quadrupol (Q3) angeordnet, bevor die generierten Ionen auf den CEM (*channel electron multiplier*) treffen und ein meßbares Signal erzeugen.

Ein *single quad*-System erlaubt zwei Meßmethoden:

scan: ein Massenbereich wird abgetastet, z. B. 50-500 m/z

SIM (single ion monitoring): man beobachtet nur bestimmte Spezies, z. B. m/z = 386, 410, 412

Diese Experimente können natürlich auch mit dem *triple quad*-System durchgeführt werden, wenn die Stoßzelle evakuiert ist und Q3 auf „Durchlaß“ steht. Wird in die Stoßzelle (Q2) jedoch das sogenannte *collision gas* eingebracht, so lassen sich aus den

Ionen, die Q1 passiert haben, Fragmentationen erzeugen. Im Q3 können diese weiter klassifiziert werden. Daraus ergeben sich zusätzlich mögliche Experimente:

product ion scan:

Welche Fragmente entstehen aus dem Target?

Q1 läßt eine bestimmte Spezies passieren. Q3 (*scan mode*) ermittelt die daraus entstandenen Fragmente.

precursor ion scan:

Aus welchen Spezies entsteht ein Fragment bestimmter Masse?

Ein Signal wird nur aufgezeichnet, wenn ein bestimmtes Fragmentation Q3 passiert. Die Masse des zugehörigen „Eltern-Ions“ (festgestellt durch Q1) wird ausgegeben.

neutral loss:

Welche Analyten verlieren bei ihrer Fragmentierung das gleiche (ungeladene) Fragment?

Ein Signal wird dann aufgezeichnet, wenn zwischen den in Q1 und Q3 gemessenen Massen eine bestimmte Differenz besteht.

MRM (*multi reaction monitoring*):

Es wird nur ein einziger Massenübergang detektiert.

Der gesuchte Analyt produziert ein charakteristisches Fragment; nur bei Auftreten dieses Ereignisses erhält man ein Signal. Äußerst selektiv, praktisch kein Untergrundrauschen.

Für die Untersuchungen an Sterolglykosiden wurde insbesondere von den Experimenten *product ion scan* und *neutral loss* Gebrauch gemacht.

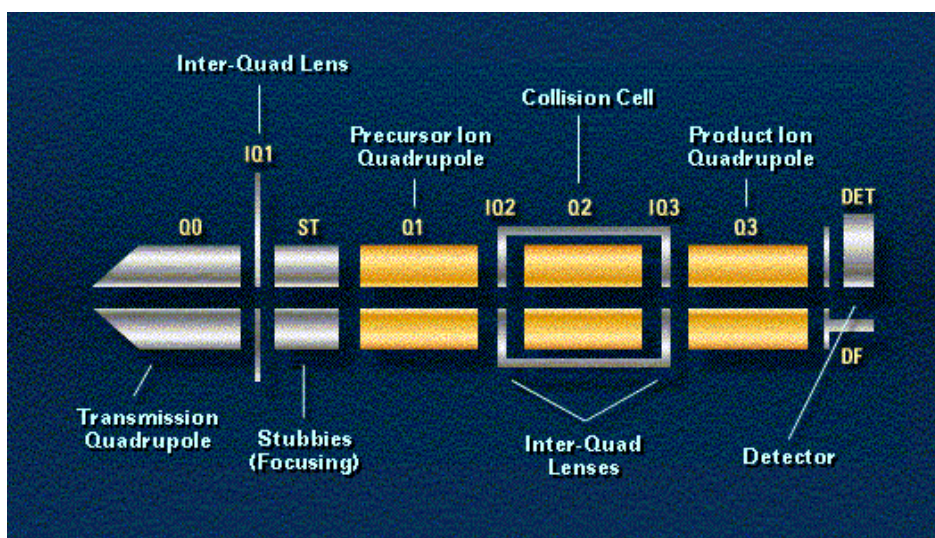


Abb. 3-8: Aufbau des verwendeten Triple Quad MS

3.3 METHODENENTWICKLUNG MIT DER MODELLSUBSTANZ

3.3.1 HPLC-Trennung

Das synthetisch erhaltene Cholesterol- β -D-glucosid wurde als Modellsubstanz zur Entwicklung einer HPLC-Methode eingesetzt. Als zu einem späteren Zeitpunkt Sterolglykoside aus Kürbissamen zur Verfügung standen, wurden die Parameter angepaßt. Die verwendeten Säulen sowie die Trennbedingungen sind unter 5.3.4 aufgeführt.

3.3.2 Kalibrierung des MS-Systems

Um spezifische und empfindliche HPLC-MS-Untersuchungen durchführen zu können, müssen die Geräteparameter – insbesondere bei APCI – den Analyten angepaßt werden. Hierzu bedient man sich des sogenannten *tune mode*, bei welchem kontinuierliche Infusion eines Vertreters der zu untersuchenden Stoffklasse in das MS-System stattfindet. Durch Variation verschiedener Parameter wie Temperatur, Gasflüsse, Ionisationsspannung oder Potentiale wird versucht, eine optimale Ionisationsausbeute und damit Signalintensität zu erzielen. Dies betrifft insbesondere auch MS/MS-Experimente.

Zunächst erfolgten Versuche mit der ESI-Ionenquelle. Der Analyt wird mit einer Spritzenpumpe in das System infundiert, wobei der Fluß bei wenigen μl pro Minute liegt. Die Ionisierungsbedingungen des ESI-Verfahrens erwiesen sich dabei als prinzipiell zu „weich“ für Sterolglykoside. Es konnte nur eine minimale Ionisationsausbeute festgestellt werden.

Die Verwendung der APCI-Ionenquelle erfordert deutlich höhere Flußraten als die ESI-Methode. Aufgrund des geringen Fassungsvermögens der Infusions-Spritzenpumpe wäre jeweils nach wenigen Minuten ein Nachfüllen der Analytlösung erforderlich. Deshalb wurde mit Hilfe eines Dreiwegeventils die Analytlösung mit der Spritzenpumpe kontinuierlich in einen HPLC-Eluentenflow von 300 $\mu\text{l}/\text{min}$ eingespritzt. Eine Analytkonzentration im nanomolaren Bereich ist dabei ausreichend. Durch APCI wurde die Ionisierung von Cholesterylglucosid problemlos erreicht. Die Optimierung der Quellenparameter (Gasflüsse und Potentiale) brachte eine zusätzliche Erhöhung der Ionisationsausbeute gegenüber den *default*-Werten um den Faktor 10^4 .

3.3.3 Ionisierung und Fragmentierung der Sterolglykoside

Bei der APCI-Ionisierung von Cholesterol- β -D-glucosid ($M_R = 548$) entstanden mehrere Molekülionenaddukte. Das typische Teilchen $[M+H]^+$ ($m/z = M+1$) war für diesen Analyten nur in sehr geringer Intensität zu messen. Das ebenfalls häufige auftretende Addukt mit dem Natrium-Kation, $[M+Na]^+$ mit $m/z = 571$ ($M+23$), ist im Massenspektrum gut zu erkennen. Gelegentlich war bei Anwesenheit von Kalium in Probenlösungen der Kürbis-Sterolglykoside auch das Addukt $[M+K]^+$ zu sehen. In deutlich größerer Intensität trat bei allen untersuchten Sterolglykosiden eine Spezies mit $m/z = M+18$ auf (566 amu für Cholesterylglucosid). Dieses Teilchen ist bei Anwesenheit von Ammoniumsalzen im Eluenten zu erwarten und entspricht einer Ionisierung durch NH_4^+ . Da in der verwendeten HPLC-Methode lediglich Methanol und Wasser als Eluenten zum Einsatz kommen, ist die Bildung von $[M+18]^+$ wohl kaum auf Ammonium zurückzuführen. Welcher Mechanismus der Entstehung dieses Teilchens zugrunde liegt, muß deshalb unklar bleiben.

Bereits bei einfachen *single quad*-Messungen trat durch die sogenannte Skimmerfragmentierung (Zerfall des Analyten bei der Beschleunigung ins Massenspektrometer) ein Tochterion mit $m/z = M-179$ auf. Offensichtlich stellt die glykosidische Bindung die Bruchstelle dar; das Fragment resultiert aus der Abspaltung des Zuckerrestes. m/z ist für das Fragment von Cholesterylglucosid gleich 369. Dieses Verhalten des Analyten konnte später – wenig überraschend – bei den aus Kürbissamenextrakt isolierten Δ^7 -Sterolglykosiden in gleicher Weise beobachtet werden.

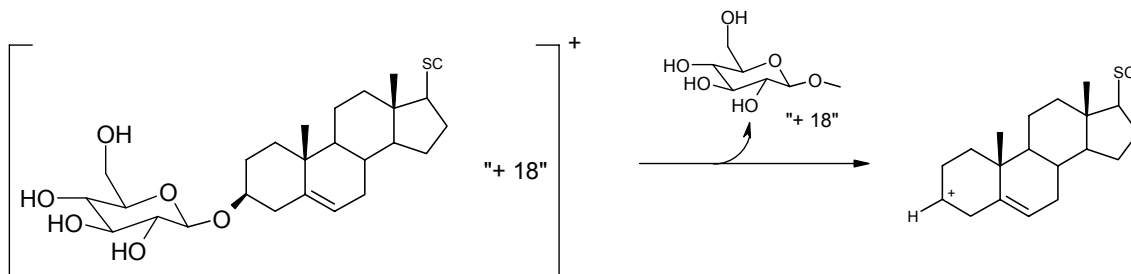


Abb. 3-9: Abspaltung des Zuckerrests eines Sterolglucosids

Eine Überprüfung dieser Zerfallsreaktion durch *precursor ion scans* zeigte jedoch überraschende Resultate. Erwartet wurde, daß das Vorläuferion des Fragments 369 im intakten Molekülion $[M+H]^+$ zu finden sei. Tatsächlich entsteht das Tochterion jedoch aus der Spezies $[M+18]^+$. Damit entspricht die Masse dieses Fragments nicht, wie zunächst angenommen, $M-179$, sondern $M+18-197$. Es muß also offensichtlich zunächst die Bildung von $[M+18]^+$ stattfinden, bevor anschließend der Zuckerrest sowie die „Masse“ 18 abgespalten werden (Abb. 3-9).

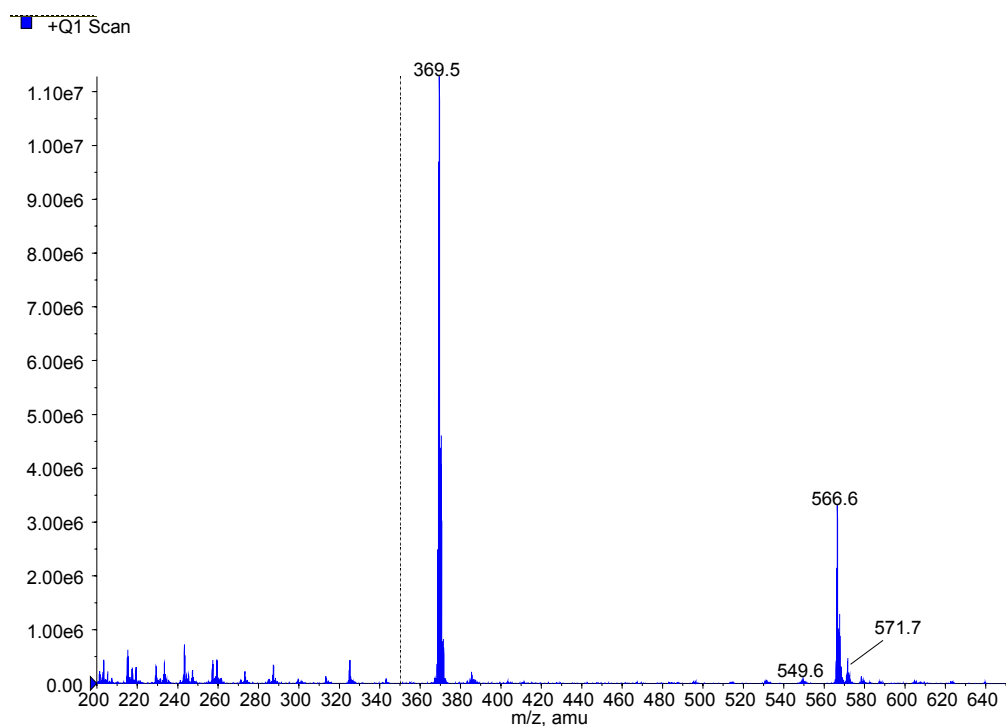


Abb. 3-10: APCI-Massenspektrum (*single quad scan*) von Cholesterol-β-D-glucosid (M_R = 548).
Wichtige Signale: [M+Na]⁺ (m/z 571), [M+18]⁺ (m/z 566), [M+H]⁺ (m/z 549), [M+18-197]⁺ (m/z 369)

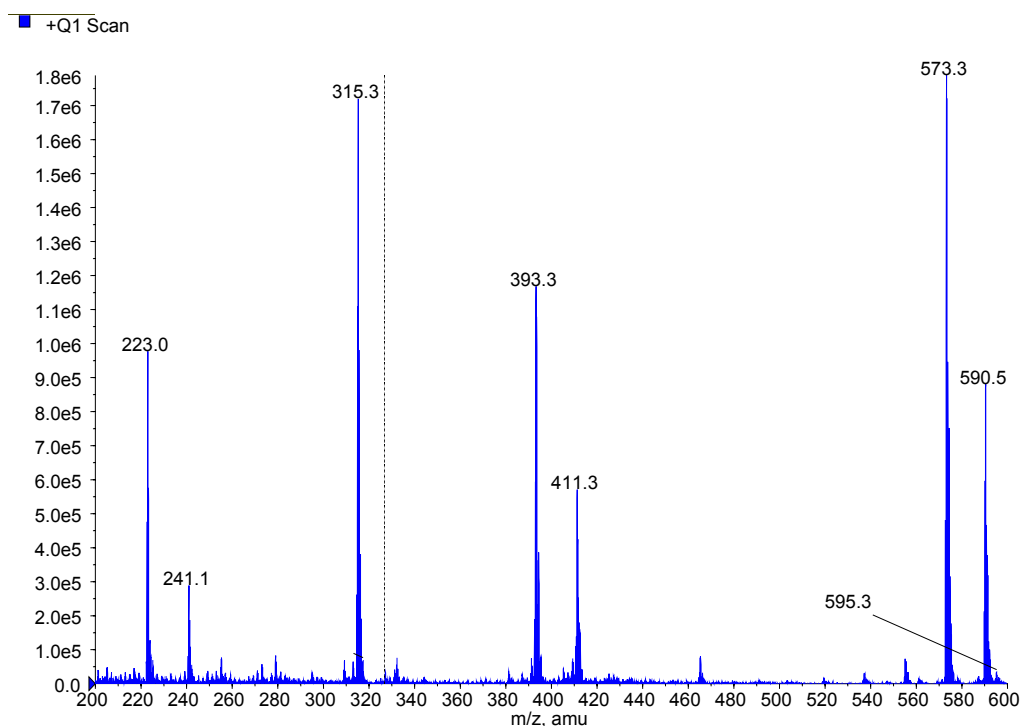


Abb. 3-11: APCI-Massenspektrum (*single quad scan*) eines Δ⁷-Sterolglykosids (M_R = 572).
Wichtige Signale: [M+Na]⁺ (m/z 595), [M+18]⁺ (m/z 590), [M+H]⁺ (m/z 573), [M+18-197]⁺ (m/z 369)

Bei den isolierten Kürbissterolglykosiden entsteht daneben außerdem ein Fragment, das dem protonierten Sterolaglykon entspricht (beispielhaft dargestellt für ein Sterolglykosid der Masse 572 (Aglykon: 410) in Abb. 3-11, $m/z = 411$).

Um eine spezifische Detektion der Sterolglykoside zu ermöglichen, wurde nun ein MS/MS-Experiment (*neutral loss*) entwickelt, welches nur ein Signal für solche geladenen Spezies ergibt, die bei ihrer Fragmentierung in Q2 ein Neutralteilchen der Masse 197 amu abspalten. Die Resultate sind exemplarisch im Massenspektrum Abb. 3-12) dargestellt.

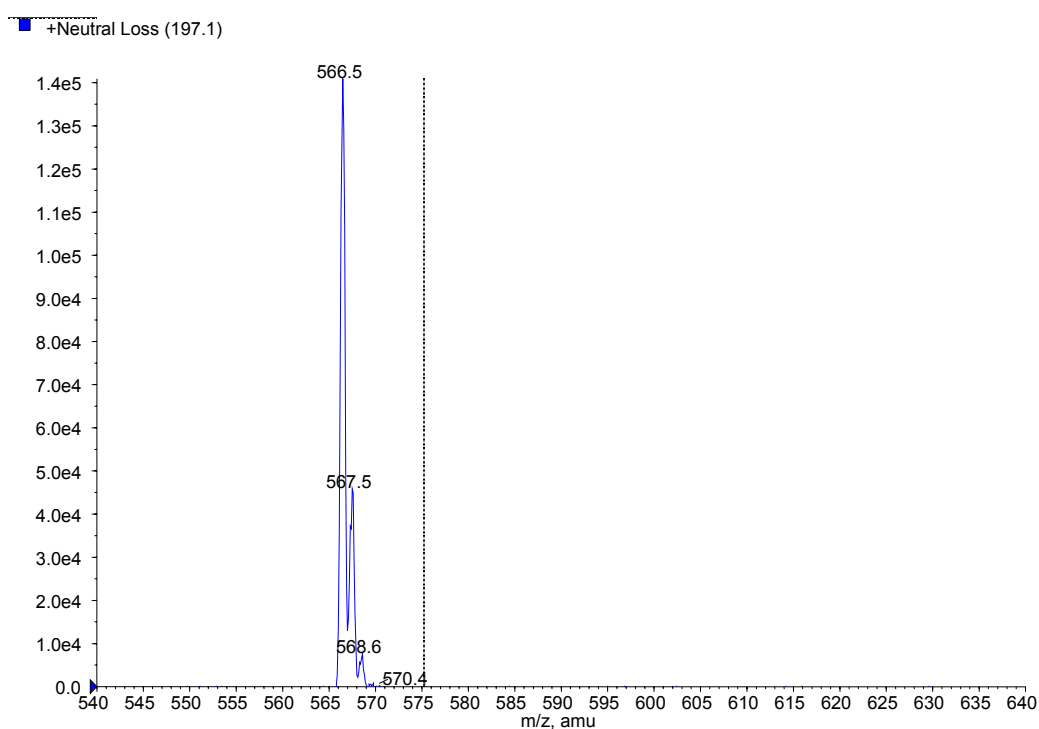


Abb. 3-12: Detektion von Cholesterylglucosid ($M_R = 548$) durch das *neutral loss*-Experiment. Nur von der Spezies mit $m/z = 566$ werden der Zuckerrest (179 amu) und ein unbekanntes Teilchen (18 amu) abgespalten; $\Sigma = 197$ amu.

3.4 ISOLIERUNG VON STEROLGLYKOSIDEN

Wie einleitend erläutert, sollte aufgrund des geringen Gehalts an Sterolglykosiden im Extrakt und zur Schonung von HPLC-Säulen ein möglichst großer Teil der Matrix von den gesuchten Analyten abgetrennt werden. Ausgehend vom ersten Schritt, einer Entfettung des Extrakts, wurde eine Methode entwickelt, die auf einer Soxhlet-Extraktion basiert und mit der auch große Mengen Extrakt in kurzer Zeit und unter geringem Lösungsmittelbedarf aufgearbeitet werden können.

Erstes Ziel war die Abtrennung von Lipiden, insbesondere Triglyceriden, da sich die Ölphase des Extrakts zu ca. 30 % aus fettem Öl zusammensetzt (siehe 5.4.3, vgl. Lit.: Extraktion von Kürbissamen, 28-55 %^{58,59}). Diese Entfettung sollte mit der bewährten Soxhlet-Extraktion erreicht werden. Da der Extrakt zähflüssig-ölig und in lipophilen Lösungsmitteln vollständig löslich ist, konnte eine Soxhlet-Filterhülse nicht direkt beschickt werden. Deshalb kam ich auf die Idee, den Extrakt auf Kieselgel aufzuziehen. Die so erhaltene Festphase konnte dann in die Soxhlet-Apparatur eingebracht werden. Durch erschöpfende Extraktion mit Hexan wurde ein goldgelbes Öl erhalten. Es setzt sich aus den lipophilen Bestandteilen des Extrakts zusammen und enthält einer gaschromatographischen Untersuchung zufolge Triglyceride, Fettsäureester, Squalen und Tocopherole. Sterole werden durch Hexan nicht vom Kieselgel desorbiert.

Aus diesem ersten Grundschrift wurde dann ein weitergehendes Schema entwickelt, durch sukzessive Behandlung mit verschiedenen Lösungsmitteln eine Bandbreite unterschiedlich polarer Matrixbestandteile zu extrahieren, ohne dabei Sterolglykoside vom Kieselgel zu desorbieren. Das Verfahren kombiniert somit den geringen Lösungsmittelbedarf der kontinuierlichen Soxhlet-Extraktion mit der zusätzlichen Komponente der adsorptiven Wechselwirkung zwischen Analyt und stationärer Phase einer Festphasenextraktion.

Es folgten zahlreiche Versuche mit verschiedenen Eluenten, wobei das „Durchbrechen“ von Sterolglykosiden durch HPLC-MS/MS kontrolliert wurde. Die Extraktion mit Diethylether liefert einen durch Chlorophyll dunkelgrün gefärbten, öligen Extrakt. Aufgrund des hohen Chlorophyllgehalts wurde zur Schonung von GC- und HPLC-Säulen auf eine eingehende Untersuchung verzichtet, nachdem in der Fraktion keine Sterolglykoside nachgewiesen werden konnten. Eine GC-MS-Untersuchung nach Aufreinigung einer kleinen Menge der Etherfraktion durch präparative DC ergab jedoch die Anwesenheit bereits früher identifizierter Δ^7 -Sterole (vgl. Kapitel 2.3).

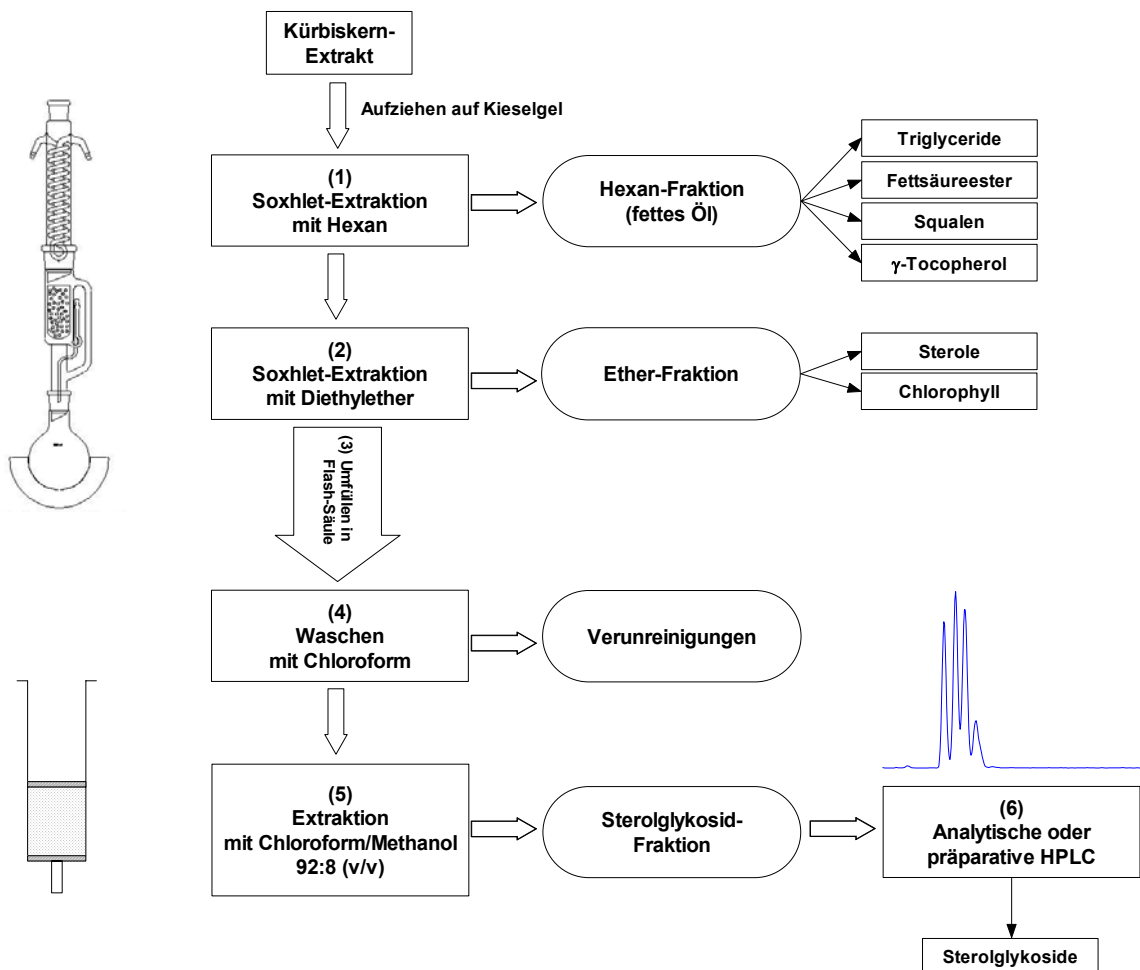
Bei der anschließenden Extraktion von Begleitstoffen mit Chloroform wurde bei längerer Zeitdauer eine teilweise Mit-Extraktion der gesuchten Analyten beobachtet. Deshalb wurde Chloroform stattdessen erst im Anschluß an die Soxhlet-Extraktion verwendet, um in einem Schritt reiner Festphasenextraktion – das beladene Kieselgel wurde hierzu aus der Soxhlet-Filterhülse in eine Flash-Säule umgefüllt – weitere Matrixbestandteile zu

desorbieren. Im letzten Extraktionsschritt wird durch Elution mit Chloroform/Methanol eine Fraktion erhalten, welche die Sterolglykoside enthält.

Anschließend erfolgte die chromatographische Trennung der in der Chloroform/Methanol-Fraktion enthaltenen Sterolglykoside. Neben der analytischen Bestimmung mit HPLC-MS/MS ist, bei entsprechender Ansatzgröße auch die Gewinnung von Milligramm-Mengen durch präparative HPLC möglich. Wie später noch ausgeführt wird, ist dazu die Extraktion der Hydrophase sinnvoll, die wesentlich größere Mengen an Sterolglykosiden enthält.

Es ergibt sich folgendes Schema:

- 1) erschöpfende Soxhlet-Extraktion des auf Kieselgel aufgezogenen Kürbissamenextrakts mit Hexan
- 2) erschöpfende Soxhlet-Extraktion mit Diethylether
- 3) Beschickung einer Flash-Säule mit dem beladenen Kieselgel
- 4) Elution (Waschen) mit Chloroform
- 5) Elution mit Chloroform/Methanol 92:8 (v/v)
- 6) Analytische oder präparative HPLC



3.5 STRUKTURAUFKLÄRUNG DER STEROLGLYKOSIDE

3.5.1 Untersuchung von Sterolglykosiden mit HPLC-APCI-MS(/MS)

Die Gesamt-Sterolglykosid-Fraktion ergab folgendes Chromatogramm (HPLC-MS/MS-System siehe 5.3.4).

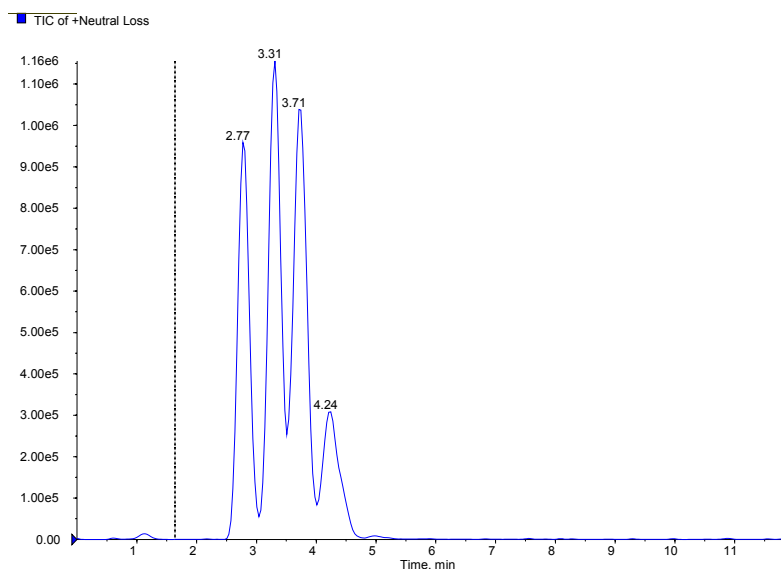


Abb. 3-13: HPLC-MS/MS-Chromatogramm der Sterolglykosid-Fraktion (*neutral loss*-Experiment)

Die Detektion der Analyten erfolgte massenspektrometrisch. Einen äußerst spezifischen Nachweis erlaubt das *neutral loss*-Experiment (siehe 3.2.4). Trotz vieler Begleit-substanzen in der Probe erhält man ein „sauberes“ Chromatogramm, welches nur die Signale der gesuchten Analyten zeigt.

Anhand der MS/MS-Untersuchungen wurden folgende Informationen erhalten:

Es liegen vier Sterolmonoglykoside vor; ihre relativen Molekülmassen sind 572 Da, 574 Da, 574 Da und 576 Da. Der Zuckeranteil hat jeweils eine relative Masse von 180 Da. Durch Fragmentierung und *product ion scan* können die durch Abspaltung der Zuckereinheit entstehenden Fragmente identifiziert werden. Ihre Grundstruktur ist in Abb. 3-14 dargestellt (siehe auch 3.3.3). Sie korrespondiert mit den Ergebnissen von J. Müller⁶², der bei der APCI-Ionisierung von Sterolaglyka ein Massendefizit von 17 Da festgestellt hatte ($M+H^+-H_2O$). Die korrespondierenden Aglyka der gefundenen Sterolglykoside haben demzufolge die Relativen Molekülmassen 410 Da, 412 Da, 412 Da und 414 Da (siehe Abb. 3-15 und nachfolgende APCI-Massenspektren).

Über die genaue Struktur der Sterolaglyka und die Art des daran gebundenen Zuckers kann anhand der APCI-Massenspektren jedoch keine Aussage getroffen werden. Die „weichen“ Ionisationsbedingungen und die Fragmentierung in der Kollisionszelle liefern

nicht, wie die EI-Ionisation der GC-MS-Methoden, die notwendige Information durch kleinere Molekülfragmente.

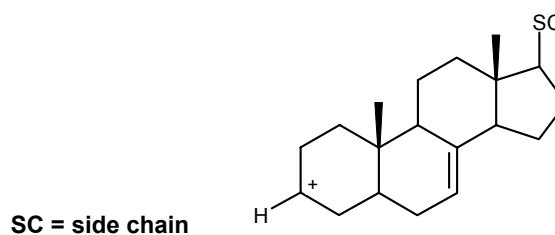


Abb. 3-14: Fragment eines Δ^7 -Sterolglykosids nach Abspaltung des Zuckerrestes

Trotzdem ermöglicht die hier gezeigte Analytik mit HPLC-MS/MS sehr viel detailliertere Aussagen über die Analyten (und eventuelle Verunreinigungen) als verbreitete Methoden wie HPLC-UV oder HPLC-DAD. Sie stellt ein extrem empfindliches Verfahren mit höchster Selektivität dar und ist damit beispielsweise hervorragend für den Einsatz in der Qualitätskontrolle geeignet.

t_R [min]	Molekülion-Addukte ($[M+H]^+$, $[M+18]^+$)	Sterolglykosid (M_R)	Aglykon-Fragment ($[M+18-197]^+$)	Sterolaglykon (M_R)
2,77	573, 590	572	393	410
3,31	575, 592	574	395	412
3,71	575, 592	574	395	412
4,24	577, 594	576	397	414

Abb. 3-15: Durch MS/MS-Experimente detektierte Sterolglykoside

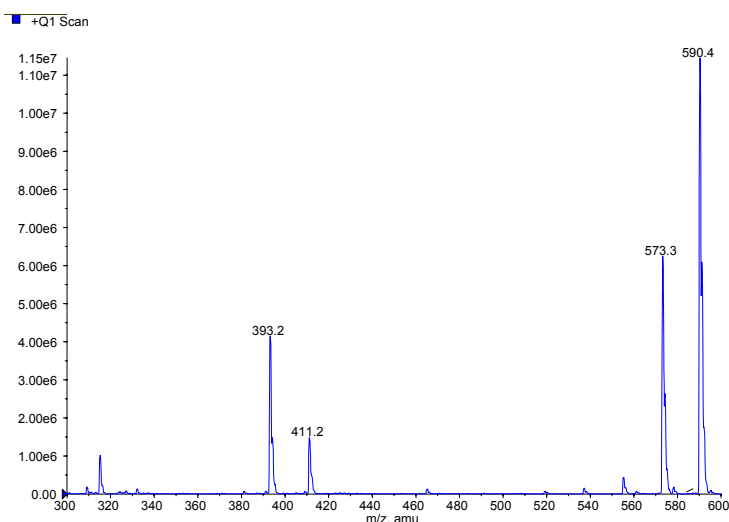


Abb. 3-16: APCI-MS (scan) des Signals bei $t_R = 2,77$ min

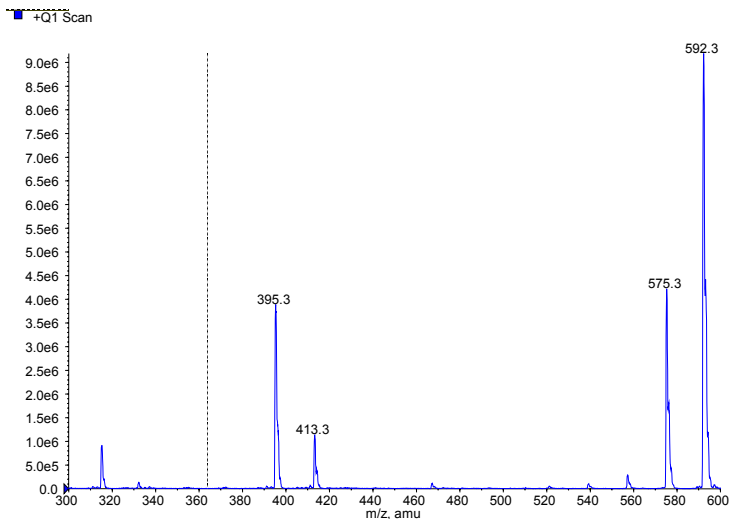


Abb. 3-17: APCI-MS (scan) des Signals bei $t_R = 3,31$ min

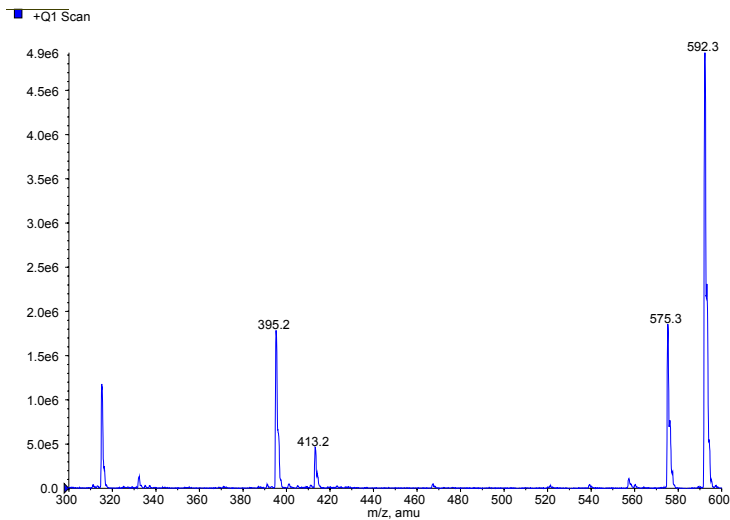


Abb. 3-18: APCI-MS (scan) des Signals bei $t_R = 3,71$ min

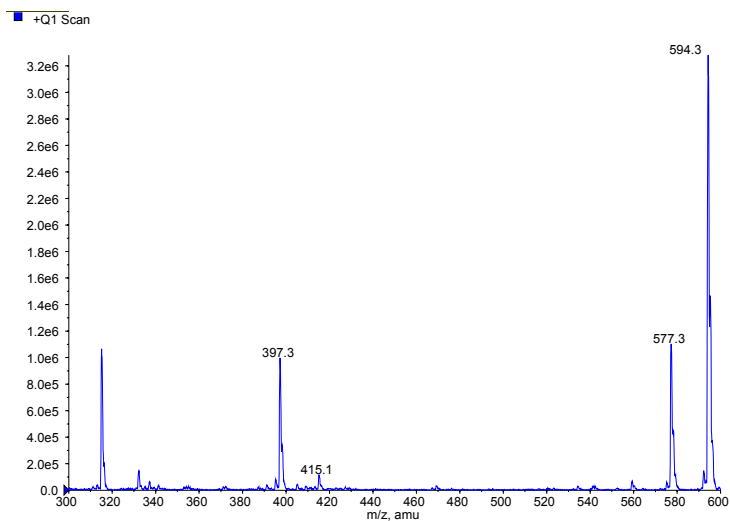


Abb. 3-19: APCI-MS (scan) des Signals bei $t_R = 4,24$ min

3.5.2 Problemstellung

Eine vollständige Aufklärung der Struktur der isolierten Substanzen war jedoch ohne die Kombination mit den Strukturaussagen anderen Methoden nicht möglich.

Zur weiteren Vorgehensweise bei der Strukturaufklärung ist folgendes anzumerken: Zum damaligen Zeitpunkt war nur die Ölphase des Kürbissamendickextrakts verfügbar. Die Konzentration der Sterolglykoside in der Ölphase ist derart gering, daß eine Isolierung ausreichender Mengen zur Anfertigung von NMR-Spektren nicht möglich erschien. Die im folgenden beschriebene Vorgehensweise ermöglichte trotzdem eine eindeutige Strukturbestimmung aller gefundenen Sterolglykoside. Nach Abschluß dieser Arbeiten wurde die nun zur Verfügung stehende Hydrophase des Extrakts untersucht. Die Zusammensetzung bezüglich der Sterolglykoside ist hier qualitativ identisch, der Gehalt jedoch bedeutend höher. Die vier Analyten wurden in Mengen zwischen 0,5 und 1,3 mg isoliert und ^1H -, ^{13}C - sowie 2D-NMR-Spektren erstellt. Mit der JEOL-Delta-Software stand ein leistungsfähiges Werkzeug zur Analyse und Interpretation zur Verfügung. Die gewonnenen Strukturinformationen untermauern die Ergebnisse, die zuvor bereits durch die Hydrolyse von Mikrogramm-Mengen gewonnen worden waren. An dieser Stelle möchte ich nochmals Herrn Dr. Holger Lerche und seinem Team meinen Dank für die mit großem Einsatz und unter hohem Zeitaufwand aus den geringen Analytmengen erstellten NMR-Spektren aussprechen.

Die prinzipielle Idee zur Strukturbestimmung der gefundenen Sterolglykoside ohne die Möglichkeit der NMR-Spektroskopie war folgende: Die Massen der bei der Fragmentierung von Sterolglykosiden entstandenen Sterolaglyka stimmten mit jenen bereits aus dem Extrakt isolierter Aglyka (siehe Kapitel 2) überein. Da Sterolglykoside einer gaschromatographischen Untersuchung nicht zugänglich sind, wurde erwogen, die Glykoside zu spalten. Neben der Bestimmung des mit dem Aglykon verknüpften Zuckers sollte dann eine Analytik der freigesetzten Aglyka mittels GC-MS möglich sein.

Als Acetale sind die O-Glykoside von Sterolen stabil gegen Basen. Eine Literaturrecherche ergab, daß bei saurer Hydrolyse von Sterolglykosiden häufig Umlagerungen von Doppelbindungen in der Seitenkette auftreten bzw. andere nicht näher bezeichnete Artefakte entstehen können^{60,61}. Denkbar ist beispielsweise auch eine Isomerisierung durch Umlagerung von Doppelbindungen im Grundkörper. Deswegen sollte eine schonende, chemoselektive enzymatische Spaltung durchgeführt und die dabei entstandenen Produkte analysiert werden.

3.5.3 Enzymatische Hydrolyse mit Glucosidasen

Alle in der Literatur beschriebenen Δ^7 -Sterolglykoside sind Sterol-mono-O- β -D-glucopyranoside, bei welchen demnach die 3-OH-Gruppe des Sterols mit β -D-Glucose verknüpft ist. Es erschien deshalb sinnvoll, β -Glucosidasen zur enzymatischen Spaltung einzusetzen. Mit β -Glucosidase aus Mandeln (Emulsin) bzw. α -/ β -Glucosidase aus

Aspergillus niger stehen käufliche Enzyme zur Verfügung, die die gewünschten Transformationen im Prinzip bewerkstelligen können sollten. Um die Anwendbarkeit von Glucosidasen für die Spaltung von Sterolglucosiden zu prüfen, wurden Versuche mit Cholesterol- β -D-glucosid als Modellsubstanz durchgeführt.

3.5.3.1 Festphasenextraktion von Sterolaglyka

Die in den nachfolgend beschriebenen Versuchen freizusetzenden Sterolaglyka sollten durch GC-MS identifiziert werden. Da die enzymatische Umsetzung in wässriger Pufferlösung stattfindet und eine Verunreinigung des GC-Systems durch Injektion von Protein unerwünscht ist, wurde der Analyse ein Reinigungsschritt vorangestellt. Mittels Festphasenextraktion (SPE) an einer Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer-Phase (Merck LiChrolut® EN 200 mg) wurden die Sterole von der Matrix des Reaktionsgemischs separiert und die Analytlösung gleichzeitig filtriert, so daß im Anschluß mit dem Eluat direkt die gaschromatographische Bestimmung möglich war.

In unserem Arbeitskreis hatte J. Müller ein Testsystem zur Aufklärung des Wirkmechanismus von Antimykotika entwickelt, das auf dem Stoffwechsel der Hefe *Yarrowia lipolytica* basiert⁶²: Sterolbiosyntheseinhibitoren verändern das von den Pilzzellen ausgeprägte Sterolmuster. Zur Extraktion der gebildeten neuen Sterole war dabei eine SPE-Methode erstellt worden, die für die vorliegende Arbeit in leicht modifizierter Weise verwendet werden konnte.

Die SPE-Kartuschen werden zunächst mit 2 ml Methanol konditioniert. Anschließend wird die Probenlösung (1,5 ml) aufgegeben. Kurz vor dem Trockenlaufen wird mit 2 ml Methanol/ Wasser (50:50) gewaschen. Die Kartusche wird durch Vakuum trockengesaugt und mit 2 x 0,5 ml Essigsäureethylester die Analyten langsam eluiert. Die Tropfgeschwindigkeit liegt jeweils bei 5-7 ml/min.

Weitere Angaben zu SPE- und GC-MS-Methoden finden sich unter 5.4.7 bzw. 5.3.5 und 5.4.8.

3.5.3.2 Versuche mit β -Glucosidase aus Mandeln (Emulsin)

Cholesterol- β -D-glucosid, gelöst in Methanol, wurde mit einer Lösung von β -Glucosidase aus Mandeln (Fluka) in Pufferlösung pH 4 (CertiPUR®, Citronensäure/NaOH/HCl) versetzt. Die Konzentration an Enzym wurde variiert. Die Reaktionsdauer betrug 3 h unter Schütteln bei 37 °C. Es wurde jedoch in keinem Fall eine Umsetzung des Substrats festgestellt.

Zu beobachten war die Bildung eines weißen Niederschlags. Die Löslichkeit des Enzyms in Methanol/Wasser-Mischungen ist gut. Um auszuschließen, daß das Substrat im Lösungsmittelgemisch ausfällt, wurde in weiteren Versuchen DMSO als Lösungsvermittler zugesetzt. Die Reaktionslösung war dann nur noch leicht getrübt. Auch hier fand jedoch keine Umsetzung statt.

3.5.3.3 Versuche mit Glucosidase aus *Aspergillus niger*

Versuche mit Glucosidase aus *A. niger* (Fluka) wurden in analoger Weise durchgeführt. Eine Umsetzung zu Cholesterin konnte auch hier nicht beobachtet werden.

3.5.3.4 Versuche mit 4-Nitrophenylglucosid als Substrat

Um auszuschließen, daß die Reaktionsbedingungen, insbesondere der Zusatz von Methanol als Lösungsmittel, die enzymatische Reaktion beeinträchtigen, wurde eine Versuchsreihe mit 4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid (4-Nitrophenylglucosid, 4-NPG, Fluka) als Edukt angesetzt. Dieses künstliche Substrat wird von einer Vielzahl von β -Glucosidasen leicht hydrolysiert und häufig zur Aktivitätsbestimmung verwendet⁶³.

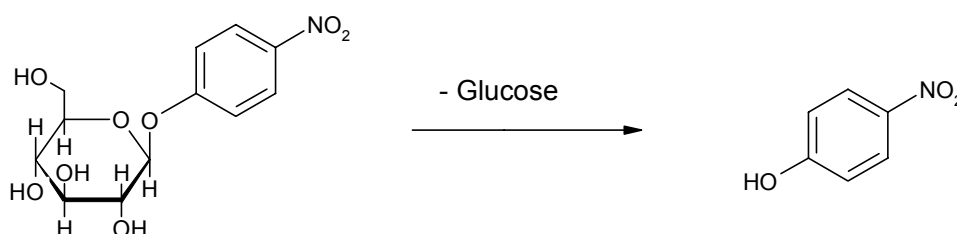


Abb. 3-20: Enzymatische Umsetzung von 4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid zu 4-Nitrophenol

Zur Ermittlung tolerierbarer Reaktionsbedingungen für die beiden eingesetzten Enzyme wurden je 100 μ g in Pufferlösung bzw. Wasser (siehe Abb. 3-21) gelöste β -Glucosidase aus Mandeln bzw. 1,0 mg gelöste Glucosidase aus *A. niger* einer Lösung von 50 μ g 4-NPG (im jeweils gleichen Lösungsmittel) zugesetzt. Die Reaktion wurde nach der Inkubation durch kurzes Erhitzen zum Siedepunkt gestoppt und die Lösung über Phenex Nylon-Spritzenfilter (2 μ m) membranfiltriert. Das Verhältnis von 4-Nitrophenylglucosid und 4-Nitrophenol wurde per HPLC-MS bestimmt (Bedingungen siehe 5.3.4).

Unter den gewählten Bedingungen (relativ große Menge an Enzym, kürzeste Reaktionszeit: 5 min) konnte kein Einfluß der Temperatur auf die Emulsin-katalysierte Umsetzung festgestellt werden. Das Substrat wurde jeweils binnen weniger Minuten vollständig hydrolysiert. Die Reaktion verlief in Wasser ebensogut wie im gepufferten Milieu. Der Zusatz von bis zu 50 % (v/v) an Alkoholen (Methanol oder Ethanol) führte zu einer Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Menge an Alkohol. Zwischen Methanol und Ethanol bestand kein Unterschied. Die Reaktion verlief auch unter Alkoholzusatz vollständig, sofern die Reaktionszeit lange genug gewählt wurde (einige Stunden). Weitere Versuche unter zusätzlicher Beimischung von 100 μ l DMSO zum Ansatz zeigten ebenfalls keinen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Umsetzung.

Vergleichbare Resultate wurden mit Glucosidase aus *A. niger* erhalten.

Glucosidase aus	Lösungsmittel	Temperatur	Reaktionsdauer
Mandeln	Puffer pH 4, 2000 µl	37 °C	5-10-20 min
Mandeln	Puffer pH 5, 2000 µl	37 °C	5-10-20 min
Mandeln	W 2000 µl	37 °C	5-10-20 min
Mandeln	Puffer pH 4, 2000 µl	RT	5-10-20 min
Mandeln	Puffer pH 5, 2000 µl	RT	5-10-20 min
Mandeln	W 2000 µl	RT	5-10-20 min
Mandeln	W 1900 µl, M 100 µl	RT	5-10-20 min
Mandeln	W 1750 µl, M 250 µl	RT	5-10-20 min
Mandeln	W 1500 µl, M 500 µl	RT	5-10-20-60-120-180 min
Mandeln	W 1000 µl, M 1000 µl	RT	5-10-20-60-120-180 min
Mandeln	W 1900 µl, E 100 µl	RT	5-10-20 min
Mandeln	W 1750 µl, E 250 µl	RT	5-10-20 min
Mandeln	W 1500 µl, E 500 µl	RT	5-10-20-60-120-180 min
Mandeln	W 1000 µl, E 1000 µl	RT	5-10-20-60-120-180 min
<i>A. niger</i>	Puffer pH 4, 2000 µl	RT	5-10-20 min
<i>A. niger</i>	W 2000 µl	RT	5-10-20 min
<i>A. niger</i>	W 1500 µl, M 500 µl	RT	20-60-120-180 min
<i>A. niger</i>	W 1000 µl, M 1000 µl	RT	20-60-120-180 min
<i>A. niger</i>	W 1500 µl, E 500 µl	RT	20-60-120-180 min
<i>A. niger</i>	W 1000 µl, E 1000 µl	RT	20-60-120-180 min

Abb. 3-21: Versuchsreihe mit 4-NPG bei unterschiedlichen Inkubationsbedingungen (W = Wasser, M = Methanol, E = Ethanol)

Unter jeweils gleichen Bedingungen fand mit β -Cholesterylglucosid sowie dem Δ^7 -Sterolglykosidgemisch aus Kürbissamenextrakt jedoch keinerlei Umsetzung statt. Daraus ist zu schließen, daß die verwendeten Glucosidasen sich nicht zur Spaltung von Sterolglykosiden eignen.

3.5.3.5 Isolierung einer Steryl- β -D-glucosidase

Eine Literaturrecherche ergab, daß eine spezifische Cholesteryl- β -D-glucosid-glucosylhydrolase (EC 3.2.1.104)⁶⁴ bekannt ist, im folgenden vereinfacht als „Steryl- β -D-glucosyl-

sidase“ bezeichnet. Dieses Enzym ist allerdings nicht kommerziell zu erwerben. Aufgrund der Möglichkeiten, die sich durch die Spezifität für Sterol- β -D-Glucoside ergeben, wurde beschlossen, dieses Enzym selbst zu präparieren.

Sterol- β -D-Monoglucoside sind, zusammen mit freien Sterolen, Bestandteil der Zellmembran von Pflanzenzellen. Die reversible Glucosylierung und Deglucosylierung von Sterolen beeinflusst durch die Änderung von Lipophilie und Raumbedarf die Organisation (*fluid mosaic model!*) und Funktion der Membran⁶⁵. Die Lokalisation in bzw. an der Zellmembran bildet auch die Grundlage der nachfolgend beschriebenen Isolierung aus Senfpflanzen.

Die Anreicherung wurde in Anlehnung an eine Vorschrift von Kalinowska⁶⁶ durchgeführt. Keimlinge von Weißem Senf (*Sinapis alba*) werden in 0,1 M Tris-maleat-Puffer pH 5,2 homogenisiert und anschließend fraktionierend zentrifugiert. Zelluläre Substrukturen, die zwischen 1000 und 15000 g sedimentieren, werden im Puffer resuspendiert und in -15 °C kaltem Aceton präzipitiert. Die so erhaltene Enzympräparation wird in 0,1 M Succinatpuffer pH 5,2 suspendiert und erneut bei 15000 g zentrifugiert. Aus dem Überstand werden die darin gelösten Proteine erneut in -15 °C kaltem Aceton präzipitiert.

Kalinowska beschreibt eine Steigerung der spezifischen Aktivität des so erhaltenen Enzymkomplexes für Cholesterol- β -D-glucosid im Vergleich zum Rohhomogenat um Faktor 600. Gleichzeitig erhöht sich das Aktivitätsverhältnis „Cholesterol- β -D-glucosid zu 4-Nitrophenylglucosid“ um Faktor 31. Die im weiteren beschriebene Aufreinigung durch Chromatographie an Sephadex erbringt nur eine zusätzliche Steigerung um Faktor 4, weshalb auf diesen Schritt verzichtet wurde.

Die hohe Spezifität für Sterol- β -D-glucoside demonstriert Kalinowska durch Zusatz von anderen Glucosiden zum Reaktionsansatz. Selbst bei 20000-fachem Überschuß beispielsweise von 4-Nitrophenylglucosid, Cellobiose oder Salicin wird die Hydrolyserate für Cholesterol- β -D-glucosid nicht bedeutend gesenkt. Hingegen kommt es bei Zugabe von Siterol- β -D-glucosid oder Androstenolon- β -D-glucosid nur noch zur teilweisen Umsetzung, bei extremem Überschuß zum Erliegen der Reaktion zugunsten der Hydrolyse des Konkurrenzsubstrats. Disaccharide mit β -D-glucosidischer Bindung werden nicht gespalten.

Eine Umsetzung mit α -D-Glucosiden wird von Kalinowska nicht beschrieben. Eigene Versuche mit Cholesterol- α -D-glucosid belegen die Spezifität des Enzyms für die β -Verknüpfung, was aufgrund der unterschiedlichen sterischen Verhältnisse nicht überrascht.

3.5.3.6 Enzymatische Hydrolyse extrahierter Kürbissterolglucoside mit Steryl- β -D-glucosidase

Die Sterolglykosid-Fraktion aus 3.4 wurde mit der Enzympräparation umgesetzt. Etwa 50 μ g Substrat, gelöst in 0,5 ml Methanol, wurden mit einer Suspension von 1 mg des Steryl- β -D-glucosidase enthaltenden Proteinpräzipitats in 1,0 ml 0,1 M Succinatpuffer pH 5,2 versetzt. Die Reaktion wurde unter 60-minütigem Schütteln bei 37 °C durchgeführt.

Die freigesetzten Aglyka wurden mit der beschriebenen SPE (siehe 3.5.3.1 bzw. 5.4.7) extrahiert. Die anschließende GC-Analytik zeigte, daß alle vier Sterolglykoside vom Enzym gespalten werden. Ob ein Unterschied in der Aktivität für die einzelnen Substrate besteht, konnte auf diese Weise nicht ermittelt werden. Aufgrund der äußerst geringen verfügbaren Menge an Glucosidgemisch und befürchteter Verluste bei weiterer Aufreinigung wurde auf eine chromatographische Trennung und Umsetzung der einzelnen Analyten verzichtet.

3.5.4 Aufklärung der Strukturen der Aglyka

Die durch enzymatische Hydrolyse erhaltenen und durch SPE angereicherten Sterol-aglyka wurden mittels GC-MS untersucht. Anhand ihrer Retentionszeiten und Massenspektren wurde festgestellt, daß die vier Aglyka identisch mit bereits früher gefundenen, genuin im Extrakt vorliegenden Sterolen sind. **Von den fünf im Extrakt identifizierten Δ^7 -Sterolen liegen demzufolge vier darüber hinaus als Sterolglykoside vor.**

t_R [min]	m/z (M^+)	Struktur
21,59	410	(22E)-(24S)-Ethyl-5 α -cholesta-7,22,25-trien-3 β -ol
21,61	412	(22E)-(24S)-Ethyl-5 α -cholesta-7,22-dien-3 β -ol
22,42	414	(24R)-Ethyl-5 α -cholest-7-en-3 β -ol
22,25	412	(24S)-Ethyl-5 α -cholesta-7,25-dien-3 β -ol

Abb. 3-22: Aus Sterolglykosiden enzymatisch freigesetzte Aglyka

Durch Blindproben konnte eindeutig bewiesen werden, daß diese Δ^7 -Sterole erst durch die enzymatische Hydrolyse freigesetzt wurden und nicht bereits vorher im Ansatz vorhanden waren.

Die bereits durch HPLC-MS/MS erkannten korrespondierenden Aglyka der Δ^7 -Sterolglykoside mit den Relativen Molekülmassen 410, 412, 412 und 414 Da konnten mit diesem Verfahren nun exakt identifiziert werden (Abb. 3-22).

3.5.5 Aufklärung von Struktur und Verknüpfung des Zuckeranteils

Aufgrund der Spezifität für β -D-verknüpfte Monoglucoside ist durch die enzymatische Spaltung auch die Art der Verknüpfung der Aglyka mit dem Zucker sowie dessen Struktur aufgeklärt. Es handelt sich demzufolge offensichtlich sämtlich um Δ^7 -Sterol- β -D-glucoside. Die gefundenen Naturstoffe sind demnach:

- 2B** (24*R*)-Ethyl-5 α -cholest-7-en-3 β -yl- β -D-glucopyranosid
- 3B** (22*E*)-(24*S*)-Ethyl-5 α -cholesta-7,22-dien-3 β -yl- β -D-glucopyranosid
- 4B** (24*S*)-Ethyl-5 α -cholesta-7,25-dien-3 β -yl- β -D-glucopyranosid
- 5B** (22*E*)-(24*S*)-Ethyl-5 α -cholesta-7,22,25-trien-3 β -yl- β -D-glucopyranosid

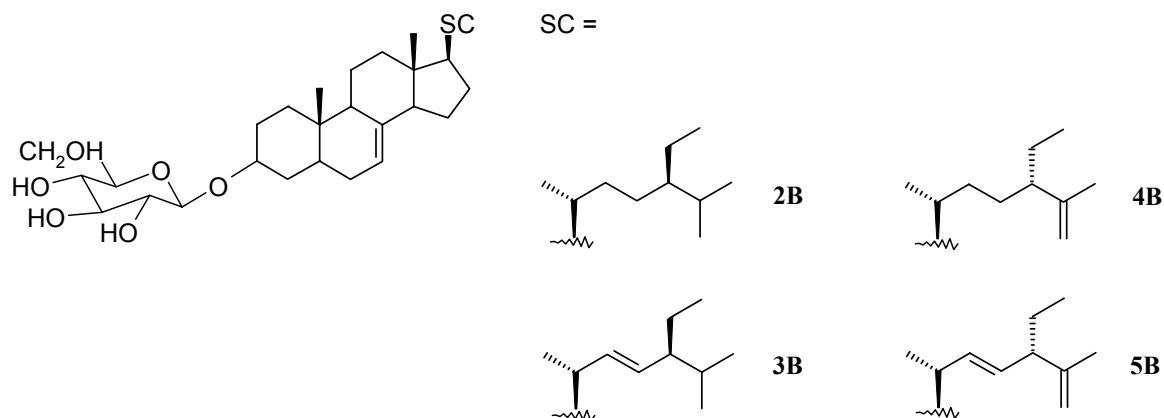


Abb. 3-23: Identifizierte Δ^7 -Sterol- β -D-Glucoside

Mit dem neu entwickelten Isolierungsschema für Sterolglykoside gelang es im weiteren, aus 200 g der dann zur Verfügung stehenden Hydrophase des Kürbissamenextrakts diese vier Substanzen in einer Gesamtmenge von 4 mg zu gewinnen. Dabei wurde analog Abschnitt 3.4 verfahren, wobei das Eluat des letzten Extraktionsschritts eingeeengt und durch portionsweises Einspritzen in die präparative HPLC die Aufreinigung und Trennung der einzelnen Sterolglucoside erreicht wurden (siehe Abb. 3-27, Ausbeuten: Abb. 3-25).

Aus den so erhaltenen Reinsubstanzen wurden NMR-Spektren angefertigt, welche die auf Basis der enzymatischen Spaltungen abgeleiteten Strukturen bestätigen.

Die β -D-Konformation der Glucose wird für alle Verbindungen, wie in Kapitel 3.1 für Cholesterylglucosid beschrieben (siehe dazu auch Abb. 3-4), durch die hohe Kopplungskonstante (> 7 Hz) für die axial/axiale 3J -Kopplung des Protons am anomeren C-Atom C-1' mit dem Proton an C-2' belegt sowie durch die Lage des Dubletts bei ca. 4,4 ppm. Exemplarisch ist ein Ausschnitt des ^1H -NMR-Spektrums von **(4B)** in Abb. 3-24 dargestellt.

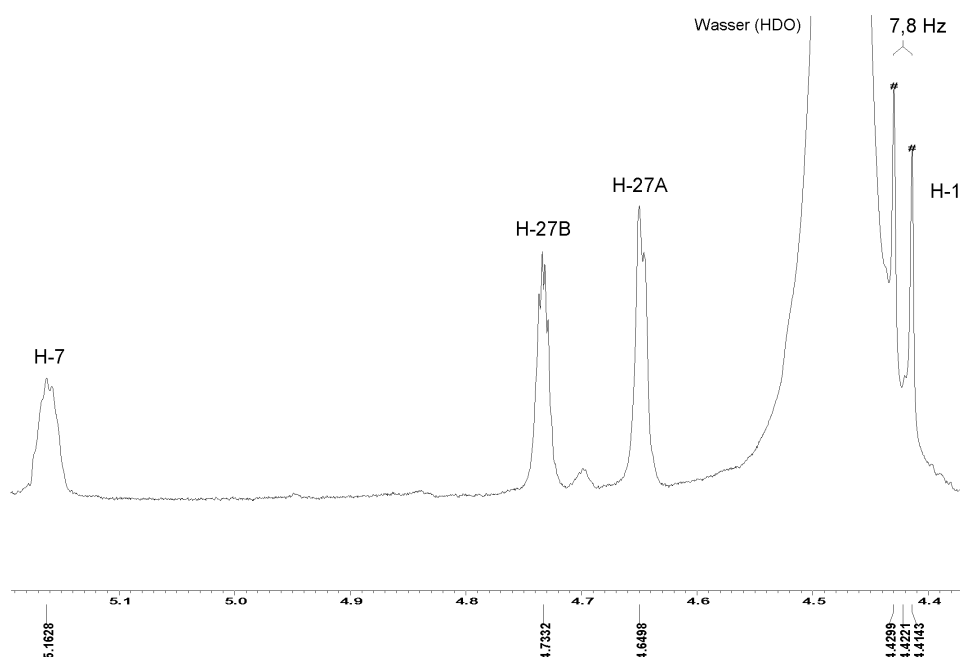


Abb. 3-24: ^1H -NMR-Spektrum (Ausschnitt) von **(24S)-Ethyl-5 α -cholesta-7,25-dien-3 β -yl- β -D-glucopyranosid (4B)**

Die Strukturbestimmung der Analyten aus den einzelnen HPLC-Fractionen durch NMR erlaubte nun auch die zweifelsfreie Zuordnung der beiden Vertreter mit 574 Da relativer Molekülmasse zu HPLC-Chromatogrammen (Abb. 3-26, Abb. 3-27; Elutionsreihenfolge identisch aufgrund gleichartiger stationärer RP-18-Phase).

Peak Nr.	m/z „[M+18] ⁺ “	M _R (Sterol-glucosid)	Ausbeute* [mg]	Struktur
1	590	572	1,2	5B (22 <i>E</i>)-(24 <i>S</i>)-Ethyl-5 α -cholesta-7,22,25-trien-3 β -yl- β -D-glucopyranosid
2	592	574	1,3	4B (24 <i>S</i>)-Ethyl-5 α -cholesta-7,25-dien-3 β -yl- β -D-glucopyranosid
3	592	574	1,0	3B (22 <i>E</i>)-(24 <i>S</i>)-Ethyl-5 α -cholesta-7,22-dien-3 β -yl- β -D-glucopyranosid
4	594	576	0,5	2B (24 <i>R</i>)-Ethyl-5 α -cholest-7-en-3 β -yl- β -D-glucopyranosid

* präparative HPLC

Abb. 3-25: Elutionsreihenfolge der Δ^7 -Sterolglucoside (HPLC, RP-18)

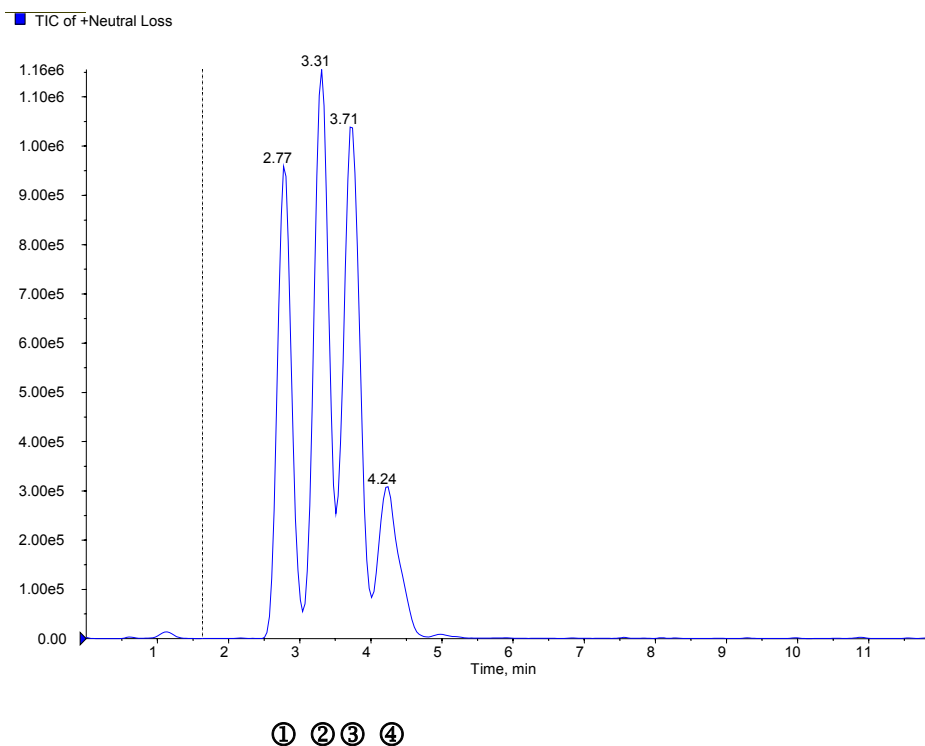


Abb. 3-26: Zuordnung der gefundenen Sterolglucoside im HPLC-MS/MS-Chromatogramm

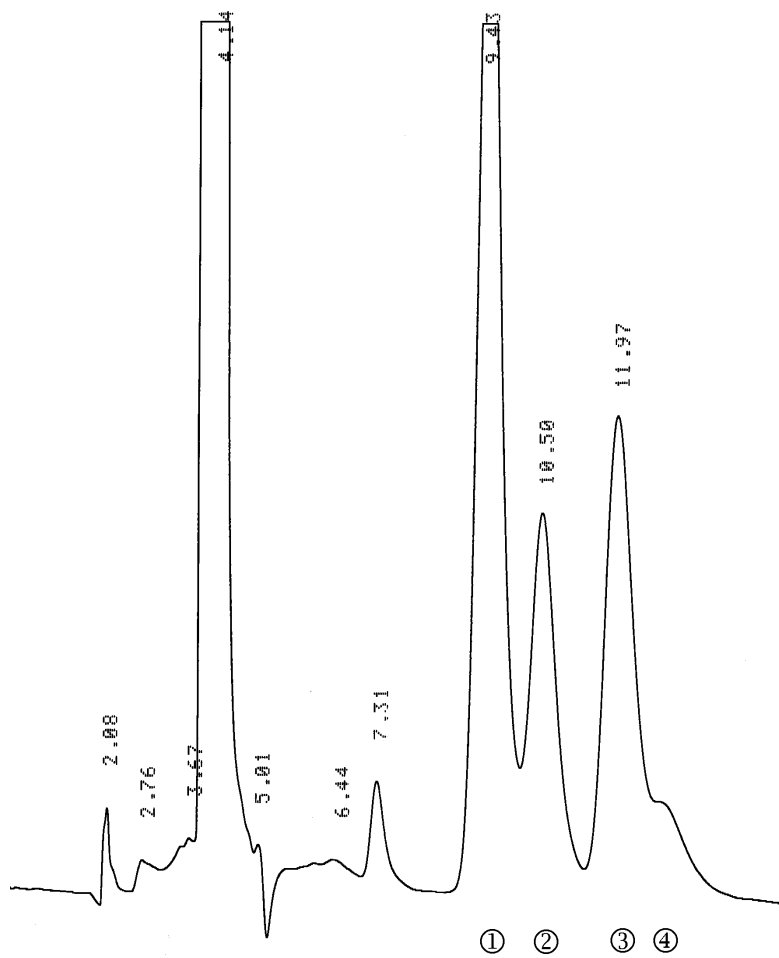


Abb. 3-27: Zuordnung der Sterolglucosid-Fractionen (präparative HPLC), vgl. Tabelle und Abb. Seite 66

4 ZUSAMMENFASSUNG

Δ^7 -Sterole und ihre Glykoside werden als bedeutsam für einen rationalen Ansatz in der Phytotherapie der Benignen Prostatahyperplasie angesehen. Während Δ^7 -Sterolglyka in Cucurbitaceen und insbesondere im Arzneikürbis bereits umfassend erforscht worden sind, liegen über die darin vorkommenden Δ^7 -Sterolglykoside bislang nur relativ wenige Erkenntnisse vor.

Ziel dieser Arbeit war die Isolierung und Aufklärung der chemischen Struktur von Δ^7 -Sterolen und deren Glykosiden aus einem alkoholischen Dickextrakt von Kürbissamen, der mit Indikationsstellung *Prostataadenom Stadium I bis II* sowie *Reizblase* in Form von Kapseln als „Prosta Fink® forte“ im Verkehr ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden leistungsfähige analytische Systeme entwickelt, die die Prüfung von Chargen auf Sterole bzw. Sterolglykoside ermöglichen. Darüber hinaus erlauben die Trennsysteme die Gewinnung dieser Substanzen im präparativen Maßstab. Erstmals wurden ferner exakte Zuordnungen der aufgeklärten Strukturen zu Gaschromatogrammen aus existierenden Untersuchungsmethoden getroffen, die bei der Chargenprüfung durch den Hersteller verwendet werden.

Zur Gewinnung der Δ^7 -Sterole aus dem Kürbissamenextrakt wurde zunächst durch alkalische Hydrolyse und anschließende Festphasenextraktion an Kieselgel der „Unverseifbare Anteil“ isoliert. Hieraus konnten direkt Bestandteile wie Squalen und γ -Tocopherol durch GC-MS identifiziert werden. Durch chromatographische Trennung an RP-Material im präparativen Maßstab gelang es, vier Δ^7 -Sterole zu isolieren und deren Strukturen durch GC-MS sowie NMR-Spektroskopie zu bestimmen. Ein weiteres, nur in Spuren vorliegendes Δ^7 -Sterol wurde durch GC-MS identifiziert.

t_R GC [min]	m/z (M^+)	Struktur
21,59	410	5A (22E)-(24S)-Ethyl-5 α -cholesta-7,22,25-trien-3 β -ol
21,61	412	3A (22E)-(24S)-Ethyl-5 α -cholesta-7,22-dien-3 β -ol
22,25	412	4A (24S)-Ethyl-5 α -cholesta-7,25-dien-3 β -ol
22,42	414	2A (24R)-Ethyl-5 α -cholest-7-en-3 β -ol
22,69	412	1 (24Z)-Ethyl-5 α -cholesta-7,24(24 ¹)-dien-3 β -ol

Abb. 4-1: Identifizierte Δ^7 -Sterole im Gaschromatogramm

Sämtlichen Verbindungen liegt dabei die Struktur eines 24-Ethyl-5 α -cholest-7-enols zugrunde. Besondere Beachtung verdient die Konfiguration am C-24. Im Falle von (24Z)-Ethyl-5 α -cholesta-7,24(24¹)-dien-3 β -ol (Avenasterol, **1**) ist C-24 Ethyliden-substituiert und

stellt somit kein Asymmetriezentrum dar. Alle anderen Sterole sowie ihre Glucoside weisen entweder (*R*)- oder (*S*)-Konfiguration an C-24 auf, besitzen also eine α - oder β -ständige Ethylgruppe. In keinem Fall wurden α - und β -Form einer Grundstruktur nebeneinander gefunden.

Eine mögliche Erklärung dafür fand sich beim Studium von Arbeiten zur Biosynthese von Sterolen in Blütenpflanzen. Auf dieser Basis wurde eine Hypothese zur Entstehung der im Kürbissamenextrakt gefundenen Sterole bzw. Sterolglucoside aufgestellt (vgl. Kapitel 2.4). Versuche mit ^3H - und ^{14}C -markierten Substraten von Goad et al.⁶⁷ sowie McKean und Nes⁶⁸ zeigen, daß die Einführung der 24-Ethylgruppe in die Seitenkette für α - und β -Epimer auf verschiedenen Wegen erfolgen muß.

24 α - und 24 β -Ethyl- Δ^7 -Sterole sind im untersuchten Extrakt in etwa gleicher Quantität vertreten (siehe S. 78). Dies steht im Einklang mit Ergebnissen früherer Arbeiten, die in Kürbissamen ein Mengenverhältnis von etwa 50 : 50 beschreiben.

Anhand der massenspektrometrischen Daten konnten die gefundenen Δ^7 -Sterole eindeutig den Signalen in Gaschromatogrammen zugeordnet werden; fehlerhafte Strukturvorschläge und -zuordnungen aus früheren Arbeiten konnten eindeutig revidiert werden.

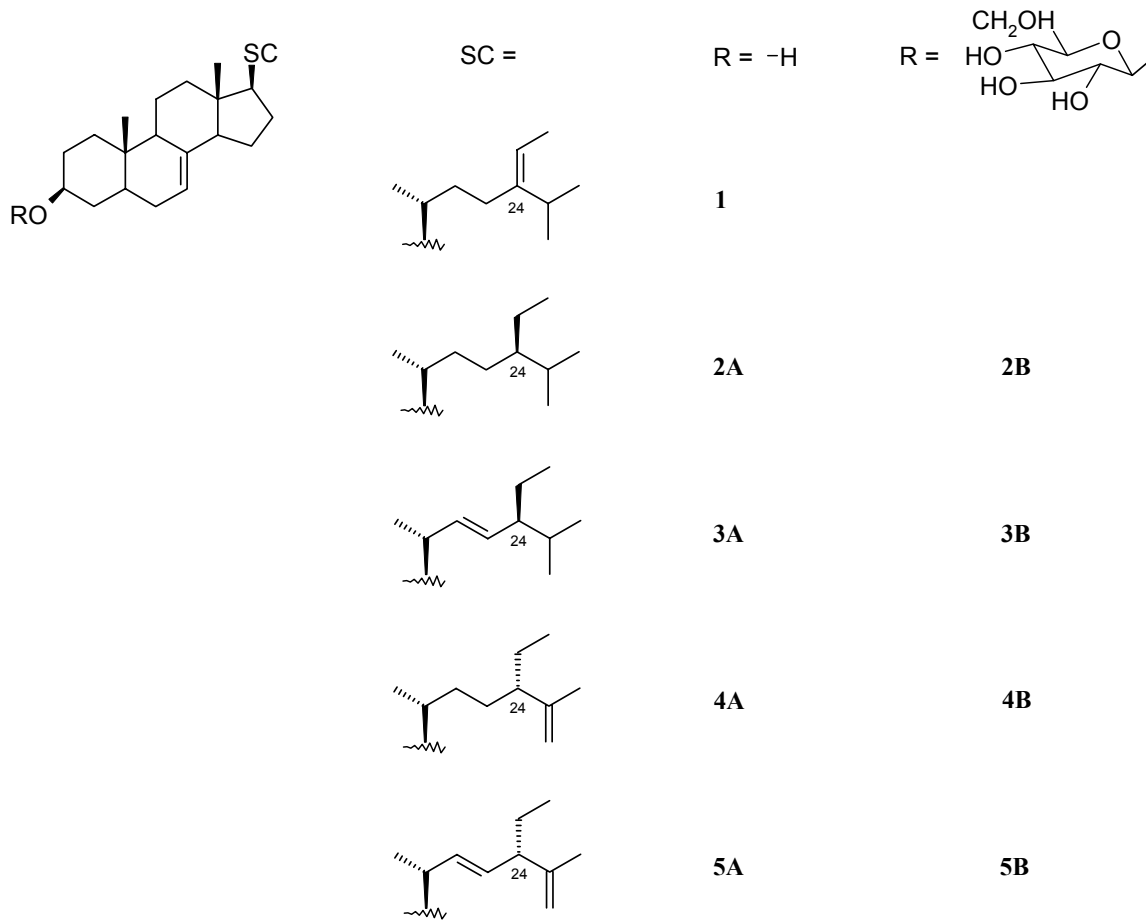
Zur Identifizierung von Sterolglykosiden war zunächst die Synthese einer Modellsubstanz (Cholesterol- β -D-glucosid) für die Entwicklung von HPLC-MS(/MS)-Methoden erforderlich. Diese Technik erlaubt die hochspezifische Detektion kleinster Analytmengen in komplexen Stoffgemischen.

Sterolglykoside wurden durch sukzessive Soxhlet- und Festphasenextraktion aus dem Kürbissamenextrakt isoliert. Die komplexe Matrix konnte auf diese Weise bei geringem Lösungsmittelbedarf weitestgehend abgetrennt werden. Die Strukturaufklärung der Sterolglykoside erfolgte anhand einer enzymatischen Umsetzung zu Sterolaglyka und dem Zuckeranteil. Modellversuche hierzu wurden mit Cholesterol- β -D-glucosid und zwei kommerziell erhältlichen Glucosidasen durchgeführt, wobei sich herausstellte, daß die verwendeten Enzyme sich nicht zur Spaltung von Sterolglykosiden eignen. Daraufhin wurde die zur erfolgreichen Hydrolyse erforderliche Steryl- β -D-glucosidase aus Keimlingen von *Sinapis alba* selbst angereichert. Durch die erwiesene Spezifität des Enzyms für Sterolglucoside, die mit dem Zucker β -D-verknüpft sind, ist die Art und Verknüpfung des Zuckers in den hydrolysierten Analyten eindeutig bestimmt. Die Aglyka wurden durch GC-MS identifiziert.

Das Ergebnis dieser Untersuchungen war, daß von den fünf im Extrakt identifizierten Δ^7 -Sterolaglyka vier darüber hinaus als Mono-O- β -D-Glucoside vorliegen.

Weitere Versuche ermöglichten im Anschluß die Isolierung der vier Sterolglucoside im mg-Maßstab und die Bestätigung der chemischen Strukturen durch NMR-Spektroskopie.

Eine Übersicht über alle identifizierten Substanzen zeigt Abb. 4-2.



Substanz	IUPAC-Bezeichnung
1	(24Z)-Ethyl-5 α -cholesta-7,24(24 ¹)-dien-3 β -ol
2A	(24R)-Ethyl-5 α -cholest-7-en-3 β -ol
2B	(24R)-Ethyl-5 α -cholest-7-en-3 β -yl- β -D-glucopyranosid
3A	(22E)-(24S)-Ethyl-5 α -cholesta-7,22-dien-3 β -ol
3B	(22E)-(24S)-Ethyl-5 α -cholesta-7,22-dien-3 β -yl- β -D-glucopyranosid
4A	(24S)-Ethyl-5 α -cholesta-7,25-dien-3 β -ol
4B	(24S)-Ethyl-5 α -cholesta-7,25-dien-3 β -yl- β -D-glucopyranosid
5A	(22E)-(24S)-Ethyl-5 α -cholesta-7,22,25-trien-3 β -ol
5B	(22E)-(24S)-Ethyl-5 α -cholesta-7,22,25-trien-3 β -yl- β -D-glucopyranosid

Abb. 4-2: Identifizierte Δ^7 -Sterolaglyka und Δ^7 -Sterolglucoside

5 EXPERIMENTELLER TEIL

5.1 ALLGEMEINE ANGABEN

Es wurden handelsübliche Lösungsmittel verwendet und durch Destillation gereinigt. Für die Flüssigchromatographie kamen Lösungsmittel der Qualität *gradient grade* zum Einsatz. Wasser für die HPLC wurde durch Destillation von demineralisiertem Wasser gewonnen.

Zur Flash-Säulenchromatographie sowie für die Festphasenextraktion im präparativen Maßstab wurde Kieselgel 60 (0,0040-0,0063 mm) der Fa. Merck verwendet.

5.2 ANGABEN ZUM EXTRAKT

Der ethanolische Dickextrakt (15-25:1) aus Samen des Arzneikürbis *Cucurbita pepo* L. convar. *citrullinina* var. *styriaca* wurde von GSK Consumer Healthcare GmbH & Co. KG zur Verfügung gestellt.

Die Kürbissamen wurden vom Hersteller des Extrakts mit Ethanol (92 % m/m) extrahiert, wobei 100 g Extraktionsmittel pro 10 g Droge eingesetzt werden. Beim Eindampfen trennt sich die entstandene homogene Dispersion nach längerem Stehen in zwei nicht mischbare Phasen, die als Öl- und Hydrophase bezeichnet werden. Während dieser Dickextrakt im regulären Produktionsprozeß durch Zugabe von partiell methyliertem Siliciumdioxid stabilisiert wird, werden Öl- und Hydrophase zu analytischen Zwecken getrennt untersucht. Für die vorliegende Arbeit standen sowohl der Gesamtextrakt als auch Öl- und Hydrophase zur Verfügung.

5.3 METHODEN, GERÄTE UND PARAMETER

5.3.1 Dünnschichtchromatographie

DC-Fertigfolien

Polygram® SIL G/UV₂₅₄, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren

Präparative DC

PSC-Platten 20 x 20 cm x 1 mm Schicht, Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck, Darmstadt

Laufmittelsysteme

System 1: Hexan/Essigsäureethylester 60:40

System 2: Hexan/Diethylether 65:35

System 3: Hexan/iso-Propanol 80:20

Reagenzien zur Detektion

A) 10 % H₂SO₄ in MeOH, Heißluft

B) Rhodamin-6G: 0,01 % in Aceton

C) Primulin, 5 mg in 100 ml Ethanol

5.3.2 Analytische HPLC

Merck L7612 Solvent Degasser

Merck D7000 Interface

Merck L7100 Gradientenpumpe

Merck L7250 Autosampler

Merck L7455 Diodenarray-Detektor

Merck D7000 System Manager Software v3.1.1

Parameter für die Analytik von Sterolaglyka

Merck LiChroCART®, LiChrospher® 100 RP-18, 250-4, 5 µm

Injektionsvolumen: 10 µl

Flow: 1 ml/min, 98/2 MeOH/Wasser

Maisch ReproSil ODS-3, 125-4, 3 µm

Injektionsvolumen: 10 µl

Flow: 1 ml/min, 98/2 MeOH/Wasser

Maisch ReproSil ODS-3, 60-2, 3 µm

Injektionsvolumen: 10 µl

Flow: 0,3 ml/min, 98/2 MeOH/Wasser

5.3.3 Präparative HPLC

Merck L6250 Pumpe, präparativer Pumpenkopf

Merck L4000 UV-Detektor, 203 nm

Merck D2000 Chromato-Integrator

Säule: Merck Hibar® Fertigsäule, LiChrospher 100 RP-18, 250-25, 10 µm

Flow: 30 ml/min, 100 % MeOH

5.3.4 HPLC-MS/MS

Applied Biosystems API2000

Agilent HP1100 HPLC-System (Degaser, Pumpe, Autosampler, DAD)

Analyst Software v1.2

Ionenquelle: Heated Nebulizer (APCI)

MS-Parameter für Sterolglucoside:

CUR	curtain gas	15 ml/min
TEM	temperature	350 °C
IS	ion spray voltage	5500 V
GS1	auxillary gas	85 ml/min
GS2	nebulizer gas	10 ml/min
ihe	interface heater	1 (on)
NC	nebulizer current	2,0 µA
DP	declustering potential	8,0 V
FP	focussing potential	400,0 V
EP	entrance potential	10,0 V
IE1	ion energy 1	0,8 eV
CEM	continuous electron multiplier	2850 V
DF	deflector	-200 V

für MS/MS-Experimente:

CAD	collision gas	12 ml/min
CE	collision energy	23,0 V
CXP	collision cell exit potential	8,0 V

MS-Parameter für 4-Nitrophenylglucosid/4-Nitrophenol

CUR	curtain gas	15 ml/min
TEM	temperature	350 °C
IS	ion spray voltage	5500 V
GS1	auxillary gas	80 ml/min

GS2	nebulizer gas	10 ml/min
ihe	interface heater	1 (on)
NC	nebulizer current	2,0 μ A
DP	declustering potential	25,0 V
FP	focussing potential	380,0 V
EP	entrance potential	10,0 V
IE1	ion energy 1	0,8 eV
CEM	continuous electron multiplier	2850 V
DF	deflector	-200 V

HPLC-Parameter für die Analytik von Sterolaglyka

Säule: Maisch ReproSil ODS-3, 60-2, 3 μ m

Injektionsvolumen: 2 μ l

Flow: 0,3 ml/min, 98/2 MeOH/Wasser

HPLC-Parameter für die Analytik von Sterolglykosiden

Säule: Phenomenex Luna C8(2), 50-2, 3 μ m

Injektionsvolumen: 2 μ l

Flow: 0,3 ml/min, 87/13 MeOH/Wasser

HPLC-Parameter für die Analyse von Sterolen neben Sterolglykosiden

Säule: Phenomenex Luna C8(2), 50-2, 3 μ m

Injektionsvolumen: 2 μ l

Flow: 0,3 ml/min

Gradient:

Zeit	Wasser [%]	MeOH [%]
0	13	87
4,00	13	87
5,00	2	98
8,00	2	98
8,01	13	87
13,00	13	87

5.3.5 GC-MS

Agilent-System

HP5980 Series II Gaschromatograph

HP5972 EI-MS

HP7673 Split/Splitless-Injektor und Autosampler

Enhanced ChemStation Software G1701BA Version B.01.00

Säule: J&W Scientific HP-5MS, 30 m, I.D. 0,25 mm, Coating 0,25 µm

Flow: 1,4 ml/min He

Injektionsvolumen: 2 µl, splitless

Injektortemperatur: 250 °C

Detektortemperatur: 280 °C

Temperaturprogramm:

Aufheizrate [°C/min]	Zieltemperatur [°C]	Haltezeit [min]
---	55	1
20	260	0
3	300	1

Gesamtprogrammzeit: 25,58 min

MS-Parameter:

Solvent cut time: 4 min

Scan mode, 50 – 450 m/z

Scan speed: 1,9/s

Shimadzu-System

GC-17A Gaschromatograph

GCMS-QP5000 EI-MS mit Schubstangensystem

AOC-20i Split/Splitless-Injektor und Autosampler

GCMSsolution Software v1.01 Su3 A

Säule: Macherey-Nagel OV-1701, 25 m, I.D. 0,25 mm, Coating 0,25 µm

Flow: 1,6 ml/min He

Injektionsvolumen: 2 µl, Split 10

Injektortemperatur: 250 °C

Detektortemperatur: 200 °C

Säule: J&W Scientific HP-5MS, 30 m, I.D. 0,25 mm, Coating 0,25 µm

Flow: 1,6 ml/min He

Injektionsvolumen: 2 µl, Split 10

Injektortemperatur: 250 °C

Detektortemperatur: 200 °C

Temperaturprogramm:

Aufheizrate [°C/min]	Zieltemperatur [°C]	Haltezeit [min]
---	60	1
20	260	0
3	300	1,67

Gesamtprogrammzeit: 26,0 min

MS-Parameter:

Solvent cut time: 5 min

Scan mode, 50 – 500 m/z

Scan speed: 2000

5.3.6 NMR

Die NMR-Spektren wurden mit den Kernresonanzspektrometern JEOL JNM-ECP 400 und JEOL JNM-ECP 500 aufgenommen. Die Auswertung der Spektren wurde mit JEOL Delta v4.2.3 für Windows vorgenommen.

5.3.7 Sonstige Geräte

Universalmühle

IKA Universalmühle M20, Janke & Kunkel, Staufen

Dispergiergeräte

Polytron PT 2000, Kinematica AG, Littau, Schweiz

Waring Blender

Zentrifugen

Heraeus/Kendro Megafuge 1.0

Heraeus Sepatech Suprafuge 22

SPE-Vakuumkammer

IST International Sorbent Technology VacMaster 10 mit PTFE-Hahn und –Nadel

Membranfiltration

Membranfiltrationsgerät GV-Serie, Schleicher & Schuell, Dassel

Schüttelinkubator

Modell AK-82, Infors AG; 200 upm, 35 °C

Schmelzpunktbestimmung

Büchi Melting Point B-540

Die Schmelzpunkte sind in °C angegeben und nicht korrigiert.

Polarimeter

Aufgrund der geringen isolierten Substanzmengen wurde die Bestimmung der optischen Drehung nicht durchgeführt.

UV-Spektrometer

Die UV-Absorption wurde durch DAD-Messungen im Rahmen der analytischen HPLC bestimmt. Lösungsmittel war das jeweilige HPLC-Eluens.

5.3.8 Verbrauchsmaterial

SPE-Kartuschen

Merck LiChrolut[®] EN 200 mg, 3 ml Standard PP-Röhrchen, Merck, Darmstadt

Membranfilter

RC-L 60, 1 µm, 50 mm, Schleicher & Schuell, Dassel

Spritzenfilter

Phenex Nylon, 4 mm, 2 µm, phenomenex, Aschaffenburg

5.4 ARBEITSVORSCHRIFTEN

5.4.1 Isolierung freier Sterole aus *C. pepo*

Alkalische Hydrolyse:

30,0 g Kürbissamendickextrakt (Ölphase:Hydrophase = 50:50) werden in einem Rundkolben mit 50 g methanolischer Kalilauge (8 g KOH p.a., 38 g MeOH dest. und 4 g bidest. Wasser) 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wird unter Rückfluß erhitzt (Ölbad: 90 °C). Nach 60 Minuten wird der Kolben abgenommen und 80 g Kieselgel zugesetzt. Am Rotavapor wird unter Vakuum und Erhitzen auf 70 °C soviel Lösungsmittel entfernt, daß eine rieselfähige Mischung entsteht.

Festphasenextraktion:

Das beladene Kieselgel wird in einer Reibschale feinst verrieben und mit einer Mischung aus Hexan und Diethylether (1:1) aufgeschlämmt. Eine Flashchromatographie-Säule (85 mm Außendurchmesser) wird mit Watte und Sandbett präpariert und die Suspension eingefüllt. Mit dem gleichen Lösungsmittel wird von der Festphase eluiert, bis das Eluat nur noch schwach gelb gefärbt ist (Gesamtvolumen ca. 500 ml). Das Lösungsmittel wird am Rotavapor entfernt.

Präparative HPLC:

Das erhaltene Rohprodukt, ein rotbraunes Öl (0,8 g), wird anteilsweise in die präparative HPLC eingespritzt (Parameter siehe 5.3.3) und mit MeOH eluiert. Man erhält folgende relevante Fraktionen:

Fraktion	t_R [min]	Zusammensetzung	Ausbeute* [mg]
1	18,8	(22E)-(24S)-Ethyl-5 α -cholesta-7,22,25-trien-3 β -ol	7,8
2	21,7	(24S)-Ethyl-5 α -cholesta-7,25-dien-3 β -ol	5,1
3	23,7	(24Z)-Ethyl-5 α -cholesta-7,24(24 ¹)-dien-3 β -ol	4,2
4	25,3	(22E)-(24S)-Ethyl-5 α -cholesta-7,22-dien-3 β -ol	11,3
Gesamt			28,4

* nach Umkristallisieren

Die einzelnen Fraktionen werden am Rotavapor eingengt und die erhaltenen Δ^7 -Sterole aus Methanol umkristallisiert.

5.4.2 Synthese von α - und β -Cholesterylglucosid

15 mmol Cholesterol (5,79 g) und 7,5 mmol wasserfreies Zinkoxid (0,61 g) werden in 100 ml wasserfreiem DCM bei Raumtemperatur 8 Stunden lang gerührt. Eine Lösung von 10 mmol 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosid (Acetobromglucose; 4,11 g, Merck) in 100 ml wasserfreiem DCM wird portionsweise zugesetzt und anschließend unter Rückfluß erhitzt (Ölbad: 55 °C). Nach 16 Stunden wird die Umsetzung mittels DC (System 3, Detektion C) kontrolliert. Der Ansatz wird über Kieselgur filtriert und der Rückstand mehrmals mit DCM gewaschen. Das Filtrat wird mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und am Rotavapor eingengt. Eine Mischung aus 7,5 ml Acetanhydrid und 3 ml Pyridin wird zugesetzt und 24 Stunden stengelassen. Es wird auf 15 g Eis gegossen und der abgeschiedene Feststoff mit Wasser gewaschen. Das im Exsikkator getrocknete Zwischenprodukt wird in Hexan/Essigsäureethylester 3:1 gelöst und mit diesem Eluenten an Kieselgel mittels Flash-Säulenchromatographie in α - und β -Anomer aufgetrennt (DC-Kontrolle: System 1, Detektion A; Elutionsreihenfolge: β -Anomer, α -Anomer).

Ausbeute: 82 mg (1,59 %) Cholesteryl- α -D-tetra-O-acetylglucopyranosid
 114 mg (1,15 %) Cholesteryl- β -D-tetra-O-acetylglucopyranosid
 (Lit.⁵⁴: 73 % Cholesteryl-(α / β)-D-tetra-O-acetylglucopyranosid)
 β -Selektivität: 58 % (Lit.⁵⁴: 88 %)

Das tetraacetylierte α -Zwischenprodukt wird unter Rühren mit einer Lösung von 1 % Natrium in MeOH versetzt (ca. 1 ml pro 25 mg Substanz). Nach 60 Minuten wird mit Eisessig neutralisiert. Das Lösungsmittel wird entfernt und das Endprodukt aus Essigsäureethylester umkristallisiert.

Mit dem tetraacetylierten β -Zwischenprodukt wird analog verfahren.

Ausbeute: 62 mg (98,8 %) Cholesteryl- α -D-tetra-O-acetylglucopyranosid
 86 mg (98,6 %) Cholesteryl- β -D-tetra-O-acetylglucopyranosid
 (Lit.⁵⁴: k. A.)

Spektroskopische Daten: siehe 5.5.3

5.4.3 Isolierung von Sterolglykosiden

100 g Kürbissamenextrakt (Öl- oder Hydrophase) werden mit 200 g Kieselgel homogen verrieben, so daß ein rieselfähiges Produkt entsteht. Dieses wird in eine 1000 ml-Soxhletfilterhülse eingebracht. Die Soxhlet-Apparatur wird unter Verwendung von Heizpilz und Siedesteinen in Betrieb genommen.

Schritt 1:

Es wird mit Hexan solange extrahiert, bis das rückfließende Eluat farblos ist. Nach Entfernung des Lösungsmittels erhält man ca. 29 g eines goldgelben Öls, das u. a. Triglyceride, Fettsäureester, Squalen und Tocopherole enthält.

Schritt 2:

Es wird mit Diethylether an der Soxhlet-Apparatur solange extrahiert, bis das rückfließende Eluat farblos ist. Nach Entfernung des Lösungsmittels erhält man ca. 25 g eines dunkelgrün gefärbten, öligen Extrakts, der Δ^7 -Sterole (vgl. 5.4.1) neben viel Chlorophyll enthält.

Schritt 3:

Das beladene Kieselgel wird in der Filterhülse im Warmluftstrom getrocknet. Es wird eine Aufschlammung mit Chloroform (ca. 250 ml) hergestellt. Eine Flash-Säule (85 mm Außendurchmesser) wird mit Watte und Sandbett präpariert und die Aufschlammung eingefüllt.

Schritt 4:

Es erfolgt Elution von der Festphase mit ca. 500 ml Chloroform. Das Eluat wird verworfen.

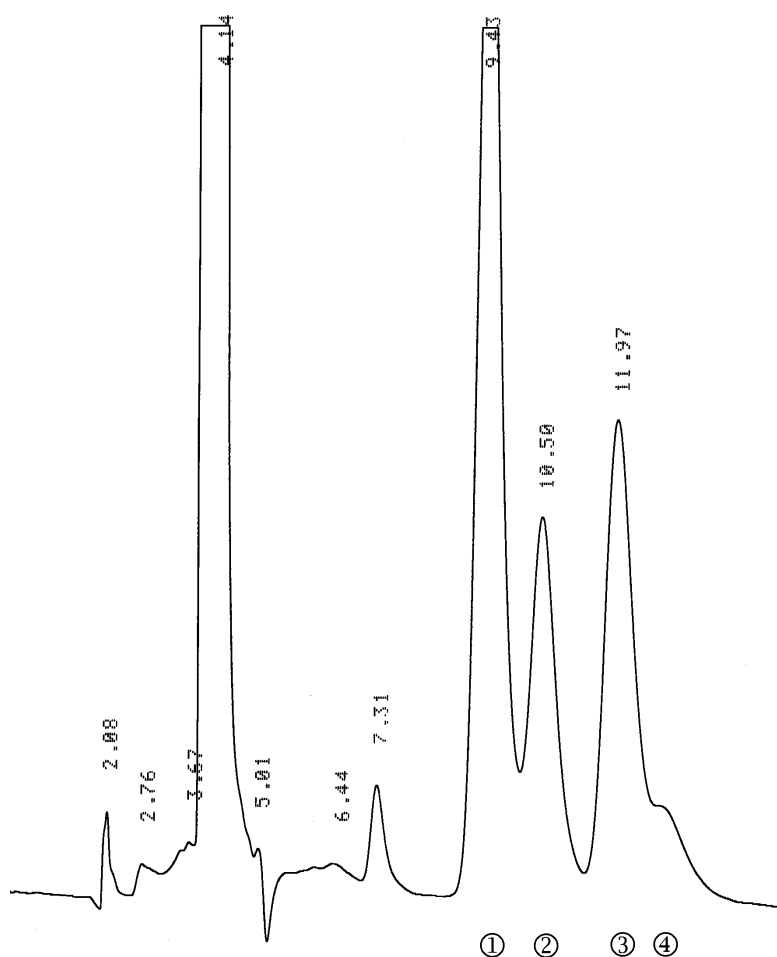
Schritt 5:

Es erfolgt Elution von der Festphase mit einem Gemisch aus Chloroform und Methanol (92:8 v/v, ca. 200 ml). Das Lösungsmittel wird am Rotavapor entfernt. Der Rückstand enthält neben Verunreinigungen Δ^7 -Sterolglucoside.

Schritt 6:

Um Sterolglucoside in präparativen Mengen zu erhalten, wird die Hydrophase des Kürbissamenextrakts wie oben beschrieben verarbeitet. Der Rückstand aus Schritt 5 wird in Methanol gelöst und portionsweise mit präparativer HPLC weiter aufgereinigt und dadurch die enthaltenen Sterolglykoside voneinander getrennt. HPLC-Parameter siehe 5.3.3. Aus insgesamt 200 g Hydrophase wurden ca. 4 mg Δ^7 -Sterol- β -D-glucoside isoliert (vgl. Tabelle auf der folgenden Seite).

Fraktion	t_R [min]	Zusammensetzung	Ausbeute [mg]
1	9,43	5B (22 <i>E</i>)-(24 <i>S</i>)-Ethyl-5 α -cholesta-7,22,25-trien-3 β -yl- β -D-glucopyranosid	1,2
2	10,50	4B (24 <i>S</i>)-Ethyl-5 α -cholesta-7,25-dien-3 β -yl- β -D-glucopyranosid	1,3
3	11,97	3B (22 <i>E</i>)-(24 <i>S</i>)-Ethyl-5 α -cholesta-7,22-dien-3 β -yl- β -D-glucopyranosid	1,0
4	ca. 12,8	2B (24 <i>R</i>)-Ethyl-5 α -cholest-7-en-3 β -yl- β -D-glucopyranosid	0,5
Gesamt			4,0



5.4.4 Isolierung einer Sterol- β -D-glucosidase aus *Sinapis alba*

Samen von *Sinapis alba* werden in einem Keimapparat unter täglichem Bewässern zur Keimung gebracht. Nach sieben Tagen werden 50 g Keimlinge entnommen und in einem Waring Blender mit 150 ml 0,1 M Tris-maleat-Puffer pH 5,2 30 Sekunden lang homogenisiert. Das Rohhomogenat wird durch ein Gewebetuch filtriert und anschließend bei 4 °C und 800 g 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wird erneut 10 min bei 1000 g zentrifugiert. Der Rückstand wird verworfen. Durch erneute Zentrifugation bei 3000 g (10 min) und anschließend 15000 g (20 min) erhält man zwei Sedimentfraktionen, die vereinigt und mit einem Rotor-Stator-Dispergiergerät in 30 ml 0,1 M Tris-maleat resuspendiert werden. Durch Eintropfen in 300 ml -15 °C kaltes Aceton wird eine Proteinfraction präzipitiert, mit 10 ml kaltem Aceton gewaschen und im Vakuum über Nacht getrocknet.

Das Präzipitat wird mit dem Dispergiergerät in 20 ml 0,1 M Succinatpuffer pH 5,2 suspendiert und 10 min bei 15000 g zentrifugiert. Der Überstand mit den darin gelösten Proteinen wird in 200 ml -15 °C kaltes Aceton eingetropt. Das Präzipitat wird mit 10 ml kaltem Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es enthält Cholesteryl- β -D-glucosid-glucohydrolase. Die Ausbeute an Protein beträgt 540 mg.

5.4.5 Enzymatische Spaltung von 4-Nitrophenylglucosid

100 µg in Pufferlösung bzw. Wasser (siehe Abb. 3-21) gelöste β-Glucosidase aus Mandeln bzw. 1,0 mg gelöste Glucosidase aus *A. niger* werden einer Lösung von 50 µg 4-Nitrophenylglucosid (Fluka) im jeweils gleichen Lösungsmittel zugesetzt. Die Reaktion wird nach der Inkubation (Dauer: siehe Abb. 3-21) durch kurzes Erhitzen zum Siedepunkt gestoppt und die Lösung über Phenex Nylon-Spritzenfilter (2 µm) membranfiltriert. Das Verhältnis von 4-Nitrophenylglucosid und 4-Nitrophenol wird per HPLC-MS bestimmt (Bedingungen siehe 5.3.4). In gleicher Weise wird die Reaktion unter zusätzlicher Beimischung von 100 µl DMSO durchgeführt.

5.4.6 Enzymatische Spaltung von Δ^7 -Sterol-β-D-glucosiden

Etwa 150 µg Substrat (Sterolglykosidfraktion aus 5.4.3), gelöst in 0,5 ml Methanol, werden mit einer Suspension von 1 mg „Stery-β-D-glucosidase“ (Proteinpräzipitat aus 5.4.4) in 1,0 ml 0,1 M Succinatpuffer pH 5,2 versetzt. Die Reaktion wird unter 60-minütigem Schütteln bei 37 °C durchgeführt. Anschließend erfolgt die Extraktion der freigesetzten Sterolaglyka mittels SPE (siehe 5.4.7) und Analytik mit GC-MS.

5.4.7 Festphasenextraktion von Sterolen aus alkoholisch-wässriger Lösung

Es werden Merck LiChrolut® EN Fertigkartuschen und eine SPE-Vakuumkammer verwendet. Die Tropfgeschwindigkeit liegt bei 5-7 ml/min.

Die SPE-Kartuschen werden mit 2 ml Methanol konditioniert. Anschließend wird die Probe (1,5 ml) aufgegeben. Kurz vor dem Trockenlaufen wird mit 2 ml Methanol/Wasser (50:50) gewaschen. Die Kartusche wird durch Vakuum trockengesaugt und mit 2 x 0,5 ml Essigsäureethylester die Analyten langsam eluiert.

5.4.8 Untersuchung sterolhaltiger Proben mit GC-MS

Feste Proben werden in einem geeigneten Lösungsmittel (z. B. Essigsäureethylester) aufgenommen und ggf. durch ein Spritzenfilter gegeben, um Schwebstoffe zu entfernen. Flüssige Proben werden ggf. verdünnt und ebenfalls filtriert. Die Probenkonzentration ist so zu wählen, daß der CEM des Massenspektrometers nicht übermäßig belastet wird.

Die Probenlösung wird in 2 ml Braunglasvials mit 300 µl *micro insert* gefüllt, so daß auch geringe Probenvolumina zwischen 10 und 20 µl sicher vom Autosampler verarbeitet werden können. Zum Verschließen werden Alu-Crimp-Caps mit Butylgummi/PTFE-Septen verwendet.

Die Geräte- und Methodenparameter der GC-MS-Systeme sind unter 5.3.5 zu ersehen.

5.4.9 Untersuchung von Proben mit HPLC-MS

Feste Proben werden in einem geeigneten Lösungsmittel (z. B. Chloroform/Methanol 2:1 v/v) aufgenommen und ggf. durch ein Spritzenfilter gegeben, um Partikel zu entfernen. Flüssige Proben werden ggf. verdünnt und ebenfalls filtriert. Die Probenkonzentration ist je nach der Natur des gewählten Experiments so zu wählen, daß der CEM des Massenspektrometers nicht übermäßig belastet wird.

Die Probenlösung wird in 2 ml Braunglasvials mit 300 µl *micro insert* gefüllt, so daß auch geringe Probenvolumina zwischen 10 und 20 µl sicher vom Autosampler verarbeitet werden können. Zum Verschließen werden Alu-Crimp-Caps mit Butylgummi/PTFE-Septen verwendet.

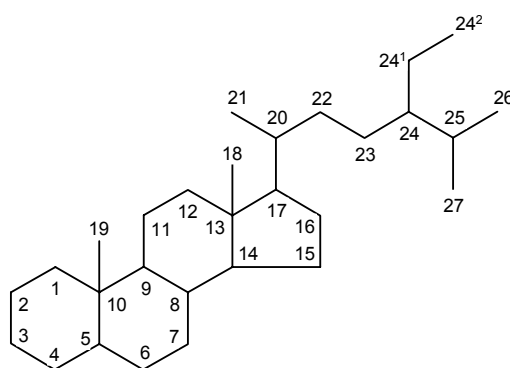
Die Geräte- und Methodenparameter des HPLC-MS-Systems sind unter 5.3.4 zu ersehen.

5.5 DATENBLÄTTER

5.5.1 Δ^7 -Sterole

Die nachfolgenden Verbindungen sind unter Angabe ihrer IUPAC-Bezeichnung sowie der üblicherweise verwendeten Trivialnamen aufgeführt.

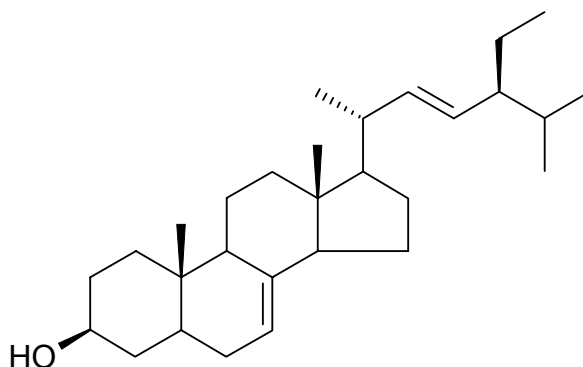
Die Lokantenbezeichnung am Kohlenstoff-Grundgerüst richtet sich nach den Empfehlungen der IUPAC und stellt sich wie folgt dar (siehe auch 1.3.3):



Die Strukturaufklärung erfolgte durch die Auswertung der aufgenommenen NMR- und Massenspektren. Hierbei waren vor allem die 2D-Spektren (HMOC, HMBC) von höchstem Wert. Die angegebene Chemische Verschiebung bezieht sich auf $\delta_{\text{TMS}} = 0,00$ ppm.

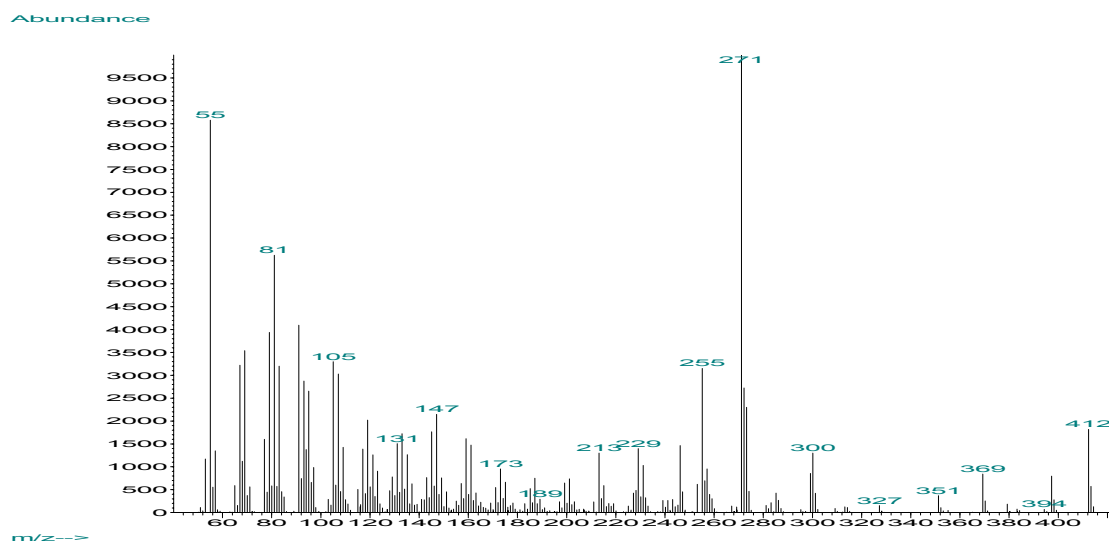
Im Zuge der gaschromatographischen Trennung aufgezeichnete EI-Massenspektren (70 eV) wurden auf charakteristische Fragmente hin untersucht und mit Literaturdaten verglichen. Zusätzlich zu den Massenspektren (Meßbereich: $m/z = 50-450$) sind wichtige Signale nochmals mit ihrer relativen Intensität aufgelistet.

Genannte Retentionszeiten beziehen sich auf GC-Bedingungen wie unter 5.3.5, "Agilent System", beschrieben.

5.5.1.1 (22E)-(24S)-Ethyl-5 α -cholesta-7,22-dien-3 β -ol (**3A**)(24E)-5 α -Stigmasta-7,22-dien-3 β -ol, Spinasterol

$C_{29}H_{48}O$
 $M_R = 412,70$

EI-MS



m/z (Relative Intensität; Ion)

412 (18; M^+); 397 (8; $M^+ -CH_3$); 394 (1; $M^+ -H_2O$); 379 (2; $M^+ -CH_3 -H_2O$);
 369 (8; $M^+ -C_3H_7$); 351 (4); 300 (13); 273 (23; $M^+ -SC$); 271 (100; $M^+ -SC -2H$);
 255 (32; $M^+ -SC -H_2O$); 253 (6; $M^+ -SC -H_2O -2H$); 246 (15); 231 (10; $M^+ -SC -C_3H_6$);
 229 (14; $M^+ -SC -C_3H_8$); 213 (13; $M^+ -SC -C_3H_6 -H_2O$); 211 (2; $M^+ -SC -C_3H_8 -H_2O$)

¹³C-NMR (CDCl₃):

δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm) Lit. ^{69,70}	δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm) Lit. ^{69,70}
12,07	18	12,07	38,03	4	38,06
12,25	24 ² (29)	12,23	39,49	12	39,51
13,05	19	13,04	40,30	5	40,32
18,95	27	19,01	40,76	20	40,77
21,10	26	21,37; 21,10	43,31	13	43,32
21,57	11	21,58	49,48	9	49,51
21,57	21	21,08	51,27	24	51,26
23,03	15	23,04	55,15	14	55,16
25,41	24 ¹ (28)	25,38	55,94	17	56,00
28,40	16	28,49	71,07	3	71,08
29,66	6	29,68	117,47	7	117,48
31,51	2	31,53	129,47	23	129,52
31,84	25	31,88	138,12	22	138,15
34,25	10	34,26	139,57	8	139,58
37,17	1	37,19			

Die Signale für C-11 und C-21 wurden durch HMQC, HMBC und DEPT135 bestätigt.

¹H-NMR (CDCl₃):

δ [ppm]	Multiplizität	J [Hz]	Integral	H-Atom	Lit. ⁶⁹ (δ [ppm], J [Hz])
0,54	s		3	18	0,55
0,79	s		3	19	0,80
0,79	d	6,4	3	27	0,79
0,80	t	7,3	3	24 ² (29)	0,84 6,4
0,84	d	6,5	3	26	0,84
1,02	d	6,6	3	21	1,05 6,6
3,58	m		1	3	3,60
5,02	dd	15,2; 8,7	1	23	5,10 15,2; 8,7
5,15	m		1	7	5,15
5,15	dd	15,0; 8,7	1	22	5,16 15,2; 8,7

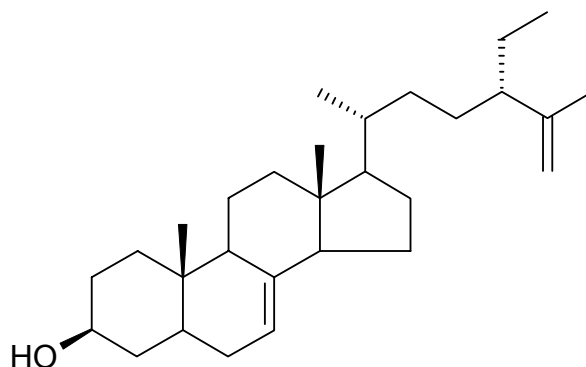
des weiteren: 0,90-2,10; m, 29 H (darunter das d bei 1,02)

UV:

λ_{max} = 203 nm

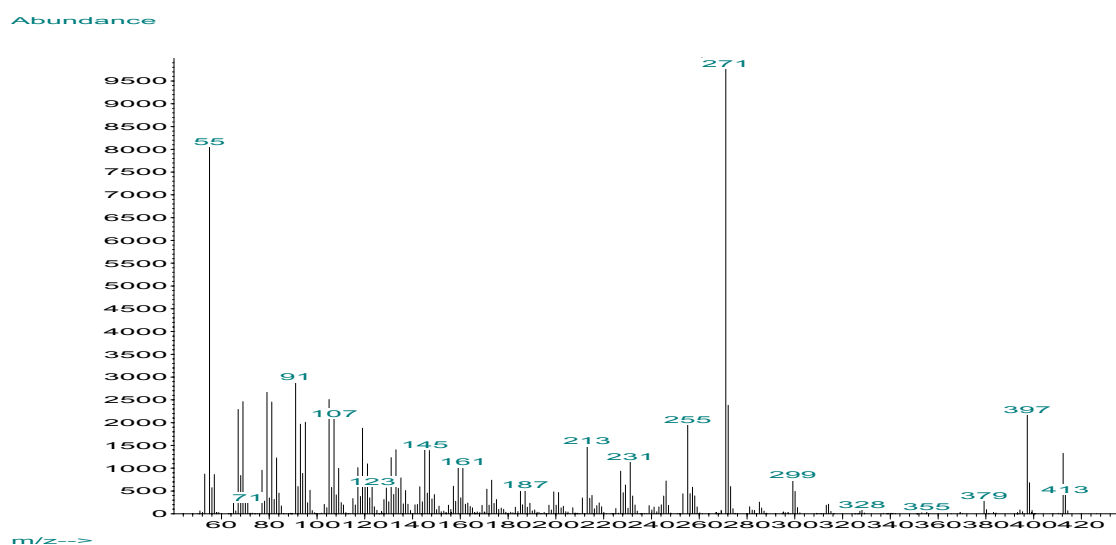
Retentionszeit (min):

GC (Agilent-System)	HPLC, Säulendimension [mm] (siehe 5.3.2 bis 5.3.4)			
	60-2	125-4	250-4	250-10
22,04	5,96	8,21	18,15	25,46

5.5.1.2 (24S)-Ethyl-5 α -cholesta-7,25-dien-3 β -ol (**4A**)5 α -Poriferasta-7,25-dien-3 β -ol

$C_{29}H_{48}O$
 $M_R = 412,70$

EI-MS



m/z (Relative Intensität; Ion)

412 (13; M^+); 397 (22; $M^+ - CH_3$); 394 (1; $M^+ - H_2O$); 379 (3; $M^+ - CH_3 - H_2O$); 300 (5);
 273 (6; $M^+ - SC$); 272 (24); 271 (100; $M^+ - SC - 2H$); 255 (20; $M^+ - SC - H_2O$);
 253 (4; $M^+ - SC - H_2O - 2H$); 246 (7); 231 (11; $M^+ - SC - C_3H_6$); 229 (6; $M^+ - SC - C_3H_8$);
 227 (9); 213 (15; $M^+ - SC - C_3H_6 - H_2O$)

¹³C-NMR (CDCl₃):

δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm) Lit. ⁷¹	δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm) Lit. ⁷¹
11,84	18	11,84	37,17	1	37,15
12,06	24 ² (29)	12,07	38,02	4	37,98
13,05	19	13,03	39,60	12	39,58
17,82	26	17,78	40,29	5	40,26
18,79	21	18,77	43,41	13	43,39
21,58	11	21,56	49,48	9	49,46
22,97	15	22,96	49,54	24	49,53
26,54	24 ¹ (28)	26,53	55,07	14	55,04
27,90	16	27,89	56,12	17	56,09
29,52	23	29,50	71,08	3	71,05
29,68	6	29,66	111,37	27	111,39
31,51	2	31,47	117,44	7	117,43
33,65	22	33,63	139,63	8	139,60
34,23	10	34,21	147,58	25	147,53
35,99	20	35,99			

¹H-NMR (CDCl₃):

δ [ppm]	Multiplizität	J [Hz]	Integral	H-Atom	Lit. ⁶⁹ (δ [ppm], J [Hz])
0,53	s		3	18	0,53
0,79	s		3	19	0,79
0,80	t	7,3	3	29	0,80 7,3
0,91	d	6,4	3	21	0,91 6,3
1,57	s		3	26	1,57
3,59	m		1	3	3,59
4,64	m		1	27A	4,65
4,73	m		1	27B	4,73
5,16	m		1	7	5,15

des weiteren: 0,94-1,53; m, 24 H
1,60-2,11; m, 14 H

UV:

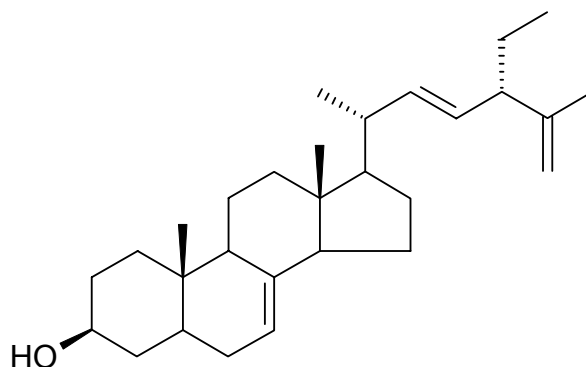
λ_{max} = 203 nm

Retentionszeit (min):

GC (Agilent-System)	HPLC, Säulendimension [mm] (siehe 5.3.2 bis 5.3.4)			
	60-2	125-4	250-4	250-10
22,65	4,47	7,17	15,50	21,71

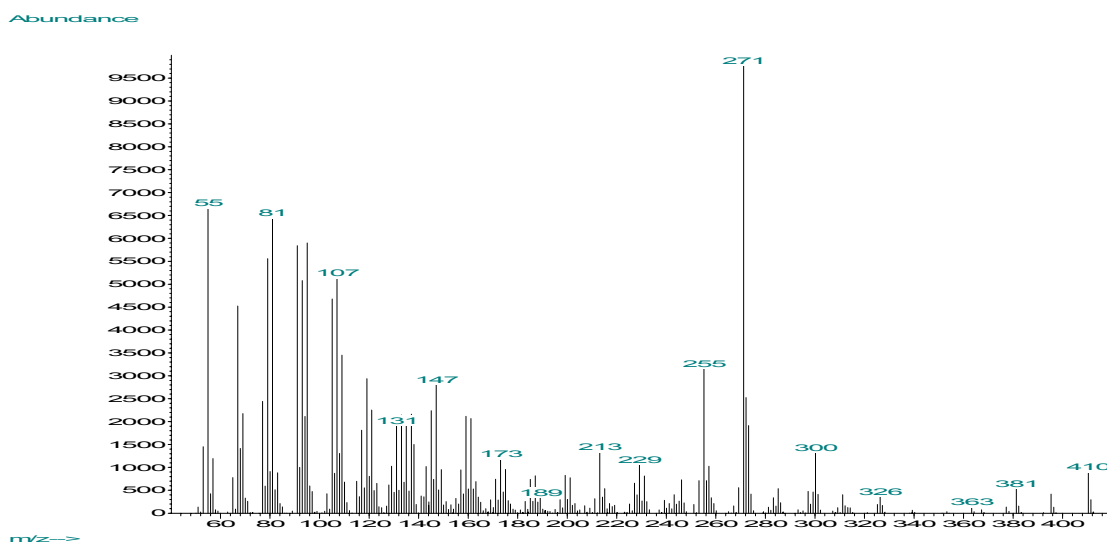
5.5.1.3 (22E)-(24S)-Ethyl-5 α -cholesta-7,22,25-trien-3 β -ol (**5A**)

(22E)-5 α -Poriferasta-7,22,25-trien-3 β -ol



C₂₉H₄₆O
M_R = 410,68

EI-MS



m/z (Relative Intensität; Ion)

410 (9; M⁺); 395 (4; M⁺ -CH₃); 381 (5; M⁺ -CH₃ -H₂O); 300 (13); 273 (19; M⁺ -SC);
272 (25); 271 (100; M⁺ -SC -2H); 255 (31; M⁺ -SC -H₂O); 253 (7; M⁺ -SC -H₂O -2H);
246 (7); 231 (8; M⁺ -SC -C₃H₆); 229 (11; M⁺ -SC -C₃H₈); 213 (13; M⁺ -SC -C₃H₆ -H₂O)

¹³C-NMR (CDCl₃):

δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm) Lit. ⁶⁹	δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm) Lit. ⁶⁹
12,08	18	12,07	40,29	5	38,05
12,15	24 ² (29)	12,07	40,51	20	40,33
13,05	19	13,04	43,34	13	43,37
20,22	26	20,94	49,47	9	49,51
20,96	21	k. A.	52,03	24	52,03
21,56	11	21,56	55,12	14	55,14
22,98	15	22,98	55,87	17	56,89
25,74	24 ¹ (28)	25,74	71,07	3	71,07
28,29	16	28,27	109,55	27	109,56
29,66	6	29,68	117,52	7	117,52
31,51	2	29,68	130,21	23	130,25
34,25	10	34,25	137,04	22	137,03
37,17	1	37,19	139,52	8	139,53
38,03	4	k. A.	148,59	25	k. A.
39,48	12	39,50			

Die angegebenen ¹³C-Literaturwerte für Verbindung **5A** sind lückenhaft und teilweise anzuzweifeln (z. B. C-5, vgl. andere Δ⁷-Sterole).

¹H-NMR (CDCl₃):

δ [ppm]	Multiplizität	J [Hz]	Integral	H-Atom	Lit. ⁶⁹ (δ [ppm], J [Hz])
0,55	s		3	18	0,55
0,80	s		3	19	0,80
0,84	t	7,3	3	24 ² (29)	0,84 7,3
1,02	d	6,6	3	21	1,02 6,6
1,65	s		3	26	1,65
2,43	dt	7,1; 7,1	1	24	k. A.
3,59	m		1	3	3,60
4,69	m		2	27	4,70
5,16	m		1	7	5,16
5,20	dd	15,4; 7,1	1	22	5,19 15,2; 8,2
5,22	dd	15,4; 7,3	1	23	5,25 15,2; 8,2

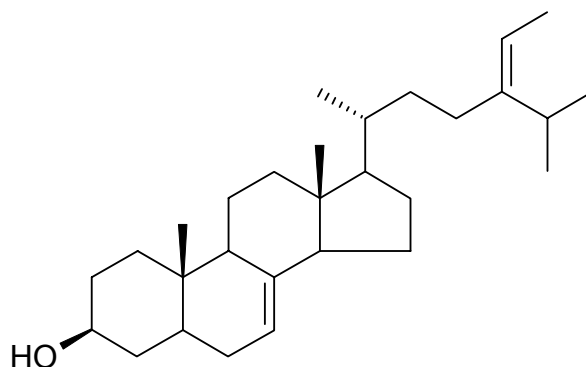
des weiteren: 1,05-2,10; m, 26 H (darunter s bei 1,65)

UV:

λ_{max} = 203 nm

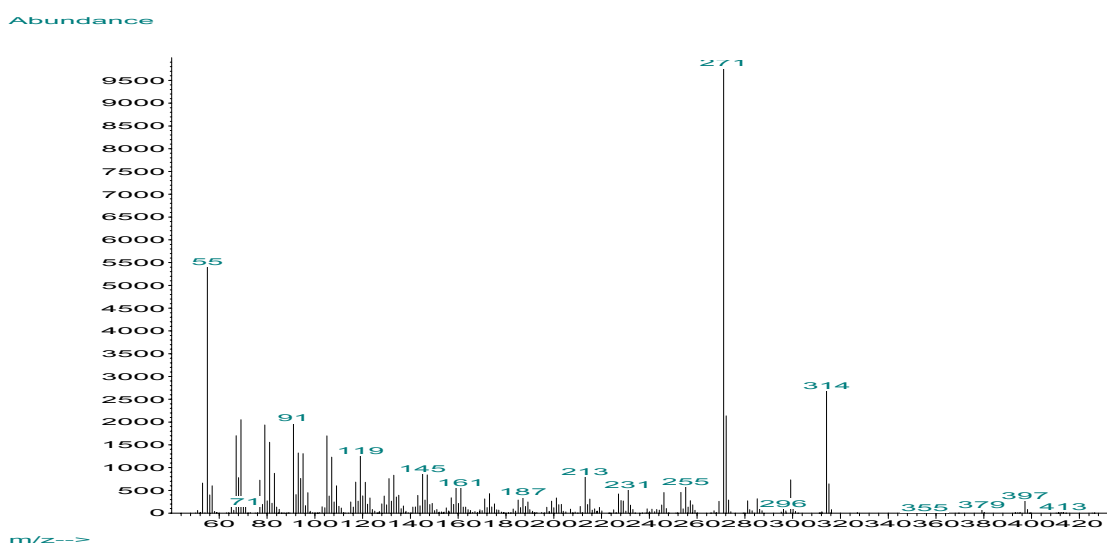
Retentionszeit (min):

GC (Agilent-System)	HPLC, Säulendimension [mm] (siehe 5.3.2 bis 5.3.4)			
	60-2	125-4	250-4	250-10
22,05	3,61	6,08	13,12	18,92

5.5.1.4 (24Z)-Ethyl-5 α -cholesta-7,24(24¹)-dien-3 β -ol (**1**)(24Z)-5 α -Stigmasta-7,24(24¹)-dien-3 β -ol, Avenasterol

C₂₉H₄₆O
M_R = 412,70

EI-MS



m/z (Relative Intensität; Ion)

412 (1; M⁺); 397 (3; M⁺ -CH₃); 394 (1; M⁺ -H₂O); 379 (1; M⁺ -CH₃ -H₂O); 314 (27; McLafferty-Umlagerung, vgl. Abb. 2-10); 299 (7; dto., -CH₃); 296 (1; dto., -H₂O); 281 (3); 271 (100; M⁺ -SC -2H); 255 (6; M⁺ -SC -H₂O); 253 (5; M⁺ -SC -H₂O -2H); 246 (5); 231 (5); 229 (3; M⁺ -SC -C₃H₈); 228 (3); 227 (4); 213 (8; M⁺ -SC -C₃H₆ -H₂O)

¹³C-NMR (CDCl₃):

δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm) Lit. ⁷²	δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm) Lit. ⁷²
11,86	18	11,84	36,59	20	35,91
13,05	19	35,91*	35,95	22	35,91
12,76	24 ² (29)	13,03	37,16	1	37,13
18,94	21	18,98	38,02	4	37,97
21,02	26	21,07	40,29	5	40,25
21,57	11	21,54	43,43	13	43,39
21,09	27	21,54	49,47	9	49,43
27,96	23	27,94	55,05	14	55,03
22,98	15	29,15*	56,05	17	56,01
28,63	25	28,60	71,07	3	71,05
29,67	6	29,64	116,50	24 ¹ (28)	116,46
31,51	2	31,39	117,45	7	117,43
39,59	12	31,87*	139,61	8	139,57
28,05	16	31,46*	145,86	24	145,82
34,23	10	34,19			

*Die Literaturdaten enthalten teilweise eindeutig unrichtige Angaben.

¹H-NMR (CDCl₃):

δ [ppm]	Multiplizität	J [Hz]	Integral	H-Atom	Lit. ⁶⁹ (δ [ppm], J [Hz])
0,54	s		3	18	0,54
0,80	s		3	19	0,80
0,95	d	6,6	3	21	k. A.
0,98	d	6,9	6	26, 27	0,98 6,9
1,59	d	6,8	3	24 ² (29)	k. A.
2,83	m		1	25	k. A.
3,61	m		1	3	3,60
5,12	q	7,0	1	24 ¹ (28)	5,08
5,16	m		1	7	5,16

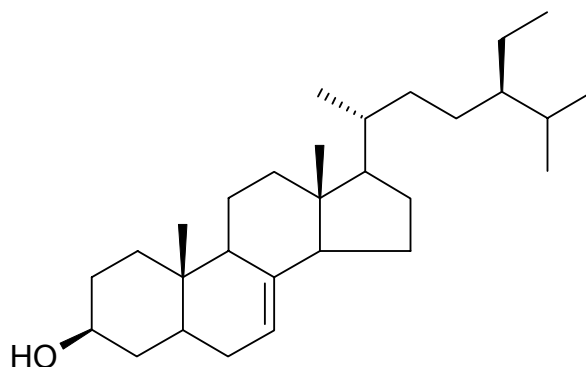
des weiteren: 0,82-2,10; m, 36 H (darunter die vier aufgeführten Dubletts)

UV:

λ_{max} = 203 nm

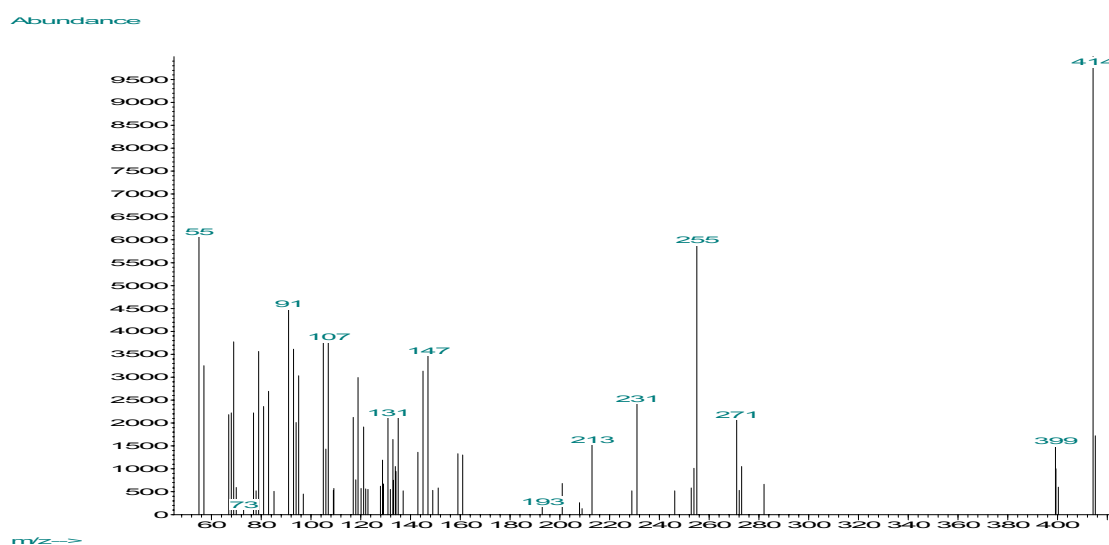
Retentionszeit (min):

GC (Agilent-System)	HPLC, Säulendimension [mm] (siehe 5.3.2 bis 5.3.4)			
	60-2	125-4	250-4	250-10
23,01	5,23	7,49	16,27	23,76

5.5.1.5 (24*R*)-Ethyl-5 α -cholest-7-en-3 β -ol (**2A**)5 α -Stigmast-7-en-3 β -ol, 22-Dihydrospinaesterol, Schottenol

$C_{29}H_{50}O$
 $M_R = 414,71$

EI-MS



m/z (Relative Intensität; Ion)

414 (100; M^+); 399 (34; $M^+ -CH_3$); 396 (2; $M^+ -H_2O$); 381 (4; $M^+ -CH_3 -H_2O$);
 273 (15; $M^+ -SC$); 255 (37; $M^+ -SC -H_2O$); 231 (14; $M^+ -SC -C_3H_6$); 229 (9; $M^+ -SC -C_3H_8$);
 213 (13; $M^+ -SC -C_3H_6 -H_2O$)

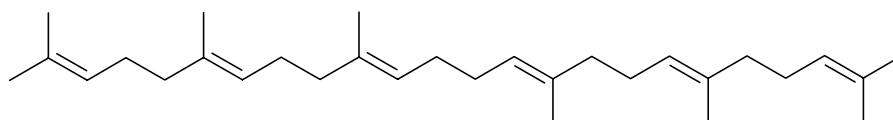
Retentionszeit:

GC (Agilent-System): 22,42 min

5.5.2 Weitere Inhaltsstoffe des Unverseifbaren Anteils

5.5.2.1 Squalen

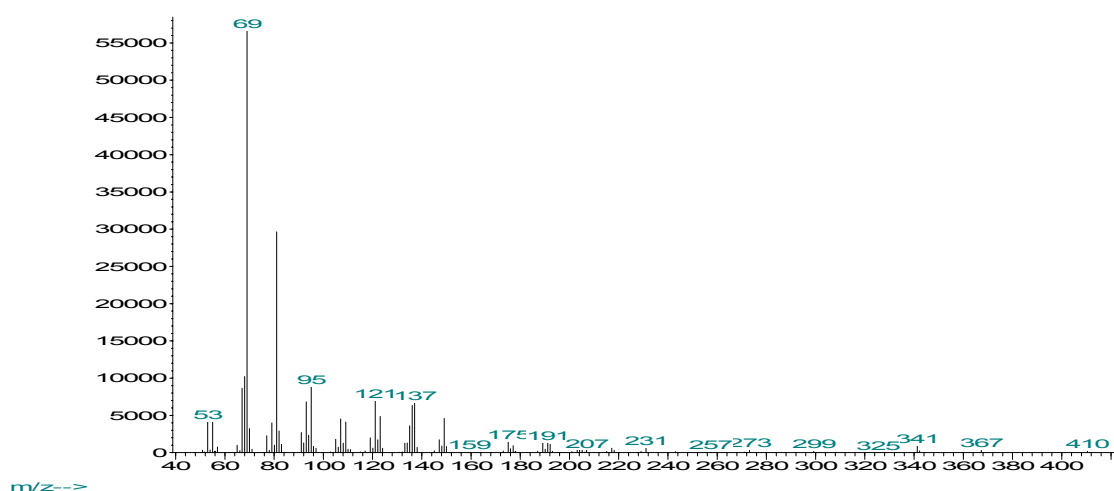
(all-*E*)-2,6,10,15,19,23-Hexamethyltetracos-2,6,10,14,18,22-hexaen



$C_{30}H_{50}$
 $M_R = 410,71$

EI-MS

Abundance



m/z (Relative Intensität)

410 (<1); 341 (1); 149 (6); 137 (10); 121 (10); 95 (13); 81 (50); 69 (100); 55 (8)

UV:

$\lambda_{max} = 203 \text{ nm}$

Retentionszeit:

GC (Agilent-System): 15,8 min

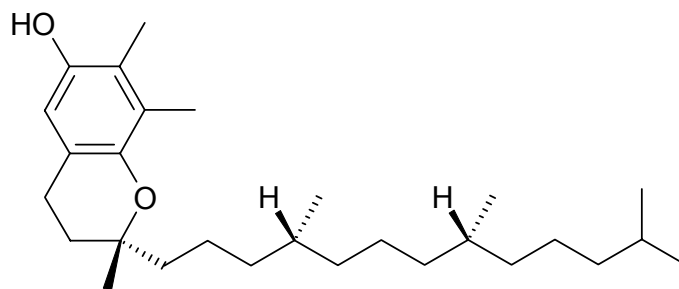
HPLC (Maisch ReproSil ODS-3, 125-4, 3 μm , 1 ml/min, 98/2 MeOH/Wasser): 9,3 min

HPLC (Merck Hibar® Fertigsäule, LiChrospher 100 RP-18, 250-25, 10 μm ,

30 ml/min, 100 % MeOH): 29,7 min

5.5.2.2 γ -Tocopherol

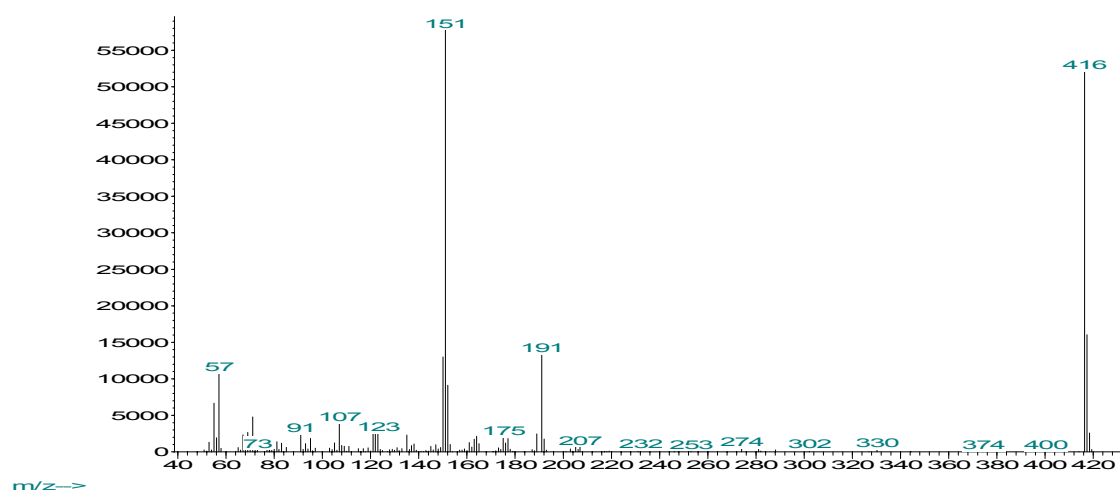
(*R*)-2,7,8-Trimethyl-2-((4*R*,8*R*)-4,8,12-trimethyl-tridecyl)-chroman-6-ol,
7,8-Dimethyltolcol



$C_{28}H_{48}O_2$
 $M_R = 416,69$

EI-MS

Abundance



m/z (Relative Intensität)

416 (87); 191 (22); 189 (4); 177 (3); 175 (3); 164 (4); 151 (100); 150 (22)

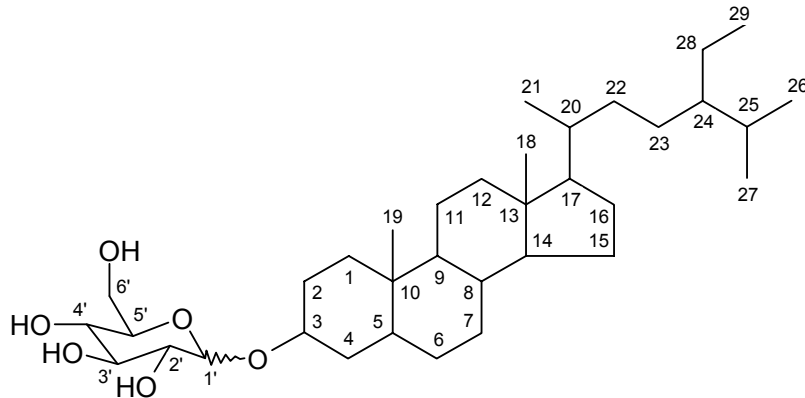
Retentionszeit:

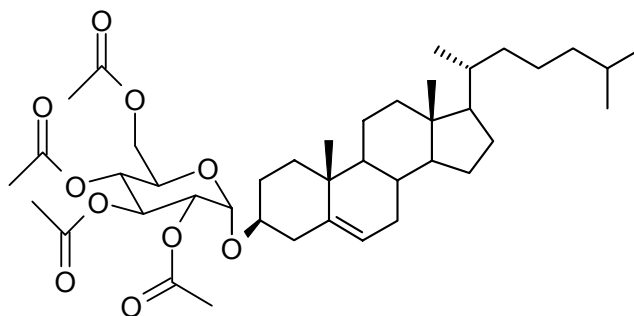
GC (Agilent-System): 18,1 min

5.5.3 Synthetisierte Sterolglucoside

Die nach 5.4.2 dargestellten Sterolglucoside sowie die dabei isolierten Zwischenstufen sind im folgenden mit spektroskopischen Daten und weiteren Parametern aufgelistet.

Die Lokantenbeziehung des Sterol-Grundkörpers wurde bereits unter 1.3.3 beschrieben und wird für den Zuckerteil wie folgt erweitert:



5.5.3.1 Cholesteryl- α -D-tetra-O-acetylglucopyranosid (**6A**)3 β -Cholest-5-en-3-yl- α -D-tetra-O-acetylglucopyranosid

$C_{41}H_{64}O_{10}$
 $M_R = 716,64$

¹³C-NMR (CDCl₃/Methanol-D₄):

δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm)	C-Atom
11,86	18	39,52	24
18,72	21	39,74	12
19,36	19	39,98	4
21,06	11	42,32	13
22,54	26	50,11	9
22,82	27	56,16	17
23,84	23	56,72	14
24,29	15	62,07	6'
27,89	25	67,23	4'
28,02	16	68,78	2'
28,22	2	70,24	3'
31,88	7	71,06	5'
31,95	8	78,84	3
35,78	20	94,19	1'
36,17	22	122,18	6
36,66	10	140,29	5
36,94	1		
ferner:	20,63; 20,71; 20,73; 21,04 (-O-CO- <u>C</u> H ₃)		
	169,67; 170,15; 170,21; 170,68 (-O- <u>C</u> O-CH ₃)		

¹H-NMR (CDCl₃):

δ [ppm]	Multiplizität	J [Hz]	Integral	H-Atom
0,68	s		3	18
0,86	d	2,2	3	27
0,87	d	2,3	3	26
0,91	d	6,5	3	21
1,01	s		3	19
2,35	m		2	4
3,43	m		1	3
4,10	dd	2,3; 12,0	1	6'A
4,14	m		2	5'
4,24	dd	4,6; 12,0	1	6'B
4,80	dd	3,9; 10,0	1	2'
5,04	m		1	4'
5,23	d	3,8	1	1'
5,35	m		1	6
5,49	m		1	3'

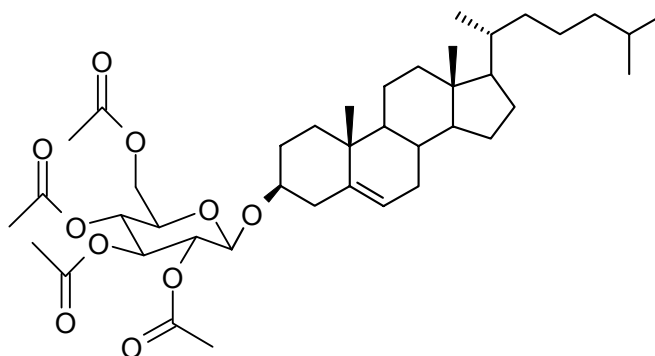
des weiteren: 2,01; 2,03; 2,06; 2,09 (jeweils s, 3 H; -O-CO-CH₃)

0,75-2,45; m, 51 H

(darunter die aufgeführten Signale von 0,86 bis 2,35 ppm)

Schmelzpunkt:

197 °C (Lit.⁵⁴: 191-192 °C)

5.5.3.2 Cholesteryl- β -D-tetra-O-acetylglucopyranosid (**6B**)3 β -Cholest-5-en-3-yl- β -D-tetra-O-acetylglucopyranosid

$C_{41}H_{64}O_{10}$
 $M_R = 716,64$

 ^{13}C -NMR (CDCl₃/Methanol-D₄):

δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm)	C-Atom
12,09	18	39,15	4
18,94	21	39,76	24
19,58	19	39,99	12
21,29	11	42,57	13
22,79	26	50,40	9
23,04	27	56,40	17
24,04	23	56,99	14
24,51	15	62,32	6'
28,25	25	68,78	4'
28,46	16	71,73	2'
29,69	2	71,93	5'
32,09	7	73,15	3'
32,18	8	80,33	3
36,00	20	99,88	1'
36,43	22	122,33	6
36,95	10	140,58	5
37,43	1		

ferner: 20,86; 20,95; 20,99; 21,28 (-O-CO-CH₃)
 169,51; 169,61; 170,57; 170,90 (-O-CO-CH₃)

¹H-NMR (CDCl₃):

δ [ppm]	Multiplizität	J [Hz]	Integral	H-Atom
0,67	s		3	18
0,86	d	2,2	3	27
0,87	d	2,3	3	26
0,91	d	6,5	3	21
0,99	s		3	19
2,26	m		2	4
3,49	m		1	3
3,68	m		2	5'
4,11	dd	2,5; 12,3	1	6'A
4,26	dd	4,8; 12,8	1	6'B
4,59	d	8,0	1	1'
4,96	dd	7,9; 9,6	1	2'
5,08	m		1	4'
5,20	m		1	3'
5,36	m		1	6

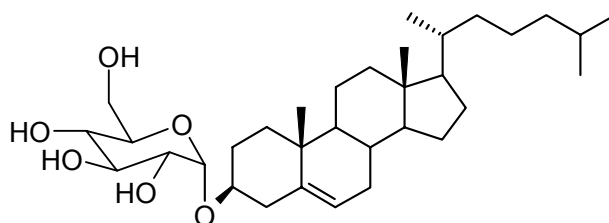
des weiteren: 2,01; 2,02; 2,05; 2,08 (jeweils s, 3 H; -O-CO-CH₃)

0,78-2,35; m, 51 H

(darunter die aufgeführten Signale von 0,86 bis 2,26 ppm)

Schmelzpunkt:

162 °C (Lit.⁵⁴: 155-156 °C)

5.5.3.3 Cholesteryl- α -D-glucopyranosid (**10A**) 3β -Cholest-5-en-3-yl- α -D-glucopyranosid, α -Cholesterylglucosid $C_{33}H_{56}O_6$
 $M_R = 548,81$ ^{13}C -NMR ($CDCl_3$ /Methanol- D_4):

δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm)	C-Atom
12,05	18	39,82	24
18,89	21	40,10	12
19,53	19	40,35	4
21,37	11	42,64	13
22,68	26	50,51	9
22,95	27	56,49	17
24,11	23	57,10	14
24,57	15	61,78	6'
27,94	25	70,57	4'
28,30	16	72,10	2'
28,52	2	72,37	3'
32,20	7	74,27	5'
32,22	8	77,91	3
36,11	20	97,26	1'
36,49	22	122,27	6
37,01	10	140,92	5
37,37	1		

¹H-NMR (CDCl₃):

δ [ppm]	Multiplizität	J [Hz]	Integral	H-Atom
0,69	s		3	18
0,86	d	2,1	3	27
0,88	d	2,2	3	26
0,93	d	6,4	3	21
1,02	s		3	19
2,36	m		2	4
3,42	m		2	3', 4'
3,50	m		1	3
3,67	m		2	2', 5'
3,79	m		2	6'A, 6'B
4,98	d	3,9	1	1'
5,35	m		1	6

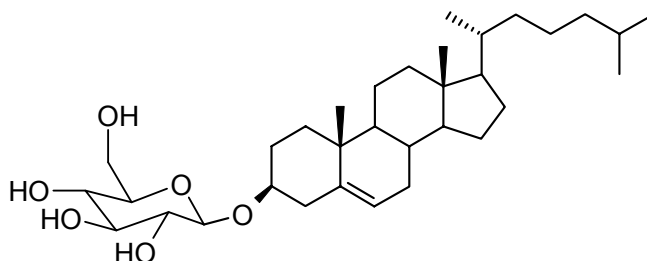
des weiteren: 0,80-2,10; m, 42 H (darunter das Singulett bei 1,02 ppm sowie die drei aufgeführten Dubletts)

Schmelzpunkt:

259 °C (Zers.) (Lit.⁵⁴: 262 °C)

Retentionszeit:

HPLC (Luna C8(2) 50-2, 3 µm, 0,3 ml/min 87/13 MeOH/Wasser): 2,81 min

5.5.3.4 Cholesteryl- β -D-glucopyranosid (**10B**)3 β -Cholest-5-en-3-yl- β -D-glucopyranosid, β -Cholesterylglucosid
 $C_{33}H_{56}O_6$
 $M_R = 548,81$
 ^{13}C -NMR (CDCl₃/Methanol-D₄):

δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm)	C-Atom
12,05	18	39,82	24
18,89	21	40,10	12
19,53	19	40,35	4
21,37	11	42,64	13
22,68	26	50,51	9
22,95	27	56,49	17
24,11	23	57,10	14
24,57	15	61,78	6'
27,94	25	70,57	4'
28,30	16	72,10	2'
28,52	2	72,37	3'
32,20	7	74,27	5'
32,22	8	77,91	3
36,11	20	97,26	1'
36,49	22	122,27	6
37,01	10	140,92	5
37,37	1		

¹H-NMR (CDCl₃):

δ [ppm]	Multiplizität	J [Hz]	Integral	H-Atom
0,70	s		3	18
0,87	d	2,1	3	27
0,88	d	2,1	3	26
0,93	d	6,5	3	21
1,02	s		3	19
2,34	m		2	4
3,23	t	9,0	1	2'
3,29	m		1	5'
3,41	m		2	3', 4'
3,60	m		1	3
3,74	dd	5,1; 12,0	1	6'A
3,86	dd	2,9; 12,2	1	6'B
4,41	d	7,9	1	1'
5,37	m		1	6

des weiteren: 0,80-2,10; m, 42 H (darunter das Singulett bei 1,02 ppm sowie die drei aufgeführten Dubletts)

Schmelzpunkt:

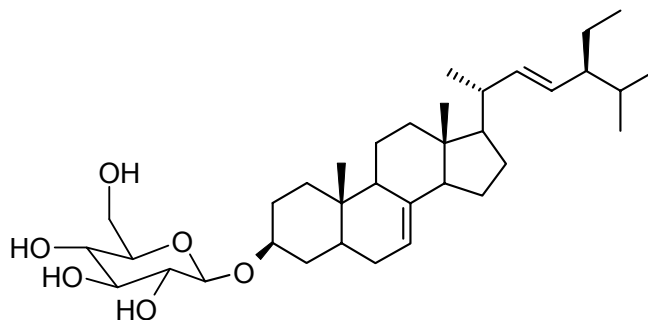
210 °C (Lit.⁵⁴: 208 °C)

Retentionszeit:

HPLC (Luna C8(2) 50-2, 3 µm, 0,3 ml/min 87/13 MeOH/Wasser): 2,84 min

5.5.4 Isolierte Sterolglucoside

- 5.5.4.1 (22*E*)-(24*S*)-Ethyl-5 α -cholesta-7,22-dien-3 β -yl- β -D-glucopyranosid (**3B**)
 (24*E*)-5 α -Stigmasta-7,22-dien-3 β -yl- β -D-glucopyranosid



$C_{35}H_{58}O_6$
 $M_R = 574,85$

 ^{13}C -NMR (CDCl₃/Methanol-D₄):

δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm)	C-Atom
12,16	18	41,10	20
12,25	24 ² (29)	43,52	13
13,04	19	49,74	9
19,04	27	51,61	24
21,12	26	55,39	14
21,45	21	56,23	17
21,77	11	62,05	6'
23,21	15	70,57	3'
25,61	24 ¹ (28)	73,92	2'
28,74	16	76,86	4'
29,58	6	76,31	5'
29,92	2	78,71	3
32,16	25	101,34	1'
34,43	10	117,62	7
34,61	4	129,74	23
37,42	1	138,49	22
39,73	12	139,80	8
40,45	5		

¹H-NMR (CDCl₃):

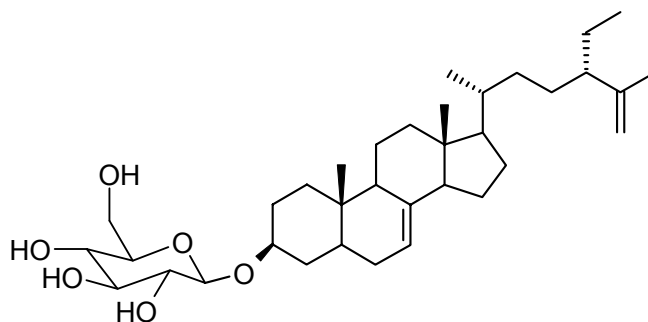
δ [ppm]	Multiplizität	J [Hz]	Integral	H-Atom
0,54	s		3	18
0,79	s		3	19
0,79	m		3	27
0,79	m		3	24 ² (29)
0,84	d	6,3	3	26
1,01	d	6,5	3	21
3,20	m		1	2'
3,27	m		1	5'
3,38	m		2	3', 4'
3,65	m		1	3
3,72	dd	5,0; 11,9	1	6'A
3,84	dd	2,5; 12,0	1	6'B
4,40	d	7,8	1	1'
5,01	dd	8,5; 15,2	1	23
5,14	m		1	22
5,14	m		1	7

des weiteren: 0,60-2,30; m, 44 H

(darunter die aufgeführten Signale von 0,79 bis 1,01 ppm)

Retentionszeit:

HPLC (Luna C8(2) 50-2, 3 µm, 0,3 ml/min 87/13 MeOH/Wasser): 4,24 min

5.5.4.2 (24S)-Ethyl-5 α -cholesta-7,25-dien-3 β -yl- β -D-glucopyranosid (**4B**)5 α -Poriferasta-7,25-dien-3 β -yl- β -D-glucopyranosid

$C_{35}H_{58}O_6$
 $M_R = 574,85$

 ^{13}C -NMR (CDCl₃/Methanol-D₄):

δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm)	C-Atom
12,06	18	40,57	5
12,18	24 ² (29)	43,76	13
13,16	19	49,86	9
17,93	26	49,96	24
19,00	21	55,42	14
21,90	11	56,51	17
23,28	15	62,19	6'
26,88	24 ¹ (28)	70,71	3'
28,22	16	74,04	2'
29,71	23	76,41	5'
29,84	6	76,98	4'
30,06	2	78,84	3
33,99	22	101,46	1'
34,56	10	111,64	27
34,72	4	117,71	7
36,32	20	139,99	8
37,55	1	147,91	25
39,97	12		

¹H-NMR (CDCl₃):

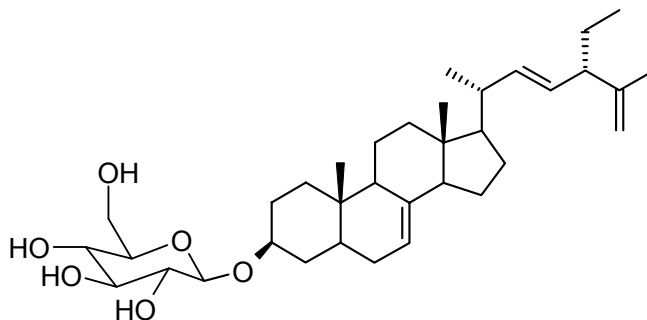
δ [ppm]	Multiplizität	J [Hz]	Integral	H-Atom
0,55	s		3	18
0,80	s		3	19
0,81	m		3	24 ² (29)
0,92	d	6,4	3	21
1,57	s		3	26
3,23	m		1	2'
3,30	m		1	5'
3,41	m		2	3', 4'
3,68	m		1	3
3,74	dd	4,9; 12,0	1	6'A
3,86	dd	2,8; 11,9	1	6'B
4,42	d	7,8	1	1'
4,65	m		1	27A
4,73	dd	1,4; 3,9	1	27B
5,16	m		1	7

des weiteren: 0,75-2,10; m, 44 H

(darunter die aufgeführten Signale von 0,80 bis 1,57 ppm)

Retentionszeit:

HPLC (Luna C8(2) 50-2, 3 µm, 0,3 ml/min 87/13 MeOH/Wasser): 3,31 min

5.5.4.3 (22E)-(24S)-Ethyl-5 α -cholesta-7,22,25-trien-3 β -yl- β -D-glucopyranosid (**5B**)(22E)-5 α -Poriferasta-7,22,25-trien-3 β -yl- β -D-glucopyranosid

$C_{35}H_{56}O_6$
 $M_R = 572,83$

 ^{13}C -NMR (CDCl₃/Methanol-D₄):

δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm)	C-Atom
12,27	18	49,49	9
12,27	24 ² (29)	52,38	24
13,14	19	55,39	14
20,30	26	56,16	17
21,12	21	62,13	6'
21,81	11	70,59	3'
23,24	15	78,77	3
25,99	24 ¹ (28)	76,27	5'
28,58	16	76,86	4'
29,63	6	73,93	2'
29,97	2	101,37	1'
34,48	4	109,71	27
34,66	10	117,71	7
37,46	1	130,53	23
39,76	12	137,39	22
40,47	5	139,81	8
40,87	20	148,89	25
43,61	13		

¹H-NMR (CDCl₃):

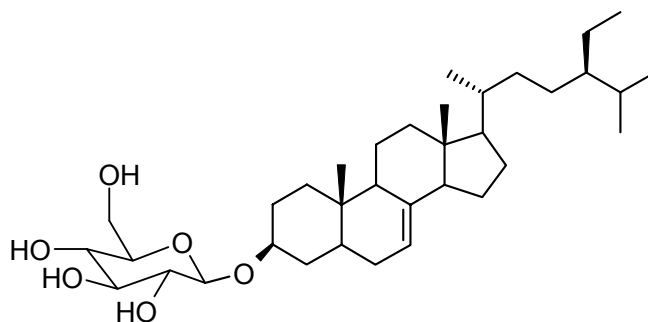
δ [ppm]	Multiplizität	J [Hz]	Integral	H-Atom
0,56	s		3	18
0,82	s		3	19
0,85	m		3	24 ² (29)
1,03	d	6,6	3	21
1,66	s		3	26
2,43	dt		1	24
3,23	m		1	2'
3,30	m		1	5'
3,41	m		2	3', 4'
3,68	m		1	3
3,75	dd	5,0; 11,8	1	6'A
3,86	dd	2,7; 11,7	1	6'B
4,42	d	7,7	1	1'
4,70	m		2	27A, 27B
5,17	m		1	7
5,19	dd	7,4; 15,3	1	22
5,26	dd	8,2; 15,1	1	23

des weiteren: 0,65-2,60; m, 40 H

(darunter die aufgeführten Signale von 0,82 bis 2,43 ppm)

Retentionszeit:

HPLC (Luna C8(2) 50-2, 3 µm, 0,3 ml/min 87/13 MeOH/Wasser): 2,77 min

5.5.4.4 (24*R*)-Ethyl-5 α -cholest-7-en-3 β -yl- β -D-glucopyranosid (**2B**)5 α -Stigmast-7-en-3 β -yl- β -D-glucopyranosid

$C_{35}H_{60}O_6$
 $M_R = 576,86$

 ^{13}C -NMR (CDCl₃/Methanol-D₄):

δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm)	C-Atom
12,11	18	37,51	1
12,20	24 ² (29)	39,92	12
13,18	19	40,52	5
19,12	21	42,53	13
19,21	27	46,24	24
20,91	26	49,76	9
21,86	11	55,37	14
23,27	15	56,36	17
23,39	24 ¹ (28)	62,15	6'
26,50	23	70,75	3'
28,27	16	73,98	2'
29,26	25	76,47	5'
29,59	6	76,90	4'
30,03	2	78,81	3
33,90	22	101,55	1'
34,52	4	117,78	7
34,53	10	139,80	8
36,94	20		

¹H-NMR (CDCl₃):

δ [ppm]	Multiplizität	J [Hz]	Integral	H-Atom
0,55	s		3	18
0,81	s		3	19
0,83	d	6,9	3	27
0,85	d	6,9	3	26
0,85	t	7,7	3	24 ² (29)
0,94	d	6,6	3	21
3,23	m		1	2'
3,29	m		1	5'
3,41	m		2	3', 4'
3,68	m		1	3
3,74	dd	4,7; 11,7	1	6'A
3,86	dd	2,8; 11,9	1	6'B
4,42	d	7,8	1	1'
5,16	m		1	7

des weiteren: 0,60-2,45; m, 48 H

(darunter die aufgeführten Signale von 0,81 bis 0,94 ppm)

Retentionszeit:

HPLC (Luna C8(2) 50-2, 3 µm, 0,3 ml/min 87/13 MeOH/Wasser): 4,24 min

6 ANHANG

6.1 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN

4-NPG	4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid
APCI	<i>atmospheric pressure chemical ionisation</i>
bidest.	zweifach destilliert
br.	breit
bzw.	beziehungsweise
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
ca.	circa
CBN	<i>Commission on Biochemical Nomenclature</i>
CEM	<i>channel electron multiplier</i> , Kanal-Elektronenvervielfacher
d	Dublett
δ	chemische Verschiebung
Da	Dalton
DAD	<i>diode array detector</i>
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dest.	destilliert
DHT	Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
EI	<i>electron impact ionisation</i>
ESI	<i>electrospray ionisation</i>
FSC	Flash-Säulenchromatographie
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
GC-MS	Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
Hz	Hertz
IPSS	<i>international prostate symptom score</i>
IUB	<i>International Union of Biochemistry</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
J	Kopplungskonstante
JCBN	<i>Joint Commission on Biochemical Nomenclature</i>

k. A.	keine Angabe
λ	Wellenlänge
Lit.	Literatur, Literaturzitat
m/z	Verhältnis Masse/Ladung
MeOH	Methanol
min	Minute, Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar
M_R	relatives Molekulargewicht
MS	Massenspektrum, Massenspektrometer
MS/MS	Tandem-MS
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology, USA</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernresonanz
Pa	Pascal
ppm	<i>parts per million</i>
q	Quartett
QOL	<i>quality of life (index)</i>
RP	<i>reversed phase</i>
s	Singulett
s.	siehe
S.	Seite
s. u.	siehe unten
SPE	<i>solid phase extraction</i> , Festphasenextraktion
Syn.	Synonym
t	Triplett
TIC	Totalionenchromatogramm
t_R	Retentionszeit
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett (-Spektrum)
UVA	Unverseifbarer Anteil
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

6.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1-1: Subjektive und objektive Symptome bei Patienten mit BPH.....	2
Abb. 1-2: Stadieneinteilung der BPH.....	3
Abb. 1-3: Metabolisierung von Testosteron.....	4
Abb. 1-4: Kürbisanbau in Ungarn; einzelne Frucht von <i>C. pepo</i>	11
Abb. 1-5: 17H-Cyclopenta[a]phenanthren.....	13
Abb. 1-6: 5 α -Gonan.....	13
Abb. 1-7: Grundstruktur eines Sterols (5 α -Androstan-3 β -ol).....	13
Abb. 1-8: IUPAC-IUB Bezifferung (1967).....	14
Abb. 1-9: IUPAC-IUB Bezifferung (1989).....	14
Abb. 1-10: Fischer-Projektion der Alkyl-Seitenkette; konventionelle Darstellung.....	15
Abb. 1-11: Gaschromatogramm von Kürbisterolen (A. Torun, 1994, Säule: DB-1, 300 °C).....	18
Abb. 1-12: Bisherige Zuordnung von Strukturen zum Gaschromatogramm (A. Torun, 1994).....	18
Abb. 1-13: Formelbilder der von Torun vorgeschlagenen Strukturen.....	19
Abb. 2-1: Totalionenchromatogramm (TIC) des UVA nach Festphasenextraktion an Kieselgel.....	21
Abb. 2-2: Massenspektrum von Squalen ($t_R = 15,8$ min, $M^+ = 410$).....	22
Abb. 2-3: Massenspektrum von γ -Tocopherol ($t_R = 18,1$ min, $M^+ = 416$).....	22
Abb. 2-4: Massenspektrum von Δ^5 -Stigmasterol ($t_R = 21,2$ min, $M^+ = 412$).....	23
Abb. 2-5: HPLC-DAD-Chromatogramm des isolierten Sterolkomplexes.....	25
Abb. 2-6: Fraktionierung des Sterolkomplexes mit präparativer HPLC (Detektion bei $\lambda = 203$ nm).....	26
Abb. 2-7: Fraktionen der präparativen HPLC, untersucht mit GC-MS.....	27
Abb. 2-8: Identifizierte Δ^7 -Sterole.....	28
Abb. 2-9: Mechanismus für den Verlust der Seitenkette zusammen mit C-15, C-16 und C-17.....	29
Abb. 2-10: Verlust eines Teils der Seitenkette durch McLafferty-Umlagerung an einem $\Delta^{24}(24^1)$ -Sterol.....	30
Abb. 2-11: Massenspektrum von (24R)-5 α -Cholesta-7-en-3 β -ol aus <i>C. pepo</i>	31
Abb. 2-12: Massenspektrum von (24R)-5 α -Cholesta-7-en-3 β -ol aus <i>A. spinosa</i>	31
Abb. 2-13: Gaschromatogramm der Δ^7 -Sterole mit Struktur-Zuordnung.....	32
Abb. 2-14: EI-Massenspektrum von (22E)-(24S)-Ethyl-5 α -cholesta-7,22,25-trien-3 β -ol (5A).....	32
Abb. 2-15: EI-Massenspektrum von (22E)-(24S)-Ethyl-5 α -cholesta-7,22-dien-3 β -ol (3A).....	33
Abb. 2-16: EI-Massenspektrum von (24S)-Ethyl-5 α -cholesta-7,25-dien-3 β -ol (4A).....	33
Abb. 2-17: EI-Massenspektrum von (24Z)-Ethyl-5 α -cholesta-7,24(24 ¹)-dien-3 β -ol (1).....	34

Abb. 2-18: Vergleichende Struktur-Zuordnung der Δ^7 -Sterole.....	35
Abb. 2-19: Hypothetischer Weg der Sterolbiosynthese in <i>C. pepo</i>	37
Abb. 3-1: Reaktion nach Liebermann-Burchard	40
Abb. 3-2: Abbauprodukte Cholesta-3,5-dien, Acetylglucose-Derivate.....	40
Abb. 3-3: EI-Massenspektrum von Cholesta-3,5-dien (7).....	40
Abb. 3-4: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (Ausschnitte) von Cholesteryl- α -D-glucopyranosid (10A) und Cholesteryl- β -D-glucopyranosid (10B).....	43
Abb. 3-5: Erzeugung von Molekülionen durch ESI.....	45
Abb. 3-6: Erzeugung von Molekülionen durch APCI	46
Abb. 3-7: Ionentransfer von der Ionenquelle (Normaldruck) ins Hochvakuum des MS	47
Abb. 3-8: Aufbau des verwendeten Triple Quad MS	48
Abb. 3-9: Abspaltung des Zuckerrests eines Sterolglucosids.....	50
Abb. 3-10: APCI-Massenspektrum (<i>single quad scan</i>) von Cholesterol- β -D-glucosid ($M_R = 548$).....	51
Abb. 3-11: APCI-Massenspektrum (<i>single quad scan</i>) eines Δ^7 -Sterolglykosids ($M_R = 572$).....	51
Abb. 3-12: Detektion von Cholesterylglucosid ($M_R = 548$) durch das <i>neutral loss</i> -Experiment	52
Abb. 3-13: HPLC-MS/MS-Chromatogramm der Sterolglykosid-Fraktion (<i>neutral loss</i> -Experiment)	55
Abb. 3-14: Fragment eines Δ^7 -Sterolglykosids nach Abspaltung des Zuckerrestes	56
Abb. 3-15: Durch MS/MS-Experimente detektierte Sterolglykoside	56
Abb. 3-16: APCI-MS (<i>scan</i>) des Signals bei $t_R = 2,77$ min	56
Abb. 3-17: APCI-MS (<i>scan</i>) des Signals bei $t_R = 3,31$ min	57
Abb. 3-18: APCI-MS (<i>scan</i>) des Signals bei $t_R = 3,71$ min	57
Abb. 3-19: APCI-MS (<i>scan</i>) des Signals bei $t_R = 4,24$ min	57
Abb. 3-20: Enzymatische Umsetzung von 4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid zu 4-Nitrophenol	60
Abb. 3-21: Versuchsreihe mit 4-NPG bei unterschiedlichen Inkubationsbedingungen.....	61
Abb. 3-22: Aus Sterolglykosiden enzymatisch freigesetzte Aglyka.....	63
Abb. 3-23: Identifizierte Δ^7 -Sterol- β -D-Glucoside	64
Abb. 3-24: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von (24 <i>S</i>)-Ethyl-5 α -cholesta-7,25-dien-3 β -yl- β -D-glucopyranosid (4B).....	65
Abb. 3-25: Elutionsreihenfolge der Δ^7 -Sterolglucoside (HPLC, RP-18)	66
Abb. 3-26: Zuordnung der gefundenen Sterolglucoside im HPLC-MS/MS-Chromatogramm	66
Abb. 3-27: Zuordnung der Sterolglucosid-Fractionen (präparative HPLC)	67
Abb. 4-1: Identifizierte Δ^7 -Sterole im Gaschromatogramm	68
Abb. 4-2: Identifizierte Δ^7 -Sterolaglyka und Δ^7 -Sterolglucoside	70

6.3 LITERATURVERZEICHNIS

- ¹ Arrhigi, H.M. *Urology (Suppl.)* **1991**, 35
- ² Coleman, C.I., Hebert, J.H., Prabashni, R. *Pharmacotherapy* **2002**, 22, 1426
- ³ Alken, C.E., Sökeland, J. *Urologie* **1979**, S. 249, Thieme, Stuttgart
- ⁴ Tunn, U.W. *Ärzte Ztg./Forschung und Praxis* **1993**, 12, 9
- ⁵ Peters, D.H., Sorkin, E.M. *Drugs* **1993**, 46, 177
- ⁶ Schweikert, H.U., Neumann, F., Tunn, U.W. *Therapiewoche* **1989**, 39, 1493
- ⁷ Frohmüller H., Theiß M., Bracher F. *Prostataerkrankungen im höheren Lebensalter* **2002**, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
- ⁸ Schilcher, H., Sauter, M., Janssen, H. *Ärztezeitschrift für Naturheilverfahren* **1985**, 26, 175
- ⁹ Carraro, J.C., Raynaud J.P., Koch, G. Chisholm, G.D., Di Silverio, F., Teillac, P., Da Silva, F.C., Cauquil, J., Chopin, D.K., Hamdy, F.C., Hanus, M., Hauri, D., Kalinteris, A., Marenca, J., Perier, A., Perrin, P. *The Prostate* **1996**, 29, 231
- ¹⁰ Sökeland, J., Albrecht J. *Urologe [A]* **1997**, 36, 327
- ¹¹ Wilt, T., Ishani, A., Stark, G. MacDonald, R., Lau, J., Mulrow, C. *JAMA* **1998**, 280, 1604
- ¹² Goepel, M., Hecker, U., Krege, S., Rübber, H., Michel, M.C. *The Prostate* **1999**, 38, 208
- ¹³ Friederich, M., Theurer, C., Schiebel-Schlosser G. *Forsch. Komplementärmed. Klass. Naturheilkd.* **2000**, 7, 200
- ¹⁴ Vahlensieck, W. jr. *Fortschr. Med.* **2002**, 16, 33
- ¹⁵ Bach, D. *Urologe [B]* **2000**, 40, 437
- ¹⁶ Kadow, C., Abrams, P.H. *Eur. Urol.* **1986**, 12, 187
- ¹⁷ Berges, R.R., Windeler, J., Trampisch, H.J., Senge, T. *Lancet* **1995**, 345, 1529
- ¹⁸ Klippel, K.F., Hiltl, D.M., Schipp, B *Brit. J. Urol.* **1997**, 80, 427
- ¹⁹ Mattei, F.M. *Urologie/Nephrologie* **2** **1990**, 5, 3

- ²⁰ Schilcher, H., Wülker, A. *Phytotherapie in der Urologie* **1992**, Hippokrates-Verlag, Stuttgart
- ²¹ Bauer, H.W., Sudhoff, F., Dressler, S. *Klin. Exp. Urol.* **1988**, 19, 44
- ²² Wagner, H., Willer, F. *Natur- und Ganzheits-Medizin* **1990**, 3, 309
- ²³ Schilcher, H., Schneider, H.-J. *Urologe [B]* **1990**, 30, 62
- ²⁴ Schilcher, H., Dunzendorfer, U., Ascali, F. *Urologe [B]* **1987**, 27, 316
- ²⁵ Murkovic, M., Hillebrand, A., Winkler, J., Leitner, E., Pfannhauser, W. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1996**, 203, 216
- ²⁶ Murkovic, M., Hillebrand, A., Winkler, J., Pfannhauser, W. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1996**, 202, 275
- ²⁷ Sauter, M. *Dissertation* **1984**, FU Berlin
- ²⁸ El-Adawy, T.A., Khaled, M.T. *Food Chemistry* **2001**, 74, 47
- ²⁹ Breinhölder P., Mosca, L., Lindner, W. *J Chromatogr B* **2002**, 777, 67
- ³⁰ IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemica Nomenclature (JCBN). The nomenclature of steroids. Recommendations 1989. *Eur. J. Biochem.* **1989**, 186, 429
- ³¹ Fieser, L.F., Fieser, M. *Natural Products Related to Phenanthrene* **1949**, 3rd Edition, Reinhold, New York
- ³² Fieser, L.F., Fieser, M. *Steroids* **1959**, Reinhold, New York
- ³³ Torun, A. *Diplomarbeit* **1994**, Fachhochschule Isny
- ³⁴ Westerman, L., Roddick, J.G. *Plant Physiol.* **1981**, 68, 872
- ³⁵ Noda, M., Tanaka, M., Seto, Y, Aiba, T., Oku, C. *Lipids* **1988**, 23, 439
- ³⁶ Bianchini, J.-P., Gaydou, E.M., Sigoillot, J.-C., Terrom, C. *J. Chromatogr.* **1985**, 329, 231
- ³⁷ Farines, M., Cocallemen, S., Soulier, J. *Lipids* **1988**, 23, 349
- ³⁸ GSK Consumer Healthcare GmbH & Co. KG, *interne Vorschrift* **1994**
- ³⁹ Copius-Peereboom, J.W. *Z. Anal. Chem.* **1964**, 205, 325
- ⁴⁰ Goad, L.H., Akihisa, T. *Analysis of Sterols*, 1. Aufl. **1997**, Chapman & Hall, London

- ⁴¹ Ruan, B., Shey, J., Gerst, N., Wilson, W.K., Schroeffer, G.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 11603
- ⁴² Bastic, M., Bastic, L., Jovanovic, J.A., Spitteller, G. *JAOCS* **1977**, 54, 525
- ⁴³ Garg, V.K., Nes, W.R. *Phytochemistry* **1986**, 25, 2591
- ⁴⁴ Farines, M., Charrouf, M., Soulier, J. *106^e Congrès national des Sociétés savantes* **1981**, Perpignan, 327
- ⁴⁵ Akihisa, T., Shimizu N., Ghosh, P., Thakur, S., Rosenstein, F.U., Tamura, T., Matsumoto, T. *Phytochemistry* **1987**, 26, 1693
- ⁴⁶ Goad, L.J., Lenton, J.R., Knapp, F.F., Goodwin, T.W. *Lipids* **1974**, 9, 582
- ⁴⁷ McKean, M.L., Nes, W.R. *Phytochemistry* **1977**, 16, 683
- ⁴⁸ Fenner, G.P., Patterson, G.W., Lusby, W.R. *Lipids* **1989**, 24, 271
- ⁴⁹ Bolger, L.M., Rees, H.H., Ghisalberti, E.L., Goad, L.J., Goodwin, T.W. *Biochem. J.* **1970**, 118, 197
- ⁵⁰ Wilkomirski, B., Goad, L.J. *Phytochemistry* **1983**, 22, 929
- ⁵¹ Garg, V.K., Nes, W.R. *Lipids* **1985**, 20, 876
- ⁵² <http://www.cyberlipid.org/sterolt/ster0003.htm>, 26.05.2002
- ⁵³ Yamauchi, R., Aizawa, K., Inakuma, T., Kato, K. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 622
- ⁵⁴ Nagarajan S., Jagan Mohan Rao L., Gurudutt, K.N. *Indian J. Chem.* **1998**, 37B, 132
- ⁵⁵ Monographie "Wollwachs", **2002**, Kommentar zur PH. EUR. NT 2001, 15. Lfg. 2002
- ⁵⁶ Nishizawa, M., Garcia, D.M., Yamada H. *Synlett* **1992**, 797
- ⁵⁷ Garcia, J.F., Barcelo, D. *HRC* **1993**, 16, 633
- ⁵⁸ Jeong, T.M., Itoh, T., Tamura, T., Matsumoto, T. *Lipids* **1974**, 9, 921
- ⁵⁹ Mandl, A., Reich, G., Lindner W. *Eur. Food Res. Technol.* **1999**, 209, 400
- ⁶⁰ Breinhölder P., Mosca, L., Lindner, W. *Der Ölkürbis (Wissensch. Tagung)* **2000**, TU Graz
- ⁶¹ Kamal-Eldin, A., Määtä, K., Toivo, J., Lampi, A.M., Piironen, V. *Lipids* **1998**, 33, 1073

- ⁶² Müller, J. *Dissertation* **2002**, Ludwig-Maximilians-Universität, München
- ⁶³ Gatt, S. *Biochem. J.* **1966**, *101*, 687
- ⁶⁴ <http://www.chem.qmw.ac.uk/iupac/jcfn/#6>, 08.12.2003
- ⁶⁵ Yamaguchi, M., Kasamo, K. *Plant Cell Physiol.* **2002**, *43*, 816
- ⁶⁶ Kalinowska, M., Wojciechowski, A. *Phytochemistry* **1978**, *17*, 1533
- ⁶⁷ Goad, L.J., Lenton, J.R., Knapp, F.F., Goodwin, T.W. *Lipids* **1974**, *9*, 582
- ⁶⁸ McKean, M.L., Nes, W.R. *Phytochemistry* **1977**, *16*, 683
- ⁶⁹ Rodriguez, J.B., Gros, E.G., Bertoni, M.H., Cattaneo P. *Lipids* **1996**, *31*, 1205
- ⁷⁰ Iida, T. *J. Japan. Oil Chem. Soc.* **1980**, *29*, 345
- ⁷¹ Horibe, I., Nakai, H., Sato, T., Seo, S., Takeda, K., Takatsuto, S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1989**, 1969
- ⁷² Falsone, G., Cateni, F., Kadlecech, V., Pichler, B., Wintersteiger, R., Haslinger, E., Presser, A., Birkofer, L. *Pharm. Pharmacol. Lett.* **1998**, *8*, 184

LEBENS LAUF

Personalien

Name	Matthias Adrian Philip Strobl
Geburtsdatum	19. Februar 1973
Geburtsort	Memmingen
Nationalität	deutsch
Familienstand:	ledig
Eltern:	Hanns-Rainer Strobl, Journalist Christine Strobl, geb. Munz

Schulbildung und Studium

1979 bis 1983	St.-Anna-Volksschule, Augsburg
1983 bis 1992	Jakob-Fugger-Gymnasium, Augsburg
1992	Allgemeine Hochschulreife
1992 bis 1995	Studium der Chemie an der TU München
1995 bis 1999	Studium der Pharmazie an der LMU München
Juni/Juli 1999	Mitarbeit als Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie der LMU München bei Prof. Dr. Franz Bracher
November 1999 bis April 2000	Pharmaziepraktikum in der Isartor-Apotheke, München
Mai 2000 bis Oktober 2000	Pharmaziepraktikum in der Zulassungs- sowie der Patentabteilung der Hexal AG, Holzkirchen
Dezember 2000	Approbation als Apotheker

Berufliche Tätigkeit

Januar 2001 bis Februar 2004	Anfertigung einer Dissertation als Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie der LMU München bei Prof. Dr. Franz Bracher
Januar 2001 bis Februar 2004	Regelmäßige Tätigkeit in der Isartor-Apotheke, München