

---

# Entwicklung von Massenspektrometrie-basierten Multimethoden zur Bestimmung von Ferulasäure, Oligoferulasäuren und Ferulasäure-Metaboliten

---

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Diplom-Lebensmittelchemiker

**Martin Waterstraat**

KIT-Dekan: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Referent: Prof. Dr. Mirko Bunzel

Korreferentin: Prof. Dr. Andrea Hartwig

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.2017



# Meinen Eltern



# INHALTSVERZEICHNIS

---

1	EINLEITUNG	1
1.1	Aufbau der pflanzlichen Zellwand	2
1.2	Zellwandgebundene Ferulasäure	4
1.2.1	Arabinoxylane	6
1.2.2	Pektine	7
1.2.3	Lignin	9
1.2.4	Strukturproteine	12
1.3	Metabolisierung der Ferulasäure	12
1.4	Zellwandgebundene Ferulasäure-Oligomere	14
1.4.1	Photodimerisierung	14
1.4.2	Oxidative Kopplung	15
1.4.3	Ferulasäure-Crosslinks	19
1.5	Metabolisierung von Dehydrodiferulasäuren	20
1.6	Bedeutung der Ferulasäure und ihrer Derivate	21
1.6.1	Einfluss und Verwendung in Lebensmitteln	21
1.6.2	Futtermittel	22
1.6.3	Herstellung von Biokraftstoff	23
2	ZIELSETZUNG	25
3	MATERIAL UND METHODEN	27
3.1	Synthese von Ferulasäure und Ferulasäure-Metaboliten	27
3.1.1	Zimtsäuren	27
3.1.2	Phenylpropionsäuren	29
3.1.3	Benzoessäuren	29
3.1.4	Phenylelessigsäure	29
3.1.5	Hippursäuren	29
3.2	Methoden zur Bestimmung von Ferulasäure-Metaboliten	30
3.3	Gewinnung von Ferulasäure-Dimeren und -Trimeren	32
3.3.1	Isolierung aus Maiskleie	32
3.3.2	Totalsynthesen	33
3.3.3	Chemische Kopplung von Monomeren der Ferulasäure	34
3.3.4	Enzymatische Kopplung von Monomeren der Ferulasäure	36
3.3.5	Photochemische Synthesen von Ferulasäure-Cyclobutandimeren	37
3.4	Methoden zur Bestimmung von Oligoferulasäuren	40
3.4.1	Isolierung von Ballaststoffen	40
3.4.2	Freisetzung von Oligoferulasäuren	41
3.4.3	Bestimmung von Oligoferulasäuren	42
3.4.4	Methoden zur Summenbestimmung von Oligoferulasäuren	45

4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	49
4.1	Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von Ferulasäure-Metaboliten	49
4.1.1	Synthese von Standardsubstanzen	49
4.1.2	Probenaufarbeitung nach QuEChERS	50
4.1.3	Chromatographische und massenspektrometrische Parameter	51
4.1.4	Kalibrierung	53
4.1.5	Validierung	53
4.1.6	Beurteilung der Methode	56
4.2	Synthese von Oligoferulasäuren	57
4.2.1	Synthesen von $^{13}\text{C}$ -Ferulasäure, Ferulasäureethylester und $^{13}\text{C}$ -Ferulasäureethylester	57
4.2.2	Oxidative Kopplung mittels Cu[Tetramethylethyldiamin]-Komplex	58
4.2.3	Enzymatische Kopplung mittels Peroxidase/ $\text{H}_2\text{O}_2$	63
4.2.4	Synthese von 4-O-5-Dehydrodiferulasäure	67
4.2.5	Synthesen von 5-5- und 5-5(methyl)-Dehydrodiferulasäure	68
4.2.6	Synthese von Ferulasäure-Cyclobutandimeren	69
4.3	Strukturaufklärung neuartiger Oligoferulasäuren	73
4.3.1	Strukturaufklärung der Stereochemie der 8-8(Tetrahydrofuran)-Dehydrodiferulasäuren	73
4.3.2	8-O-4/8-5(cyclisch)-Dehydrotriferulasäure	75
4.3.3	8-8(cyclisch)/5-5-Dehydrotriferulasäure	77
4.3.4	5-5/8-8(cyclisch)-Dehydrotriferulasäure	77
4.3.5	8-8(nicht cyclisch)/8-O-4-Dehydrotriferulasäure	78
4.3.6	5-5/8-8(nicht cyclisch)-Dehydrotriferulasäure	79
4.3.7	Dehydrotetraferulasäuren	81
4.4	Nachweis von Oligoferulasäuren in Pflanzenzellwänden	85
4.4.1	Nachweis der Diastereomere von 8-8(Tetrahydrofuran)-Dehydrodiferulasäure	85
4.4.2	Nachweis bislang nicht beschriebener Dehydrotri- und -tetraferulasäuren	86
4.5	Entwicklung von Methoden zur Bestimmung von Oligoferulasäuren	88
4.5.1	Chromatographische Parameter	88
4.5.2	Summenbestimmung der Isomere von 8-8(Tetrahydrofuran)-Dehydrodiferulasäure	90
4.5.3	Bestimmung von Ferulasäure und <i>p</i> -Cumarsäure mittels Diodenarraydetektor	91
4.5.4	Bestimmung von Oligoferulasäuren mittels Stabilisotopenverdünnungsanalyse	94
4.5.5	Bestimmung von Oligoferulasäuren unter Verwendung der internen Standardsubstanz 5-5(methyl)-Dehydrodiferulasäure	99

4.5.6	Beurteilung und Vergleich der Methoden	102
4.6	Summenbestimmung von Ferulasäure-Dimeren mittels SEC-FLD	106
4.7	Entwicklung einer SEC-FTIR-Methode	109
4.7.1	Chromatographische Parameter	109
4.7.2	Bestimmung von <i>Response</i> -Faktoren	109
4.7.3	Kalibrierung und Validierung	111
4.7.4	Beurteilung der Methode	114
4.8	Zusammenfassende Diskussion	115
5	ZUSAMMENFASSUNG	123
6	LITERATURVERZEICHNIS	127
7	CHEMIKALIEN UND INSTRUMENTE	147
7.1	Chemikalien	147
7.2	Enzyme	152
7.3	Instrumente	153
8	ARBEITSVORSCHRIFTEN	155
8.1	Synthese von (isotopenmarkierten) Ferulasäure-Metaboliten	155
8.1.1	[ <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]Zimtsäuren	155
8.1.2	[ <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]Phenylpropionsäuren	155
8.1.3	[3,5-D <sub>2</sub> ]4-Hydroxybenzoesäure und [2,4,6-D <sub>3</sub> ]3-Hydroxybenzoesäure	156
8.1.4	[7,7-D <sub>2</sub> ]Phenylelessigsäure	156
8.1.5	[ <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]Hippursäure	156
8.1.6	3-Hydroxyhippursäure und [ <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]3-Hydroxyhippursäure	156
8.2	Bestimmung von Ferulasäure und Ferulasäure-Metaboliten in Milch	157
8.2.1	Probenvorbereitung nach QuEChERS	157
8.2.2	LC-MS/MS-Messung	158
8.3	Synthesen von Oligoferulasäuren	158
8.3.1	Synthese von [9- <sup>13</sup> C]Ferulasäure	158
8.3.2	Synthese von Ethylferulat und [9- <sup>13</sup> C]Ethylferulat	159
8.3.3	Synthese von 5-5-Dehydrodiferulasäure und [ <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]5-5-Dehydrodiferulasäure	159
8.3.4	Synthese der internen Standardsubstanz 5-5(methyl)-Dehydrodiferulasäure	160
8.3.5	Synthese von 4-O-5-Dehydrodiferulasäure und [ <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]4-O-5-Dehydrodiferulasäure	160
8.3.6	Synthese von Dehydridi-, -tri- und -tetraferulasäuren mittels Cu[Tetramethylethylendiamin]-Komplex	161
8.3.7	Enzymatische Synthese von 8-8(Tetrahydrofuran)-Dehydrodiferulasäuren und weiteren Ferulasäure-Dimeren	163
8.3.8	Synthese von Ferulasäure-Derivaten zur Photodimerisierung	164
8.3.9	Photodimerisierung von Ferulasäure	165

8.4	Präparative Ballaststoffisolierung	166
8.5	Bestimmung von Ferulasäure, <i>p</i> -Cumarsäure und Oligoferulasäuren	166
8.5.1	Probenvorbereitung	166
8.5.2	LC-MS/MS-Messung	167
8.6	Untersuchungen zur Fluoreszenzderivatisierung von Ferulasäure-Dimeren	168
8.6.1	Derivatisierung von Ferulasäure-Dimeren	168
8.6.2	Bestimmung von <i>Response</i> -Faktoren	168
8.7	Summenbestimmung von Oligoferulasäuren mittels SEC-FTIR	168
8.7.1	Probenvorbereitung	168
8.7.2	SEC-FTIR-Messung	169
A	TABELLEN	171
B	ABBILDUNGEN	181
C	PUBLIKATIONSLISTE	199
D	DANKSAGUNG	201

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

<b>ACN</b>	Acetonitril
<b>APCI</b>	chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (engl. <i>Atmospheric-Pressure Chemical Ionization</i> )
<b>BSTFA</b>	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
<b>c</b>	cyclisch
<b>CBD</b>	Cyclobutandimer
<b>COMT</b>	Catechol- <i>O</i> -Methyltransferase (in Abbildungen)
<b>COSY</b>	<i>Correlation Spectroscopy</i>
<b>DAD</b>	Diodenarraydetektor
<b>DBD-ED</b>	4-( <i>N,N</i> -Dimethylaminosulfonyl)-7- <i>N</i> -(2-aminoethyl)amino-2,1,3-benzoxadiazol
<b>DBD-PZ</b>	4-( <i>N,N</i> -Dimethylaminosulfonyl)-7-piperazino-2,1,3-benzoxadiazol
<b>dc</b>	decarboxyliert
<b>DFS</b>	Dehydrodiferulasäure
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>EI</b>	<i>Electron Impact</i>
<b>ESI</b>	Elektronenspray-Ionisation
<b>FID</b>	Flammenionisationsdetektor
<b>FLD</b>	Fluoreszenzdetektor
<b>FS</b>	Ferulasäure
<b>FTIR</b>	Fourier-Transformations-Infrarot
<b>GC</b>	Gaschromatographie
<b>hh</b>	<i>head to head</i> (Bezeichnung für Truxinsäuren)
<b>HMBC</b>	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
<b>HPLC</b>	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
<b>HSQC</b>	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
<b>ht</b>	<i>head to tail</i> (Bezeichnung für Truxillsäuren)
<b>IR</b>	Infrarot
<b>LBS</b>	lösliche Ballaststoffe (engl. <i>Liquid Chromatography</i> )

<b>LC</b>	Flüssigchromatographie
<b>me</b>	methyliert
<b>MeOH</b>	Methanol
<b>MRM</b>	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
<b>MS</b>	Massenspektrometrie
<b>MS/MS</b>	Tandem-Massenspektrometrie
<b>nc</b>	nicht cyclisch
<b>NMR</b>	Kernspinresonanz (engl. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> )
<b>NOESY</b>	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
<b>OFS</b>	Oligoferulasäuren
<b>PAL</b>	Phenylalanin-Ammoniak-Lyase
<b><i>p</i>-CS</b>	<i>p</i> -Cumarsäure
<b><i>p</i>-CS3H</b>	<i>p</i> -Cumarsäure-3-Hydroxylase
<b>QuEChERS</b>	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>
<b>RP</b>	Umkehrphasen (engl. <i>Reversed Phase</i> )
<b>SEC</b>	Größenausschlusschromatographie (engl. <i>Size Exclusion Chromatography</i> )
<b>SIM</b>	<i>Single Ion Monitoring</i>
<b>SIVA</b>	Stabilisotopenverdünnungsanalyse
<b>TAL</b>	Tyrosin-Ammoniak-Lyase
<b>TEMED</b>	Tetramethylethyldiamin
<b>TetraFS</b>	Dehydrotetraferulasäure
<b>TFA</b>	Trifluoressigsäure (engl. <i>trifluoroacetic acid</i> )
<b>THF</b>	Tetrahydrofuran
<b>TMS</b>	Trimethylsilyl- (in Abbildungen)
<b>TIC</b>	Totalionenstrom (engl. <i>Total Ion Current</i> )
<b>TriFS</b>	Dehydrotriferulasäure
<b>UBS</b>	unlösliche Ballaststoffe
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>ZS4H</b>	Zimtsäure-4-Hydroxylase (in Abbildungen)

## EINLEITUNG

---

Pflanzenzellen sind von einer komplexen Zellwand umgeben, die die Protoplasten voneinander abgrenzen. Die wichtigsten Aufgaben der pflanzlichen Zellwand sind Formgebung, Regulation des Zellwachstums und die Stabilisierung der Zelle gegenüber exogenen mechanischen Kräften sowie dem endogenen Turgordruck. Außerdem trägt sie entscheidend zur Widerstandsfähigkeit gegenüber abiotischen und biotischen (beispielsweise Insekten und pathogenen Mikroorganismen) Belastungen bei und spielt eine Rolle bei Signalübertragungsprozessen und dem Stoffaustausch. Diese Eigenschaften werden durch komplexe Interaktionen von Polymeren erreicht, die sowohl nicht-kovalent als auch kovalent miteinander verknüpft sind. Zu den nicht-kovalenten Bindungen gehören Wasserstoffbrückenbindungen, welche beispielsweise von Cellulose-Ketten innerhalb der Mikrofibrillen ausgebildet werden und diese wiederum mit Hemicellulosen vernetzen, aber auch elektrostatische Interaktionen.

Eine Möglichkeit zur kovalenten Verknüpfung von Polymeren bietet die Bildung von Ferulasäure (FS)-*Crosslinks*. Estergebundene FS (4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure) kann über verschiedene Mechanismen zu Dehydrodiferulasäuren (DFS), Dehydrotriferulasäuren (TriFS) und Dehydrotetraferulasäuren (TetraFS) reagieren, wodurch theoretisch bis zu vier Polymere miteinander verknüpft werden können (Iiyama et al. 1994; Bunzel 2010). Für die Pflanze ist dies wichtig, da durch die zusätzliche Vernetzung die Stabilität und Widerstandsfähigkeit der Zellwand weiter erhöht wird. FS-*Crosslinks* können aber auch als nachteilig angesehen werden, zum Beispiel in Bezug auf die Qualität von Futtermitteln, zu deren Herstellung global etwa 60 % der Ackerflächen dienen (Raschka und Carus 2012). Durch einen hohen Anteil an FS-*Crosslinks* sinkt der Anteil an verwertbarer Energie für Wiederkäuer, da die Polysaccharide nicht für mikrobielle Enzyme zugänglich sind (Grabber et al. 1998; Grabber et al. 2009). Aus ähnlichen Gründen ist die Bestimmung von Oligoferulasäuren (OFS) auch in pflanzlichen Rohstoffen, die zur Herstellung von Biokraftstoffen der zweiten Generation verwendet werden, von Interesse. Anhand der Kenntnisse über das Vorkommen von *Crosslinks* über OFS können einerseits Sorten mit höherem Energieertrag ausgewählt und andererseits die chemischen Zersetzungsbedingungen optimal angepasst werden (Ralph 2010; Vismeh et al. 2013). Bisherige Methoden zur Quantifizierung von OFS sind jedoch aus verschiedenen Gründen in ihrer Anwendbarkeit limitiert.

Pflanzliche Zellwände machen außerdem den Hauptteil des Ballaststoff-Komplexes in der menschlichen Ernährung aus. Ballaststoffe leisten einen wichtigen Beitrag zur ausgewogenen und gesunden Ernährung des Menschen. Sie verbessern die Darmmotilität,

verringern den Anstieg des postprandialen Blutzuckerspiegels und senken das Risiko, an Typ-II-Diabetes, koronaren Herzerkrankungen oder Dickdarmkrebs zu erkranken (Harris und Ferguson 1999; Slavin 2013). Einen Beitrag zu den ernährungsphysiologischen Eigenschaften von Ballaststoffen könnte auch die FS leisten, welche in verschiedenen Testsystemen antioxidative, antiinflammatorische und antiarteriosklerotische Wirkung zeigt (Ou und Kwok 2004). Ein Großteil der im Dickdarm freigesetzten FS wird allerdings durch mikrobielle Enzyme metabolisiert, sodass neben der freien FS auch die Metaboliten absorbiert und in der Leber weiter metabolisiert werden können (Rosazza et al. 1995; Zhao und Moghadasian 2008). Inwieweit die ernährungsphysiologisch positiven Wirkungen FS-haltiger Lebensmittel auf die mikrobiell und hepatisch gebildeten Metaboliten zurückzuführen ist, ist bisher kaum erforscht.

Aus diesen Gründen ist sowohl die Quantifizierung der FS- und OFS-Gehalte in bestimmten Pflanzenmaterialien, als auch die Bestimmung von FS und FS-Metaboliten in verschiedenen menschlichen und tierischen Matrices von Interesse. Dieser Thematik widmet sich die vorliegende Dissertationsschrift.

## 1.1 AUFBAU DER PFLANZLICHEN ZELLWAND

Zellwände weisen je nach Pflanze, Gewebe, Zelltyp und Reifegrad enorme Unterschiede in ihrer Zusammensetzung auf. Insbesondere im Zuge der Zelldifferenzierung, in der einzelnen Zellen spezielle Funktionen zugewiesen werden, müssen die Zellwände den neuen Aufgaben angepasst werden. Dennoch gibt es allgemeine Prinzipien, nach denen alle Zellwände aufgebaut sind (Abbildung 1).

Zwischen den Zellwänden von benachbarten Zellen befindet sich die hauptsächlich aus Pektinen bestehende Mittellamelle. An sie grenzt die Primärwand, deren wichtigsten Bestandteile Cellulose, verschiedene Hemicellulosen, Pektine und Proteine sind. Aufgrund der Anteile dieser Polymere kann zwischen zwei Zellwand-Typen unterschieden werden. Die Primärwände von dikotylen Pflanzen und Monokytelodenen außer Commeliniden besitzen einen höheren prozentualen Anteil an Pektinen, Xyloglucanen, (Gluco-)Mannanen und Proteinen (Zellwand-Typ 1), wohingegen Commeliniden, zu denen auch die Süßgräser (Poaceae) gehören, prozentual mehr (Arabino-)Xylanen und  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 4)-Glucanen enthalten (Zellwand-Typ 2) (Vogel 2008).

Der im ersten Augenblick anzunehmende Widerspruch aus Stabilität, Flexibilität und Dehnungsfähigkeit bei wachsenden Zellen wird in Primärzellwänden durch die Coexistenz zweier Netzwerke gelöst, die in allen primären Zellwänden das Grundgerüst bilden (Bidhendi und Geitmann 2016). Hemicellulosen können nicht-kovalent an Cellulose-Mikrofibrillen binden, sodass diese untereinander verknüpft werden und ein Cellulose-Hemicellulose-Netzwerk entsteht. Die hohe Bindungskraft wird erreicht, indem Abschnitte

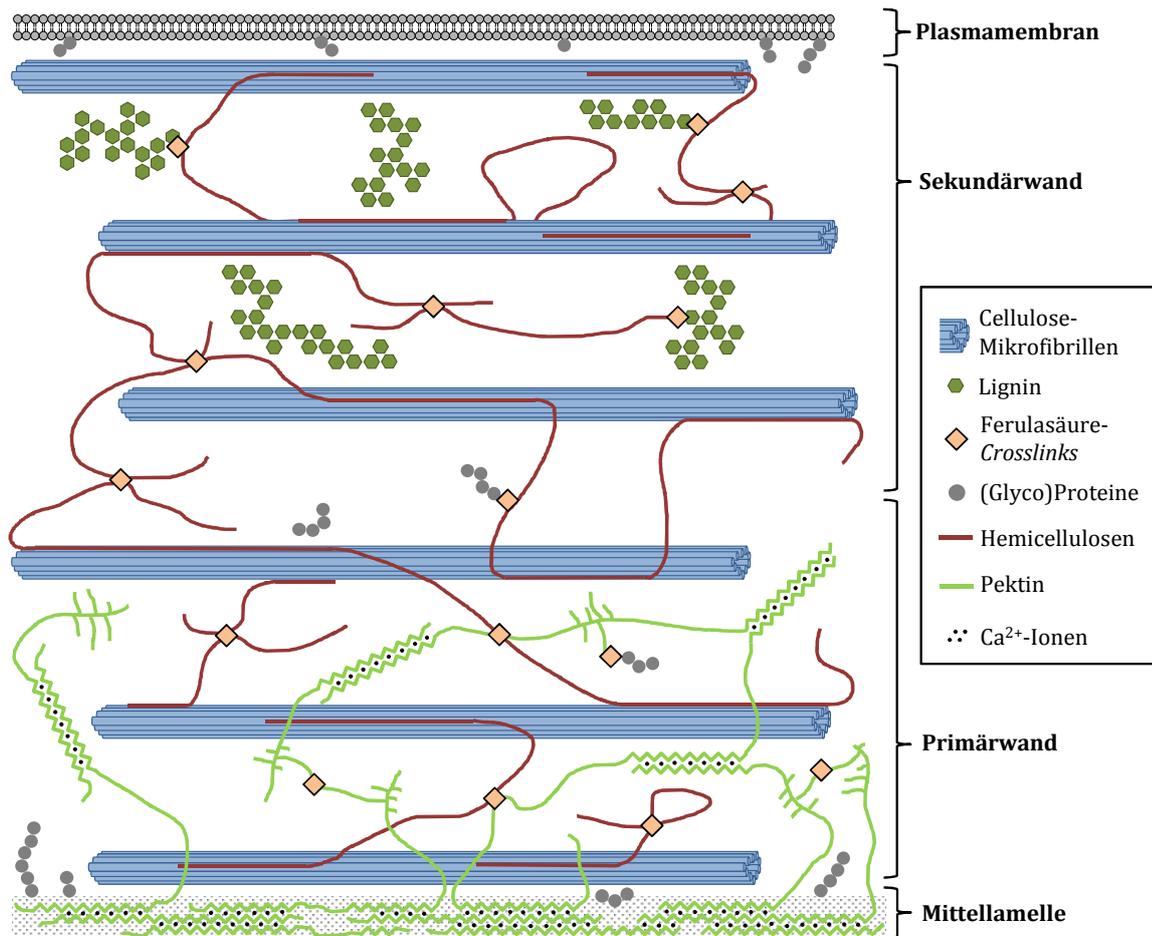


Abbildung 1: Schematische Darstellung der pflanzlichen Zellwand.

der Hemicellulose-Kette entweder während der Cellulose-Biosynthese in die kristallinen Mikrofibrillen eingegliedert werden oder nachträglich über Wasserstoffbrücken an die Oberfläche der Mikrofibrillen binden. Andere Bereiche der Hemicelluloseketten ragen in die Zellwandmatrix und können dort Bindungen mit weiteren Hemicellulosen eingehen oder an benachbarte Cellulose-Mikrofibrillen binden. In dikotylen Pflanzen wird dieses Netzwerk hauptsächlich durch Xyloglucane gebildet, während in Typ-2-Zellwänden Arabinoxylane diese Aufgabe übernehmen. Auch für Mannane wurde gezeigt, dass sie Cellulose-Mikrofibrillen quervernetzen können (Whitney et al. 1998). Das zweite Netzwerk besteht aus Pektinen, deren Struktur in Kapitel 1.2.2 ausführlich beschrieben ist. Pektine werden definiert als Polysaccharide, die  $\alpha$ -(1→4)-verknüpfte Galacturonsäure enthalten. Dies sind sowohl lineare, als auch verzweigte Struktureinheiten, die über nicht-kovalente und kovalente Bindungen miteinander verknüpft sein können (Vincken et al. 2003). Durch dieses Netzwerk wird die Zellwand stabil gegenüber Druck- und Scherspannungen, während das Cellulose-Hemicellulose-Netzwerk Zugspannungen entgegenwirkt (Albersheim et al. 2010; Bidhendi und Geitmann 2016).

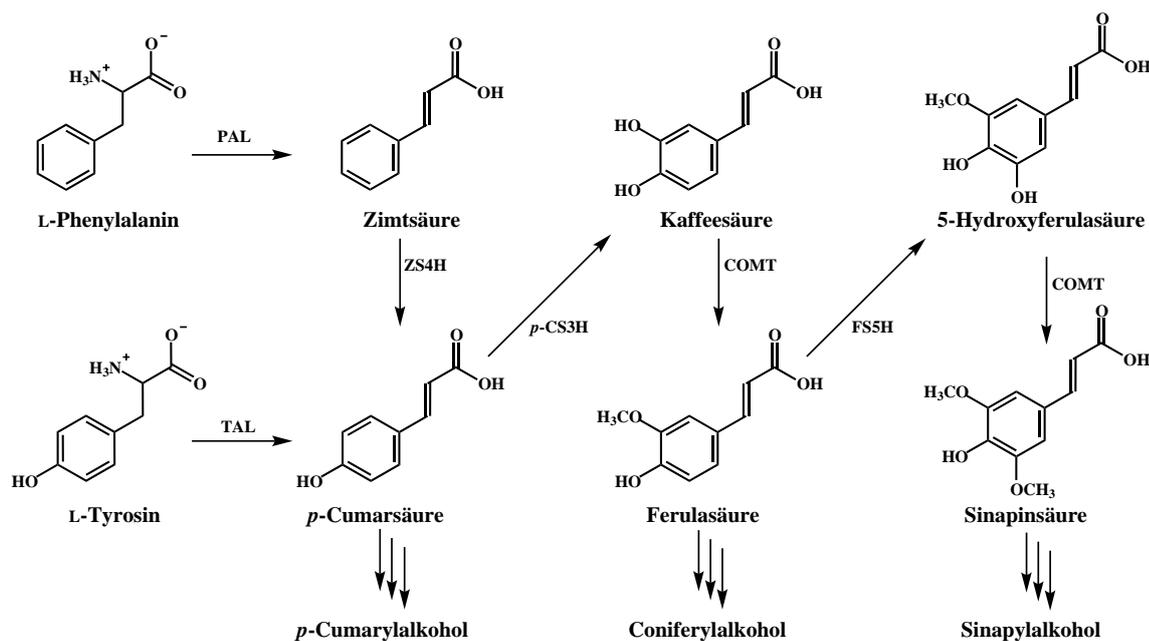
Mit Beginn der Differenzierung kann der Primärwand eine Sekundärwand aufgelagert werden. Sie besteht hauptsächlich aus Cellulose, (Glucurono-)Xylanen und Mannanen (Zellwand-Typ 1) bzw. Cellulose, (Arabino-)Xylanen und Mannanen (Zellwand-Typ 2). Außerdem kann Lignin in die Sekundärwand eingelagert werden, was als Lignifizierung bezeichnet wird und eine maßgebliche Verstärkung der Zellwand zur Folge hat (Gibson 2012; Vogel 2008; Scheller und Ulvskov 2010).

Neben Polysacchariden und Lignin sind auch Proteine und Glycoproteine am Aufbau der Zellwand beteiligt. Ihre Funktionen reichen von strukturgebenden Eigenschaften über enzymatische Tätigkeiten und Wundheilung bis hin zur Regulation interzellulärer Prozesse wie Signalweiterleitung und Stoffaustausch. Die Strukturproteine können anhand von charakteristischen Aminosäure-Motiven in hydroxyprolinreiche Glycoproteine, glycinreiche Proteine und prolinreiche Proteine eingeteilt werden. In der Zellwand liegen sie in ungelöster Form vor. Es wird angenommen, dass *Crosslinks* innerhalb der Proteine sowie zu Zellwandpolysacchariden (Kapitel 1.2.4) dazu führen, dass die Proteine fest in der Zellwand verankert werden (Fry 1986; Iiyama et al. 1994).

## 1.2 ZELLWANDGEBUNDENE FERULASÄURE

FS und andere Phenolcarbonsäuren wie beispielsweise *p*-Cumarsäure (*p*-CS) und Sinapinsäure sind Minorkomponenten der pflanzlichen Zellwand. Trotz der geringen Mengen sind sie von zentraler Bedeutung für die Zellwandarchitektur (Harris und Hartley 1976; Bunzel 2010). Die Produkte des Shikimisäureweges, Phenylalanin und Tyrosin, sind die Ausgangsverbindungen für die Biosynthese der Phenolcarbonsäuren (Abbildung 2). Der erste Schritt, die Deaminierung von Phenylalanin, wird durch Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) katalysiert. Die daraus resultierende Zimtsäure wird durch Zimtsäure-4-Hydroxylase (ZS4H) zu *p*-CS umgesetzt, die in Süßgräsern auch aus Tyrosin durch Tyrosin-Ammoniak-Lyase (TAL) gebildet werden kann (Rosler et al. 1997). Das Einbringen einer weiteren Hydroxygruppe durch *p*-Cumarsäure-3-Hydroxylase (*p*-CS3H) führt zu Kaffeesäure, die durch Methylierung mittels Catechol-O-Methyltransferase (COMT) an Position O-3 zu FS überführt werden kann. Eine erneute Hydroxylierung und Methylierung an Position 5 ergibt Sinapinsäure. Neuere Untersuchungen zeigen, dass *p*-CS und die folgenden Zwischenprodukte eine Aktivierung durch Veresterung mit Coenzym A, Chinasäure oder Shikimisäure benötigen, um die enzymatischen Reaktionen zu durchlaufen (Hatfield und Marita 2010; Vanholme et al. 2012).

Hydroxyzimtsäuren sind wichtige Verbindungen des Phenylpropan-Stoffwechselweges, da sie Vorläufer zahlreicher sekundärer Pflanzenstoffe bilden. Beispielsweise werden durch Reduktion von *p*-CS, FS und Sinapinsäure die Monolignole *p*-Cumarylalkohol, Coniferylalkohol und Sinapylalkohol gebildet (Kapitel 1.2.3). Desweiteren sind einige Hydroxyzimtsäuren wichtige Komponenten der pflanzlichen Zellwand. Insbesondere FS und *p*-CS



**Abbildung 2:** Vereinfachte Darstellung der Biosynthese von Phenolcarbonsäuren. PAL: Phenylalanin-Ammoniak-Lyase, TAL: Tyrosin-Ammoniak-Lyase, ZS4H: Zimtsäure-4-Hydroxylase, COMT : Catechol-O-Methyltransferase, *p*-CS3H: *p*-Cumarsäure-3-Hydroxylase, FS5H: Ferulasäure-5-Hydroxylase.

sind in den Zellwänden von Commeliniden, zu denen die Süßgräser gehören, und in der Ordnung der Caryophyllales weit verbreitet. In Getreiden hat sich gezeigt, dass die gesamten Körner und insbesondere Kleien hohe Mengen an Ferulasäuren besitzen (Tabelle 1), während *p*-CS die dominierende phenolische Säure in den Halmen darstellt (Faulds und Williamson 1999). Diese Verteilung ist vermutlich darin begründet, dass der Einbau von *p*-CS in die pflanzliche Zellwand überwiegend mit der Lignifizierung zusammenhängt. Eine positive Korrelation der Gehalte an *p*-CS und Lignin konnte in Studien an Mais gezeigt werden (Hatfield und Chaptman 2009).

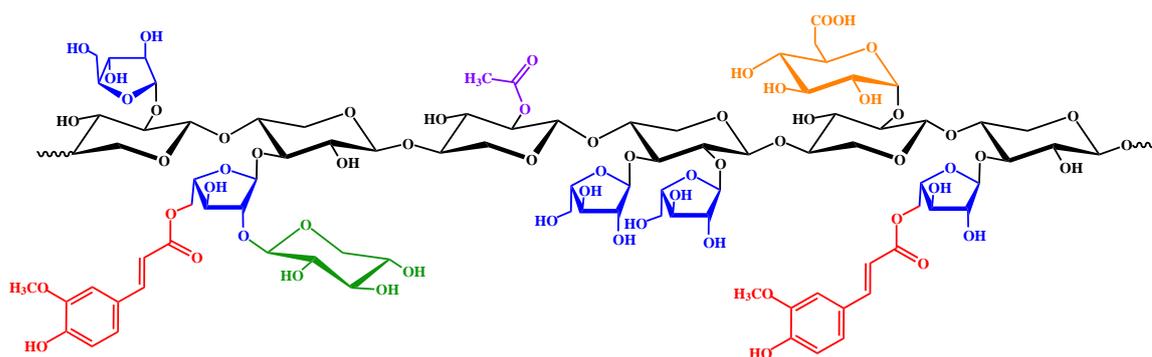
Wie genau die Acylierung von Zellwand-Polysacchariden mit Hydroxyzimtsäuren stattfindet, konnte bislang nicht eindeutig aufgeklärt werden (Oliveira et al. 2015). Der derzeit wahrscheinlichste Mechanismus basiert auf Untersuchungen in Reis-Suspensionskulturen. Die Identifizierung einer cytosolischen FS-CoA-Transferase, die FS auf ein Arabinoxylan-Trisaccharid überträgt, weist darauf hin, dass die Bindung von FS während der Arabinoxylan-Biosynthese im Golgi-Apparat stattfindet (Yoshida-Shimokawa et al. 2001). Eine extrazelluläre FS-CoA-Transferaseaktivität kann zwar nicht ausgeschlossen werden, wird jedoch als unwahrscheinlich angesehen (Hatfield und Marita 2010).

**Tabelle 1:** Gehalte an Ferulasäure und Dehydrodiferulasäuren (DFS, Kapitel 1.4.2) in Getreiden. kA: keine Angabe.

Getreide (Anzahl der untersuchten Sorten)	Ferulasäure [µg/g]	∑ DFS [µg/g]	Quelle
Roggenkörner (17)	895–1174	241–409	Andreasen et al. (2000)
Weizenkörner (6)	535–783	kA	Abdel-Aal et al. (2001)
Weizenkörner (2)	860–870	140–150	Barron et al. (2007)
Gerstenkörner (11)	359–624	135–234	Hernanz et al. (2001)
Sorghumhirsenkörner (7)	92–297	kA	Hahn et al. (1983)
Maiskörner (4)	3300–5290	kA	Mora-Rochin et al. (2010)
Maiskleie (9)	14 100–32 700	2900–8400	García-Lara et al. (2004)
Maiskleie (7)	13 900–20 600	2200–4900	Bily et al. (2003)

### 1.2.1 Arabinoxylane

In Gräsern wie Mais, Reis und Weizen kommt FS hauptsächlich an Arabinoxylane gebunden vor, die, wie bereits in Kapitel 1.1 beschrieben, in Typ II-Zellwänden die dominierende Klasse unter den Hemicellulosen darstellen (Vogel 2008). Arabinoxylane bestehen aus einem Rückgrat aus  $\beta$ -(1→4)-verknüpfter Xylopyranose mit Seitenketten, die über die Positionen O-2 und/oder O-3 verknüpft sein können. Den größten Anteil unter den Substituenten macht  $\alpha$ -L-Arabinofuranose aus, die an Position O-5 mit FS verestert sein kann (Abbildung 3, Smith und Hartley 1983). Die FS-Gehalte einiger Süßgräser sind in Tabelle 1 gegeben. Weitere Seitenketten sind Glucuronsäure, O-4-Methylglucuronsäure und Acetylgruppen (Ebringerová und Heinze 2000).



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung einer Arabinoxylankette mit typischen Strukturmerkmalen. Der Ausschnitt zeigt ein Xylan-Rückgrat (schwarz), an das an Position O-2 und/oder O-3 Arabinose (blau) gebunden sein kann. Diese kann an Position O-5 mit Ferulasäure (rot) verestert sein und weitere Xylosyl-Einheiten (grün) tragen. Das Xylan-Rückgrat kann auch mit Glucuronsäure (orange) oder Acetylgruppen (violett) substituiert sein.

In Körnern von Roggen, Mais und Wildreis wurden außerdem komplexere, ferulasäurehaltige Seitenketten nachgewiesen, bei denen zusätzliche Substituenten an die O-2-Position der Arabinose gebunden sind. Nach saurer Hydrolyse konnte das Fragment 2-O- $\beta$ -D-Xylopyranosyl-(5-O-feruloyl)-L-arabinose identifiziert werden, das auf die in Abbildung 3 dargestellte Seitenkette schließen lässt (Wende und Fry 1997; Bunzel et al. 2002; Steinhart und Bunzel 2003). Weiterhin wurden in Mais Fragmente freigesetzt, bei denen zusätzlich  $\alpha$ -L-Galactopyranosyl-,  $\alpha$ -D-Galactopyranosyl- und  $\alpha$ -D-Xylopyranosyl-Einheiten mit der O-2-Position dieser Xyloseseitenkette verknüpft sind (Saulnier et al. 1995; Allerdings et al. 2006; Appeldoorn et al. 2013).

Oft wird bei der Charakterisierung von Zellwänden das Arabinose/Xylose-Verhältnis bestimmt, welches als Indikator für den Substitutionsgrad fungiert. Dieses Verhältnis ist abhängig von Pflanze, Gewebe und Reifegrad und liegt in vielen Getreidekörnern zwischen etwa 0,5 und 1 (Buksa et al. 2016; Ayala-Soto et al. 2014). Vergleichsweise geringe Arabinose/Xylose-Verhältnisse von 0,13 wurden beispielsweise in Blättern der Maispflanze gefunden, was für einen niedrigen Verzweigungsgrad spricht (Ebringerová und Heinze 2000). Durch Substitutionsart, -grad und -muster werden unter anderem die gelbildenden Eigenschaften der Arabinoxylane beeinflusst. Ketten mit relativ geringem Verzweigungsgrad können Wasserstoffbrücken untereinander oder zu Cellulosemikrofibrillen ausbilden. Abschnitte mit höherem Substitutionsgrad stärken dagegen die Gelbildung durch Ausbildung von FS-Crosslinks, die die Polysaccharidketten vernetzen (Kapitel 1.4) (Carvajal-Millan et al. 2005; Marquez-Escalante et al. 2017).

### 1.2.2 Pektine

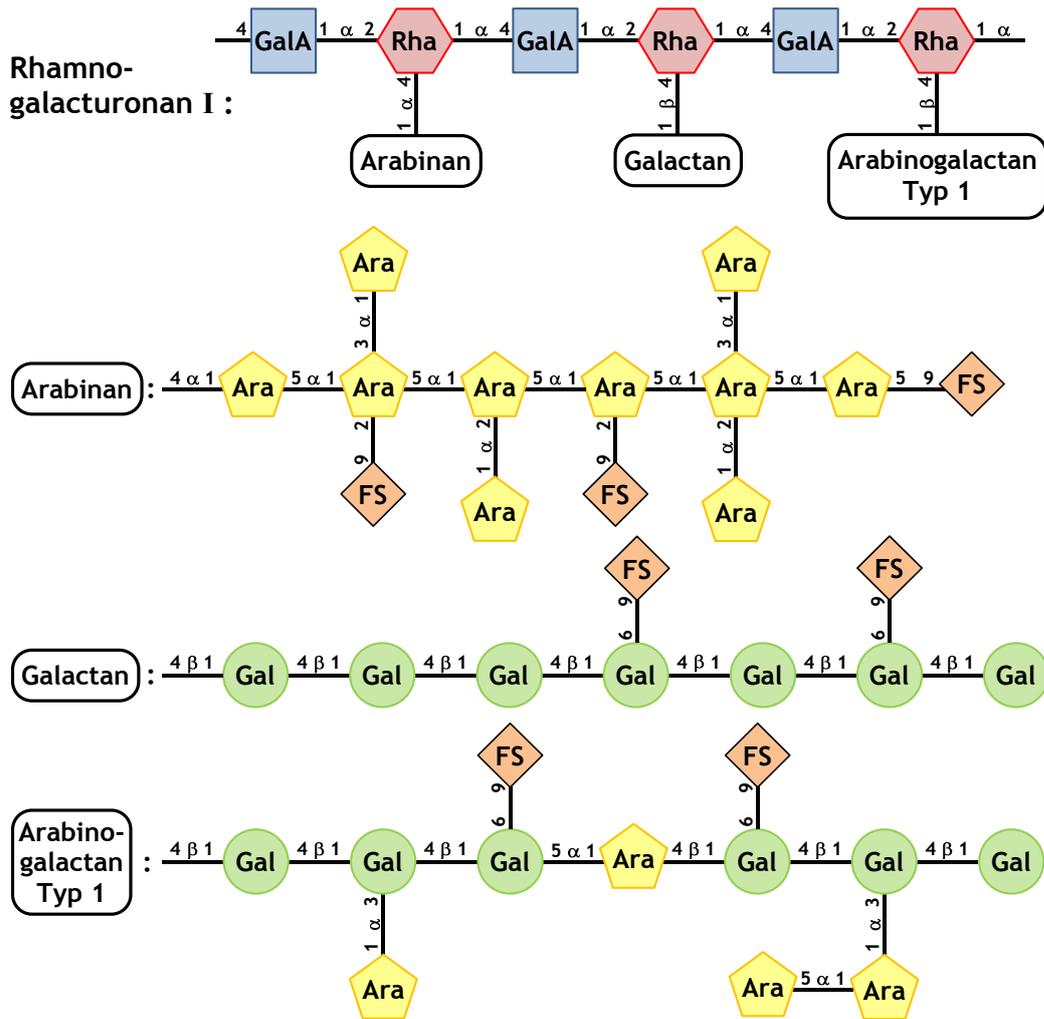
In dikotylen Pflanzen bilden Pektine neben Cellulose den größten Anteil an Nicht-Stärke-Polysacchariden. In den Zellwänden von Pflanzen der Ordnung Caryophyllales, wie beispielsweise Zuckerrübe, Amarant oder Spinat, wurden außerdem hohe Mengen an estergebundener FS gefunden (Ralet et al. 1994; Vogel 2008). Pektine bestehen aus verschiedenen Struktureinheiten, deren wichtigste Vertreter Homogalacturonane, Typ I Rhamnogalacturonane und Typ II Rhamnogalacturonane sind. All diese Strukturen besitzen ein Rückgrat aus (unter anderem) Galacturonsäure, wodurch der Galacturonsäure-Anteil oft mehr als 20 mol % beträgt (Albersheim et al. 2010).

Homogalacturonane bestehen aus einer unverzweigten  $\alpha$ -D-Galactopyranuronsäure-Kette, deren Säuregruppen teilweise als Methylester vorliegen. Desweiteren können in manchen Pflanzen die Positionen O-2 und/oder O-3 acetyliert sein (Ridley et al. 2001). Homogalacturonane besitzen ausgeprägte Gelbildungseigenschaften, die in verschiedenen Lebensmitteln angewendet (Kapitel 1.6.1) und – abhängig vom Methylierungsgrad – über zwei Modelle erklärt werden können. In Homogalacturonan mit niedrigem Methylierungsgrad können sogenannte *egg-boxes* ausgebildet werden, indem die freien Carboxy-

gruppen zweier Polysaccharidstränge abschnittsweise durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen komplexiert werden (Abbildung 1, Thakur et al. 1997). Auf der anderen Seite können auch Homogalacturonane mit einem hohen Veresterungsgrad Gele bilden, die unabhängig von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sind. Damit Bereiche innerhalb dieser Strukturen aggregieren können, müssen die anionischen Abstoßungskräfte der Carboxylatgruppen durch Protonierung bei niedrigem pH-Wert verhindert werden. Außerdem fördern Mono- und Dissaccharide die Gelbildung, da sie die Ausbildung von Hydrathüllen bei den Polysacchariden herabsetzen. Folglich können Wasserstoffbrücken unter den Polysacchariden ausgebildet werden, die zusammen mit den unpolaren Wechselwirkungen der Methylgruppen zur Gelbildung führen (Thakur et al. 1997).

Typ I Rhamnogalacturonane besitzen ein Rückgrat aus alternierenden D-Galactopyranuronsäure- und L-Rhamnopyranose-Einheiten. Dabei ist Galacturonsäure über eine  $\alpha$ -(1→2)-Verknüpfung an Rhamnose und diese über eine  $\alpha$ -(1→4)-Verknüpfung an Galacturonsäure gebunden (Abbildung 4). Zwischen 25 und 80 % der Rhamnose-Einheiten besitzen an Position O-4 Seitenketten, die sich abhängig von Art der Pflanze, Gewebe und Reifezustand stark unterscheiden können. Die dominierenden Seitenketten sind Arabinane, Galactane und Typ 1-Arabinogalactane. In geringeren Mengen können die Seitenketten auch L-Fucose und D-Glucuronsäure enthalten (Caffall und Mohnen 2009). Arabinane sind Seitenketten aus  $\alpha$ -(1→5)-verknüpften L-Arabinofuranose-Einheiten, die an Position O-2 und/oder O-3 mit L-Arabinose verzweigt sein können. Zusätzlich kann FS an Position O-2 des Arabinose-Rückgrats und in geringerem Ausmaß an Position O-5 der terminalen Arabinose-Einheit gebunden sein (Ishii und Tobita 1993; Levigne et al. 2004; Colquhoun et al. 1994; Wefers et al. 2014; Bunzel et al. 2005b). Galactane liegen als größtenteils unverzweigte Ketten aus  $\beta$ -(1→4)-verknüpften D-Galactopyranose-Einheiten vor. Die Identifizierung von O-[6-O-*trans*-Feruloyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-(1→4)-D-galactopyranose lässt darauf schließen, dass FS über Position O-6 an die Galactan-Seitenketten von Rhamnogalacturonan I gebunden sein kann (Abbildung 4, Ishii und Tobita 1993; Ishii 1997; Colquhoun et al. 1994; Bunzel et al. 2005b). Das isolierte FS-Digalactosid kann aber auch aus Typ 1 Arabinogalactanen stammen. Dieses besteht ebenso aus einem Rückgrat aus  $\beta$ -(1→4)-verknüpften D-Galactose-Einheiten, in das jedoch einzelne  $\alpha$ -(1→5)-verknüpfte L-Arabinofuranose-Einheiten eingestreut sein können (Huisman et al. 2001). Außerdem können Seitenketten aus  $\alpha$ -(1→3)-verknüpften L-Arabinose-Mono oder -Disacchariden vorhanden sein (Habibi et al. 2004; Caffall und Mohnen 2009).

Typ II Rhamnogalacturonane machen den mengenmäßig kleineren Teil der Pektine aus. Wie Homogalacturonane bestehen Typ II Rhamnogalacturonane aus einem Rückgrat aus  $\alpha$ -(1→4)-verknüpften Galacturonsäure-Einheiten, besitzen aber äußerst komplexe Seitenketten. Diese sind stark verzweigt und bestehen aus bis zu zwölf verschiedenen Monosacchariden und 20 Bindungstypen. Dennoch ist ihre Struktur weitestgehend aufgeklärt und kann als hochkonserviert angesehen werden, da sie in Angiospermen, Gymnospermen,



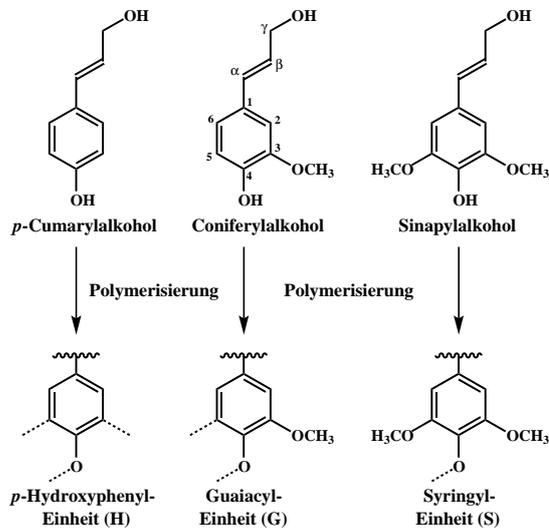
**Abbildung 4:** Vereinfachte Grundstruktur von Rhamnogalacturonan I. Das Rückgrat bilden Galacturonsäure (GalA) und Rhamnose (Rha). Häufig vorkommende Seitenketten bestehen aus Arabinose (Ara) und Galactose (Gal). Die Seitenketten können zusätzlich mit Ferulasäure (FS) verestert sein.

Farnen und Moosen zu finden sind (O'Neill et al. 2004). Bindungen von FS oder anderen Phenolcarbonsäuren an Typ II Rhamnogalacturonane wurden bislang nicht beschrieben.

### 1.2.3 Lignin

Lignin ist ein komplexes, phenolisches Polymer, das in der Zellwand gebildet wird, sobald die Ausbildung der Polysaccharidmatrix der Sekundärzellwand begonnen hat. Die Lignifizierung führt zu einer Festigung der Zellwand, wodurch die mechanische Stabilität gegenüber Umwelteinflüssen erhöht und die Barriere gegen Pathogene gestärkt wird. Die Hydrophobizität des Lignins führt außerdem zu einer Wasserundurchlässigkeit, die insbesondere für den Wasser- und Assimilattransport in Xylem und Phloem von Bedeutung ist (Boerjan et al. 2003; Bhuiyan et al. 2009). Lignin wird hauptsächlich aus den 4-Hydroxyphenylpropanalkoholen *p*-Cumarylalkohol, Coniferylalkohol und Sinapylalkohol auf-

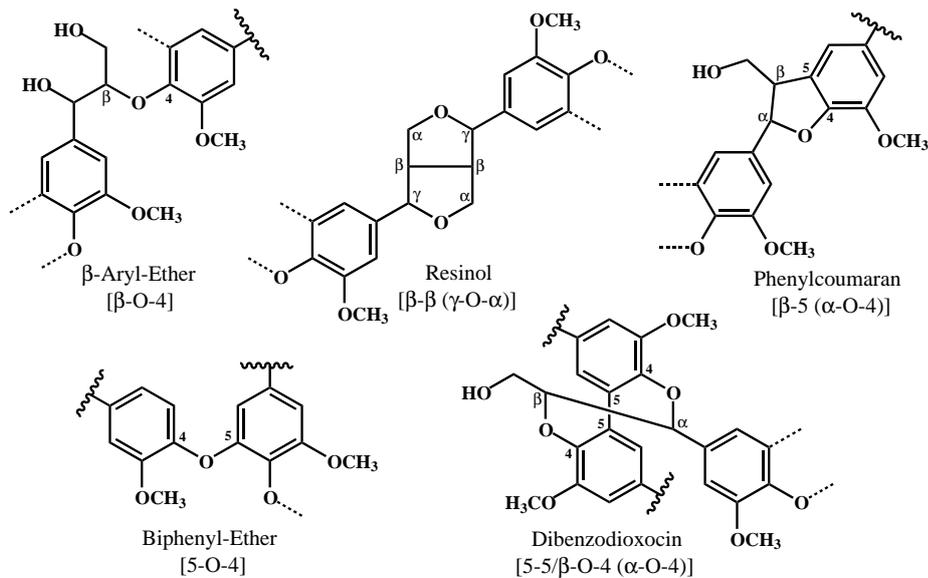
gebaut. Nach der Polymerisierung werden diese als *p*-Hydroxyphenyl (H)-, Guaiacyl (G)- und Syringyl (S)-Einheiten bezeichnet (Abbildung 5, Ralph et al. 2004b).



**Abbildung 5:** Strukturen der dominierenden Monolignole (oben) und ihre Struktur-Einheiten im Lignin-Polymer (unten).

Die monomeren Vorstufen des Lignins, auch Monolignole genannt, werden im Cytosol über den Phenylpropan-Stoffwechselweg gebildet und anschließend in die Zellwand transportiert. Hier werden sie durch Peroxidasen und  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder Laccasen und  $\text{O}_2$  zu Phenoxyradikalen umgesetzt, welche das polymere Lignin in der Polysaccharidmatrix bilden (Barros et al. 2015). Die Startpunkte der Lignifizierung (*nucleation sites*) befinden sich hauptsächlich in den Ecken der Primärzellwand und der Mittellamelle. Von diesen expandiert das Lignin-Netzwerk bis in die innere Schicht der Sekundärwand (Donaldson 2001). Die Phenoxyradikale werden über mehrere Positionen resonanzstabilisiert, über die

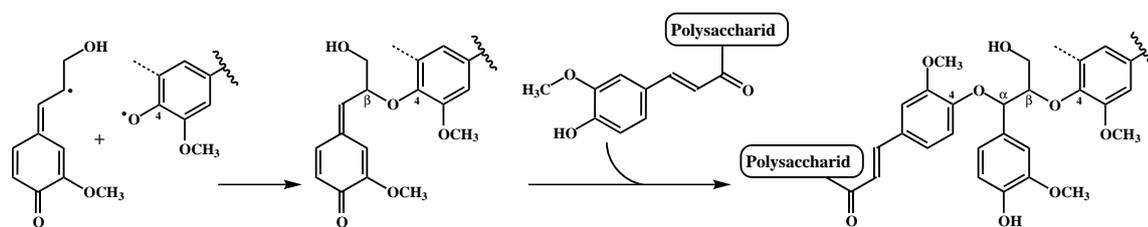
sie koppeln und verschiedene Bindungstypen bilden können. Einige häufig vorkommende Bindungstypen sind in Abbildung 6 dargestellt. Aufgrund der höheren Eielektronendichte an der  $\beta$ -Position koppeln Monolignole bevorzugt über diese Position. Bei der Kopplung zweier Phenoxyradikale entstehen daher hauptsächlich  $\beta$ - $\beta$ -gekoppelte Dimere sowie geringere Mengen an  $\beta$ -5- und  $\beta$ -O-4-Dimeren. 5-5- oder 4-O-5-gekoppelte Dimere entstehen nur in geringen Mengen (Hatfield und Vermerris 2001). Da in den meisten



**Abbildung 6:** Auswahl an möglichen Struktureinheiten im Lignin-Polymer.

Pflanzengewebe der Anteil an  $\beta$ -O-4-Bindungstypen dominiert, wird davon ausgegangen, dass die Kopplung zweier monomerer Phenoxyradikale eine untergeordnete Rolle spielt und stattdessen die Vergrößerung eines bestehenden Lignin-Oligomers oder -Polymers bevorzugt stattfindet (Ralph et al. 2004b; Vanholme et al. 2010).

Schon lange ist bekannt, dass auch FS in das Lignin-Netzwerk integriert ist und somit zur Quervernetzung von Lignin mit Arabinoxylenen oder Pektinen führen kann (Lam et al. 1992b). Es werden zwei Mechanismen diskutiert, über die Polysaccharid-Lignin-Crosslinks entstehen können. Dem passiven Mechanismus liegt die Entstehung des bevorzugten  $\beta$ -O-4-Bindungstyps in Lignin zugrunde. Hierbei entsteht ein Chinonmethid-Intermediat, das durch die Addition von Wasser rearomatisiert wird. Anstelle von Wasser können aber auch andere Nucleophile addieren (Lam et al. 1992a). Im Falle von polysaccharidgebundener FS würde dies in einer 4-O- $\alpha$ -Kopplung resultieren (Abbildung 7). Allerdings gibt es bisher nur wenige Hinweise darauf, dass FS tatsächlich über diesen



**Abbildung 7:** Postulierter passiver Mechanismus, bei dem polysaccharidgebundene Ferulasäure als Nucleophil an die  $\alpha$ -Position des  $\beta$ -O-4-Chinonmethid-Intermediates addiert (Lam et al. 2001).

passiven Mechanismus an Lignin bindet (Lam et al. 2001). Dagegen gilt die Kopplung über den aktiven Mechanismus als allgemein anerkannt. Hierbei wird polysaccharidgebundene FS durch Peroxidasen und  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder Laccasen und  $\text{O}_2$  dehydrogeniert und kann anschließend in einer Radikalreaktion mit Lignin koppeln. Beispielsweise konnte in mit  $^{13}\text{C}$  angereichertem Weidelgras mittels *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (HMBC)-Experimenten die Bindung von FS über deren Position 8 an die  $\beta$ -Position von Lignin-Monomeren aufgezeigt werden (Ralph et al. 1995).  $\beta$ -O-4- und  $\beta$ -8-verknüpfte Monolignol-FS-Dimere konnten nach alkalischer Hydrolyse von Roggen, Weizen, Hafer und weiteren Getreideproben nachgewiesen werden (Jacquet et al. 1995; Bunzel et al. 2004b). Dies deutet darauf hin, dass FS als *nucleation site* die Lignifizierung initiieren kann. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch DFS (Kapitel 1.4.2) in der Lage sind, Crosslinks mit Lignin zu bilden, wobei 5-5-DFS die höchste Tendenz zur Vernetzung mit Lignin besitzt (Grabber et al. 2002). Neben der Initiierung der Lignifizierung können FS und DFS auch mit schon bestehenden Lignin-Oligomeren oder -Polymeren quervernetzt werden. Dies kann aufgrund von Kopplungsprodukten abgeleitet werden, bei denen die Positionen O-4 oder 5 der Guaiacyl-Einheiten mit FS verknüpft sind. Diese Kopplungstypen konnten in Zellwänden von Mais-Zellsuspensionen im Lignin-Polymer, allerdings nicht als FS-Coniferylalkohol-Dimer nachgewiesen werden (Grabber et al. 2002).

#### 1.2.4 Strukturproteine

Strukturproteine werden als unlöslich beschrieben, was zum Teil auf kovalente Bindungen mit anderen Zellwandpolymeren zurückzuführen ist. Es wurde gezeigt, dass Tyrosin aufgrund der phenolischen Gruppe über eine radikalische Reaktion mit einer weiteren Tyrosin-Einheit koppeln kann, wodurch ein Isodityrosin-Derivat entsteht. Dieser Mechanismus ist bereits seit über 30 Jahren bekannt (Fry 1986). Allerdings wird vermutet, dass Isodityrosin hauptsächlich durch intramolekulare Kopplung entsteht, während Di-Isodityrosin und Pulcherosin – nachgewiesen in Zellwänden von Tomatenzellkulturen – durch intermolekulare Kopplung entstehen (Brady und Sadler 1996; Brady et al. 1998). Da der radikalische Mechanismus zur Kopplung von Tyrosin dem von FS (Kapitel 1.4.2) ähnelt, wurde auch deren gemeinsame Kopplung vermutet (Bacic et al. 1988). *In-vitro*-Versuche mit einem Tyrosin-haltigen Tripeptid (Gly-Tyr-Gly) zeigten, dass dieses durch Peroxidase und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit FS oxidativ gekoppelt werden kann (Oudgenoeg et al. 2001).

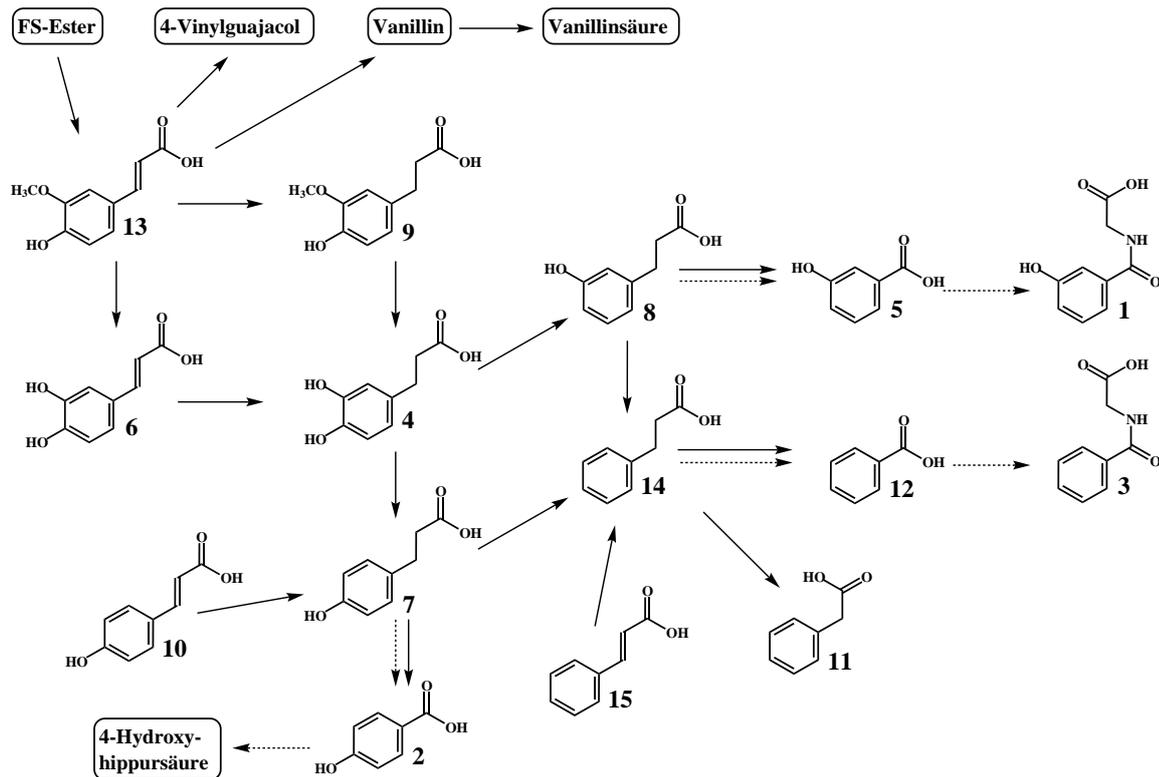
Dass die Quervernetzung von Proteinen und Arabinoxylanen auch *in vivo* möglich ist, konnte anhand von Weizen- und Roggenmehl gezeigt werden (Piber und Koehler 2005). Durch saure Hydrolyse wurden vier Substanzen freigesetzt, die mittels Massenspektrometrie (MS) als Dehydroferulasäure-Tyrosin-Dimere identifiziert wurden. Außerdem wurden zwei Trimere detektiert, die sich aus zwei FS- und einer Tyrosin-Einheit zusammensetzen. Es wird vermutet, dass es sich jeweils um Strukturisomere handelt, wie sie von FS aufgrund der verschiedenen Kopplungstypen bekannt sind (Kapitel 1.4.2). Die Ergebnisse zeigen, dass die Tyrosin-FS-vermittelte, kovalente Bindung von Proteinen mit Arabinoxylanen möglich ist, wodurch diese fest in der Zellwand verankert werden und zu den physikochemischen Eigenschaften der Zellwand beitragen. Über das Ausmaß dieser Kopplung sowie ein Vorhandensein in anderen Pflanzenarten kann jedoch bisher keine Aussage getroffen werden.

### 1.3 METABOLISIERUNG DER FERULASÄURE

Der größte Anteil an FS, der in der menschlichen Ernährung aufgenommen wird, ist wie in Kapitel 1.2 beschrieben an Zellwandpolymere gebunden. Nur geringe Anteile an FS liegen in freier oder konjugierten Formen vor, die im Magen oder Dünndarm freigesetzt und absorbiert werden können (Andreasen et al. 2001a). Beispielsweise zeigten Adom und Liu (2002) anhand verschiedener Getreidearten, dass 0,1–0,5 % der vorhandenen FS in freier Form und 1–6,5 % als lösliche Konjugate vorliegen, während 93–99 % der FS zellwandgebunden ist. In gebundener Form kann FS nicht von körpereigenen Enzymen freigesetzt werden und gelangt unverändert in den Dickdarm. Im Dickdarm wird die kompakte Zellwandstruktur teilweise aufgeschlossen. Dies ist möglich, da sich unter den Darm-Mikroorganismen unter anderem auch *fibrolytic bacteria* (beispielsweise einige Vertreter der Gattungen *Bacteroides*, *Roseburia* und *Ruminococcus*) befinden, welche die  $\beta$ -(1→4)-Bin-

dungen von Hemicellulosen und zum Teil auch Cellulose sowie Pektine hydrolysieren können (Chassard und Lacroix 2013). Infolgedessen können die FS-Ester durch mikrobielle Esterasen gespalten werden (Kroon et al. 1997). Die Mikrobiota von Herbivoren wie beispielsweise Rindern, Schafen, Ziegen und Pferden, deren Energiebedarf hauptsächlich durch pflanzliche Materialien abgedeckt wird, ist entsprechend an diese Energiequelle angepasst. Einige Mikroorganismen der vielfältigen Mikrobiota verfügen über Multienzymkomplexe (Cellulosome), die durch die Kombination aus Cellulasen, Cellobiohydrolasen, Endoglucanasen, Xylanasen, Mannanasen und Esterasen eine effiziente Fermentation der Zellwandpolysaccharide und Freisetzung von FS ermöglichen (Blum et al. 2000; Schwarz 2001; Artzi et al. 2016).

Die Resorption von FS erfolgt mittels transzellulärer, passiver Diffusion im gesamten Gastrointestinaltrakt, wobei aus den genannten Gründen der größte Teil im Dickdarm aufgenommen wird (Zhao und Moghadasian 2010). Desweiteren ist auch eine erleichterte Diffusion mittels Monocarboxylat-Transportern möglich (Poquet et al. 2008). Allerdings wird nur ein Teil der freigesetzten FS absorbiert, da mikrobielle Enzyme diverse FS-Metaboliten bilden (Abbildung 8, durchgezogene Pfeile). Für FS typische Reaktionen



**Abbildung 8:** Möglicher mikrobieller (durchgezogene Pfeile) und hepatischer (gestrichelte Pfeile) Metabolismus von zellwandgebundener Ferulasäure (13). 3-Hydroxyhippursäure (1); 4-Hydroxybenzoessäure (2); Hippursäure (3); 3,4-Dihydroxyphenylpropionsäure (4); 3-Hydroxybenzoessäure (5); Kaffeesäure (6); 4-Hydroxyphenylpropionsäure (7); 3-Hydroxyphenylpropionsäure (8); Dihydroferulasäure (9); *p*-Cumarsäure (10); Phenyllessigsäure (11); Benzoessäure (12); Phenylpropionsäure (14); und Zimtsäure (15)

im Zuge der Metabolisierung sind Demethylierung, Hydrierung, Dehydroxylierung und Decarboxylierung, was zu einer Vielzahl möglicher Metaboliten führt. Zusätzlich sind  $\alpha$ - und  $\beta$ -Oxidationsreaktionen möglich (Rosazza et al. 1995; Jansen und Wanders 2006). Im Dickdarm des Menschen verläuft der Hauptmetabolismus über eine Hydrierung zu Dihydroferulasäure, gefolgt von einer Demethylierung zu 3,4-Dihydroxyphenylpropionsäure und einer selektiven Dehydroxylierung an Position C-4 zu 3-Hydroxyphenylpropionsäure (Russell et al. 2008; Perez-Tertero et al. 2017; Koistinen et al. 2017). Im Rumen von Wiederkäuern wird aufgrund der vielfältigeren Mikrobiota, die unter anderem auch Hefen und Schimmelpilze umfasst (Lund 1974), Phenylpropionsäure als mikrobieller Hauptmetabolit gebildet, indem 3-Hydroxyphenylpropionsäure erneut dehydroxyliert wird. Zusätzlich können weitere Metaboliten gefunden werden, die aus FS gebildet werden, aber auch von anderen phenolischen Säuren, Polyphenolen oder aromatischen Aminosäuren stammen können (Chesson et al. 1999; Rechner et al. 2002; Clayton 2012).

Nach Resorption von FS und der mikrobiell gebildeten Metaboliten können diese in der Leber (teilweise auch in der Darmschleimhaut und der Niere) weiter metabolisiert werden (Abbildung 8, gestrichelte Pfeile). Im hepatischen Metabolismus finden hauptsächlich  $\beta$ -Oxidationen der Phenylpropionsäuren und Konjugationen mit Glucuronsäure, Sulfat und Glycin statt (Perez-Tertero et al. 2017). Hohe Mengen an Hippursäuren (die Glycinkonjugate der Benzoesäuren) sind insbesondere bei herbivoren Säugetieren zu finden und bilden die Hauptausscheidungsform der über die Nahrung aufgenommenen aromatischen Verbindungen (Chesson et al. 1999; Zhao und Moghadasian 2008).

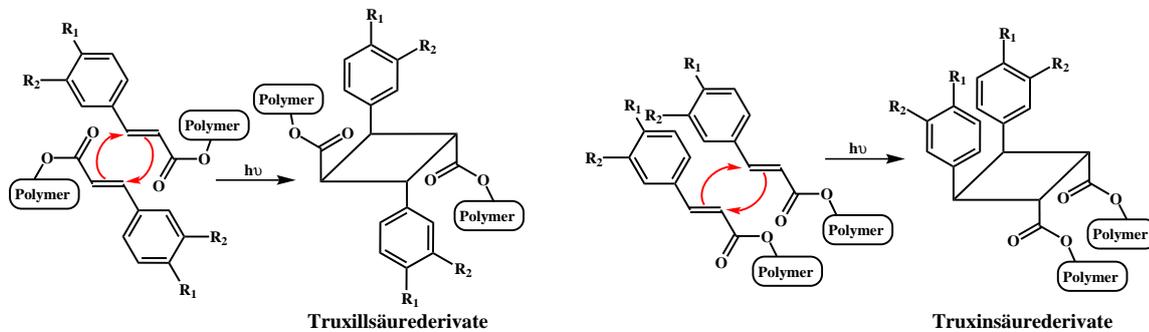
## 1.4 ZELLWANDGEBUNDENE FERULASÄURE-OLIGOMERE

Zellwandgebundene Ferulasäureester können photochemisch oder oxidativ gekoppelt werden, was zu FS-Dimeren und höheren Oligomeren führt (Bunzel 2010). Obwohl der oxidative Mechanismus schon vor mehr als 45 Jahren entdeckt wurde, war lange Zeit nur eines der vielen möglichen Kopplungsprodukte, die 5-5-DFS, bekannt (Geissmann und Neukom 1971). Aus diesem Grund wurde der Einfluss der oxidativ gekoppelten DFS stark unterbewertet und Pflanzenproben hauptsächlich auf photochemisch gebildete Cyclobutandimere (CBD) untersucht. Erst nach der Identifizierung weiterer DFS verlagerte sich der Fokus auf diese Kopplungsprodukte, da besonders in Getreidekörnern und -kleien hohe Gehalte an DFS zu finden sind (Tabelle 1, Ralph et al. 1994). Im Folgenden sollen die beiden Mechanismen näher erläutert werden.

### 1.4.1 Photodimerisierung

FS kann über einen lichtinduzierten Mechanismus dimerisieren. Dieser verläuft über eine [2+2]Cycloaddition (Abbildung 9). Liegen die Doppelbindungen zweier Monomere

in antiparalleler bzw. paralleler Anordnung und mit einem Abstand von maximal 4,2 Å vor, können unter Lichteinfluss Truxillsäuren (*head to tail* (ht)) bzw. Truxinsäuren (*head to head* (hh)) entstehen (Cohen und Schmidt 1964; Schmidt 1964). Je nach Anordnung der Monomere können unterschiedliche Diastereomere gebildet werden und neben FS kann auch zellwandgebundene *p*-CS diese Reaktion eingehen. Somit sind theoretisch bis zu je-



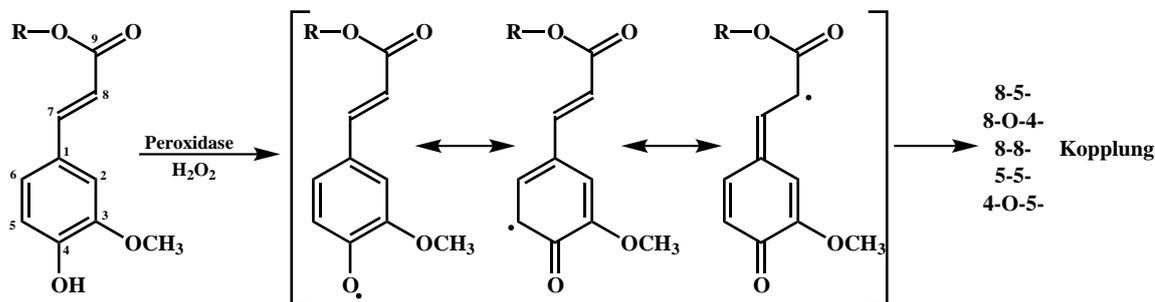
**Abbildung 9:** Lichtinduzierte Bildung von Ferulasäure ( $R_1=OH$ ,  $R_2=OCH_3$ )-Cyclobutandimeren mit Truxill- und Truxinsäurestruktur über eine [2+2]Cycloaddition. Ebenso kann zellwandgebundene *p*-Cumarsäure ( $R_1=OH$ ,  $R_2=H$ ) an dieser Reaktion teilnehmen.

weils elf Homodimere und 14 Heterodimere möglich. Von den insgesamt 36 CBD konnten bereits 18 in der Restpflanze von Mais nachgewiesen werden (Dobberstein und Bunzel 2010a). In Versuchen von Turner et al. (1993) konnte gezeigt werden, dass die Bildung von CBD nicht aktiv von der Pflanzenzelle reguliert wird, sondern lediglich von der Dauer und Intensität der Bestrahlung mit Sonnenlicht abhängt. Dazu wurden Gerstenblätter von lebenden Pflanzen und nach Gefriertrocknung mit Licht behandelt bzw. im Dunkeln gelagert und die Anteile an CBD verglichen. Es zeigte sich, dass sowohl in lebendem als auch totem Gewebe der CBD-Anteil durch die Bestrahlung zunahm, während in den unbestrahlten Proben keine CBD detektierbar waren. In Lebensmitteln sind CBD kaum von Interesse, da die hauptsächlich verwendeten Pflanzengewebe entweder nur wenig FS enthalten oder – wie beispielsweise Getreidekörner durch Spelzen oder Hüllblätter – vor Sonnenlicht geschützt sind. Bei Pflanzenmaterial, das als Futtermittel oder zur Produktion von Biokraftstoffen eingesetzt wird, sind die Gehalte an CBD jedoch ein wichtiger Parameter, um die auf der Fermentation beruhenden Eigenschaften des Pflanzenmaterials zu beurteilen.

#### 1.4.2 Oxidative Kopplung

Zellwandgebundene FS kann in Gegenwart von Peroxidase und  $H_2O_2$  leicht durch Abspaltung des phenolischen Wasserstoffatoms oxidiert werden, da das entstehende Phenoxyradikal mesomeriestabilisiert wird (Abbildung 10). Dieses kann anschließend mit einem weiteren Phenoxyradikal koppeln und nach Rearomatisierung der Zwischenprodukte verschiedene DFS bilden. Obwohl der radikalische Mechanismus schon früh entdeckt

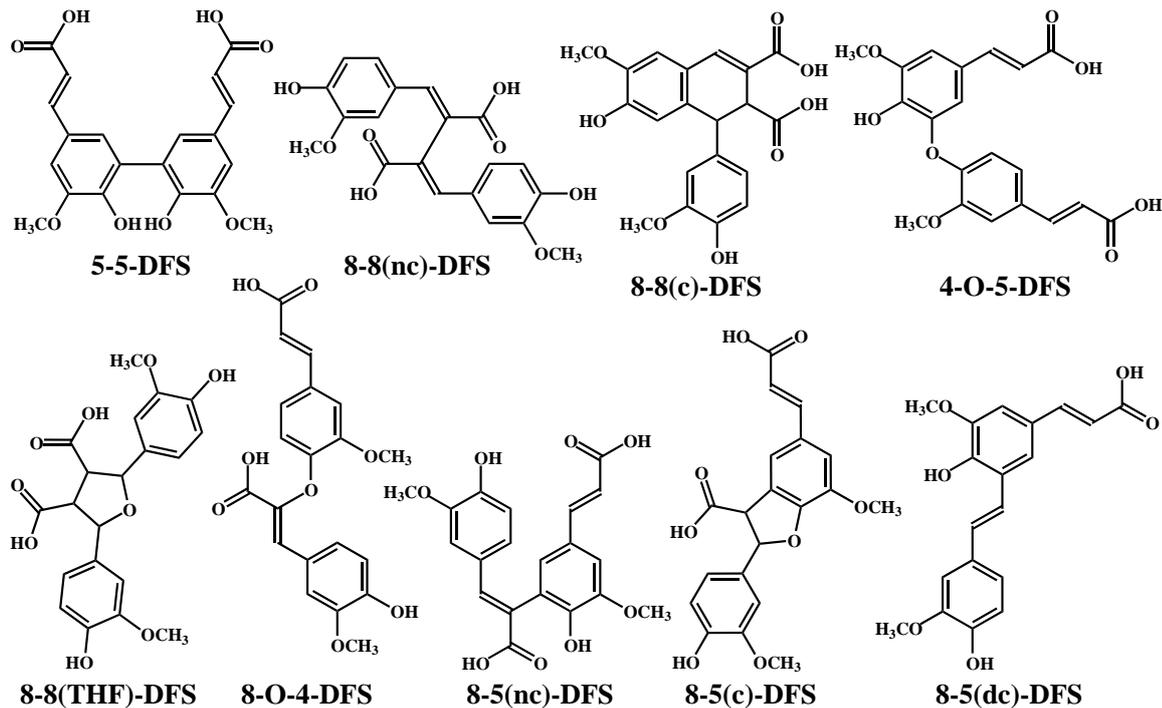
wurde, war lange Zeit lediglich das 5-5-Kopplungsprodukt bekannt (Geissmann und Neukom 1971; Kamisaka et al. 1990).



**Abbildung 10:** Mechanismus der oxidativen Kopplung zellwandgebundener Ferulasäure durch Peroxidase und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Dass 5-5-DFS nur einen kleinen Teil der DFS ausmacht, wurde erst nach über 20 Jahren deutlich, nachdem die ebenso möglichen 8-5-, 8-O-4-, 8-8- und 4-O-5-gekoppelten DFS-Regioisomere synthetisiert und (mit Ausnahme von 4-O-5-DFS, deren Existenz erst später bestätigt wurde) in Zellwänden von Knäuelgras, Rutenhirse und Maissuspensionszellkulturen nachgewiesen wurden (Abbildung 11, Ralph et al. 1994). Dabei wurde beobachtet, dass nach 8-5-Kopplung ein Chinonmethid-Intermediat entsteht, das durch intramolekulare Ringbildung zwischen O-4 und C-7 schneller rearomatisiert als durch Eliminierung des Protons an Position C-8. Dadurch entsteht ein FS-Dimer mit Dihydrobenzofuran-Struktur, das durch die alkalischen Bedingungen bei der Verseifung zum Teil zu einer offenen (nicht cyclisch (nc)) und einer decarboxylierten (dc) 8-5-DFS umgesetzt wird. 8-5(nc)- und 8-5(dc)-DFS konnten jedoch weder in nativen Zellwänden, noch nach chemischer oder enzymatischer Kopplung von FS-Estern nachgewiesen werden (Ralph et al. 1994; Bunzel 2010), sodass davon ausgegangen wird, dass der Nachweis dieser Verbindungen vollständig auf den Abbau der 8-5(cyclisch (c))-DFS im Zuge der Verseifung zurückzuführen ist.

Anders dagegen resultiert die 8-8-Kopplung in einem bis-Chinonmethid-Intermediat, das *in vitro* und vermutlich auch *in vivo* in drei verschiedene DFS umgelagert werden kann (Ralph et al. 2004a; Lu et al. 2012). Eine Möglichkeit ist die Abspaltung beider acider Protonen an den Positionen C-8. Dadurch entsteht die offene Form 8-8(nc)-DFS. Die cyclische Form 8-8(c)-DFS entsteht durch Abspaltung eines Protons an C-8 und einem anschließenden nukleophilen Angriff von C-6 des rearomatisierten Rings an der C-7-Position der verbliebenen Chinonmethid-Einheit. Die dritte Möglichkeit besteht in der Anlagerung eines Wassermoleküls an Position C-7 und einem Ringschluss durch nucleophilen Angriff der neu entstandenen Hydroxygruppe an der zweiten C-7-Position. Aufgrund der gebildeten Tetrahydrofuran (THF)-Struktur wird dieses Dimer als 8-8(THF)-DFS bezeichnet. Die höhere Molekülmasse und der Verlust der Ultraviolett (UV)-Absorption bei 320–330 nm führten dazu, dass 8-8(THF)-DFS erst einige Jahre später in Mais-Zellsuspensionskulturen nachgewiesen wurde (Grabber et al. 2000; Ralph et al. 2004a). Somit

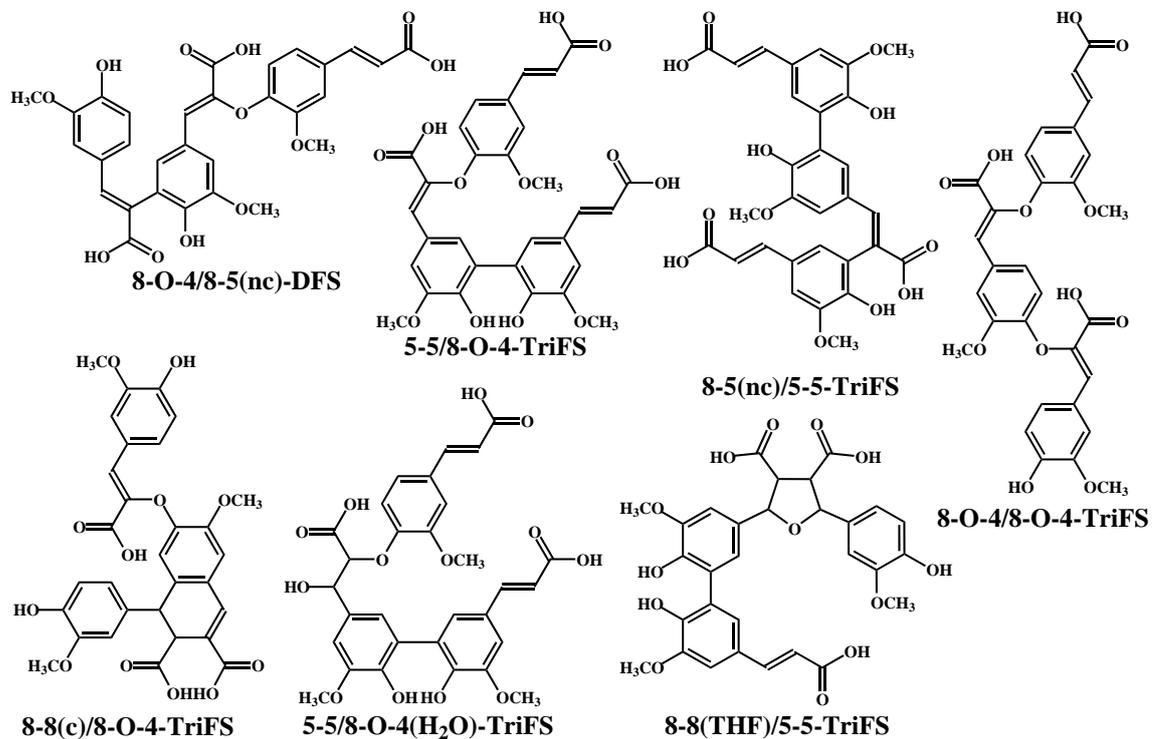


**Abbildung 11:** Strukturen der Dehydrodiferulasäuren (DFS), die nach alkalischer Hydrolyse von Zellwänden gefunden werden können. Auf eventuelle Stereoisomere dieser Verbindungen wird in dieser Abbildung nicht eingegangen. THF: Tetrahydrofuran, nc: nicht cyclisch, c: cyclisch, dc: decarboxyliert.

können die insgesamt neun in Abbildung 11 dargestellten DFS in alkalischen Hydrolysaten von Pflanzenzellwänden gefunden werden. Bislang unbekannt ist, wie viele der sechs theoretisch möglichen Diastereomeren von 8-8(THF)-DFS existieren. Zwar wurde zunächst vermutet, dass nur das *cis-trans-trans*-Isomer *in vivo* gebildet wird, jedoch ergaben Flüssigchromatographie (LC)-MS-Messungen Hinweise auf das Vorhandensein weiterer Diastereomere (Schatz et al. 2006; Jilek und Bunzel 2013).

Wie in Abbildung 11 ersichtlich ist, besitzen die durch oxidative Kopplung gebildeten DFS noch immer eine (bzw. im Falle von 5-5-DFS und den 8-8-gekoppelten DFS zwei) freie Phenolgruppe(n). Wie schon beschrieben sind 8-5(nc)- und 8-5(dc)-DFS Artefakte der Probenaufarbeitung und existieren wahrscheinlich nicht in nativer Form. Unter oxidativen Bedingungen können also auch DFS zu Phenoxyradikalen umgesetzt werden, die mit weiteren FS-Monomeren oder -Dimeren koppeln können. *In vitro* wurde dies durch Oligomerisierung freier FS mittels Lignin-Peroxidase gezeigt (Ward et al. 2001). Dass die Bildung höherer Oligomere auch *in planta* möglich ist, wurde erstmals im Jahre 2003 bestätigt, indem 5-5/8-O-4-TriFS (Abbildung 12) aus dem alkalischen Extrakt von Maiskleie isoliert und identifiziert wurde (Bunzel et al. 2003; Rouau et al. 2003). In den darauffolgenden Jahren wurden sechs weitere TriFS und zwei TetraFS aus Zellwänden von Maiskleie isoliert und deren Struktur aufgeklärt (Abbildung 12): 8-O-4/8-O-4-TriFS, 8-8(c)/8-O-4-TriFS (Funk et al. 2005), 5-5/8-O-4(H<sub>2</sub>O)-TriFS, 8-O-4/8-5(nc)-TriFS (Bunzel et al. 2005a), 5-5/8-

5(nc)-TriFS, 5-5/8-8(THF)-TriFS, 8-O-4/5-5/8-O-4-TetraFS und 8-O-4/5-5/8-5(nc)-TetraFS (Bunzel et al. 2006).



**Abbildung 12:** Strukturen der bisher bekannten, aus Maiskleie isolierten Dehydrotriferulasäuren (TriFS). Auf eventuelle Stereoisomere dieser Verbindungen wird in dieser Abbildung nicht eingegangen. THF: Tetrahydrofuran, nc: nicht cyclisch, c: cyclisch. Trimere mit 8-5(nc)-Struktur entstehen bei der alkalischen Hydrolyse aus den entsprechenden cyclischen Strukturen.

Neben den bereits bekannten Struktureinheiten wurde eine weitere Variante – 5-5/8-O-4(H<sub>2</sub>O)-TriFS – identifiziert, bei der ein H<sub>2</sub>O-Molekül an die Seitenkette der 8-O-4-Bindung addiert. Da diese Struktureinheit bisher nicht unter den Dimeren gefunden wurde, wird von einem spezifischen Reaktionsablauf ausgegangen: Zunächst wird das 5-5-gekoppelte Dimer gebildet. Wird dieses erneut oxidiert und mit einem Monomer über eine 8-O-4-Bindung gekoppelt, entsteht ein Chinonmethid-Intermediat, an dessen Position C-7 H<sub>2</sub>O addieren kann (Bunzel et al. 2005a). Auch bei 8-8(c)/8-O-4-TriFS, 8-O-4/8-5(nc)-TriFS und 5-5/8-5(nc)-TriFS sind spezifische Reaktionsfolgen nachvollziehbar, die in ihren Trivialnamen durch die Abfolge der Struktureinheiten verdeutlicht werden sollten (Bunzel 2010). Bei den restlichen bekannten TriFS und TetraFS existieren mehrere Möglichkeiten, in welcher Reihenfolge die Kopplungen entstehen können.

Die Bestätigung, dass nicht nur FS sondern auch DFS zellwandgebunden vorliegen, konnte durch Isolierung einiger DFS-haltiger Oligosaccharide nach partieller Hydrolyse von Zellwandpolysacchariden erbracht werden. So konnten aus Maiskleie nach saurer Hydrolyse saccharidgebundene 5-5-DFS (Saulnier et al. 1999), 8-O-4-DFS (Allerdings et al. 2005; Bunzel et al. 2008a) und 8-8(c)-DFS (Bunzel et al. 2008a) isoliert werden. Die

estergebundenen Saccharide (Arabinofuranosyl- und Xylopyranosyl- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2)-arabinosyl-Ester) belegen, dass DFS an Arabinoxylane gebunden sein können. Aus Zellwänden von Zuckerrüben konnten außerdem durch aufeinanderfolgende Hydrolysen mit 0,05 M Trifluoressigsäure (TFA), 0,1 M TFA und enzymatischer Hydrolyse Ballaststoff-Fractionen gewonnen werden, die mittels MS unter Verwendung einer Ionenfalle untersucht wurden. In den isolierten Fraktionen waren Struktureinheiten, die sowohl DFS (5-5- oder 8-O-4-) als auch Mono- und/oder Disaccharide von Arabinan- oder Galactan-Seitenketten enthielten (Ralet et al. 2005). Arabinangebundene 5-5- und 8-O-4-DFS konnten außerdem nach enzymatischer Hydrolyse in Quinoa-Samen isoliert und mittels LC-MS/MS und Kernspinresonanz (NMR)-Spektroskopie identifiziert werden (Wefers et al. 2015). Somit wird davon ausgegangen, dass auch pektin gebundene FS oligomerisiert werden kann. Wider Erwarten konnten bisher keine 8-5(c)-gekoppelten Oligosaccharide nachgewiesen werden, obwohl dieser Kopplungstyp in vielen Pflanzen dominiert (Bunzel 2010).

### 1.4.3 Ferulasäure-Crosslinks

Die in den Kapiteln 1.4.1 und 1.4.2 genannten Mechanismen eröffnen die Möglichkeit der FS-vermittelten Kopplung von Zellwandpolymeren. Die Ausbildung dieser *Crosslinks* gehört zu den wahrscheinlich wichtigsten Funktionen zellwandgebundener FS. Dadurch können Arabinoxylane und Pektine untereinander sowie mit Proteinen oder Lignin verknüpft werden. Daraus resultiert eine höhere Stabilität gegenüber mechanischen Einwirkungen, Widerstandsfähigkeit gegen Angriffe von Insekten und phytopathogenen Mikroorganismen, aber auch eine höhere Resistenz gegenüber chemischem und enzymatischem Abbau (Ralph et al. 2004a). Um den Einfluss dieser Kopplungen auf die Zellwand zu beurteilen, ist jedoch von elementarer Bedeutung, ob es sich um inter- oder intramolekulare Kopplungen handelt. Auch wenn bisher kein direkter Beweis erbracht wurde, gibt es viele Ansätze, die für die Existenz von intermolekularen *Crosslinks* zwischen Zellwandpolysacchariden sprechen. Beispielsweise kann Pektin, das aus Zuckerrüben isoliert wurde, Gele bilden, wenn es mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Peroxidase versetzt wird. Die höhere Viskosität und das mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) bestimmte höhere Molekulargewicht korreliert mit der Bildung von DFS aus monomerer FS, was nur durch intermolekularer Kopplung zu erklären ist (Oosterveld et al. 2000). Auch bei Versuchen mit Arabinoxylanen aus Weizen, Gerste, Roggen und Triticale führte eine oxidative Kopplung der gebundenen FS zur Gelbildung, einhergehend mit einer Steigerung des hydrodynamischen Volumens der Polysaccharide. Dies deutet auf eine intermolekulare Quervernetzung der Arabinoxylane durch die Bildung von OFS hin (Dervilly-Pinel et al. 2001).

Weitere Hinweise resultieren aus molekularer Modellierung. Hierbei können komplexe Moleküle dreidimensional dargestellt und ihre physikochemischen Eigenschaften berechnet werden. Hatfield und Ralph (1999) untersuchten anhand stark vereinfachter Strukturmodelle, ob intramolekulare Kopplung möglich ist. Dabei wurde ein Rückgrat aus

16 Xylose-Einheiten gewählt, an das an den O-3-Positionen über verschiedene Möglichkeiten zwei 5-O-*trans*-Feruloyl-L-arabinofuranose-Einheiten gebunden waren. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass FS nur dann intramolekular koppeln kann, wenn zwischen den beiden ferulasäurehaltigen Arabinose-Einheiten entweder zwei oder vier Xylose-Einheiten liegen. Unter diesen Umständen ist lediglich eine 5-5-Kopplung möglich. Die anderen Kopplungstypen müssen demnach durch intermolekulare Kopplung entstanden sein, da für intramolekulare Kopplung die Energiebarrieren zu hoch sind. Auch wenn in dieser Studie keine höheren Oligomere der FS berücksichtigt wurden, erscheint bei Betrachtung der Trimere und Tetramere eine rein intramolekulare Kopplung äußerst unwahrscheinlich. Auf der anderen Seite darf nicht vernachlässigt werden, dass simulierte Modelle nicht den tatsächlichen Gegebenheiten in Zellwänden entsprechen. Durch die komplexe Matrix könnten Polysaccharid-Ketten deformiert und Energiebarrieren verringert werden, sodass intramolekulare Verknüpfungen möglicherweise auch durch andere Kopplungstypen entstehen. Bei TriFS und insbesondere TetraFS wird vermutet, dass die Kopplung von drei, bzw. vier Polymeren über einen Knotenpunkt sterisch zu anspruchsvoll ist. Deshalb wird davon ausgegangen, dass zellwandgebundene FS in der Lage ist, sowohl inter- als auch intramolekulare Kopplungen einzugehen.

## 1.5 METABOLISIERUNG VON DEHYDRODIFERULASÄUREN

In verschiedenen *in-vitro*-Testsystemen besitzen DFS radikalfangende und antioxidative Eigenschaften (Garcia-Conesa et al. 1999; Andreasen et al. 2001c). Um jedoch die physiologische Relevanz der DFS *in vivo* beurteilen zu können, sind Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit dieser Substanzen notwendig, welche wie in den Kapiteln 1.2 und 1.4 beschrieben durch die Bindung an Polysaccharide in eine komplexe Zellwandmatrix eingebettet sind. Nur geringe Mengen der DFS liegen in freier Form vor (Grúz et al. 2015).

Bisher wurden Untersuchungen zur Resorption und Metabolisierung einzelner OFS aufgrund begrenzter Verfügbarkeit von Standardsubstanzen lediglich mit 8-O-4-, 5-5- und 8-5-gekoppelten DFS durchgeführt. Andreasen et al. (2001b) zeigten, dass oral aufgenommene, freie 5-5-, 8-O-4-, 8-5(c)- und 8-5(nc)-DFS im Gastrointestinaltrakt von Ratten absorbiert und im Blut nach Inkubation mit Glucuronidase/Sulfatase nachgewiesen werden können. Außerdem wurde unter Einsatz von DFS-Diethylestern sowie Weizen- und Roggenkleien gezeigt, dass geringe Mengen der estergebundenen DFS durch die humane intestinale Mukosa freigesetzt werden. Deutlich höher sind dagegen die DFS-Freisetzungsraten durch Inkubation mit humanen Fäzesproben, was auf eine effiziente mikrobielle Spaltung der DFS-Ester im Dickdarm hindeutet. Die von Andreasen et al. (2001b) bestimmten, unterschiedlich effizienten Freisetzungen aus Weizen- und Roggenkleien lassen vermuten, dass die Zellwandmatrix einen wesentlichen Einfluss auf die Substratzugänglichkeit und damit auf die Aktivität der Esterasen hat.

Die Absorption von mikrobiell freigesetzten DFS-Regioisomeren konnte bislang jedoch nicht nachgewiesen werden. Kern et al. (2003) analysierten Blutproben von Probanden über einen Zeitraum von 24 h, denen eine Mahlzeit mit hohem Weizenkleie-Anteil verabreicht wurde, konnten jedoch nach Glucuronidase-/Sulfatase-Inkubation keine 5-5-, 8-O-4-, 8-5(c)- oder 8-5(nc)-DFS detektieren. Dies wurde unter anderem auf eine rasche mikrobielle Metabolisierung der freigesetzten DFS zurückgeführt. In den folgenden Jahren wurde der mikrobielle Metabolismus von 5-5-, 8-O-4- und 8-5-gekoppelter DFS anhand der Inkubation der DFS mit humanen Fäzesproben untersucht. Ihre jeweiligen Hauptmetaboliten wurden isoliert und deren Struktur aufgeklärt. So wurde gezeigt, dass 5-5-DFS enzymatisch hydriert und demethyliert wird, was zur Bildung verschiedener Metaboliten führt. Eine Spaltung der Biphenyl-Bindung zu monomeren Verbindungen wurde nicht nachgewiesen (Russell et al. 2008; Braune et al. 2009). Dagegen wurde gezeigt, dass die Etherbindung der 8-O-4-DFS gespalten wird, wodurch monomere FS und vermutlich 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-Brenztraubensäure entstehen. Diese können wie in Kapitel 1.3 beschrieben, d.h. durch Hydrierung, Demethylierung, Dehydroxylierung und Decarboxylierung zu zahlreichen Metaboliten umgesetzt werden (Braune et al. 2009; Kostinen et al. 2017). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass auch 8-5(c)-DFS und 8-5(nc)-DFS mikrobiell umgesetzt werden, was in Hydrierung der Seitenketten und Demethylierung der Methoxygruppen resultiert (Schendel et al. 2015). Außerdem kann die Ringstruktur der 8-5(c)-DFS reaktiv geöffnet werden, wohingegen eine Spaltung der Dimeren zu Monomeren nicht beobachtet wurde. In dieser Studie wurde zusätzlich die Modellverbindung 8-5(c)-DFS-Diethylester einer Fäzesinkubation unterzogen. Dabei wurde die Abspaltung beider Estergruppen, die bereits von Andreasen et al. (2001b) beobachtet wurde, bestätigt. Interessanterweise konnte durch Isolierung und Strukturaufklärung entsprechender Metaboliten gezeigt werden, dass diverse Metabolisierungsreaktionen auch ohne die Spaltung der Esterbindung ablaufen (Schendel et al. 2015). Übertragen auf 8-O-4-DFS könnte somit die Metabolisierung von polysaccharidgebundener 8-O-4-DFS zur Spaltung entsprechender *Crosslinks* führen, noch bevor die Esterbindungen hydrolysiert werden. Untersuchungen zur mikrobiellen Metabolisierung von 8-8-gekoppelten DFS, CBD oder TriFS wurden bislang nicht durchgeführt.

## 1.6 BEDEUTUNG DER FERULASÄURE UND IHRER DERIVATE

### 1.6.1 Einfluss und Verwendung in Lebensmitteln

Aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften wird FS in vielen Lebensmitteln als physiologisch wertvoll angesehen (Acosta-Estrada et al. 2014). Neben ihrer antioxidativen Wirkung wurden weitere, für den menschlichen Organismus positive Eigenschaften wie zum Beispiel Cholesterin-senkende (Kim et al. 2003), antiarteriosklerotische (Nagy et al. 2013), anti-inflammatorische (Russell et al. 2008) und antikanzerogene (Mancuso und Santangelo 2014) Effekte postuliert. Auch für Lebensmittel selbst können hohe Gehalte an FS

vorteilhaft sein, da durch ihre Wirkung als Radikalfänger der oxidative Verderb verzögert wird. Des Weiteren besitzt FS *in vitro* antibakterielle Eigenschaften, was den mikrobiellen Verderb von Lebensmitteln verlangsamen könnte (Borges et al. 2013). Aus diesen Gründen wurde die Zugabe von Rohstoffen oder Extrakten mit hohen Gehalten an FS und anderen phenolischen Säuren zu vielfältigen Lebensmitteln untersucht. So konnte gezeigt werden, dass die oxidative Stabilität von Keksen erhöht werden kann, wenn das verwendete Sonnenblumenöl mit einem Extrakt aus Reiskleie angereichert wurde (Bhanger et al. 2008). Ebenso kann die oxidative Stabilität und Haltbarkeit von Fleischpasteten erhöht werden, indem den Teigen bei der Produktion 3–7% Weizen- oder Hafer-Kleien zugegeben werden (Kumar et al. 2016).

Des Weiteren trägt FS durch Bildung von *Crosslinks* zwischen Zellwandpolymeren zur Knusprigkeit von Obst und Gemüse bei. Die hohe thermische Stabilität der Textur von Wasserkastanien (Parker und Waldron 1995; Parr et al. 1996) und Zuckerrüben (Waldron et al. 1997) ist vermutlich auf die relativ hohen Gehalte an DFS in den Zellwänden zurückzuführen. Die Zellen dieser Gewebe lassen sich auch nach langem Kochen aufgrund starker Zell-Zell-Adhäsion nicht separieren.

Die gelbildende Eigenschaft von Pektinen (Kapitel 1.2.2), die beispielsweise in Konfitüren ausgenutzt wird, kann durch eine stärkere Quervernetzung der Polysaccharide gesteigert werden. Durch Behandlung mit Peroxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder Laccase kann polysaccharidgebundene FS oxidativ gekoppelt werden, wodurch die Viskosität erhöht und die Gelbildung verbessert wird (Oosterveld et al. 2000; Oosterveld et al. 2001; Micard und Thibault 1999). Beim Brotbackprozess sind Arabinoxylane aufgrund ihrer wasserbindenden und gelbildenden Eigenschaften von großer Bedeutung. FS scheint dabei einen Einfluss auf diese Eigenschaften zu haben, da die Zugabe von isolierten Arabinoxylanen zu Mehl in einer gesteigerten Wasserbindungsfähigkeit resultierte, während dieser Effekt bei Zugabe alkalisch verseifter Arabinoxylane nicht nachgewiesen wurde (Hartmann et al. 2005).

FS wird außerdem als Vorstufe zur Produktion von Vanillin verwendet, das als „natürliches Vanillin“ vermarktet werden darf. Durch enzymatische Hydrolyse kann FS zunächst aus verschiedenen Nebenprodukten anderer Industriezweige freigesetzt und anschließend zu Vanillin umgesetzt werden. Zahlreiche Mikroorganismen wurden identifiziert, die diese Biokonversion durchführen können (Kaur und Chakraborty 2013).

### 1.6.2 Futtermittel

Neben Leguminosen werden hauptsächlich die Blätter und Stängel verschiedener Gräser als Futtermittel verwendet, die entweder direkt, nach Trocknung oder Silierung verfüttert werden (Jackson 1977). Da etwa 60% der globalen Ackerflächen zur Produktion von Futtermitteln genutzt werden, ist das Interesse entsprechend groß, die Qualität der Fut-

termittel zu steigern (Raschka und Carus 2012). Die Bioverfügbarkeit der Energie aus den Zellwandpolysacchariden hängt von der Struktur und Zusammensetzung verschiedener Zellwandkomponenten ab. Insbesondere die Menge und Zusammensetzung von Lignin spielt eine entscheidende Rolle, da Lignin eine Barriere für Wasser und hydrolysierende Enzyme darstellt. Die Limitierung der Fermentation durch Lignin ist in zahlreichen Publikationen zusammengefasst (Grabber et al. 2004; Grabber 2005; Frei 2013).

Dass auch der Gehalt an FS und *p*-CS mit der Verdaulichkeit von Zellwandpolysacchariden korreliert, wurde erstmals am Beispiel von Weidelgras gezeigt (Hartley 1972). Zunächst konnte lediglich vermutet werden, dass der limitierende Effekt nicht von den Monomeren der Hydroxycimtsäuren selbst ausgeht, sondern die Bildung von Dimeren für die Verringerung der Fermentation verantwortlich ist. Beispielsweise sind in Weidelgras, Gerste, Luzerne, rotem Klee, Mais und Sorghumhirse etwa 5–14% der Monomere zu Dimeren umgesetzt, wobei der Anteil an Dimeren aufgrund der damals verwendeten Analysemethoden nach heutigem Wissen höher eingeschätzt werden muss. Insbesondere CBD sind aufgrund des Sonnenlichts in den Blättern und Stängeln von Gräsern in relativ hohen Gehalten vorhanden (Eraso und Hartley 1990).

Grabber et al. (2009) führten Untersuchungen zum Einfluss von FS auf die ruminale Fermentation von Futtermitteln durch. Dazu wurden Zellwände aus Mais-Zellsuspensionen mit normaler und gehemmter FS-Biosynthese isoliert und zum Teil künstlich lignifiziert. Die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Fermentation wurden bestimmt, indem die Gasproduktion und die Menge an nicht-fermentierbaren Polysacchariden bei einer *in-vitro*-Inkubation mit Pansensaft analysiert wurden. So wurde ermittelt, dass die enzymatische Hydrolyse durch DFS-*Crosslinks* in nicht-lignifizierten Zellwänden geringfügig und durch Lignin-Polysaccharid-*Crosslinks* in lignifizierten Zellwänden maßgeblich verringert wird (Grabber et al. 2009). Zu dieser Schlussfolgerung kamen auch frühere Studien mit Mais-Zellsuspensionen (Grabber et al. 1998) und Trespens (Casler und Jung 1999).

### 1.6.3 Herstellung von Biokraftstoff

Die Gewinnung von Biokraftstoffen basiert auf dem enzymatischen Abbau von Öl, Stärke und Zucker (erste Generation) oder Nicht-Stärke-Polysacchariden (zweite Generation). Im Vergleich zur Herstellung von Biokraftstoffen der ersten Generation sind die Verfahren unter Verwendung der ganzen Pflanze aufgrund der komplexen und individuellen Zellwandstruktur deutlich aufwendiger und bislang weniger rentabel (Zhao et al. 2012a). Um die Ausbeute und damit Wirtschaftlichkeit der Herstellung von Biokraftstoffen der zweiten Generation zu erhöhen, muss das Netzwerk aus Cellulose, Hemicellulosen und Lignin aufgeschlossen werden, damit die Polysaccharide für Hydrolasen und Wasser zugänglich sind. Dazu wurden verschiedene Vorbehandlungen entwickelt, die je nach Rohmaterial angewandt werden können (Balat 2011; Zhao et al. 2012b; Mood et al. 2013). Darunter

zielen einige auf die Verringerung der FS-Crosslinks ab, die Hemicellulosen untereinander und zu Lignin quervernetzen. Eines der führenden Verfahren ist die „ammonia fiber expansion“-Vorbehandlung, bei der das Pflanzenmaterial mit flüssigem Ammoniak versetzt und anschließend auf 90 °C erhitzt wird. Dieser Prozess findet zunächst unter Druck statt, der dann schlagartig gesenkt wird, was zu einer explosionsartigen Verdampfung des Ammoniaks führt. Mit Hilfe dieses Verfahrens wird der Kristallisationsgrad der Cellulose reduziert, die Ligninstruktur verändert und estergebundene FS-Crosslinks gespalten (Zhao et al. 2012b; Vismeh et al. 2013). Eine weniger aufwendige Variante stellt die alkalische Vorbehandlung dar, bei der das Pflanzenmaterial mit NaOH, KOH, Ca(OH)<sub>2</sub> oder Ammoniak für mehrere Stunden oder Tage behandelt wird. Auch bei diesem Verfahren liegt der größte Vorteil in der Reduktion der FS-Crosslinks und somit im teilweisen Abbau der Zellwandmatrix, wodurch die Cellulose zugänglicher gemacht wird (Zhao et al. 2012b; Mood et al. 2013).

Eine weitere Strategie zur Steigerung der Effizienz bei der Biokraftstoff-Produktion bietet die Veränderung der Lignin-Struktur *in planta*, indem mittels genetischer Modifikationen beeinflusst wird, welche Monomere für die Lignifizierung verwendet werden. Dadurch kann beispielsweise der Polymerisationsgrad, die Hydrophobizität und/oder die Vernetzung zu anderen Zellwandpolymeren verringert werden (Mottiar et al. 2016). Vergleichsweise neu sind Konzepte, bei denen Monolignolferulate in das Lignin-Polymer der Pflanzenzellwände eingebaut werden. Diese sogenannten „zip-Lignine“ bieten den Pflanzen die lebensnotwendigen Eigenschaften, lassen sich aber leicht durch alkalische Hydrolyse aufspalten (Wilkerson et al. 2014; Mottiar et al. 2016).

## ZIELSETZUNG

---

Zellwandgebundene FS und deren Derivate sind für Pflanzen in vielerlei Hinsicht von zentraler Bedeutung, beeinflussen aber auch die Qualität von pflanzlichen Nahrungsmitteln, Futtermitteln und Rohstoffen zur Gewinnung von Biokraftstoff. In Bezug auf Nahrungsmittel wird FS mit verschiedenen physiologisch positiven Eigenschaften in Verbindung gebracht. Jedoch ist zu berücksichtigen, dass ein Großteil der FS zellwandgebunden vorliegt und daher erst im Dickdarm freigesetzt wird. Die freigesetzte FS kann mikrobiell fermentiert, resorbiert und anschließend hepatisch weiter metabolisiert werden. Entsprechende Vorgänge finden auch in Wiederkäuern statt, sodass derartige Metaboliten auch in der Milch zu finden sein sollten. Des Weiteren sind zellwandgebundene OFS von großem Interesse, da durch die Quervernetzung von Polysacchariden untereinander sowie mit Lignin und eventuell Strukturproteinen die Widerstandsfähigkeit der Zellwand gegenüber enzymatischem und chemischem Abbau gesteigert wird.

Die in der Literatur beschriebenen Methoden zur Analytik von FS sowie ihrer Derivate und Metaboliten besitzen häufig eine geringe Selektivität und Empfindlichkeit. Außerdem liefern diese Methoden oft nur unvollständige Informationen über FS-Metaboliten in Milch und anderen Matrices sowie über die in Zellwänden vorkommenden FS-Crosslinks, da jeweils nur eine Auswahl an Metaboliten bzw. OFS erfasst wird. Insbesondere bei der OFS-Analytik ist dies unter anderem darauf zurückzuführen, dass die etablierten Verfahren zur Gewinnung entsprechender Standardsubstanzen mit einem hohen Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden sind.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, verschiedene Multimethoden zu entwickeln, mit denen möglichst umfassende Informationen über FS, FS-Metaboliten und OFS erhalten werden können. Unter anderem sollte eine LC-MS/MS-basierte Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) entwickelt werden, mit der FS, typische FS-Metaboliten sowie weitere Präkursoren dieser Metaboliten selektiv und empfindlich in Milch quantifiziert werden können. Da die meisten der für diese Methode benötigten isotope markierten Standardsubstanzen nicht kommerziell verfügbar sind, sollten diese in geeigneten Synthesen als zweifach markierte Isotopologe gewonnen werden. Ziel war zudem eine Optimierung der Probenaufarbeitung, um eine schnelle und effiziente Extraktion zu ermöglichen, die neben der Eliminierung störender Matrixbestandteile eine Konzentration der Analyten zulässt.

Zur Entwicklung von Methoden für die Bestimmung von OFS sollten Strategien entwickelt werden, mit denen ein breites Spektrum der nicht kommerziell erhältlichen OFS-

Standardsubstanzen effizient und in hoher Reinheit gewonnen werden kann. Dabei sollten Verfahren im Fokus stehen, bei denen durch den Einsatz von isotopenmarkierten Reaktanten auch die entsprechenden Isotopologe gebildet und isoliert werden können. Ein weiterer Schwerpunkt lag in der Gewinnung von bislang nicht beschriebenen OFS, deren Strukturen mittels moderner spektroskopischer Methoden aufgeklärt werden sollten. Anhand verschiedener Proben sollte überprüft werden, ob die synthetisierten Verbindungen auch in Pflanzenmaterialien vorkommen.

Ausgehend von einer möglichst großen Vielfalt an Standardsubstanzen sollten Methoden entwickelt werden, mit denen umfassende Informationen über die Gehalte an FS und OFS in pflanzlichen Zellwänden erhalten werden können. Einerseits war das Ziel, eine LC-MS/MS-basierte SIVA zu entwickeln, die sich durch eine hohe Selektivität und Empfindlichkeit auszeichnet, sodass auch geringe Gehalte an OFS unabhängig von der Komplexität der Matrix richtig und präzise bestimmt werden können. Des Weiteren war vorgesehen, eine LC-MS/MS-Methode zu entwickeln, bei der anstelle von isotopenmarkierten Standardsubstanzen die monomethylierte 5-5-DFS als alleinige interne Standardsubstanz verwendet wird, da diese mit deutlich geringerem Aufwand synthetisiert werden kann. Die Anwendbarkeit der Methoden sollte anhand der Analyse von unlöslichen Ballaststoffen (UBS) monokotyler und dikotyler Pflanzen demonstriert werden. Außerdem sollten Möglichkeiten zur Etablierung von Screening-Verfahren zur Summenbestimmung von FS-Dimeren und -Trimeren untersucht werden, deren Vorteile in einer schnellen Durchführung und Interpretation der Ergebnisse liegen.

### 3.1 SYNTHESE VON FERULASÄURE UND FERULASÄURE-METABOLITEN

Zur Entwicklung von *Targeted Screening*-Methoden, die auf die Bestimmung bekannter Substanzen abzielen, werden Referenzsubstanzen benötigt, um die Eigenschaften der Analyten in den jeweiligen Testsystemen beurteilen zu können. Für die SIVA sind außerdem isotoopenmarkierte Standardsubstanzen notwendig, mit denen neben aufarbeitungsbedingten Analytverlusten die matrixbedingte Ionensuppression bei Verwendung weicher Ionisationsmethoden ausgeglichen werden kann.

Die in dieser Arbeit untersuchten FS-Metaboliten beinhalten die in Abbildung 8 (Kapitel 1.3) gezeigten Zimtsäuren, Phenylpropionsäuren, Benzoesäuren, Hippursäuren und Phenylelessigsäure. Mit Ausnahme von 3-Hydroxyhippursäure sind diese kommerziell erhältlich, jedoch sind ihre Isotopologen – bis auf [D<sub>2</sub>]Benzoesäure – nicht verfügbar oder nur zu unrealistisch hohen Preisen. Aus diesem Grund wurden Möglichkeiten erarbeitet, die benötigten Substanzen zu synthetisieren. Zu den gängigen Verfahren der Stabilisotopenmarkierung gehören der Austausch von H- mit D-Atomen oder der Einbau von <sup>13</sup>C-Atomen in die Strukturen. Der H/D-Austausch hat den Vorteil, dass er oft mit einem geringeren finanziellen und zeitlichen Aufwand durchgeführt werden kann. Allerdings muss bei dieser Technik sichergestellt werden, dass die Isotopenmarkierung während der Analyse stabil ist. <sup>13</sup>C-Markierungen sind vergleichsweise teuer und können nur im Zuge einer geeigneten Synthese in das Zielmolekül integriert werden. Dennoch wurden in dieser Arbeit FS und die meisten FS-Metaboliten als zweifach <sup>13</sup>C-markierte Standardsubstanzen hergestellt, da diese Art der Markierung beständig ist und einen geringeren Isotopenshift im Vergleich zu D-Markierungen aufweist. Substanzen, bei denen eine <sup>13</sup>C-Markierung nicht praktikabel war, wurden mittels H/D-Austausch deuteriert.

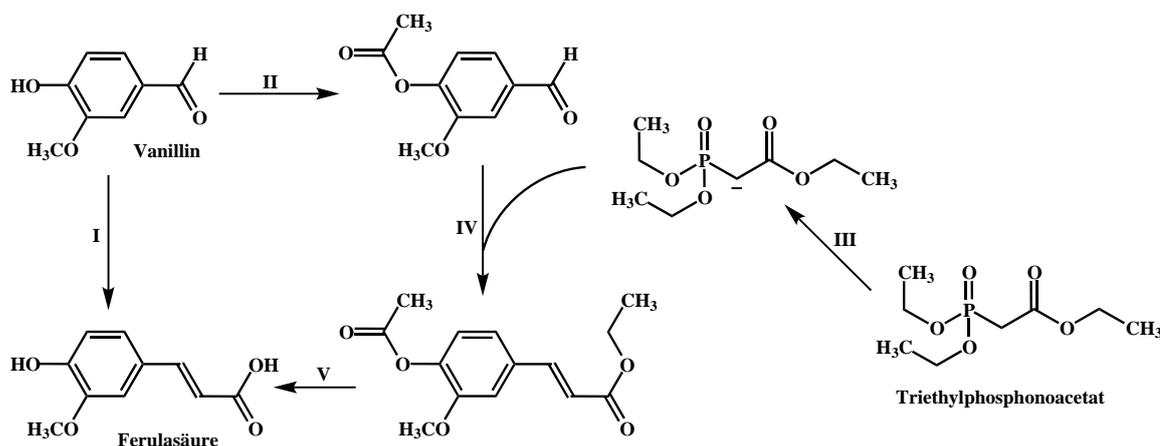
#### 3.1.1 Zimtsäuren

Prinzipiell können <sup>13</sup>C-markierte Zimtsäuren durch drei verschiedene Reaktionsmechanismen aus Benzaldehyden erhalten werden. Die Perkin-Reaktion beinhaltet eine Kondensation aromatischer Aldehyde mit Säureanhydriden (Perkin 1867; Bacharach und Brogan 1928; Pawar et al. 2011). Hierbei wird Essigsäureanhydrid und der Katalysator Pyridin verwendet, um eine C<sub>2</sub>-Einheit auf den Benzaldehyd zu übertragen. Da <sup>13</sup>C-markiertes Essigsäureanhydrid in dieser Reaktion gleichzeitig als Lösungsmittel dient und deswegen in hohem Überschuss eingesetzt werden muss, ist die Synthese von <sup>13</sup>C-markierten

Zimtsäuren über diesen Weg nicht praktikabel.

In der Horner-Wadsworth-Emmons-Variante der Wittig-Reaktion wird die C<sub>2</sub>-Einheit von Trialkylphosphonoacetaten übertragen, wodurch entsprechende Alkylester der Zimtsäuren entstehen (Horner et al. 1959; Wadsworth und Emmons 1961). Freie Phenolgruppen müssen in dieser Reaktion mit Schutzgruppen versehen werden. Trialkylphosphonoacetat wird mit NaH deprotoniert und kann anschließend mit dem Benzaldehyd zum Zimtsäurealkylester umgesetzt werden. Zuletzt müssen die Schutzgruppe und der Alkylester abgespalten werden (Abbildung 13, Reaktionen II–V).

In der Knoevenagel-Reaktion mit Doebner-Modifikation dient Malonsäure als C<sub>2</sub>-Gruppenüberträger (Knoevenagel 1898; Doebner 1900; Robbins und Schmidt 2004). Im Lösungsmittel Pyridin mit katalytischen Mengen Anilin oder Piperidin wird Malonsäure deprotoniert und addiert an die Carbonylverbindung. Durch spontane Wasserabspaltung und Decarboxylierung entsteht die *trans*-Zimtsäure (Abbildung 13, Reaktion I).



**Abbildung 13:** Die Synthese von Zimtsäuren aus Benzaldehyden (hier am Beispiel von Ferulasäure dargestellt) ist mittels Knoevenagel-Reaktion mit Doebner-Modifikation möglich (I: Malonsäure, Pyridin, Anilin). Eine weitere Möglichkeit bietet die Horner-Wadsworth-Emmons-Variante der Wittig-Reaktion, die aus Acetylierung (II: Pyridin, Essigsäureanhydrid), Deprotonierung (III: Tetrahydrofuran, NaH), Kondensation (IV: Tetrahydrofuran) und Verseifung (V: wässrige NaOH-Lösung) besteht.

Aufgrund der einfacheren Durchführbarkeit wurden die zweifach <sup>13</sup>C-markierten Zimtsäuren mittels Knoevenagel-Reaktion synthetisiert (Kapitel 8.1.1). Die Horner-Wadsworth-Emmons-Variante der Wittig-Reaktion wurde durchgeführt, um mit [<sup>13</sup>C]Triethylphosphonoacetat FS mit einer <sup>13</sup>C-Markierung zu synthetisieren (Kapitel 8.3.1). Diese wurde als Ausgangsprodukt zur Synthese von <sup>13</sup>C-markierten OFS verwendet (Kapitel 3.3). Aufgrund des hohen Bedarfs an [9-<sup>13</sup>C]FS war der erhöhte Arbeitsaufwand durch den geringeren Preis von [<sup>13</sup>C]Triethylphosphonoacetat im Vergleich zu [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Malonsäure gerechtfertigt.

### 3.1.2 Phenylpropionsäuren

Isotopenmarkierte Phenylpropionsäuren können durch Reduktion der entsprechenden Zimtsäuren erhalten werden (Fumeaux et al. 2010). Allerdings finden bei Verwendung von D<sub>2</sub> als Reduktionsmittel zusammen mit Metallkatalysatoren wie PtO<sub>2</sub> oder Pd/C zusätzlich H/D-Austauschreaktionen statt, die in einem uneinheitlichen Deuterierungsgrad resultieren (Sajiki et al. 2004a; Sajiki et al. 2004b; Esaki et al. 2007; Yu und Spencer 1997). Aus diesem Grund wurden synthetisierte <sup>13</sup>C<sub>2</sub>-markierte Zimtsäuren mit H<sub>2</sub> reduziert, sodass selektiv <sup>13</sup>C<sub>2</sub>-markierte Phenylpropionsäuren entstanden (Kapitel 8.1.2).

### 3.1.3 Benzoessäuren

Die Integration von zwei <sup>13</sup>C-Atomen in Benzoessäure, 3-Hydroxybenzoessäure und 4-Hydroxybenzoessäure kann nicht ohne einen erheblichen Aufwand durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit H/D-Austauschreaktionen untersucht, die nach dem Mechanismus der elektrophilen aromatischen Substitution verlaufen. Katalysiert durch starke Säuren addiert das Elektrophil D<sup>+</sup> an den Ring. Hierbei werden Positionen bevorzugt, bei denen das kationische Zwischenprodukt besonders gut mesomeriestabilisiert wird. Unter Deprotonierung erfolgt anschließend die Rearomatisierung. Hydroxygruppen besitzen einen -I- und einen +M-Effekt, wodurch die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht wird und die Protonen in *ortho*- und *para*-Stellung zur Hydroxygruppe bevorzugt ausgetauscht werden. Somit können mittels elektrophiler aromatischer Substitution wie in Kapitel 8.1.3 beschrieben [3,5-D<sub>2</sub>]4-Hydroxybenzoessäure und [2,4,6-D<sub>3</sub>]3-Hydroxybenzoessäure erhalten werden (Marini et al. 2010). Eine selektive Deuterierung von Benzoessäure ist mittels elektrophiler aromatischer Substitution nicht möglich, allerdings ist [2,6-D<sub>2</sub>]Benzoessäure kommerziell verfügbar.

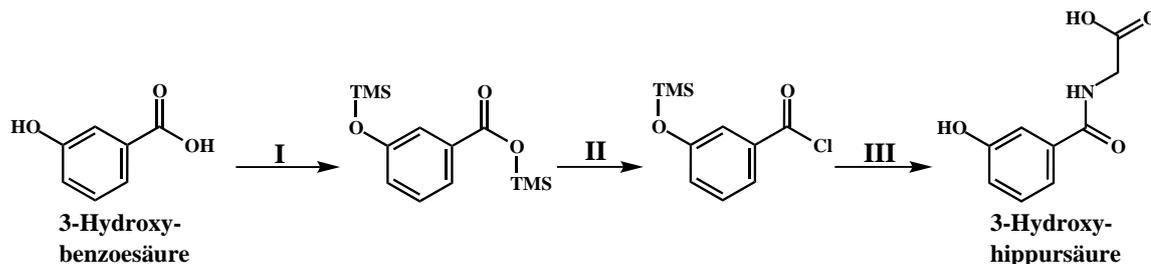
### 3.1.4 Phenylelessigsäure

Aufgrund von Keto-Enol-Tautomerie und Mesomeriestabilisierung über den aromatischen Ring sind die Protonen des α-C-Atoms der Phenylelessigsäure relativ acide und können unter alkalischen Bedingungen mit D<sup>+</sup> ausgetauscht werden (Orfanopoulos et al. 1990) (Kapitel 8.1.4). Dem geringen synthetischen Aufwand steht jedoch gegenüber, dass [7,7-D<sub>2</sub>]Phenylelessigsäure nicht verwendet werden kann, wenn bei der Probenvorbereitung oder Messung hohe pH-Werte vorliegen, da sonst ein Rückaustausch stattfinden kann.

### 3.1.5 Hippursäuren

Hippursäure kann in einem Schritt durch Anwendung der Schotten-Baumann-Reaktion aus Benzoylchlorid und Glycin synthetisiert werden (Schotten 1884; Baumann 1886; Kaus-

hik et al. 2012) (Kapitel 8.1.5). Die Synthese von 3-Hydroxyhippursäure ist dagegen komplexer, da zunächst die Hydroxygruppe mit einer geeigneten Schutzgruppe versehen werden muss, bevor 3-Hydroxybenzoesäure mit Thionylchlorid zu 3-Hydroxybenzoylchlorid umgesetzt werden kann (Abbildung 14). Dadurch wird verhindert, dass das Carbonsäurechlorid intermolekular mit der Hydroxygruppe reagiert. Die Schutzgruppe muss so gewählt werden, dass sie unter den alkalischen Bedingungen der Schotten-Baumann-Reaktion ausreichend stabil ist und dennoch anschließend leicht abgespalten werden kann. Aus diesem Grund wurde eine Trimethylsilylierung gewählt (Kapitel 8.1.6).



**Abbildung 14:** Für die Synthese von 3-Hydroxyhippursäure aus 3-Hydroxybenzaldehyd muss zunächst eine Schutzgruppe eingebacht werden (I: *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, Triethylamin). Anschließend kann die Carbonsäure zum Carbonsäurechlorid umgesetzt werden (II: Thionylchlorid). Die darauffolgende Schotten-Baumann-Reaktion (III: Toluol, Glycin in wässriger NaOH-Lösung) führt zum gewünschten Produkt. TMS: Trimethylsilyl-Gruppe.

### 3.2 METHODEN ZUR BESTIMMUNG VON FERULASÄURE-METABOLITEN

Prinzipiell können die in Abbildung 8 (Kapitel 1.3) gezeigten phenolischen Säuren mittels Umkehrphasen (RP)-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), Ionenchromatographie oder Gaschromatographie (GC) getrennt werden. Aufgrund der teilweise sehr geringen Analytmengen empfiehlt sich die Detektion mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS), für die eine Kopplung mit Ionenchromatographie aufgrund der hohen Salzmengen mit einem erhöhten technischen Aufwand verbunden ist. Zur Bestimmung einiger phenolischer Säuren in Weizenkeimen konnte bereits eine GC-MS/MS-Methode entwickelt werden (Wu et al. 1999). Durch Kopplung einer unpolaren mit einer polaren GC-Kapillare und *Time-of-Flight*-Detektion wurden bis zu 980 Substanzen – darunter einige phenolische Säuren – in Fäzesproben analysiert (Aura et al. 2008; Koistinen et al. 2017). Um eine ausreichende Flüchtigkeit zu erreichen, müssen die Analyten jedoch zuvor derivatisiert werden, was mit einem zusätzlichen Arbeitsschritt verbunden ist. Mittels HPLC können die Analyten nach entsprechender Probenaufarbeitung direkt analysiert werden. Beispielsweise wurden verschiedene phenolische Substanzen auf einer C8-Säule getrennt und mittels UV-Detektor quantifiziert (Besle et al. 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine LC-(Triple-Quadrupol)-MS/MS-Methode entwickelt, mit der die Bestimmung von FS und der in Abbildung 8 (Kapitel 1.3) als Struktur-

formel dargestellten FS-Metaboliten in Milch möglich ist (Kapitel 8.2). Die Trennung der Analyten erfolgte auf einer Phenyl-Hexyl-Säule, die mit aromatischen Verbindungen zusätzlich zu hydrophoben Wechselwirkungen auch  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen eingehen kann. Die zur massenspektrometrischen Detektion notwendige Ionisierung der Analyten erfolgt mittels Elektronenspray-Ionisation (ESI), bei der im Vergleich zur härteren chemischen Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) eine geringere Fragmentierung der Analyten auftritt. Somit können im ersten Quadropol die jeweiligen Quasimolekülonen  $[M-H]^-$  selektiert werden, die im zweiten Quadrupol – der sogenannten Stoßkammer – durch Kollision mit Argon fragmentiert werden. Anschließend werden im dritten Quadrupol spezifische Fragmentionen selektiert. Dabei wird für jede Substanz neben dem *Quantifier*-Fragmention, das zur Quantifizierung dient, wenn möglich ein zusätzliches Fragmention (*Qualifier*-Ion) detektiert, welches zur eindeutigen Identifizierung der jeweiligen Verbindung verwendet werden kann.

Eine der einfachsten Strategien zur Kalibrierung chromatographischer Methoden ist die externe Kalibrierung, bei der Lösungen von Standardsubstanzen und Proben unabhängig voneinander gemessen werden. Anhand der Peakflächen und Konzentrationen der Standardsubstanzen werden Kalibriergleichungen erstellt, mit denen die Analytgehalte in den Proben berechnet werden können. Diese Methode hat zum Nachteil, dass mögliche Fehler während der Probenaufarbeitung oder der Messung nicht berücksichtigt werden. Häufig werden deshalb interne Standardsubstanzen verwendet, die möglichst ähnliche chemische Eigenschaften wie die Analyten besitzen, sich jedoch chromatographisch von diesen trennen lassen und nicht natürlicherweise in den zu analysierenden Proben enthalten sind. Die internen Standardsubstanzen werden zu Beginn der Probenaufarbeitung zur Probe gegeben und parallel zu den Analyten quantifiziert, sodass – unter Voraussetzung vergleichbarer chemischer Eigenschaften von Analyten und internen Standardsubstanzen – Fehler während der Probenaufarbeitung weitestgehend ausgeglichen werden. Allerdings kann es bei der Verwendung MS-basierter Detektionsmethoden zu einigen Fehlerquellen, darunter matrixbedingte Ionensuppression, kommen, die mittels dieser internen Standardsubstanzen nicht ausgeglichen werden können. Aus diesem Grund sollten bei massenspektrometrischen Methoden isotope markierte Standardsubstanzen eingesetzt werden, was dem Prinzip der SIVA entspricht. Dabei wird der Probe zu Beginn der Analyse eine bekannte Menge isotope markierter Standardsubstanzen zugegeben. Da sich die Isotope chemisch gleich verhalten, aber mittels MS bzw. MS/MS unterschieden werden können, werden sowohl die Analytverluste während der Probenaufarbeitung als auch matrixbedingte Ionensuppressionseffekte bei der Ionisation der Analyten und sonstige Einflüsse auf die Ionenausbeute ausgeglichen, wodurch eine hohe Methodenrichtigkeit erzielt wird. Da die in dieser Arbeit analysierten FS-Metaboliten größtenteils in unkomplizierten Synthesen als isotope markierte Standardsubstanzen hergestellt werden können, wurde die Strategie der SIVA gewählt.

Eine optionale Enzyminkubation mit Glucuronidase und Sulfatase zu Beginn der Probenaufarbeitung ermöglicht es, sowohl die Gehalte an nicht-konjugierten als auch Phase-II-konjugierten Analyten zu bestimmen. Zur Extraktion der FS und FS-Metaboliten wird eine angepasste Version der *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe* (QuEChERS)-Methode angewandt, die ursprünglich zur Extraktion von Pestiziden aus Lebensmitteln mit geringem Fettgehalt entwickelt wurde (Anastassiades et al. 2003; Lehotay et al. 2005). Dabei wird die homogenisierte, wasserhaltige Probe mit Acetonitril (ACN) gemischt (Einquphasen-Extraktion) und anschließend durch Zugabe von  $\text{MgSO}_4$  und NaCl eine Phasentrennung ausgelöst, nach der sich die aromatischen Analyten größtenteils in der organischen Phase befinden. Die bei der LC-MS/MS-Analyse möglicherweise störenden Kohlenhydrate, Lipide, Proteine und Salze werden durch die flüssig-flüssig-Extraktion größtenteils entfernt. Anschließend wird bei Methoden zur Bestimmung von Pestiziden in der Regel eine dispersive Festphasenextraktion mit primären und sekundären Aminen durchgeführt, um Fettsäuren und andere Carbonsäuren abzutrennen. Da bei diesem Verfahren jedoch auch FS und FS-Metaboliten adsorbiert und entfernt werden, wurde auf den Einsatz der dispersiven Festphasenextraktion verzichtet. Stattdessen wurde der Extrakt erneut mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet durch Entfernen des Lösungsmittels aufkonzentriert.

Anhand der Analyse von drei Milchproben mit unterschiedlichem Fettgehalt wurde die entwickelte LC-MS/MS-Methode validiert. So konnte gezeigt werden, dass sich diese durch eine schnelle Probenaufarbeitung sowie eine selektive, empfindliche und präzise Quantifizierung auszeichnet und aufgrund der Verwendung von isotoopenmarkierten Standardsubstanzen eine hohe Richtigkeit besitzt.

### 3.3 GEWINNUNG VON FERULASÄURE-DIMEREN UND -TRIMERN

In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene Wege erarbeitet, OFS als Standardsubstanzen zu gewinnen. Dabei wurden sowohl Methoden zur Isolierung von natürlich vorkommenden Verbindungen verwendet, als auch Synthesen entwickelt, die von *de-novo*-Synthesen über chemische Kopplungen bis zu biomimetischen Reaktionen reichen.

#### 3.3.1 Isolierung aus Maiskleie

Aufgrund des relativ hohen FS-Gehaltes von bis zu 3,1 % des Trockengewichts hat sich die Kleie von Mais als besonders geeignet zur Isolierung von FS-Oligomeren erwiesen (Saulnier et al. 1995; García-Lara et al. 2004). Dennoch darf die Bedeutung der komplexen Zellwandmatrix sowie die Vielfalt zellwandgebundener phenolischer Verbindungen in Maiskleie bei der Isolierung nicht unterschätzt werden. Sie sind der Grund dafür, dass mehrere aufeinanderfolgende Arbeitsschritte nötig sind, damit einzelne Substanzen mit ausreichender Reinheit erhalten werden. Dies erfordert entsprechende Trennsysteme und

einen zeitlichen Aufwand von mehreren Wochen.

Die in der Vergangenheit publizierten Methoden zur Isolierung von DFS, TriFS und TetraFS aus Maiskleie folgen dem selben Schema (Bunzel et al. 2003; Bunzel et al. 2004a; Funk et al. 2005; Bunzel et al. 2005a). Nach Mahlen und Entfetten der Kleie werden die UBS wie in Kapitel 8.4 beschrieben isoliert, indem Stärke, ein Großteil der Proteine, lösliche Ballaststoffe (LBS) und weitere lösliche Bestandteile der Probe entfernt werden. LBS enthalten zwar auch OFS, allerdings nur geringe Mengen im Vergleich zu den UBS. Im nächsten Schritt werden mittels alkalischer Hydrolyse die estergebundenen Phenolsäuren aus den UBS freigesetzt, die anschließend mit Diethylether oder Ethylacetat extrahiert werden können. Weitere Extraktionsschritte in 5%ige NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und nach Ansäuern zurück in ein organisches Lösungsmittel haben zur Folge, dass nur Substanzen mit mindestens einer freien Carbonsäuregruppe isoliert werden. Somit wird ein Gemisch aus hauptsächlich FS, *p*-CS und FS-Oligomeren erhalten. Die folgende Fraktionierung mittels Sephadex LH-20-Chromatographie ist der zentrale Schritt der Isolierung von OFS. Die stationäre Phase besteht aus hydroxypropylierten Dextranen, die über *Crosslinks* zu einem porösen Netzwerk verbunden sind. Dadurch werden die Moleküle zum einen nach ihrem hydrodynamischen Volumen, aber auch durch hydrophile und lipophile Wechselwirkungen aufgetrennt, sodass viele DFS und 5-5/8-O-4-TriFS mit Reinheiten von über 75% aus Maiskleie isoliert werden. Diese können anschließend mittels semipräparativer HPLC auf einer C18-Säule weiter aufgereinigt werden (Bunzel et al. 2003; Bunzel et al. 2004a). Durch kleine Modifikationen dieses Verfahrens können weitere Trimere isoliert und als Standardsubstanzen gewonnen werden (Funk et al. 2005; Bunzel et al. 2005a). Die Fraktionierung mittels Sephadex LH-20 kann außerdem optimiert werden, indem zuvor eine Trennung der Dimere, Trimere und höheren Oligomeren mittels SEC durchgeführt wird (Bunzel et al. 2006).

Der Nachteil der Isolierung aus Maiskleie ist, dass trotz des hohen zeitlichen Aufwandes viele OFS nur in geringen Mengen isoliert werden. Auch in Hinblick auf die Gewinnung von isotopenmarkierten Standardsubstanzen ist die Isolierung aus Pflanzenmaterial ungeeignet und wurde deshalb in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Allerdings wurde die Sephadex LH-20-Chromatographie eingesetzt, um komplexe Produktgemische chemischer Synthesen zu fraktionieren (Kapitel 8.3.6). Es zeigte sich, dass dieses Verfahren insbesondere zur Aufreinigung von TriFS und TetraFS gegenüber der präparativen SEC oder RP-HPLC überlegen ist (Kapitel 4.2.2).

### 3.3.2 Totalsynthesen

Mittels Totalsynthese können komplexe Moleküle aus vergleichsweise einfach aufgebauten, kommerziell erhältlichen Vorgängersubstanzen erhalten werden. Der reversible Einsatz von Schutzgruppen findet oft Verwendung, um reaktive Gruppen zu inaktivieren,

damit spezifische Produkte mit höherer Ausbeute erhalten werden.

Die Totalsynthese von 8-O-4-DFS kann aus Vanillin und Coniferylaldehyd in neun Syntheseschritten erfolgen. Darunter sind das Einbringen von drei verschiedenen Schutzgruppen, die Kopplung der beiden Monomere, Abspaltung von Schutzgruppen, Bromierung, Eliminierung, Oxidation des Aldehyds und abschließend eine Verseifung (Ralph et al. 1994). 8-8(THF)-DFS kann in einem komplexen, mehrstufigen Syntheseweg erhalten werden, dessen Schlüsselschritt die Kopplung eines Zimtsäureesters mit einem  $\beta$ -Ketoester durch  $\text{Mn}(\text{OAc})_3$  ist (Schatz et al. 2006). Von sechs möglichen Diastereomeren entsteht bei dieser Reaktion lediglich das *cis-trans-trans*-Isomer, welches auch in Pflanzen das dominierende Diastereomer darstellt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass auch weitere Diastereomere existieren (Jilek und Bunzel 2013), für die bisher keine geeigneten Synthesen beschrieben wurden. Mouterde et al. (2013) publizierten eine Möglichkeit zur Totalsynthese von 5-5/8-O-4-TriFS aus Vanillin in zehn Schritten. Sie beinhaltet unter anderem eine enzymatische 5-5-Kopplung des Monomers, Verwendung von Acetyl- und *tert*-Butyl-Schutzgruppen, Kettenverlängerung mittels Wittig-Reaktion, Aldolkondensation, Eliminierung und die Abspaltung der Schutzgruppen.

Die drei beschriebenen Synthesewege beinhalten Reaktionsschritte unter speziellen Bedingungen wie beispielsweise Schutzgasatmosphäre, Temperaturen von  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  oder Lichtausschluss und Chemikalien mit hohem Gefahrenpotential. Somit sind gute Kenntnisse und Erfahrung in der organischen Synthesechemie sowie eine entsprechende Laborausstattung notwendig, um die Synthesen durchzuführen. Des Weiteren benötigen die Reaktionsschritte und die Aufreinigung der Zwischenprodukte viel Zeit und lassen Gesamtausbeuten von nur 15–20 % erwarten. Besonders bei der Gewinnung von  $^{13}\text{C}$ -markierten Standardsubstanzen führen die geringen Ausbeuten zu hohen Kosten, da bei diesen OFS der Einbau von  $^{13}\text{C}$ -Atomen innerhalb der ersten Reaktionsschritte erfolgen muss. Aus diesen Gründen wurden keine Totalsynthesen durchgeführt.

### 3.3.3 Chemische Kopplung von Monomeren der Ferulasäure

Phenoxyradikale, die *in planta* durch Peroxidase und  $\text{H}_2\text{O}_2$  entstehen (Abbildung 10, Kapitel 1.4.2), können auch chemisch durch verschiedene Eielektronenüberträger gebildet werden. Besonders Silber-, Kupfer- und Eisenionen sind dafür bekannt, diese Reaktionen zu katalysieren, da sie mehrere stabile Oxidationsstufen besitzen. Werden jedoch phenolische Säuren in ihrer freien Form eingesetzt, kommt es unter den oxidativen Bedingungen verstärkt zu Decarboxylierungen (Jin et al. 2010). Aus diesem Grund werden häufig Ethylester verwendet, die wie in Kapitel 8.3.2 beschrieben nach Fiesers Methode synthetisiert werden können (Fieser und Fieser 1967).

In einem von Ralph et al. (1994) beschriebenen oxidativen System aus  $\text{Ag}_2\text{O}$  in Aceton koppelt Ethylferulat nach 2–3 h zu etwa 30 % 8-5-verknüpfter DFS, aber auch zu anderen Di- und Trimeren. In einem weiteren System werden  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen durch Komplexbildung mit Tetramethylethyldiamin (TEMED) in organischem Lösungsmittel gelöst, um Ethylferulat zu Phenoxylradikalen zu oxidieren. Auch hier entstehen Ester verschiedener FS-Oligomere, wobei unter den Dimeren 5-5- und 8-8(c)-gekoppelte Ethylferulate überwiegen (Lu et al. 2012). Denkbar wäre auch ein oxidatives System mit Eisen-Ionen, die auf unterschiedliche Art komplexiert werden können. Mittels wasserlöslichem Eisen-Porphyrin-Komplex wurden bereits verschiedene Hydroxymethylsäuren, allerdings nicht FS, oxidativ gekoppelt (Šmejkalová und Piccolo 2006). Tobinaga und Kotani (1972) konnten mittels Eisen-Dimethylformamid-Komplex FS mit einer Ausbeute von 35 % zum 8-8-gekoppelten Dilakton umsetzen, das weiter zu 8-8(c)- und 8-8(nc)-DFS umgesetzt werden kann (Ralph et al. 1994).

Die Ausbeuten und die Verteilung der Regioisomere können bei den chemischen Koppelungsreaktionen maßgeblich über die Reaktionsbedingungen beeinflusst werden. Modifikationen können in der Art des verwendeten FS-Esters, des Lösungsmittels, der Menge an Oxidationsmittel, der Reaktionszeit und -Temperatur vorgenommen werden, um beispielsweise bestimmte Koppelungsprodukte bevorzugt zu erhalten oder um das Verhältnis von Dimeren zu höheren Oligomeren zu beeinflussen (Ralph et al. 1992; Lu et al. 2012). Die Bildung von 4-O-5-Koppelungsprodukten ist energetisch ungünstiger als 8-5-, 8-O-4-, 5-5- und 8-8-Kopplungen. Deshalb können aus FS-Estern keine 4-O-5-Koppelungsprodukte gebildet werden. Erst wenn durch Verwendung von Vanillin oder Vanillylalkohol keine Kopplung über Position C8 möglich ist, kann mittels  $\text{Ag}_2\text{O}$  die 4-O-5-Kopplung stattfinden (Ralph et al. 1994). Die Umsetzung des Divanillins zur DFS kann anschließend wie in Kapitel 3.1.1 für Zimtsäuren beschrieben erfolgen.

In dieser Arbeit wurde das von Lu et al. (2012) publizierte oxidative System, welches den  $\text{Cu}[\text{TEMED}]$ -Komplex enthält, verwendet, da in dieser Reaktion ein ausgewogenes Produktspektrum an 8-8-, 8-5-, 8-O-4- und 5-5-gekoppelten Dimeren entsteht. Außerdem führt diese Reaktion aufgrund des verwendeten organischen Lösungsmittels zur Bildung von TriFS und höheren Oligomeren. Die Untersuchung einiger Reaktionsparameter ergab, dass die höchsten Ausbeuten unter Verwendung von katalytischen Mengen des  $\text{Cu}$ -TEMED-Komplexes unter Regeneration mit  $\text{O}_2$  nach 16 h in ACN erzielt wurden. Zur Aufreinigung des komplexen Produktgemisches wurde eine Kombination aus Umkristallisation sowie Flash-, Sephadex LH-20- und RP-Chromatographie entwickelt (Kapitel 4.2.2). In einer weiteren Reaktion, in der  $[9\text{-}^{13}\text{C}]$ Ethylferulat verwendet wurde, konnten mit dem optimierten Verfahren zweifach  $^{13}\text{C}$ -markierte DFS und dreifach  $^{13}\text{C}$ -markierte TriFS gewonnen werden (8.3.6). Des Weiteren wurde das Verfahren nach Ralph et al. (1994) verwendet, um 4-O-5-DFS zu synthetisieren. Abweichend zur Literatur wurde jedoch getestet, ob das 4-O-5-gekoppelte Divanillin wie in Kapitel 8.3.5 beschrieben auch mittels

Knoevenagel-Reaktion zu 4-O-5-DFS umgesetzt werden kann, die in einem Reaktionsschritt erfolgt (Abbildung 13).

### 3.3.4 Enzymatische Kopplung von Monomeren der Ferulasäure

Verschiedene Peroxidasen und mit geringerer Effektivität auch Laccasen können Ferulate zu OFS oxidieren (Wallace und Fry 1999; Carunchio et al. 2001). Auch bei der enzymatischen Oxidation treten bei Verwendung der freien FS Decarboxylierungsreaktionen auf (Liu et al. 2005), weshalb die Verwendung von FS-Estern besser geeignet ist. Dabei ist zu beachten, dass die Enzyme für eine ausreichende Aktivität einen hohen wässrigen Anteil im Reaktionsmedium benötigen. Dadurch ist die Löslichkeit unpolarer FS-Ester begrenzt und wird durch die Kopplung zu Oligomeren noch weiter herabgesetzt. Wenn selektiv DFS erhalten werden sollen, ist diese Eigenschaft von Vorteil, da die gewünschten Produkte nicht für weitere Reaktionen zu Verfügung stehen. So können beispielsweise FS-Ethylester in wässriger Pufferlösung durch Peroxidase und  $H_2O_2$  mit hoher Ausbeute zu Dimeren umgesetzt werden. Hierbei entstehen vergleichbar zu den natürlichen Gegebenheiten bevorzugt 8-5-Kopplungen (Ralph et al. 1998; Aljawish et al. 2014).

Zur Synthese höherer Oligomere muss das Reaktionsmedium einen ausreichenden Anteil an organischem Lösungsmittel beinhalten, damit die dimeren Zwischenprodukte in Lösung bleiben. So können aus Ethylferulat durch einen Anteil von 30 % Ethanol verschiedene Trimere und Tetramere generiert und isoliert werden (Bunzel et al. 2008b). Allerdings sinkt mit steigendem Anteil an organischem Lösungsmittel die Aktivität und Stabilität der Enzyme. Eine weitere Möglichkeit ist die Veresterung von FS mit einer ausreichend polaren Verbindung, um die Dimere in Lösung zu halten.

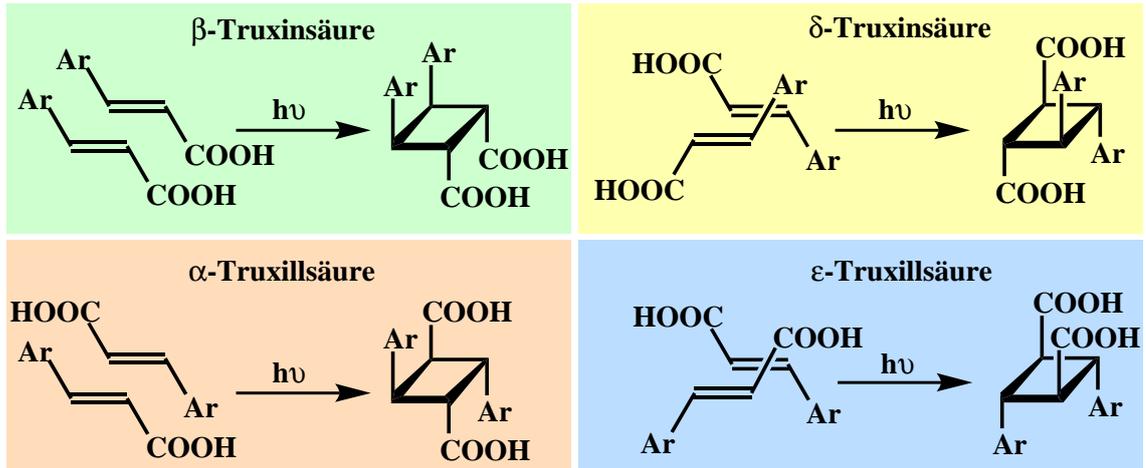
Wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei der biomimetischen Reaktion nach Ralph et al. (1998) geringe Mengen an 8-8(THF)-DFS entstehen. Da die Gewinnung dieser DFS bisher nur mittels Totalsynthese oder Isolierung aus Maiskleie beschrieben wurde (Schatz et al. 2006; Jilek und Bunzel 2013), wurde die Gewinnung mittels enzymatischer Kopplung von Ferulaten als mögliche Alternative untersucht. In Übereinstimmung zu den Reaktionsmechanismen des 8-8-gekoppelten Chinonmethid-Intermediates (Kapitel 1.4.2) wurde gezeigt, dass der Anteil an 8-8(THF)-DFS durch niedrige pH-Werte gesteigert werden kann. Allerdings verringert sich dadurch die Enzymaktivität und -stabilität der verwendeten Peroxidase. In einer wässrigen Pufferlösung mit einem pH-Wert von 2,5 wurden die höchsten Ausbeuten an 8-8(THF)-DFS detektiert. Deshalb wurden diese Bedingungen für folgende Reaktionen verwendet, um nach entsprechender Aufreinigung 8-8(THF)-, 8-5- und 8-O-4-gekoppelte DFS bzw. ihre  $^{13}C_2$ -markierten Isotopologen zu erhalten (Kapitel 8.3.7).

### 3.3.5 Photochemische Synthesen von Ferulasäure-Cyclobutandimeren

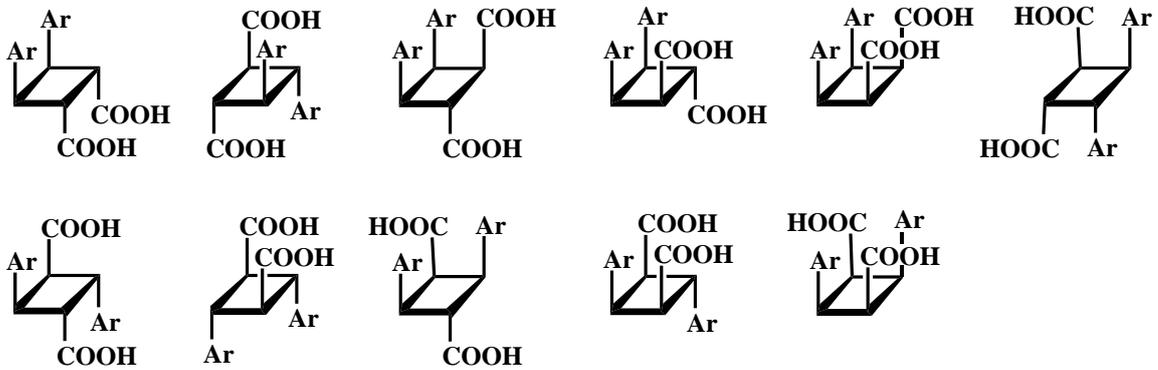
FS-CBD können erhalten werden, indem FS mit Licht bestrahlt wird. Die [2+2]Cycloadditionsreaktion kann allerdings nur stattfinden, wenn die Monomere in einer Kristallstruktur vorliegen, bei der die Doppelbindungen parallel zueinander angeordnet sind und einen Abstand von maximal 4,2 Å zueinander haben (Schmidt 1964). Untersuchungen an Zimtsäure und substituierten Zimtsäuren zeigten, dass die  $\alpha$ -Kristallmodifikation, in der die Moleküle antiparallel zueinander angeordnet sind, zu  $\alpha$ -Truxillsäuren dimerisieren wohingegen die parallele Ausrichtung in der  $\beta$ -Struktur zu  $\beta$ -Truxinsäuren führt.  $\gamma$ -Kristallstrukturen sind photoinaktiv. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass je nach Substitution der Zimtsäure unterschiedliche Kristallstrukturen gebildet werden können, aber auch das Lösungsmittel, aus dem kristallisiert wird, und die Temperatur einen Einfluss auf die Kristallstruktur haben (Schmidt 1964; Atkinson et al. 2003; Fonseca et al. 2008).

Die unterschiedlichen Kristallstrukturen und damit verbundenen photochemischen Reaktionen der FS sind vergleichsweise wenig erforscht und die Produktspektren der in der Literatur beschriebenen Versuche teilweise unterschiedlich. Ford und Hartley (1989) fanden beispielsweise nach Bestrahlung von FS ein CBD des Truxillsäuretyps, während Morrison et al. (1991) sowohl eine Truxill- als auch eine Truxinsäure fanden. Packert und Steinhart (1995) identifizierten sogar sechs verschiedene FS-CBD nach Bestrahlung von FS. Grund für die unterschiedlichen Produktspektren könnte sein, dass manche Kristallstrukturen metastabil sind und sich während der langen Bestrahlungszeiten in eine stabilere Anordnung umlagern. Besonders wenn Lichtquellen mit hoher Wärmeeinstrahlung benutzt werden, kann sich das Kristallgitter ändern und zu anderen Produkten führen. Eine weitere Ursache kann im Vorhandensein von *cis*-FS im Kristallgitter liegen. Wird nur *trans*-FS auskristallisiert, können maximal vier verschiedene CBD entstehen (Abbildung 15). Ist dagegen auch *cis*-FS vorhanden, die in Lösung aus *trans*-FS gebildet werden kann, steigt die Zahl der möglichen Stereoisomere auf elf (Abbildung 16, Hartley et al. 1990).

Die in der Literatur beschriebenen Photodimerisierungen von FS haben eine relativ geringe Reaktionsrate von bestenfalls 50 % Umsatz nach 480 h im Vergleich zu *p*-CS, die schon nach wenigen Stunden fast vollständig dimerisiert (Morrison et al. 1992). Grund dafür sind wahrscheinlich die Kristallstrukturen der FS, in der die Doppelbindungen der Monomere ungünstiger für die [2+2]Cycloaddition angeordnet sind. Ichikawa et al. (2004) konnten zeigen, dass durch die Herstellung verschiedener Derivate der FS eine veränderte Ausrichtung der Doppelbindungen im Kristall erzwungen werden kann. Dadurch kann die Reaktionsrate auf bis zu 98 % Umsatz in 72 h gesteigert werden und bestimmte Stereoisomere können selektiv erhalten werden. Die Reaktionsrate kann außerdem gesteigert werden, indem in einem photochemischen Reaktor durch Suspension der Kristalle in



**Abbildung 15:** Die Stereoisomerie der Cyclobutandimere, die nach Bestrahlung von *trans*-Ferulasäure (Ar = 4-Hydroxy-3-methoxyphenyl) entstehen können, ist abhängig von deren Anordnung im Kristall. Vier Stereoisomere sind theoretisch möglich.



**Abbildung 16:** Mögliche Stereoisomere von Ferulasäure-Cyclobutandimeren (Ar = 4-Hydroxy-3-methoxyphenyl), die theoretisch durch Bestrahlung eines Gemisches aus *cis*- und *trans*-Ferulasäure entstehen können.

Hexan alle Oberflächen gleichmäßig bestrahlt werden. Durch die bessere Temperaturkontrolle und den Ausschluss von O<sub>2</sub> finden im Vergleich zur direkten Bestrahlung potentiell weniger Nebenreaktionen statt.

Da ein solcher photochemischer Reaktor nicht zur Verfügung stand, wurde FS in der vorliegenden Arbeit in einer Kristallisierschale als dünne Schicht auskristallisiert und mit einer Halogenlampe (1000 W) bestrahlt. In regelmäßigen Abständen wurden die Substanzen gelöst und neu auskristallisiert, da nur die Moleküle an der Oberfläche zur Reaktion befähigt sind. In einer analogen Reaktion wurde [9-<sup>13</sup>C]FS bestrahlt, um zweifach <sup>13</sup>C-markierte CBD zu erhalten (Kapitel 8.3.9). Um verschiedene Konstitutions- und Konfigurationsisomere zu erhalten, wurde der Einfluss des Lösungsmittels, in dem FS auskristallisiert wird, untersucht sowie unterschiedliche FS-Derivate hergestellt und der photochemischen Reaktion unterzogen. Zur Derivatisierung wurden Ethyl-, Nitrophenyl-, Tosyl-, Trimethylsilyl-, Acetat- und Glycosyl-Gruppen gewählt, da diese nach erfolgrei-

cher Photodimerisierung unter alkalischen oder sauren Bedingungen hydrolysiert werden können. Während die meisten Synthesen zur Gewinnung dieser Derivate mit einem geringen Zeit- und Arbeitsaufwand durchführbar sind (Kapitel 8.3.8), ist die Synthese von FS-Glycosiden aufwendiger. 1-O-Feruloyl- $\beta$ -D-glucose-tetraacetat kann mittels Nucleophiler Substitution ( $S_N2$ ) aus 1-Brom- $\alpha$ -D-glucose-tetraacetat und FS gebildet werden (Shimotori et al. 2012). Die Acetyl-Schutzgruppen sind dabei notwendig, um eine intermolekulare Reaktion von 1-Brom- $\alpha$ -D-glucose zu verhindern. Allerdings ist die selektive Abspaltung der Acetylgruppen von 1-O-Feruloyl- $\beta$ -D-glucose-tetraacetat problematisch, da die Spaltung der Esterbindung zwischen FS und Glucose verhindert werden muss (Zhu und Ralph 2011). Somit können klassische Verseifungsbedingungen nicht angewandt werden. Gokhale (2011) beschreibt eine Reaktion, bei der eine selektive Deacetylierung von 1-O-Feruloyl- $\beta$ -D-glucose-tetraacetat durch milde ammoniakalische Bedingungen möglich ist. Eine weitere Möglichkeit zur Synthese von 1-O-Feruloyl- $\beta$ -D-glucose wurde von Zhu und Ralph (2011) vorgestellt. Dabei werden anstelle von Acetylgruppen Chloracetylgruppen als Schutzgruppen der Glucose verwendet, welche aufgrund der hohen Elektronegativität von Chlor unter alkalischen Bedingungen deutlich leichter abgespalten werden als Acetylgruppen. Da dieser Reaktionsweg jedoch aus mehreren aufwendigen Reaktionsschritten besteht, wurde in dieser Arbeit kommerziell erhältliches 1-Brom- $\alpha$ -D-glucose-tetraacetat mit FS umgesetzt und anschließend in wässrig-ethanolischer  $NH_3$ -Lösung deacetyliert (Kapitel 8.3.8).

Eine Schwierigkeit bei der Analyse von CBD ist die Identifizierung der synthetisierten oder natürlich vorkommenden Substanzen. Die Unterscheidung zwischen Truxill- und Truxinsäuren ist mittels *GC-Electron Impact* (EI)-MS möglich, da durch die hohe Ionisierungsenergie jeweils spezifische Fragmente entstehen. Stilben- und Dicarboxylat-Fragmente ( $m/z$  416 und 260 nach Trimethylsilylierung) können nur durch asymmetrische Spaltung der Truxinsäuren entstehen. Fragmente, die durch die McLafferty-Umlagerung gebildet werden ( $m/z$  586, 469 und 441 nach Trimethylsilylierung), sind dagegen bei Truxillsäuren etwa fünffach intensiver zu detektieren als bei Truxinsäuren (Morrison et al. 1991; Stewart et al. 1992). GC-EI-MS-Messungen haben allerdings den Nachteil, dass die Unterscheidung zwischen FS- und *p*-CS-CBD bzw. dem Heterodimer aus FS und *p*-CS nicht immer eindeutig ist, da FS-CBD unter Abspaltung einer Methoxygruppe fragmentieren. Diese Unterscheidung kann beim Einsatz einer mildereren Ionisationstechnik wie der chemischen Ionisation oder der Verwendung einer LC-ESI-MS gemacht werden, bei der aufgrund der geringen Fragmentierung wiederum nicht zwischen Truxill- und Truxinsäuren unterschieden werden kann.

Die Konfiguration kann theoretisch über die Karplus-Beziehung ermittelt werden. Die Karplus-Kurve beschreibt die Korrelation von Diederwinkeln der Protonen und ihren Kopplungskonstanten in  $^1H$ -NMR-Experimenten. Aufgrund der Signal-Überlagerung von jeweils zwei Protonen, die jeweils durch zwei benachbarte Protonen aufgespalten sind,

können die Kopplungskonstanten dieser Protonen jedoch nicht ohne weiteres ermittelt werden (Morrison et al. 1992). Eine zuverlässige Bestimmung der absoluten Konfiguration bietet die Röntgenstrukturanalyse. Durch die Beugung von Röntgenstrahlen, mit denen ein Einkristall bestrahlt wird, können die Abstände und Winkel einzelner Atome berechnet werden, woraus dann die Molekülstruktur abgeleitet werden kann. In dieser Arbeit wurde die absolute Molekülstruktur eines synthetisierten FS-CBD mittels Röntgenstrukturanalyse bestimmt. Die Kristallisation und Messung wurden in Kooperation mit den Novartis Institutes for BioMedical Research in Basel durchgeführt und ausgewertet.

### 3.4 METHODEN ZUR BESTIMMUNG VON OLIGOFERULASÄUREN

#### 3.4.1 Isolierung von Ballaststoffen

Ballaststoffe, welche mit Ausnahme von Strukturproteinen alle wesentlichen Zellwandpolymere weitgehend enthalten, können in die Fraktionen UBS, LBS und niedermolekulare Ballaststoffe eingeteilt werden. Diese Einteilung basiert nicht auf strukturellen Eigenschaften der Bestandteile, sondern auf der Löslichkeit in wässriger Pufferlösung bzw. 80 %igem Ethanol. Die Fraktionen werden entweder gravimetrisch bestimmt (für analytische Zwecke) oder im präparativen Maßstab aus Pflanzenmaterialien isoliert, um sie für weitere Untersuchungen zu verwenden. Im präparativen Maßstab wird zum Abbau der Stärke eine thermostabile  $\alpha$ -Amylase und eine Inkubationstemperatur von 92 °C verwendet, wodurch auch resistente Stärken hydrolysiert werden, die eigentlich zum Ballaststoffkomplex gehören (AOAC 985.29). Da resistente Stärken jedoch keine FS beinhalten, ist ihr Verlust bei der Untersuchung der OFS akzeptabel. Zur analytischen Ballaststoffbestimmung wird im Unterschied zur präparativen Ballaststoffisolierung eine Pankreas  $\alpha$ -Amylase in Kombination mit realeren Inkubationsbedingungen verwendet, um die physiologischen Gegebenheiten des Gastrointestinaltraktes besser nachzustellen und resistente Stärken mitzufassen (McCleary et al. 2015).

Sowohl bei der präparativen als auch der analytischen Methode werden zunächst Stärke und Proteine teilweise enzymatisch gespalten und entfernt. Der in wässrigem Puffer unlösliche Rückstand bildet die UBS. Die durch Ausfällen in 80 %igem Ethanol aus dem Überstand gewonnene Fraktion bildet die LBS. Oligosaccharide, die unter diesen Bedingungen löslich sind, werden als niedermolekulare Ballaststoffe klassifiziert. Da die UBS und LBS noch Restproteine und Mineralstoffe enthalten, müssen diese Komponenten nachträglich bestimmt werden, um die gravimetrisch bestimmten Ergebnisse entsprechend zu korrigieren. Der Restproteingehalt wird meist über den Stickstoffgehalt im sauren Aufschluss nach Kjeldahl ermittelt. Der Stickstoffgehalt kann über verschiedene Methoden wie beispielsweise titrimetrisch, photometrisch oder mittels Ammoniumselektiver Elektrode bestimmt werden (Willis et al. 1996; Khanizadeh et al. 1995). Über einen Faktor, der abhängig von der Aminosäurezusammensetzung des Proteins ist, kann

anschließend der Proteingehalt berechnet werden. Bei unbekannter Proteinzusammensetzung wird historisch der Faktor 6,25 verwendet. Zur Bestimmung des Aschegehaltes kann die Probe bei hohen Temperaturen (in der Regel 625 °C) verascht und der Rückstand ausgewogen werden.

In dieser Arbeit wurden die UBS von Apfel, Amaranth, Zuckerrübe, Mais und Weizen verwendet (Tabelle 2). Diese bereits in anderen Arbeiten detailliert charakterisierten Probenmaterialien wurden einerseits ausgewählt, da sie unterschiedliche Zellwandzusammensetzungen besitzen (Wefers 2016; Schendel 2016). Die Zellwände von Mais und Weizen besitzen hohe Mengen an Arabinoxylanen und entsprechen der Zusammensetzung von Typ-II-Zellwänden, während Zuckerrübe und Amaranth Typ-I-Zellwände mit hohen Pektin-Anteilen besitzen. Des Weiteren war für die Methodenentwicklung von Vorteil, dass sowohl Proben mit hohen als auch niedrigeren FS- und OFS-Gehalten verwendet wurden, was anhand von Literaturdaten abgeschätzt werden konnte (Dobberstein und Bunzel 2010b; Jilek und Bunzel 2013).

**Tabelle 2:** Übersicht über die in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten Pflanzenproben.

Pflanze	Gewebe	botanischer Name
Apfel	Fruchtfleisch	<i>Malus domestica</i> cv. Braeburn
Amaranth	Samen	<i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.
Zuckerrübe	Schnitzel nach Extraktion	<i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i>
Mais	Karyopsen	<i>Zea mays</i> L. var. <i>evarta</i>
Weizen	Karyopsen	<i>Triticum aestivum</i> L.

Apfel gehört zur Ordnung Rosales (Rosenartige) und besitzt eine mit Zuckerrübe und Amaranth vergleichbare Zellwandzusammensetzung, jedoch keine polysaccharidgebundene FS (Wefers 2016). Somit stellen die UBS von Apfel eine geeignete Leermatrix für Typ-I-Zellwände dar, die in der Methodvalidierung verwendet wurde (Kapitel 4.5). Native Typ-II-Zellwände enthalten dagegen immer auch zellwandgebundene FS, weshalb ein Gemisch aus Cellulose und Xylan (1:1) als Typ-II-Zellwandimitat verwendet wurde (Jilek und Bunzel 2013). Die UBS der in Tabelle 2 aufgelisteten pflanzlichen Materialien wurden im präparativen Maßstab unter Verwendung von thermostabiler  $\alpha$ -Amylase isoliert. Auf die Verwendung einer teureren Pankreas  $\alpha$ -Amylase sowie die Korrektur auf Restprotein- und Aschegehalte wurde verzichtet.

### 3.4.2 Freisetzung von Oligoferulasäuren

Die Freisetzung der estergebundenen phenolischen Substanzen ist durch saure Hydrolyse mittels  $H_2SO_4$  oder HCl möglich. Dies hat jedoch den Nachteil, dass die Esterbindungen bei zu geringer Säurekonzentration nicht vollständig gespalten werden und bei einer zu hohen Säurekonzentration die freigesetzten Moleküle nicht stabil sind (Barberousse et al.

2008). Auch durch eine enzymatische Hydrolyse unter Verwendung von Esterasen können selbst in Kombination mit Xylanasen und Pectinasen aufgrund der Substratspezifität und der schlechten Zugänglichkeit der Esterasen die phenolischen Säuren nur unvollständig freigesetzt werden (Andreasen et al. 1999). Insbesondere die Freisetzung von FS-Oligomeren kann durch Enzyme nur in geringem Ausmaß erreicht werden (Kroon et al. 1999). Deshalb hat sich zur Freisetzung von OFS die Verseifung mit 2 M NaOH für 18–24 h bei Raumtemperatur durchgesetzt (Parker et al. 2005), die auch in dieser Arbeit verwendet wurde. Die Verseifung muss unter Lichtausschluss und Abwesenheit von Luftsauerstoff durchgeführt werden, um Isomerisierungs- und Oxidationsreaktionen zu vermeiden. Nach Ansäuern können die phenolischen Substanzen mit Diethylether oder Ethylacetat extrahiert werden (Dobberstein und Bunzel 2010a; Jilek und Bunzel 2013).

Eine zusätzliche Probenaufarbeitung ist durch Extraktion in wässrige 5 %ige NaHCO<sub>3</sub>-Lösung möglich. Aufgrund des leicht alkalischen pH-Wertes werden Carbonsäuren deprotoniert und liegen bevorzugt in der wässrigen Phase vor, wohingegen andere phenolische Substanzen in der organischen Phase verbleiben. Nach Ansäuern können die phenolischen Säuren wieder mit Diethylether oder Ethylacetat extrahiert werden. Da diese Prozedur relativ zeitaufwendig ist, wurde sie in dieser Arbeit ausschließlich in Zusammenhang mit der Methode zur Summenbestimmung von OFS durchgeführt (Kapitel 4.7), da hier von einem störenden Einfluss der Matrix ausgegangen wurde.

### 3.4.3 Bestimmung von Oligoferulasäuren

Zur Bestimmung der OFS sind in den letzten Jahren verschiedene Methoden entwickelt worden. Bei den meisten Methoden wird 5-5(me)-DFS als interne Standardsubstanz verwendet. Diese ist im Vergleich zu 5-5-DFS (Abbildung 11) an einer der phenolischen Gruppen methyliert (me). 5-5(me)-DFS kommt nicht natürlicherweise in Pflanzenzellwänden vor und besitzt ähnliche chemische Eigenschaften wie die OFS, kann aber chromatographisch von diesen getrennt werden (Zeller und Schatz 2015). Zunächst wurden Trennungen mittels GC bevorzugt, da sich die GC durch eine hohe chromatographische Auflösung auszeichnet. Somit können die einzelnen Substanzen gut voneinander getrennt und eine Coelution mit Matrixbestandteilen minimiert werden, sodass die Detektion mittels Flammenionisationsdetektor (FID) erfolgen kann (Packert und Steinhart 1995; Renger und Steinhart 2000; Grabber et al. 2000; Bunzel et al. 2001). Oft wird bei diesen Methoden die Identität der Analyten durch den Einsatz eines MS-Detektors bei gleichen chromatographischen Bedingungen bestätigt (Micard et al. 1997). Die Quantifizierung mittels GC-MS hätte den Vorteil einer höheren Selektivität und Empfindlichkeit, wurde jedoch bisher nicht verwirklicht.

GC-Methoden haben den Nachteil, dass eine Derivatisierung – meist Trimethylsilylierung – notwendig ist, um eine ausreichende Flüchtigkeit der Substanzen zu erreichen. Die

Flüchtigkeit von TriFS und TetraFS ist jedoch auch nach Derivatisierung zu gering, weshalb diese Substanzen nicht mittels GC untersucht werden können. Deshalb wurden nach Entdeckung der TriFS HPLC-Methoden mit UV-Detektion entwickelt, die auch die Bestimmung der höheren Oligomere ermöglichen (Dobberstein und Bunzel 2010a). Dabei muss beachtet werden, dass die UV-Absorptionsmaxima von 8-8(THF)-DFS und den CBD aufgrund der fehlenden konjugierten Doppelbindung bei niedrigeren Wellenlängen liegen als die der anderen OFS. Des Weiteren kann die geringere chromatographische Auflösung dazu führen, dass einzelne Analyten durch Coelution anderer Substanzen überbestimmt werden. Selektiver und oft auch empfindlicher ist die Verwendung eines Massenspektrometers als Detektor. Dabei ist die Bildung negativ geladener Quasimolekülonen aufgrund der Carbonsäuregruppen in der Regel empfindlicher (Grúz et al. 2015; Jilek und Bunzel 2013), wohingegen positiv geladene Quasimolekülonen gebildet werden können, um anhand spezifischer Fragmente unterschiedliche Regioisomere zu identifizieren (Vismeh et al. 2013). Allerdings können bei MS-basierten Detektionsarten Ionensuppressionseffekte zu fehlerhaften Bestimmungen führen, wenn weiche Ionisationsmethoden und keine isopenmarkierten Standardsubstanzen verwendet werden.

Zur Untersuchung von CBD sind in der Literatur ausschließlich GC-Methoden aufgeführt (Dobberstein und Bunzel 2010a; Packert und Steinhart 1995; Turner et al. 1993). Grund dafür sind die vielen möglichen Regio- und Stereoisomere, deren Molekülstruktur zu ähnlich für eine ausreichende chromatographische Trennung mittels HPLC ist. Nach Entdeckung der DFS ging das Interesse an CBD stark zurück, sodass bisher keine Methode zur Quantifizierung aller natürlich vorkommenden CBD zur Verfügung steht. Dies liegt auch an der Schwierigkeit, die verschiedenen Stereoisomere als Standardsubstanzen zu gewinnen (Kapitel 3.3.5). Deshalb können die bestehenden qualitativen Methoden nicht zu quantitativen Zwecken genutzt werden (Dobberstein und Bunzel 2010a; Packert und Steinhart 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei LC-Diodenarraydetektor (DAD)-MS/MS-Methoden zur Bestimmung von OFS sowie FS und *p*-CS entwickelt, wobei die OFS mittels MS/MS und FS bzw. *p*-CS mittels DAD quantifiziert werden (Kapitel 8.5). Im Vergleich zu bestehenden Methoden zeichnen sich die neuen Methoden durch einige Vorteile aus. Zunächst wird durch die Verwendung eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers eine höhere Selektivität erreicht, da zuerst das Quasi-Molekülion  $[M-H]^-$  (bzw. das decarboxylierte Quasi-Molekülion  $[M-H-CO_2]^-$ ) und nach Fragmentierung ein spezifisches Fragmention selektiert und detektiert wird. Außerdem zeichnet sich die Detektion mittels MS/MS durch eine hohe Empfindlichkeit aus, da das Hintergrundsignal minimiert und somit das Signal/Rausch-Verhältnis verbessert wird. Wie in Kapitel 4.5.5.3 beschrieben, wurden Bestimmungsgrenzen von 5–50 ng/mL ermittelt, die im Vergleich zu LC-(Single-Quadrupol)-MS- bzw. LC-UV-Methoden um das 10–20-fache bzw. 60–80-fache niedriger sind (Dobberstein und Bunzel 2010a; Jilek und Bunzel 2013). Dadurch reichen geringe Pro-

benmengen für die Analyse aus bzw. geringe OFS-Gehalte können zuverlässig analysiert werden. Beispielsweise kann 4-O-5-DFS, die bisher aufgrund ihres geringen natürlichen Vorkommens in quantitativen Methoden oft vernachlässigt wird, mit den neuen Methoden bestimmt werden.

Ein weiterer Vorteil der entwickelten Methoden ist die größere Anzahl an Analyten, die mit diesen erfasst werden. Die Synthese und Isolierung geeigneter Standardsubstanzen (Kapitel 4.2) machte es möglich, dass insgesamt zehn Dimere und neun Trimere in die Methoden integriert wurden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Verseifung von Zellwänden mindestens drei verschiedene Konfigurationsisomere der 8-8(THF)-DFS freisetzt, die unter Verwendung eines bestimmten Massenübergangs als Summe bestimmt werden können (Kapitel 4.5.2). Mittels der entwickelten Methoden ist es außerdem möglich, neben bekannten TriFS auch die im Rahmen dieser Arbeit erstmals identifizierten 8-8(c)/5-5-, 8-8(nc)/8-O-4-, 5-5/8-8(nc)- und 5-5/8-8(c)-TriFS zu quantifizieren. Die Quantifizierung der *trans*- und *cis*-Isomere von FS und *p*-CS erfolgt mittels DAD, da Zellwände im Allgemeinen deutlich höhere Gehalte dieser Analyten im Vergleich zu OFS aufweisen. Diese würden bei der Detektion mittels MS/MS zu einer Signalsättigung führen, sofern die Probe nicht zusätzlich als Verdünnung gemessen wird. Dagegen können die Daten des weniger empfindlichen DAD, der außerdem über einen vergleichsweise großen linearen Bereich verfügt, zur Quantifizierung dieser Analyten verwendet werden. Dabei wird die interne Standardsubstanz *o*-Cumarsäure eingesetzt, die bereits in anderen Methoden zur Bestimmung von zellwandgebundenen phenolischen Säuren Verwendung fand (Gallardo et al. 2006; Jilek und Bunzel 2013).

Die Unterschiede der beiden entwickelten LC-DAD-MS/MS-Methoden liegen in der Wahl der internen Standardsubstanzen zur Bestimmung der OFS. Während bei einer der Methoden 5-5(me)-DFS als interne Standardsubstanz verwendet wird, basiert die Zweite auf der Verwendung von isotope markierten Standardsubstanzen, was dem Prinzip der SIVA entspricht. Daraus ergeben sich auch die Vor- und Nachteile der jeweiligen Methoden: Die Gewinnung von 5-5(me)-DFS kann mit wenigen Syntheseschritten in großen Mengen erfolgen (Kapitel 8.3.4), wohingegen die isotope markierten Standardsubstanzen in verschiedenen Reaktionen mit mehreren Aufreinigungsschritten durchgeführt werden müssen (Kapitel 8.3). Bei der Probenaufarbeitung hat die Methode mit 5-5(me)-DFS den Vorteil, dass (abgesehen von *o*-Cumarsäure zur Quantifizierung der Monomere) nur eine Substanz zugegeben werden muss. Allerdings hat sich gezeigt, dass die Zugabe einer einzigen, definierten Menge an 5-5(me)-DFS in der Regel nicht ausreicht, um den kalibrierten Bereich aller DFS und TriFS abzudecken. Aus diesem Grund ist die Zugabe von sowohl geringeren, als auch höheren Mengen an 5-5(me)-DFS nötig, was zu einer höheren Probenzahl führt. Dagegen kann bei der SIVA die Zugabe jeder einzelnen internen Standardsubstanz entsprechend angepasst werden. Den größten Vorteil bietet die SIVA jedoch durch den Ausgleich von Ionensuppressionseffekten, die je nach Matrix unterschiedlich

stark auftreten können. Auch Unterschiede im Extraktionsverhalten einzelner Analyten während der Probenaufarbeitung werden selektiv ausgeglichen.

Die Standardsubstanzen, die für die SIVA verwendet werden, setzen sich aus zweifach  $^{13}\text{C}$ -markierten Dimeren (Ausnahme [ $^{13}\text{C}$ ]8-5(dc)-DFS) und dreifach  $^{13}\text{C}$ -markierten Trimeren zusammen, bei denen jeweils die Carboxygruppen  $^{13}\text{C}$ -Atome besitzen. Die relativ geringe Anzahl an Isotopenmarkierungen wurde gewählt, da die entsprechenden Reaktanten günstiger sind und zudem ein geringerer chromatographischer Isotopenshift zu erwarten war. Die spektrale Überlappung durch das natürliche  $^{13}\text{C}$ -Vorkommen ist trotz des geringen Massenunterschieds von Analyten und Standardsubstanzen vergleichsweise gering, da die meisten Analyten unter einer Decarboxylierung fragmentieren und somit nur Analyten mit natürlichen Carboxy- $^{13}\text{C}$ -Atomen als interne Standardsubstanz detektiert werden. Die Auswirkungen der geringen spektralen Überlappung werden in Kapitel 4.5.4.2 beschrieben.

#### 3.4.4 Methoden zur Summenbestimmung von Oligoferulasäuren

Oft ist zur Beurteilung von Pflanzenmaterialien eine Unterscheidung der einzelnen DFS bzw. TriFS nicht nötig, sondern lediglich entscheidend, wie hoch der Gesamtgehalt an DFS und TriFS ist. Die Quantifizierung jeder einzelnen Substanz ist mit einem hohen analytischen Aufwand verbunden, der durch Methoden zur Summenbestimmung eventuell verringert werden kann. Ein weiterer Vorteil wäre, dass auch solche CBD- und TriFS-Isomere miterfasst würden, die bisher aufgrund fehlender Standardsubstanzen nicht bestimmt werden können. Eine solche Methode ist für OFS bisher nicht bekannt. Theoretisch sind aber verschiedene Ansätze möglich, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden.

Zur quantitativen oder zumindest semiquantitativen Summenbestimmung von OFS muss ein System gefunden werden, bei dem sich alle Dimere bzw. Trimere gleich verhalten und sich dennoch von Matrixkomponenten unterscheiden lassen. Als eines der Kriterien kann das hydrodynamische Volumen dienen, das bei den verschiedenen Dimeren bzw. Trimeren vergleichbar ist. Die SEC kann deshalb verwendet werden, um die DFS und TriFS zu selektieren, ohne zwischen den unterschiedlichen Isomeren der Dimere bzw. Trimere zu differenzieren. Geeignete SEC-gekoppelte Detektoren müssen die Voraussetzung erfüllen, dass alle Dimere bzw. Trimere den selben oder zumindest einen vergleichbaren *Response*-Faktor (Signalintensität/injizierte Analytmenge) besitzen, da andernfalls über die Signalintensität keine Aussage über die Quantität der Analyten gemacht werden kann. Außerdem sollten eventuell coeluerende Matrixverbindungen möglichst nicht erfasst werden. Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass OFS bei Verwendung eines UV-Detektors unterschiedliche *Response*-Faktoren besitzen, was aufgrund der strukturellen Unterschiede der DFS und TriFS vorhersehbar war (Dobberstein und Bunzel 2010a). Ebenso resultiert die Verwendung von Brechungsindex- Lichtstreu- oder massenspektrometri-

schen Detektoren erfahrungsgemäß in substanzspezifischen *Response*-Faktoren, was zum Teil durch entsprechende Vorversuche bestätigt wurde. Allerdings stand im Arbeitskreis von Prof. Dr. Wilhelm, Institut für Technische Chemie und Polymerchemie ein Fourier-Transformations-Infrarot (FTIR)-Detektor zur Verfügung, dessen Verwendungsmöglichkeit für die Summenbestimmung von DFS und TriFS im Rahmen dieser Arbeit getestet wurde.

Bei der Infrarot (IR)-Spektroskopie werden elektromagnetische Wellen verwendet, die Schwingungen und Rotationen von Molekülen anregen. Im mittleren IR-Bereich mit Wellenzahlen von  $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$  werden dabei die Grundtöne von Bindungsschwingungen angeregt. Je nach Bindungstyp werden charakteristische Wellenzahlen absorbiert, sodass aus dem IR-Spektrum wichtige Strukturinformationen gewonnen werden können. Für Carbonylfunktionen, die die DFS bzw. TriFS als weitere Gemeinsamkeit besitzen, sind charakteristische Signale bei Wellenzahlen um  $1725\text{--}1680\text{ cm}^{-1}$  zu erwarten (Günzler und Gremlich 2003). Auch quantitative Bestimmungen sind mittels IR-Spektroskopie möglich, da die Absorption von IR-Strahlung bestimmter Wellenlängen proportional zur Konzentration der gelösten Substanz ist (Lambert-Beersches Gesetz).

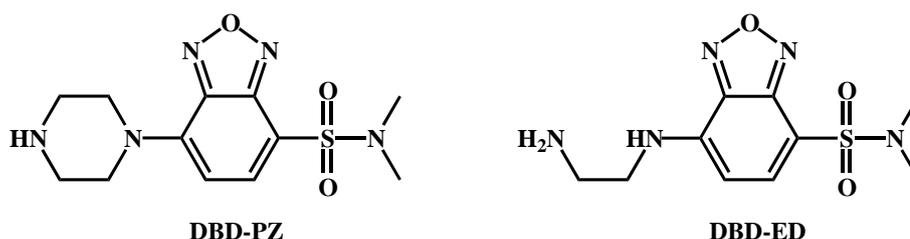
Bei der Kopplung von SEC und IR-Spektroskopie müssen aufgrund der unterschiedlichen Anforderungen einige Kompromisse getroffen werden. Zunächst sollte ein Lösungsmittel verwendet werden, das einerseits keine Wechselwirkungen zwischen den Analyten und dem Säulenmaterial der SEC zulässt, aber auch IR-inaktiv ist oder zumindest ein spektrales Fenster im verwendeten Wellenlängenbereich besitzt. Bei Verwendung von Styrol-Divinylbenzol-Copolymeren als stationäre Phase ist THF als mobile Phase besonders geeignet. THF weist im Bereich um  $1700\text{ cm}^{-1}$  ein spektrales Fenster auf, sodass ein geringes Grundsignal vorliegt (Günzler und Gremlich 2003). Für eine genaue Messung ist das Signal/Rausch-Verhältnis ein wesentlicher Faktor, das unter anderem von der Analytkonzentration abhängig ist. Demnach muss für die Messung eine möglichst hohe Probenmenge verwendet werden, die allerdings zu einer Überladung der SEC-Säule führen kann. Desweiteren kann das Signal/Rausch-Verhältnis gesteigert werden, indem mehrere Scans durchgeführt und die Interferogramme addiert werden. Dabei ist das Signal/Rausch-Verhältnis proportional zu  $\sqrt{n}$ , wobei die Anzahl der Interferogramme  $n$  bei der online-Kopplung durch die Peakbreite und damit unter anderem durch die Flussrate der SEC-Trennung begrenzt wird. Die Flussrate wiederum kann aufgrund von longitudinaler Diffusion (Van-Deemter-Gleichung) und längeren Analysezeiten nur begrenzt verringert werden.

Die Möglichkeit der Summenbestimmung von FS-Di- und -Trimeren mittels SEC-FTIR wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht (Kapitel 8.7). Dabei wurde ein Vertex 70 FTIR-Spektrometer der Firma Bruker verwendet, das im Arbeitskreis von Prof. Dr. Wilhelm, Institut für Technische Chemie und Polymerchemie in vielerlei Hinsicht modifiziert wurde,

um eine möglichst empfindliche Messung zu gewährleisten (Beskers et al. 2015).

Außerdem wurde eine weitere Möglichkeit zur Summenbestimmung von DFS und TriFS untersucht, bei der die Carbonsäuregruppen fluoreszenzderivatisiert und anschließend mittels SEC-Fluoreszenzdetektor (FLD) analysiert werden. Bei Verwendung eines Fluorophors, dessen  $\pi$ -Elektronensystem nicht durch das derivatisierte Molekül beeinflusst wird, sollten die verschiedenen DFS- bzw. TriFS-Derivate neben dem hydrodynamischen Volumen auch vergleichbare Fluoreszenzintensitäten aufweisen. Die Derivatisierung kann vor oder nach der chromatographischen Trennung stattfinden, wobei für eine Nachsäulenderivatisierung eine schnelle Derivatisierungsreaktion und ein größerer apparativer Aufwand nötig sind. Zur Derivatisierung von Carbonsäuren kommen verschiedene Reagenzien in Betracht, die entweder eine reaktive Gruppe besitzen, oder durch Kondensationsreagenzien aktiviert werden können. Möglich sind Bromalkyl-, Diazomethan-, Hydrazin-, Amin-, Alkohol- und Sulfonatereagenzien, wovon Aminreagenzien zu den häufigsten Fluoreszenzderivaten zählen (Toyo'oka 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in Abbildung 17 dargestellten Reagenzien 4-(*N,N*-Dimethylaminosulfonyl)-7-piperazino-2,1,3-benzoxadiazol (DBD-PZ) sowie 4-(*N,N*-Dimethylaminosulfonyl)-7-*N*-(2-aminoethyl)amino-2,1,3-benzoxadiazol (DBD-ED) getestet, die sich durch ein isoliertes Fluorophor, kommerzielle Verfügbarkeit, geringe Toxizität und eine hohe Stabilität der Reaktionsprodukte auszeichnen. Sie wurden bereits zur Bestimmung von Prostaglandinen (Toyo'oka et al. 1992), freien Fettsäuren (Toyo'oka et al. 1991; Ueno et al. 1999), Carbonsäuren des Citratzyklus (Kubota et al. 2005) und *N*-Acetylparaginsäure (Fukushima et al. 2008) verwendet. Als Kondensationsreagenzien wurden einerseits 2,2-Dipyridyldisulfid in Kombination mit Triphenylphosphan sowie Diethylcyanophosphonat untersucht (Breuer 2016).



**Abbildung 17:** Strukturen der in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzderivate. DBD-PZ: 4-(*N,N*-Dimethylaminosulfonyl)-7-piperazino-2,1,3-benzoxadiazol, DBD-ED: 4-(*N,N*-Dimethylaminosulfonyl)-7-*N*-(2-aminoethyl)amino-2,1,3-benzoxadiazol.



## 4.1 ENTWICKLUNG EINER METHODE ZUR BESTIMMUNG VON FERULA-SÄURE-METABOLITEN IN MILCH

Teile der im Folgenden vorgestellten Ergebnisse wurden bereits im *Journal of Agricultural and Food Chemistry* publiziert (Waterstraat et al. 2016b).

### 4.1.1 Synthese von Standardsubstanzen

Die Synthesen der  $^{13}\text{C}$ -markierten Zimt- und Phenylpropionsäuren sowie  $^{13}\text{C}_2$ Hippursäure wurden in wissenschaftlichen Abschlussarbeiten optimiert, sodass im Zuge dieser Arbeit die verfügbaren Bestände lediglich aufgefüllt wurden (Waterstraat 2014; Rosler 2014).  $[\text{D}_3]$ 3-Hydroxybenzoesäure und  $[\text{D}_2]$ 4-Hydroxybenzoesäure wurden mittels säurekatalysiertem H/D-Austausch aus 3-Hydroxybenzoesäure und 4-Hydroxybenzoesäure bei  $100\text{ }^\circ\text{C}$  erhalten (Kapitel 8.1.3). Da nach 48 h Reaktionszeit die Isotopenreinheit nur 90–95 % betrug, wurde die Reaktion im Falle von 3-Hydroxybenzoesäure dreimal und im Falle von 4-Hydroxybenzoesäure einmal wiederholt. Dadurch wurde  $[\text{D}_3]$ 3-Hydroxybenzoesäure mit einer Ausbeute von 85 % und einer Isotopenreinheit von 98 % bzw.  $[\text{D}_2]$ 4-Hydroxybenzoesäure mit einer Ausbeute von 89 % und einer Isotopenreinheit von 99 % gewonnen.  $[\text{D}_2]$ Phenyllessigsäure wurde durch basenkatalysierten H/D-Austausch der aliphatischen Protonen erhalten, die aufgrund der Keto-Enol-Tautomerie relativ acide sind (Kapitel 8.1.4). Die NaOD/ $\text{D}_2\text{O}$ -Lösung wurde unter Ausschluss von  $\text{O}_2$  für etwa 16 h bei  $100\text{ }^\circ\text{C}$  gerührt, anschließend mit DCl angesäuert und mit Ethylacetat extrahiert. Nach zwei Wiederholungen dieser Reaktion wurde  $[\text{D}_2]$ Phenyllessigsäure mit einer Ausbeute von 75 % und einer Isotopenreinheit von 96 % erhalten, die sich auch durch eine vierte Umsetzung nicht steigern lies.

Zur Herstellung von 3-Hydroxyhippursäure wurde ein Syntheseweg entwickelt, dessen zentraler Schritt in Analogie zur Synthese von Hippursäure eine Schotten-Baumann-Reaktion war (Kapitel 8.1.6). Die Gewinnung des 3-Hydroxybenzoesäurechlorides erforderte jedoch, dass die phenolische Gruppe zuvor mit einer Schutzgruppe versehen wird (Abbildung 14). NMR-Untersuchungen des trimethylsilylierten Zwischenprodukts zeigten, dass sowohl die phenolische, als auch die Carbonsäuregruppe vollständig derivatisiert und nur geringe Rückstände der eingesetzten Derivatisierungsreagenzien vorhanden waren. Die darauffolgende Umsetzung zum Carbonsäurechlorid durch Thionylchlorid wurde – um

dennoch mögliche Nebenreaktionen zu minimieren – in stöchiometrischem Verhältnis und unter langsamem Zutropfen bei 0 °C durchgeführt. Nach Entfernung des Lösungsmittels blieb ein öliger Rückstand zurück, der im Vergleich zum flüssigen Benzoesäurechlorid nicht direkt für die Schotten-Baumann-Reaktion verwendet werden kann. Nachdem Dichlormethan und Aceton als Lösungsmittel getestet und als ungeeignet bewertet wurden, wurde Toluol für die Zweiphasenreaktion gewählt, in dem der ölige Rückstand nach Sonifizieren eine feine Suspension bildete. Diese wurde tropfenweise bei 0 °C zur wässrigen Lösung aus Glycin und NaOH gegeben. LC-MS-Messungen nach Abspaltung der Schutzgruppen zeigten, dass ein großer Anteil des mutmaßlich gebildeten Säurechlorids mit Wasser reagierte, aber dennoch akzeptable Mengen an 3-Hydroxyhippursäure entstanden, die mittels präparativer HPLC mit einer Gesamtausbeute von 15 % isoliert wurden. Die Wiederholung der Synthese unter Verwendung von [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Glycin erbrachte eine Ausbeute von 28 %.

In einer analogen Reaktionsabfolge mit 4-Hydroxybenzoesäure wurde nach Abspaltung der Schutzgruppen neben geringen Anteilen unbekannter Nebenprodukte lediglich die Ausgangssubstanz detektiert. Dies weist darauf hin, dass entweder die Umsetzung zum Säurechlorid nicht stattgefunden hat oder das Säurechlorid in der Schotten-Baumann-Reaktion bevorzugt mit Wasser reagierte. Aus diesem Grund konnten 4-Hydroxyhippursäure bzw. [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]4-Hydroxyhippursäure nicht als Standardsubstanzen gewonnen werden, sodass die Bestimmung von 4-Hydroxyhippursäure nicht in die LC-MS/MS-Methode integriert werden konnte.

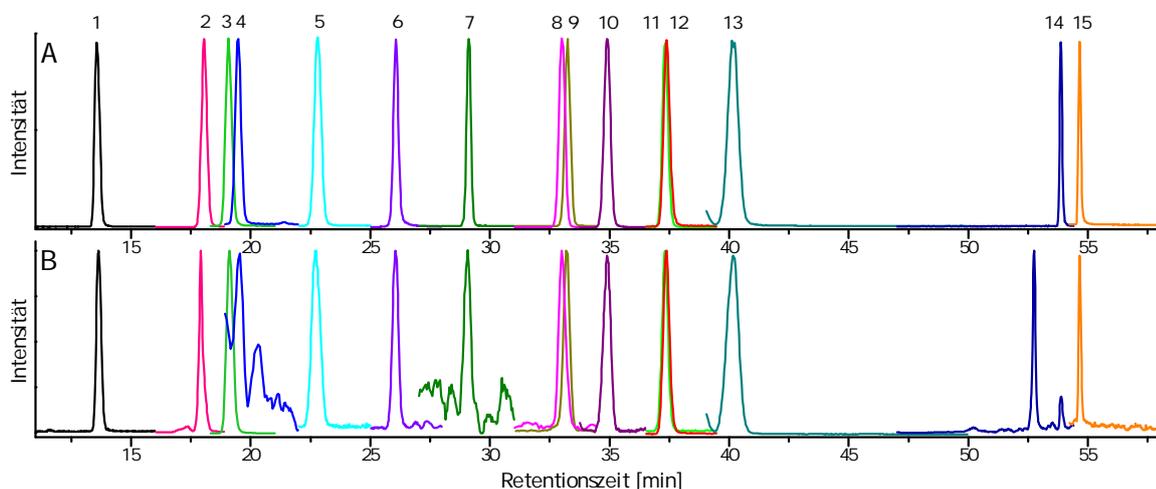
#### 4.1.2 Probenaufarbeitung nach QuEChERS

Vorversuche zur Extraktion der Analyten mittels QuEChERS-Methode wurden im Zuge einer wissenschaftlichen Abschlussarbeit durchgeführt (Rosler 2014). Ausgehend von einer Methode zur Extraktion von Pestiziden aus Milch wurden einige Parameter an die phenolischen Säuren angepasst (Lehotay et al. 2005). Zunächst wurden die Milchproben mit isotope markierten Standardsubstanzen versetzt, worauf eine Standzeit von mindestens 20 min folgte, damit die internen Standardsubstanzen potentielle Interaktionen mit Matrixkomponenten eingehen können. Von den internen Standardsubstanzen wurden Konzentrationen eingesetzt, die denen der jeweiligen Analyten möglichst ähnlich waren (Abweichungen um einen Faktor von maximal 10). Anschließend wurde der pH-Wert der Milchproben auf pH 1,5 eingestellt, um eine möglichst vollständige Extraktion der phenolischen Säuren zu gewährleisten. Die bei der QuEChERS-Extraktion typischerweise durchgeführte dispersive Festphasenextraktion mit primären und sekundären Aminen wurde ausgelassen, da diese zum Verlust der Analyten führen würde. Außerdem wurden die ACN-Phasen möglichst vollständig verwendet und vor der LC-MS/MS-Messung getrocknet. Die Zugabe von Methanol (MeOH):H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) zum getrockneten Extrakt resultierte bei manchen Proben in einer Phasentrennung. Deshalb wurden die Extrakte in

einem Gemisch aus MeOH, H<sub>2</sub>O und konzentrierter Salzsäure (250:50:1) gelöst, zentrifugiert und im Falle der Phasentrennung die organische Phase für die Messung verwendet. Mit Hilfe des Aufkonzentrierens wurde eine etwa 25-fach höhere Methodenempfindlichkeit im Vergleich zur Verwendung des unbehandelten Extraktes erhalten. Die höhere Empfindlichkeit ist unverzichtbar für die Quantifizierung einiger gering-konzentrierter Analyten bei Verwendung des in Kapitel 7.3 beschriebenen Massenspektrometers. Des Weiteren wurde eine optionale Enzyminkubation in die Methode integriert, sodass auch die im Phase-II-Metabolismus gebildeten Sulfat- und Glucuronid-Konjugate miterfasst werden können. Diese setzt sich aus einer Ansäuerung der Milch auf pH 4,9, gefolgt von einer 18-stündigen Inkubation mit Sulfatase/Glucuronidase bei 38 °C zusammen (Kapitel 8.2).

#### 4.1.3 Chromatographische und massenspektrometrische Parameter

Nach Variation der chromatographischen Bedingungen resultierte die Verwendung einer oberflächenporösen Phenyl-Hexyl-Säule bei Anwendung eines ternären Gradienten aus H<sub>2</sub>O, MeOH und ACN mit jeweils 0,01 % Ameisensäure in der besten Trennung (Kapitel 8.2) (Rosler 2014). Anhand des in Abbildung 18A dargestellten, kombinierten LC-MS/MS-Chromatogramms einer Lösung aus Standardsubstanzen ist ersichtlich, dass die Analyten Hippursäure (3) und 3,4-Dihydroxyphenylpropionsäure (4), 3-Hydroxyphenylpropionsäure (8) und Dihydroferulasäure (9) sowie Phenylelessigsäure (11) und Benzoesäure (12) coeluierten, von denen jedoch spezifische Massenübergänge ohne spektrale Überlappung aufgenommen wurden (Tabelle 3). Die Chromatogramme der unverdün-



**Abbildung 18:** Kombinierte HPLC-MS/MS-Chromatogramme einer Mischung aus Standardsubstanzen (A) und einer ökologisch erzeugten Milchprobe mit 3,8 % Fettgehalt (B), die sich aus Chromatogrammen verschiedener Massenübergänge zusammensetzen. Die Daten der 3-Hydroxyhippursäure (1) und Hippursäure (3) entstammen der Messung nach 1:100-Verdünnung. Weitere Analyten sind: 4-Hydroxybenzoesäure (2); 3,4-Dihydroxyphenylpropionsäure (4); 3-Hydroxybenzoesäure (5); Kaffeesäure (6); 4-Hydroxyphenylpropionsäure (7); 3-Hydroxyphenylpropionsäure (8); Dihydroferulasäure (9); *p*-Cumarsäure (10); Phenylelessigsäure (11); Benzoesäure (12); Ferulasäure (13); Phenylpropionsäure (14); und Zimtsäure (15).

ten Milch-Extrakte wiesen einen 2 min breiten Hippursäure-Peak (3) auf, der auf eine Überladung der Säule zurückzuführen war. Die chromatographische Trennung von 4-Hydroxybenzoesäure (2) und 3,4-Dihydroxyphenylpropionsäure (4) wurde dadurch nicht beeinflusst (Abbildung 18B). Zur Quantifizierung von Hippursäure mussten die Proben als Verdünnung gemessen werden, wobei auch 3-Hydroxyhippursäure aufgrund hoher Konzentrationen in dieser Verdünnung quantifiziert wurde.

Die Parameter der massenspektrometrischen Detektion wurden mittels Direktinjektion von Standardlösungen dahingehend optimiert, dass möglichst hohe Intensitäten bestimmter Fragmentationen entstehen (Abbildungen 44–47). Die innerhalb einer Messung konstanten Einstellungen sind in Tabelle 12 (Kapitel 8.2), die je nach Analyt variierenden Cone-Spannungen und Fragmentierungsenergien sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

**Tabelle 3:** Für die massenspektrometrische Detektion im *Multiple Reaction Monitoring*-Modus wurden je nach Analyt und interner Standardsubstanz (IS) spezifische Cone-Spannungen, Kollisionsenergien, Massenübergänge und Aufnahmezeiträume verwendet.

Analyt	Retentionszeit [min]	<i>m/z</i> Mutterion Analyt	<i>m/z</i> Quantifier Analyt	<i>m/z</i> Qualifier Analyt	<i>m/z</i> Mutterion IS	<i>m/z</i> Quantifier IS	<i>m/z</i> Qualifier IS	Cone Spannung [V]	Kollisionsenergie Spannung [V]	Aufnahmezeitraum [min]
3-Hydroxyhippursäure (1)	13,6	194	150	-	196	151	-	24	11	5,0–16,0
4-Hydroxybenzoesäure (2)	18,0	137	93	-	139	95	-	23	12	16,0–18,9
Hippursäure (3)	19,0	178	134	-	180	135	-	24	11	18,3–21,0
3,4-Dihydroxyphenylpropionsäure (4)	19,5	181	137	109	183	138	109	24	12	19,9–22,0
3-Hydroxybenzoesäure (5)	22,8	137	93	-	140	96	-	20	13	22,0–25,0
Kaffeesäure (6)	26,0	179	135	-	181	136	-	20	15	25,0–28,0
4-Hydroxyphenylpropionsäure (7)	29,1	165	93	121	167	93	122	27	13	27,0–31,0
3-Hydroxyphenylpropionsäure (8)	33,0	165	121	119	167	122	120	24	12	31,0–34,5
Dihydroferulasäure (9)	33,3	195	136	121	197	137	121	25	17	31,0–34,5
<i>p</i> -Cumarsäure (10)	34,9	163	119	-	165	120	-	20	14	33,7–36,5
Phenyllessigsäure (11)	37,4	135	91	-	137	93	-	15	7	36,5–39,5
Benzoessäure (12)	37,4	121	77	-	123	79	-	20	11	36,5–39,5
Ferulasäure (13)	40,2	193	134	178	195	135	180	22	15	39,0–50,0
Phenylpropionsäure (14)	53,9	149	105	-	151	106	-	24	11	47,0–54,4
Zimtsäure (15)	54,7	147	103	-	149	104	-	22	11	54,2–60,0

Die jeweils intensivsten Fragmente wurden als Quantifier verwendet. Zusätzlich konnte bei fünf Substanzen die Aufnahme von Qualifier-Übergängen verwirklicht werden, die neben der Retentionszeit zur eindeutigen Identifizierung der Analyten genutzt wurden. Dies war insbesondere bei Substanzen wichtig, die mehr als einen Peak im Chromatogramm aufwiesen (Abbildung 18B). Analog dazu wurden die Quantifier- und Qualifier-Übergänge der isotopenmarkierten Standardsubstanzen ermittelt, die jeweils der gleichen Fragmentierung entsprachen. Die Aufnahmezeiträume wurden so gewählt, dass maximal acht Massenübergänge parallel gemessen werden, wodurch mindestens 12 Datenpunkte pro Peak erhalten wurden (Tabelle 3).

#### 4.1.4 Kalibrierung

Die Kalibrierung dieser Methode erfolgte, indem für die Analyten und internen Standardsubstanzen unabhängige Kalibriergleichungen erstellt wurden. Hierbei wurden in jedem Kalibrierpunkt jeweils gleiche Konzentrationen an Analyt und isotoopenmarkierter Standardsubstanz eingesetzt. Um die Konzentration des jeweils niedrigsten Kalibrierpunktes zu ermitteln, wurden Standardlösungen verdünnt, bis ein Signal/Rausch-Verhältnis von mindestens 9:1 erreicht wurde. Die somit ermittelten Konzentrationen lagen zwischen 5–25 ng/mL und sind in Tabelle 15 dargestellt. Die Kalibrierung erfolgte in einem Konzentrationsbereich vom jeweils niedrigsten Kalibrierpunkt bis 11 µg/mL, der in zwei Abschnitte (niedrigsten Kalibrierpunkt–1 µg/mL und 1–11 µg/mL) mit jeweils sechs äquidistanten Kalibrierpunkten aufgeteilt wurde. Jeder Kalibrierpunkt wurde in Dreifachbestimmung gemessen und die jeweiligen Peakflächen gegen ihre Konzentration aufgetragen. Anschließend wurden für jeden Konzentrationsbereich quadratische Regressionen durchgeführt, die aufgrund inhomogener Varianzen gewichtet wurden (Wichtungsfaktor =  $1/\text{Standardabweichung}^2$ ). Die Kalibrierdaten sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

#### 4.1.5 Validierung

Die quantitative Freisetzung der Analyten, die in Form ihrer Sulfat- und/oder Glucuronid-Konjugate vorliegen, wurde bestätigt, indem Milchproben mit unterschiedlichen Enzymaktivitäten (50 U, 100 U und 300 U) in Dreifachbestimmung inkubiert und analysiert wurden. Der Einsatz der höchsten Enzymmenge resultierte bei zehn der 15 Analyten in keinem signifikanten Unterschied in den gemessenen Analyt-Konzentrationen ( $p < 0,05$ ). Kaffeesäure, 3,4-Dihydroxyphenylpropionsäure und 4-Hydroxyphenylpropionsäure waren aufgrund ihrer geringen Konzentrationen in diesen Proben nicht bestimmbar. Für *p*-CS und Zimtsäure wurden bei Verwendung höherer Enzymmengen signifikante Unterschiede ermittelt. Diese sind jedoch vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Analyten – wie nachfolgend beschrieben – in Konzentrationen nahe der Bestimmungsgrenzen vorlagen.

Die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen dieser Methode konnte nicht in Leermatrizes durchgeführt werden, da keine Milchproben vorhanden waren, die frei von den analysierten Verbindungen waren. Auch die Herstellung einer Milchmatrix-imitierenden Mischung war problematisch, da sowohl Kaseine als auch Molkenproteine phenolische Verbindungen adsorbieren und somit wahrscheinlich mit den Analyten verunreinigt sind. Deshalb wurde in dieser Arbeit eine native Milchprobe (3,5 % Fettgehalt) mit isotoopenmarkierten Standardsubstanzen in abnehmenden Konzentrationen versetzt und analysiert. Dadurch lassen sich jedoch nicht die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von hoch-konzentrierten Analyten ermitteln, da diese aufgrund der geringen spektralen Überlappung durch natürliche  $^{13}\text{C}$ -Atome ein falsch-positives Signal verursachen.

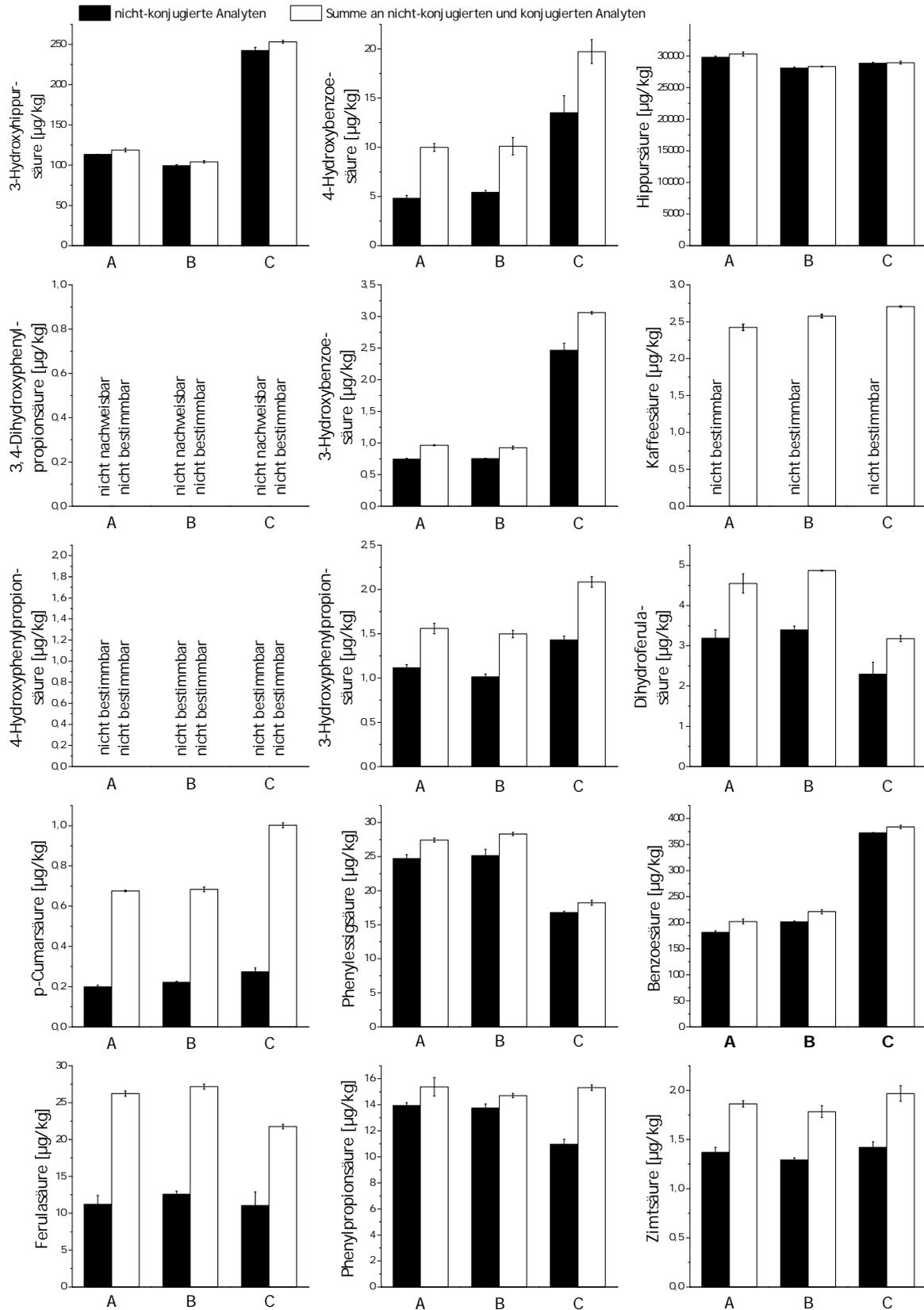
Aus diesem Grund konnten für Hippursäure keine Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (Signal/Rausch-Verhältnis 3:1 bzw. 9:1) ermittelt werden. Die mittels dieses Verfahrens bestimmten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der anderen Analyten sind in Tabelle 14 angegeben, sollten jedoch nur als grobe Abschätzungen interpretiert werden.

Anhand der Analyse von zwei konventionell erzeugten Milchproben mit 1,5 bzw. 3,5 % Fettgehalt und einer ökologisch erzeugten, nicht homogenisierten Milchprobe mit 3,8 % Fettgehalt in Dreifachbestimmung wurde die Anwendbarkeit der Methode überprüft. Aufgrund von Vorversuchen konnten die einzelnen Analytgehalte grob abgeschätzt werden, sodass vergleichbare Mengen der jeweiligen isotoopenmarkierten Standardsubstanzen zu den Proben gegeben wurden. In diesen Proben konnten alle Analyten außer 3,4-Dihydroxyphenylpropionsäure, 4-Hydroxyphenylpropionsäure und nicht-konjugierte Kaffeesäure quantifiziert werden (Abbildung 19). Alle Analyten, auch diejenigen, die keine phenolische Hydroxygruppe besitzen (Benzoessäure, Phenylpropionsäure, Phenylelessigsäure und Zimtsäure), wiesen nach Enzyminkubation mit Sulfatase/Glucuronidase höhere Analytgehalte auf. Dies könnte auf das Vorhandensein von Acylglucuroniden zurückzuführen sein, die als mögliche Produkte des Fremdstoffmetabolismus carbonsäurehaltiger Verbindungen angesehen werden (Regan et al. 2010).

Die Methodenpräzision liegt mit  $< 0,3\text{--}8,9\%$  Standardabweichung für die Konzentrationsbestimmungen nach Enzyminkubation in einem akzeptablen Bereich, wohingegen die Standardabweichungen für die Bestimmung der nicht-konjugierten FS, Dihydroferulasäure und 4-Hydroxybenzoessäure mit bis zu 16,5 % eine geringere Präzision ausweisen. Möglicherweise kommt es unter den kurzzeitig sauren Bedingungen während der Probenaufarbeitung zu einer partiellen Hydrolyse der offensichtlich vorhandenen Sulfat- und/oder Glucuronid-Konjugate und damit zu größeren Abweichungen innerhalb der Dreifachbestimmungen.

Die aus der Analyse der drei Milchproben erhaltenen Daten wurden außerdem genutzt, um Wiederfindungsraten der zugegebenen isotoopenmarkierten Standardsubstanzen zu berechnen. Dabei wurde berücksichtigt, dass bei der QuEChERS-Probenaufarbeitung nur etwa 5 ml der zugesetzten 10 mL ACN entnommen werden konnten. Die ermittelten Wiederfindungsraten, die die Methodenempfindlichkeit, jedoch nicht die Richtigkeit der Methode beurteilen, lagen zwischen 21 % für  $[^{13}\text{C}_2]$ Dihydroferulasäure und 94 % für  $[^{13}\text{C}_2]$ FS (Tabelle 14).

Zur Beurteilung der Richtigkeit wurde die bereits analysierte, konventionelle Milchprobe mit 3,5 % Fettgehalt erneut in Dreifachbestimmung aufgearbeitet, wobei zuvor eine Mischung aus nicht-isotoopenmarkierten (zusammen mit den isotoopenmarkierten) Standard-



**Abbildung 19:** Mittels LC-MS/MS bestimmte Konzentrationen (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $n=3$ ) von phenolischen Säuren in konventionell erzeugter Milch mit 1,5 % Fettgehalt (A), konventionell erzeugter Milch mit 3,5 % Fettgehalt (B) und ökologisch erzeugter Milch mit 3,8 % Fettgehalt (C). Die Konzentrationen für die Summe der nicht-konjugierten und konjugierten Analyten wurden nach Inkubation mit Sulfatase/Glucuronidase gemessen.

substanzen zugesetzt wurde. Die Wiederfindungen *WF* dieser Versuche wurden mittels der Formel

$$WF = \frac{\text{analysierte Konzentration } [\mu\text{g/mL}]}{\text{natürliche Konzentration } [\mu\text{g/mL}] + \text{zugesetzte Konzentration } [\mu\text{g/mL}]} \cdot 100\% \quad (1)$$

berechnet und betragen für die meisten Analyten zwischen 90–110 %. Im Falle von 4-Hydroxybenzoesäure, Phenylpropionsäure und Zimtsäure lagen die Wiederfindungen jedoch bei nur 50–70 %. Deswegen sollten die Ergebnisse dieser Analyten als semiquantitativ eingestuft werden.

#### 4.1.6 Beurteilung der Methode

Die Validierung und Anwendung der Methode auf drei Milchproben mit unterschiedlichem Fettgehalt zeigte, dass präzise und plausible Ergebnisse erhalten werden, deren Richtigkeit durch Verwendung von isotope-markierten Standardsubstanzen als hoch eingeschätzt werden kann. Dies wurde außerdem durch Wiederfindungsversuche bestätigt. Die Probenvorbereitung ist mittels angepasster QuEChERS-Methode schnell, unkompliziert und für viele Proben parallel durchführbar, jedoch ist die Gewinnung der isotope-markierten Standardsubstanzen zum Teil mit einem hohen finanziellen und zeitlichen Aufwand verbunden. Aufgrund der ermittelten unterschiedlichen Wiederfindungsraten für die verschiedenen Analyten sind diese jedoch unverzichtbar.

Im Vergleich der drei Milchproben wiesen die beiden konventionell erzeugten Proben untereinander geringe Unterschiede auf. Dies war nicht verwunderlich, da diese von der selben Molkerei bezogen wurden. Im Vergleich zur Milch aus ökologischer Herstellung, die von einer anderen Molkerei stammte, konnten dagegen größere Unterschiede ermittelt werden. Während die Konzentrationen von 3-Hydroxyphenylpropionsäure, 3-Hydroxybenzoesäure, 3-Hydroxyhippursäure, 4-Hydroxybenzoesäure und Benzoesäure in der ökologisch erzeugten Milch höher waren, wurden geringere Konzentrationen an Dihydroferulasäure und Phenylelessigsäure analysiert. Ob und in welchem Ausmaß diese Unterschiede durch die unterschiedlichen Aufnahmemengen von FS und/oder anderen phenolischen Verbindungen mit dem Futter verursacht werden, konnte im Zuge dieser Arbeit aufgrund der niedrigen Probenzahl nicht beurteilt werden.

## 4.2 SYNTHESE VON OLIGO FERULASÄUREN

Die Synthesen der verschiedenen OFS erfolgte mittels oxidativ-chemischer, oxidativ-enzymatischer und photochemischer Reaktionen. Dabei wurden zunächst die Auswirkungen einiger Reaktionsbedingungen auf die Produktvielfalt und -ausbeuten untersucht. Anschließend wurden verschiedene Methoden getestet, um die Reaktionsprodukte zu isolieren. Auf diese Weise konnten bekannte, aber auch bisher unbekannte OFS als Standardsubstanzen gewonnen werden. Für die Reaktionen wurden die Ausgangssubstanzen FS, FS-Ethylester (Ethylferulat) oder Malonsäure eingesetzt. Durch Wiederholung der erfolgreichen Reaktionen unter Verwendung von  $[9-^{13}\text{C}]$ FS,  $[9-^{13}\text{C}]$ Ethylferulat oder  $[1,3-^{13}\text{C}_2]$ Malonsäure wurden FS-Dimere, -Trimere und -Tetramere erhalten, deren Carboxygruppen  $^{13}\text{C}$ -markiert waren.

### 4.2.1 Synthesen von $^{13}\text{C}$ -Ferulasäure, Ferulasäureethylester und $^{13}\text{C}$ -Ferulasäureethylester

Wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, boten sich prinzipiell drei Möglichkeiten an, FS mit einer  $^{13}\text{C}$ -Markierung zu synthetisieren. Da von einem Bedarf von etwa 2–3 g  $[^{13}\text{C}]$ FS ausgegangen wurde, wurde die aufwendigere, aber preislich günstigere Variante mittels Horner-Wadsworth-Emmons-Variante der Wittig-Reaktion durchgeführt (Abbildung 13).

Die in der Literatur beschriebene Reaktion ohne Verwendung einer Schutzgruppe bei niedrigen Temperaturen erwies sich als nicht reproduzierbar (Hu und Jeong 2006). Deshalb wurde zunächst Vanillin acetyliert, um die phenolische Gruppe zu inaktivieren. Unter Verwendung des acetylierten Vanillins wurden in drei Durchgängen ausgehend von je 1 g  $[^{13}\text{C}]$ Triethylphosphonoacetat insgesamt 3,21 g eines Rohproduktes erhalten, das neben  $[^{13}\text{C}]$ FS auch Vanillin und Rückstände des zur Stabilisierung von NaH zugesetzten Öls enthielt. Beide Verunreinigungen konnten effizient entfernt werden, indem  $[^{13}\text{C}]$ FS in 5%ige  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung extrahiert, diese mehrmals mit Ethylacetat gewaschen und  $[^{13}\text{C}]$ FS nach Ansäuern zurück in Ethylacetat extrahiert wurde. So wurden 2,42 g  $[^{13}\text{C}]$ FS erhalten, was einer Ausbeute von 85,4% entspricht. Diese Ausbeute liegt in einem mit Literaturdaten vergleichbaren Bereich (Lu et al. 2010; Yin et al. 2014).

Die oxidativen Bedingungen, die bei vielen der durchgeführten Kopplungsreaktionen vorherrschen, würden zur Decarboxylierung der freien FS führen. Aus diesem Grund wurde FS-Ethylester eingesetzt, der mit wenig Aufwand in einer quantitativen Reaktion aus FS hergestellt wurde (Kapitel 8.3.2). Allerdings war es teilweise nicht möglich, das ölige Produkt auszukristallisieren. Während sich bei Ethylferulat nach mehreren Tagen bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  spontane Kristallisationskeime bildeten, konnte  $[^{13}\text{C}]$ Ethylferulat auch bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  oder durch Kristallisation aus Petrolether/Ethylacetat nicht in kristalliner Form erhalten werden. Vermutlich verhinderten Spuren an Verunreinigungen, die durch die vorangehen-

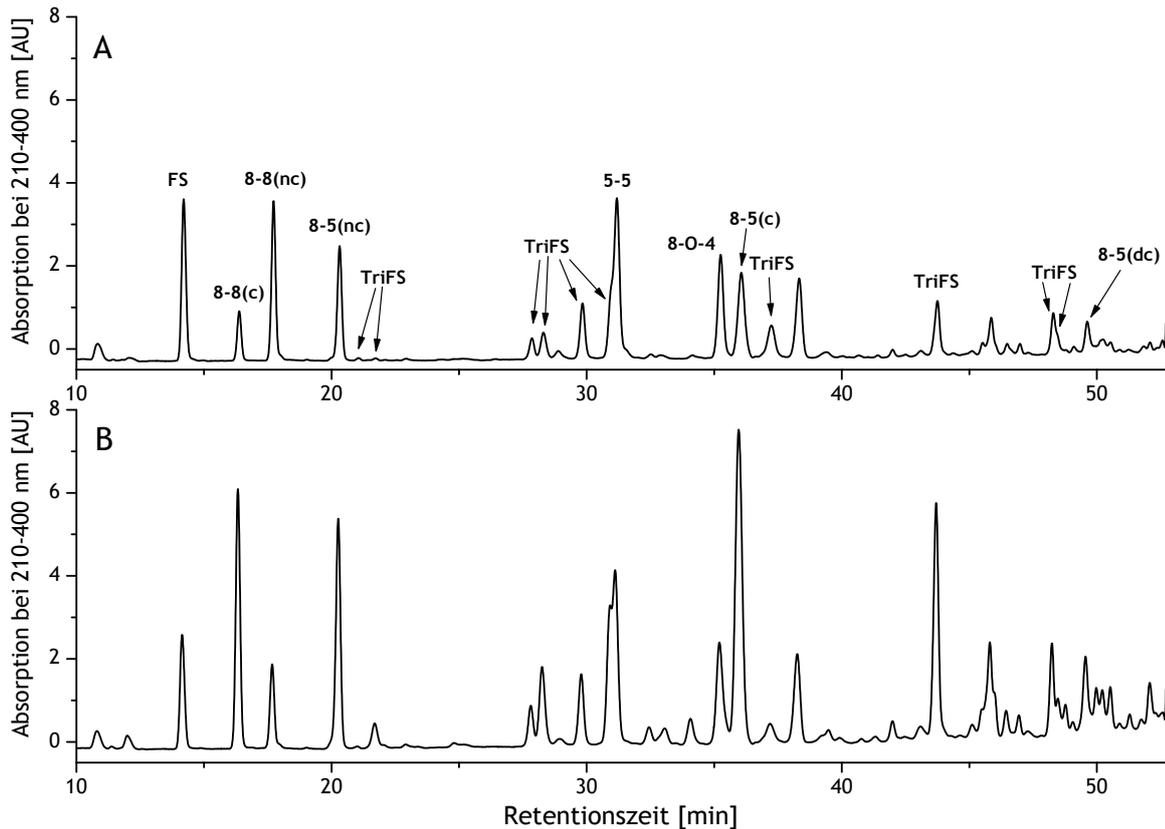
den Synthesen bedingt waren, die Keimbildung. Deshalb wurde das ölige Produkt, das aus 2 g [ $^{13}\text{C}$ ]FS gewonnen wurde, für die beiden Reaktionen (Kapitel 4.2.2 und 4.2.3) zu gleichen Mengen aufgeteilt.

#### 4.2.2 Oxidative Kopplung mittels Cu[Tetramethylethyldiamin]-Komplex

Teile der im Folgenden vorgestellten Ergebnisse wurden bereits im *Journal of Agricultural and Food Chemistry* publiziert (Waterstraat et al. 2016a).

Ausgangspunkt der Untersuchungen zur oxidativen Kopplung mittels Cu[TEMED]-Komplex war die Publikation von Lu et al. (2012), bei der CuCl entweder in stöchiometrischen Mengen (Variante A) oder katalytisch unter Regeneration mit  $\text{O}_2$  (Variante B) zugesetzt wurde. Als Lösungsmittel dienten ACN oder Dichlormethan. Im Rahmen dieser Arbeit und in Zusammenhang mit einer wissenschaftlichen Abschlussarbeit wurden Untersuchungen zu beiden Varianten durchgeführt (Kauz 2016). Variante A wurde mit einem 1,5- oder 5-fachen Überschuss des Cu[TEMED]-Komplexes unter Verwendung von Dichlormethan oder ACN durchgeführt. Die katalytische Variante B wurde bei verschiedenen Reaktionszeiten unter Verwendung der Lösungsmittel ACN, Dichlormethan, Aceton, THF und Methanol getestet. Nach Abschluss der Reaktionen wurden die Reaktionsprodukte verseift, mit Ethylacetat extrahiert und je 1  $\mu\text{g}$  des Produktgemisches mittels LC-DAD-MS untersucht. Die Daten konnten jedoch nur zum semiquantitativen Vergleich der Peakflächen genutzt werden, da keine Kalibrierung durchgeführt wurde.

Die Auswertung der mit Variante A durchgeführten Reaktionen zeigte, dass ein molares Verhältnis von 1,5:1 (Cu[TEMED]-Komplex : Ethylferulat) in ACN die höchsten Ausbeuten an DFS und TriFS ergaben (Produktspektrum in Abbildung 20A). Unter den Reaktionen mit katalytischen Mengen des Cu[TEMED]-Komplexes (Variante B) führte die Verwendung von ACN bei einer Reaktionszeit von 16 h zu den höchsten Ausbeuten (Produktspektrum in Abbildung 20B). In Übereinstimmung mit den Arbeiten von Lu et al. (2012) begünstigten die Bedingungen der Variante A die Bildung von 8-8(nc)-DFS gegenüber 8-8(c)-DFS, während die katalytische Variante in einer stärkeren Bildung von 8-8(c)-DFS im Vergleich zu 8-8(nc)-DFS resultierte. Diese Verteilung war bei Durchführung beider Reaktionsvarianten in Aceton und THF weniger ausgeprägt, was auf eine partielle Lösungsmittelabhängigkeit schließen ließ. Es konnte ebenfalls beobachtet werden, dass die Anteile an 8-O-4-DFS in den Ansätzen der mit Variante A durchgeführten Reaktionen höher waren als bei Verwendung der Variante B. Des Weiteren wurden in allen Reaktionen 8-5- und 5-5-DFS gebildet. Wie erwartet entstand in keiner der Reaktionen 8-8(THF)-DFS, da deren Bildungsmechanismus die Addition eines  $\text{H}_2\text{O}$ -Moleküls erfordert. Auch in einer Reaktion, die in ACN mit 7 % Wasseranteil durchgeführt wurde, war keine 8-8(THF)-DFS detektierbar. Ebenso konnte 4-O-5-DFS in keinem der Produktgemische nachgewiesen werden. Neben den genannten DFS waren einige Peaks erkennbar,



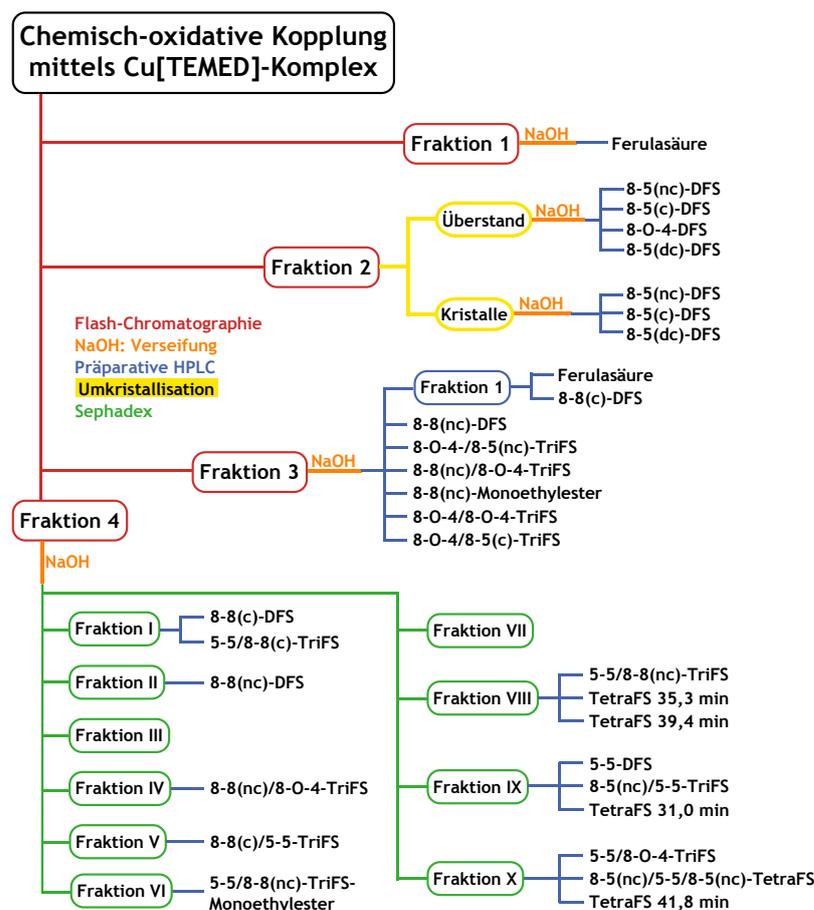
**Abbildung 20:** Mittels Flüssigchromatographie getrennte Reaktionsprodukte der oxidativen Koppelung nach Lu et al. (2012) mittels stöchiometrischer Variante (A: molares Verhältnis von 1,5 : 1 (Cu[Tetramethylethylendiamin]-Komplex : Ethylferulat) in Acetonitril) und katalytischer Variante (B: 16 h Reaktionszeit in Acetonitril). Die Parameter der LC-DAD-MS-Methode sind in Kapitel 8.5.2 beschrieben. FS: Ferulasäure, DFS: Dehydrodiferulasäure, TriFS: Dehydrotriferulasäure, c: cyclisch, nc: nicht cyclisch, dc: decarboxyliert.

die entweder mit Hilfe von Referenzsubstanzen oder aufgrund ihrer UV- und MS-Daten als TriFS oder TetraFS identifiziert wurden. Insgesamt waren zehn TriFS (Abbildung 20) und sieben TetraFS vorhanden. Zusätzlich wurden Peaks mit den  $m/z$  413, 605 und 797 detektiert, die vermutlich aufgrund unvollständiger Verseifung auf Monoethylester von DFS, TriFS bzw. TetraFS zurückzuführen sind.

Für den Hauptversuch wurde die Variante B gewählt, da unter den katalytischen Bedingungen 8-8(c)-DFS gebildet wird, welches mittels Variante A nur mit geringem Anteil entsteht. Außerdem waren bei Variante B mit einer Reaktionszeit von 16 h in ACN die Peakflächen der meisten DFS und TriFS größer als bei anderen Bedingungen. Das Produktspektrum des Hauptversuches war vergleichbar zu dem des Vorversuches (Abbildung 20B).

Zur Aufreinigung des komplexen Reaktionsgemisches wurde zunächst versucht, eine Fraktionierung der Ethylester mittels SEC zu erreichen. Die semipräparative Säule (Tosoh Bioscience, TSKgel G1000H<sub>XL</sub>, 30 cm x 21,5 mm, 5  $\mu$ m) eignete sich, um pro Lauf ca.

20 mg des Rohproduktes nach hydrodynamischem Volumen zu trennen. FS-Dimere ließen sich dadurch relativ gut von Trimeren trennen. Dennoch enthielt die Dimer-Fraktion viele Substanzen, deren Isolierung weitere Aufreinigungsschritte benötigten. Tri- und Tetramere konnten mittels SEC lediglich angetrennt werden, sodass die Aufreinigung dieser Substanzen durch die SEC-Fraktionierung kaum vereinfacht wurde. Deshalb wurde diese Art der Fraktionierung nicht weiter verfolgt. Stattdessen wurde die in der Literatur oft verwendete Flash-Chromatographie an Kieselgel für eine erste Fraktionierung des Reaktionsgemisches verwendet (Ralph et al. 1998; Yamamoto et al. 1999; Lu et al. 2012; Mouterde et al. 2013). Die Trennung des Reaktionsgemisches in vier Fraktionen und deren weitere Behandlung ist schematisch in Abbildung 21 dargestellt.



**Abbildung 21:** Schematisch dargestellte Vorgehensweise zur Isolierung der Reaktionsprodukte, die durch oxidative Kopplung mittels Cu[Tetramethylethylendiamin (TEMED)]-Komplex aus Ethylferulat gebildet wurden. Eine erste Fraktionierung erfolgte mittels Flash-Chromatographie (rot). Des Weiteren wurden Verseifungen (orange), präparative RP-HPLC (blau), Umkristallisation (gelb) und eine Fraktionierung mittels Sephadex-Chromatographie (grün) durchgeführt, um Ferulasäure, Dehydrodiferulasäuren (DFS), Dehydrotriferulasäuren (TriFS) und Dehydrotetraferulasäuren (TetraFS) zu isolieren. Einige TetraFS wurden vorläufig anhand ihrer Retentionszeiten unter Anwendung der in Kapitel 8.5 beschriebenen LC-MS/MS-Methode bezeichnet. nc: nicht cyclisch, c: cyclisch, dc: decarboxyliert.

Die erste Fraktion der Flash-Chromatographie enthielt hauptsächlich Ethylferulat. Dieses kann entweder direkt, oder nach Verseifung als FS mittels präparativer C18-HPLC

zurückgewonnen werden. Im Falle der Reaktion mit  $^{13}\text{C}$ -markiertem Ethylferulat wurde die Aufreinigung von [ $^{13}\text{C}$ ]Ethylferulat vorgezogen, da dieses nur bei hoher Reinheit spontan auskristallisiert. Die gewonnenen Kristalle können zur Keimbildung in zukünftigen Synthesen dienen.

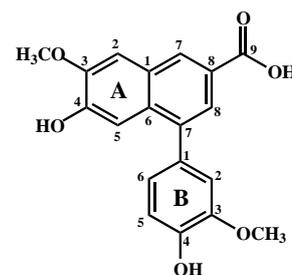
Fraktion 2 der Flash-Chromatographie enthielt hauptsächlich 8-5(c)- und 8-O-4-DFS-Diethylester. In einem Gemisch aus Petrolether und Ethylacetat wurde 8-5(c)-DFS-Ethylester in reiner Form auskristallisiert, während im Überstand ein Gemisch der beiden Substanzen und weiterer Verunreinigungen zurückblieb. Die Umkristallisation dieser Fraktion empfahl sich, da sich die Trennung von 8-5(c)- und 8-O-4-DFS mittels präparativer HPLC als schwierig erwies. Durch Verringerung des 8-5(c)-DFS-Anteils konnte jedoch eine praktikable Trennung erreicht werden.

Die dritte Fraktion der Flash-Chromatographie enthielt 8-8-gekoppelte Dimere und mindestens vier TriFS, die nach Verseifung mittels präparativer C18-HPLC isoliert werden konnten. Interessanterweise war auch FS enthalten, die entweder ein Abbauprodukt von instabilen OFS darstellte oder aufgrund von sekundären Wechselwirkungen mit OFS während der Flash-Chromatographie erst später eluierte. Zusätzlich wurde eine Substanz isoliert, die mittels NMR- und LC-MS-Daten als 8-8(nc)-Monoethylester identifiziert werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass 8-8(nc)-gekoppelte FS-Diethylester unter den gewählten Bedingungen im Gegensatz zu anderen DFS nicht vollständig verseifbar sind. Unter den Trimeren waren in dieser Fraktion 8-O-4/8-5(nc)- und 8-O-4/8-O-4-TriFS enthalten. Ihre Strukturen wurden durch Abgleich von NMR-Daten mit Literaturwerten bestätigt (Bunzel et al. 2005a; Funk et al. 2005). Außerdem wurden aus dieser Fraktion zwei bisher unbekannte Trimere, 8-O-4/8-5(c)- und 8-8(nc)/8-O-4-TriFS, isoliert, deren Strukturaufklärung in Kapitel 4.3.2 bzw. 4.3.5 beschrieben wird (Waterstraat et al. 2016a).

Die LC-MS-Messung der letzten Fraktion der Flash-Chromatographie zeigte, dass auch in dieser Fraktion nach Verseifung größere Mengen an 8-8(c)- und 8-8(nc)-DFS sowie 8-8(nc)/8-O-4-TriFS enthalten waren. Dies könnte neben eventuell auftretenden sekundären Wechselwirkungen auf eine unvollständige Trennung der Fraktionen 3 und 4 im Zuge der Flash-Chromatographie zurückzuführen sein. Neben den beiden 8-8-gekoppelten Dimeren waren außerdem einige TriFS, TetraFS, OFS-Monoethylester und unbekannte Nebenprodukte der oxidativen Reaktion oder Verseifung enthalten. Dadurch war eine direkte Aufreinigung mittels präparativer HPLC nicht praktikabel. Aus diesem Grund wurde zunächst eine Fraktionierung mittels Sephadex-LH20-Chromatographie gewählt, die zur Isolierung von OFS aus Maiskleie entwickelt wurde (Bunzel et al. 2004a). Jede der zehn Fraktionen der gut reproduzierbaren Trennung enthielt wenige Substanzen, deren Isolierung mittels präparativer HPLC gut durchführbar war (Abbildungen 48 und 49). So konnten die Ausbeuten von 8-8(c)-DFS, 8-8(nc)-DFS und 8-8(nc)/8-O-4-TriFS erhöht und weitere Tri- und Tetramere als Standardsubstanzen gewonnen werden. Unter den

Trimeren waren die bekannten 5-5/8-O-4-, 8-5(nc)/5-5- und 5-5/8-O-4-TriFS. Bis dahin nicht beschrieben waren dagegen 5-5/8-8(c)-, 8-8(c)/5-5- und 5-5/8-8(nc)-TriFS sowie fünf TetraFS, von denen eine als 8-5(nc)/5-5/8-5(nc)-TetraFS identifiziert wurde. Die anderen wurden aufgrund nicht-eindeutiger Identifizierung vorläufig nach ihren Retentionszeiten bei Verwendung der in Kapitel 8.5.2 beschriebenen LC-MS-Methode (31,0 min, 35,3 min, 39,4 min und 41,8 min) benannt. Die Strukturaufklärung der bislang nicht beschriebenen, hier isolierten und identifizierten Substanzen ist in Kapitel 4.3 beschrieben.

Bei der Aufreinigung von 8-8(c)-DFS wurde festgestellt, dass diese auch nach präparativer HPLC durch eine relativ spät eluierende Substanz verunreinigt war, deren Anteil bei Lagerung von 8-8(c)-DFS in gelöster Form zunahm. Um die Identität dieser Verbindung aufzuklären, wurden geringe Mengen isoliert und in Kooperation mit dem Max Rubner Institut, Institut für Sicherheit und Qualität bei Obst und Gemüse, mittels hochauflösender MS gemessen. Dabei wurde eine akkurate Masse von 339,0867 Da  $[M-H]^-$  bestimmt, was der Summenformel  $C_{19}H_{16}O_6$  mit einem Fehler von  $-2,1$  ppm (MS) bzw.  $4,7$  ppm (MS/MS, 15 Fragmente) entspricht. Des Weiteren wurden ein- und zweidimensionale NMR-Experimente durchgeführt, deren Auswertung in Tabelle 17 zusammengefasst wurde. Die Interpretation der NMR-Daten führte zur eindeutigen Aufklärung der in Abbildung 22 dargestellten Struktur. Dieses Naphthalin-Derivat entsteht aus 8-8(c)-DFS vermutlich durch Abspaltung eines Ameisensäure-Moleküls unter Aromatisierung des dritten Ringes. In nachfolgenden Versuchen wurden die UBS von Mais, Weizen, Zuckerrübe und Amaranth der üblichen alkalischen Hydrolyse unterzogen und die Extrakte mittels LC-MS und GC-MS auf das 8-8(c)-DFS-Abbauprodukt untersucht. Jedoch war in diesen Proben das Naphthalin-Derivat nicht detektierbar und wurde deshalb bei der Bestimmung von OFS nicht weiter berücksichtigt.



**Abbildung 22:** Strukturformel des 8-8(cyclisch)-Dehydrodiferulasäure-Abbauprodukts.

Zusammenfassend konnten nach oxidativer Kopplung von FS-Ethylester mittels  $Cu[TEMED]$ -Komplex sieben DFS und neun TriFS als Standardsubstanzen sowie fünf TetraFS mit geringeren Ausbeuten und Reinheiten gewonnen werden. Da die Reaktion und die anschließende Fraktionierung und Isolierung mehrmals durchgeführt wurde, wobei immer wieder Aliquote für Tests entnommen oder Fraktionen vereint wurden, konnten keine Ausbeuten berechnet werden. Bei Anwendung der Reaktion unter Verwendung von  $[9-^{13}C]$ Ethylferulat wurden die in Tabelle 4 dargestellten, auf  $[^{13}C]$ FS bezogenen Ausbeuten der einzelnen OFS erzielt.

**Tabelle 4:** Ausbeuten und Reinheiten der isolierten Syntheseprodukte nach oxidativer Kopplung von [ $^{13}\text{C}$ ]Ethylferulat mittels Cu[Tetramethylethylendiamin]-Komplex. Die Ausbeuten beziehen sich auf 1 g [ $^{13}\text{C}$ ]Ferulasäure. DFS: Dehydrodiferulasäure, TriFS: Dehydrotriferulasäure, c: cyclisch, nc: nicht cyclisch, dc: decarboxyliert.

Substanz	Menge	Ausbeute	UV/VIS-Reinheit	NMR-Reinheit
[ $^{13}\text{C}_2$ ] 8-8(c)-DFS	48,4 mg	4,8 %	> 99 %	> 99 %
[ $^{13}\text{C}_2$ ] 8-8(nc)-DFS	31,4 mg	3,1 %	> 99 %	> 98 %
[ $^{13}\text{C}_2$ ] 8-5(nc)-DFS	17,5 mg <sup>a</sup>	1,7 %	> 99 %	> 99 %
[ $^{13}\text{C}_2$ ] 5-5-DFS	25,2 mg	2,5 %	> 99 %	> 99 %
[ $^{13}\text{C}_2$ ] 8-O-4-DFS	23 mg	2,3 %	> 98 %	> 97 %
[ $^{13}\text{C}_2$ ] 8-5(c)-DFS	40,4 mg <sup>a</sup>	4 %	> 97 %	> 97 %
[ $^{13}\text{C}$ ] 8-5(dc)-DFS	4,1 mg <sup>a</sup>	0,4 %	> 99 %	> 99 %
[ $^{13}\text{C}_3$ ] 5-5/8-8(c)-TriFS	2,7 mg	0,3 %	> 96 %	> 95 %
[ $^{13}\text{C}_3$ ] 8-8(c)/5-5-TriFS	3,8 mg	0,4 %	> 95 %	> 96 %
[ $^{13}\text{C}_3$ ] 8-O-4/8-5(nc)-TriFS	2,3 mg	0,2 %	> 97 %	> 96 %
[ $^{13}\text{C}_3$ ] 5-5/8-8(nc)-TriFS	13,4 mg	1,3 %	> 99 %	> 99 %
[ $^{13}\text{C}_3$ ] 8-5(nc)/5-5-TriFS	9,3 mg	0,9 %	> 98 %	> 97 %
[ $^{13}\text{C}_3$ ] 8-8(nc)/8-O-4-TriFS	3,2 mg	0,3 %	> 97 %	> 96 %
[ $^{13}\text{C}_3$ ] 5-5/8-O-4-TriFS	8,9 mg	0,9 %	> 99 %	> 99 %
[ $^{13}\text{C}_3$ ] 8-O-4/8-O-4-TriFS	5,4 mg	0,5 %	> 97 %	> 96 %
[ $^{13}\text{C}_3$ ] 8-O-4/8-5(c)-TriFS	nicht isoliert			

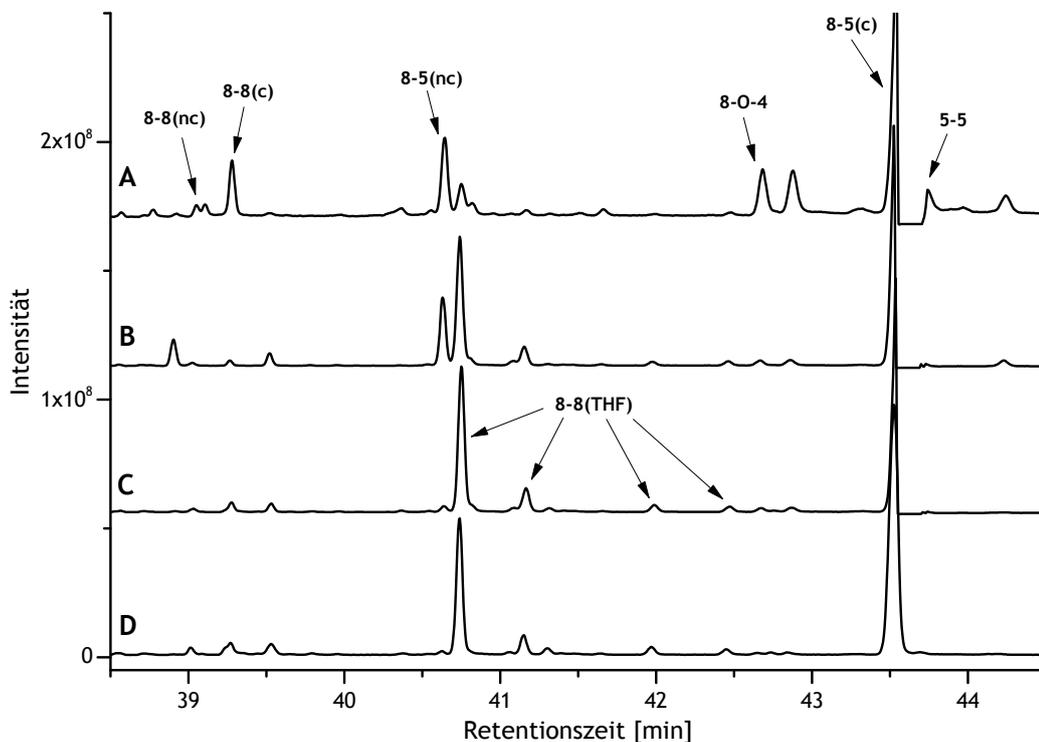
<sup>a</sup> von 130 mg [ $^{13}\text{C}_2$ ]8-5-Diethylester wurden etwa 100 mg verseift

#### 4.2.3 Enzymatische Kopplung mittels Peroxidase/ $\text{H}_2\text{O}_2$

Die enzymatische Kopplung von Ethylferulat in wässriger Pufferlösung ist eine geeignete Methode, um FS-Dimere zu gewinnen. Während Ethylferulat in wässriger Lösung teilweise löslich ist, fallen die oxidativ gekoppelten Dimere aus und stehen nicht für weitere Reaktionen zur Verfügung (Kapitel 3.3.4). Unter den von Ralph et al. (1998) gewählten Bedingungen entstand 8-5-DFS-Diethylester als Hauptprodukt, aber auch 5-5-, 8-8-, und 8-O-4-gekoppelte Dimere waren im Reaktionsgemisch zu finden. 4-O-5-DFS konnte nach Verseifung nicht nachgewiesen werden.

Anhand der Bildungsmechanismen der 8-8-gekoppelten Dimere aus dem gemeinsamen Chinonmethid-Intermediat (Kapitel 1.4.2) wurde abgeleitet, dass ein niedriger pH-Wert die Abstraktion von Protonen hemmt, die zur Bildung von 8-8(nc)- und 8-8(c)-DFS führen würde. Folglich sollte unter sauren Bedingungen die Addition eines  $\text{H}_2\text{O}$ -Moleküls zur Bildung von 8-8(THF)-DFS bevorzugt stattfinden. Diese Annahme wurde untersucht, indem die biomimetische Reaktion nach Ralph et al. (1998) bei niedrigeren pH-Werten durchgeführt wurde. Dazu wurden in Vorversuchen jeweils 50 mg Ethylferulat in wässrigen Phosphatpuffern mit den pH-Werten 4, 3, 2,5 und 2 umgesetzt. Um dem schnellen Verlust der Enzymaktivität bei den niedrigen pH-Werten entgegenzuwirken, wurde das Enzym portionsweise zugegeben. Die eingesetzten Enzymmengen wurden jeweils sukzessive erhöht, bis mittels Dünnschichtchromatographie kein Ethylferulat mehr nachweisbar

war. Insgesamt wurden 3,5, 5, 10 bzw. 18 mg (0,7, 1, 2 bzw. 3,6 kU) Meerrettichperoxidase für die Reaktionen bei den pH-Werten 4, 3, 2,5 bzw. 2 eingesetzt.  $H_2O_2$  wurde ebenso portionsweise zugegeben, da in früheren Arbeiten festgestellt wurde, dass eine hohe  $H_2O_2$ -Konzentration die Enzymaktivität zusätzlich hemmen kann (Bunzel et al. 2008b). Nach Abschluss der Reaktionen wurden je 100  $\mu$ g der Produktgemische trimethylsilyliert und mittels GC-MS analysiert (Abbildung 23). Die Identifizierung der DFS-Derivate



**Abbildung 23:** Chromatogramme nach gaschromatographischer Trennung und massenspektrometrischer Detektion der trimethylsilylierten Reaktionsprodukte, die durch enzymatische Kopplung bei pH 4 (A), pH 3 (B), pH 2,5 (C) und pH 2 (D) gebildet wurden. Die Parameter der GC-MS-Methode sind in Kapitel 8.3.7 beschrieben. nc: nicht cyclisch, c: cyclisch, THF: Tetrahydrofuran.

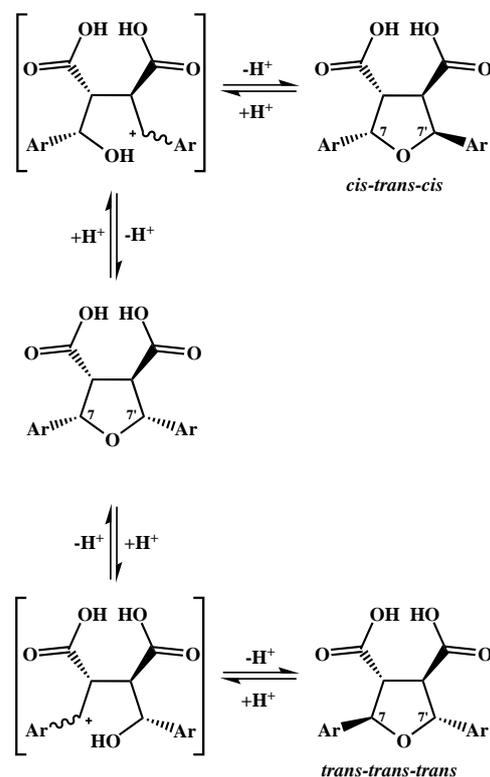
erfolgte durch einen Vergleich der Retentionszeiten und Massenspektren mit Referenzsubstanzen (Abbildung 50). Diese wurden aus authentischen DFS-Standardsubstanzen durch Bildung der Diethylester mit anschließender Trimethylsilylierung gewonnen. So konnten die Derivate von 8-8(nc)-, 8-8(c)-, 8-5(nc), 8-O-4-, 8-5(c)- und 5-5-DFS den Peaks der GC-Chromatogramme zugeordnet werden und deren Entstehung nach Verseifung mittels LC-MS bestätigt werden. Überraschend ist das Vorhandensein von 8-5(nc)-DFS (Abbildung 23), die vermutlich nicht bei der enzymatischen Kopplung, sondern durch die alkalischen Bedingungen bei der Trimethylsilylierung aus 8-5(c)-DFS entstanden ist. Da von 8-8(THF)-DFS keine authentischen Standardsubstanzen verfügbar waren, erfolgte die Identifizierung über massenspektrometrische Daten. 8-8(THF)-DFS besitzt aufgrund des addierten Wassermoleküls ein höheres Molekulargewicht ( $m/z$  604 nach Trimethylsilylierung des Diethylesters) als die anderen DFS-Derivate ( $m/z$  586 bzw.  $m/z$  514). In den Chromatogrammen waren vier Peaks mit Retentionszeiten von 40,8, 41,2, 41,9 und

42,4 min sichtbar, deren Massenspektren auf Konfigurationsisomere der 8-8(THF)-DFS (trimethylsilylierter Diethylester) schließen ließen (Abbildung 50). Zwar wiesen die Spektren nur geringe Intensitäten des Moleküllions ( $m/z$  604) auf, jedoch waren charakteristische Fragmente durch Abspaltung einer Methylgruppe ( $m/z$  589) oder Ringspaltung ( $m/z$  380; 310 und 294) dominierend. Diese Arten der Fragmentierung wurden bereits für das *cis-trans-trans*-Isomer der 8-8(THF)-DFS beobachtet (Schatz et al. 2006).

Der Vergleich der Chromatogramme nach den unterschiedlichen Reaktionsbedingungen bestätigte, dass mit Absenkung des pH-Wertes die Anteile der vier 8-8(THF)-DFS steigen, wohingegen die Anteile anderer DFS tendenziell abnehmen (Abbildung 23). Die Integration der 8-8(THF)-DFS-Peaks sowohl im mittels Totalionenstrom (TIC) detektierten Chromatogramm als auch unter Verwendung von charakteristischen Massenspuren bestätigte den visuellen Eindruck, wobei die Reaktionen bei pH 2,5 und 2 in vergleichbaren Peakflächen für die vier Isomere der 8-8(THF)-DFS resultierten. Da für die Reaktion bei pH 2 jedoch eine deutlich höhere Enzymmenge eingesetzt werden musste, wurde der Hauptansatz bei pH 2,5 durchgeführt (Kapitel 8.3.7).

Das mittels GC-MS gemessene Produktspektrum des Hauptansatzes war vergleichbar zu dem des Vorversuchs (Abbildung 23C). Um die Syntheseprodukte zu isolieren, wurde zunächst eine Fraktionierung mittels Flash-Chromatographie durchgeführt. Die vier Fraktionen enthielten geringe Mengen an nicht umgesetztem Ethylferulat (Fraktion 1), Diethylester von 8-5(c)- und 8-O-4-DFS (Fraktion 2), hauptsächlich 8-8-Kopplungsprodukte (Fraktion 3) und 5-5-DFS-Diethylester zusammen mit einigen unbekanntem Nebenprodukten (Fraktion 4). Zur Gewinnung von 8-5(nc)-, 8-5(c)-, 8-5(dc)- und 8-O-4-DFS wurden die Substanzen der Fraktion 2, wie in Kapitel 8.3.6 beschrieben, zunächst umkristallisiert, dann verseift und mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

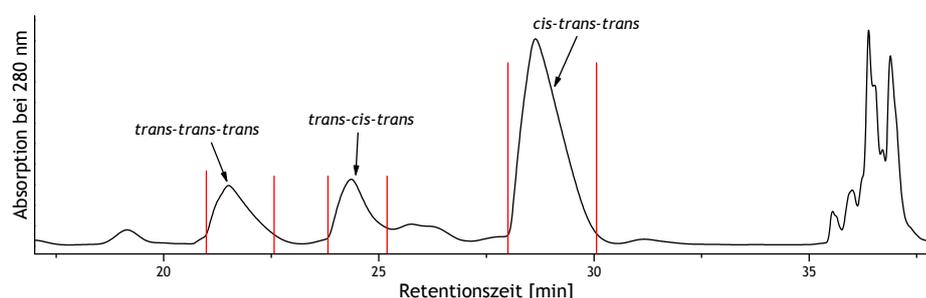
Zur Isolierung der 8-8(THF)-gekoppelten Dimere wurde Fraktion 3 verseift und mittels LC-MS analysiert. Obwohl vor der Verseifung vier Isomere der 8-8(THF)-DFS vorhanden waren, zeigten die Chromatogramme der LC-MS-Messungen nach der Verseifung nur drei Peaks, deren UV- und Massenspektren auf 8-8(THF)-DFS hindeuteten (Abbildung 51). Auch in den GC-MS-



**Abbildung 24:** Die Stereochemie der C-Atome der Position 7 bzw. 7' von 8-8(Tetrahydrofuran)-Dehydrodiferulasäure kann sich durch eine säurekatalysierte Ringöffnung ändern.

Chromatogrammen konnten lediglich drei zu 8-8(THF)-DFS passende Peaks (Retentionszeiten 40,05, 40,2 und 41,15 min) identifiziert werden (Abbildung 52). Der Verlust eines Isomers könnte in Epimerisierungsreaktionen begründet sein, die unter sauren Bedingungen ablaufen können (Sarkanen und Wallis 1973; Fulcrand et al. 1994). Durch Protonierung der Ethergruppe wird der Ring reversibel geöffnet, wobei sich die Stereochemie der C-Atome an Position 7 bzw. 7' ändern kann (Abbildung 24). Ein niedriger pH-Wert wurde eingesetzt, um die DFS nach der Verseifung mit Ethylacetat zu extrahieren.

Die beste präparative Trennung der Substanzen in Fraktion 3 konnte an einer C18-Säule unter Verwendung eines MeOH:H<sub>2</sub>O-Gradienten mit 0,01 % Ameisensäure erzielt werden (Abbildung 25). In dieser Trennung wurden das *trans-trans-trans*-Isomer<sup>1</sup> (Retentionszeit 21–22 min) und das *cis-trans-trans*-Isomer (Retentionszeit 29–30 min) mit Reinheiten von über 99 % (LC-UV und NMR) erhalten. Das *trans-cis-trans*-Isomer (Retentionszeit 24–25 min) besaß geringe Verunreinigungen, die durch einen weiteren Aufreinigungsschritt an einer analytischen C18-Säule entfernt werden konnten. Somit wurden mittels der beschriebenen Synthese und anschließender Aufreinigung des Produktgemisches aus 1 g Ethylferulat 7,6, 6,4 bzw. 34,2 mg der Verbindungen gewonnen, die, wie in Kapitel 4.3.1 beschrieben, als *trans-trans-trans*-, *trans-cis-trans* und *cis-trans-trans*-Isomere identifiziert wurden. Dies entspricht einer Gesamtausbeute an Isomeren der 8-8(THF)-DFS von 5,3 %.



**Abbildung 25:** Chromatogramm der Trennung von *trans-trans-trans*-, *trans-cis-trans*- und *cis-trans-trans*-8-8(Tetrahydrofuran)-Dehydrodiferulasäure mittels präparativer HPLC. Die Detektion erfolgte mittels UV-Detektor bei 280 nm, alle weiteren Bedingungen sind in Kapitel 8.3.7 angegeben.

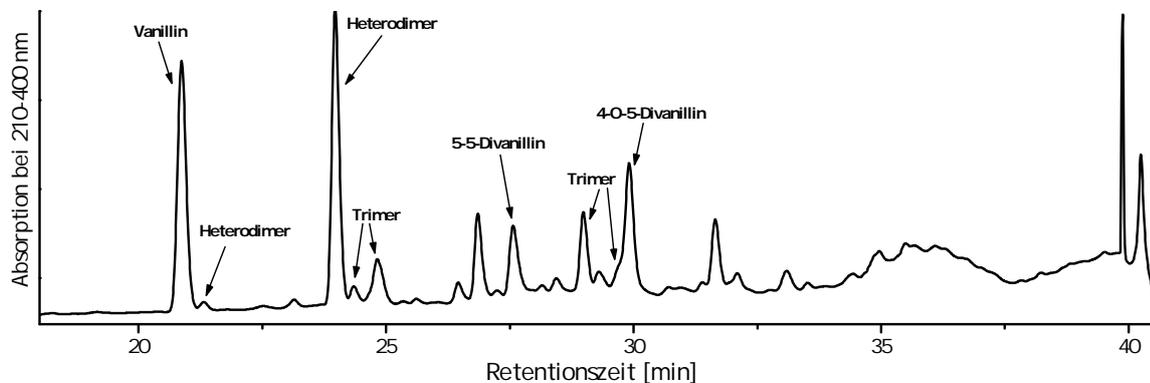
Die enzymatische Kopplung wurde unter Einsatz von [<sup>13</sup>C]Ethylferulat wiederholt, das, wie in Kapitel 8.3.1 und 8.3.2 beschrieben, hergestellt wurde. Ausgehend von etwa 1 g [<sup>13</sup>C]FS wurden in dieser Reaktion mit anschließender Aufreinigung 2,5 mg des *trans-trans-trans*-Isomers und 34,2 mg des *cis-trans-trans*-Isomers der [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]8-8(THF)-DFS erhalten (Gesamtausbeute 3,7 %). Auf die Aufreinigung von 12,5 mg der Fraktion, die das *trans-cis-trans*-Isomer enthielt, wurde verzichtet, da dieses im Gegensatz zur ersten Durchführung stärker verunreinigt und für die Methodenentwicklung nicht erforderlich war (Kapitel 4.5.2). Zusätzlich wurden bei dieser Synthese 51,6 mg [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]8-5(nc)-DFS (5,2 %

<sup>1</sup> Zum besseren Verständnis werden im Folgenden die Ergebnisse der Strukturaufklärung (Kapitel 4.3.1) vorweggenommen.

Ausbeute), 93,9 mg [ $^{13}\text{C}_2$ ]8-5(c)-DFS (9,4 % Ausbeute), 9 mg [ $^{13}\text{C}_2$ ]8-5(dc)-DFS (0,9 % Ausbeute) und 3,2 mg 8-O-4-DFS (0,3 % Ausbeute) gewonnen.

#### 4.2.4 Synthese von 4-O-5-Dehydrodiferulasäure

Die Synthese von 4-O-5-DFS erfolgte in Abwandlung des Verfahrens von Ralph et al. (1994) und ist in Kapitel 8.3.5 detailliert beschrieben. Im ersten Reaktionsschritt wurde Vanillylalkohol einer oxidativen Radikalreaktion unter Verwendung von  $\text{Ag}_2\text{O}$  unterzogen. Die oxidativen Bedingungen führten dazu, dass neben der radikalischen Kopplung über die Positionen O-4 und 5 auch teilweise die primäre Alkoholgruppe oxidiert wurde. Dadurch entstand ein komplexes Produktgemisch aus Mono-, Di- und Trimeren, die sich aus Vanillylalkohol- und Vanillineinheiten zusammensetzten (Abbildung 26). Eventuell



**Abbildung 26:** Chromatogramm der HPLC-DAD-Messung eines Reaktionsgemisches nach oxidativer Kopplung von Vanillylalkohol mittels  $\text{Ag}_2\text{O}$ .

entstanden auch höhere Oligomere, die jedoch aufgrund des detektierten Massenbereichs ( $m/z$  100–500) nicht identifiziert wurden.

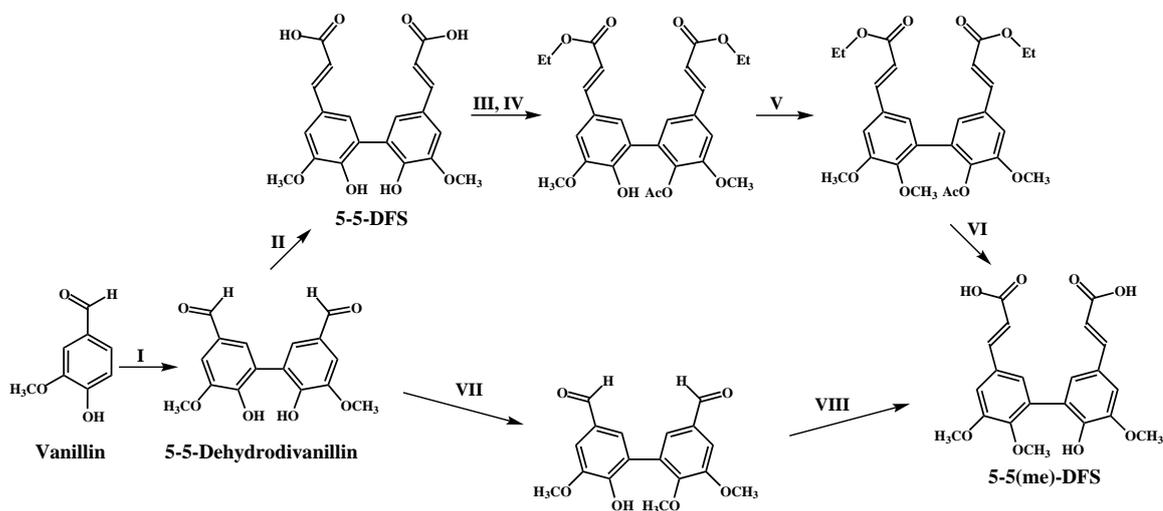
Eine erste Fraktionierung des Produktgemisches erfolgte mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel, da diese im Vergleich zur präparativen Dünnschichtchromatographie für den größeren Maßstab von knapp 1 g Ausgangsmaterial preiswerter und schneller durchführbar war. Dabei wurden vier Fraktionen erhalten, von denen diejenigen Fraktionen mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt wurden, welche 4-O-5-Dehydrodivanillin oder ein 4-O-5-gekoppeltes Heterodimer (Vanillin-Vanillylalkohol-Dimer) enthielten. Die Ausbeuten des isolierten Heterodimers lagen mit ca. 4 % weit unter den von Ralph et al. (1994) beschriebenen bis zu 30 %. Die geringere Ausbeute ist wahrscheinlich zum Teil der Reaktion selbst und nicht nur der weiteren Aufarbeitung des Reaktionsansatzes geschuldet, wie im Chromatogramm des Produktgemisches (Abbildung 26) ersichtlich ist. Bei 300 nm (UV-Maximum des Heterodimers) kann abgeschätzt werden, dass der Flächenanteil des Heterodimers nur etwa 20 % beträgt. Dagegen sind die Flächenanteile von 4-O-5- und 5-5-Dehydrodivanillins mit 11 bzw. 6 % größer als in der Literatur beschrieben (Ralph et al. 1994). Eventuell könnte auch die Fraktionierung mittels Flash-Chromatographie anstel-

le der präparativen Dünnschichtchromatographie zu Verlusten geführt haben, da hierbei einige Probleme auftraten. Theoretisch sollten jedoch beide Methoden weitgehend verlustfrei und nach dem gleichen Trennprinzip verlaufen. Auch die Ausbeute der anschließend durchgeführten Oxidation des Heterodimers zum 4-O-5-Dehydrodivanillin war mit ca. 63 % etwas geringer als in der Literatur beschrieben (77 %).

Für die Umsetzung des 4-O-5-Dehydrodivanillins zu 4-O-5-DFS bzw. [ $^{13}\text{C}_2$ ]4-O-5-DFS wurde ein doppelter Überschuss an Malonsäure bzw. [ $^{13}\text{C}_2$ ]Malonsäure eingesetzt. Die zweifache  $^{13}\text{C}$ -Markierung an Position 1 und 3 der Malonsäure wurde gewählt, damit sich die Isotopenmarkierung an den Carboxygruppen des Produktes befindet. Die auf Dehydrodivanillin bezogenen Ausbeuten nach 34 Tagen Reaktionszeit bei Raumtemperatur betragen 15 bzw. 24 %. In einer weiteren Reaktion mit gleichen stöchiometrischen Verhältnissen und einer Reaktionszeit von 18 Tagen konnte eine Ausbeute von 56 % erhalten werden. Weitere Untersuchungen zur Reaktionszeit und -temperatur könnten die Ausbeute dieser Reaktion weiter erhöhen.

#### 4.2.5 Synthesen von 5-5- und 5-5(methyl)-Dehydrodiferulasäure

Da zu Beginn dieser Arbeit nicht absehbar war, ob 5-5-DFS bzw. [ $^{13}\text{C}_2$ ]5-5-DFS aus den Reaktionsgemischen der oxidativen Kopplung mittels Cu[TEMED]-Komplex (Kapitel 4.2.2) isoliert werden können, wurden diese durch die enzymatische Kopplung von Vanillin zu 5-5-Dehydrodivanillin (Baumgartner und Neukom 1972) mit anschließender Knoevenagel-Reaktion hergestellt (Abbildung 27, Reaktionen I+II). Während die Umsetzung des Vanil-



**Abbildung 27:** Mögliche Reaktionswege zur Synthese von 5-5-Dehydrodiferulasäure (DFS) und der monomethylierten internen Standardsubstanz 5-5(me)-DFS. I: Peroxidase,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; II: Pyridin, Anilin, Malonsäure; III: Ethanol, Acetylchlorid; IV: Pyridin, Essigsäureanhydrid; V: Aceton,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , Iodmethan; VI: Ethanol,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaOH}$ ; VII: THF,  $\text{KOH}$ , Iodmethan; VIII: Pyridin, Anilin, Malonsäure.

lins nahezu quantitativ verlief, konnten in der Knoevenagel-Reaktion mit Doebner-Modi-

fikation unter Verwendung eines doppelten Überschusses an Malonsäure bzw. [ $^{13}\text{C}_2$ ]Malonsäure Ausbeuten von etwa 50 % (bezogen auf 5-5-Dehydrodivanillin) erreicht werden (Kapitel 8.3.3).

Zur Synthese der internen Standardsubstanz 5-5(me)-DFS wurde ein Syntheseweg ausgehend von 5-5-DFS vorgeschlagen (Lu und Ralph, University of Wisconsin–Madison, USA) und in dieser Arbeit getestet. Dieser beinhaltet die Veresterung der Carboxygruppen, eine Monoacetylierung, gefolgt von einer Methylierung der freien Hydroxygruppe und der Abspaltung der Schutzgruppen (Abbildung 27, Reaktionen III–VI). Unter Einsatz von 61,4 mg 5-5-DFS wurden über diesen Syntheseweg 17 mg 5-5(me)-DFS erhalten, was einer Gesamtausbeute von 27 % entspricht. Theoretisch kann diese Ausbeute verbessert werden, da die bei der Acetylierungsreaktion (Abbildung 27, Reaktion IV) nicht-acetylierten und diacetylierten Substanzen verseift und zurückgewonnen werden können. Dennoch ist dieses Verfahren aufgrund der vielen Reaktions- und Aufreinigungsschritte arbeits- und zeitaufwendig.

Vor Kurzem wurde ein weiteres Verfahren zur Synthese von 5-5(me)-DFS veröffentlicht (Zeller und Schatz 2015), dessen Schlüsselreaktion die Monomethylierung von 5-5-Dehydrodivanillin ist (Abbildung 27, Reaktion VII). Da das monomethylierte Zwischenprodukt durch Soxhlet-Extraktion mit  $\text{CHCl}_3$  isoliert werden kann, können große Mengen dieser Substanz mit wenig Arbeitsaufwand hergestellt werden. Nicht umgesetztes Dehydrodivanillin kann nach der Soxhlet-Extraktion erneut methyliert werden. Anschließend kann die Umsetzung zu 5-5(me)-DFS mittels Horner-Wadsworth-Emmons-Variante der Wittig-Reaktion erfolgen (Zeller und Schatz 2015). In dieser Arbeit wurde der letzte Schritt mittels Knoevenagel-Reaktion durchgeführt, wobei eine Ausbeute von etwa 50 % erzielt wurde (Kapitel 8.3.4). Verglichen mit den Ausbeuten der Wittig-Reaktion von etwa 55–70 % waren die Ausbeuten mittels Knoevenagel-Reaktion niedriger, allerdings war diese Reaktion mit einem geringeren Arbeits- und Zeitaufwand verbunden.

#### 4.2.6 Synthese von Ferulasäure-Cyclobutandimeren

Da die Anordnung der Monomere im Kristall über die Bildung von CBD und deren Regio- und Konfigurationsisomerie entscheidet (Kapitel 3.3.5), wurde zum einen untersucht, ob das Lösungsmittel, aus dem FS kristallisiert wird, einen Einfluss auf die Kristallstruktur hat. Zum anderen wurden einige FS-Derivate hergestellt und bestrahlt, um den Einfluss der substituierten Gruppen auf die Bildung von CBD zu untersuchen. Die Syntheseprodukte wurden mittels der in Kapitel 8.3.9 beschriebenen GC-MS-Methode untersucht. Diese Versuche wurden teilweise im Rahmen einer Masterarbeit durchgeführt (Hau 2016).

##### 4.2.6.1 Einfluss des Lösungsmittels

Die Kristallisation von etwa 30 mg FS aus MeOH, Aceton, Diethylether, THF, Dimethylsulfoxid (DMSO), ACN, Ethanol, Chloroform, Ethylacetat und  $\text{H}_2\text{O}$  resultierte vor der

ersten Bestrahlung in weißen Kristallen. Mit zunehmender Bestrahlungszeit (bis zu 260 h) färbten sich die Rückstände braun und konnten beim Trocknen nicht mehr auskristallisiert werden, sodass ein dunkles Öl zurückblieb. Die Untersuchung mittels GC-MS ergab, dass in allen Ansätzen neben einigen Nebenprodukten ein FS-CBD mit *ht*-Konstitution und einer Retentionszeit von 32,5 min (GC-MS-Analyse gemäß Kapitel 8.3.9) entstand. Die Struktur dieses Isomers konnte nach Isolierung (Kapitel 4.2.6.3) und in Kooperation mit den Novartis Institutes for BioMedical Research mittels Röntgenstrukturanalyse als  $\alpha$ -Truxillsäure-Derivat (Abbildung 15) identifiziert werden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass FS trotz der unterschiedlichen Polaritäten der Lösungsmittel in der energetisch günstigeren  $\alpha$ -Kristallstruktur auskristallisiert. Es muss erwähnt werden, dass die Proben während der Bestrahlung Temperaturen von 60–80 °C ausgesetzt waren. Diese Energie könnte einen wesentlichen Einfluss auf die Kristallmodifikation, aber auch auf die Entstehung von Nebenprodukten haben, die mittels GC-MS detektiert wurden.

#### 4.2.6.2 Einfluss der Derivatisierung

Die Synthesen von Ethylferulat, Bis(trimethylsilyl)-FS, FS-Acetat, *o*-Nitrophenyl-FS, *p*-Nitrophenyl-FS, FS-Tosylat und FS-Ethylestertosylat erfolgten im Zuge einer Masterarbeit (Hau 2016) anhand von Vorschriften aus der Literatur (Kapitel 8.3.8) (Purushotham Reddy et al. 2014; Yang et al. 2011; Hegde et al. 2009). Wie in Kapitel 3.3.5 beschrieben ist die Synthese von 1-*O*-Feruloyl- $\beta$ -*D*-glucose mit einigen Schwierigkeiten verbunden. Während das Zwischenprodukt 1-*O*-Feruloyl- $\beta$ -*D*-glucose-tetraacetat in einem unkomplizierten Reaktionsschritt synthetisiert und mittels flüssig-flüssig-Extraktion aufgereinigt werden kann (Shimotori et al. 2012), ist die anschließende Deacetylierung problematisch, da die Spaltung der Esterbindung zwischen FS und Glucose verhindert werden muss (Zhu und Ralph 2011). In ethanolischer NH<sub>3</sub>-Lösung (Gokhale 2011) wurde Feruloylglucose mit Ausbeuten von etwa 40 % aus Feruloyl- $\beta$ -*D*-glucose-tetraacetat gebildet, jedoch befanden sich im Reaktionsgemisch auch FS, Glucose, verschiedene 1-*O*-Feruloyl- $\beta$ -*D*-glucose-acetate und FS-Amid. Durch flüssig-flüssig-Extraktion mit Diethylether konnte FS effizient abgetrennt werden, wohingegen für die Entfernung der anderen Verunreinigungen im durchgeführten Maßstab von etwa 3 g Rohprodukt keine praktikable Möglichkeit gefunden wurde. Mittels präparativer HPLC, bei der sich die Retentionszeiten von 1-*O*-Feruloyl- $\beta$ -*D*-glucose und FS-Amid nur geringfügig unterschieden, wurden etwa 40 mg Feruloylglucose und 20 mg FS-Amid isoliert und für Bestrahlungsversuche eingesetzt (Kapitel 8.3.8).

Von allen FS-Derivaten wurden 10–100 mg aus MeOH kristallisiert und über einen Zeitraum von bis zu 170 h bestrahlt. In regelmäßigen Abständen wurden Aliquote entnommen, alkalisch hydrolysiert und mittels GC-MS analysiert. In den Reaktionsgemischen wurden insgesamt sechs verschiedene FS-CBD identifiziert, von denen vier Isomere in *hh*-Konstitution vorlagen. Da, wie in Kapitel 3.3.5 beschrieben, bei der Bestrahlung von Kristallen, die ausschließlich *trans*-FS-(Derivate) enthalten, maximal vier CBD entstehen

können, müssen dementsprechend FS-Derivate mit *cis*-Konfiguration im Kristallgitter vorhanden gewesen sein. Unter der Annahme, dass die Ausbeuten bei Verseifung und Trimethylsilylierung sowie die Ionisierung der einzelnen CBD-Isomere vergleichbar sind, können die Anteile der gebildeten Konstitutions- und Konfigurations-Isomere durch Integration der Peaks im TIC-Chromatogramm abgeschätzt werden. Die entsprechenden Flächenanteile sind ohne Berücksichtigung von Nebenprodukten in Tabelle 5 dargestellt.

**Tabelle 5:** Prozentuale Anteile der mittels GC-MS im Totalionenstrom bestimmten Peakflächen verschiedener Ferulasäure (FS)-Cyclobutandimere, die durch Bestrahlung von verschiedenen Ferulasäure-Derivaten und anschließender alkalischer Hydrolyse erhalten wurden.

Cyclobutandimer <sup>a</sup> :	20,1 (hh)	26,7 (hh)	27,0 (hh)	28,9 (ht)	32,5 (ht)	33,9 (hh)
<i>p</i> -Nitrophenyl-FS	-	6,2 %	86,5 %	2,2 %	5,1 %	-
<i>o</i> -Nitrophenyl-FS	-	56,6 %	29,2 %	8,3 %	5,8 %	-
FS-Acetat	-	-	-	-	100 %	-
Feruloylglucose	9,1 %	34,5 %	15,3 %	41,1 %	-	-
FS-Ethylester	-	-	-	-	-	-
FS-Tosylat	-	-	-	-	100 %	-
FS-Ethylestertosylat	3,9 %	52,6 %	16,9 %	7,5 %	17,4 %	1,8 %
FS-Amid	4,2 %	39,9 %	23,9 %	30,9 %	0,6 %	0,6 %
Bis(trimethylsilyl)-FS	-	-	-	-	100 %	-

<sup>a</sup> GC-MS Retentionszeit [min] (Konstitution), hh: Truxinsäure, ht: Truxillsäure.

Anhand dieser Daten ist ersichtlich, dass die Acetylierung, Tosylierung und Trimethylsilylierung im Vergleich mit nicht-derivatisierter FS keinen Einfluss auf das Produktspektrum nach Bestrahlung haben. Die anderen verwendeten FS-Derivate begünstigen dagegen die Entstehung von CBD mit abweichender Isomerie. Sie sind jedoch nicht spezifisch, sodass jeweils Gemische aus verschiedenen CBD entstehen. Anhand von LC-DAD-MS-Messungen wurde abgeschätzt, dass alle Produktgemische zu komplex und die CBD-Ausbeuten zu gering für eine präparative Aufreinigung waren. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Versuchen von Ichikawa et al. (2004), bei denen spezifische CBD mit Ausbeuten von 35–98 % erhalten wurden. Allerdings wurden in diesen Versuchen die Kristalle in Hexan suspendiert und in einem photochemischen Reaktor bestrahlt. Dadurch wurde eine gleichmäßige Bestrahlung aller Oberflächen bei niedrigeren Temperaturen und unter Sauerstoffausschluss erreicht.

#### 4.2.6.3 Bestrahlung von Ferulasäure und [<sup>13</sup>C]Ferulasäure

Da keine praktikable Möglichkeit gefunden wurde verschiedene FS-CBD-Isomere herzustellen, wurde lediglich das CBD des  $\alpha$ -Truxillsäure-Typs synthetisiert (Kapitel 8.3.9). Durch eine 190-stündige Bestrahlung von 500 mg FS, die regelmäßig aus MeOH neu auskristallisiert wurde, entstand das erwartete FS-CBD, das durch präparative HPLC in einer Ausbeute von 44 % isoliert wurde. Im Gegensatz dazu wurden durch Bestrahlung von 150 mg [<sup>13</sup>C]FS drei CBD-Isomere (GC-MS Retentionszeit 26,7; 27,0 und 32,5 min) gebil-

det, von denen zwei (GC-MS Retentionszeiten 27,0 und 32,5 min) in Ausbeuten von 5% bzw. 6% isoliert werden konnten. Die daraufhin erneute Bestrahlung von FS bestätigte wiederum die spezifische Bildung einer  $\alpha$ -Truxillsäure (Retentionszeit 32,5 min). Eventuell basieren die Unterschiede auf geringen Verunreinigungen der [ $^{13}\text{C}$ ]FS, die durch ihre Synthese verursacht wurden.

#### 4.2.6.4 *Ferulasäure-Cyclobutandimere in Zellwänden verschiedener Pflanzen*

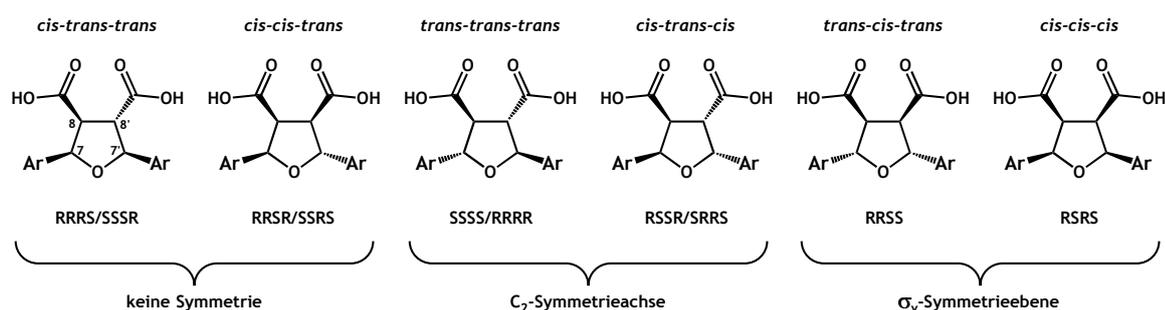
Um einen Überblick über die Vielfalt der Isomere der FS-CBD in Pflanzenzellwänden zu bekommen, wurden im Zuge einer Masterarbeit die alkalischen Hydrolysate von Blattspinat, Roggen, Hafer, Weidelgras und Futterwicke mittels GC-MS untersucht (Hau 2016). Die Proben wurden in Halm, Blatt, Ähre/Rispe und Korn getrennt, getrocknet, gemahlen und in einer Soxhlet-Apparatur schrittweise mit Ethanol, Ethylacetat und n-Hexan extrahiert. Die estergebundenen Phenolsäuren wurden mittels alkalischer Hydrolyse freigesetzt und mit Ethylacetat extrahiert. Der Extrakt wurde durch flüssig-flüssig-Extraktion mit  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gereinigt. Anhand dieser Extrakte wurde eine GC-MS-Methode entwickelt, mit der sechs Isomere des FS-Homodimers nachgewiesen werden konnten (Kapitel 8.3.9). Außerdem wurden neun *p*-CS-Homodimere und zwei Heterodimere, bestehend aus FS und *p*-CS, identifiziert. Die Methode eignet sich für qualitative Fragestellungen, da die Isomere gut voneinander getrennt werden, und anhand von Fragmentierungsmustern die Unterscheidung von Truxill- (ht) und Truxinsäuren (hh) erfolgen kann. Eine zuverlässige Bestimmung der Anteile der einzelnen CBD in den Proben ist mit dieser Methode jedoch nicht möglich, da sich die Bildung spezifischer Fragmente zwischen Truxill- und Truxinsäuren stark unterscheidet und die Verwendung des TIC-Signals aufgrund von Coelutionen mit Matrixbestandteilen fehlerhaft wäre. Allerdings kann anhand der untersuchten Proben geschlussfolgert werden, dass die Peakflächenverhältnisse der einzelnen FS-CBD je nach Probe stark variierten. Der Peak des FS-CBD mit  $\alpha$ -Truxillsäure-Konfiguration (Retentionszeit 32,5 min) war in allen Proben vorhanden und in einigen (Blättern von Spinat, Roggen, Weidelgras und Hafer, Halmen von Weidelgras und Hafer sowie Karyopsen von Roggen und Hafer) dominierend.

### 4.3 STRUKTURAUFKLÄRUNG NEUARTIGER OLIGOFERULASÄUREN

#### 4.3.1 Strukturaufklärung der Stereochemie der 8-8(Tetrahydrofuran)-Dehydrodiferulasäuren

In dieser Arbeit werden die 8-8(THF)-DFS-Isomere aus Gründen der besseren Übersicht anhand ihrer *cis-trans*-Isomerie benannt. Durch diese Nomenklatur wird die Enantiomerie nicht berücksichtigt, die anhand der durchgeführten Versuche nicht bestimmt werden konnte. Aufgrund des radikalischen Bildungsmechanismus wird davon ausgegangen, dass Enantiomerenpaare als Racemate gebildet und isoliert wurden.

8-8(THF)-DFS besitzt vier Stereozentren an Position 7, 7', 8 und 8'. Es sind prinzipiell sechs Diastereomere möglich, deren Strukturen in Abbildung 28 dargestellt sind. Vier der Diastereomere können als Enantiomerenpaare vorliegen, während zwei aufgrund einer vertikalen Symmetrieebene ( $\sigma_v$ ) *meso*-Verbindungen darstellen. Diastereomere verhalten sich chromatographisch und in der NMR-Spektroskopie unterschiedlich, Enantiomere sind dagegen nur unter Verwendung einer achiralen stationären Phase bzw. achiralen Substanzen im Lösungsmittel der NMR-Probe unterscheidbar.



**Abbildung 28:** Theoretisch mögliche Diastereomere der 8-8(THF)-Dehydrodiferulasäure und ihre Bezeichnungen die *cis-trans*-Isomerie beschreibend bzw. gemäß Cahn-Ingold-Prelog-Konvention. Ar: 4-Hydroxy-3-methoxyphenyl.

Die UV-Spektren der drei synthetisierten und isolierten Verbindungen wiesen Absorptionsmaxima bei etwa 280 nm auf (Abbildung 53), was in Kombination mit den mittels LC-MS bestimmten  $m/z$  von 403 ( $[M-H]^-$ ) das Vorhandensein von 8-8(THF)-DFS-Isomeren vermuten lies. Die GC-MS-Spektren wiesen eine große Übereinstimmung in der Art der Fragmente auf (Abbildung 52), wohingegen die Intensitäten einzelner Fragmente im Vergleich der drei isolierten Verbindungen und im Vergleich zur Literatur Unterschiede erkennen ließen (Schatz 2006). Insbesondere das Fragmentation mit  $m/z$  468, das vermutlich aus einer Ringöffnung und der Abspaltung eines Benzaldehyds resultierte sowie das Fragmentation mit  $m/z$  424 (Abspaltung einer aromatischen Seitenkette und einer Trimethylsilylgruppe) waren beim *cis-trans-trans*-Isomer um ein Vielfaches stärker vorhanden als bei den beiden anderen Isomeren. Auch bei der Fragmentierung mittels LC-MS/MS entstanden größtenteils gleiche Fragmente (Abbildung 51). Das Fragmentspektrum des *trans-cis*-

*trans*-Isomers unterschied sich jedoch von dem der anderen beiden dadurch, dass die Intensitäten des Quasimoleküliions und der Fragmente mit  $m/z$  297, 233 und 207 geringer bzw. nicht detektierbar waren. Die UV- und massenspektrometrischen Daten bestätigten das Vorliegen von 8-8(THF)-DFS, konnten jedoch keine gesicherten Hinweise auf die Konfiguration der Verbindungen geben.

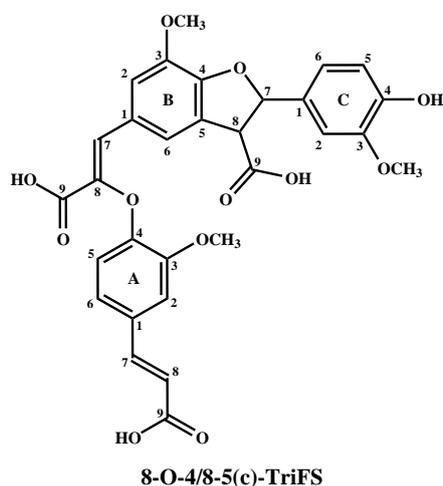
Anhand der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren konnten zusätzliche Informationen gewonnen werden (Abbildungen 54–56), da sich die THF-Derivate ohne Symmetrie von denen mit  $\text{C}_2$ -Symmetrieachse und  $\sigma_v$ -Symmetrieebene unterscheiden. Während die aliphatischen Protonen von asymmetrischen Molekülen jeweils unterschiedliche chemische Umgebungen – und dadurch unterschiedliche chemische Verschiebungen und Spin-Spin-Kopplungen – besitzen, sind bei den in Abbildung 28 dargestellten symmetrischen Molekülen die Protonen an Position 7 und 7' bzw. 8 und 8' chemisch (aber nicht magnetisch) äquivalent. Verglichen mit den Daten von Schatz et al. (2006) waren die UV-, Fragmentierungs- und NMR-Spektren eines der isolierten Isomere nahezu identisch, sodass dieses mit hoher Wahrscheinlichkeit als *cis-trans-trans*-Isomer identifiziert wurde. Theoretisch könnte es sich auch um das *cis-cis-trans*-Isomer handeln, dessen chemische Verschiebungen und Spin-Spin-Kopplungen im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum unbekannt sind. Die Untersuchung von alkalisch hydrolysierten UBS von Mais, Weizen, Zuckerrübe und Amaranth mittels GC-MS und LC-MS zeigten jedoch, dass die Retentionszeiten des dominierenden 8-8(THF)-DFS-Isomers denen des bei der Synthese hauptsächlich gebildeten Isomers entsprachen. Aus diesem Grund deuten alle gesammelten Daten darauf hin, dass es sich bei dieser Verbindung um das *cis-trans-trans*-Isomer handelt.

Die NMR-Spektren der beiden anderen Diastereomere zeigen jeweils ein Multiplett mit einer chemischen Verschiebung von 5,1–5,4 ppm (Protonen 7 und 7') und 3,3–3,6 ppm (Protonen 8 und 8'). Daraus kann geschlossen werden, dass es sich um symmetrische Verbindungen handeln muss. Des Weiteren wurde untersucht, ob aufgrund der  $^3\text{J}$ -Kopplungskonstanten der aliphatischen Protonen auf deren *cis-trans*-Konfiguration geschlossen werden kann. Dazu kann die Karplus-Beziehung herangezogen werden, die die Korrelation von  $^3\text{J}$ -Kopplungskonstanten und den Diederwinkeln von vicinalen Protonen beschreibt (Karplus 1959). Bei einem Diederwinkel von 70–110° sind Kopplungskonstanten von < 2 Hz zu erwarten, während bei Diederwinkeln von 0 bzw. 180° Kopplungskonstanten von 8–10 bzw. 10–14 Hz auftreten. Sechsringe liegen hauptsächlich in der Sesselkonformation vor, die geringe Winkel- und Torsionsspannungen besitzen. Die Diederwinkel von zwei axialen Protonen betragen etwa 180° und von zwei äquatorialen Protonen oder einem axialen und einem äquatorialen Proton etwa 60°. Durch die hohe Stabilität der Sesselkonformation ändern sich die Diederwinkel Protonen kaum, sodass die Kopplungskonstanten der NMR-Messung eine hohe Aussagekraft besitzen (Durette und Horton 1971).

In Fünfringen besitzen auch die stabilsten Konformationen – Briefumschlag- und Halbsesselkonformation – hohe Winkel- und Torsionsspannungen, sodass schnelle Konformationsänderungen stattfinden und sich die Diederwinkel ständig ändern. Die Pseudorotation verläuft im Vergleich zur NMR-Messung so schnell, dass eine zeitlich gemittelte Struktur der Verbindung gemessen wird. Am Beispiel von THF wurde gezeigt, dass die Kopplungskonstanten von *cis*-ständigen Protonen 7,37 bzw. 8,65 Hz und die von *trans*-ständigen Protonen 5,34 bzw. 5,44 Hz betragen (Wu und Cremer 2003). Dass die Kopplungskonstanten der 8-8(THF)-DFS mit *cis-trans-trans*-Konfiguration jedoch 8,55 Hz für die *cis*-ständigen und 8,68 Hz für die *trans*-ständigen Protonen betragen (Abbildung 54), weist die Grenzen der Karplus-Beziehung für Fünfringe auf und zeigt, dass die Kopplungskonstanten der unbekanntenen 8-8(THF)-DFS-Isomere nicht zu einer zweifelsfreien Bestimmung der Konfiguration herangezogen werden können (Schatz et al. 2006). Aus diesem Grund wurden die Strukturen der beiden symmetrischen Verbindungen in Kooperation mit den Novartis Institutes for BioMedical Research mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt. Die Messungen ergaben, dass die Verbindungen mit den GC-MS-Retentionszeiten von 40,2 und 41,15 min Isomere der 8-8(THF)-DFS mit *trans-cis-trans*- bzw. *trans-trans-trans*-Konfiguration sind.

#### 4.3.2 8-O-4/8-5(cyclisch)-Dehydrotriferulasäure

Teile der im Folgenden vorgestellten Ergebnisse wurden bereits im *Journal of Agricultural and Food Chemistry* publiziert (Waterstraat et al. 2016a).



**Abbildung 29:** Strukturformel der 8-O-4/8-5(c)-Dehydrotriferulasäure (TriFS). c: cyclisch.

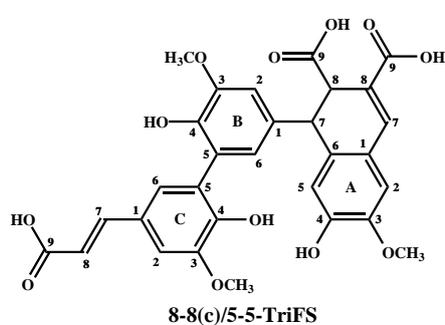
in einem Fehler von 2,7 ppm.

Das UV-Spektrum, das ein für FS-Derivate mit Propenylseitenkette typisches Absorptionsmaximum bei 323–326 nm zeigt, lieferte einen ersten Hinweis auf die Struktur der 8-O-4/8-5(c)-TriFS (Abbildung 53). Des Weiteren ist die breitere Schulter bei 290–300 nm im Vergleich zu anderen Bindungstypen ein Indiz für OFS mit 8-O-4-Bindungstyp (Dobberstein und Bunzel 2010a). Die Summenformel  $C_{30}H_{25}O_{12}$  für das Quasimolekülion  $[M-H]^-$  wurde mittels hochauflösender MS in Kooperation mit dem Max Rubner Institut, Institut für Sicherheit und Qualität bei Obst und Gemüse, bestätigt. Im MS-Modus wurde ein  $m/z$  von 577,1342 (theoretisch 577,1352) bestimmt, was einem Fehler von  $-1,7$  ppm entspricht. Die Interpretation von 46 Fragmenten im MS/MS-Modus resultierte in

Durch die Auswertung von ein- und zweidimensionalen NMR-Spektren ( $^1\text{H}$ , *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC), HMBC, *Correlation Spectroscopy* (COSY) und *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* (NOESY)) wurde die Struktur der 8-O-4/8-5(c)-TriFS eindeutig aufgeklärt. Zwei Protonensignale bei 6,00 und 4,37 ppm mit Kopplungskonstanten von 8,0 Hz ließen auf den Kopplungstypen einer 8-5(c)-DFS innerhalb des Trimers schließen (Ralph 1994). Außerdem waren nur zwei Dubletts mit Kopplungskonstanten von 16 Hz sichtbar, sodass auf die Beteiligung einer Position 8 im zweiten Bindungstyp geschlossen wurde. Zwei Doppeldubletts mit Kopplungskonstanten von etwa 8 und 2 Hz sowie zwei Dubletts mit Kopplungskonstanten von etwa 8 Hz signalisierten, dass zwei FS-Einheiten über Protonen an Position 5 verfügen. Das bedeutet, dass die dritte FS-Einheit nicht über ihre Position 5, sondern über eine 8-O-4-Bindung gekoppelt sein muss. Theoretisch existieren zwei mögliche Regioisomere, die einen 8-O-4- und einen 8-5(c)-Kopplungstypen enthalten. Jedoch zeigt das Proton an Position B7, das mittels HSQC- und HMBC-Experimenten eindeutig zugeordnet werden konnte, ein Singulett und keine Korrelationen im COSY-Spektrum. Außerdem war im LC-MS/MS-Massenspektrum das Fragment  $m/z$  193 sichtbar. Dieses entspricht einem  $[\text{FS}-\text{H}]^-$ -Ion und ist charakteristisch für OFS mit mindestens einer endständigen FS-Einheit, die über Position O-4 gebunden ist. Für das zweite Regioisomer mit 8-O-4- und 8-5(c)-Kopplungstypen würde dieses Fragment – ebenso wie bei 8-8(nc)/8-O-4-TriFS (Kapitel 4.3.5) – nicht entstehen, da keine über Position O-4 gebundene, endständige FS-Einheit vorhanden ist. Aus diesen Gründen wurde geschlussfolgert, dass die Position 8 der B-Einheit in der 8-O-4-Kopplung mit der dritten FS-Einheit (A) involviert ist. Alle anderen Signale der verschiedenen NMR-Experimente sind in Übereinstimmung mit der in Abbildung 29 gezeigten Struktur und vergleichbar zu den NMR-Daten des 8-O-4/8-5(c)-DFS-Triethylesters (Bunzel Heuermann 2008). Da sich die chemischen Verschiebungen der Protonen B2 und B6 überlagern, konnten die  $^{13}\text{C}$ -Verschiebungen der direkt benachbarten C-Atome von 115,5 und 121,1 ppm nicht anhand der NMR-Daten zugeordnet werden, sondern wurden anhand von Literaturdaten zugeordnet (Bunzel Heuermann 2008). Außerdem wurden in den HMBC-Spektren unter den angewandten Parametern keine Kopplungen beobachtet, mit denen eine eindeutige Bestimmung der  $^{13}\text{C}$ -Verschiebung des Kohlenstoffs an Position B1 möglich wäre. Die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Verschiebungen aller anderen Positionen wurden eindeutig zugeordnet und sind in Tab. 16 aufgelistet (Waterstraat et al. 2016a). Die Bezeichnung nach IUPAC-Nomenklatur lautet: (5-[(Z)-2-Carboxy-2-(4-((E)-2-carboxyvinyl)-2-methoxyphenoxy)vinyl]-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-methoxy-2,3-dihydrobenzofuran-3-carboxylsäure.

## 4.3.3 8-8(cyclisch)/5-5-Dehydrotriferulasäure

Teile der im Folgenden vorgestellten Ergebnisse wurden bereits im *Journal of Agricultural and Food Chemistry* publiziert (Waterstraat et al. 2016a).



**Abbildung 30:** Strukturformel der 8-8(c)/5-5-Dehydrotriferulasäure (TriFS). c: cyclisch.

Das UV-Spektrum der 8-8(c)/5-5-TriFS zeigt ein für FS-Derivate mit Propenylseitenkette typisches Absorptionsmaximum bei 324–326 nm und eine Schulter bei 300–315 nm (Abbildung 53). Verglichen mit den einzelnen Bindungstypen der Dimere sind größere Ähnlichkeiten zur 5-5-DFS vorhanden. Die von 8-8(c)-DFS bekannten Charakteristika (UV-Absorptionsmaximum von 340 nm und zwei Schultern bei etwa 290 und 315 nm) sind dagegen kaum erkennbar (Dobberstein und Bunzel 2010a).

Mittels hochauflösender MS ohne Fragmentierung wurde in Kooperation mit dem Max Rubner Institut, Institut für Sicherheit und Qualität bei Obst und Gemüse ein Quasimolekülion mit einem  $m/z$  577,1348  $[M-H]^-$  ermittelt. Somit wurde die Summenformel  $C_{30}H_{25}O_{12}$  ( $m/z$  577,13515) mit einem Fehler von  $-0,7$  ppm bestätigt. Im MS/MS-Modus lag der Fehler unter Berücksichtigung von 22 Fragmenten bei 3,8 ppm.

Das  $^1H$ -Spektrum von 8-8(c)/5-5-TriFS wies unter anderem zwei Dubletts von Dubletts mit Kopplungskonstanten von 2,0 Hz und einer chemischen Verschiebung von 4,66 und 4,04 ppm sowie ein tieffeldverschobenes Singulett bei 7,70 ppm auf. Diese drei Signale sind charakteristisch für eine 8-8(c)-Kopplung (Ralph 1994). Da keine Doppeldubletts mit einer Aufspaltung von 8 Hz vorhanden waren, wurde geschlussfolgert, dass die dritte FS-Einheit über eine 5-5-Kopplung an Einheit B gebunden sein muss (Abbildung 30). Dieser Strukturvorschlag wurde durch die Interpretation von HSQC-, HMBC-, COSY- und NOESY-Spektren bestätigt. Unter anderem verdeutlicht die im NOESY-Spektrum erkennbare dipolare Kopplung der Protonen B6 und C6, dass sich diese Protonen räumlich nahe sind. Die chemischen Verschiebungen der  $^1H$ - und  $^{13}C$ -Kerne von 8-8(c)/5-5-TriFS sind Tabelle 16 zusammengefasst. Die Bezeichnung nach IUPAC-Nomenklatur lautet: (E)-1-[5'-(2-Carboxyvinyl)-2',6-dihydroxy-3',5-dimethoxy-(1,1'-biphenyl)-3-yl]-7-hydroxy-6-methoxy-1,2-dihydronaphthalen-2,3-dicarboxylsäure (Waterstraat et al. 2016a).

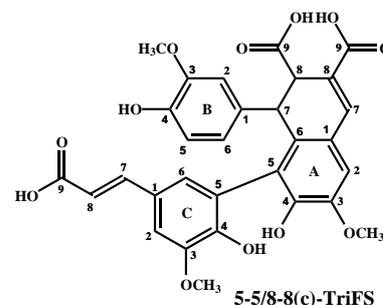
## 4.3.4 5-5/8-8(cyclisch)-Dehydrotriferulasäure

Das UV-Spektrum der 5-5/8-8(c)-TriFS mit einem UV-Absorptionsmaximum von 320–326 nm und einer Schulter bei etwa 290–300 nm (Abbildung 53) sowie das mittels LC-MS

bestimmte  $m/z$  von 577 ( $[M-H]^-$ ) gaben erste Hinweise auf das Vorhandensein einer TriFS.

Die Interpretation von ein- und zweidimensionalen NMR-Spektren ließ eindeutig auf die in Abbildung 31 dargestellte Struktur der 5-5/8-8(c)-DFS schließen. Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ließ ein Dublett und ein breites Singulett mit chemischen Verschiebungen von 3,79 und 4,37 ppm sowie ein Singulett mit einer chemischen Verschiebung von 7,79 ppm erkennen. Wie bereits beschrieben, lassen diese Signale das Vorhandensein eines 8-8(c)-Kopplungstyps vermuten (Ralph et al. 1994). Allerdings war im aromatischen Bereich lediglich ein weiteres Singulett mit einer chemischen Verschiebung von 7,26 ppm vorhanden, was darauf hinwies, dass die dritte FS-Einheit über das Proton an Position A5 gekoppelt ist. Die im  $^1\text{H}$ -Spektrum vorhandenen beiden Dubletts mit Kopplungskonstanten von 15,9 Hz führten zu dem Schluss, dass die dritte FS-Einheit nicht über Position 8 gekoppelt sein kann.

Des Weiteren waren im Spektrum ein Dublett von Dubletts mit Kopplungskonstanten von 8,1 und 2,0 Hz und ein Dublett mit einer Kopplungskonstante von 8,1 Hz vorhanden, die von den Protonen an Position B6 und B5 stammen. Da kein weiteres Dublett von Dubletts bzw. Dublett mit einer 8 Hz-Aufspaltung zu sehen war, wurde darauf geschlossen, dass die dritte FS-Einheit über eine 5-5-Kopplung gebunden vorliegt (Abbildung 31). Alle Signale aus HSQC-, HMBC-, COSY- und NOESY-Spektren bestätigten diese Struktur und konnten wie in Tabelle 16 zusammengefasst zugeordnet werden. Die Bezeichnung nach IUPAC-Nomenklatur lautet: 8-[5-[(1*E*)-2-Carboxyeth-1-en-1-yl]-2-hydroxy-3-methoxyphenyl]-7-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-6-methoxy-1,2-dihydronaphthalen-2,3-dicarboxylsäure.



**Abbildung 31:** Strukturformel der 5-5/8-8(cyclisch)-Dehydrotriferulasäure. c: cyclisch.

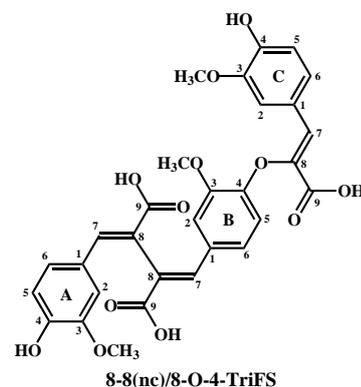
#### 4.3.5 8-8(nicht cyclisch)/8-O-4-Dehydrotriferulasäure

Das UV-Spektrum von 8-8(nc)/8-O-4-TriFS zeigt ebenfalls ein Absorptionsmaximum von 320–323 nm und eine vergleichsweise breite Schulter bei 290–305 nm, die einen 8-O-4-Kopplungstypen vermuten ließ (Abbildung 53).

Die Interpretation der ein- und zweidimensionalen NMR-Spektren ermöglichte zwar eine eindeutige Strukturaufklärung, jedoch konnten aufgrund ähnlicher chemischer Verschiebungen einiger  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Kerne nicht alle Signale eindeutig zugeordnet werden

(Tabelle 16). Das  $^1\text{H}$ -Spektrum wies drei derjenigen Signalgruppen auf, die, wie bereits beschrieben, charakteristisch für nicht-substituierte 5-Positionen sind.

Diese sind Dubletts von Dubletts mit Kopplungskonstanten von 8 und 2 Hz und Dubletts mit Kopplungskonstanten von 8 Hz, die auch im COSY-Spektrum koppeln. Außerdem waren keine Signale mit Kopplungskonstanten von etwa 16 Hz (oder 10 Hz) vorhanden, die auf unsubstituierte *trans*- (oder *cis*-) Doppelbindungen hinweisen würden. Aus diesen Informationen wurde geschlossen, dass die Positionen 8 aller drei FS-Einheiten substituiert sind, während alle Positionen 5 unsubstituiert vorliegen. Somit ist nur die in Abbildung 32 dargestellte Struktur möglich. Auch die Anzahl und Art der anderen Protonensignale im  $^1\text{H}$ -Spektrum sowie die aus HSQC-, HMBC-, COSY- und NOESY-Experimenten abgeleiteten Kopplungen stehen mit dieser Struktur in Einklang, wenngleich einige der Signale nicht eindeutig zugeordnet werden können. Die nicht eindeutige Zuordnung ist in Tabelle 16 durch hochgestellte Buchstaben kenntlich gemacht. Die Bezeichnung nach IUPAC-Nomenklatur lautet: (2*E*,3*E*)-2-[(4-[(1*Z*)-1-carboxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)eth-1-en-1-yl]oxy)-3-methoxyphenyl)methyliden]-3-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)methyliden]butandisäure.



**Abbildung 32:** Strukturformel der 8-8(nc)/8-O-4-Dehydrotriferulasäure (TriFS). nc: nicht cyclisch.

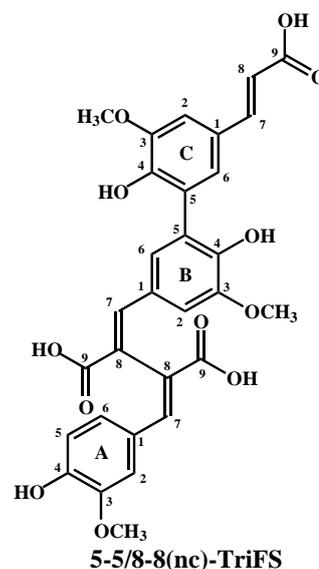
#### 4.3.6 5-5/8-8(nicht cyclisch)-Dehydrotriferulasäure

Wie auch bei den bereits diskutierten TriFS diente das UV-Spektrum der 5-5/8-8(nc)-TriFS als erster Anhaltspunkt für die Identifizierung als FS-Derivat (Abbildung 53). Das durch LC-MS ermittelte  $m/z$  von 577 ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ) gab Grund zur Annahme, dass es sich bei dieser Verbindung um eine TriFS handelt.

Das  $^1\text{H}$ -Spektrum zeigte unter anderem zwei Dubletts mit einer Kopplungskonstante von 15,9 Hz, die auf der *trans*-Doppelbindung einer nicht substituierten Propenylseitenkette (Position 7 und 8) basieren. Außerdem waren ein Doppeldublett ( $^3J=8,2$  und  $2,0$  Hz) und die Signale der entsprechenden Kopplungspartner zu sehen. Das bedeutet, dass zwei der drei Positionen 8 und zwei der Positionen 5 in Bindungen involviert sind. Aus diesen Informationen ergeben sich jedoch zwei mögliche Regioisomere (5-5/8-8(nc)- und 8-5(nc)/8-5(nc)-TriFS), von denen keines anhand der durchgeführten HSQC-, HMBC-, COSY- und NOESY-Experimente ausgeschlossen werden konnte. Dies lag zum einen daran, dass sich zwei der Dubletts mit einer Kopplungskonstante von  $2,0$  Hz exakt überlagerten. Zum anderen konnten die Bindungstypen auch deshalb nicht unterschieden werden, da die  $^{13}\text{C}$ -Atome sowohl in Position 5 als auch in Position 8 eine chemische Verschiebung von 125–126 ppm haben, unabhängig davon, ob sie in eine 5-5-, 8-8(nc)-, oder

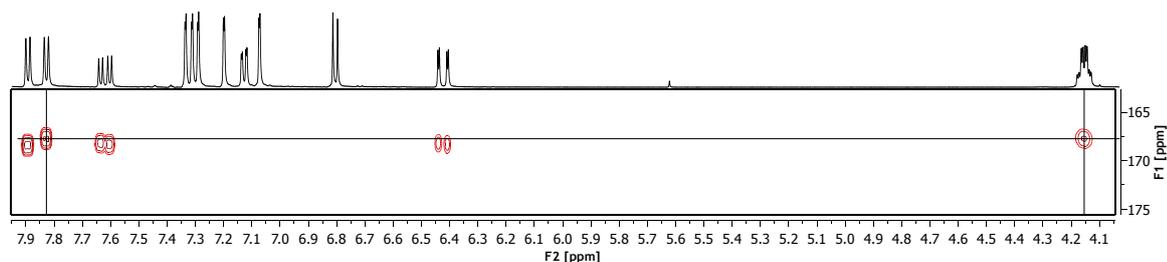
8-5(nc)-Kopplung involviert sind.

Aus diesem Grund wurde nach weiteren Möglichkeiten gesucht, die Struktur dieser Verbindung eindeutig zu identifizieren. Wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben, wurde das Produktgemisch der Synthese mit Cu[TEMED]-Komplex zunächst mittels Flash-Chromatographie fraktioniert. In der vierten Fraktion befanden sich neben einigen TriFS auch zwei mutmaßliche TriFS-Monoethylester ( $m/z$  605  $[M-H]^-$ ), die durch unvollständige Verseifung dieser Fraktion bedingt waren. Nach der anschließend durchgeführten Sephadex-LH20-Chromatographie befanden sich diese in den Fraktionen VI und VII. Analog dazu befanden sich in den Fraktionen VI und VII nach Synthese von  $^{13}C$ -markierten OFS zwei mutmaßliche  $[^{13}C_3]$ TriFS-Monoethylester ( $m/z$  608  $[M-H]^-$ ), von denen 12,5 mg der Verbindung aus Fraktion VI mittels präparativer HPLC isoliert und ein Teil davon erneut verseift wurde. LC-DAD-MS-Messungen ergaben, dass durch die Verseifung eine  $[^{13}C_3]$ TriFS ( $m/z$  580  $[M-H]^-$ ) entstand, deren Retentionszeit und UV-Spektrum denen der diskutierten Verbindung



**Abbildung 33:** Strukturformel der 5-5/8-8(nc)-Dehydrotriferulasäure (TriFS). nc: nicht cyclisch.

(5-5/8-8(nc)-TriFS, Abbildung 33) glichen. Da der Diethylester von 8-8(nc)-DFS im Vergleich zu anderen DFS-Diethylestern stabiler gegenüber der alkalischen Hydrolyse ist (Kapitel 4.2.2), wurde vermutet, dass es sich bei dem unvollständig hydrolysierten Trimer um 5-5/8-8(nc)-TriFS-Monoethylester handelt. Um diese These zu untermauern wurden ein- und zweidimensionale NMR-Spektren des  $[^{13}C_3]$ TriFS-Monoethylesters aufgenommen. Wie erwartet waren im  $^1H$ -Spektrum dieser Verbindung zusätzliche Signale der Ethylgruppe zu sehen. Außerdem wurden die Signale der Protonen an Position 7 und 8 aufgrund der  $^{13}C$ -markierten Carboxygruppen zusätzlich mit Kopplungskonstanten von 7,4 Hz ( $^3J$ ) bzw. 2,7 Hz ( $^2J$ ) aufgespalten. Im HMBC-Spektrum, in dem die Kopplungen von Protonen mit Carboxy-C-Atomen um ein Vielfaches intensiver zu sehen waren als andere Kopplungen, konnte ein C-Atom ( $\delta_C=167,7$  ppm) ermittelt werden, das sowohl mit der Methylengruppe der Ethylgruppe ( $\delta_H=4,15$  ppm), als auch mit einem Proton an Position 7 ( $\delta_H=7,83$  ppm) koppelte (Abbildung 34). Da das tieffeldverschobene Proton lediglich durch eine 7,4 Hz-Kopplungskonstante aufgespalten ist ( $^3J$ -Kopplung zum Carbonyl-C), muss es sich um das Proton einer FS-Einheit handeln, die sowohl über Position 8 gebunden, als auch als Ethylester vorliegt. Für den Fall, dass die isolierte Verbindung einen  $[^{13}C_3]$ 8-5(nc)/8-5(nc)-Ethylester darstellt, würde dies bedeuten, dass ein Großteil des bei der oxidativen Kopplung von Ethylferulat entstandenen  $[^{13}C_3]$ 8-5(c)/8-5(c)-Triethylesters bei der anschließenden Verseifungsreaktion eine Ringöffnung (Abspaltung des Protons an Position 8 unter Ausbildung einer Doppelbindung und Protonierung der phenolischen Gruppe) erfuhr, ohne dass die benachbarte Ethylgruppe abgespalten wurde. Da ein sol-



**Abbildung 34:** Das HMBC-Spektrum des 5-5/8-8(nc)-Dehydrodiferulasäure-Monoethylesters verdeutlicht, dass eines der Carbonyl- $^{13}\text{C}$ -Atome sowohl mit den Protonen einer Carbonylgruppe als auch mit einem Proton an Position-7 koppelt. nc: nicht cyclisch.

cher Reaktionsmechanismus bisher nicht für 8-5-gekoppelte DFS beschrieben wurde, deuten alle Daten darauf hin, dass es sich bei der diskutierten TriFS vermutlich um 5-5/8-8(nc)-TriFS (Abbildung 33) handelt. Dennoch war eine eindeutige Strukturaufklärung anhand der durchgeführten Versuche nicht möglich. Die vorläufige Bezeichnung nach IUPAC-Nomenklatur lautet: (2*E*,3*E*)-2-[(3-5-[(1*E*)-2-carboxyeth-1-en-1-yl]-2-hydroxy-3-methoxyphenyl-4-hydroxy-5-methoxyphenyl)methyliden]-3-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)methyliden]butandisäure.

#### 4.3.7 Dehydrotetraferulasäuren

Nicht alle der synthetisierten und isolierten TetraFS konnten anhand der durchgeführten Experimente eindeutig identifiziert werden. Deshalb wurden diese vorläufig anhand ihrer Retentionszeiten im Chromatogramm der LC-DAD-MS/MS-Methode benannt (Kapitel 8.5.2). Dennoch konnten einige Aussagen über die Verbindungen getroffen werden, die im folgenden diskutiert werden.

Die mittels LC-MS bestimmten  $m/z$  von 769 entsprechen dem Quasimolekülion  $[\text{M} - \text{H}]^-$  einer TetraFS. Anhand der Retentionszeiten der TetraFS – 31,0, 32,8, 35,3, 39,4 und 41,8 min – können erste Hinweise auf die Kopplungstypen erhalten werden, da von DFS und TriFS bekannt ist, dass unter den verwendeten Bedingungen Verbindungen, die 8-8- und 8-5(nc)-Bindungen enthalten tendenziell früher eluieren, wohingegen OFS, die 8-5(c)- und 8-O-4-Bindungen enthalten, tendenziell stärker retardiert werden. Die in Abbildung 53 dargestellten UV-Chromatogramme zeigen Absorptionsmaxima bei etwa 320 nm, während die für FS-Derivate ebenso typische Schulter bei 290–310 nm bei einigen TetraFS nur schwach oder gar nicht ausgeprägt ist. Weitaus aussagekräftigere Informationen konnten durch Interpretation der ein- und zweidimensionalen NMR-Spektren erhalten werden. Die NMR-Daten sind in den Tabellen 16 und 18 zusammengefasst.

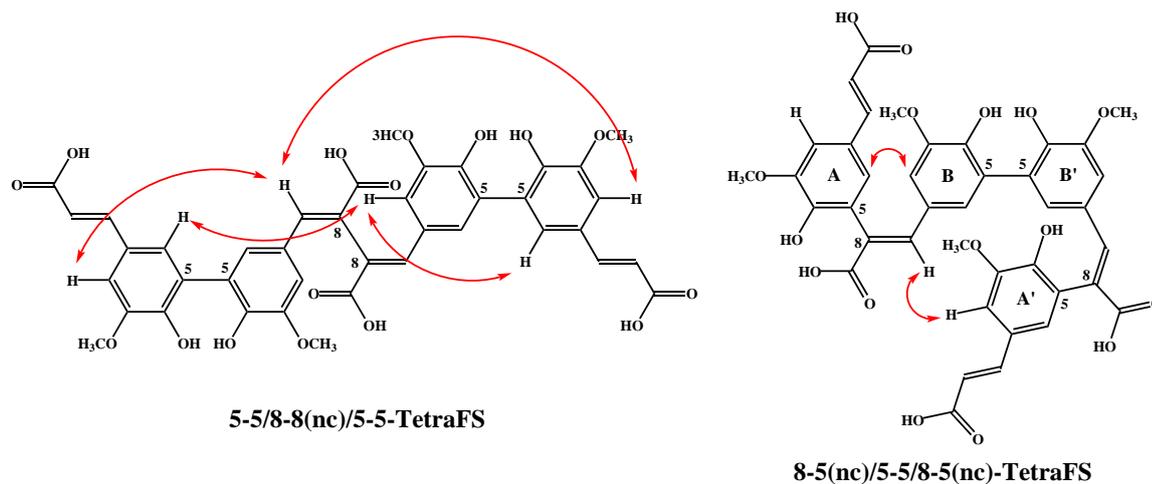
4.3.7.1 *TetraFS 31,0 min*

Der aliphatische Bereich der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von TetraFS 31,0 min wies lediglich vier Singulets auf, die den vier Methoxygruppen entsprechen. Demnach konnten die Kopplungstypen 8-8(c) und 8-5(c) ausgeschlossen werden. Des Weiteren waren im  $^1\text{H}$ -Spektrum ein Doppeldublett mit Kopplungskonstanten von etwa 8 und 2 Hz sowie ein Dublett mit einer Kopplungskonstante von etwa 8 Hz vorhanden, die auf aromatischen Protonen in *ortho*-Stellung und deren Kopplung beruhen. Diese Kopplung wurde mit Hilfe eines COSY-Experiments bestätigt. Daraus wurde geschlossen, dass eine der vier FS-Einheiten eine unsubstituierte Position 5 besitzt, während die anderen drei über Position 5 gekoppelt vorliegen. Ebenso wurde anhand der beiden Dubletts mit einer Kopplungskonstante von etwa 16 Hz abgeleitet, dass eine der FS-Einheiten an Position 8 unsubstituiert vorliegt, während die anderen drei FS-Einheiten über Position 8 in Kopplungen involviert sind. Drei Singulets mit chemischen Verschiebungen von 7,8–7,9 ppm bestätigen diese These.

Anhand dieser Informationen sind vier Strukturvorschläge möglich, deren Verifizierung bzw. Falsifizierung mittels NMR-Experimenten ähnliche Probleme bereiten wie die der Identifizierung von 5-5/8-8(nc)-TriFS (Kapitel 4.3.6). Die vier Strukturvorschläge lauten 8-5(nc)/8-8(nc)/5-5-, 8-8(nc)/8-5(nc)/5-5-, 8-5(nc)/8-5(nc)/8-5(nc)- und 8-5(nc)/5-5/8-8(nc)-TetraFS.

4.3.7.2 *8-5(nc)/5-5/8-5(nc)-Dehydrotetraferulasäure*

Die geringe Anzahl an Signalen (sieben im aromatischen und zwei im aliphatischen Bereich) deutete darauf hin, dass die nach 32,8 min eluierende TetraFS eine symmetrische Verbindung darstellt. Da kein Dublett von Dubletts und ein Dublett mit einer Kopplungskonstante von 15,9 Hz vorhanden war, müssen alle vier FS-Einheiten in Position 5 substituiert und zwei der FS-Einheiten in Position 8 substituiert vorliegen. Aufgrund dieser Informationen erschienen zwei Regioisomere möglich, 5-5/8-8(nc)/5-5- und 8-5(nc)/5-5/8-5(nc)-TetraFS, denen auch die restlichen Protonensignale (vier Dubletts mit Kopplungskonstanten von etwa 2 Hz) und die Signale aus HSQC-, HMBC- und COSY-Experimenten zugeordnet werden konnten. Die Strukturen beider Möglichkeiten sind in Abbildung 35 dargestellt. Im NOESY-Spektrum, das Kopplungen von räumlich nahegelegenen Protonen sichtbar macht, waren unter anderem zwei Signale zu erkennen, die in Abbildung 35 durch rote Pfeile signalisiert werden. Wie zu erkennen ist, lassen sich diese Signale nur anhand von 8-5(nc)/5-5/8-5(nc)-TetraFS erklären, da sich die entsprechenden Protonen im Falle der 5-5/8-8(nc)/5-5-TetraFS räumlich nicht nahe genug ( $< 4 \text{ \AA}$ ) kommen können (Richards und Hollerton 2011). Aus diesem Grund wird davon ausgegangen, dass es sich bei der TetraFS 32,8 min um 8-5(nc)/5-5/8-5(nc)-TetraFS handelt.



**Abbildung 35:** Strukturformeln der in dieser Arbeit synthetisierten und isolierten 8-5(nc)/5-5/8-5(nc)-Dehydrotetraferulasäure (TetraFS, rechts) und der regioisomeren Verbindung 5-5/8-8(nc)/5-5-Dehydrotetraferulasäure (links). Die roten Pfeile signalisieren Kopplungen, welche in NOESY-NMR-Experimenten beobachtet wurden und nur anhand der rechten Struktur erklärt werden können. nc: nicht cyclisch.

#### 4.3.7.3 TetraFS 35,3 min

Im aliphatischen Bereich des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von TetraFS 35,3 min waren keine Signale vorhanden, die charakteristisch für 8-5(c)- oder 8-8(c)-Kopplungstypen sind. Vier Dubletts mit einer Kopplungskonstante von etwa 16 Hz signalisierten das Vorhandensein von zwei nicht-substituierten Propenylseitenketten. Das bedeutet, dass die anderen beiden FS-Einheiten über Position 8 in Bindungen involviert sind. Außerdem waren ein Doppeldublett ( $^3J=8,4$  und  $^4J=2,0$  Hz) und ein Dublett ( $^3J=8,4$  Hz) vorhanden, die eine nicht-substituierte Position 5 signalisierten. Somit sind drei FS-Einheiten über die Position 5 gekoppelt, woraus geschlossen werden kann, dass eine FS-Einheit über eine der O-4-Positionen gekoppelt sein muss. Auch wenn unter den dimeren und trimeren Reaktionsprodukten der oxidativen Kopplung von Ethylferulat keine 4-O-5-Kopplung identifiziert wurde, kann dieser Kopplungstyp bei Tetrameren nicht ausgeschlossen werden. Beispielsweise ist von der Biosynthese von Lignin bekannt, dass Monolignole bevorzugt über die  $\beta$ -Position an das bestehende Polymer binden. Dennoch können innerhalb des Lignin-Netzwerks 4-O-5-gekoppelte Struktureinheiten gefunden werden, die hauptsächlich auf die Kopplung von zwei polymeren Lignin-Strukturen zurückzuführen sind (Ralph et al. 2007). Durch Synthese, Isolierung und Strukturaufklärung des Tetraethylesters von 8-5(c)/4-O-5/8-5(c)-TetraFS konnte gezeigt werden, dass auch bei der oxidativen Kopplung von Ethylferulat die Bildung von 4-O-5-Struktureinheiten möglich ist, indem wahrscheinlich zwei dimere Radikale über ihre O-4- und 5-Positionen miteinander reagieren (Bunzel et al. 2008b).

Daraus folgt, dass die Kopplungen der TetraFS 35,3 min entweder über 8-O-4-, 8-5(nc)- und 5-5- oder 4-O-5-, 5-5- und 8-8(nc)- oder 4-O-5-, 8-5(nc)- und 8-5(nc)-Struktureinheiten erfolgen, was zu einer hohen Anzahl möglicher Regioisomere führt. Eine TetraFS mit

Kopplungen über 8-O-4-, 8-5(nc)- und 5-5-Struktureinheiten wurde bereits von Bunzel et al. (2006) aus Maiskleie isoliert und durch Vergleich der chemischen Verschiebungen mit authentischen TriFS als 8-O-4/5-5/8-5(nc)-DFS identifiziert. Im Vergleich zu dieser TetraFS unterschieden sich jedoch einige der in Aceton- $d_6$  bestimmten chemischen Verschiebungen der TetraFS 35,3 min so stark, dass nicht von identischen Verbindungen ausgegangen werden konnte. Somit war es anhand der durchgeführten Experimente nicht möglich, die genaue Struktur der TetraFS 35,3 min zu identifizieren.

#### 4.3.7.4 TetraFS 39,4 min

Durch die gleiche Vorgehensweise wie zur Identifizierung der anderen Tri- und TetraFS wurden auch die NMR-Spektren der TetraFS 39,4 min ausgewertet. Dadurch wurde ermittelt, dass eine 8-8(c)-Kopplung (zwei aliphatische Protonen mit den chemischen Verschiebungen  $\delta_{\text{H}}=4,64$  und  $4,02$  ppm, die direkt an Kohlenstoffatome mit den chemischen Verschiebungen  $\delta_{\text{C}}=46,1$  und  $47,5$  ppm gebunden waren) in dem Molekül vorliegt. Zwei Dubletts mit Kopplungskonstanten von 16 Hz deuten darauf hin, dass eine weitere FS-Einheit über Position 8 gebunden ist und drei FS-Einheiten über Position 5 in Bindungen involviert sind. Daraus ergaben sich die Kopplungstypen 8-8(c), 8-5(nc) und 5-5 und somit eine Vielzahl an möglichen Regioisomeren für die TetraFS 39,4 min. Anhand der durchgeführten Experimente konnte daher die Struktur nicht eindeutig bestimmt werden.

#### 4.3.7.5 TetraFS 41,8 min

Die Auswertung der NMR-Spektren von TetraFS 41,8 min ergab, dass keine 8-5(c)- oder 8-8(c)-Strukturen vorlagen und drei der FS-Einheiten über Position 8 sowie zwei der FS-Einheiten über Position 5 gebunden vorliegen müssen. Daraus wurde geschlossen, dass eine der O-4-Positionen in eine Bindung involviert ist, wobei sowohl eine 8-O-4- als auch eine 4-O-5-Kopplung möglich ist. Da die Unterscheidung zwischen 8-5(nc)-, 8-8(nc)- und 5-5-Kopplungstypen, wie in Kapitel 4.3.6 beschrieben, anhand von NMR-Daten nicht eindeutig möglich ist, sind für TetraFS 41,8 min drei Kombinationen von Kopplungstypen möglich. Diese sind 4-O-5, 8-8(nc) und 8-5(nc) oder 8-O-4, 5-5 und 8-8(nc) oder 8-O-4, 8-5(nc) und 8-5(nc). Somit resultiert für die Regioisomerie der TetraFS 41,8 min eine Vielzahl an Möglichkeiten, die im Zuge dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurden.

## 4.4 NACHWEIS BISLANG NICHT BESCHRIEBENER OLIGOFERULASÄUREN IN PFLANZENZELLWÄNDEN

Das natürliche Vorkommen der synthetisierten OFS wurde anhand von UBS aus Mais, Weizen, Zuckerrübe und Amaranth untersucht. Dazu wurden die UBS dieser Proben isoliert (Kapitel 8.4), verseift und die freigesetzten Phenolcarbonsäuren nach Ansäuern mit Diethylether extrahiert. Da teilweise nur geringe Mengen der Verbindungen zu erwarten waren, wurden bis zu 100 mg UBS eingesetzt. Die Extrakte wurden mittels LC-MS/MS und im Falle der 8-8(THF)-DFS zusätzlich mittels GC-MS analysiert.

### 4.4.1 Nachweis der Diastereomere von 8-8(Tetrahydrofuran)-Dehydrodiferulasäure

Zum Nachweis der Diastereomere der 8-8(THF)-DFS wurden die Pflanzenproben mittels GC-MS im *Single Ion Monitoring* (SIM)-Modus analysiert, wobei auf Basis der Fragmentierungsmuster der Standardsubstanzen (Abbildung 52) die Ionen mit  $m/z$  692, 677, 453, 354, 338 und 264 selektiert wurden. Unter Verwendung der in Kapitel 8.3.7 beschriebenen gaschromatographischen Bedingungen eluierten die 8-8(THF)-DFS mit *cis-trans-trans*-, *trans-cis-trans*- bzw. *trans-trans-trans*-Konfiguration nach 40,05; 40,2 bzw. 41,15 min. Durch Vergleich dieser Retentionszeiten mit denen der Peaks in den Chromatogrammen der Pflanzenproben konnten die drei Diastereomere in Mais, Weizen und Zuckerrübe nachgewiesen werden, wohingegen in Amaranth bei den entsprechenden Retentionszeiten keine Peaks detektiert wurden.

Zur Analyse mittels LC-MS/MS erfolgte die Trennung an einer C18-Säule unter Verwendung eines binären Gradienten aus MeOH und H<sub>2</sub>O mit jeweils 0,01 % Ameisensäure (8.3.7). Unter diesen Bedingungen ließen sich die Diastereomere der 8-8(THF)-DFS voneinander trennen und eluierten nach 24,1 min (*trans-trans-trans*-Isomer), 26,8 min (*trans-cis-trans*-Isomer) bzw. 30,0 min (*cis-trans-trans*-Isomer). Die Proben wurden im SIM-Modus ( $m/z$  403) sowie im MS/MS-Modus analysiert, wobei die charakteristischen Fragmentationen mit  $m/z$  148, 151 und 163 (Mutterion  $m/z$  403) betrachtet wurden (Abbildung 51). Durch Vergleich der Retentionszeiten konnten sowohl die Quasimoleküle im SIM-Modus, als auch die charakteristischen Fragmentationen der drei Diastereomere in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden. Peaks, die Hinweise auf die Existenz weiterer Diastereomere geben, wurden unter den verwendeten Bedingungen nicht beobachtet.

#### 4.4.2 Nachweis bislang nicht beschriebener Dehydrotri- und -tetraferulasäuren

Teile der im Folgenden vorgestellten Ergebnisse wurden bereits im *Journal of Agricultural and Food Chemistry* publiziert (Waterstraat et al. 2016a).

Zum Nachweis bislang unbekannter TriFS und TetraFS wurden die Pflanzenproben mit Hilfe von zwei LC-MS/MS-Methoden, die sich durch die Gradientenzusammensetzung der mobilen Phase unterschieden, untersucht. Dadurch wurde die Wahrscheinlichkeit reduziert, dass Substanzen mit gleichen Massenübergängen von Mutter- zu Produktionen coeluierten und so zu einem falsch positiven Ergebnis führen. Zum einen wurde eine Phenyl-Hexyl-Säule als stationäre Phase mit einem ternären Gradienten aus H<sub>2</sub>O, ACN und geringen Anteilen an MeOH (jeweils mit 0,01 % Ameisensäure) verwendet (Kapitel 8.5.2), mit dem, wie in Kapitel 4.5 beschrieben, die quantitative Bestimmung von OFS erfolgte. Zum anderen wurde die Trennung bei Verwendung der gleichen Säule, jedoch eines binären Gradienten aus MeOH und H<sub>2</sub>O (jeweils mit 0,01 % Ameisensäure) durchgeführt (Kapitel 8.3.6). Die massenspektrometrische Detektion erfolgte durch Selektion der Quasimolekülonen [M-H]<sup>-</sup> mit *m/z* 577 (TriFS) bzw. *m/z* 769 (TetraFS) als Mutterion. Geeignete Produktionen wurden anhand von Standardsubstanzen ermittelt, indem deren Fragmentierungsmuster ermittelt wurden und die jeweils intensivsten Fragmentationen als Produktionen ausgewählt wurden (Abbildungen 57–58 und 60).

Durch den Vergleich der Retentionszeiten mit isolierten Standardsubstanzen wurden 8-8(c)/5-5-, 5-5/8-8(c)-, 8-8(nc)/8-O-4- und 5-5/8-8(nc)-TriFS in den untersuchten Pflanzenproben mit beiden Methoden nachgewiesen (Signal/Rausch-Verhältnis > 3:1). 8-O-4/8-5(c)-TriFS wurde in keiner der Proben nach Verseifung für 18 h detektiert. Da von 8-5(c)-DFS bekannt ist, dass diese unter alkalischen Bedingungen zu 8-5(nc)-DFS und 8-5(dc)-DFS umgesetzt wird (Ralph et al. 1994) und auch in wässrigen Pufferlösungen mit einem pH-Wert von etwa 7 decarboxyliert (Schendel et al. 2015), könnte dies der Grund für die Abwesenheit entsprechender Peaks von 8-O-4/8-5(c)-TriFS sein.

Aus diesem Grund wurden mildere Methoden zur Hydrolyse von pflanzlichen Materialien zum Nachweis der 8-O-4/8-5(c)-TriFS durchgeführt. Zunächst wurde die Kombination aus Driselase und zwei verschiedenen Feruloyl-esterasen getestet. Driselase, ein Multienzymkomplex aus verschiedenen Zellwandpolysaccharid-spaltenden Enzymen, sollte dabei OFS-haltige Oligosaccharide freisetzen, um so die Zugänglichkeit für die Feruloyl-esterasen zu verbessern. Jedoch konnten so lediglich geringe Mengen einiger DFS, aber keine OFS in den Hydrolysaten detektiert werden. Dies könnte darin begründet sein, dass die Enzymzugänglichkeit von TriFS-haltigen Strukturen trotz Spaltung der Polysaccharide zu gering ist oder die eingesetzten Feruloyl-esterasen aufgrund ausgeprägter Substratspezifität OFS-Ester nicht spalten. Deshalb wurde im Anschluss an die Enzyminkubation eine 10-minütige Verseifung mit geringer konzentrierter NaOH-Lösung (1 M) durchge-

führt. Bei Anwendung dieser Hydrolysebedingungen wurde 8-O-4/8-5(c)-TriFS in den UBS von Mais, Weizen und Zuckerrübe nachgewiesen, jedoch nicht in Amaranth (Walterstraat et al. 2016a). Allerdings wurde in quantitativen Bestimmungen gezeigt, dass in Amaranth auch die Gehalte von FS und anderen OFS im Vergleich zu Mais, Weizen und Zuckerrübe um ein Vielfaches geringer sind (Kapitel 4.5). 8-O-4/8-5(nc)-TriFS, die vermutlich aus 8-O-4/8-5(c)-TriFS entsteht, wurde in verschiedenen Proben, darunter auch Amaranth, nachgewiesen (Kapitel 4.5) (Jilek und Bunzel 2013).

Von den neu beschriebenen Tetrameren konnten durch Vergleich der Retentionszeiten TetraFS 41,8 min und 8-5(nc)/5-5/8-5(nc)-TetraFS mit beiden Methoden in Mais, Weizen und Zuckerrübe nachgewiesen werden, wohingegen sie in Amaranth nicht detektierbar waren (Signal/Rausch-Verhältnis < 3:1). Des Weiteren wurden in den Chromatogrammen von Mais und Weizen bei beiden Methoden Peaks detektiert, die auf das Vorhandensein von TetraFS 35,5 min und TetraFS 39,4 min schließen ließen. Entsprechende Peaks wurden jedoch nicht eindeutig bei Analyse der Hydrolysate aus Zuckerrübe und Amaranth nachgewiesen. TetraFS 31,0 min konnte nur bei Anwendung der Methode, die einen binären Gradienten nutzt, und nur in Mais und Weizen detektiert werden. Möglicherweise resultiert die im mittels DAD detektierten Chromatogramm deutlich sichtbare Coelution von 5-5-DFS und 8-5(nc)/5-5-TriFS bei Verwendung des ternären Gradienten in einer starken Ionensuppression (Abbildung 36), sodass die geringen Mengen der TetraFS 31,0 min mit dieser Methode nicht nachweisbar waren.

Somit konnte gezeigt werden, dass unter Vorbehalt von TetraFS 31,0 min alle im Rahmen dieser Arbeit erstmals synthetisierten und charakterisierten TriFS und TetraFS in Pflanzenzellwänden existieren und zur Komplexität der OFS-Analytik beitragen. Darüber hinaus waren in den Chromatogrammen, die unter Verwendung der beschriebenen Massenübergänge aufgezeichnet wurden, Peaks zu sehen, die die Existenz weiterer, bisher unbekannter Regioisomere vermuten lassen.

## 4.5 ENTWICKLUNG VON METHODEN ZUR BESTIMMUNG VON OLIGOFERULASÄUREN

Im Zuge dieser Arbeit wurden zwei LC-DAD-MS/MS-Methoden zur quantitativen Bestimmung von OFS in Pflanzenzellwänden entwickelt. Mit beiden Methoden können die gleichen Analyten bestimmt werden, jedoch werden unterschiedliche interne Standardsubstanzen verwendet. Während eine der Methoden 5-5(me)-DFS als interne Standardsubstanz verwendet, basiert die zweite Methode auf dem Prinzip der SIVA. Optional wurde die Quantifizierung der *cis*- und *trans*-Isomere der Monomere FS und *p*-CS unter Verwendung von *o*-Cumarsäure als interne Standardsubstanz in die Methoden integriert. Diese Option ist für die beiden Methoden identisch, da sie auf der Verwendung der mittels DAD detektierten Daten basiert und bei beiden Methoden die gleichen chromatographischen Bedingungen angewandt werden.

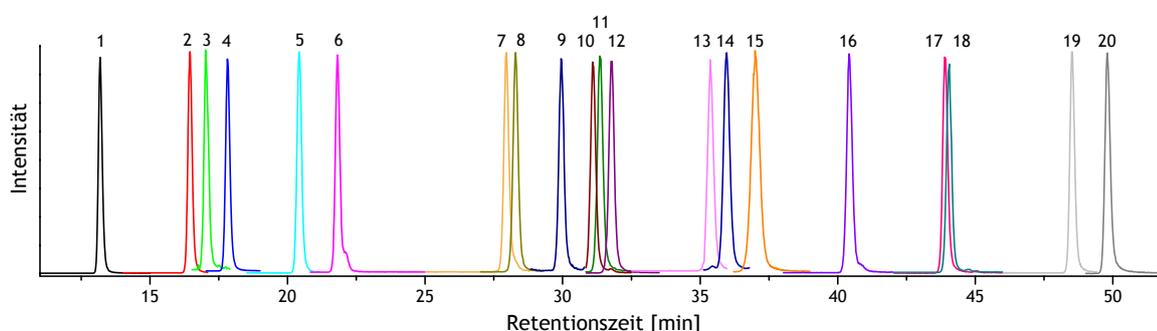
Im Vergleich zu bereits publizierten Methoden wurde die Anzahl an quantifizierbaren Analyten erhöht (Dobberstein und Bunzel 2010a; Jilek und Bunzel 2013), da die entsprechenden Standardsubstanzen aufgrund der durchgeführten Synthesen in ausreichender Menge und Reinheit zur Verfügung standen. Informationen über die verwendeten Standardsubstanzen und die Herstellung von Stammlösungen für die Methodenentwicklung sind in Tabelle 19 zusammengefasst. So wurden mit Ausnahme von 8-O-4/8-5(c)-TriFS alle in dieser Arbeit synthetisierten Di- und Trimere in die neuen Methoden integriert. Wie in Kapitel 4.3.2 beschrieben, ist 8-O-4/8-5(c)-TriFS nach herkömmlicher Probenaufarbeitung nicht nachweisbar und wurde deshalb nicht in die Methoden aufgenommen. Außerdem wurde keine der synthetisierten TetraFS in die Methoden integriert, da die verfügbaren Mengen und die Reinheiten der Substanzen zwar für LC-MS- und NMR-Versuche, aber nicht für die Methodenentwicklung ausreichten.

### 4.5.1 Chromatographische Parameter

In bisherigen LC-Methoden wurden C18- oder Phenyl-Hexyl-substituierte Kieselgele als stationäre Phasen, binäre oder ternäre Gradienten aus H<sub>2</sub>O (mit TFA oder Ameisensäure), ACN und MeOH als mobile Phasen, Temperaturen während der Trennung von bis zu 50 °C und eine Flussrate der mobilen Phase von bis zu 1 mL/min verwendet (Dobberstein und Bunzel 2010a; Jilek und Bunzel 2013; Vismeh et al. 2013). Ausgehend von diesen Bedingungen wurden die chromatographischen Parameter auf das verwendete LC-DAD-MS/MS-System angepasst. Aufgrund des verwendeten Massenspektrometers (Kapitel 7.3) musste einerseits die Flussrate auf maximal 0,5 mL/min reduziert werden, um eine vollständige Verdampfung des Lösungsmittels bei der ESI zu gewährleisten. Zum anderen musste sichergestellt werden, dass möglichst wenige Analyten coeluierten, da jeder gleichzeitig gemessene Massenübergang die Anzahl an Datenpunkten pro Peak verringert. Für

das verwendete Massenspektrometer wurde eine optimale Verweilzeit von 0,5 s pro Massenübergang ermittelt. Da die Peaks unter den verwendeten Bedingungen eine Peakbreite von etwa 30 s besitzen, ist die parallele Aufnahme von maximal vier Massenübergängen möglich, um 15 Datenpunkte pro Peak und somit eine präzise Peakintegration zu erreichen. Im Falle der SIVA, bei der auch die Massenübergänge der isotopenmarkierten Standardsubstanzen detektiert werden, sollten somit maximal zwei Analyten coeluiieren, wobei *Qualifier*-Übergänge nur bei einzeln eluierenden Analyten aufgenommen werden können. Des Weiteren durften keine Analyten coeluiieren, die die gleichen Mutter- und Produktionen besitzen, da diese im *Multiple Reaction Monitoring* (MRM)-Modus nicht unterschieden werden können.

In dieser Arbeit wurde die beste Trennung mittels der in Kapitel 8.5.2 beschriebenen Bedingungen erreicht. Wie in Abbildung 36 zu sehen ist, werden fast alle Substanzen basisliniengetreunt. Coeluiierende Analyten sind 5-5-DFS (10) mit 8-5(nc)/5-5-TriFS (11) und 5-5/8-O-4-TriFS (17) mit 5-5(me)-DFS (18), wobei 5-5(me)-DFS nur in einer der beiden Methoden als interne Standardsubstanz verwendet wird. Diese Analyten können jedoch aufgrund unterschiedlicher  $m/z$  der Quasimolekülonen massenspektrometrisch unterschieden werden. Außerdem sind 8-8(c)/5-5- (7) und 8-O-4/8-5(nc)-TriFS (8) bzw. 8-5(nc)/5-5- (11) und 8-8(c)/8-O-4-TriFS (12) lediglich angetrennt. Obwohl diese Trimere Quasimolekülonen mit gleichem  $m/z$  bilden, können sie aufgrund der Bildung spezifischer Produktionen selektiv detektiert werden (Abbildungen 57–59).



**Abbildung 36:** Kombinierte HPLC-MS/MS-Chromatogramme einer Mischung aus Standardsubstanzen, das sich aus Chromatogrammen verschiedener Massenübergänge zusammensetzt. Ferulasäure-Cyclobutandimer mit  $\alpha$ -Truxillsäure-Konfiguration (1); 8-8(c)-Dehydrodiferulasäuren (DFS) (2); 8-8(THF)-DFS (3); 8-8(nc)-DFS (4); 8-5(nc)-DFS (5); 5-5/8-8(c)-Dehydrotriferulasäuren (TriFS) (6); 8-8(c)/5-5-TriFS (7); 8-O-4/8-5(nc)-TriFS (8); 5-5/8-8(nc)-TriFS (9); 5-5-DFS (10); 8-5(nc)/5-5-TriFS (11); 8-8(c)/8-O-4-TriFS (12); 8-O-4-DFS (13); 8-5(c)-DFS (14); 8-8(nc)/8-O-4-TriFS (15); 4-O-5-DFS (16); 5-5/8-O-4-TriFS (17); 5-5(me)-DFS (18); 8-O-4/8-O-4-TriFS (19); 8-5(dc)-DFS (20).

Die monomeren phenolischen Säuren *cis-p-CS*, *trans-p-CS*, *cis-FS* und *trans-FS* eluieren unter den verwendeten chromatographischen Bedingungen nach 12,5, 13,0, 14,0 bzw. 14,3 min. Die Coelution von *p-CS* und FS-CBD hat keinen Einfluss auf die Quantifizierung von *p-CS* mittels DAD, da diese bei einer Wellenlänge von 307 nm detektiert wird. Bei die-

ser Wellenlänge zeigt das FS-CBD keine Absorption. Die als interne Standardsubstanz verwendete *o*-Cumarsäure eluiert nach 18,3 min und ist somit auch von früh eluierenden DFS getrennt.

Die in Abbildung 36 gezeigte Trennung wurde nach angepasster Ameisensäurekonzentration in der mobilen Phase erzielt. Ein niedriger pH-Wert ist wichtig, um eine Dissoziation der Phenolcarbonsäuren während der Chromatographie zu verhindern, reduziert jedoch die Ionenbildung bei Anwendung der ESI im negativen Modus. Durch Modifikation der Zusätze an Ameisensäure wurde festgestellt, dass eine Ameisensäurekonzentration von 0,01 % in allen Fließmittelkomponenten für die chromatographische Trennung ausreichend ist. Im Vergleich zu höheren Säurekonzentrationen resultierte diese Anpassung in einer Verbesserung der Ionenausbeute.

#### 4.5.2 Summenbestimmung der Isomere von 8-8(Tetrahydrofuran)-Dehydrodiferulasäure

Die massenspektrometrische Quantifizierung der 8-8(THF)-DFS-Isomere stellt eine Besonderheit der entwickelten Methoden dar. Da das *trans-trans-trans*- und das *trans-cis-trans*-Isomer bei der Synthese nur in geringen Mengen gewonnen wurden und die Isomere unter den verwendeten chromatographischen Bedingungen nicht voneinander getrennt werden (Retentionszeiten von 17,1–17,4 min), wurde nach einer Möglichkeit der Summenbestimmung dieser Verbindungen gesucht. Dazu wurden zunächst Lösungen der drei Isomere in DMSO-*d*<sub>6</sub> hergestellt und deren Konzentrationen mittels <sup>1</sup>H-NMR relativ zueinander bestimmt. Um eine vollständige Relaxation der <sup>1</sup>H-Kerne zu gewährleisten, wurde eine D<sub>1</sub>-Zeit (Relaxationszeit zwischen zwei Scans) von 10 s gewählt. Anschließend wurden durch entsprechende Verdünnungen die Konzentrationen der Lösungen aneinander angepasst, sodass Lösungen gleicher Konzentration (etwa 1 µg/mL) erhalten wurden. Diese wurden abwechselnd in siebenfacher Ausführung gemessen, wobei im MRM-Modus die für alle Isomere typischen Fragmentationen mit *m/z* 163, 151, 148 und 136 selektiert wurden. Der Vergleich der jeweiligen Peakflächen ergab, dass der *Response* der einzelnen Isomere bei einem Massenübergang von *m/z* 403 nach *m/z* 136 die geringsten Unterschiede aufwies. Da die Mittelwerte der drei Proben mit einer Standardabweichung von 12 % voneinander abwichen, kann von einem annähernd gleichen *Response* ausgegangen werden, wobei sich der *Response* des zur Kalibrierung bzw. als isopenmarkierte Standardsubstanz verwendeten *cis-trans-trans*-Isomers zwischen denen der beiden anderen Isomere befindet.

### 4.5.3 Bestimmung von Ferulasäure und *p*-Cumarsäure mittels Diodenarraydetektor

Zur Detektion der monomeren phenolischen Säuren mittels DAD wurden deren jeweilige Absorptionsmaxima von 294 nm (*cis-p*-CS), 307 nm (*trans-p*-CS), 310 nm (*cis*-FS), 321 nm (*trans*-FS) und 323 nm (*trans-o*-Cumarsäure) verwendet.

#### 4.5.3.1 Kalibrierung

Da die *cis*-Isomere der *p*-CS und FS nicht kommerziell erhältlich waren, wurden zunächst ihre *trans*-Isomere zusammen mit *o*-Cumarsäure kalibriert. Dazu wurden sechs äquidistante Kalibrierlösungen im Bereich von 0,5–50 µg/mL hergestellt und in Dreifachbestimmung analysiert. Die jeweiligen Peakflächen wurden gegen ihre Konzentration aufgetragen und eine lineare, gewichtete Regression durchgeführt. Hierbei und in allen nachfolgend beschriebenen Regressionen wurde jeweils der Wichtungsfaktor = 1/Standardabweichung<sup>2</sup> verwendet. Durch Bestrahlung der Kalibrierlösungen in MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1; v/v) mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm für 4 h wurden die *trans*-Verbindungen partiell zu *cis*-Isomeren umgesetzt. Dass eventuell stattfindene Nebenreaktionen vernachlässigbar sind, konnte nach erneuter Messung in Dreifachbestimmung bestätigt werden, da außer den erwarteten Peaks der *trans*- und *cis*-Isomere der Hydroxyzimtsäuren keine Weiteren zu sehen waren. Über die Peakflächen der *trans*-Isomere wurden die Konzentrationen der *cis*-Isomere in den Gemischen nach Bestrahlung berechnet und deren Peakflächen gegen ihre Konzentrationen aufgetragen. Lineare, gewichtete Regression für den Bereich von 0,4–15,1 µg/mL (*cis-p*-CS) bzw. 0,5–25,6 µg/mL (*cis*-FS) resultierte in den in Tabelle 6 dargestellten Kalibrierdaten. Das vergleichsweise geringe Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,99227$  und der hohe Wert des *y*-Achsenabschnitts der Kalibrierung von *cis*-FS war durch die fehleranfällige Integration der nicht-basisliniengetrennten Peaks von *cis*- und *trans*-FS bedingt. Dennoch ist diese Kalibrierung ausreichend, um die Gehalte der in vielen Proben als Minorkomponente vertretenen *cis*-FS abzuschätzen.

**Tabelle 6:** Kalibrierdaten und Nachweisgrenzen (NWG) der Analyten, die mittels Diodenarray-Detektor bei den jeweiligen Absorptionsmaxima ( $\lambda$ ) gemessen wurden.  $R^2$ : Bestimmtheitsmaß, *p*-CS: *p*-Cumarsäure, FS: Ferulasäure, *o*-CS: *o*-Cumarsäure.

Analyt	Retentionszeit ( $\lambda$ )	Geradengleichung	$R^2$	kalibrierter Bereich	NWG [ $\mu\text{g/mL}$ ]
<i>cis-p</i> -CS	12,5 min (294 nm)	$y=2044,393x+69,071$	0,99997	0,4–15,1 µg/mL	0,1
<i>trans-p</i> -CS	13,0 min (307 nm)	$y=5025,866x-63,38$	0,99991	0,5–50 µg/mL	0,05
<i>cis</i> -FS	14,0 min (310 nm)	$y=619,279x+218,57$	0,99227	0,5–25,6 µg/mL	0,1
<i>trans</i> -FS	14,3 min (321 nm)	$y=3483,575x-13,254$	0,99998	0,5–50 µg/mL	0,05
<i>trans-o</i> -CS	18,3 min (323 nm)	$y=2028,493x+24,66$	0,99996	0,5–50 µg/mL	0,1

## 4.5.3.2 Validierung

Die Nachweisgrenzen von *trans-p-CS*, *trans-FS* und *o*-Cumarsäure wurden über das Signal/Rausch-Verhältnis ermittelt, wobei eine Lösung von Standardsubstanzen so weit verdünnt wurde, bis ein Signal/Rausch-Verhältnis von ungefähr 3:1 erreicht wurde. Als Bestimmungsgrenzen wurden die Konzentrationen des untersten Kalibrierpunkts verwendet, obwohl diese teilweise höher waren als die Konzentrationen mit einem Signal-Rausch-Verhältnis von etwa 9:1. Die Nachweisgrenzen lagen zwischen 0,05 und 0,1 µg/mL und sind ebenso wie die kalibrierten Bereiche in Tabelle 6 angegeben.

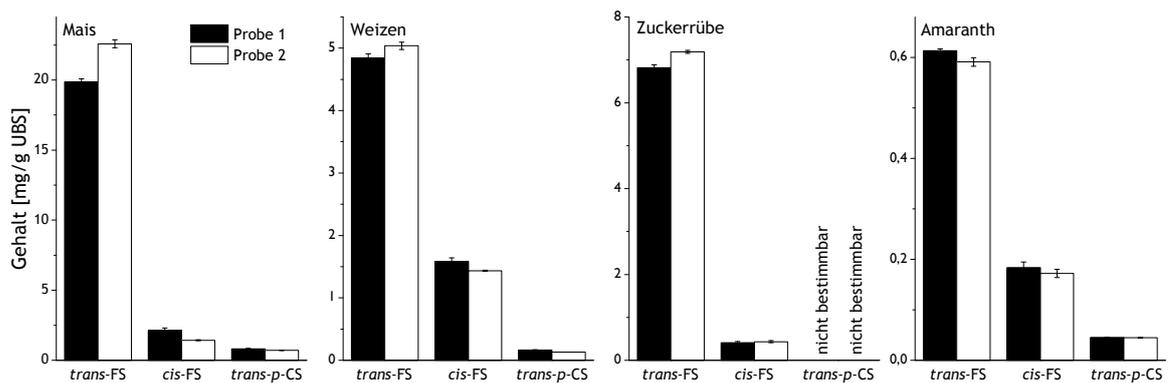
Zur Beurteilung weiterer Validierungsparameter wurden die UBS von Mais (5 mg), Weizen, Zuckerrübe und Amaranth (je 10 mg) in Doppelbestimmung aufgearbeitet und jeder Extrakt viermal gemessen. Die Berechnung der Analytgehalte erfolgte mittels der Formel

$$\text{Gehalt(A)} = \frac{c_{\text{gem}}(\text{A})}{c_{\text{gem}}(\text{IS})} \cdot \frac{\text{Zugabe}(\text{IS})}{\text{Probeneinwaage}} \quad (2)$$

wobei die mittels DAD gemessenen Konzentrationen  $c_{\text{gem}}$  von Analyt (A) und interner Standardsubstanz (IS) mit Hilfe der jeweiligen Geradengleichungen der Kalibrierung (Tabelle 6) und der Formel

$$c_{\text{gem}} = \frac{\text{Peakfläche} - y\text{-Achsenabschnitt}}{\text{Steigung}} \quad (3)$$

berechnet wurde. Proben, bei denen Analyten zu konzentriert vorlagen, wurden zusätzlich als 1/10-Verdünnung gemessen. Eine detaillierte Beschreibung ist in Kapitel 8.5 gegeben. Die ermittelten Analytgehalte sind in Abbildung 37 dargestellt.



**Abbildung 37:** Mittels LC-DAD bestimmte Gehalte an *trans*-Ferulasäure (FS), *cis*-FS und *trans-p*-Cumarsäure (*p-CS*) in den unkorrigierten unlöslichen Ballaststoffen (UBS) von Mais- und Weizenkörnern, Zuckerrübenschnitzeln und Amaranthsemen; dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung,  $n=4$ .

Die ermittelten Gehalte beziehen sich auf die unkorrigierten UBS und sind mit Literaturdaten vergleichbar (García-Lara et al. 2004; Bily et al. 2003; Schendel 2016; Wefers 2016). Wie erwartet war in allen Proben *trans-FS* dominierend unter den analysierten mo-

nomeren phenolischen Säuren. Die Quantifizierung von *cis-p*-CS war aufgrund der eingesetzten Probenmengen von 5–10 mg nicht möglich. Unter der Annahme, dass die Probenextraktion verlustfrei verlief, kann anhand der Bestimmungsgrenzen abgeleitet werden, dass ihr Gehalt  $< 0,04 \mu\text{g/g}$  UBS in Mais und  $< 0,02 \mu\text{g/g}$  UBS in Weizen, Zuckerrübe und Amaranth ist. Auch *trans-p*-CS konnte lediglich in Mais, Weizen und Amaranth bestimmt werden, wohingegen sie in Zuckerrübe unterhalb der Bestimmungsgrenze (entspricht  $< 0,025 \mu\text{g/g}$  UBS) lag.

Die ermittelten Standardabweichungen von 0,5–2% innerhalb eines Probenextraktes sprechen für eine präzise Messung in Bezug auf *trans*-FS und *trans-p*-CS. *cis*-FS wies jedoch aufgrund der fehleranfälligen Peakintegration Standardabweichungen von 2–7% auf. Deutlich größer sind die Abweichungen zwischen den unabhängig aufgearbeiteten Proben 1 und 2, die die Präzision der gesamten Methode beurteilen (Abbildung 37). Hierbei resultierten die Fehler hauptsächlich aus den Probeneinwaagen, da zum Einwiegen dieser Proben kein Ionisator zur Verfügung stand und von dem stark elektrostatisch aufgeladenen Probenmaterial nur 5–10 mg verwendet wurden. Weitere Fehler könnten durch Inhomogenität des verwendeten Probenmaterials verursacht werden.

Die Validierung der Richtigkeit war einer der am schwierigsten zu beurteilenden Parameter für alle entwickelten Methoden, da keine zertifizierten Referenzmaterialien mit bekannten Analyt-Gehalten zur Verfügung standen. Deshalb wurden Wiederfindungsversuche durchgeführt, die zwar die Extraktion und Messung, aber nicht die Freisetzung und Stabilität während der Verseifung beurteilen. Dazu wurden Leermatrizes verwendet, die der Zusammensetzung der Zellwandtypen I und II so gut wie möglich entsprachen, jedoch keine detektierbaren Mengen an FS oder *p*-CS enthielten. Dass die UBS von Apfel (Typ-I-Zellwand) und ein Gemisch aus Cellulose und Arabinoxylan (1:1) (Typ-II-Zellwandimitat) für diese Wiederfindungsversuche geeignet sind, wurde durch Verseifung und LC-DAD-Analyse von je 10 mg Probenmaterial bestätigt. Die Chromatogramme zeigten keine erkennbaren Peaks bei den Retentionszeiten der FS, *p*-CS und *o*-Cumarsäure. Von den Leermatrizes wurden je 10 mg in Dreifachbestimmung für 18 h einer alkalischen Hydrolyse unterzogen, wobei 2 h vor Reaktionsende  $100 \mu\text{g}$  FS,  $10 \mu\text{g}$  *p*-CS und  $31,1 \mu\text{g}$  *o*-Cumarsäure zugesetzt wurden. Anschließend wurden die Proben wie in Kapitel 8.5 beschrieben angesäuert, extrahiert und mittels LC-DAD analysiert.

Die unter Berücksichtigung der internen Standardsubstanz ermittelten Gehalte entsprachen  $96,2 \pm 1,1\%$  (Typ-II-Zellwandimitat) bzw.  $97,7 \pm 0,6\%$  (Apfel-UBS) der zugesetzten Menge an *trans-p*-CS und  $99,1 \pm 1,5\%$  (Typ-II-Zellwandimitat) bzw.  $99,6 \pm 0,5\%$  (Apfel-UBS) der zugesetzten Menge an FS. Diese Ergebnisse bestätigen die Richtigkeit der Analyse von *trans-p*-CS und *trans*-FS. Die *cis*-Isomere wurden in diesen Versuchen nicht berücksichtigt. Da die Probenaufnahme in THF:H<sub>2</sub>O und die anschließende Verdünnung nicht quantitativ erfolgte, konnten keine absoluten Wiederfindungsraten ermittelt werden,

die eine Aussage über die Verluste von Analyten und interner Standardsubstanz bei der Probenaufarbeitung zulassen würden. Potentielle Verluste hätten allerdings lediglich eine Auswirkungen auf die Empfindlichkeit, aber nicht auf die Richtigkeit der Methode.

#### 4.5.4 Bestimmung von Oligoferulasäuren mittels Stabilisotopenverdünnungsanalyse

##### 4.5.4.1 Massenspektrometrische Parameter

Während die meisten massenspektrometrischen Parameter innerhalb einer Messung konstant bleiben mussten, waren die *Cone*-Spannungen und Fragmentierungsenergien variabel und wurden durch Direktinjektion von Standardsubstanzen so optimiert, dass möglichst hohe Intensitäten bestimmter Fragmentionen entstanden. Für die jeweiligen Isotopologe wurden gleiche *Cone*-Spannungen und Fragmentierungsenergien gewählt. Alle anderen Parameter wurden zuvor anhand einer Auswahl an DFS und TriFS optimiert und sind in Tabelle 13 (Kapitel 8.5.2) dargestellt. Zur Quantifizierung diente mit Ausnahme von 5-5/8-8(nc)-TriFS, 8-5(nc)/5-5-TriFS und 8-5(c)-DFS jeweils das Quasimolekülion  $[M-H]^-$  als Mutterion. Die drei genannten Analyten wurden bei der Ionisierung so stark decarboxyliert, dass die Verwendung der jeweiligen Mutterionen  $[M-H-CO_2]^-$  die Empfindlichkeit steigerte. Als *Quantifier*-Produktion wurde jeweils das Fragmention mit der höchsten Intensität verwendet. Für eine zusätzliche Absicherung der Peak-Identität wurde, wenn möglich, ein zweiter Massenübergang (*Qualifier*-Übergang) aufgenommen. Wie anhand der Fragmentspektren ersichtlich war, konnten nicht für alle Analyten *Qualifier*-Übergänge aufgenommen werden, da bei einigen Analyten die Intensität weiterer Fragmentionen sehr gering war (Abbildungen 57–59).

Für die  $^{13}C$ -markierten Standardsubstanzen wurden jeweils analoge Massenübergänge herangezogen, da deren Ionenausbeuten – unabhängig von eventuell inkonstanten MS-Bedingungen – vergleichbar zu denen der Analyten sein sollten. Die entsprechenden  $m/z$ -Verhältnisse der Fragmentionen wurden den Fragmentierungsspektren entnommen, die unter den optimierten massenspektrometrischen Bedingungen erhalten wurden (Abbildungen 61–63). Im Falle von gleichzeitig eluierenden Analyten musste auf die Detektion von *Qualifier*-Übergängen verzichtet werden, da andernfalls die Anzahl an Datenpunkten pro Peak zu gering für eine genaue Peakintegration wäre. Dies traf für 8-8(THF)-, 8-8(nc)- und 5-5-DFS sowie 8-O-4/8-5(nc)- und 5-5/8-O-4-TriFS zu. Die verwendeten massenspektrometrischen Parameter sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

##### 4.5.4.2 Kalibrierung

Im Zuge dieser Arbeit wurde festgestellt, dass die Signale einer mehrmals gemessenen Lösung aus Standardsubstanzen Standardabweichungen von 10–15 % aufweisen. Der Grund dafür ist, dass die Ionenausbeute von vielen Faktoren abhängig ist, wie beispielsweise

vom Verschmutzungsgrad der Ionenquelle, dem N<sub>2</sub>-Druck für Trocknungs- und Zerstäubungsgas bei der Ionisierung und dem He-Druck in der Kollisionszelle. Diese Faktoren sind bei dem verwendeten Massenspektrometer über einen Zeitraum von mehreren Messungen nicht ausreichend konstant zu halten. Innerhalb eines Laufes wiesen die Peakflächenverhältnisse unterschiedlicher Substanzen mit einer Standardabweichung von 2–5 % eine deutlich bessere Reproduzierbarkeit auf. Aus diesem Grund wurde eine Kalibrierung durchgeführt, bei der die Konzentrationsverhältnisse von Analyt zu interner Standardsubstanz variiert werden und die jeweiligen Peakflächenverhältnisse gegen ihre Konzentrationsverhältnisse aufgetragen werden. Dazu wurden sowohl die Konzentration der Analyten, als auch die der isotonenmarkierten Standardsubstanzen variiert, sodass ein Bereich von 0,1 bis 10 der Verhältnisse von Analyt zu interner Standardsubstanz mit fünf Kalibrierpunkten (0,1, 0,316, 1, 3,16 und 10) abgedeckt wurde. Die Summe der Konzentrationen von Analyt und interner Standardsubstanz betrug dabei jeweils 1 µg/mL. Die Kalibrierlösungen wurden in Sechsfachbestimmung gemessen, wobei Standardabweichungen von 0,3–3,5 % erhalten wurden. Da 8-8(c)/8-O-4-TriFS nicht als <sup>13</sup>C-markierte Standardsubstanz synthetisiert werden konnte, wurde zur Auswertung dieser Verbindung die interne Standardsubstanz [<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]8-5(nc)/5-5-TriFS verwendet, da diese mit 31,0 min eine ähnliche Retentionszeit wie 8-8(c)/8-O-4-TriFS (31,7 min) besaß.

Nach Auftragung der Kalibrierpunkte wurde sowohl eine lineare, gewichtete, als auch eine quadratische, gewichtete Regression durchgeführt (am Beispiel von 8-5(c)-DFS in Abbildung 64 dargestellt). Anschließend wurde mittels Mandel-Test für jede Substanz untersucht, ob die quadratische Regression signifikant besser geeignet ist als die lineare Regression. Dazu wurden mittels der Formel

$$PG = \frac{[(n-2) \cdot (s_{yL})^2] - [(n-3) \cdot (s_{yQ})^2]}{(s_{yQ})^2} \quad (4)$$

die Prüfgrößen PG berechnet, wobei  $n$  für die Anzahl an Kalibrierpunkten steht. Die Reststandardabweichung der linearen Kalibrierung  $s_{yL}$  wurde über die Formel

$$s_{yL} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad (5)$$

und die Reststandardabweichung der quadratischen Kalibrierung  $s_{yQ}$  über die Formel

$$s_{yQ} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-3}} \quad (6)$$

berechnet, wobei  $y$  den Messwert des Analyt-Signals und  $\hat{y}$  den  $y$ -Wert der Kalibrierfunktion darstellt. Der Term  $\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$  wird auch als Summe der Fehlerquadrate bezeichnet. Die Prüfgrößen wurden mit dem Tabellenwert der F-Tabelle ( $f_1=1$ ,  $f_2=2$ ) bei einem Signifikanzniveau von 95 % verglichen. War die Prüfgröße höher als der Tabellenwert von 18,51,

wurde die quadratische Regression als signifikant besser eingestuft und der linearen Regression vorgezogen.

Anhand der berechneten Prüfgrößen wurde der visuelle Eindruck bestätigt, dass bei neun Kalibrierungen eine quadratische Regression signifikant besser geeignet ist als eine lineare Regression. Grund dafür ist das natürliche  $^{13}\text{C}$ -Vorkommen von etwa 1,1 %, aufgrund dessen ein Teil der nicht-isotopenmarkierten Moleküle die gleichen massenspektrometrischen Eigenschaften besitzt wie die jeweilige isotopenmarkierte Standardsubstanz und deshalb als solche detektiert wird. Beispielsweise besitzen theoretisch etwa 2,2 % der 4-O-5-DFS-Moleküle zwei natürliche  $^{13}\text{C}$ -Atome, wodurch sie im ersten Quadrupol als  $[^{13}\text{C}_2]4\text{-O-5-DFS}$  selektiert werden. Im dritten Quadrupol werden wiederum diejenigen Moleküle selektiert, von denen keines der  $^{13}\text{C}$ -Atome mit der Methylgruppe ( $\Delta_{m/z}=15$ ) abgespalten wurde. Daraus ergibt sich eine theoretische spektrale Überlappung von etwa 2 %. Berechnungen für 8-5(c) und 8-5(dc) ergeben eine theoretische spektrale Überlappung von 3,2 %, da sich bereits die Mutterionen nur um eine Masseneinheit unterscheiden. Anhand von Lösungen der nicht-isotopenmarkierten Standardsubstanzen wurden die tatsächlichen spektralen Überlappungen bestimmt, indem die gemessenen Peakflächen der jeweiligen Isotopologen ins Verhältnis gesetzt wurden. Die gemessenen spektralen Überlappungen sind tendenziell größer als die theoretischen und korrelieren mit den Ergebnissen des Mandel-Tests (Tabelle 7). Eine Ausnahme bildete 8-5(nc)-DFS, bei der zwar eine geringe spektrale Überlappung bestimmt wurde, aber dennoch laut Mandel-Test die quadratische Kalibrierung besser geeignet war. Bei der Analyse von Lösungen der isotopenmarkierten Standardsubstanzen wurden unter Verwendung der Massenübergänge der jeweiligen nicht-isotopenmarkierten Verbindungen keine Signale detektiert.

#### 4.5.4.3 Validierung

Die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erfolgte durch Verdünnung einer Lösung aus nicht-markierten Standardsubstanzen, bis das Signal/Rausch-Verhältnis der LC-MS/MS-Messung etwa 3:1 bzw. 10:1 betrug. Um den Matrix-Einfluss zu beurteilen, wurden zusätzlich je 10 mg des Typ-II-Zellwandmittels (Cellulose-Xylan-Gemisch) und Apfel-UBS alkalisch hydrolysiert, wobei 2 h vor Beendigung der alkalischen Hydrolyse verschiedene Mengen der Standardsubstanzen zugegeben wurden. Die alkalischen Hydrolysate wurden im Anschluss entsprechend aufgearbeitet und analysiert. Auch hier wurden anhand der eingesetzten Mengen an Standardsubstanzen die Konzentrationen ermittelt, bei denen das Signal/Rausch-Verhältnis 3:1 bzw. 9:1 betrug. Die Konzentrationen der Bestimmungsgrenzen lagen zwischen 5–50 ng/mL und beziehen sich jeweils auf die Extrakt-Lösung, die mittels LC-MS/MS analysiert wurde (Tabelle 21, linke Seite). Um eine Aussage über die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in Bezug auf Probenmaterialien treffen zu können, muss die eingesetzte Probenmenge und die Menge des Lösungsmittels, die dem Extrakt nach Trocknung zugegeben wurde, berücksichtigt werden. Bezogen auf 10 mg Probenmaterial und einem Lösungsmittelvolumen von 0,5 mL betragen

**Tabelle 7:** Kalibrierdaten der entwickelten LC-MS/MS-Stabilisotopenverdünnungsanalyse zur Bestimmung eines Ferulasäure-Cyclobutandimers (FS-CBD) sowie verschiedener Dehydrodiferulasäuren (DFS) und Dehydrotriferulasäuren (TriFS). Die spektrale Überlappung wurde anhand von nicht-isotopenmarkierten Standardsubstanzen ermittelt und resultiert aus dem natürlichen  $^{13}\text{C}$ -Vorkommen. Die Prüfgrößen (PG) wurden mittels Mandel-Test berechnet (Formeln 4–6).  $R^2$ : Bestimmtheitsmaß.

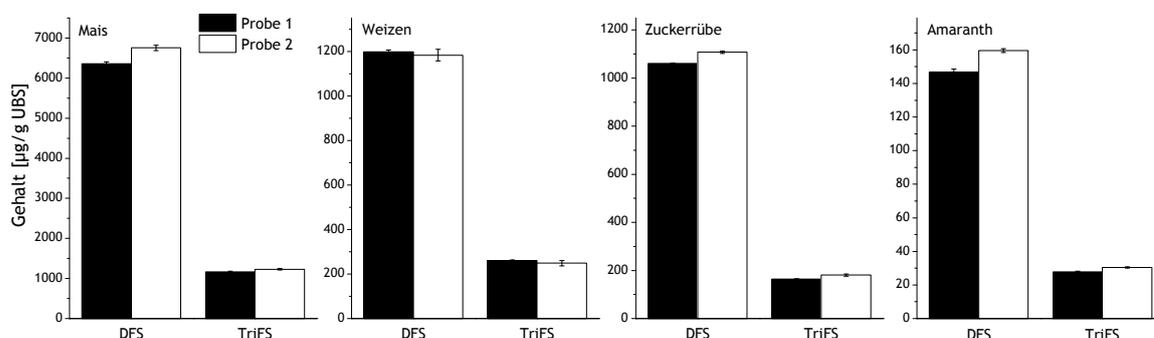
	Regression	Kalibriergleichung	$R^2$	Spektrale Überlappung [%]	PG
8-O-4-DFS	quadratisch	$y = -0,0087x^2 + 0,95347x - 0,00403$	0,999 81	1,18	22,5
5-5-DFS	quadratisch	$y = -0,00644x^2 + 1,01765x - 0,00028$	0,999 99	1,04	180,5
8-5(nc)-DFS	quadratisch	$y = 0,00197x^2 + 0,90689x + 0,00123$	1,000 00	0,24	38,2
8-5(c)-DFS	quadratisch	$y = -0,02377x^2 + 1,0051x + 0,00072$	0,999 99	3,65	4045
8-5(dc)-DFS	quadratisch	$y = -0,0144x^2 + 0,74747x + 0,00462$	1,000 00	4,01	13584
8-8(c)-DFS	linear	$y = 0,9001x - 0,00508$	0,999 96	0,25	0,3
8-8(THF)-DFS <sup>a</sup>	quadratisch	$y = -0,01162x^2 + 0,80171x + 0,00543$	0,999 92	1,92	144,1
8-8(nc)-DFS	quadratisch	$y = -0,01116x^2 + 0,96778x - 0,00378$	0,999 95	1,61	225,7
4-O-5-DFS	quadratisch	$y = -0,02215x^2 + 0,91846x + 0,0078$	0,999 98	3,74	2071
FS-CBD	quadratisch	$y = -0,01989x^2 + 1,18687x - 0,00758$	0,999 83	1,97	121,2
5-5/8-O-4-TriFS	linear	$y = 0,89959x + 0,00647$	0,999 94	0,31	0,6
8-5(nc)/5-5-TriFS	linear	$y = 1,06757x + 0,00464$	0,999 90	0,31	4,7
8-8(c)/8-O-4-TriFS <sup>b</sup>	linear	$y = 0,44144x - 0,00117$	0,999 60	<sup>b</sup>	4,8
8-O-4/8-O-4-TriFS	linear	$y = 0,98709x + 0,00646$	0,999 90	0,43	0,1
8-O-4/8-5(nc)-TriFS	linear	$y = 1,06802x - 0,00309$	0,999 96	0,43	0,3
5-5/8-8(c)-TriFS	linear	$y = 1,12794x + 0,00607$	0,999 86	0,07	1,1
8-8(c)/5-5-TriFS	linear	$y = 1,26112x + 0,00965$	0,999 98	0,27	0,0001
5-5/8-8(nc)-TriFS	linear	$y = 0,9435x + 0,00287$	0,999 78	0,75	4,4
8-8(nc)/8-O-4-TriFS	linear	$y = 0,91913x + 0,00101$	0,999 72	0,23	4,2

<sup>a</sup> *cis-trans-trans*-Isomer

<sup>b</sup> bezogen auf [ $^{13}\text{C}_3$ ]8-5(nc)/5-5-TriFS

Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenzen zwischen 0,1 und 1 bzw. 0,25 und 2,5  $\mu\text{g/g}$  Probe (Tabelle 21, rechte Seite). Für die meisten Substanzen wurde kein Einfluss der Matrix oder der Probenaufarbeitung auf die Empfindlichkeit beobachtet. Lediglich für 8-5(dc)-DFS und 5-5/8-8(c)-TriFS wurden in den Versuchen mit Matrix geringere Empfindlichkeiten ermittelt, die durch Ionensuppression oder unvollständige Extraktion verursacht wird. Insgesamt ist die im Zuge dieser Arbeit entwickelte Methode je nach Analyt um das 10- bis 180-fache empfindlicher als die Bestimmung mittels LC-UV (Dobberstein und Bunzel 2010a) und um das 2- bis 85-fache empfindlicher als die von Jilek und Bunzel (2013) entwickelte LC-MS-Methode. Da die Empfindlichkeit der LC-MS/MS-Messung jedoch von Faktoren wie beispielsweise dem Verschmutzungsgrad der Ionenquelle, dem  $\text{N}_2$ -Druck oder dem He-Druck abhängig ist, sollten die hier ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenze nur als Richtwert dienen und bei der Auswertung der Chromatogramme stets das Signal/Rausch-Verhältnis begutachtet werden.

Um Aussagen über die Methodenpräzision (bedingt durch die Probenaufarbeitung und die LC-MS/MS-Messung) sowie Messpräzision (bedingt durch die LC-MS/MS-Messung) treffen zu können, wurden die UBS von Mais, Weizen, Zuckerrübe und Amaranth in Doppelbestimmung aufgearbeitet und jeder Extrakt viermal gemessen. Die Zugabe der internen Standardsubstanzen, deren einzusetzenden Konzentrationen aus Vorversuchen abgeschätzt werden konnten, erfolgte etwa 20 min vor Beendigung der Verseifung. Inner-



**Abbildung 38:** Mittels LC-MS/MS-Stabilisotopenverdünnungsanalyse analysierte Gehalte an Ferulasäure-Dimeren (DFS) und Dehydrotriferulasäuren (TriFS) in den unkorrigierten unlöslichen Ballaststoffen (UBS) von Mais- und Weizenkörnern, Zuckerrübenschnitzeln und Amaranthsamens; dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung,  $n=4$ . Detaillierte Angaben zu einzelnen DFS und TriFS sind in Tabelle 22 dargestellt.

halb einer Probe wurden die Summen an Dimeren bzw. Trimeren mit Standardabweichungen von 0,1–1,3 bzw. 0,7–2,3 %, d.h. sehr präzise, bestimmt (Abbildung 38). Lediglich bei einer der beiden Weizen-Proben wurde mit 2,2 bzw. 4,8 % Standardabweichung eine etwas geringere Präzision erhalten. Auch die Standardabweichungen von 0,2–5,1 % bei der Bestimmung einzelner Dimere bzw. 0,6–8,6 % bei der Bestimmung einzelner Trimere ließen darauf schließen, dass durch Verwendung von isotope markierten Standardsubstanzen im Vergleich zu 5-5(me)-DFS (s. Kapitel 4.5.5) die durch die massenspektrometrische Bestimmung bedingten Fehler besser kompensiert werden.

Auch bei diesen Messungen wiesen drei der Proben (UBS von Maiskaryopsen, Zuckerrübenschnitzel und Amaranthsamens) größere Abweichungen zwischen den Doppelbestimmungen auf (Abbildung 38), die vermutlich durch die fehleranfällige Einwaage von 5–10 mg des elektrostatisch aufgeladenen Probenmaterials verursacht wurden. Diese Annahme wird auch dadurch gestützt, dass sich die Gehalte der meisten Analyten um einen ähnlichen Faktor unterscheiden (Tabelle 22). Ebenso können Probeninhomogenitäten ursächlich sein, die bei den geringen Einwaagen nicht ausreichend ausgeglichen wurden.

In Wiederfindungsversuchen, die die Richtigkeit der Methode beurteilen sollten, wurden die Leermatrizes Apfel-UBS und Typ-II-Zellwandimitat in Dreifachbestimmung analysiert, wobei 2 h vor Beendigung der Verseifung Lösungen aus nicht-isotopenmarkierten und isotopenmarkierten Standardsubstanzen zugegeben wurden. Zuvor wurde bestätigt, dass beide Leermatrizes keine detektierbaren Mengen an Analyten enthielten. Die Men-

gen an zugegebenen Standardsubstanzen wurde dabei jeweils an den Gehalten in Weizenkaryopsen und Zuckerrübenschnitzeln ausgerichtet. Auch hier muss betont werden, dass nicht die Verluste an Analyten bzw. isopenmarkierten Standardsubstanzen berechnet werden konnten, sondern der analysierte Gehalt im Verhältnis zur zugegebenen Analytmenge bestimmt wurde.

Die über die zugesetzten, internen Standardsubstanzen analysierten Gehalte betragen je nach Analyt zwischen 86 und 104 % der zugesetzten Mengen und lagen somit in einem akzeptablen Bereich. Niedrigere Werte für einige Dimere bedingten, dass die Wiederfindung der Summe für die Dimeren bei etwa 94 % lag, während die Summe an Trimeren zu 99–100 % wiedergefunden wurde. Diese Versuche geben Grund zur Annahme, dass mittels der entwickelten SIVA Ergebnisse mit akzeptabler Richtigkeit erhalten werden.

#### 4.5.5 Bestimmung von Oligoferulasäuren unter Verwendung der internen Standardsubstanz 5-5(methyl)-Dehydrodiferulasäure

##### 4.5.5.1 *Massenspektrometrische Parameter*

Die massenspektrometrischen Parameter zur Bestimmung der internen Standardsubstanz 5-5(me)-DFS wurden wie in Kapitel 4.5.4.1 beschrieben ermittelt. Die Parameter für die Bestimmung der anderen Verbindungen wurde von der SIVA übernommen, wobei *Qualifier*-Übergänge für 8-8(THF)-, 8-8(nc)- und 5-5-DFS sowie 8-O-4/8-5(nc)- und 5-5/8-O-4-TriFS ergänzt wurden (Tabelle 23).

##### 4.5.5.2 *Kalibrierung*

Die Kalibrierung wurde analog zur SIVA durchgeführt, indem die Konzentrationsverhältnisse von Analyt zu interner Standardsubstanz im Bereich von 0,1–10 variiert und die gemessenen Peakflächenverhältnisse gegen ihre Konzentrationsverhältnisse (0,1, 0,316, 1, 3,16 und 10) aufgetragen wurden. Um den Verbrauch an Standardsubstanzen gering zu halten, wurden sowohl die Konzentrationen der Analyten als auch die von 5-5(me)-DFS zwischen 0,091 und 0,91 µg/mL variiert. Die Kalibrierlösungen wurden einmal hergestellt und in Sechsfachbestimmung gemessen. Die Standardabweichungen der meisten Peakflächenverhältnisse betragen zwischen 2 und 6 %. Lediglich bei der Bestimmung der Peakflächenverhältnisse von 8-8(THF)-DFS zu 5-5(me)-DFS wurden Standardabweichungen zwischen 6 und 12 % erhalten, was möglicherweise auf die geringere Empfindlichkeit des Massenübergangs von 8-8(THF)-DFS und somit Messungen nahe der Bestimmungsgrenze zurückzuführen ist (Tabelle 21).

Der Vergleich von linearen, gewichteten zu quadratischen, gewichteten Regressionen erfolgte mittels Mandel-Test (Kapitel 4.5.4.2, Formeln 4–6). Da die Prüfgrößen aller Analyten unterhalb des kritischen Wertes von 18,51 lagen, wurden jeweils die linearen Kali-

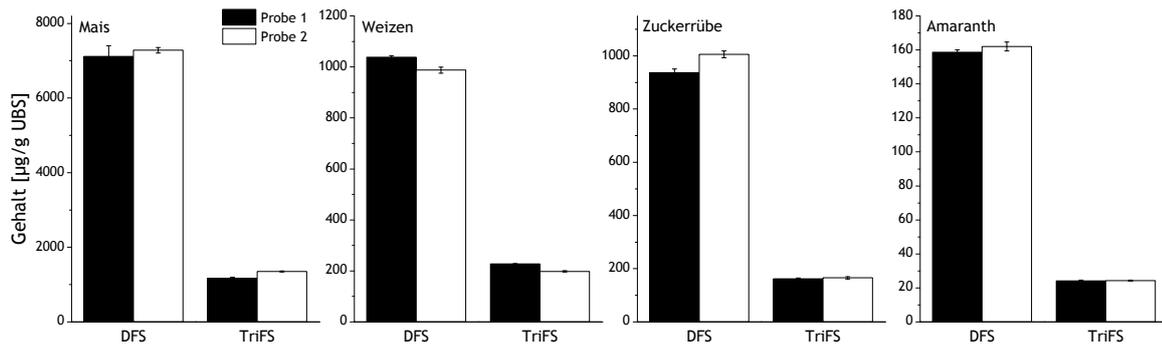
brierfunktionen verwendet. Die entsprechenden Geradengleichungen, Bestimmtheitsmaße und Prüfgrößen der Analyten sind in Tabelle 24 dargestellt.

#### 4.5.5.3 Validierung

Die massenspektrometrischen Bedingungen der Methode unter Verwendung von 5-5(me)-DFS unterscheiden sich neben der Art der detektierten Massenübergänge lediglich dadurch von der in Kapitel 4.5.4 beschriebenen Methode, dass in einigen Aufnahmezeiträumen eine geringere Anzahl an Massenübergängen gleichzeitig detektiert wurde. Da dies bei gleichen Verweilzeiten keinen negativen Einfluss auf die Empfindlichkeit der Messung hat, kann von vergleichbaren Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ausgegangen werden (Tabelle 21), wobei letztendlich das Signal/Rausch-Verhältnis der Proben ausschlaggebend ist.

Zur Untersuchung der Methoden- und Messpräzision wurden die UBS von Maiskaryopsen (5 mg), Weizenkaryopsen, Zuckerrübenschnitzeln und Amaranthsamen (je 10 mg) in Doppelbestimmung aufgearbeitet und jede Probe viermal gemessen. Etwa 20 min vor Ende der Verseifung wurde eine Lösung der internen Standardsubstanz 5-5(me)-DFS in MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1; v/v) zugegeben. Da bereits bekannt war, dass sich die Gehalte der einzelnen OFS um einen Faktor von bis zu 500 unterscheiden, war die Verwendung von nur einer einzigen Konzentration der internen Standardsubstanz nicht ausreichend, um alle Analyten innerhalb des kalibrierten Bereichs auszuwerten. Aus diesem Grund wurde jede Analyse in doppelter Ausführung durchgeführt, wobei zwei sich um einen Faktor von 30–60 unterscheidende Mengen der internen Standardsubstanz zu den Proben gegeben wurden. Der Extrakt, aus dem die höher konzentrierten OFS analysiert wurden, wurde nach dem Trocknen in 1 mL THF:H<sub>2</sub>O (1:1; v/v) aufgenommen und als 1/5-Verdünnung injiziert, wohingegen der Extrakt zur Quantifizierung der niedrig konzentrierten OFS in 0,5 ml THF:H<sub>2</sub>O (1:1; v/v) gelöst und gemessen wurde. Nach Auswertung der Daten beider Messungen wurden diejenigen Werte verwendet, bei denen sich die Konzentrationsverhältnisse von Analyt zu interner Standardsubstanz im kalibrierten Bereich befanden.

Anhand der in Abbildung 39 dargestellten Konzentrationen für die Summen an Dimeren bzw. TriFS ist zu erkennen, dass die Standardabweichungen der in Vierfachbestimmung analysierten Extrakte mit 0,5–4,1 % in einem akzeptablen Bereich lagen. Die Standardabweichungen für die Bestimmung einzelner OFS betrugen 0,5–6,8 % (Dimere) bzw. 0,6–9,6 (Trimere), wobei die höchsten Standardabweichungen im Zuge der Analyse einer der beiden Maisproben auftraten (Tabelle 25). Wie auch bereits bei der Kalibrierung beobachtet, zeigten diejenigen Substanzen eine tendenziell größere Standardabweichung, deren Retentionszeiten größere Unterschiede zur Retentionszeit der internen Standardsubstanz aufwiesen. Deshalb, und da die Matrixeffekte bei wiederholter Messung eines Extraktes gleich sein sollten, wurde vermutet, dass die höheren Standardabweichungen



**Abbildung 39:** Mittels LC-MS/MS-Methode unter Verwendung der internen Standardsubstanz 5-5(me)-Dehydrodiferulasäure analysierte Gehalte an Ferulasäure-Dimeren (DFS) und Dehydrotriferulasäuren (TriFS) in den unkorrigierten unlöslichen Ballaststoffen (UBS) von Mais- und Weizenkörnern, Zuckerrübenschnitzeln und Amaranthsemen; dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung,  $n=4$ . Detaillierte Angaben zu einzelnen DFS und TriFS sind in Tabelle 25 dargestellt.

einiger Analyten durch zeitlich variierende Parameter des verwendeten Massenspektrometers verursacht wurden.

Die Ergebnisse der unabhängigen Doppelbestimmungen eines Probenmaterials liegen größtenteils in einem vergleichbaren Bereich. Die Gehalte der TriFS in Mais-UBS sowie die Gehalte der DFS und TriFS in Weizen-UBS und die Gehalte der FS-Dimere in Zuckerrüben-UBS weisen jedoch größere Unterschiede zwischen Probe 1 und Probe 2 auf (Abbildung 39). Wie bereits in Kapitel 4.5.3.2 erwähnt, wurden diese Unterschiede hauptsächlich durch die Probeneinwaage verursacht, da nur 5–10 mg eines elektrostatisch aufgeladenen Materials verwendet wurden. Diese Vermutung kann durch den Vergleich einzelner Analytgehalte der Doppelbestimmung bekräftigt werden, wobei beachtet werden muss, dass Analyten mit hohen bzw. niedrigen Gehalten unabhängig voneinander aufgearbeitet und analysiert wurden. Somit können Trimere innerhalb der Doppelbestimmungen eines Probenmaterials andere Abweichungen zeigen als Dimere mit hohen Gehalten. Unter Berücksichtigung dieser Gegebenheit weichen vergleichbare Analytgehalte der Doppelbestimmungen um etwa den gleichen Faktor voneinander ab (Tabelle 25). Dieser Fehler kann möglicherweise durch Einsatz größerer Probenmengen und/oder der Verwendung eines Ionisators zur Verringerung der elektrostatischen Aufladung des Probenmaterials minimiert werden.

Um die Richtigkeit der Methode zu untersuchen, wurden Wiederfindungsversuche durchgeführt, bei denen vergleichbar zu den in Kapitel 4.5.4.3 beschriebenen Versuchen die Leermatrizes Apfel-UBS und ein Typ-II-Zellwandimitat verwendet wurden. Die Leermatrizes wurden 2 h vor Beendigung der Verseifung mit Standardsubstanzen versetzt, wobei Mengen eingesetzt wurden, die mit den in Weizenkaryopsen und Zuckerrübenschnitzeln ermittelten Gehalten vergleichbar waren. Zusätzlich wurde die interne Standardsubstanz 5-5(me)-DFS in zwei verschiedenen Konzentrationen zugegeben und die Proben analysiert. Diese Versuche wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Dadurch soll-

ten potentielle Fehler durch beispielsweise unterschiedliches Extraktionsverhalten von Analyt und interner Standardsubstanz oder Ionensuppressionseffekte untersucht werden. Wie bereits in Kapitel 4.5.4.3 erwähnt, konnten in diesen Versuchen keine absoluten Wiederfindungsraten berechnet werden.

Anhand dieser Versuche wurde gezeigt, dass von den meisten Analyten 80–113 % der zugesetzten Mengen wiedergefunden wurden (Tabelle 26, linke Seite). Dies deutete darauf hin, dass die Analyten ähnliche Extraktionseigenschaften wie die interne Standardsubstanz 5-5(me)-DFS besitzen und keine ausgeprägten Ionensuppressionseffekte durch die verwendeten Matrices auftraten. Größere Abweichungen von 100 % wurden dagegen bei den Wiederfindungen für 8-5(dc)-DFS mit 9,1 % im Typ-II-Zellwandimitat und 21–55 % in Apfel-UBS sowie für 5-5/8-8(c)-TriFS (35,0 bzw. 34,6 %) ermittelt. Bei diesen Analyten wurde im Gegensatz zu den anderen Verbindungen bereits bei der Untersuchung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen eine durch Matrix bedingte Verringerung der Empfindlichkeit festgestellt (Abbildung 21), die auf Verlusten bei der Extraktion oder matrixbedingter Ionensuppression zurückzuführen sein könnte. Wiederfindungen von 70–80 % traten bei den Trimeren 8-8(nc)/8-O-4-, 8-8(c)/8-O-4- und 8-5(nc)/5-5-TriFS auf. Die niedrigen Wiederfindungen einiger Substanzen deuten darauf hin, dass auch deren Gehalte in den hier untersuchten Mais-, Weizen-, Zuckerrüben- und Amaranthproben unterbestimmt wurden. Der Vergleich mit Ergebnissen der SIVA (Kapitel 4.5.4) bestätigte diese Annahme im Fall von 5-5/8-8(c)-TriFS, deren mittels SIVA bestimmten Gehalte deutlich höher waren (Tabelle 8). Die Unterschiede der anderen TriFS-Gehalte im Vergleich zu den mittels SIVA bestimmten Gehalte deuteten jedoch nicht eindeutig auf eine Unterbestimmung dieser Analyten mittels LC-MS/MS-Methode unter Verwendung von 5-5(me)-DFS als interne Standardsubstanz hin. Für 8-5(dc)-DFS wurden auch in bereits publizierten Methoden vergleichsweise niedrige Wiederfindungsraten ermittelt. Die Gründe hierfür wurden in einer unvollständigen Extraktion bzw. in einem unvollständigen Lösen im Injektionslösungsmittel nach dem Trocknen des Diethyletherextraktes gesucht (Dobberstein und Bunzel 2010a; Jilek und Bunzel 2013). Somit ist wahrscheinlich, dass die mittels der Methode unter Verwendung von 5-5(me)-DFS als interne Standardsubstanz bestimmten geringeren Gehalte der 8-5-gekoppelten DFS im Vergleich zu den mittels SIVA bestimmten Gehalten durch eine Unterbestimmung der 8-5(dc)-DFS begründet ist (Tabelle 8).

#### 4.5.6 Beurteilung und Vergleich der Methoden

Die beiden entwickelten LC-MS/MS-Multimethoden zur Quantifizierung von OFS zeichnen sich durch eine hohe Empfindlichkeit und Selektivität im Vergleich zu bisherigen Methoden aus. Aufgrund der gesteigerten Empfindlichkeit ist weniger Probenmaterial erforderlich bzw. Proben mit geringeren OFS-Gehalten können analysiert werden. Außerdem werden mit der Erfassung von zehn FS-Dimeren und neun FS-Trimeren, von denen einige erstmals in Pflanzenproben quantifizierbar sind, umfassende Informationen über

auf FS basierende *Crosslinks* in den Probenmaterialien gewonnen. Im Zuge derselben Analyse können zusätzlich die Gehalte von monomerer FS und *p*-CS (*cis*- und *trans*-Isomere) ermittelt werden. Diese werden unter Verwendung von *o*-Cumarsäure als interne Standardsubstanz mittels DAD quantifiziert.

In Hinblick auf die Probenaufarbeitung muss berücksichtigt werden, dass bei der auf einer internen Standardsubstanz (5-5(me)-DFS) beruhenden Methode eine potentielle matrixbedingte Ionensuppression nicht ausgeglichen wird. Daher ist eine umfassende Probenaufreinigung mit entsprechenden Aufreinigungsschritten erforderlich, insbesondere bei Proben, bei denen eine komplexe Matrix zu erwarten ist. Außerdem müssen bei dieser Methode die Proben aufgrund der unterschiedlichen Analyt-Gehalte typischerweise zweimal aufgearbeitet werden, wobei eine geringere und eine höhere Konzentration der internen Standardsubstanz 5-5(me)-DFS eingesetzt werden muss. Des Weiteren ist zu beachten, dass die Extrakte ausreichend verdünnt analysiert werden, da die Kalibrierungen im Konzentrationsbereich von 0,091–0,91 µg/mL durchgeführt wurden und somit nur innerhalb dieses Bereichs die Linearität des Detektors bestätigt wurde.

In diesen Punkten weist die SIVA klare Vorteile auf, da eine möglicherweise auftretende Ionensuppression für Analyten und isotoopenmarkierte Standardsubstanzen im gleichen Ausmaß erfolgen sollte und somit eine potentielle Unterbestimmung der Analyten entgegengewirkt wird. Da jede isotoopenmarkierte interne Standardsubstanz individuell der Probe angepasst werden kann, können alle Analyten typischerweise in einem Lauf analysiert werden. Dadurch werden sowohl weniger Probenmaterial, als auch geringere Zeiten in der Probenvorbereitung und -Messung benötigt. Der Aufwand für die Probenaufarbeitung ist aufgrund der geringeren Probenzahl zwar geringer, dieser Effekt relativiert sich jedoch durch die Herstellung der Mischung aus 18 Standardsubstanzen in unterschiedlichen Konzentrationen. Dies wird insbesondere dann relevant, wenn sehr unterschiedliche Materialien mit stark abweichenden Profilen an OFS analysiert werden. Im Vergleich zur Methode mit 5-5(me)-DFS als alleinige interne Standardsubstanz ist die Messung von höher konzentrierten Analyten weniger problematisch, da eine Überladung der ESI-Quelle die Ionenausbeute von Analyt und interner Standardsubstanz gleichermaßen senkt. Dennoch sollten Ergebnisse für hochkonzentrierte Analyten durch Messung des verdünnten Extraktes verifiziert werden. Ein bedeutender Nachteil der SIVA ist die Abhängigkeit von mehreren isotoopenmarkierten Standardsubstanzen, deren Synthese mit vergleichsweise großem zeitlichen und finanziellen Aufwand verbunden ist. Die interne Standardsubstanz 5-5(me)-DFS kann dagegen relativ schnell in großen Mengen hergestellt werden.

Die Präzision beider Messmethoden wurde anhand der erzielten Standardabweichungen bei Durchführung der Kalibrierung, Messung von Proben und Bestimmung von Wiederfindungsraten beurteilt. Diese waren zumeist < 8 % (Methode mit einer internen Standardsubstanz) bzw. < 4 % (SIVA) und somit in akzeptablen und erwarteten Größenord-

nungen. Die geringeren Standardabweichungen bei der SIVA lassen sich durch den besseren Ausgleich von zeitlich variierenden MS-Bedingungen erklären. Bei Verwendung von 5-5(me)-DFS als interne Standardsubstanz unterscheiden sich die Retentionszeiten von Analyt und internem Standard um bis zu 30 min. In diesem Zeitraum kann es bei der verwendeten LC-MS/MS-Anlage unter anderem zu geringen Veränderungen im Druck des Trocknungs- und Zerstäubungsgases kommen, wodurch die Ionenausbeute der ESI beeinflusst wird.

Die durchgeführten Wiederfindungsversuche zeigten, dass die Richtigkeit der SIVA in einem akzeptablen Bereich liegt. Unter Verwendung der Methode mit einer internen Standardsubstanz wurden dagegen für 8-5(dc)-DFS und einige TriFS Wiederfindungen unter 100% bestimmt, die auf stärkere Matrixeffekte schließen lassen. Die geringen Wiederfindungen könnten durch unterschiedliche Extraktionseigenschaften von Analyten und 5-5(me)-DFS, aber auch durch matrixbedingte Ionensuppression bedingt sein. Dennoch deuten die gemessenen Wiederfindungen auf eine akzeptable Richtigkeit für die Bestimmung der meisten Analyten hin, wobei die Ergebnisse bestimmter TriFS und 8-5(dc)-DFS, die einen Teil der Summe der 8-5-DFS ausmacht, als semiquantitativ eingestuft werden sollten.

Einen weiteren Anhaltspunkt für die Richtigkeit der Methoden liefert der Vergleich der OFS-Gehalte, die mittels beider Methoden in den UBS aus Maiskaryopsen, Weizenkaryopsen, Zuckerrübenschnitzeln und Amaranthsaamen bestimmt wurden. Diese sind in Tabelle 8 als Mittelwerte von Doppelbestimmungen, die jeweils viermal gemessen wurden, zusammengefasst. Wie bereits erwähnt, wurde aufgrund der Wiederfindungsversuche eine Unterbestimmung von 5-5/8-8(c)-TriFS im Falle der nur eine interne Standardsubstanz verwendenden Methode vermutet. Diese Vermutung wird durch die Gehaltsbestimmung von 5-5/8-8(c)-TriFS in verschiedenen Proben bestätigt (Tabelle 8). Nicht mit den Validierungsdaten zu erklären ist jedoch, dass mit dieser Methode höhere Mengen an 8-O-4/8-5(nc)- und 5-5/8-8(nc)-TriFS im Vergleich zur SIVA bestimmt wurden, wohingegen die Gehalte an 8-8(nc) geringer waren.

Alle anderen Ergebnisse der beiden Methoden zeigen eine gute Übereinstimmung, und auch die potentielle Unterbestimmung von 8-5(dc) bei Verzicht auf isotope markierte Standardsubstanzen scheint einen geringen Einfluss auf die Summe der 8-5-gekoppelten Dimere zu haben. Auf eine statistische Auswertung der Ergebnisse zum Vergleich der beiden Methoden wurde aufgrund der geringen Probenzahl und des großen Einflusses der Probeneinwaage und -aufarbeitung verzichtet.

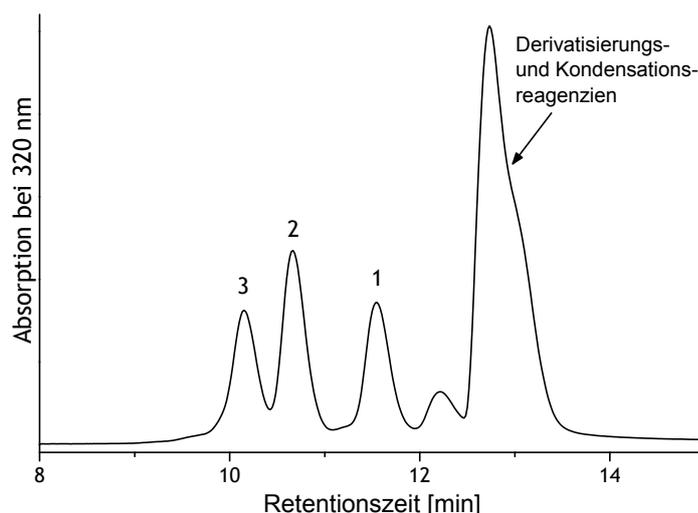
**Tabelle 8:** Gegenüberstellung der Gehalte in µg/g unlösliche Ballaststoffe, die mittels der in dieser Arbeit entwickelten Methoden ermittelt wurden. Diese sind als Mittelwerte von zwei Proben, deren Extrakte jeweils in Vierfachbestimmung gemessen wurden, dargestellt. FS-CBD: Ferulasäure-Cyclobutandimer, DFS: Dehydrodiferulasäure, TriFS: Dehydrotriferulasäure, SIVA: Stabilisotopenverdünnungsanalyse, me: methyl, c: cyclisch, nc: nicht cyclisch, THF: Tetrahydrofuran.

	<b>Mais</b>		<b>Weizen</b>		<b>Zuckerrübe</b>		<b>Amaranth</b>	
	5-5(me)-DFS	SIVA	5-5(me)-DFS	SIVA	5-5(me)-DFS	SIVA	5-5(me)-DFS	SIVA
<b>Σ Dimere</b>	<b>7196,1</b>	<b>6556,9</b>	<b>1012,9</b>	<b>1190,7</b>	<b>971,2</b>	<b>1084,3</b>	<b>160,4</b>	<b>153,2</b>
8-O-4-DFS	2348,4	1927,0	233,1	279,6	236,9	271,1	33,6	33,0
5-5-DFS	1774,1	1654,0	165,1	165,9	152,7	149,4	20,1	17,0
Σ 8-5-DFS	1673,5	1707,3	361,2	445,3	388,4	415,8	42,6	40,6
8-8(c)-DFS	611,3	555,7	113,1	138,8	66,1	74,6	37,4	33,2
Σ 8-8(THF)-DFS	620,6	569,7	67,1	83,6	62,8	69,8	6,6	5,4
8-8(nc)-DFS	68,6	78,3	31,0	37,0	52,0	93,2	9,4	14,7
4-O-5-DFS	71,6	46,0	8,5	6,6	2,4	2,2	0,3	0,4
FS-CBD	28,0	18,8	33,8	33,9	9,8	8,1	10,3	8,8
<b>Σ Trimere</b>	<b>1258,8</b>	<b>1197,6</b>	<b>212,7</b>	<b>254,2</b>	<b>163,9</b>	<b>172,3</b>	<b>24,2</b>	<b>29,1</b>
5-5/8-O-4-TriFS	523,0	481,5	64,3	71,8	44,8	39,7	7,2	6,0
8-5(nc)/5-5-TriFS	172,6	166,5	32,3	69,8	23,5	41,9	2,5	5,7
8-8(c)/8-O-4-TriFS	173,7	232,3	26,0	26,7	24,6	26,8	4,0	4,6
8-O-4/8-O-4-TriFS	123,0	108,4	31,6	32,5	22,4	20,4	3,6	3,5
8-O-4/8-5(nc)-TriFS	93,6	48,1	35,8	21,2	23,2	12,0	2,9	1,9
5-5/8-8(c)-TriFS	73,0	90,9	9,7	20,3	7,4	16,3	2,4	5,9
8-8(c)/5-5-TriFS	57,6	52,5	7,0	7,6	2,7	2,8	0,7	0,8
5-5/8-8(nc)-TriFS	37,0	13,9	5,0	3,4	11,9	8,5	0,8	0,6
8-8(nc)/8-O-4-TriFS	5,3	3,4	1,0	0,9	3,4	3,8	0,2	0,2

## 4.6 UNTERSUCHUNGEN ZUR SUMMENBESTIMMUNG VON FERULASÄURE-DIMEREN MITTELS SEC-FLD

Im Rahmen einer wissenschaftlichen Abschlussarbeit wurden die Möglichkeiten der Entwicklung einer SEC-FLD-Methode zur Summenbestimmung von FS-Dimeren untersucht (Breuer 2016). Ein Teil dieser Arbeit bestand darin, ausgehend von Literaturdaten die Reaktionsbedingungen der Derivatisierung von OFS mit DBD-PZ bzw. DBD-ED (Abbildung 17) zu optimieren (Toyo'oka et al. 1991; Ueno et al. 1999; Kubota et al. 2005; Fukushima et al. 2008). Dazu wurden die Konzentrationsverhältnisse der Reaktanten variiert, verschiedene Kondensationsreagenzien und Lösungsmittel getestet und die Vollständigkeit der Derivatisierungsreaktion anhand von ausgewählten DFS mittels LC-DAD-MS untersucht (Kapitel 8.6.1). Es wurde gezeigt, dass ein Reaktionsgemisch aus DFS (0,013 mM), DBD-PZ bzw. DBD-ED (2,5 mM), 2,2-Dipyridyldisulfid und Triphenylphosphan (jeweils 17,5 mM) in ACN geeignete Derivatisierungsbedingungen darstellten, wohingegen die Verwendung anderer Lösungsmittel in einer unvollständigen Derivatisierung resultierten.

Anhand eines mit DBD-PZ derivatisierten Gemisches aus FS, 5-5-DFS und 8-O-4/8-O-4-TriFS wurde untersucht, ob eine mit Styrol-Divinylbenzol-Copolymer gefüllte SEC-Säule (Phenomenex, Phenogel, 300 x 7,8 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 50  $\text{\AA}$ ) mit ACN als mobile Phase oder eine mit hydroxyliertem Polymethacrylat gefüllte SEC-Säule (TOSOH, TSKgel G2500PW<sub>XL</sub>, 300 x 7,8 mm, 7  $\mu\text{m}$ , < 200  $\text{\AA}$ ) mit ACN:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) als mobile Phase für die Trennung von Mono-, Di- und Trimeren der FS geeignet sind. Die Verwendung von ACN oder eines ACN:H<sub>2</sub>O-Gemisches als Fließmittel hätte den Vorteil, dass ein Trocknen und erneutes Lösen des Reaktionsgemisches nach der Derivatisierung der Proben nicht notwendig wäre. Allerdings konnte unter diesen Bedingungen keine Trennung des Gemisches aus FS-, 5-5-DFS- und 8-O-4/8-O-4-TriFS-Derivaten erreicht werden. Möglicherweise führten sekundäre Wechselwirkung zwischen den Analyten und der stationären Phase dazu, dass die Trennung nicht ausschließlich aufgrund des hydrodynamischen Volumens der Analyten erfolgte. Eine relativ späte Elution der Analyten bekräftigte diese Annahme. Aus diesem Grund wurden Trennungen mit THF als mobile Phase getestet. Da jedoch keine HPLC-FLD-Anlage zur Verfügung stand, die resistent gegenüber THF war, wurde die Entwicklung der chromatographischen Trennung an einer HPLC-UV-Anlage durchgeführt. Unter den verfügbaren stationären Phasen wurde die beste Trennung des Gemisches aus FS-, 5-5-DFS- und 8-O-4/8-O-4-TriFS-Derivaten unter Verwendung einer Säule auf Styrol-Divinylbenzol-Copolymer-Basis (Phenomenex, Phenogel, 300 x 7,8 mm, 7  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ ) mit einer Flussrate von 0,8 mL/min und einer Trenntemperatur von 40 °C erreicht (Abbildung 40). Möglicherweise kann die Trennung der Di- und Trimere, die unter den hier verwendeten Bedingungen nicht basisliniengetrennt war, durch Ergänzung einer zweiten, baugleichen Säule verbessert werden.



**Abbildung 40:** Chromatogramm nach Größenausschlusschromatographischer Trennung und UV-Detektion eines Gemisches aus Ferulasäure (1), 5-5-Dehydrodiferulasäure (2) und 8-O-4/8-O-4-Dehydrotriferulasäure (3), die mit 4-(*N,N*-Dimethylaminosulfonyl)-7-piperazino-2,1,3-benzoxadiazol fluoreszenzderivatisiert wurden. Die Bedingungen der Derivatisierungsreaktion sind in Kapitel 8.6.1 beschrieben.

Die Bestimmung von *Response*-Faktoren der Fluoreszenz-Detektion erfolgte nach Trennung an einer C18-Säule, da, wie bereits erwähnt, keine THF-resistente HPLC-FLD-Anlage zur Verfügung stand (Kapitel 8.6.2). Durch Injektion von ausgewählten DFS-Derivaten in bekannten Konzentrationen und Integration der Analyt-Peaks in den Chromatogrammen nach Fluoreszenz-Detektion konnten *Response*-Faktoren berechnet und miteinander verglichen werden. Diese sind relativ zueinander in Tabelle 9 dargestellt. Obwohl vermutet

**Tabelle 9:** Mittels Fluoreszenzdetektor (FLD) bzw. UV-Detektor bestimmte relative *Response*-Faktoren ausgewählter Dehydrodiferulasäuren (DFS) nach Derivatisierung mit 4-(*N,N*-Dimethylaminosulfonyl)-7-piperazino-2,1,3-benzoxadiazol (DBD-PZ) oder 4-(*N,N*-Dimethylaminosulfonyl)-7-*N*-(2-aminoethyl)amino-2,1,3-benzoxadiazol (DBD-ED). nc: nicht cyclisch, n.b.: nicht bestimmt.

Analyt	DBD-PZ-Derivat		DBD-ED-Derivat	
	<i>Response</i> (FLD)	<i>Response</i> (UV)	<i>Response</i> (FLD)	<i>Response</i> (UV)
8-O-4-DFS	100 %	100 %	100 %	100 %
5-5-DFS	76 %	88 %	50 %	63 %
8-8(nc)-DFS	46 %	54 %	n.b.	n.b.
4-O-5-DFS	94 %	98 %	79 %	98 %

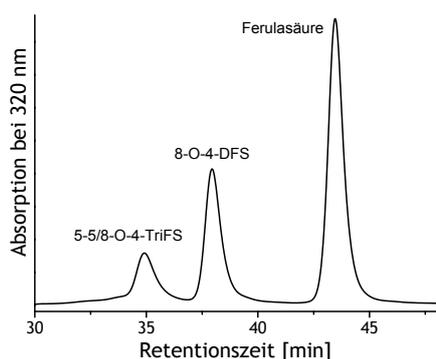
wurde, dass die Fluoreszenzintensitäten der verwendeten Fluorophore aufgrund isolierter  $\pi$ -Elektronensysteme nicht von der substituierten Carbonsäure beeinflusst werden, wiesen die ermittelten *Response*-Faktoren deutliche Unterschiede auf. Zum Teil könnten diese Unterschiede durch die Gradientenelution begründet sein, mit der die HPLC-FLD-Messung durchgeführt wurde, da das Lösungsmittel, insbesondere bei der Detektion mittels FLD, einen Einfluss auf die Signalintensität hat (Díaz et al. 2009). Die Retentionszeiten

der analysierten DFS-Derivate unterschieden sich jedoch lediglich um maximal 8 min, was einem Unterschied in der Fließmittelzusammensetzung von maximal 4 % entspricht. Auch *Quenching*-Effekte der substituierten DFS-Regioisomere können die unterschiedlichen *Response*-Faktoren nur teilweise erklären, da selbst bei der Absorption bei 432 nm bzw. 437 nm (Absorptionsmaximum von DBD-PZ- bzw. DBD-ED-Derivaten, jedoch keine Absorption der DFS) deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Regioisomeren ermittelt wurden (Tabelle 9). Weitere Untersuchungen, die zur Erklärung dieser Unterschiede beitragen könnten, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Somit blieb offen, warum sich die *Response*-Faktoren der untersuchten DFS-Regioisomere so stark unterschieden und folglich eine Summenbestimmung von FS-Dimeren bzw. -Trimeren mittels SEC-FLD oder SEC-UV unter den gewählten Bedingungen nicht möglich war.

## 4.7 ENTWICKLUNG EINER SEC-FTIR-METHODE ZUR SUMMENBESTIMMUNG VON FERULASÄURE-DIMEREN

Teile dieses Kapitels wurden im Rahmen einer wissenschaftlichen Abschlussarbeit und in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Wilhelm, Institut für Technische Chemie und Polymerchemie erarbeitet (Gerster 2015).

### 4.7.1 Chromatographische Parameter



**Abbildung 41:** Chromatogramm nach Größenausschlusschromatographie und UV-Detektion eines Gemischs aus 5-5/8-O-4-Dehydrotriferulasäure (TriFS), 8-O-4-Dehydrodiferulasäure (DFS) und Ferulasäure.

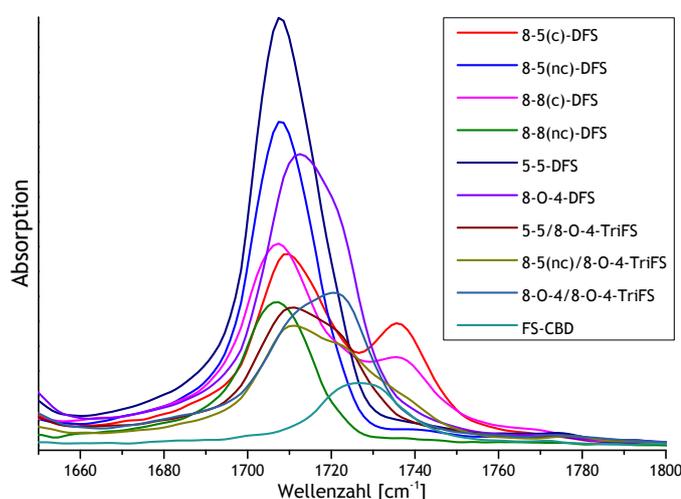
Die Trennung von FS-Derivaten nach hydrodynamischem Volumen mittels SEC wurde zunächst anhand von FS, 8-O-4-DFS und 5-5/8-O-4-TriFS an einer SEC-UV-Anlage optimiert. Dazu wurden verschiedene stationäre Phasen und Säulendimensionen, Flussraten der mobilen Phase und Trenntemperaturen getestet, wobei eine Kombination aus zwei identischen Säulen (300 x 15 mm, 5  $\mu$ m) gefüllt mit einem Styrol-Divinylbenzol-Copolymer mit einer Ausschlussgrenze von 1000 Da bei Raumtemperatur zur besten Trennung führte. Flussraten zwischen 0,1–0,6 mL/min resultierten in einer vergleichbaren Trennleistung. Um mittels FTIR-Detektion unter Verwendung von 67 Scans pro Datenpunkt 10–12 Datenpunkte pro Peak aufzunehmen, wurde für diese Methode die Flussrate auf 0,3 mL/min festgelegt. Unter diesen Bedingungen eluierte das injizierte Lösungsmittel nach etwa 65 min. Als Fließmittel wurde lediglich THF getestet, da THF ein spektrales Fenster bei 1700  $\text{cm}^{-1}$  aufweist (Günzler und Gremlich 2003), und die verwendeten Säulen nicht reversibel mit anderen Lösungsmitteln betrieben werden konnten. Das Chromatogramm der Trennung der drei verwendeten Standardsubstanzen ist in Abbildung 41 dargestellt.

### 4.7.2 Bestimmung von *Response*-Faktoren

Die Bestimmung von FTIR-*Response*-Faktoren der einzelnen DFS und TriFS erfolgte, indem Stammlösungen von Standardsubstanzen hergestellt und mittels SEC-FTIR analysiert wurden. Da zu diesem Zeitpunkt nur eine Auswahl an OFS zur Verfügung stand, konnten nicht alle DFS bzw. TriFS getestet werden. Jedoch war die *Response*-Bestimmung für die jeweils dominierenden Regioisomere 8-5(c)-, 8-5(nc)-, 5-5-, 8-O-4-, 8-8(c)- und 8-8(nc)-DFS bzw. 5-5/8-O-4-, 8-O-4/8-5(nc)- und 8-O-4/8-O-4-TriFS möglich. Die Retentionszeiten dieser Messung unterschieden sich geringfügig von denen der Analyse mittels SEC-

UV, die Trennung war jedoch vergleichbar (Abbildung 43A). 8-5(dc) nimmt in dieser Methode eine Sonderstellung ein, da es aufgrund der Decarboxylierung vermutlich sowohl ein geringeres hydrodynamisches Volumen als auch einen niedrigeren *Response*-Faktor besitzt. Da 8-5(dc) jedoch typischerweise einen geringen Anteil der FS-Dimere ausmacht, ist eine potentielle Unterbestimmung dieser Substanz weniger bedeutsam.

Eine qualitative Betrachtung der aufgenommenen FTIR-Spektren der jeweiligen Peakmaxima zeigte, dass der Wellenzahlenbereich, in dem Signale der Schwingungen der Carbonylfunktion zu erwarten sind, bei den einzelnen OFS wesentliche Unterschiede aufwies. Zwar weisen mit Ausnahme des FS-CBD alle OFS ein Maximum bei  $1707\text{--}1713\text{ cm}^{-1}$  auf, jedoch sind bei einigen Substanzen mehr oder weniger ausgeprägte Schultern im Bereich höherer Wellenzahlen zu sehen (Abbildung 42). Außerdem ist erkennbar, dass diejenigen



**Abbildung 42:** Fourier-Transformations-Infrarot-Spektren der verschiedenen Dehydrodiferulasäuren (DFS), Dehydrotriferulasäuren (TriFS) und eines Ferulasäure-Cyclobutandimers (FS-CBD) in einem ausgewählten Wellenzahlenbereich. c: cyclisch, nc: nicht cyclisch.

Verbindungen, die eine ausgeprägte Schulter oder ein zweites Absorptionsmaximum besitzen, gleichzeitig eine geringere Absorption im Bereich von  $1707\text{--}1713\text{ cm}^{-1}$  aufweisen. Dieser Effekt wird jedoch teilweise dadurch überlagert, dass einige Substanzen aufgrund verminderter Löslichkeit in THF in geringeren Konzentrationen eingesetzt wurden. So wurden von 8-8(nc)-DFS und den drei TriFS Konzentration von etwa  $5\text{ mg/mL}$  und vom FS-CBD eine Konzentration von etwa  $2,5\text{ mg/mL}$  eingesetzt, wohingegen von den restlichen DFS Konzentrationen von etwa  $10\text{ mg/mL}$  injiziert wurden.

Die Berechnung von *Response*-Faktoren bei der Wellenzahl  $1707\text{ cm}^{-1}$  resultierte im Falle der DFS in Werten, deren Standardabweichung etwa 35 % des Mittelwertes betrug. Dabei war auffällig, dass 8-5(nc)- und 5-5-DFS, die keine Schultern im IR-Spektrum besaßen, höhere *Response*-Faktoren zeigten, wohingegen DFS, die in dem betrachteten Wellenlängenbereichen ein zweites Absorptionsmaximum besaßen (8-5(c)- und 8-8(c)-DFS), eine geringere Signalantwort aufwiesen. Die *Response*-Faktoren der Trimere waren mit

einer Standardabweichung von etwa 20 % weniger unterschiedlich, deuteten aber einen vergleichbaren Trend an. Um besser übereinstimmende *Response*-Faktoren zu erhalten, wurden die Daten erneut ausgewertet, jedoch unter Verwendung bestimmter Wellenzahlenbereiche anstelle bei einer Wellenzahl. Dabei wurde ein Bereich von 1696–1786 cm<sup>-1</sup> ermittelt, bei dessen Anwendung die *Response*-Faktoren der Dimere bzw. Trimere eine Standardabweichung von 18 % bzw. 4 % um den ermittelten Mittelwert aufwiesen. Eine wiederholte Bestimmung der *Response*-Faktoren mit neu hergestellten Standardlösungen zeigte, dass die Unterschiede hauptsächlich auf das unterschiedliche Verhalten der Substanzen bei der IR-Spektroskopie und weniger auf die Präzision der Messung oder einer fehlerhaften Einwaage bei der Herstellung der Standardlösungen zurückzuführen sind. Die Ergebnisse dieser Doppelbestimmung sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

**Tabelle 10:** Ermittelte *Response*-Faktoren der verschiedenen Dehydrodiferulasäuren (DFS), Dehydrotriferulasäuren (TriFS) und des Ferulasäure-Cyclobutandimers (FS-CBD) unter Verwendung des Wellenzahlenbereichs von 1696–1786 cm<sup>-1</sup>. MW: Mittelwert, R/2: Range/2, c: cyclisch, nc: nicht cyclisch.

Analyt	<i>Response</i> (MW ± R/2; n=2) [% vom MW]	
5-5-DFS	0,778 ± 0,022	127
8-5(c)-DFS	0,591 ± 0,006	97
8-5(nc)-DFS	0,711 ± 0,009	116
8-8(c)-DFS	0,514 ± 0,018	84
8-8(nc)-DFS	0,485 ± 0,043	79
8-O-4-DFS	0,674 ± 0,011	110
FS-CBD	0,523 ± 0,002	86
8-O-4/8-5(nc)-TriFS	0,583 ± 0,044	99
8-O-4/8-O-4-TriFS	0,615 ± 0,033	104
5-5/8-O-4-TriFS	0,574 ± 0,121	97

Zu berücksichtigen ist, dass durch Detektion größerer Wellenzahlenbereichen das Signal/Rausch-Verhältnis im Vergleich zur Messung bei der Wellenzahl 1707 cm<sup>-1</sup> reduziert wurde. Diese geringere Empfindlichkeit kann dadurch erklärt werden, dass Wellenzahlen, bei denen die Analyten eine geringe Absorption – und damit ein geringes Signal/Rausch-Verhältnis – besitzen, ebenso berücksichtigt werden wie Wellenzahlen, bei denen die Analyten eine hohe Absorption zeigen.

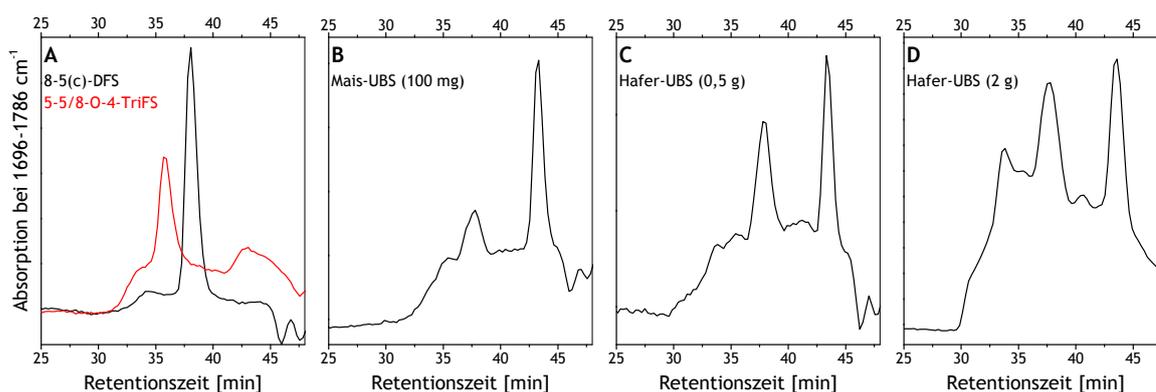
#### 4.7.3 Kalibrierung und Validierung

Die Modifikationen des verwendeten FTIR-Spektrometers beinhalteten unter anderem die Verwendung eines Quantendetektors aus einem Quecksilber-Cadmium-Tellurid-Halbleitmaterial (Beskers et al. 2015). Dieser musste manuell mit flüssigem N<sub>2</sub> auf –196 °C gekühlt werden, wobei etwa 0,5 L N<sub>2</sub> für maximal 8 h Messzeit benötigt wurden. Des Weiteren konnten durch Verwendung eines Autosamplers zwar präzise Volumina repro-

duzierbar injiziert werden, jedoch musste jede Messung mit einer Dauer von etwa 70 min manuell gestartet werden. Daraus resultierte, dass in der Regel nicht mehr als 5–8 Proben pro Tag gemessen werden konnten. Aus diesen Gründen und aufgrund begrenzter Verfügbarkeit der Anlage musste die Validierung dieser Methode auf die wichtigsten Parameter beschränkt werden.

Zunächst wurde die Empfindlichkeit der SEC-FTIR-Messung untersucht, indem Lösungen aus 8-8(c)-DFS und 5-5/8-O-4-TriFS in verschiedenen Verdünnungen gemessen wurden. Dabei zeigte sich, dass bei einem Injektionsvolumen von 100  $\mu\text{L}$  Konzentrationen von 1 mg/mL notwendig sind, um ein Signal/Rauschverhältnis von 10:1 bzw. 9:1 im Falle des Dimers bzw. Trimers zu erhalten. Dies zeigte, dass vergleichsweise hohe Probenmengen eingesetzt werden müssen, um die Detektion mittels FTIR zu ermöglichen.

Daraufhin wurden die UBS von Haferkaryopsen (500 mg) und Maiskaryopsen (100 mg) aufgearbeitet und mittels SEC-FTIR analysiert (Kapitel 8.7). In den Chromatogrammen der Wellenzahlen  $1696\text{--}1786\text{ cm}^{-1}$ , bei denen Carboxy-, Aldehyd- und Ketogruppen absorbieren, war ab der Totzeit von ca. 30 min ein intensives Signal zu erkennen, von dem sich bei den Retentionszeiten der Dimere (38 min) und der Monomere FS und *p*-CS (43 min) erkennbare Peaks abhoben. Dagegen war die Elution der geringen Mengen an Trimeren (Retentionszeit 36 min) so stark von Matrixbestandteilen überlagert, dass kein Peak erkennbar war (Abbildung 43). Auch eine Erhöhung der Probenmenge auf 2 g Hafer-UBS ließ keine eindeutige Identifizierung des Peaks für TriFS zu (Abbildung 43D). Aus diesem Grund war die Summenbestimmung der Gehalte an TriFS unter Verwendung der gewählten Bedingungen nicht möglich und die weitere Validierung sowie die Kalibrierung der Methode wurde auf die Quantifizierung von FS-Dimeren beschränkt.



**Abbildung 43:** Größenausschlusschromatogramme für eine Standardmischung (A) sowie die alkalischen Hydrolysate von unlöslichen Ballaststoffen (UBS) aus Mais (B) und Hafer (C,D). Die Detektion erfolgte mittels Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie in einem Wellenzahlenbereich von  $1696\text{--}1786\text{ cm}^{-1}$ . DFS: Dehydrodiferulasäure, TriFS: Dehydrotriferulasäure.

Da die *Response*-Faktoren der einzelnen DFS Unterschiede aufwiesen (Tabelle 10), wurde für die Kalibrierung eine Mischung von DFS eingesetzt, deren Zusammensetzung das

FS-Profil im alkalischen Hydrolysat monokotyler Zellwände representieren sollte (Bunzel et al. 2001; Dobberstein und Bunzel 2010a; Jilek und Bunzel 2013). Die Anteile betragen 30 % 8-5(c)-DFS, jeweils 20 % 8-5(nc)- und 8-8(c)-DFS und jeweils 10 % 8-O-4-, 8-8(nc)- und 5-5-DFS. Die Kalibrierung erfolgte in Dreifachbestimmung durch Messung von sechs äquidistanten Kalibrierpunkten in einem Bereich von 1–11 µg/mL und Auftragung der Peakflächen (Detektion des Wellenzahlbereichs 1696–1786 cm<sup>-1</sup>) gegen die entsprechenden Konzentrationen. Durchführung des Mandel-Tests zeigte, dass die quadratische Regression nicht signifikant besser geeignet war als die lineare Regression (Prüfgröße 0,1), deren Bestimmtheitsmaß  $R^2=0,99977$  betrug. Die Geradengleichung war  $y = 4,9775x + 0,075$ ; mit  $y$ : Peakfläche [ $10^{-4}$ ];  $x$ : Konzentration [mg/mL].

Zur Beurteilung der Methodenpräzision wurden Mais-UBS in Vierfachbestimmung (Einwaage je 100 mg) analysiert. Dabei wurde ein Gehalt von  $4,97 \pm 0,02$  mg DFS/g UBS ermittelt. Die Standardabweichung von nur 0,5 % zeugt von einer präzisen Messung.

Die Richtigkeit wurde mittels Wiederfindungsversuchen überprüft, bei denen die bereits mit dieser Methode analysierten UBS von Mais (100 mg) erneut in Vierfachbestimmung aufgearbeitet wurden. Nach der alkalischen Hydrolyse wurden die Lösungen mit 0,8 mg DFS (160 % des gemessenen Gehaltes) in der bereits für die Kalibrierung verwendeten Zusammensetzung dotiert. Nach Analyse mittels SEC-FTIR wurden Wiederfindungsraten von  $68 \pm 6$  % berechnet, was eine methodenbedingte Unterbestimmung von DFS vermuten lässt. Im Vergleich mit den Ergebnissen der LC-MS/MS-Methoden (Kapitel 4.5) wurden nur 69–76 % der Gehalte an Dimeren bestimmt (Tabelle 8). Somit ist wahrscheinlich, dass die mittels SEC-FTIR-Methode bestimmten Gehalte unterbestimmt wurden. Potentielle Verluste wurden in der zusätzlichen Probenaufreinigung durch Extraktion in 5%ige NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und Reextraktion nach Ansäuern in Ethylacetat vermutet. Deshalb wurde eine größere Menge UBS verseift, extrahiert und aliquotiert. Anschließend wurden Dreifachbestimmungen von unbehandelten Extrakten und Extrakten nach zusätzlichen flüssig-flüssig-Extraktionsschritten (5 % NaHCO<sub>3</sub> und Ethylacetat) mittels HPLC-UV analysiert, wobei die Chromatographie und Peak-Identifizierung anhand der Methode von Dobberstein und Bunzel (2010a) erfolgte. Der Vergleich der Peakflächen von 8-8(c)-, 8-8(nc)-, 8-5(c)-, 8-5(nc)-, 5-5- und 8-O-4-DFS zeigte, dass bei diesen DFS Verluste von etwa 5 % durch die zusätzliche flüssig-flüssig-Extraktion auftraten. Für 8-5(dc)-DFS waren dagegen Verluste von knapp 90 % zu verzeichnen, die auf einer unvollständigen Extraktion in wässrige NaHCO<sub>3</sub>-Lösung beruht, sodass diese DFS in der entsprechenden organischen Phase gefunden werden konnte. Die Optimierung der Probenaufarbeitung würde die Ergebnisse jedoch nur unwesentlich beeinflussen, da 8-5(dc)-DFS auch in der SEC-FTIR-Messung unterbestimmt wird (Kapitel 4.7.2) und nur einen geringen Anteil der DFS ausmacht. Außerdem kann die Unterbestimmung von 8-5(dc)-DFS nicht die geringen Wiederfindungsraten verursachen, da 8-5(dc) in diesen Versuchen nicht eingesetzt wurde. Möglicherweise sind die vergleichsweise niedrigen DFS-Gehalte sowie die Wie-

derfindungsraten von  $68 \pm 6\%$  durch die geringe Selektivität des FTIR-Detektors und die damit nach dem Totvolumen der Säule stark ansteigende Grundlinie begründet. Die Peak-Integration wurde von Tal zu Tal durchgeführt, was aufgrund ungleichmäßiger Überlagerungen anderer Signale in zu geringen Peakflächen resultiert haben könnte (Abbildung 43B). Eine andere Art der Integration würde die Definition einer Grundlinie erfordern, was sich bei den erhaltenen Chromatogrammen als sehr problematisch darstellt.

#### 4.7.4 Beurteilung der Methode

Wie bereits in Kapitel 4.7.3 beschrieben, erfordert die Messung mittels SEC-FTIR eine regelmäßige Kühlung mit  $N_2$  und eine manuelle Probeninjektion. Auch bei der Auswertung der zweidimensionalen Rohdaten ist ein hoher manueller Aufwand nötig, da bisher keine geeignete Software zur automatisierten Selektion der Wellenzahlen und Integration der Peaks zur Verfügung steht.

Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche lassen darauf schließen, dass eine semi-quantitative Bestimmung von DFS mittels SEC-FTIR prinzipiell möglich ist, jedoch einige Einschränkungen mit sich bringt. So sollte aufgrund der geringen Selektivität eine möglichst intensive Probenaufreinigung durchgeführt werden, um die Codetektion von Matrixbestandteilen zu minimieren. Des Weiteren sind vergleichsweise hohe Probenmengen nötig, da die Messzeit des FTIR-Spektrometers durch die online-Kopplung an die SEC begrenzt wird, woraus eine geringe Empfindlichkeit resultiert.

Der Vergleich der *Response*-Faktoren einzelner DFS zeigte, dass diese stärker voneinander abweichen als erwartet. Durch Verwendung des Wellenzahlenbereichs von  $1696\text{--}1786\text{ cm}^{-1}$  und die Kalibrierung anhand eines DFS-Gemisches kann dieser Fehler jedoch begrenzt werden, vorausgesetzt, dass die jeweiligen DFS-Anteile der Proben nicht stark von der typischen Verteilung abweichen. Auch die nicht-vermeidbare Unterbestimmung von 8-5(dc)-DFS ist vermutlich weniger bedeutend, da diese typischerweise nur einen geringen Anteil der DFS ausmacht. Dennoch muss aufgrund der durchgeführten Wiederfindungsversuche und dem Vergleich der Ergebnisse mit Werten anderer Methoden davon ausgegangen werden, dass die Analyse mittels SEC-FTIR in einer Unterbestimmung der DFS resultiert und somit als semiquantitativ eingestuft werden muss.

## 4.8 ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION

Ein Teil dieser Arbeit bestand in der Entwicklung einer LC-MS/MS-Multimethode, mit der FS, eine Auswahl an mikrobiellen und hepatischen Metaboliten der FS sowie *p*-CS und Zimtsäure in Milch quantifiziert werden können. Die meisten der für diese SIVA notwendigen isotope markierten Standardsubstanzen sind – ebenso wie auch die nicht markierte 3-Hydroxyhippursäure – nicht kommerziell verfügbar und wurden deshalb mit Hilfe geeigneter Synthesen hergestellt. Hierzu wurden die [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Zimtsäuren mittels Knoevenagel-Reaktion synthetisiert, die sich im Vergleich zu anderen Reaktionswegen durch einen geringeren Zeit- und Arbeitsaufwand auszeichnet. Die [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Phenylpropionsäuren wurden durch katalytische Hydrierung der synthetisierten <sup>13</sup>C-markierten Zimtsäuren gewonnen. Die Synthese von [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Hippursäure wurde durch Anwendung der Schotten-Baumann-Reaktion unter Verwendung von [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Glycin durchgeführt und die Hydroxybenzoesäuren und Phenylelessigsäure wurden mittels H/D-Austauschreaktionen als deuterierte Isotopologe hergestellt. Die Ausbeuten dieser Synthesen lagen in einem mit Literaturdaten vergleichbaren Bereich (Robbins und Schmidt 2004; Fumeaux et al. 2010; Marini et al. 2010; Orfanopoulos et al. 1990; Kaushik et al. 2012). Zur Gewinnung von 3-Hydroxyhippursäure bzw. [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]3-Hydroxyhippursäure wurde ein Syntheseweg unter Verwendung der Schotten-Baumann-Reaktion bei Einsatz von Trimethylsilyl-Schutzgruppen erarbeitet. Im Vergleich zur Synthese bei Verwendung von Ethoxycarbonyl-Schutzgruppen (Lima et al. 2008) wurden vergleichbare Ausbeuten erhalten (15 bzw. 28 % im Vergleich zu 20 %), jedoch waren weniger Reaktions- und Aufreinigungsschritte erforderlich.

Die QuEChERS-Methode wurde aufgrund ihrer zahlreichen Vorteile – unter anderem eine schnelle, einfache und günstige Durchführung – zur Probenaufarbeitung gewählt und auf die Extraktion von phenolischen Säuren aus Milch angepasst. Während die Entfernung störender Matrixbestandteile auch mittels anderer Methoden möglich ist (Besle et al. 2010; King et al. 1998), bestand ein weiterer Vorteil der QuEChERS-Methode darin, dass ein Extrakt mit geringem Wassergehalt gewonnen wurde. Dieser konnte in vergleichsweise kurzer Zeit aufkonzentriert werden, sodass eine höhere Methodenempfindlichkeit erreicht wurde, was unverzichtbar zur Bestimmung einiger gering-konzentrierter Analyten war. Außerdem wurde eine optionale Enzyminkubation mit Glucuronidase/Sulfatase in die Probenaufarbeitung integriert, die nützliche Informationen zu den in Milch enthaltenen hepatischen Phase-II-Konjugaten liefert (Abbildung 19). Beispielsweise wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass alle Analyten – auch diejenigen, bei denen lediglich eine Ester-Konjugation möglich ist – teilweise in Glucuronid- und/oder Sulfat-gebundener Form vorliegen. Zur Freisetzung der Konjugate wurde die Milchprobe selbst anstelle eines Extraktes (Besle et al. 2010) mit Enzymen inkubiert, sodass potentielle Verluste der konjugierten – und somit polareren – Analyten bei der Extraktion vermieden wurden.

Die entwickelte SIVA zur Bestimmung von FS und 14 weiteren phenolischen Säuren wurde anhand von drei Milchproben mit unterschiedlichen Fettgehalten in Bezug auf Empfindlichkeit, Präzision und Richtigkeit validiert. Aufgrund der Verwendung von Isotopologen als interne Standardsubstanzen wurden die meisten Analyten mit hoher Präzision und Richtigkeit bestimmt. Die durchgeführten Wiederfindungsversuche signalisierten jedoch, dass die Bestimmung von 4-Hydroxybenzoesäure, Phenylpropionsäure und Zimtsäure als semiquantitativ eingestuft werden sollten. Je nach Analyt wurden Bestimmungsgrenzen von etwa 0,1–9 µg/kg Milch ermittelt, die im Vergleich zu HPLC-UV-Methoden um ein Vielfaches geringer sind (beispielsweise Qi et al. (2009): Nachweisgrenze von 200 µg Benzoesäure/kg Milch). Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der entwickelten Methode konnten viele der analysierten Verbindungen erstmals in Milch quantifiziert werden. Auch 3-Hydroxyhippursäure wurde trotz relativ hoher Gehalte von 100–250 µg/kg Milch in bisherigen Methoden nicht erfasst, was vermutlich auf die fehlende kommerzielle Verfügbarkeit der entsprechenden Standardsubstanz zurückzuführen ist. Die Gehalte von Analyten, die bereits mit anderen Methoden bestimmt wurden (Hippursäure, Benzoesäure, 4-Hydroxybenzoesäure, Phenylelessigsäure und FS), unterscheiden sich zum Teil stark von den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse (Besle et al. 2010; Qi et al. 2009; Marsili et al. 1981). Allerdings wurde gezeigt, dass die Ernährung der Kühe einen Einfluss auf die Konzentration phenolischer Säuren sowie auf andere phenolische Substanzen in deren Milch hat (Besle et al. 2010). Auch in dieser Arbeit konnten anhand von zwei konventionell und einer ökologisch erzeugten Milchprobe Unterschiede in den Gehalten einiger phenolischer Säuren aufgezeigt werden (Abbildung 19). Um jedoch den Einfluss der mit der Nahrung aufgenommenen FS auf die Gehalte der analysierten phenolischen Säuren in Milch zu beurteilen oder Markersubstanzen zu identifizieren, mit denen eine Überprüfung der Echtheit von Produkten wie „Heumilch“, „Weidemilch“ oder „Alpenmilch“ möglich sein könnte, muss eine größere Anzahl authentischer Proben analysiert werden.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurden Strategien erarbeitet, mit denen FS-CBD, DFS und TriFS sowie ihre <sup>13</sup>C-markierten Isotopologe als Standardsubstanzen gewonnen werden können. Unter anderem wurde eine oxidative Kopplung von Ethylferulat mittels Cu[TEMED]-Komplex durchgeführt, wobei geringfügige Modifikationen der von Lu et al. (2012) beschriebenen Reaktionsbedingungen zu höheren Ausbeuten an DFS und TriFS führten. Im Vergleich zu anderen oxidativ-chemischen oder oxidativ-enzymatischen Reaktionen wurde unter Verwendung des Cu[TEMED]-Komplexes in ACN ein Produktgemisch gebildet, das eine größere Anzahl unterschiedlicher OFS mit relativ ausgewogenen Produktanteilen enthält (Tabelle 4) (Bunzel et al. 2008b; Ralph et al. 1998; Tobinaga und Kotani 1972; Aljawish et al. 2014). Um die einzelnen OFS im präparativen Maßstab aus dem komplexen Produktgemisch zu isolieren, wurde eine Kombination aus Kristallisation, Flash-Chromatographie, Sephadex-Chromatographie und RP-HPLC erarbeitet (Abbildung 21). Dieses Verfahren ermöglichte es, mit einem zeitlichen Aufwand von 3–4 Wochen

sieben DFS und neun TriFS als Standardsubstanzen zu gewinnen. Dabei konnten ausgehend von 1 g FS Ausbeuten von insgesamt 240 mg DFS und TriFS mit Reinheiten von mindestens 95 % (bestimmt mittels UV/VIS- und NMR-Spektroskopie) isoliert werden. Ein ähnlicher Zeit- und Arbeitsaufwand ist zur Isolierung von OFS aus Maiskleie notwendig, bei der jedoch zum einen keine  $^{13}\text{C}$ -markierten Standardsubstanzen gewonnen werden können und zum anderen die erhaltenen Mengen aufgrund der begrenzten Kapazität der Sephadex-Säule geringer sind (Bunzel et al. 2004a). Diese begrenzte Kapazität wurde durch das in dieser Arbeit entwickelte Aufreinigungsverfahren optimal genutzt, da FS und die meisten DFS zuvor mittels Flash-Chromatographie abgetrennt wurden, so dass die Sephadex-Säule hauptsächlich mit TriFS und TetraFS beladen wurde.

Unter den aufgereinigten TriFS befanden sich fünf Verbindungen, die im Rahmen dieser Arbeit erstmals beschrieben wurden. Diese wurden mittels NMR-Spektroskopie, LC-MS/MS und hochauflösender MS eindeutig identifiziert und charakterisiert. Außerdem wurde das Vorkommen dieser TriFS in den alkalischen Hydrolysaten von Mais-, Weizen-, Zuckerrüben- und teilweise Amaranth-UBS anhand charakteristischer Retentionszeiten und Massenübergängen mittels LC-MS/MS nachgewiesen. Somit wurde gezeigt, dass FS-Crosslinks in vielfältiger Weise existieren als bisher bekannt war. Um einen detaillierteren Einblick in die Architektur pflanzlicher Zellwände zu erhalten, sollten die bislang unbekanntesten TriFS in zukünftigen Analysen mitberücksichtigt werden, was durch die Verfügbarkeit entsprechender Standardsubstanzen möglich ist. Des Weiteren wurden aus dem Reaktionsgemisch der oxidativen Kopplung von Ethylferulat fünf TetraFS isoliert, deren Mengen und Reinheiten für Messungen zur Strukturcharakterisierung mittels NMR-Spektroskopie sowie LC-MS/MS ausreichen. Anhand dieser Messungen konnte eines der Tetramere – 8-5(nc)/5-5/8-5(nc)-TetraFS – identifiziert werden, wohingegen die Strukturaufklärung der anderen vier synthetisierten TetraFS nicht eindeutig möglich war. Allerdings konnten mögliche Kopplungstypen innerhalb der TetraFS identifiziert werden. Dabei war auffällig, dass diese, ebenso wie die bereits in früheren Arbeiten aus Maiskleie isolierten 4-O-8/5-5/8-O-4- und 4-O-8/5-5/8-5(nc)-TetraFS (Bunzel et al. 2006), höchstens eine 5-5-Bindung enthalten (Kapitel 4.3.7). Die in dieser Arbeit synthetisierten TetraFS wurden – unter Vorbehalt von TetraFS 31,0 min – in den alkalischen Hydrolysaten von Mais- und Weizen-UBS nachgewiesen (Kapitel 4.4.2). Somit kann geschlossen werden, dass entweder intramolekulare Kopplung von Arabinoxylanen nicht ausschließlich durch 5-5-Kopplung möglich ist, wie es von Hatfield und Ralph (1999) postuliert wurde, oder dass TetraFS Verknüpfungspunkte von mindestens drei Zellwandpolymeren darstellen. Die Unterscheidung von intra- und intermolekularen FS-Crosslinks hat einen entscheidenden Einfluss auf die Zellwandarchitektur (Kapitel 1.4.3).

In einer weiteren Reaktion zur Gewinnung von OFS-Standardsubstanzen wurden die Bedingungen der enzymatischen Kopplung von Ethylferulat (Ralph et al. 1998) dahingehend verändert, dass möglichst hohe Mengen isomerer 8-8(THF)-DFS entstehen. Diese

werden bei Durchführung der Synthese unter Einhaltung der in der Literatur beschriebenen Bedingungen lediglich in Spuren gebildet. In Kombination mit einer relativ unkomplizierten präparativen Aufreinigung der Syntheseprodukte mittels Flash-Chromatographie und RP-HPLC wurden ausgehend von 1 g Ethylferulat innerhalb von 1–2 Wochen etwa 34 mg der *cis-trans-trans*-8-8(THF)-DFS gewonnen. Die entwickelte enzymatische Gewinnung von 8-8(THF)-DFS ist somit wesentlich schneller durchführbar als deren Totalsynthese oder deren Isolierung aus Maiskleie (Jilek und Bunzel 2013; Schatz et al. 2006). Zudem ist dieses Verfahren zur Gewinnung  $^{13}\text{C}$ -markierter Isotopologe geeignet. Außerdem wurden bei der Reaktion zwei Isomere der 8-8(THF)-DFS gebildet, die im Rahmen dieser Arbeit erstmals identifiziert und in alkalischen Hydrolysaten von Mais-, Weizen- und Zuckerrüben-UBS nachgewiesen wurden. Zur Quantifizierung verschiedener 8-8(THF)-DFS-Diastereomere ist eine Charakterisierung ihrer Eigenschaften im entsprechenden Testsystem essentiell, um potentielle Unterschiede – insbesondere bei einer massenspektrometrischen Detektion – berücksichtigen zu können (Jilek und Bunzel 2013). Diese Charakterisierung ist nur anhand von entsprechenden Standardsubstanzen möglich, welche mittels der entwickelten Synthesemethode gewonnen werden können.

Die Versuche der enzymatischen Kopplung von Ethylferulat (Ralph et al. 1998) zeigten, dass eine Absenkung des pH-Wertes bis pH 2,5 zu einer gesteigerten Bildung von 8-8(THF)-DFS führt. Anhand dessen kann vermutet werden, dass pH-Werte unter 2,5 die 8-8(THF)-DFS-Ausbeute weiter steigern, sofern anstelle des Peroxidase/ $\text{H}_2\text{O}_2$ -Systems ein oxidatives System gewählt wird, das unter sauren Bedingungen eine höhere Aktivität besitzt und die Kopplung der gebildeten Phenoxyradikale über ihre Position 8 begünstigt. Die oxidative Kopplung mittels Cu[TEMED]-Komplex in ACN erwies sich zwar als besonders vorteilhaft zur Bildung 8-8-gekoppelter OFS, jedoch würden die Amin-Gruppen von TEMED unter sauren Bedingungen protoniert werden, sodass der Cu[TEMED]-Komplex nicht stabil wäre. Die Identifizierung eines für diese Zwecke geeigneten oxidativen Systems sollte Ziel zukünftiger Untersuchungen sein. Ebenso sollte die enzymatische Kopplung von Ethylferulat in 30 %igem Ethanol (Bunzel et al. 2008b) mit der in dieser Arbeit entwickelten Aufreinigung mittels Flash-, Sephadex- und RP-HPLC (Abbildung 21) kombiniert werden. Dadurch könnten möglicherweise TriFS und TetraFS gewonnen werden, welche nicht oder nur in geringen Mengen mittels Cu[TEMED]-Komplex gebildet werden. Beispielsweise war es nicht möglich, 8-8(THF)/5-5-, 8-8(c)/8-O-4- und 5-5/8-O-4( $\text{H}_2\text{O}$ )-TriFS (Abbildung 12) mittels chemisch-oxidativer Kopplung zu erhalten.

Die Synthesen der 4-O-5-DFS (Ralph et al. 1994) sowie 5-5(me)-DFS (Zeller und Schatz 2015) wurden in modifizierter Form durchgeführt, indem die Knoevenagel-Reaktion mit Doebner-Modifikation angewandt wurde. Diese zeichnet sich im Vergleich zur Horner-Wadsworth-Emmons-Variante der Wittig-Reaktion durch einen deutlich reduzierten Zeit- und Arbeitsaufwand aus, wobei dennoch vergleichbare Ausbeuten erzielt werden konnten.

Die durchgeführten Synthesen resultierten in einer großen Auswahl nicht-markierter und  $^{13}\text{C}$ -markierter OFS-Standardsubstanzen, die die Entwicklung von zwei LC-DAD-MS/MS-Multimethoden ermöglichten. 8-8(c)/8-O-4-TriFS konnte zwar nicht synthetisiert werden, jedoch stand diese Verbindung nach Isolierung aus Maiskleie zur Verfügung (Jilek und Bunzel 2013), sodass sie in die Methoden integriert werden konnte. Mit beiden hier entwickelten Methoden ist die Quantifizierung von zehn FS-Dimeren, darunter auch ein FS-CBD, neun TriFS sowie der *cis*- und *trans*-Isomere von FS und *p*-CS möglich. Somit erfassen die entwickelten Methoden deutlich mehr Analyten als andere Methoden zur Bestimmung von OFS (Bunzel et al. 2001; Jilek und Bunzel 2013; Dobberstein und Bunzel 2010a). Insbesondere unter den TriFS können einige Regioisomere erstmals quantifiziert werden, die bisher aufgrund fehlender Standardsubstanzen nicht analysiert werden konnten. Neben der Verfügbarkeit entsprechender Standardsubstanzen ist allerdings auch die hohe Empfindlichkeit der Detektion mittels MS/MS ausschlaggebend dafür, dass die Bestimmung einiger Analyten möglich ist. So können auch OFS, welche lediglich in geringen Mengen in alkalischen Hydrolysaten von Zellwänden vorkommen (beispielsweise 4-O-5-DFS oder einige TriFS), detektiert werden. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit können die entwickelten Methoden auch auf Proben angewandt werden, für die das Probenmaterial auf wenige mg begrenzt ist, wohingegen zur Analyse von OFS mittels GC-FID und LC-UV bzw. LC-MS Probenmengen von 40–90 mg UBS bzw. 1 g Getreidemehl notwendig sind (Bunzel et al. 2001; Jilek und Bunzel 2013; Dobberstein und Bunzel 2010a). Auch die Selektivität der Detektion mittels MS/MS ist im Vergleich zur Detektion mittels FID, UV-Detektor oder Single-Quadrupol-MS höher, sodass eine Überbestimmung durch co-eluierende Matrixbestandteile unwahrscheinlicher ist.

Es konnte gezeigt werden, dass bei Verwendung des Massenübergangs von  $m/z$  403 nach  $m/z$  136 ein vergleichbarer *Response* für die unterschiedlichen Diastereomere von 8-8(THF)-DFS erhalten wird, sodass bei Anwendung dieses Massenübergangs die Summe der gleichzeitig eluierenden Isomere bestimmt werden kann. Allerdings ist die Empfindlichkeit dieses Massenübergangs geringer als die Detektion des Massenübergangs von  $m/z$  403 nach  $m/z$  151 (Hauptfragmentation).

Die Unterschiede der entwickelten Analysemethoden bestehen in der Verwendung unterschiedlicher interner Standardsubstanzen, welche zur Bestimmung der OFS verwendet werden. Während bei der SIVA  $^{13}\text{C}$ -markierte Isotopologe zum Einsatz kommen, wird bei der zweiten Methode die bereits in früheren Methoden verwendete 5-5(me)-DFS als alleinige interne Standardsubstanz eingesetzt. Die Vor- und Nachteile beider Methoden sind in Kapitel 4.5.6 beschrieben und liegen hauptsächlich in der Verfügbarkeit entsprechender interner Standardsubstanzen, in der Anforderung an die Probenaufarbeitung sowie in der erzielten Präzision und Richtigkeit für bestimmte Analyten.

Mit beiden Methoden zur Bestimmung von OFS wurden bei der Analyse der UBS von Mais, Weizen, Zuckerrübe und Amaranth größtenteils vergleichbare Ergebnisse erzielt (Tabelle 8). Dies lässt auf geringe Matrix-Effekte der Proben schließen, allerdings wurden in den durchgeführten Messungen stark aufgereinigte Probenmaterialien in Mengen von nur 5–10 mg verwendet. Komplexere Matrices oder höhere Matrixmengen könnten möglicherweise stärkere Matrixeffekte hervorrufen, welche nur mittels SIVA ausgeglichen werden.

Unter Berücksichtigung der biologischen Variabilität und der durchgeführten bzw. nicht-durchgeführten Korrekturen um den Restprotein- und Aschegehalt der UBS, liegen die in dieser Arbeit analysierten DFS-Gehalte in einem mit früheren Ergebnissen vergleichbaren Bereich (Bunzel et al. 2001; Dobberstein und Bunzel 2010a). Da von Jilek und Bunzel (2013) Vollkornmehle anstelle von UBS analysiert wurden, ist ein Vergleich mit den in dieser Arbeit ermittelten OFS-Gehalte nicht ohne Weiteres möglich. Bei Betrachtung der prozentualen Anteile einzelner DFS am Gesamt-DFS-Gehalt können teilweise größere Unterschiede im Vergleich zu früheren Messungen festgestellt werden. Insbesondere die Anteile der 8-O-4-DFS waren in allen analysierten Proben deutlich höher als in früheren Messungen, wohingegen die 8-5-gekoppelten DFS mit Ausnahme von Zuckerrüben-UBS geringere Anteile aufwiesen (Bunzel et al. 2001; Dobberstein und Bunzel 2010a; Jilek und Bunzel 2013). Die Anteile der 5-5- und 8-8-gekoppelten DFS stimmten wiederum größtenteils mit den Ergebnissen früherer Messungen überein. Werden die Anteile einzelner TriFS am Gesamt-TriFS-Gehalt verglichen, können keine drastischen Unterschiede zu den Messungen von Jilek und Bunzel (2013) beobachtet werden. Allerdings wird deutlich, dass die in dieser Arbeit erstmals quantifizierten TriFS mit Anteilen von insgesamt 11–25 % der Gesamt-TriFS-Gehalte nicht vernachlässigt werden sollten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden außerdem Möglichkeiten zur Summenbestimmung von DFS bzw. TriFS untersucht, da für viele Fragestellungen Informationen über die Gesamtgehalte an Dimeren bzw. Trimeren ausreichend sind und eine Aufschlüsselung in die einzelnen Isomere nicht unbedingt notwendig ist. Dazu wurde in einer wissenschaftlichen Abschlussarbeit die Strategie verfolgt, die Analyten mit den Fluorophoren DBD-PZ oder DBD-ED zu derivatisieren, mittels SEC in Dimer- und Trimer-Fractionen zu trennen und anhand eines Fluoreszenzdetektors zu analysieren. Es wurde jedoch festgestellt, dass sich die *Response*-Faktoren der derivatisierten Analyten trotz isoliertem  $\pi$ -Elektronensystem des Fluorophors unterscheiden. Auch die Intensitäten der UV-Absorption bei den Absorptionsmaxima von 432 nm bzw. 437 nm der DBD-PZ- bzw. DBD-ED-Derivate wichen zu stark voneinander ab, sodass eine Summenquantifizierung von OFS basierend auf diesen Derivaten nicht möglich war (Breuer 2016). In zukünftigen Arbeiten sollte nach Fluorophoren gesucht werden, bei deren Einsatz die *Response*-Faktoren der derivatisierten Verbindungen weniger durch die Bindungstypen der OFS beeinflusst werden. Folgearbeiten auf diesem Gebiet sind wünschenswert, da sich eine Methode zur Summenbestimmung

von DFS bzw. TriFS in hydrolysierten Pflanzenzellwänden mittels SEC und Fluoreszenz-Detektion durch eine hohe Selektivität (hydrodynamisches Volumen in Kombination mit Carbonsäuregruppen) und Empfindlichkeit auszeichnen würde.

Im Rahmen einer weiteren wissenschaftlichen Abschlussarbeit wurden Möglichkeiten zur Summenbestimmung von OFS mittels SEC-FTIR untersucht. Dabei konnte ein Wellenzahlenbereich von  $1696\text{--}1786\text{ cm}^{-1}$  ermittelt werden, bei dem die getesteten Dimere bzw. Trimere vergleichbare *Response*-Faktoren aufweisen. Anhand der Analyse von Mais-UBS wurde eine hohe Methodenpräzision ermittelt, jedoch war die Detektion mittels FTIR im Vergleich zu anderen Detektionsarten relativ unempfindlich, sodass Probenmengen von mindestens 100–500 mg UBS notwendig waren. Auch die Selektivität der Methode war trotz intensiver Probenaufarbeitung vergleichsweise gering, was anhand ausgeprägter Matrix-Signale in den Chromatogrammen ersichtlich war. Aus diesem Grund konnte die Summe an TriFS mittels dieser Methode nicht bestimmt werden. Die Summe an FS-Dimeren war durch Anwendung der entwickelten Methode zwar quantifizierbar, jedoch deuteten die durchgeführten Wiederfindungsversuche anhand von Mais-UBS und der Vergleich mit den DFS-Gehalten, die mit anderen Methoden ermittelt wurden, darauf hin, dass nur etwa 70 % der tatsächlichen Gehalte an Dimeren bestimmt werden. Möglicherweise könnte in zukünftigen Arbeiten die Empfindlichkeit durch technische Anpassung des FTIR-Gerätes (Lichtquelle und Durchflusszelle) erhöht werden (Beskers et al. 2015), während die Selektivität durch SEC-Säulen mit höherer Trennleistung verbessert werden könnte, um die Anwendungsmöglichkeiten der entwickelten Methode zu erweitern. Die Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, dass die entwickelte SEC-FTIR-Methode zum jetzigen Zeitpunkt zwar als semiquantitatives Screening-Verfahren zur Summenbestimmung von DFS eingesetzt werden kann, jedoch sollten die absoluten Analytgehalte mittels LC-MS/MS bestimmt werden.



ZUSAMMENFASSUNG

---

Ferulasäure und ihre Derivate sind aufgrund ihrer Eigenschaft verschiedene Biopolymere (Polysaccharide, Lignin, Proteine) zu koppeln wichtige Bestandteile der pflanzlichen Zellwand. In dikotylen Pflanzen der Ordnung Caryophyllales liegt Ferulasäure hauptsächlich mit Pektinen und in monokotylen Pflanzen hauptsächlich mit Arabinoxylanen verestert vor. Durch Bindung an diese Polysaccharide wird mit der Nahrung aufgenommene Ferulasäure nicht von körpereigenen Enzymen, sondern im Dickdarm von mikrobiellen Esterasen freigesetzt. Derart freigesetzte Ferulasäure wird teilweise resorbiert. Die vielfältige Enzymausstattung der Mikroorganismen führt allerdings auch dazu, dass verschiedene mikrobielle Metaboliten gebildet werden. Diese können ebenso wie Ferulasäure teilweise resorbiert und im Menschen und in anderen Säugetieren hepatisch metabolisiert werden, was in einem breiten Spektrum an möglichen Metaboliten der Ferulasäure resultiert. Kühe besitzen wie alle Herbivoren einen besonders ausgeprägten mikrobiellen und hepatischen Metabolismus, sodass eine große Vielfalt an Ferulasäure-Metaboliten mit der Milch ausgeschieden und vom Menschen aufgenommen wird. Untersuchungen, inwieweit die Konzentration der einzelnen Metaboliten von der aufgenommenen Menge an Ferulasäure und somit von den eingesetzten Futtermitteln abhängt, konnten bislang nicht durchgeführt werden, da keine geeignete Methode zur umfassenden Analyse des Metabolitenspektrums zur Verfügung stand. Kenntnisse über die Profile an Ferulasäure-Metaboliten könnten jedoch dazu eingesetzt werden, die Fütterungsart der Kühe, mit der Milchprodukte teilweise beworben werden, anhand der erzeugten Milch nachzuweisen.

Insbesondere oligomere Ferulasäure-Derivate sind für die Struktur, Stabilität und Widerstandsfähigkeit von Pflanzenzellwänden von zentraler Bedeutung. Durch Photodimerisierung oder oxidativ-radikalische Kopplung polymergebundener Ferulasäure können Ferulasäure-Oligomere gebildet werden, wodurch Polysaccharide miteinander, aber auch mit Lignin und möglicherweise Strukturproteinen quervernetzt werden. Daraus resultiert eine erhöhte Widerstandsfähigkeit der Zellwand gegenüber biotischen und abiotischen Stressfaktoren. Auch die Qualität von pflanzlichen Lebensmitteln, Futtermitteln und Rohstoffen zur Herstellung von Biokraftstoff wird durch die Ferulasäure-vermittelte Quervernetzung beeinflusst. Mit den in der Literatur beschriebenen GC-FID, LC-UV- und LC-MS-Methoden kann jedoch nur eine Auswahl an Oligoferulasäuren analysiert werden, wobei aufgrund der geringen Empfindlichkeit der zumeist verwendeten Analysemethoden relativ hohe Probenmengen eingesetzt werden müssen. Außerdem kann die eingeschränkte Selektivität der eingesetzten Detektoren zu fehlerhaften Ergebnissen führen.

Aus diesen Gründen wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene auf flüssigchromatographischer Trennung und massenspektrometrischer Detektion beruhende Multimethoden zur Bestimmung von Ferulasäure, Ferulasäure-Metaboliten und Oligoferulasäuren erarbeitet. Zur Entwicklung einer Stabilisotopenverdünnungsanalyse, mit der Ferulasäure, zwölf Ferulasäure-Metaboliten und die zu teilweise gleichen Metaboliten führenden *p*-Cumarsäure und Zimtsäure in Milch bestimmt werden können, wurden isotopenmarkierte Standardsubstanzen synthetisiert. Dabei wurden die Zimtsäuren, Phenylpropionsäuren und Hippursäuren als  $^{13}\text{C}$ -markierte Verbindungen hergestellt, wohingegen die Hydroxybenzoesäuren und Phenylelessigsäure mittels H/D-Austausch deuteriert wurden. Durch Anpassung der QuEChERS-Methode, die ursprünglich zur Extraktion von Pestiziden aus Obst und Gemüse entwickelt wurde, wurden die Analyten aus Milch extrahiert und konzentriert, bevor sie mittels LC-ESI-MS/MS bestimmt wurden. Die Durchführung einer optionalen Enzyminkubation ermöglichte es, sulfatierte und mit Glucuronsäure konjugierte Analyten zu erfassen. Die Methodvalidierung anhand von drei verschiedenen Milchproben belegt, dass die Methode über eine hohe Empfindlichkeit, Selektivität und Präzision verfügt und mit Ausnahme der Bestimmung von 4-Hydroxybenzoesäure, Phenylpropionsäure und Zimtsäure von einer hohen Richtigkeit ausgegangen werden kann. In den untersuchten konventionell und ökologisch erzeugten Milchproben wurden Unterschiede in den Gehalten an Dihydroferulasäure, Phenylelessigsäure, 3-Hydroxyphenylpropionsäure, 3-Hydroxybenzoesäure, 3-Hydroxyhippursäure, 4-Hydroxybenzoesäure und Benzoesäure nachgewiesen. Die entwickelte Methode soll als Grundlage für zukünftige Untersuchungen dienen, bei denen eine größere representative Auswahl an authentischen Milchproben analysiert wird, um mögliche Markersubstanzen zur Überprüfung der Fütterungsart von Milchkühen zu identifizieren.

Zur Entwicklung neuer, leistungsstarker Methoden zur Analyse von Oligoferulasäuren sind entsprechende Standardsubstanzen notwendig. Modifikationen von Reaktionen zur Synthese von Oligoferulasäuren und die Entwicklung präparativer Verfahren zur Aufreinigung der Reaktionsprodukte ermöglichten es, Standardsubstanzen mit hoher Ausbeute und Reinheit zu gewinnen. Unter anderem konnten durch diese auf chemischer bzw. enzymatischer Kopplung von Ferulasäure beruhenden Synthesen zwei Diastereomere der 8-8(THF)-Dehydrodiferulasäure, fünf Dehydrotriferulasäuren und fünf Dehydrotetraferulasäuren gewonnen werden, die im Rahmen dieser Arbeit erstmals isoliert, größtenteils identifiziert und in Pflanzenzellwänden nachgewiesen wurden. Im Vergleich zur Isolierung von Oligoferulasäuren aus Pflanzenmaterialien oder deren Totalsynthesen sind die entwickelten Verfahren mit einem geringeren Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden und können ebenfalls zur effizienten Gewinnung von isotopenmarkierten Standardsubstanzen eingesetzt werden, die essentiell zur Entwicklung und Durchführung von Stabilisotopenverdünnungsanalysen sind.

Unter Verwendung der synthetisierten Oligoferulasäuren wurden zwei LC-MS/MS-Multimethoden entwickelt, bei denen entweder die etablierte interne Standardsubstanz 5-5(me)-Dehydrodiferulasäure oder  $^{13}\text{C}$ -markierte Standardsubstanzen verwendet wurden. Neben zehn Ferulasäure-Dimeren und neun Dehydrotriferulasäuren konnten in der gleichen Analyse auch die *cis*- und *trans*-Isomere von Ferulasäure und *p*-Cumarsäure bestimmt werden. Die Validierung der Methoden und der Vergleich der Gehalte an Oligoferulasäuren in unlöslichen Ballaststoffen aus Mais- und Weizenkaryopsen, Zuckerrübenschnitzeln und Amaranthsamen verdeutlichten, dass beide Methoden grundsätzlich zur Analyse von Pflanzenproben geeignet sind. Jedoch zeigen beide Methoden spezifische Vor- und Nachteile in Bezug auf Probenvorbereitung und -aufarbeitung, Präzision und Richtigkeit einzelner Analyten.

Die Entwicklung einer chromatographiebasierten Methode zur Summenbestimmung von Ferulasäure-Dimeren und -Trimeren konnte dagegen nur mit Einschränkungen verwirklicht werden. Voraussetzung für die Summenbestimmung ist, dass die Isomere der Ferulasäure-Dimere und -Trimere denselben oder zumindest vergleichbare *Response*-Faktoren unter den gewählten Detektionsbedingungen aufweisen. Hierfür wurden die Oligoferulasäuren in einer Vorsäulenderivatisierung mit einer fluoreszierenden Gruppe versehen. Die so erhaltenen Derivate unterschieden sich jedoch in ihrem *Response* bei der Fluoreszenzdetektion, sodass dieser Weg nicht gängig war. Als zweite Möglichkeit wurde die Detektion mittels Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie getestet, wobei die Anregung von Schwingungen der Carbonylfunktion als gemeinsames Strukturmerkmal der Ferulasäure-Dimere und -Trimere genutzt werden sollte. Es zeigte sich, dass die Detektion mittels Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie nach Größenausschlusschromatographie realisierbar war, jedoch war lediglich eine semiquantitative Bestimmung der Ferulasäure-Dimere möglich. Eine entsprechende Möglichkeit für die Trimere der Ferulasäure stellte sich als ungeeignet heraus.

Somit konnten in dieser Arbeit hochempfindliche, selektive Methoden zur Bestimmung von Ferulasäure-Metaboliten sowie einzelner Isomere der Ferulasäure-Dimere und -Trimere erarbeitet werden. Des Weiteren besteht die Möglichkeit eine semiquantitative Summenbestimmung der Ferulasäure-Dimere durchzuführen, wenn Informationen über das Profil der einzelnen Isomere für die entsprechende Fragestellung nicht notwendig sind.



## LITERATURVERZEICHNIS

- Abdel-Aal, E.-S., Hucl, P., Sosulski, F., Graf, R., Gillott, C. und Pietrzak, L. (2001). „Screening spring wheat for midge resistance in relation to ferulic acid content“. *J. Agric. Food Chem.* 49, S. 3559–3566.
- Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Urbe, J. A. und Serna-Saldívar, S. O. (2014). „Bound phenolics in foods, a review“. *Food Chem.* 152, S. 46–55.
- Adom, K. K. und Liu, R. H. (2002). „Antioxidant activity of grains“. *J. Agric. Food Chem.* 50, S. 6182–6187.
- Albersheim, P., Darvill, A., Roberts, K., Sederoff, R. und Staehelin, A. (2010). *Plant cell walls*. New York, NY: Garland Science.
- Aljawish, A., Chevalot, I., Jasniewski, J., Paris, C., Scher, J. und Muniglia, L. (2014). „Laccase-catalysed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate in aqueous medium: A green procedure for the synthesis of new compounds“. *Food Chem.* 145, S. 1046–1054.
- Allerdings, E., Ralph, J., Schatz, P. F., Gniechwitz, D., Steinhart, H. und Bunzel, M. (2005). „Isolation and structural identification of diarabinosyl 8-O-4-dehydrodiferulate from maize bran insoluble fibre“. *Phytochemistry* 66, S. 113–124.
- Allerdings, E., Ralph, J., Steinhart, H. und Bunzel, M. (2006). „Isolation and structural identification of complex feruloylated heteroxylan side-chains from maize bran“. *Phytochemistry* 67, S. 1276–1286.
- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D. und Schenck, F. J. (2003). „Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce“. *J. AOAC Int.* 86, S. 412–431.
- Andreasen, M. F., Christensen, L. P., Meyer, A. S. und Hansen, A. (1999). „Release of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids in rye by commercial plant cell wall degrading enzyme preparations“. *J. Sci. Food Agric.* 79, S. 411–413.
- Andreasen, M. F., Christensen, L. P., Meyer, A. S. und Hansen, A. (2000). „Content of phenolic acids and ferulic acid dehydrodimers in 17 rye (*Secale cereale* L.) varieties“. *J. Agric. Food Chem.* 48, S. 2837–2842.
- Andreasen, M. F., Kroon, P. A., Williamson, G. und Garcia-Conesa, M.-T. (2001a). „Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals“. *J. Agric. Food Chem.* 49, S. 5679–5684.
- Andreasen, M. F., Kroon, P. A., Williamson, G. und Garcia-Conesa, M.-T. (2001b). „Intestinal release and uptake of phenolic antioxidant diferulic acids“. *Free Radical Biol. Med.* 31, S. 304–314.

- Andreasen, M. F., Landbo, A.-K., Christensen, L. P., Hansen, Å. und Meyer, A. S. (2001c). „Antioxidant effects of phenolic rye (*Secale cereale* L.) extracts, monomeric hydroxycinnamates, and ferulic acid dehydrodimers on human low-density lipoproteins“. *J. Agric. Food Chem.* 49, S. 4090–4096.
- Appeldoorn, M. M., Waard, P. de, Kabel, M. A., Gruppen, H. und Schols, H. A. (2013). „Enzyme resistant feruloylated xylooligomer analogues from thermochemically treated corn fiber contain large side chains, ethyl glycosides and novel sites of acetylation“. *Carbohydr. Res.* 381, S. 33–42.
- Artzi, L., Bayer, E. A. und Morais, S. (2016). „Cellulosomes: bacterial nanomachines for dismantling plant polysaccharides“. *Nat. Rev. Microbiol.*
- Atkinson, S. D. M., Almond, M. J., Hollins, P. und Jenkins, S. L. (2003). „The photodimerisation of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -forms of *trans*-cinnamic acid: a study of single crystals by vibrational microspectroscopy“. *Spectrochim. Acta, Part A* 59, S. 629–635.
- Aura, A.-M., Mattila, I., Seppänen-Laakso, T., Miettinen, J., Oksman-Caldentey, K.-M. und Orešič, M. (2008). „Microbial metabolism of catechin stereoisomers by human faecal microbiota: comparison of targeted analysis and a non-targeted metabolomics method“. *Phytochem. Lett.* 1, S. 18–22.
- Ayala-Soto, F. E., Serna-Saldivar, S. O., Garcia-Lara, S. und Pérez-Carrillo, E. (2014). „Hydroxycinnamic acids, sugar composition and antioxidant capacity of arabinoxylans extracted from different maize fiber sources“. *Food Hydrocolloids* 35, S. 471–475.
- Bacharach, G. und Brogan, F. (1928). „The action of pyridine as a catalyst in Perkin's synthesis of cinnamic acid“. *J. Am. Chem. Soc.* 50, S. 3333–3334.
- Bacic, A., Harris, P. J. und Stone, B. A. (1988). „Structure and function of plant cell walls“. *The biochemistry of plants*. 14. Auflage. San Diego: Elsevier.
- Balat, M. (2011). „Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review“. *Energy Convers. Manage.* 52, S. 858–875.
- Barberousse, H., Roiseux, O., Robert, C., Paquot, M., Deroanne, C. und Blecker, C. (2008). „Analytical methodologies for quantification of ferulic acid and its oligomers“. *J. Sci. Food Agric.* 88, S. 1494–1511.
- Barron, C., Surget, A. und Rouau, X. (2007). „Relative amounts of tissues in mature wheat (*Triticum aestivum* L.) grain and their carbohydrate and phenolic acid composition“. *J. Cereal Sci.* 45, S. 88–96.
- Barros, J., Serk, H., Granlund, I. und Pesquet, E. (2015). „The cell biology of lignification in higher plants“. *Ann. Bot.* 115, S. 1053–1074.
- Baumann, E. (1886). „Ueber eine einfache Methode der Darstellung von Benzoesäureäthern“. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 19, S. 3218–3222.
- Baumgartner, J. und Neukom, H. (1972). „Enzymatische Oxydation von Vanillin“. *Chimia* 26, S. 366–368.
- Beskers, T. F., Hofe, T. und Wilhelm, M. (2015). „Development of a chemically sensitive online SEC detector based on FTIR spectroscopy“. *Polym. Chem.* 6, S. 128–142.

- Besle, J. M., Viala, D., Martin, B., Pradel, P., Meunier, B., Berdagué, J. L., Fraisse, D., Laimaison, J. L. und Couoln, J. B. (2010). „Ultraviolet-absorbing compounds in milk are related to forage polyphenols“. *J. Dairy Sci.* 93, S. 2846–2856.
- Bhanger, M. I., Iqbal, S., Anwar, F., Imran, M., Akhtar, M. und Zia-ul-Haq, M. (2008). „Antioxidant potential of rice bran extracts and its effects on stabilisation of cookies under ambient storage“. *Int. J. Food Sci. Technol.* 43, S. 779–786.
- Bhuiyan, N. H., Selvaraj, G., Wei, Y. und King, J. (2009). „Role of lignification in plant defense“. *Plant Signaling Behav.* 4, S. 158–159.
- Bidhendi, A. J. und Geitmann, A. (2016). „Relating the mechanics of the primary plant cell wall to morphogenesis“. *J. Exp. Bot.* 67, S. 449–461.
- Bily, A. C., Reid, L. M., Taylor, J. H., Johnston, D., Malouin, C., Burt, A. J., Bakan, B., Regnault-Roger, C., Pauls, K. P., Arnason, J. T. und Philogene, B. J. R. (2003). „Dehydrodimers of ferulic acid in maize grain pericarp and aleurone: resistance factors to *Fusarium graminearum*“. *Phytopathology* 93, S. 712–719.
- Blum, D. L., Kataeva, I. A., Li, X.-L. und Ljungdahl, L. G. (2000). „Feruloyl esterase activity of the *Clostridium thermocellum* cellulosome can be attributed to previously unknown domains of XynY and XynZ“. *J. Bacteriol.* 182, S. 1346–1351.
- Boerjan, W., Ralph, J. und Baucher, M. (2003). „Lignin biosynthesis“. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, S. 519–546.
- Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M. J. und Simoes, M. (2013). „Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria“. *Microb. Drug Resist.* 19, S. 256–265.
- Brady, J. D. und Sadler, I. H. (1996). „Di-isodityrosine, a novel tetrameric derivative of tyrosine in plant cell wall proteins: a new potential cross-link“. *Biochem. J.* 315, S. 323–327.
- Brady, J. D., Sadler, I. H. und Fry, S. C. (1998). „Pulcherosine, an oxidatively coupled trimer of tyrosine in plant cell walls: its role in cross-link formation“. *Phytochemistry* 47, S. 349–353.
- Braune, A., Bunzel, M., Yonekura, R. und Blaut, M. (2009). „Conversion of dehydrodiferulic acids by human intestinal microbiota“. *J. Agric. Food Chem.* 57, S. 3356–3362.
- Breuer, M. (2016). „Entwicklung einer HPLC-FLD-Methode zur Quantifizierung von Di- und Triferulasäuren“. Wissenschaftliche Abschlussarbeit. Karlsruhe, Germany: Karlsruher Institut für Technologie.
- Buksa, K., Praznik, W., Loeppert, R. und Nowotna, A. (2016). „Characterization of water and alkali extractable arabinoxylan from wheat and rye under standardized conditions“. *J. Food Sci. Technol.* 53, S. 1389–1398.
- Bunzel, M. (2010). „Chemistry and occurrence of hydroxycinnamate oligomers“. *Phytochem. Rev.* 9, S. 47–64.
- Bunzel, M., Allerdings, E., Ralph, J. und Steinhart, H. (2008a). „Cross-linking of arabinoxylans via 8-8-coupled diferulates as demonstrated by isolation and identification

- of di-arabinosyl 8-8(cyclic)-dehydrodiferulate from maize bran". *J. Cereal Sci.* 47, S. 29–40.
- Bunzel, M., Allerdings, E., Sinnwell, V., Ralph, J. und Steinhart, H. (2002). „Cell wall hydroxycinnamates in wild rice (*Zizania aquatica* L.) insoluble dietary fibre". *Eur. Food Res. Technol.* 214, S. 482–488.
- Bunzel, M., Funk, C. und Steinhart, H. (2004a). „Semipreparative isolation of dehydrodiferulic and dehydrotriferulic acids as standard substances from maize bran". *J. Sep. Sci.* 27, S. 1080–1086.
- Bunzel, M., Heuermann, B., Kim, H. und Ralph, J. (2008b). „Peroxidase-catalyzed oligomerization of ferulic acid esters". *J. Agric. Food Chem.* 56, S. 10368–10375.
- Bunzel, M., Ralph, J., Brüning, P. und Steinhart, H. (2006). „Structural identification of dehydrotriferulic and dehydrotetraferulic acids from insoluble maize bran fiber". *J. Agric. Food Chem.* 54, S. 6409–6418.
- Bunzel, M., Ralph, J., Funk, C. und Steinhart, H. (2003). „Isolation and identification of a ferulic acid dehydrotrimer from saponified maize bran insoluble fiber". *Eur. Food Res. Technol.* 217, S. 128–133.
- Bunzel, M., Ralph, J., Funk, C. und Steinhart, H. (2005a). „Structural elucidation of new ferulic acid-containing phenolic dimers and trimers isolated from maize bran". *Tetrahedron Lett.* 46, S. 5845–5850.
- Bunzel, M., Ralph, J., Lu, F., Hatfield, R. D. und Steinhart, H. (2004b). „Lignins and ferulate-coniferyl alcohol cross-coupling products in cereal grains". *J. Agric. Food Chem.* 52, S. 6496–6502.
- Bunzel, M., Ralph, J., Marita, J. M., Hatfield, R. D. und Steinhart, H. (2001). „Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre". *J. Sci. Food Agric.* 81, S. 653–660.
- Bunzel, M., Ralph, J. und Steinhart, H. (2005b). „Association of non-starch polysaccharides and ferulic acid in grain amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) dietary fiber". *Mol. Nutr. Food Res.* 49, S. 551–559.
- Caffall, K. H. und Mohnen, D. (2009). „The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides". *Carbohydr. Res.* 344, S. 1879–1900.
- Carunchio, F., Crescenzi, C., Girelli, A. M., Messina, A. und Tarola, A. M. (2001). „Oxidation of ferulic acid by laccase: identification of the products and inhibitory effects of some dipeptides". *Talanta* 55, S. 189–200.
- Carvajal-Millan, E., Landillon, V., Morel, M.-H., Rouau, X., Doublier, J.-L. und Micard, V. (2005). „Arabinoxylan gels: Impact of the feruloylation degree on their structure and properties". *Biomacromolecules* 6, S. 309–317.
- Casler, M. D. und Jung, H.-J. G. (1999). „Selection and evaluation of smooth brome grass clones with divergent lignin or etherified ferulic acid concentration". *Crop Sci.* 39, S. 1873–1880.

- Chassard, C. und Lacroix, C. (2013). „Carbohydrates and the human gut microbiota“. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 16, S. 453–460.
- Chesson, A., Provan, G. J., Russell, W. R., Scobbie, L., Richardson, A. J. und Stewart, C. (1999). „Hydroxycinnamic acids in the digestive tract of livestock and humans“. *J. Sci. Food Agric.* 79, S. 373–378.
- Clayton, T. A. (2012). „Metabolic differences underlying two distinct rat urinary phenotypes, a suggested role for gut microbial metabolism of phenylalanine and a possible connection to autism“. *FEBS Lett.* 586, S. 956–961.
- Cohen, M. D. und Schmidt, G. M. J. (1964). „383. Topochemistry. Part I. A survey“. *J. Chem. Soc.* S. 1996–2000.
- Colquhoun, I. J., Ralet, M.-C., Thibault, J.-F., Faulds, C. B. und Williamson, G. (1994). „Structure identification of feruloylated oligosaccharides from sugar-beet pulp by NMR spectroscopy“. *Carbohydr. Res.* 263, S. 243–256.
- Dervilly-Pinel, G., Rimsten, L., Saulnier, L., Andersson, R. und Aman, P. (2001). „Water-extractable arabinoxylan from pearled flours of wheat, barley, rye and triticale. Evidence for the presence of ferulic acid dimers and their involvement in gel formation“. *J. Cereal Sci.* 34, S. 207–214.
- Díaz, M. S., Freile, M. L. und Gutiérrez, M. I. (2009). „Solvent effect on the UV/Vis absorption and fluorescence spectroscopic properties of berberine“. *Photochem. Photobiol. Sci.* 8, S. 970–974.
- Dobberstein, D. und Bunzel, M. (2010a). „Identification of ferulate oligomers from corn stover“. *J. Sci. Food Agric.* 90, S. 1802–1810.
- Dobberstein, D. und Bunzel, M. (2010b). „Separation and detection of cell wall-bound ferulic acid dehydrodimers and dehydrotrimers in cereals and other plant materials by reversed phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection“. *J. Agric. Food Chem.* 58, S. 8927–8935.
- Doebner, O. (1900). „Synthese der Sorbinsäure“. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 33, S. 2140–2142.
- Donaldson, L. A. (2001). „Lignification and lignin topochemistry – an ultrastructural view“. *Phytochemistry* 57, S. 859–873.
- Durette, P. L. und Horton, D. (1971). „Conformational studies on pyranoid sugar derivatives by NMR spectroscopy. Correlations of observed proton-proton coupling constants with the generalized Karplus equation“. *Magn. Reson. Chem.* 3, S. 417–427.
- Ebringerová, A. und Heinze, T. (2000). „Xylan and xylan derivatives – biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties“. *Macromol. Rapid Commun.* 21, S. 542–556.
- Eraso, F. und Hartley, R. D. (1990). „Monomeric and dimeric phenolic constituents of plant cell walls – possible factors influencing wall biodegradability“. *J. Sci. Food Agric.* 51, S. 163–170.

- Esaki, H., Aoki, F., Umemura, M., Kato, M., Maegawa, T., Monguchi, Y. und Sajiki, H. (2007). „Efficient H/D exchange reactions of alkyl-substituted benzene derivatives by means of the Pd/C-H<sub>2</sub>-D<sub>2</sub>O system“. *Chem. Eur. J.* 13, S. 4052–4063.
- Faulds, C. B. und Williamson, G. (1999). „The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall“. *J. Sci. Food Agric.* 79, S. 393–395.
- Fieser, L. F. und Fieser, M. (1967). *Reagents for organic synthesis*. New York: John Wiley & Sons.
- Fonseca, I., Hayes, S., Blümich, B. und Bertmer, M. (2008). „Temperature stability and photodimerization kinetics of  $\beta$ -cinnamic acid and comparison to its  $\alpha$ -polymorph as studied by solid-state NMR spectroscopy techniques and DFT calculations“. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 10, S. 5898–5907.
- Ford, C. W. und Hartley, R. D. (1989). „GC/MS characterisation of cyclodimers from *p*-coumaric and ferulic acids by photodimerisation – a possible factor influencing cell wall biodegradability“. *J. Sci. Food Agric.* 46, S. 301–310.
- Frei, M. (2013). „Lignin: characterization of a multifaceted crop component“. *Scientific World J.* 2013, S. 1–25.
- Fry, S. C. (1986). „Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms“. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37, S. 165–186.
- Fukushima, T., Arai, K., Tomiya, M., Mitsuhashi, S., Sasaki, T., Santa, T., Imai, K. und Toyooka, T. (2008). „Fluorescence determination of *N*-acetylaspartic acid in the rat cerebrum homogenate using high-performance liquid chromatography with pre-column fluorescence derivatization“. *Biomed. Chromatogr.* 22, S. 100–105.
- Fulcrand, H., Cheminat, A., Brouillard, R. und Cheynier, V. (1994). „Characterization of compounds obtained by chemical oxidation of caffeic acid in acidic conditions“. *Phytochemistry* 35, S. 499–505.
- Fumeaux, R., Menozzi-Smarrito, C., Stalmach, A., Munari, C., Kraehenbuehl, K., Steiling, H., Crozier, A., Williamson, G. und Barron, D. (2010). „First synthesis, characterization, and evidence for the presence of hydroxycinnamic acid sulfate and glucuronide conjugates in human biological fluids as a result of coffee consumption“. *Org. Biomol. Chem.* 8, S. 5199–5211.
- Funk, C., Ralph, J., Steinhart, H. und Bunzel, M. (2005). „Isolation and structural characterisation of 8-O-4/8-O-4- and 8-8/8-O-4-coupled dehydrotriferulic acids from maize bran“. *Phytochemistry* 66, S. 363–371.
- Gallardo, C., Jimenez, L. und Garcia-Conesa, M.-T. (2006). „Hydroxycinnamic acid composition and *in vitro* antioxidant activity of selected grain fractions“. *Food Chem.* 99, S. 455–463.
- Garcia-Conesa, M.-T., Wilson, P. D., Plumb, G. W., Ralph, J. und Williamson, G. (1999). „Antioxidant properties of 4, 4'-dihydroxy-3, 3'-dimethoxy- $\beta$ ,  $\beta'$ -bicycinnamic acid(8-8-diferulic acid, non-cyclic form)“. *J. Sci. Food Agric.* 79, S. 379–384.

- García-Lara, S., Bergvinson, D. J., Burt, A. J., Ramputh, A. I., Díaz-Pontones, D. M. und Arnason, J. T. (2004). „The role of pericarp cell wall components in maize weevil resistance“. *Crop Sci.* 44, S. 1546–1552.
- Geissmann, T. und Neukom, H. (1971). „Vernetzung von Phenolcarbonsäureestern von Polysacchariden durch oxydative phenolische Kupplung“. *Helv. Chim. Acta* 54, S. 1108–1112.
- Gerster, L. (2015). „Entwicklung einer SEC/FTIR-Methode zur Summenbestimmung von Diferulasäuren“. Wissenschaftliche Abschlussarbeit. Karlsruhe, Germany: Karlsruher Institut für Technologie.
- Gibson, L. J. (2012). „The hierarchical structure and mechanics of plant materials“. *J. R. Soc. Interface* 9, S. 2749–2766.
- Gokhale, K. M. (2011). „New method for synthesis of 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) prop-2-enoic acid and 1-feruloyl- $\beta$ -D-glucose“. *Int. J. Pharm. Phytopharm. Res.* 1, S. 17–22.
- Grabber, J. H. (2005). „How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies“. *Crop Sci.* 45, S. 820–831.
- Grabber, J. H., Hatfield, R. D. und Ralph, J. (1998). „Diferulate cross-links impede the enzymatic degradation of non-lignified maize walls“. *J. Sci. Food Agric.* 77, S. 193–200.
- Grabber, J. H., Mertens, D. R., Kim, H., Funk, C., Lu, F. und Ralph, J. (2009). „Cell wall fermentation kinetics are impacted more by lignin content and ferulate cross-linking than by lignin composition“. *J. Sci. Food Agric.* 89, S. 122–129.
- Grabber, J. H., Ralph, J. und Hatfield, R. D. (2000). „Cross-linking of maize walls by ferulate dimerization and incorporation into lignin“. *J. Agric. Food Chem.* 48, S. 6106–6113.
- Grabber, J. H., Ralph, J. und Hatfield, R. D. (2002). „Model studies of ferulate-coniferyl alcohol cross-product formation in primary maize walls: Implications for lignification in grasses“. *J. Agric. Food Chem.* 50, S. 6008–6016.
- Grabber, J. H., Ralph, J., Lapierre, C. und Barriere, Y. (2004). „Genetic and molecular basis of grass cell-wall degradability. I. Lignin-cell wall interactions“. *C.R. Biol.* 327, S. 455–465.
- Grúz, J., Pospíšil, J., Kozubíková, H., Pospíšil, T., Doležal, K., Bunzel, M. und Strnad, M. (2015). „Determination of free diferulic, disinapic and dicoumaric acids in plants and foods“. *Food Chem.* 171, S. 280–286.
- Günzler, H. und Gremlich, H.-U. (2003). *IR-Spektroskopie: Eine Einführung*. 4. Auflage. Weinheim: John Wiley & Sons.
- Habibi, Y., Mahrouz, M., Marais, M.-F. und Vignon, M. R. (2004). „An arabinogalactan from the skin of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits“. *Carbohydr. Res.* 339, S. 1201–1205.

- Hahn, D., Faubion, J. und Rooney, L. (1983). „Sorghum phenolic acids, their high performance liquid chromatography separation and their relation to fungal resistance“. *Cereal Chem.* 60, S. 255–259.
- Harris, P. J. und Ferguson, L. R. (1999). „Dietary fibres may protect or enhance carcinogenesis“. *Mutat. Res.* 443, S. 95–110.
- Harris, P. J. und Hartley, R. D. (1976). „Detection of bound ferulic acid in cell walls of the Gramineae by ultraviolet fluorescence microscopy“. *Nature* 259, S. 508–510.
- Hartley, R. (1972). „*p*-Coumaric and ferulic acid components of cell walls of ryegrass and their relationships with lignin and digestibility“. *J. Sci. Food Agric.* 23, S. 1347–1354.
- Hartley, R. D., Morrison, W. H., Himmelsbach, D. S. und Borneman, W. S. (1990). „Cross-linking of cell-wall phenolic arabinoxylans in gramineous plants“. *Phytochemistry* 29, S. 3705–3709.
- Hartmann, G., Piber, M. und Koehler, P. (2005). „Isolation and chemical characterisation of water-extractable arabinoxylans from wheat and rye during breadmaking“. *Eur. Food Res. Technol.* 221, S. 487–492.
- Hatfield, R. D. und Chaptman, A. K. (2009). „Comparing corn types for differences in cell wall characteristics and *p*-coumaroylation of lignin“. *J. Agric. Food Chem.* 57, S. 4243–4249.
- Hatfield, R. D. und Marita, J. (2010). „Enzymatic processes involved in the incorporation of hydroxycinnamates into grass cell walls“. *Phytochem. Rev.* 9, S. 35–45.
- Hatfield, R. D. und Ralph, J. (1999). „Modelling the feasibility of intramolecular dehydrodiferulate formation in grass walls“. *J. Sci. Food Agric.* 79, S. 425–427.
- Hatfield, R. und Vermerris, W. (2001). „Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity“. *Plant Physiol.* 126, S. 1351–1357.
- Hau, A.-L. (2016). „Analytik von Truxill- und Truxinsäurederivaten“. Masterarbeit. Karlsruhe: Karlsruher Institut für Technologie.
- Hegde, S., Srinivas, P. und Muralikrishna, G. (2009). „Single-step synthesis of 4-nitrophenyl ferulate for spectrophotometric assay of feruloyl esterases“. *Anal. Biochem.* 387, S. 128–129.
- Hernanz, D., Nuñez, V., Sancho, A. I., Faulds, C. B., Williamson, G., Bartolomé, B. und Gómez-Cordovés, C. (2001). „Hydroxycinnamic acids and ferulic acid dehydrodimers in barley and processed barley“. *J. Agric. Food Chem.* 49, S. 4884–4888.
- Horner, L., Hoffmann, H., Wippel, H. G. und Klahre, G. (1959). „Phosphororganische Verbindungen, XX. Phosphinoxyde als Olefinierungsreagenzien“. *Chem. Ber.* 92, S. 2499–2505.
- Hu, K. und Jeong, J.-H. (2006). „A convenient synthesis of an anti-*Helicobacter pylori* agent, dehydrodiconiferyl alcohol“. *Arch. Pharmacol. Res.* 29, S. 563–565.
- Huisman, M. M., Brüll, L. P., Thomas-Oates, J. E., Haverkamp, J., Schols, H. A. und Vorage, A. G. (2001). „The occurrence of internal (1→5)-linked arabinofuranose and

- arabinopyranose residues in arabinogalactan side chains from soybean pectic substances". *Carbohydr. Res.* 330, S. 103–114.
- Ichikawa, M., Takahashi, M., Aoyagi, S. und Kibayashi, C. (2004). „Total synthesis of (-)-incarvilline, (+)-incarvine C, and (-)-incarvillateine". *J. Am. Chem. Soc.* 126, S. 16553–16558.
- Iiyama, K., Lam, T. B. T. und Stone, B. A. (1994). „Covalent cross-links in the cell wall". *Plant Physiol.* 104, S. 315–320.
- Ishii, T. (1997). „Structure and functions of feruloylated polysaccharides". *Plant Science* 127, S. 111–127.
- Ishii, T. und Tobita, T. (1993). „Structural characterization of feruloyl oligosaccharides from spinach-leaf cell walls". *Carbohydr. Res.* 248, S. 179–190.
- Jackson, M. (1977). „Review article: the alkali treatment of straws". *Anim. Feed Sci. Technol.* 2, S. 105–130.
- Jacquet, G., Pollet, B., Lapierre, C., Mhamdi, F. und Rolando, C. (1995). „New ether-linked ferulic acid-coniferyl alcohol dimers identified in grass straws". *J. Agric. Food Chem.* 43, S. 2746–2751.
- Jansen, G. A. und Wanders, R. J. (2006). „Alpha-oxidation". *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* 1763, S. 1403–1412.
- Jilek, M. L. und Bunzel, M. (2013). „Dehydrotriferulic and dehydrodiferulic acid profiles of cereal and pseudocereal flours". *Cereal Chem.* 90, S. 507–514.
- Jin, X., Yang, R., Shang, Y., Dai, F., Qian, Y., Cheng, L., Zhou, B. und Liu, Z. (2010). „Oxidative coupling of cinnamic acid derivatives and their radical-scavenging activities". *Chin. Sci. Bull.* 55, S. 2885–2890.
- Kamisaka, S., Takeda, S., Takahashi, K. und Shibata, K. (1990). „Diferulic and ferulic acid in the cell wall of *Avena* coleoptiles – Their relationships to mechanical properties of the cell wall". *Physiol. Plant.* 78, S. 1–7.
- Kaur, B. und Chakraborty, D. (2013). „Biotechnological and molecular approaches for vanillin production: a review". *Appl. Biochem. Biotechnol.* 169, S. 1353–1372.
- Kaushik, D., Khan, S. A. und Chawla, G. (2012). „Synthesis of (substituted benzamidostyryl) 1*H*-benzimidazoles and their screening for anti-inflammatory activity". *Med. Chem. Res.* 21, S. 459–467.
- Kauz, T. (2016). „Synthese und Identifizierung von Tri- und Tetraferulasäuren". Wissenschaftliche Abschlussarbeit. Karlsruhe: Karlsruher Institut für Technologie.
- Kern, S. M., Bennett, R. N., Mellon, F. A., Kroon, P. A. und Garcia-Conesa, M.-T. (2003). „Absorption of hydroxycinnamates in humans after high-bran cereal consumption". *J. Agric. Food Chem.* 51, S. 6050–6055.
- Khanizadeh, S., Buszard, D. und Zarkadas, C. G. (1995). „Misuse of the Kjeldahl method for estimating protein content in plant tissue". *HortScience* 30, S. 1341–1342.

- Kim, H. K., Jeong, T.-S., Lee, M.-K., Park, Y. B. und Choi, M.-S. (2003). „Lipid-lowering efficacy of hesperetin metabolites in high-cholesterol fed rats“. *Clin. Chim. Acta* 327, S. 129–137.
- King, R. A., Mano, M. M. und Head, R. J. (1998). „Assessment of isoflavonoid concentrations in Australian bovine milk samples“. *J. Dairy Res.* 65, S. 479–489.
- Knoevenagel, E. (1898). „Condensationen zwischen Malonester und Aldehyden unter dem Einfluss von Ammoniak und organischen Aminen“. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 31, S. 2585–2595.
- Koistinen, V. M., Nordlund, E., Katina, K., Mattila, I., Poutanen, K., Hanhineva, K. und Aura, A.-M. (2017). „Effect of bioprocessing on the *in vitro* colonic microbial metabolism of phenolic acids from rye bran fortified breads“. *J. Agric. Food Chem.* 65, S. 1854–1864.
- Kroon, P. A., Faulds, C. B., Ryden, P., Robertson, J. A. und Williamson, G. (1997). „Release of covalently bound ferulic acid from fiber in the human colon“. *J. Agric. Food Chem.* 45, S. 661–667.
- Kroon, P. A., Garcia-Conesa, M.-T., Fillingham, I. J., Hazlewood, G. P. und Williamson, G. (1999). „Release of ferulic acid dehydrodimers from plant cell walls by feruloyl esterases“. *J. Sci. Food Agric.* 79, S. 428–434.
- Kubota, K., Fukushima, T., Yuji, R., Miyano, H., Hirayama, K., Santa, T. und Imai, K. (2005). „Development of an HPLC-fluorescence determination method for carboxylic acids related to the tricarboxylic acid cycle as a metabolome tool“. *Biomed. Chromatogr.* 19, S. 788–795.
- Kumar, P., Chatli, M. K., Mehta, N., Malav, O. P., Verma, A. K. und Kumar, D. (2016). „Quality attributes and storage stability of chicken meat biscuits incorporated with wheat and oat bran“. *J. Food Qual.* 39, S. 649–657.
- Lam, T. B. T., Iiyama, K. und Stone, B. A. (1992a). „Changes in phenolic-acids from internode walls of wheat and *Phalaris* during maturation“. *Phytochemistry* 31, S. 2655–2658.
- Lam, T. B. T., Iiyama, K. und Stone, B. A. (1992b). „Cinnamic acid bridges between cell-wall polymers in wheat and *Phalaris* internodes“. *Phytochemistry* 31, S. 1179–1183.
- Lam, T. B. T., Kadoya, K. und Iiyama, K. (2001). „Bonding of hydroxycinnamic acids to lignin: ferulic and *p*-coumaric acids are predominantly linked at the benzyl position of lignin, not the  $\beta$ -position, in grass cell walls“. *Phytochemistry* 57, S. 987–992.
- Lehotay, S. J., Maštovská, K. und Yun, S. J. (2005). „Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes“. *J. AOAC Int.* 88, S. 630–638.
- Levigne, S. V., Ralet, M.-C. J., Quémener, B. C., Pollet, B. N.-L., Lapierre, C. und Thibault, J.-F. J. (2004). „Isolation from sugar beet cell walls of arabinan oligosaccharides esterified by two ferulic acid monomers“. *Plant Physiol.* 134, S. 1173–1180.

- Lima, S., Kumar, S., Gawandi, V., Momany, C. und Phillips, R. S. (2008). „Crystal structure of the *Homo sapiens* kynureninase-3-hydroxyhippuric acid inhibitor complex: insights into the molecular basis of kynureninase substrate specificity“. *J. Med. Chem.* 52, S. 389–396.
- Liu, H. L., Kong, L. Y., Takaya, Y. und Niwa, M. (2005). „Biotransformation of ferulic acid into two new dihydrotrimers by *Momordica charantia* peroxidase“. *Chem. Pharm. Bull.* 53, S. 816–819.
- Lu, F., Marita, J. M., Lapierre, C., Jouanin, L., Morreel, K., Boerjan, W. und Ralph, J. (2010). „Sequencing around 5-hydroxyconiferyl alcohol-derived units in caffeic acid O-methyltransferase-deficient poplar lignins“. *Plant Physiol.* 153, S. 569–579.
- Lu, F., Wei, L., Azarpira, A. und Ralph, J. (2012). „Rapid syntheses of dehydrodiferulates via biomimetic radical coupling reactions of ethyl ferulate“. *J. Agric. Food Chem.* 60, S. 8272–8277.
- Lund, A. (1974). „Yeasts and moulds in the bovine rumen“. *Microbiology* 81, S. 453–462.
- Mancuso, C. und Santangelo, R. (2014). „Ferulic acid: pharmacological and toxicological aspects“. *Food Chem. Toxicol.* 65, S. 185–195.
- Marini, A., Domenici, V., Malanga, C., Menicagli, R. und Veracini, C. (2010). „Synthesis of deuterium-labelled, optically active, ferroelectric liquid crystals“. *Tetrahedron* 66, S. 3472–3477.
- Marquez-Escalante, J. A., Carvajal-Millan, E., Yadav, M. P., Kale, M., Rascon-Chu, A., Gardea, A. A., Valenzuela-Soto, E., Lopez-Franco, Y. L., Lizardi-Mendoza, J. und Faulds, C. B. (2017). „Rheology and microstructure of gels based on wheat arabinoxylans enzymatically modified in arabinose to xylose ratio“. *J. Sci. Food Agric.* n/a, S. 1–9.
- Marsili, R. T., Ostapenko, H., Simmons, R. E. und Green, D. E. (1981). „High performance liquid chromatographic determination of organic acids in dairy products“. *J. Food Sci.* 46, S. 52–57.
- McCleary, B. V., Sloane, N. und Draga, A. (2015). „Determination of total dietary fibre and available carbohydrates: A rapid integrated procedure that simulates *in vivo* digestion“. *Starch/Stärke* 67, S. 860–883.
- Micard, V., Grabber, J. H., Ralph, J., Renard, C. M. G. C. und Thibault, J. F. (1997). „Dehydrodiferulic acids from sugar-beet pulp“. *Phytochemistry* 44, S. 1365–1368.
- Micard, V. und Thibault, J.-F. (1999). „Oxidative gelation of sugar-beet pectins: use of laccases and hydration properties of the cross-linked pectins“. *Carbohydr. Polym.* 39, S. 265–273.
- Mood, S. H., Golfeshan, A. H., Tabatabaei, M., Jouzani, G. S., Najafi, G. H., Gholami, M. und Ardjmand, M. (2013). „Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment“. *Renewable Sustainable Energy Rev.* 27, S. 77–93.
- Mora-Rochin, S., Gutiérrez-Urbe, J. A., Serna-Saldivar, S. O., Sánchez-Peña, P., Reyes-Moreno, C. und Milán-Carrillo, J. (2010). „Phenolic content and antioxidant activity of

- tortillas produced from pigmented maize processed by conventional nixtamalization or extrusion cooking". *J. Cereal Sci.* 52, S. 502–508.
- Morrison, I. M., Robertson, G. W., Stewart, D. und Wightman, F. (1991). „Determination and characterization of cyclodimers of naturally occurring phenolic acids". *Phytochemistry* 30, S. 2007–2011.
- Morrison, W. H., Hartley, R. D. und Himmelsbach, D. S. (1992). „Synthesis of substituted truxillic acids from *p*-coumaric and ferulic acid: simulation of photodimerization in plant cell walls". *J. Agric. Food Chem.* 40, S. 768–771.
- Mottiar, Y., Vanholme, R., Boerjan, W., Ralph, J. und Mansfield, S. D. (2016). „Designer lignins: harnessing the plasticity of lignification". *Curr. Opin. Biotechnol.* 37, S. 190–200.
- Mouterde, L. M. M., Flourat, A. L., Cannet, M. M. M., Cucrot, P.-H. und Allais, F. (2013). „Chemoenzymatic total synthesis of a naturally occurring (5-5')/(8'-O-4'') dehydrotrimer of ferulic acid". *Eur. J. Org. Chem.* 2013, S. 173–179.
- Nagy, K., Actis-Goretta, L., Redeuil, K., Barron, D., Fumeaux, R., Giuffrida, F., Cruz-Hernandez, C. und Destailats, F. (2013). „Identification of cholesteryl ester of ferulic acid in human plasma by mass spectrometry". *J. Chromatogr. A* 1301, S. 162–168.
- Oliveira, D. M., Finger-Teixeira, A., Mota, R. T., Salvador, V. H., Moreira-Vilar, F. C., Molinari, H. B. C., Mitchell, C., Andrew, R., Marchiosi, R., Ferrarese-Filho, O. und Santos, W. D. dos (2015). „Ferulic acid: a key component in grass lignocellulose recalcitrance to hydrolysis". *Plant Biotechnol. J.* 13, S. 1224–1232.
- O'Neill, M. A., Ishii, T., Albersheim, P. und Darvill, A. G. (2004). „Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide". *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, S. 109–139.
- Oosterveld, A., Beldman, G. und Voragen, A. G. J. (2000). „Oxidative cross-linking of pectic polysaccharides from sugar beet pulp". *Carbohydr. Res.* 328, S. 199–207.
- Oosterveld, A., Pol, I. E., Beldman, G. und Voragen, A. G. J. (2001). „Isolation of feruloylated arabinans and rhamnogalacturonans from sugar beet pulp and their gel forming ability by oxidative cross-linking". *Carbohydr. Polym.* 44, S. 9–17.
- Orfanopoulos, M., Smonou, I. und Foote, C. S. (1990). „Intermediates in the ene reactions of singlet oxygen and *N*-phenyl-1, 2, 4-triazoline-3, 5-dione with olefins". *J. Ind. Microbiol.* 112, S. 3607–3614.
- Ou, S. Y. und Kwok, K. C. (2004). „Ferulic acid: Pharmaceutical functions, preparation and applications in foods". *J. Sci. Food Agric.* 84, S. 1261–1269.
- Oudgenoeg, G., Hilhorst, R., Piersma, S. R., Boeriu, C. G., Gruppen, H., Hensing, M., Voragen, A. G. und Laane, C. (2001). „Peroxidase-mediated cross-linking of a tyrosine-containing peptide with ferulic acid". *J. Agric. Food Chem.* 49, S. 2503–2510.
- Packert, M. und Steinhart, H. (1995). „Separation and identification of some monomeric and dimeric phenolic acids by a simple gas chromatographic method using a capillary column and FID-MSD". *J. Chromatogr. Sci.* 33, S. 631–639.

- Parker, M. L., Ng, A. und Waldron, K. W. (2005). „The phenolic acid and polysaccharide composition of cell walls of bran layers of mature wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Avalon) grains“. *J. Sci. Food Agric.* 85, S. 2539–2547.
- Parker, M. L. und Waldron, K. W. (1995). „Texture of Chinese water chestnut – involvement of cell-wall phenolics“. *J. Sci. Food Agric.* 68, S. 337–346.
- Parr, A. J., Waldron, K. W., Ng, A. und Parker, M. L. (1996). „The wall-bound phenolics of Chinese water chestnut (*Eleocharis dulcis*)“. *J. Sci. Food Agric.* 71, S. 501–507.
- Pawar, P. M., Jarag, K. J. und Shankarling, G. S. (2011). „Environmentally benign and energy efficient methodology for condensation: an interesting facet to the classical Perkin reaction“. *Green Chem.* 13, S. 2130–2134.
- Perez-Ternero, C., Macià, A., Sotomayor Paz, M. á. de, Parrado, J., Motilva, M. und Gonzalez, M. D. H. (2017). „Bioavailability of the ferulic acid-derived phenolic compounds of a rice bran enzymatic extract and their activity against the superoxide production“. *Food Funct.* 8, S. 2165–2174.
- Perkin, W. H. (1867). „XLVIII.–On the action of acetic anhydride upon the hydrides of salicyl, ethyl-salicyl, &c.“ *J. Chem. Soc.* 20, S. 586–591.
- Piber, M. und Koehler, P. (2005). „Identification of dehydro-ferulic acid-tyrosine in rye and wheat: Evidence for a covalent cross-link between arabinoxylans and proteins“. *J. Agric. Food Chem.* 53, S. 5276–5284.
- Poquet, L., Clifford, M. N. und Williamson, G. (2008). „Transport and metabolism of ferulic acid through the colonic epithelium“. *Drug Metab. Dispos.* 36, S. 190–197.
- Purushotham Reddy, S., Chinnababu, B. und Venkateswarlu, Y. (2014). „First stereoselective and concise synthesis of rhoiptelol C“. *Helv. Chim. Acta* 97, S. 999–1003.
- Qi, P., Hong, H., Liang, X. und Liu, D. (2009). „Assessment of benzoic acid levels in milk in China“. *Food Control* 20, S. 414–418.
- Ralet, M.-C., Andre-Reloux, G., Quemener, B. und Thibault, J. F. (2005). „Sugar beet (*Beta vulgaris*) pectins are covalently cross-linked through diferulic bridges in the cell wall“. *Phytochemistry* 66, S. 2800–2814.
- Ralet, M.-C., Thibault, J.-F., Faulds, C. B. und Williamson, G. (1994). „Isolation and purification of feruloylated oligosaccharides from cell walls of sugar-beet pulp“. *Carbohydr. Res.* 263, S. 227–241.
- Ralph, J. (2010). „Hydroxycinnamates in lignification“. *Phytochem. Rev.* 9, S. 65–83.
- Ralph, J., Brunow, G. und Boerjan, W. (2007). „Lignins“. *eLS*, S. 1–10.
- Ralph, J., Bunzel, M., Marita, J. M., Hatfield, R. D., Lu, F., Kim, H., Schatz, P. F., Grabber, J. H. und Steinhart, H. (2004a). „Peroxidase-dependent cross-linking reactions of p-hydroxycinnamates in plant cell walls“. *Phytochem. Rev.* 3, S. 79–96.
- Ralph, J., Garcia-Conesa, M.-T. und Williamson, G. (1998). „Simple preparation of 8-5-coupled diferulate“. *J. Agric. Food Chem.* 46, S. 2531–2532.

- Ralph, J., Grabber, J. H. und Hatfield, R. D. (1995). „Lignin-ferulate cross-links in grasses: active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins“. *Carbohydr. Res.* 275, S. 167–178.
- Ralph, J., Helm, R. F. und Quideau, S. (1992). „Lignin-feruloyl ester cross-links in grasses. Part 2. Model compound syntheses“. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, S. 2971–2980.
- Ralph, J., Lundquist, K., Brunow, G., Lu, F., Kim, H., Schatz, P. F., Marita, J. M., Hatfield, R. D., Ralph, S. A., Christensen, J. H. und Boerjan, W. (2004b). „Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids“. *Phytochem. Rev.* 3, S. 29–60.
- Ralph, J., Quideau, S., Grabber, J. H. und Hatfield, R. D. (1994). „Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell walls“. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, S. 3485–3498.
- Raschka, A. und Carus, M. (2012). *Stoffliche Nutzung von Biomasse. Basisdaten für Deutschland, Europa und die Welt*. Techn. Ber. nova-Institut für Ökologie und Innovation GmbH.
- Rechner, A., G., K., Bremner, P., Hubbard, G. P., Moore, K. P. und Rice-Evans, C. A. (2002). „The metabolic fate of dietary polyphenols in humans“. *Free Rad. Biol. Med.* 33, S. 220–235.
- Regan, S. L., Maggs, J. L., Hammond, T. G., Lambert, C., Williams, D. P. und Park, B. K. (2010). „Acyl glucuronides: the good, the bad and the ugly“. *Biopharm. Drug Dispos.* 31, S. 367–395.
- Renger, A. und Steinhart, H. (2000). „Ferulic acid dehydrodimers as structural elements in cereal dietary fibre“. *Eur. Food Res. Technol.* 211, S. 422–428.
- Richards, S. A. und Hollerton, J. C. (2011). *Essential practical NMR for organic chemistry*. Chichester: John Wiley & Sons.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A. und Mohnen, D. (2001). „Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling“. *Phytochemistry* 57, S. 929–967.
- Robbins, R. J. und Schmidt, W. F. (2004). „Optimized synthesis of four isotopically labeled (<sup>13</sup>C-enriched) phenolic acids via a malonic acid condensation“. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 47, S. 797–806.
- Rosazza, J. P. N., Huang, Z., Dostal, L., Volm, T. und Rousseau, B. (1995). „Review: Biocatalytic transformations of ferulic acid: An abundant aromatic natural product“. *J. Ind. Microbiol.* 15, S. 457–471.
- Rosler, J., Krekel, F., Amrhein, N. und Schmid, J. (1997). „Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity“. *Plant Physiol.* 113, S. 175–179.
- Rosler, M. (2014). „Entwicklung einer QuEChERS-Methode zur Bestimmung von Ferulasäure-Metaboliten in Milch mittels LC/MS/MS“. Wissenschaftliche Abschlussarbeit. Karlsruhe: Karlsruher Institut für Technologie.
- Rouau, X., Cheynier, V., Surget, A., Gloux, D., Barron, C., Meudec, E., Louis-Montero, J. und Criton, M. (2003). „A dehydrotrimer of ferulic acid from maize bran“. *Phytochemistry* 63, S. 899–903.

- Russell, W. R., Scobbie, L., Chesson, A., Richardson, A. J., Stewart, C. S., Duncan, S. H., Drew, J. E. und Duthie, G. G. (2008). „Anti-inflammatory implications of the microbial transformation of dietary phenolic compounds“. *Nutr. Cancer* 60, S. 636–642.
- Sajiki, H., Aoki, F., Esaki, H., Maegawa, T. und Hirota, K. (2004a). „Efficient CH/CD exchange reaction on the alkyl side chain of aromatic compounds using heterogeneous Pd/C in D<sub>2</sub>O“. *Org. Lett.* 6, S. 1485–1487.
- Sajiki, H., Kurita, T., Esaki, H., Aoki, F., Maegawa, T. und Hirota, K. (2004b). „Complete replacement of H<sub>2</sub> by D<sub>2</sub> via Pd/C-catalyzed H/D exchange reaction“. *Org. Lett.* 6, S. 3521–3523.
- Sarkanen, K. V. und Wallis, A. F. (1973). „Oxidative dimerizations of (*E*)- and (*Z*)-isoeugenol (2-methoxy-4-propenylphenol) and (*E*)- and (*Z*)-2, 6-dimethoxy-4-propenylphenol“. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, S. 1869–1878.
- Saulnier, L., Crepeau, M. J., Lahaye, M., Thibault, J. F., Garcia-Conesa, M.-T., Kroon, P. A. und Williamson, G. (1999). „Isolation and structural determination of two 5,5'-diferuloyl oligosaccharides indicate that maize heteroxylans are covalently cross-linked by oxidatively coupled ferulates“. *Carbohydr. Res.* 320, S. 82–92.
- Saulnier, L., Marot, C., Chanliaud, E. und Thibault, J. F. (1995). „Cell wall polysaccharide interactions in maize bran“. *Carbohydr. Polym.* 26, S. 279–287.
- Schatz, P. F., Ralph, J., Lu, F., Guzei, I. A. und Bunzel, M. (2006). „Synthesis and identification of 2,5-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-tetrahydrofuran-3,4-dicarboxylic acid, an unanticipated ferulate 8-8-coupling product acylating cereal plant cell walls“. *Org. Biomol. Chem.* 4, S. 2801–2806.
- Scheller, H. V. und Ulvskov, P. (2010). „Hemicelluloses“. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, S. 263–289.
- Schendel, R. R., Karrer, C., Bunzel, D., Huch, M., Hildebrand, A. A., Kulling, S. E. und Bunzel, M. (2015). „Structural transformation of 8-5-coupled dehydrodiferulates by human intestinal microbiota“. *J. Agric. Food Chem.* 63, S. 7975–7985.
- Schendel, R. R. (2016). „Qualitative and quantitative screening of side-chain profiles of cereal grain arabinoxylans“. Dissertation. Karlsruhe, Germany: Karlsruher Institut für Technologie.
- Schmidt, G. (1964). „385. Topochemistry. Part III. The crystal chemistry of some *trans*-cinnamic acids“. *J. Am. Chem. Soc.* S. 2014–2021.
- Schotten, C. (1884). „Ueber die Oxydation des Piperidins“. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 17, S. 2544–2547.
- Schwarz, W. (2001). „The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria“. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, S. 634–649.
- Shimotori, Y., Tsutano, K., Soga, K., Osawa, Y., Aoyama, M. und Miyakoshi, T. (2012). „Synthesis of glycosyl ferulate derivatives by amine-promoted glycosylation with regioselective hydrolysis using Novozym 435 and evaluation of their antioxidant properties“. *Carbohydr. Res.* 359, S. 11–17.

- Slavin, J. (2013). „Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits“. *Nutrients* 5, S. 1417–1435.
- Šmejkalová, D. und Piccolo, A. (2006). „Rates of oxidative coupling of humic phenolic monomers catalyzed by a biomimetic iron-porphyrin“. *Environ. Sci. Technol.* 40, S. 1644–1649.
- Smith, M. M. und Hartley, R. D. (1983). „Occurrence and nature of ferulic acid substitution of cell-wall polysaccharides in graminaceous plants“. *Carbohydr. Res.* 118, S. 65–80.
- Steinhart, H. und Bunzel, M. (2003). „Separation techniques in structural analysis of dietary fiber polysaccharides“. *Chromatographia* 57, S. 359–361.
- Stewart, D., Robertson, G. W. und Morrison, I. M. (1992). „Identification of cyclobutane-type dimers of substituted cinnamic acids by gas chromatography/mass spectrometry“. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 6, S. 46–53.
- Thakur, B. R., Singh, R. K. und Handa, A. K. (1997). „Chemistry and uses of pectin“. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 37, S. 47–73.
- Tobinaga, S. und Kotani, E. (1972). „Intramolecular and intermolecular oxidative coupling reactions by a new iron complex  $[\text{Fe}(\text{DMF})_3\text{Cl}_2][\text{FeCl}_4]$ “. *J. Am. Chem. Soc.* 94, S. 309–310.
- Toyo'oka, T. (2002). „Fluorescent tagging of physiologically important carboxylic acids, including fatty acids, for their detection in liquid chromatography“. *Anal. Chim. Acta* 465, S. 111–130.
- Toyo'oka, T., Ishibashi, M., Takeda, Y., Nakashima, K., Akiyama, S., Uzu, S. und Imai, K. (1991). „Precolumn fluorescence tagging reagent for carboxylic acids in high-performance liquid chromatography: 4-substituted-7-aminoalkylamino-2, 1, 3-benzoxadiazoles“. *J. Chromatogr. A* 588, S. 61–71.
- Toyo'oka, T., Ishibashi, M., Terao, T. und Imai, K. (1992). „Sensitive fluorometric detection of prostaglandins by high performance liquid chromatography after precolumn labeling with 4-(*N, N*-dimethylaminosulphonyl)-7-(1-piperazinyl)-2, 1, 3-benzoxadiazole (DBD-PZ)“. *Biomed. Chromatogr.* 6, S. 143–148.
- Turner, L. B., Muellerharvey, I. und Mcallan, A. B. (1993). „Light-induced isomerization and dimerization of cinnamic acid-derivatives in cell-walls“. *Phytochemistry* 33, S. 791–796.
- Ueno, Y., Matsunaga, H., Umemoto, K. und Nishijima, K. (1999). „Determination of free fatty acids in o/w injectable emulsions by HPLC with fluorescence detection using 4-(*N, N*-Dimethylaminosulfonyl)-7-*N*-piperazino-2, 1, 3-benzoxadiazole“. *Chem. Pharm. Bull.* 47, S. 1375–1379.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J. und Boerjan, W. (2010). „Lignin biosynthesis and structure“. *Plant Physiol.* 153, S. 895–905.
- Vanholme, R., Morreel, K., Darrah, C., Oyarce, P., Grabber, J. H., Ralph, J. und Boerjan, W. (2012). „Metabolic engineering of novel lignin in biomass crops“. *New Phytol.* 196, S. 978–1000.

- Vincken, J.-P., Schols, H. A., Oomen, R. J. F. J., McCann, M. C., Ulvskov, P., Voragen, A. G. J. und Visser, R. G. F. (2003). „If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture“. *Plant Physiol.* 132, S. 1781–1789.
- Vismeh, R., Lu, F., Chundawat, S. P. S., Humpala, J. F., Azarpira, A., Balan, V., Dale, B. E., Ralph, J. und Jones, A. D. (2013). „Profiling of diferulates (plant cell wall cross-linkers) using ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry“. *Analyst* 138, S. 6683–6692.
- Vogel, J. (2008). „Unique aspects of the grass cell wall“. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, S. 301–307.
- Wadsworth, W. S. und Emmons, W. D. (1961). „The utility of phosphonate carbanions in olefin synthesis“. *J. Am. Chem. Soc.* 83, S. 1733–1738.
- Waldron, K. W., Ng, A., Parker, M. L. und Parr, A. J. (1997). „Ferulic acid dehydrodimers in the cell walls of *Beta vulgaris* and their possible role in texture“. *J. Sci. Food Agric.* 74, S. 221–228.
- Wallace, G. und Fry, S. C. (1999). „Action of diverse peroxidases and laccases on six cell wall-related phenolic compounds“. *Phytochemistry* 52, S. 769–773.
- Ward, G., Hadar, Y., Bilkis, I., Konstantinovskiy, L. und Dosoretz, C. G. (2001). „Initial steps of ferulic acid polymerization by lignin peroxidase“. *J. Biol. Chem.* 276, S. 18734–18741.
- Waterstraat, M. (2014). „Etablierung einer LC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von Ferulasäure und ausgewählter Metaboliten“. Wissenschaftliche Abschlussarbeit. Karlsruhe: Karlsruher Universität für Technologie.
- Waterstraat, M., Bunzel, D. und Bunzel, M. (2016a). „Identification of 8-O-4/8-5(cyclic)- and 8-8(cyclic)/5-5-coupled dehydrotriferulic acids, naturally occurring in cell walls of mono- and dicotyledonous plants“. *J. Agric. Food Chem.* 64, S. 7244–7250.
- Waterstraat, M., Hildebrand, A., Rosler, M. und Bunzel, M. (2016b). „Development of a QuEChERS-based stable-isotope dilution LC-MS/MS method to quantitate ferulic acid and its main microbial and hepatic metabolites in milk“. *J. Agric. Food Chem.* 64, S. 8667–8677.
- Wefers, D., Gmeiner, B. M., Tyl, C. E. und Bunzel, M. (2015). „Characterization of diferuloylated pectic polysaccharides from quinoa (*Chenopodium quinoa* WILLD.)“ *Phytochemistry* 116, S. 320–328.
- Wefers, D., Tyl, C. und Bunzel, M. (2014). „Novel arabinan and galactan oligosaccharides from dicotyledonous plants“. *Front. Chem.* 2, S. 100.
- Wefers, D. (2016). „Entwicklung chromatographischer und spektroskopischer Profilingmethoden zur Analyse komplexer Strukturelemente neutraler Pektinseitenketten“. Dissertation. Karlsruhe, Germany: Karlsruher Institut für Technologie.
- Wende, G. und Fry, S. C. (1997). „2-O-β-D-xylopyranosyl-(5-O-feruloyl)-L-arabinose, a widespread component of grass cell walls“. *Phytochemistry* 44, S. 1019–1030.

- Whitney, S. E. C., Brigham, J. E., Darke, A. H., Reid, J. S. G. und Gidley, M. J. (1998). „Structural aspects of the interaction of mannan-based polysaccharides with bacterial cellulose“. *Carbohydr. Res.* 307, S. 299–309.
- Wilkerson, C. G., Mansfield, S. D., Lu, F., Withers, S., Park, J.-Y., Karlen, S. D., Gonzales-Vigil, E., Padmakshan, D., Unda, F., Rencoret, J. und Ralph, J. (2014). „Monolignol ferulate transferase introduces chemically labile linkages into the lignin backbone“. *Science* 344, S. 90–93.
- Willis, R. B., Montgomery, M. E. und Allen, P. R. (1996). „Improved method for manual, colorimetric determination of total Kjeldahl nitrogen using salicylate“. *J. Agric. Food Chem.* 44, S. 1804–1807.
- Wu, A. und Cremer, D. (2003). „Extension of the Karplus relationship for NMR spin-spin coupling constants to nonplanar ring systems: Pseudorotation of tetrahydrofuran“. *Int. J. Mol. Sci.* 4, S. 158.
- Wu, H., Haig, T., Pratley, J., Lemerle, D. und An, M. (1999). „Simultaneous determination of phenolic acids and 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one in wheat (*Triticum aestivum* L.) by gas chromatography-tandem mass spectrometry“. *J. Chromatogr. A* 864, S. 315–321.
- Yamamoto, H., Hoshino, T. und Uchiyama, T. (1999). „Convenient preparation and quantification of 5,5'-diferulic acid“. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, S. 390–394.
- Yang, Z. D., Song, Z. W., Ren, J., Yang, M. J. und Li, S. (2011). „Improved thin-layer chromatography bioautographic assay for the detection of acetylcholinesterase inhibitors in plants“. *Phytochem. Anal.* 22, S. 509–515.
- Yin, J., Li, Y., Zhang, R., Jin, K. und Duan, C. (2014). „Copper/silver-mediated decarboxylative trifluoromethylation of  $\alpha,\beta$ -unsaturated carboxylic acids with  $\text{CF}_3\text{SO}_2\text{Na}$ “. *Synthesis* 46, S. 607–612.
- Yoshida-Shimokawa, T., Yoshida, S., Kakegawa, K. und Ishii, T. (2001). „Enzymic feruloylation of arabinoxylan-trisaccharide by feruloyl-CoA : arabinoxylan-trisaccharide O-hydroxycinnamoyl transferase from *Oryza sativa*“. *Planta* 212, S. 470–474.
- Yu, J. und Spencer, J. B. (1997). „First evidence that the mechanism of catalytic hydrogenation with homogeneous palladium and rhodium catalysts is strongly influenced by substrate polarity“. *J. Am. Chem. Soc.* 119, S. 5257–5258.
- Zeller, W. E. und Schatz, P. F. (2015). „Synthesis of monomethyl 5,5'-dehydrodiferulic acid“. *Tetrahedron Lett.* 56, S. 1076–1079.
- Zhao, X., Zhang, L. und Liu, D. (2012a). „Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose“. *Biofuels, Bioprod. Biorefin.* 6, S. 465–482.
- Zhao, X., Zhang, L. und Liu, D. (2012b). „Biomass recalcitrance. Part II: Fundamentals of different pre-treatments to increase the enzymatic digestibility of lignocellulose“. *Biofuels, Bioprod. Biorefin.* 6, S. 561–579.

- Zhao, Z. und Moghadasian, M. H. (2008). „Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review“. *Food Chem.* 109, S. 691–702.
- Zhao, Z. und Moghadasian, M. H. (2010). „Bioavailability of hydroxycinnamates: a brief review of *in vivo* and *in vitro* studies“. *Phytochem. Rev.* 9, S. 133–145.
- Zhu, Y. und Ralph, J. (2011). „Stereoselective synthesis of 1-O- $\beta$ -feruloyl and 1-O- $\beta$ -sinapoyl glucopyranoses“. *Tetrahedron Lett.* 52, S. 3729–3731.



## CHEMIKALIEN UND INSTRUMENTE

## 7.1 CHEMIKALIEN

Substanz (Reinheit)	Hersteller	GHS-Symbole	H-Sätze	P-Sätze
2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosylbromid (> 98,5 %)	VWR	GHS07	315, 319, 335	280, 305+351+338
3-(3,4-Dihydroxyphenyl)propionsäure (> 98 %)	Alfa Aesar	GHS07	315, 319, 335	302+352, 304+340, 305+351+338
3-(3-Hydroxyphenyl)propionsäure (< 98 %)	Alfa Aesar	GHS07	315, 319, 335	302+352, 304+340, 305+351+338
3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure (< 99 %)	Alfa Aesar	GHS07	315, 319, 335	261, 305+351+338
3,4-Dihydroxybenzaldehyd (97 %)	Sigma-Aldrich	GHS07	315, 319, 335	261, 305+351+338
3-Hydroxybenzaldehyd (< 95 %)	Fluka	GHS07	315, 319, 335	261, 305+351+338
3-Hydroxybenzoesäure (99 %)	Alfa Aesar	GHS07	302, 315, 319, 335	261, 305+351+338
3-Phenylpropionsäure (99 %)	Alfa Aesar	GHS07	315, 319, 335	261, 305+351+338
4-Hydroxybenzaldehyd (96 %)	Merck-Schuchardt	GHS07	315, 319, 335	261, 305+351+338
4-Hydroxybenzoesäure (99 %)	Alfa Aesar	GHS05, GHS07	318, 335	280, 305+351+338+310
Aceton	VWR	GHS02, GHS07	225, 319, 336	210, 233+403, 305+351+338
[D <sub>6</sub> ]Aceton (99,9 Atom % D)	Sigma-Aldrich	GHS02, GHS07	225, 319, 336	210, 233+403, 305+351+338
Acetonitril (HPLC-/ MS-Grade)	VWR	GHS02, GHS07	225, 302+312+332, 319	280, 305+351+338, 310
Acetylchlorid (> 99 %)	Fluka	GHS02, GHS05	225, 314	210, 305+351+338, 310

Substanz (Reinheit)	Hersteller	GHS-Symbole	H-Sätze	P-Sätze
Ameisensäure	Carl Roth	GHS02, GHS05, GHS06	226, 290, 302, 314, 331	260, 280, 303+361+353, 305+351+338, 310
Ammoniak-Lösung (25 %)	Merck	GHS05, GHS06, GHS09	221, 331, 314, 400	210, 260, 280, 273, 304+340, 303+361+353, 305+351+338, 315, 377, 381, 405, 403
Ammoniumchlorid	Carl Roth	GHS07	302, 319	305+351+338
Anilin	Alfa Aesar	GHS05, GHS06, GHS08, GHS09	301, 311, 331, 317, 318, 341, 351, 372, 400	273, 280, 302+352, 304+340, 305+351+338, 308+31
Arabinoxylan aus Buchenholz (> 90 %)	Sigma-Aldrich	-	-	-
Benzaldehyd (> 99 %)	Alfa Aesar	GHS07	302	270
Benzoesäure (99,5 %)	Fluka	GHS05, GHS08	315, 318, 372	280, 302+352, 305+351+338, 314
3,5-[D <sub>2</sub> ]Benzoesäure (98,9 %)	CDN isotopes	GHS05, GHS08	315, 318, 372	280, 302+352, 305+351+338, 314
Benzoylchlorid (99 %)	VWR	GHS05, GHS06	302, 312, 331, 314, 317	280, 301+330+331, 303+361+353, 304+340, 310, 305+351+338, 310
BSTFA	Sigma Aldrich	GHS02, GHS05	226, 314	280, 310, 305+351+338
Carbogen (5 % CO <sub>2</sub> )	Air Liquide S.A.	GHS03, GHS04	270, 280	244, 220, 370+376, 403
Cellulose	Roth	-	-	-
Chloroform (99,9 %)	Roth	GHS06, GHS08	351, 361d, 331, 302, 372, 319, 315	302+352, 314
DBD-ED (< 95 %)	Sigma-Aldrich	keine Daten verfügbar	keine Daten verfügbar	keine Daten verfügbar
DBD-PZ (> 99 %)	Fluka	GHS07	315, 319, 335	261, 305+351+338
Deuteriumchlorid 35 wt % (99 %)	Sigma-Aldrich	GHS05, GHS07	314, 335	280, 301+330+331, 305+351+338, 310
Deuteriumoxid (99,9 Atom % D)	Deutero GmbH	-	-	-

Substanz (Reinheit)	Hersteller	GHS-Symbole	H-Sätze	P-Sätze
Dichlormethan stabilisiert mit 0,2 % Ethanol	VWR	GHS08	351	201, 281, 308+313
Diethylcyanophosphonat (90 %)	Sigma-Aldrich	GHS05, GHS06	300+310+330, 314	260, 264, 280, 284, 301+310, 302+350
Diethylether	VWR	GHS02, GHS07	224, 302, 336	210, 243, 280, 304+340+, 310
Dihydroferulasäure (97 %)	Alfa Aesar	GHS07	315, 319, 335	261, 305+351+338
Dimethylsulfoxid	Carl Roth	-	-	-
1,4-Dioxan (99,8 %)	Roth	GHS02, GHS07, GHS08	225, 351, 319, 335	210, 233, 308+313, 305+351, 338, 403+235
Dipyridyldisulfid (99 %)	Sigma-Aldrich	GHS07	315, 319, 335	261, 305+351+338
Essigsäure, konzentriert (> 99,8 %)	Carl Roth	GHS02, GHS05	226, 290, 314	210, 280, 303+361+353, 305+351+338, 310
Essigsäureanhydrid (> 99 %, zur Synthese)	Carl Roth	GHS02, GHS05, GHS07	226, 302+332, 314	210, 280, 303+361+353, 305+351+338, 310
Ethanol (99 %)mit 1 % MEK	VWR	GHS02	225	210, 243, 280
Ethylacetat (> 99,5 %)	Roth	GHS02, GHS07	225, 319, 336	210, 243, 261, 280, 305+351+338, 403, 233
Glycin	Fluka	-	-	-
[ <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]Glycin (99 %)	Sigma-Aldrich	-	-	-
n-Hexan (95 %)	VWR	GHS02, GHS07, GHS08, GHS09	225, 361f, 304, 315, 336, 373, 411	201, 210, 243, 273, 280, 301+330+331, 302+352, 304+340, 309+310
Hippursäure (99 %)	VWR	-	-	-
Kupfer(I)chlorid (95 %)	Roth	GHS05, GHS07, GHS09	302, 315, 318, 410	273, 280, 305+351+338, 501
Magnesiumsulfat	VWR	-	-	-
Malonsäure (< 99,5 %)	Alfa Aesar	GHS07	302, 319	260, 262, 305+351+338
[ <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]Malonsäure (< 99 %)	Sigma-Aldrich	GHS07	302, 319	260, 262, 305+351+338

Substanz (Reinheit)	Hersteller	GHS-Symbole	H-Sätze	P-Sätze
[ <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]Malonsäure (< 99 %)	Sigma-Aldrich	GHS07	302, 319	260, 262, 305+351+338
Methanol (HPLC-/ MS-Grade)	VWR	GHS02, GHS06, GHS08	301+311+331, 370	280, 302+352, 304+340, 310
[D <sub>4</sub> ]Methanol	Deutero GmbH	GHS02, GHS06, GHS08	301+311+331, 370	280, 302+352, 304+340, 310
N,O-Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid	Sigma-Aldrich	GHS02, GHS05	225, 314	210, 280, 305+351+338, 310
Natriumacetat	Sigma-Aldrich	-	-	-
Natriumchlorid	Roth	-	-	-
Natriumdihydrogenphosphat (< 99 %)	Sigma Aldrich	-	-	-
Natriumhydrid (60 %ige Suspension in Öl)	Alfa Aesar	GHS02	260	223, 231+232, 233, 280, 370+378c, 402+404, 501a
Natriumhydrogencarbonat	Riedel-de Haën AG	-	-	-
[D <sub>1</sub> ]Natriumhydroxid 40 wt % (99,5 Atom % D)	Sigma-Aldrich	GHS05	290, 314	280, 301+330+331, 305+351+338, 310
Natriumhydroxid-Plätzchen	Carl Roth	GHS05	290, 314	280, 301+330+331, 305+351+338, 310
Natriumsulfat	VWR	-	-	-
o-Nitrophenol (99 %)	Sigma-Aldrich	GHS07	302, 315, 319, 335, 412	261, 262, 273, 305+351+338
Palladium auf Aktivkohle (10 % Pd)	E. Merck AG	GHS02	228	233
Petrolether (40–60 °C)	VWR	GHS02, GHS06, GHS08, GHS09	225, 304, 336, 411	210, 243, 280, 273, 301+331, 304+340, 309+310
Phenyllessigsäure (99 %)	Sigma-Aldrich	GHS07	319, 335	304+340, 305+351+338
Phosphorsäure (> 85 %)	Roth	GHS05	314, 290	280, 301+330+331, 305+351+338, 309+310
Pyridin	VWR	GHS02, GHS07	225, 302+312, 332	210, 243, 280, 302+352, 304+340, 310

Substanz (Reinheit)	Hersteller	GHS-Symbole	H-Sätze	P-Sätze
p-Nitrophenol (99,5%)	Sigma-Aldrich	GHS06, GHS08	301, 312+332, 373	261, 280, 301+330+310, 302+352, 304,340, 312
Salzsäure (37%)	VWR	GHS05, GHS07	314, 335	280, 301+330+331, 305+351+338, 310
Silber(I)oxid (> 99%)	Roth	GHS03, GHS05, GHS09	271, 318, 410	210, 280, 305+351+338+310, 370+378, 371+380+375
Tetrahydrofuran	VWR	GHS02, GHS07, GHS08	225, 302+312+332, 319, 351, 335	280, 210, 301+312, 303+361+353, 305+351+338
Tetrahydrofuran stabilisiert mit BHT	Roth	GHS02, GHS07, GHS08	225, 302+312+332, 319, 351, 335	280, 210, 301+312, 303+361+353, 305+351+338
Tetramethylethyldiamin	Carl Roth	GHS02, GHS05, GHS07	225, 332, 302, 314	210, 280, 305+351+338, 310
Thionylchlorid (98%)	Riedel-de Haën AG	GHS05, GHS06	302, 331, 314, 335	280, 301+330+331, 304+340, 305+351+338, 309+310
Toluol	VWR	GHS02, GHS07, GHS08	225, 361, 304, 373, 315, 336	210, 240, 301+310+330, 302+352, 308+313, 314, 403+233
<i>trans</i> -Ferulasäure	Sigma-Aldrich	GHS07	315, 319, 335	261, 305+351+338
<i>trans</i> -Kaffeensäure	Sigma-Aldrich	GHS07, GHS08	315, 319, 335, 351, 361	261, 281, 305+351+338
<i>trans-o</i> -Cumarsäure	Fluka	GHS06	301, 315, 319, 335	261, 301+310, 305+351+338
<i>trans-p</i> -Cumarsäure	Sigma-Aldrich	GHS07	315, 319, 335	261, 305+351+338
Triethylamin (99%)	Alfa Aesar	GHS02, GHS05, GHS07	225, 314, 302, 312, 332, 335	210, 260, 261, 280, 301+330+331, 303+361+353, 304+340, 305+351+338, 310, 403+233, 405, 501a

Substanz (Reinheit)	Hersteller	GHS-Symbole	H-Sätze	P-Sätze
Triethylphosphonoacetat	Fluka (99%)	GHS07	317, 315	302+352, 305+351+338
[ <sup>13</sup> C]Triethylphosphonoacetat (99 Atom % <sup>13</sup> C)	Sigma Aldrich	GHS07	317, 315	302+352, 305+351+338
Trifluoressigsäure (99%)	Sigma-Aldrich	GHS05, GHS07	290, 314, 332, 412	260, 280, 303+361+353, 305+351+338
Triphenylphosphan (> 99%)	Alfa Aesar	GHS07, GHS08	302, 317, 373	280, 301+312,330, 333+313
Vanillin (< 99%)	Fluka	GHS07	302, 319	301+312, 305+351+338, 337+313
Vanillylalkohol (< 98%)	Sigma-Aldrich	GHS07	315, 319, 335	261, 305+351+338
Wasserstoff	Wasserstoff- generator	GHS02, GHS04	220, 280	P210, P377, P381, P403
Wasserstoffperoxid (30%)	Sigma-Aldrich	GHS03, GHS05, GHS07	271, 302, 314, 332, 335, 412	210, 220, 260, 280, 305+351+338, 370+378
Zimtsäure (< 99%)	Fluka	GHS07	319	280, 264, 305+351+338, 337+313

## 7.2 ENZYME

Peroxidase	aus Meerrettich, Typ-II, 200 U/mg	Sigma-Aldrich
Sulfatase (mit Glucuronidase- aktivität)	aus <i>Helix pomatia</i> , Typ H-1	Sigma-Aldrich
Driselase	aus Basidomycetes, Cellulaseaktivi- tät $\geq 100$ U/g, Laminarinaseaktivität $\geq 10$ U/g, Xylanaseaktivität $\geq 3$ U/g	Sigma-Aldrich
Feruloylsterase E-FAERU	aus Rumen Mikroorganismen, 600 U/mL)	Megazyme
Feruloylsterase E-FAEZCT	aus <i>Clostridium thermocellum</i> , 7 U/mL	Megazyme

## 7.3 INSTRUMENTE

### LC-DAD-MS/MS-System

Pumpe, Autosampler	2690 Separation Module (Waters)
Schleifenvolumen	50 µL
Säulenofen	Beckman coulter
Diodenarraydetektor	996 PDA D (Waters)
Massenspektrometer	Micromass Quattro Micro (Waters)
Software	MassLynx 4.1 (Waters)

### GC-MS-System

Gaschromatograph	GC-2010 Plus (Shimadzu)
Autosampler	AOC-20i Auto Injector (Shimadzu)
Kapillarsäule	Rxi-5Sil MS (29,1 m, 0,25 mmID, 0,25 µm, Restek)
Massenspektrometer	GC-MS QP 2010Ultra SE (Shimadzu)
Software	GCMSsolution Version 2.72

### HPLC-DAD-FLD-System

Communication Modul	Prominence CBM-20A (Shimadzu)
Säulenofen	Prominence CTO-20AC (Shimadzu)
Pumpen (3x)	Prominence LC-20AT (Shimadzu)
Autosampler	Prominence SIL-20AC (Shimadzu)
DAD-Detektor	Prominence SPD-M20A (Shimadzu)
FLD-Detektor	RF-10AXL (Shimadzu)
Software	LCsolution Version 1.22 SP1

### HPLC-UV-System (präparativ)

Communication Modul	Prominence CBM-20A (Shimadzu)
Pumpen (2x)	LC-8A (Shimadzu)
UV-Detektor	Prominence SPD-20A (Shimadzu)
Software	LCsolution Version 1.22 SP1

### HPLC-UV-System (semipräparativ)

Pumpen (2x)	AZURA P2.1L (Knauer)
Degasser	Online Degasser (Knauer)
Mischkammer	Dynamische Mischkammer (Knauer)
Autosampler	Optimas type 820 (Spark)
Schleifenvolumen	100 µL
UV-Detektor	AZURA UVD2.1L (Knauer)
Fraktionssammler	Azura V2.1S (Knauer)

## NMR-Spektrometer

Gerätebezeichnung	Ascend 500 MHz (Bruker)
Probenkopf	CryoProbe Prodigy (Bruker)
Software	Topspin 3.2
Lösungsmittel	Aceton-d <sub>6</sub> (wenn nicht anders vermerkt)
Pulsprogramme	Standard-Pulsprogramme von Bruker ( <sup>1</sup> H, HSQC, HMBC, COSY, NOESY)

## Flash-Chromatograph

Gerätebezeichnung	Horizon flash chromatograph (Biotage)
-------------------	---------------------------------------

## SEC-FTIR-System

Pumpe, Autosampler	Agilent Technologies 1260 Infinity
FTIR-Detektor	Vertex 70 (Bruker) mit Modifikationen nach Beskers et al. 2015
Software	PSS WinGPC Unity / OPUS 6.5
Volumen der Messzelle	170 µL

## Sephadex-Gelpermeationschromatographie

Pumpe	Jasco 880-PU (Techlab)
Schleifenvolumen	10 mL
Säulenmaterial	Sephadex LH-20 (GE Healthcare), 70 cm x 2,6 cm
Detektor	WellChrom UV-Detector K-2600 (Knauer)
Fraktionssammler	FC 204 (Gilson)
Software	Chromstar 7

## LC-HRMS/MS-System

Gerätebezeichnung	LC-ToF-MS/MS-System
HPLC	1290 Infinity HPLC System (Agilent Technologies)
Pumpe	1290 Bin Pump G4220A mit Degasser
Autosampler	1290 Sampler G4226A
Thermostat	1290 Thermostat G1330B
Säulenofen	1290 TCC G1316C
Detektor	1290 DAD G4212A
Massenspektrometer	Triple TOF 5600 (AB Sciex Instruments), Hybrid Quadrupole-TOF LC/MS/MS mit Duo Spray Ion Source
Standort/Durchführung	Max Rubner Institut, Institut für Sicherheit und Qualität bei Obst und Gemüse

## 8.1 SYNTHESE VON (ISOTOPENMARKIERTEN) FERULASÄURE-METABOLITEN

### 8.1.1 [ $^{13}\text{C}_2$ ]Zimtsäuren

- Für [ $^{13}\text{C}_2$ ]FS:
  - Vanillin (142,8 mg, 0,92 mmol) und [ $^{13}\text{C}_3$ ]Malonsäure (65 mg, 0,61 mmol) zusammen mit Pyridin (300  $\mu\text{L}$ ) und Anilin (30  $\mu\text{L}$ ) in ein 1,5 mL-Braunglas geben.
- Für [ $^{13}\text{C}_2$ ]Kaffeensäure:
  - 3,4-Dihydroxybenzaldehyd (127 mg, 0,92 mmol) und [ $^{13}\text{C}_3$ ]Malonsäure (65 mg, 0,61 mmol) zusammen mit Pyridin (300  $\mu\text{L}$ ) und Anilin (30  $\mu\text{L}$ ) in ein 1,5 mL-Braunglas geben.
- Für [ $^{13}\text{C}_2$ ]p-CS:
  - 4-Hydroxybenzaldehyd (112,4 mg, 0,92 mmol) und [ $^{13}\text{C}_3$ ]Malonsäure (60 mg, 0,56 mmol) zusammen mit Pyridin (300  $\mu\text{L}$ ) und Anilin (30  $\mu\text{L}$ ) in ein 1,5 mL-Braunglas geben.
- Für [ $^{13}\text{C}_2$ ]3-Hydroxyzimtsäure:
  - 3-Hydroxybenzaldehyd (56,2 mg, 0,46 mmol) und [ $^{13}\text{C}_3$ ]Malonsäure (30 mg, 0,28 mmol) zusammen mit Pyridin (150  $\mu\text{L}$ ) und Anilin (15  $\mu\text{L}$ ) in ein 1,5 mL-Braunglas geben.
- Für [ $^{13}\text{C}_2$ ]Zimtsäure:
  - Benzaldehyd (97,6 mg, 0,92 mmol) und [ $^{13}\text{C}_3$ ]Malonsäure (60 mg, 0,56 mmol) zusammen mit Pyridin (300  $\mu\text{L}$ ) und Anilin (30  $\mu\text{L}$ ) in ein 1,5 mL-Braunglas geben.
- Mit  $\text{N}_2$  bedecken und bei 55 °C für 16 h reagieren lassen.
- Die Rohprodukte in ein größeres Gefäß überführen und mit 1 mL  $\text{H}_2\text{O}$  und 0,5 mL konz. HCl ansäuern.
- Mehrmals mit Ethylacetat extrahieren und Lösungsmittel trocknen.
- Rückstand in  $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$  lösen und mittels präparativer HPLC aufreinigen.
- C18-Säule (Luna, 250 x 10 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 100 Å), Fließmittel A:  $\text{MeOH}$  mit 0,1 % Ameisensäure, Fließmittel B:  $\text{H}_2\text{O}$  mit 0,1 % Ameisensäure, Flussrate: 3,5 mL/min, UV-Detektor: 280 nm, Gradient: 20 % A auf 45 % A in 25 min. (Ausnahme im Gradienten für [ $^{13}\text{C}_2$ ]Zimtsäure: 35 % A auf 100 % B in 35 min.)

### 8.1.2 [ $^{13}\text{C}_2$ ]Phenylpropionsäuren

- Für [ $^{13}\text{C}_2$ ]Dihydroferulasäure:
  - [ $^{13}\text{C}_2$ ]FS (49,1 mg, 0,25 mmol) in einem Zweihalskolben in  $\text{MeOH}$  (1,5 mL) lösen und ca. 5 mg Palladium (10 %) auf Aktivkohle zugeben.
- Für [ $^{13}\text{C}_2$ ]3,4-Dihydroxyphenylpropionsäure:
  - [ $^{13}\text{C}_2$ ]Kaffeensäure (43,7 mg, 0,24 mmol) in einem Zweihalskolben in  $\text{MeOH}$  (1,5 mL) lösen und ca. 5 mg Palladium (10 %) auf Aktivkohle zugeben.
- Für [ $^{13}\text{C}_2$ ]4-Hydroxyphenylpropionsäure:
  - [ $^{13}\text{C}_2$ ]p-CS (31 mg, 0,19 mmol) in einem Zweihalskolben in  $\text{MeOH}$  (1,5 mL) lösen und ca. 5 mg Palladium (10 %) auf Aktivkohle zugeben.
- Für [ $^{13}\text{C}_2$ ]3-Hydroxyphenylpropionsäure:
  - [ $^{13}\text{C}_2$ ]3-Hydroxyzimtsäure (40,2 mg, 0,24 mmol) in einem Zweihalskolben in  $\text{MeOH}$  (1,5 mL) lösen und ca. 5 mg Palladium (10 %) auf Aktivkohle zugeben.

- Für [ $^{13}\text{C}_2$ ]Phenylpropionsäure:
  - [ $^{13}\text{C}_2$ ]Zimtsäure (22,4 mg, 0,15 mmol) in einem Zweihalskolben in MeOH (1,5 mL) lösen und ca. 5 mg Palladium (10 %) auf Aktivkohle zugeben.
- Einen mit  $\text{H}_2$  gefüllten Ballon an den Zweihalskolben anbringen und die Luft mit  $\text{H}_2$  verdrängen. 16 h bei Raumtemperatur rühren.
- Den Katalysator durch Zentrifugieren entfernen, das Lösungsmittel trocknen.

### 8.1.3 [3,5- $\text{D}_2$ ]4-Hydroxybenzoesäure und [2,4,6- $\text{D}_3$ ]3-Hydroxybenzoesäure

- Für [ $\text{D}_2$ ]4-Hydroxybenzoesäure:
  - 4-Hydroxybenzoesäure (100 mg, 0,73 mmol) mit  $\text{D}_2\text{O}$  (745  $\mu\text{L}$ ) und  $\text{DCl}$  (124  $\mu\text{L}$ , 35 Gew %) in ein druckstabiles 1,5 mL-Glasgefäß geben.
- Für [ $\text{D}_3$ ]3-Hydroxybenzoesäure:
  - 3-Hydroxybenzoesäure (100 mg, 0,73 mmol) mit  $\text{D}_2\text{O}$  (745  $\mu\text{L}$ ) und  $\text{DCl}$  (124  $\mu\text{L}$ , 35 Gew %) in ein druckstabiles 1,5 mL-Glasgefäß geben.
- Die Lösungen bei 100 °C für 48 h rühren.
- Die Lösungen auf 0 °C abkühlen und die Kristalle durch Zentrifugieren isolieren und mit kaltem Wasser waschen und gefriertrocknen.
- Für eine quantitative Umsetzung den Austausch ein- bis zweimal wiederholen.

### 8.1.4 [7,7- $\text{D}_2$ ]Phenyllessigsäure

- Phenyllessigsäure (400 mg, 2,34 mmol),  $\text{D}_2\text{O}$  (884  $\mu\text{L}$ ) und  $\text{NaOD}$  (294  $\mu\text{L}$ , 40 Gew %) in ein druckstabiles 1,5 mL-Glasgefäß geben.
- Die Suspension mit  $\text{N}_2$  bedecken, dann über Nacht bei 100 °C rühren.
- Die Lösung auf Raumtemperatur abkühlen, mit konz.  $\text{HCl}$  (130  $\mu\text{L}$ ) ansäuern, mit Ethylacetat extrahieren und trocknen.
- Für eine quantitative Umsetzung den Austausch zweimal wiederholen.

### 8.1.5 [ $^{13}\text{C}_2$ ]Hippursäure

- [ $^{13}\text{C}_2$ ]Glycin (100 mg, 1,27 mmol) in Natronlauge (2 mL, 2 M) lösen.
- Die Lösung auf 0 °C abkühlen und unter Rühren Benzoylchlorid (186  $\mu\text{L}$ , 1,62 mmol) tropfenweise zugeben.
- Nach 2 h Reaktionszeit bei 0 °C die Lösung mit konz.  $\text{HCl}$  auf pH 1 ansäuern und die Kristalle im Vakuum abfiltrieren.
- Zu den getrockneten Kristallen Toluol (20 mL) geben, worin sich das Nebenprodukt Benzoesäure löst.
- Die Suspension vakuumfiltrieren und die gewonnenen Kristalle in  $\text{H}_2\text{O}$  umkristallisieren.

### 8.1.6 3-Hydroxyhippursäure und [ $^{13}\text{C}_2$ ]3-Hydroxyhippursäure

- 3-Hydroxybenzoesäure (100 mg, 0,73 mmol), *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) (1 mL, 0,96 g, 3,73 mmol) und Triethylamin (100  $\mu\text{L}$ , 73 mg, 0,72 mmol) in ein 1,5 mL-Glasgefäß geben.
- Die Lösung bei 60 °C für 16 h reagieren lassen.
- Das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernen und den Rückstand anschließend gefriertrocknen.
- Aceton (500  $\mu\text{L}$ ) zum öligen Rückstand geben und die Lösung auf 0 °C abkühlen.
- Thionylchlorid (52,6  $\mu\text{L}$ , 86,3 mg, 0,73 mmol) langsam zutropfen und das Gemisch für 2 h rühren.

- Das Lösungsmittel unter N<sub>2</sub> entfernen und den Rückstand in Toluol (400 µL) mit Ultraschall suspendieren.
- Für 3-Hydroxyhippursäure:
  - Die Suspension tropfenweise bei 0 °C zu einer Glycin-Lösung (54,4 mg, 0,73 mmol) in NaOH (500 µL, 2 M) geben.
- Für [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]3-Hydroxyhippursäure:
  - Die Suspension tropfenweise bei 0 °C zu einer [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Glycin-Lösung (55,8 mg, 0,73 mmol) in NaOH (500 µL, 2 M) geben.
- Das Gemisch für 1 h bei 0 °C und für weitere 4 h bei Raumtemperatur rühren.
- Das organische Phase unter N<sub>2</sub> entfernen, die wässrige Phase mit konz. HCl auf pH 1 ansäuern und mit Ethylacetat extrahieren.
- Das Lösungsmittel entfernen und den Rückstand in Essigsäure:H<sub>2</sub>O:ACN (3:1:1, 2,5 mL) bei 60 °C für 16 h rühren.
- Das Lösungsmittel entfernen, den Rückstand in ACN:H<sub>2</sub>O (1:1) lösen und mittels präparativer HPLC aufreinigen.
- C18-Säule (Luna, 250 x 15 mm, 5 µm, 100 Å), Fließmittel A: ACN, Fließmittel B: H<sub>2</sub>O mit 0,1 % Ameisensäure, Flussrate: 8 mL/min, UV-Detektor: 288 nm, Gradient: 10 % A auf 20 % A in 15 min.

## 8.2 BESTIMMUNG VON FERULASÄURE UND FERULASÄURE-METABOLITEN IN MILCH

### 8.2.1 Probenvorbereitung nach QuEChERS

- Die Milchprobe gut schütteln und 15 g in ein 50 mL-Zentrifugenröhrchen einwiegen.
- Interne Standardsubstanzen (gelöst in 100 µL MeOH:H<sub>2</sub>O, 1:1) zugeben und 20 min equilibrieren lassen.
- Für freie und konjugierte Analyten:
  - HCl (600 µL, 1 M) zugeben und schütteln, dann Sulfatase (aus *Helix Pomatia*, Typ H-1, 100 U) gelöst in Acetatpuffer (500 µL, pH 4,9) zugeben und schütteln.
  - Bei 38 °C für 18 h inkubieren, dann HCl (2,1 mL, 1 M) zugeben und schütteln.
- Für freie Analyten:
  - HCl (2,7 mL, 1 M) zugeben und schütteln.
- ACN (10 mL) zugeben und schütteln.
- MgSO<sub>4</sub> (7,5 g) und NaCl (2 g) zugeben und 3 x 30 s vortexen.
- Die Probe zentrifugieren (5 min, 4000 rcf).
- Die organische Phase (ca. 8 mL) in ein 15 mL-Zentrifugenröhrchen pipettieren.
- MgSO<sub>4</sub> (2 g) zugeben und 3 x 30 s vortexen.
- Die Probe zentrifugieren (5 min, 4000 rcf).
- Die organische Phase (ca. 5 mL) in ein 15 mL-Zentrifugenröhrchen pipettieren.
- Das Lösungsmittel im Evaporator bei 45 °C in ca. 3,5 h entfernen.
- MeOH:H<sub>2</sub>O:HCl (250:50:1, 301 µL) zugeben und 5 min sonifizieren.
- Die Lösung zentrifugieren (2 min, 4000 rcf) und die obere Phase unverdünnt und als 1/100-Verdünnung für die LC-MS/MS-Messung verwenden

### 8.2.2 LC-MS/MS-Messung

- Anlage: LC-MS (Kapitel 7.3).
- Säule: Phenyl-Hexyl (Phenomenex, Kinetex, 150 x 4,6 mm, 2,6  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ ).
- Fließmittel A: Wasser mit 0,01 % Ameisensäure, Fließmittel B: MeOH mit 0,01 % Ameisensäure, Fließmittel C: ACN mit 0,01 % Ameisensäure.
- Ofentemperatur: 24 °C.
- Flussrate: 0,5 mL/min.
- Gradient: 95 % A, 5 % B auf 83 % A, 17 % B in 10 min, 10 min halten, auf 87 % A, 13 % C in 1 min, 12 min halten, auf 75 % A, 25 % B in 1 min, 12 min halten, auf 100 % B in 10 min. Spül- und Equilibrier-Schritte.
- Injektionsvolumen: 20  $\mu\text{L}$ .
- MS-Parameter: Tabelle 3 und 12.

**Tabelle 12:** Parameter der massenspektrometrischen Detektion zur Bestimmung von Ferulasäure und Ferulasäure-Metaboliten

Electrospray + Source		Analyser	
Capillary	3,4 kV	LM Resolution 1	15
Cone	variabel	HM Resolution 1	15
Extractor	3 V	Ion Energy 1	0,8
RF Lens	0,1 V	Entrance	-1
Source Temp.	120 °C	Collision	variabel
Desolvation Temp.	350 °C	Exit	1
Gas Flow Desolvation	750 L/h	LM Resolution 2	15
Gas Flow Cone	50 L/h	HM Resolution 2	15
		Ion Energy 2	1
Collision Gas Pirani	$6 \cdot 10^{-3}$ mbar	Multiplier	650

## 8.3 SYNTHESEN VON OLIGO FERULASÄUREN

### 8.3.1 Synthese von [9- $^{13}\text{C}$ ]Ferulasäure

#### Vanillinacetat

- Vanillin (3 g, 19,74 mmol) und Pyridin (5 mL) in einen 50 mL-Rundkolben geben.
- Abkühlen auf 0 °C und unter Rühren Essigsäureanhydrid (20 mL) zutropfen.
- Langsam auf Raumtemperatur erwärmen und 6 h rühren.
- Lösung in vier Pyrexgläser aufteilen und jeweils 10 mL  $\text{CHCl}_3$  zugeben.
- Mit  $\text{H}_2\text{O}$  (4 x 5 mL) waschen, Lösungsmittel unter  $\text{N}_2$  abblasen und gefriertrocknen.
- Zurück bleiben 3,75 g Vanillinacetat (19,33 mmol, 98 % Ausbeute).

#### [9- $^{13}\text{C}$ ]Ferulasäure

- In drei Ansätzen jeweils NaH (60 % Dispersion in Öl, 190 mg, 4,75 mmol) in THF (20 mL, wasserfrei) lösen und auf -20 °C abkühlen.
- Unter Rühren [1- $^{13}\text{C}$ ]Triethylphosphonoacetat (1 g, 885  $\mu\text{L}$ , 4,46 mmol) langsam zutropfen, wodurch eine gelb-weiße Trübung entsteht.
- Langsam auf Raumtemperatur erwärmen lassen, wodurch die Lösung gelb und klar wird und weitere 30 min bei Raumtemperatur rühren.

- Lösung auf  $-20^{\circ}\text{C}$  abkühlen und Vanillinacetat (970 mg, 5 mmol, gelöst in 2 mL THF) langsam zutropfen.
- Lösung langsam auf Raumtemperatur erwärmen und weitere 2 h rühren.
- Lösungsmittel mittels Rotationsverdampfer entfernen, NaOH-Lösung (30 mL, 2 M) zugeben und bei  $50^{\circ}\text{C}$  über Nacht rühren.
- Lösung in vier Pyrexgläser aufteilen, mit Ethylacetat (3 x 10 mL) extrahieren und Lösungsmittel entfernen. Zurück bleiben 0,89 g, 1,16 g und 1,16 g Rohprodukt.
- Die drei Ansätze in jeweils 4 mL Ethylacetat lösen und mit  $\text{NaHCO}_3$  (3 x 3 mL, 5% wässrige Lösung) extrahieren.
- Die Extrakte mit Ethylacetat (3 x 3 mL) waschen, die Ethylacetat-Fraktion verwerfen.
- Die wässrige Fraktion vorsichtig mit konz. HCl auf pH 1 ansäuern, zwischendurch vorsichtig sonifizieren.
- Die Lösung mit Ethylacetat (3 x 4 mL) extrahieren und das Lösungsmittel trocknen.
- Zurück bleiben 2,42 g  $[\text{9-}^{13}\text{C}]\text{FS}$  (11,43 mmol, 85,4% Ausbeute).

### 8.3.2 Synthese von Ethylferulat und $[\text{9-}^{13}\text{C}]\text{Ethylferulat}$

- Für Ethylferulat:
  - FS (2 g, 10,3 mmol) in Ethanol (20 mL) lösen, unter Rühren Acetylchlorid (12,5 mL, 2,75 g, 35 mmol) zutropfen und Lösung über Nacht bei Raumtemperatur rühren lassen.
- Für  $[\text{13C}]\text{Ethylferulat}$ :
  - $[\text{13C}]\text{FS}$  (2 g, 8,97 mmol) in Ethanol (20 mL) lösen, unter Rühren Acetylchlorid (1 mL, 1,1 g, 14,1 mmol) zutropfen und Lösung über Nacht bei Raumtemperatur rühren lassen.
- Lösungsmittel mittels Rotationsverdampfer entfernen und mehrmals mit Ethanol (3 x 10 mL) spülen, um HCl auszutreiben.
- Zur quantitativen Umsetzung die Reaktion ein- bis zweimal wiederholen.
- Für Ethylferulat:
  - Zurück bleiben 2,23 g Ethylferulat (10 mmol, 97% Ausbeute) als dunkelbraunes Öl, das über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  oder durch Zugabe eines Ethylferulat-Kristalls auskristallisiert werden kann.
- Für  $[\text{13C}]\text{Ethylferulat}$ :
  - Zurück bleiben 2,18 g  $[\text{13C}]\text{Ethylferulat}$  (9,8 mmol, 86% Ausbeute) als dunkelbraunes Öl.

### 8.3.3 Synthese von 5-5-Dehydrodiferulasäure und $[\text{13C}_2]\text{5-5-Dehydrodiferulasäure}$

- Vanillin (500 mg, 3,29 mmol) in Citratpuffer (75 mL, 0,1 M, pH 4,25) lösen und auf  $37^{\circ}\text{C}$  erwärmen.
- Wasserstoffperoxid (30%, 200  $\mu\text{L}$ ) zugeben.
- Meerrettichperoxidase Typ I (1,8 mg) in 1 mL Citratpuffer (30 mL, 0,1 M, pH 4,25) lösen und zum Reaktionsansatz geben.
- Nach 1 h Reaktionszeit bei  $37^{\circ}\text{C}$  unter Rühren den Niederschlag (5-5-Dehydrodivanillin) unter Vakuum filtrieren und trocknen.
- Für 5-5-DFS:
  - 5-5-Dehydrodivanillin (100 mg, 0,33 mmol) und Malonsäure (150 mg, 1,44 mmol) in ein 1,5 mL Braunglas geben. Pyridin (200  $\mu\text{L}$ ) und Anilin (10  $\mu\text{L}$ ) zugeben, mit  $\text{N}_2$  bedecken und bei Raumtemperatur für 14 Tage rühren.
- Für  $[\text{13C}_2]\text{5-5-DFS}$ :
  -

– 5-5-Dehydrodivanillin (76,6 mg, 0,25 mmol) und Malonsäure (107,2 mg, 1,01 mmol) in ein 1,5 mL-Braunglas geben. Pyridin (400  $\mu$ L) und Anilin (20  $\mu$ L) zugeben, mit  $N_2$  bedecken und bei Raumtemperatur für 14 Tage rühren.

- Die Lösung in ein größeres Gefäß überführen und mit 2 mL  $H_2O$  und 1 mL konz. HCl ansäuern.
- Mehrmals mit Ethylacetat extrahieren und Lösungsmittel entfernen.
- Rückstand in Ethanol unter Erwärmen lösen und mittels präparativer HPLC aufreinigen.
- C18-Säule (250  $\times$  15 mm, 5  $\mu$ m, 100  $\text{Å}$ ), Fließmittel A: ACN:1 mM TFA (9:1), Fließmittel B: 1 mM TFA, Flussrate: 8 mL/min, UV-Detektor: 320 nm, Gradient: 20 % A auf 52 % A in 19 min. 5-5-DFS (61,4 mg, 0,16 mmol) bzw. [ $^{13}C_2$ ]5-5-DFS (29 mg, 0,075 mmol) eluiert nach ca. 16–17 min.

### 8.3.4 Synthese der internen Standardsubstanz 5-5(methyl)-Dehydrodiferulasäure

Nach Zeller und Schatz (2015)

- Die Synthese von 5-5-Dehydrodivanillin wie in Kapitel ?? beschrieben in 5-fachem Ansatz durchführen.
- 5-5-Dehydrodivanillin (ca. 2,5 g, 8,3 mmol) mit 95 mL THF und KOH (0,55 g, 9,8 mmol) in einen 250 mL-Rundkolben geben.
- Unter Rückfluss zum Sieden erhitzen, 5-5-Dehydrodivanillin muss vollständig gelöst sein.
- $ICH_3$  (1,5 mL, 10,7 mmol) in 5 mL THF lösen und tropfenweise zugeben.
- Für ca. 91 h unter Rückfluss rühren.
- Das Reaktionsgemisch auf 400 g Eis + 5 mL konz. HCl geben, warten bis das Eis geschmolzen ist.
- Den Rückstand im Vakuum abfiltrieren, Eluat verwerfen.
- Den Rückstand für 8 h mittels Soxhlet mit  $CHCl_3$  extrahieren. Der Rückstand (5-5-Dehydrodivanillin) kann erneut mit  $ICH_3$  umgesetzt werden.
- Den Extrakt trocknen, bei Bedarf mit Aceton umkristallisieren.
- Das 5-5(me)-Dehydrodivanillin-Rohprodukt (ca. 100 mg) in einem 4,5 mL-Schraubdeckelgläschen mit Malonsäure (200 mg), 800  $\mu$ L Pyridin und 16  $\mu$ L Anilin versetzen und bei Raumtemperatur für 13 Tage rühren.
- Die Lösung in ein größeres Gefäß überführen und mit 4 mL  $H_2O$  und 2 mL konz. HCl ansäuern.
- Mehrmals mit Ethylacetat extrahieren und Lösungsmittel entfernen.
- Den Rückstand in THF: $H_2O$  unter Erwärmen lösen und mittels präparativer HPLC aufreinigen.
- C18-Säule (250  $\times$  15 mm, 5  $\mu$ m, 100  $\text{Å}$ ), Fließmittel A: MeOH, Fließmittel B: 0,1 % Ameisensäure, Flussrate: 8 mL/min, UV-Detektor: 320 nm, Gradient: 40 % A auf 60 % A in 28 min. 5-5(me)-DFS (63,3 mg) eluiert nach 24–25 min.

### 8.3.5 Synthese von 4-O-5-Dehydrodiferulasäure und [ $^{13}C_2$ ]4-O-5-Dehydrodiferulasäure

- In sechs 8 mL-Braungläsern je 154 mg Vanillylalkohol (1 mmol) mit Aceton (5 mL) lösen und  $Ag_2O$  (347 mg, 1,5 mmol) zugeben.
- Reaktion unter Rühren bei Raumtemperatur nach 45 min durch Vakuumfiltration über Celite stoppen.
- Lösung einengen und Rückstand in 2 mL Ethylacetat lösen.
- Fraktionierung mittels Flash-Chromatographie.
- Säule: Einwegkartusche Si60 (30 g, 15–40  $\mu$ m), Schleifenvolumen: 2,5 mL, Fließmittel A: Petrolether, Fließmittel B: Ethylacetat, Druck: 1 bar, Flussrate: ca. 70 mL/min, Gradient: 20 % B auf 50 % B innerhalb von 864 mL, 48 Gläschen mit je 18 mL.

- Fraktion 1: Vanillin, Fraktion 2: hauptsächlich 4-O-5-Dehydrodivanillin, wenig 5-5-Dehydrodivanillin, Vanillin und Trimere, Fraktion 3: hauptsächlich Vanillylalkohol-Vanillin-Dimer, wenig 5-5-Dehydrodivanillin, 4-O-5-Dehydrodivanillin und Trimere, Fraktion 4: Trimere.
- Fraktion 2 und 3 trocknen, in ACN lösen und mittels präparativer HPLC aufreinigen.
- C18-Säule (250 × 15 mm, 5 µm, 100 Å), Fließmittel A: ACN, Fließmittel B: H<sub>2</sub>O, Flussrate: 8 mL/min, UV-Detektor: 300 nm, Gradient: 25 % A auf 60 % A in 24 min, 4-O-5-Dehydrodivanillin (45,5 mg, ölig) eluiert nach ca. 19 min, Vanillylalkohol-Vanillin-Dimer (37 mg, ölig) eluiert nach 13 min.
- Vanillylalkohol-Vanillin-Dimer (37 mg, 0,12 mmol) und 2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon (27,7 mg, 0,12 mmol) in 2 mL THF lösen und mit N<sub>2</sub> bedeckt bei Raumtemperatur über Nacht rühren.
- Reaktionsprodukte trocknen, in MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1) lösen und mittels präparativer HPLC wie oben beschrieben aufreinigen.
- Für 4-O-5-DFS:
  - 4-O-5-Dehydrodivanillin (50 mg, 0,17 mmol), Malonsäure (68,9 mg, 0,66 mmol), Pyridin (200 µL) und Anilin (10 µL) in ein 1,5 mL-Braunglas geben, mit N<sub>2</sub> bedecken und bei Raumtemperatur für 34 Tage rühren.
- Für [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]4-O-5-DFS:
  - 4-O-5-Dehydrodivanillin (23,3 mg, 0,08 mmol), [1,3-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Malonsäure (32,7 mg, 0,31 mmol), Pyridin (200 µL) und Anilin (10 µL) in ein 1,5 mL-Braunglas geben, mit N<sub>2</sub> bedecken und bei Raumtemperatur für 34 Tage rühren.
- Die Rohprodukte in ein größeres Gefäß überführen und mit 1 mL H<sub>2</sub>O und 0,5 mL konz. HCl ansäuern.
- Mehrmals mit Ethylacetat extrahieren und Lösungsmittel trocknen.
- Rückstand in MeOH:H<sub>2</sub>O lösen und mittels präparativer HPLC aufreinigen.
- C18-Säule (250 × 15 mm, 5 µm, 100 Å), Fließmittel A: ACN:MeOH (9:1) mit 0,01 % Ameisensäure, Fließmittel B: H<sub>2</sub>O mit 0,01 % Ameisensäure, Flussrate: 8 mL/min, UV-Detektor: 320 nm, Gradient: 35 % A auf 41 % A in 12 min. 4-O-5-DFS (9,9 mg) bzw. [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]4-O-5-DFS (7,1 mg) eluiert nach ca. 11–12 min.

### 8.3.6 Synthese von Dehydridi-, -tri- und -tetraferulasäuren mittels Cu[Tetraethylethylendiamin]-Komplex

- In einen 200 mL-Zweihalskolben ACN (60 mL), CuCl (40 mg, 0,4 mmol) und TEMED (60 µL, 46,2 mg, 0,4 mmol) geben und 5 min bei Raumtemperatur rühren lassen.
- Ethylferulat (888 mg, 4 mmol, Kapitel 8.3.2) zugeben und einen mit Carbogen gefüllten Ballon am Zweihalskolben befestigen, mit dem eine Sauerstoffatmosphäre erzeugt wird.
- Bei Raumtemperatur für 4 h rühren.
- Die Reaktion durch Zugabe von Salzsäure (24 mL, 1 M) stoppen.
- Den Anteil an organischem Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernen, die wässrige Lösung in vier Pyrexgläser aufteilen, mit Ethylacetat (3 × 10 mL) extrahieren.
- Die Ethylacetat-Fraktion mit saurer NH<sub>4</sub>Cl-Lösung (0,5 mL 1 M HCl + 5 mL gesättigte NH<sub>4</sub>Cl-Lösung) waschen.
- Wasser mit MgSO<sub>4</sub> aus der organischen Fraktion entfernen und das Lösungsmittel auf 2 mL einengen.
- Petrolether (0,5 mL) zugeben und mit Wärme im Ultraschallbad lösen.
- Fraktionierung mittels Flash-Chromatographie.
- Säule: Einwegkartusche Si60 (30 g, 15–40 µm), Schleifenvolumen: 2,5 mL, Fließmittel A: Petrolether, Fließmittel B: Ethylacetat, Druck: 1 bar, Flussrate: ca. 70 mL/min, Gradient: 30 % B auf 60 % B innerhalb von 1065 mL. Die ersten 201 mL gemeinsam auffangen, dann 48 Gläschen mit je 18 mL sammeln und anschließend mit 100 % Ethylacetat (400 mL) die letzte Fraktion eluieren.
- Fraktion 1: Ethylferulat, Fraktion 2: Ester von 8-5(c)-DFS und 8-O-4-DFS, Fraktion 3: Ester von 8-8(c)-DFS, 8-8(nc)-DFS, 8-O-4/8-5(c)-TriFS, 8-O-4/8-O-4-TriFS und weitere, Fraktion 4: komplexes Gemisch aus 5-5-DFS, 8-8(c)-DFS, 8-8(nc), 5-5/8-O-4-TriFS, weitere TriFS und TetraFS.

- Aufreinigung von Fraktion 2 :
  - mehrmals in wenig Ethylacetat:Petrolether (1:2, v/v) umkristallisieren, wobei der 8-5(c)-DFS-Ethylester ausfällt und 8-O-4-DFS-Ethylester (verunreinigt mit 8-5(c)-DFS-Ethylester) in Lösung bleibt.
  - Lösungsmittel von beiden Unterfraktionen entfernen und mit NaOH (20 mL, 2 M) bei Raumtemperatur über Nacht verseifen.
  - Die Unterfraktionen mit konz. HCl auf pH 1 bringen, dann mit Ethylacetat (3 x 5 mL) extrahieren und das Lösungsmittel trocknen.
  - Die verseiften Produkte in wenig THF:H<sub>2</sub>O (1:1) lösen und mittels präparativer HPLC aufreinigen.
  - C18-Säule (250 x 15 mm, 5 µm, 100 Å), Fließmittel A: ACN:MeOH (9:1) mit 0,01 % Ameisensäure, Fließmittel B: H<sub>2</sub>O mit 0,01 % Ameisensäure, Flussrate: 8 mL/min, UV-Detektor: 320 nm, Gradient: 20 % A auf 37 % A in 17 min, 5 min halten, auf 45 % A in 8 min, auf 55 % A in 5 min. 8-5(nc)-DFS eluiert nach ca. 16 min, 8-O-4-DFS eluiert nach ca. 22 min, 8-5(c)-DFS eluiert nach ca. 23 min, 8-5(dc)-DFS eluiert nach ca. 33 min.
  - Das Lösungsmittel von 8-5(c)-DFS immer sofort nach dem Auffangen evaporieren, da die Säure zu Ringöffnung führen kann.
- Aufreinigung von Fraktion 3:
  - Lösungsmittel entfernen und mit NaOH (20 mL, 2 M) bei Raumtemperatur über Nacht verseifen.
  - Mit konz. HCl auf pH 1 bringen, dann mit Ethylacetat (3 x 5 mL) extrahieren und das Lösungsmittel trocknen.
  - Die verseiften Produkte in wenig THF:H<sub>2</sub>O (1:1) lösen und mittels präparativer HPLC aufreinigen.
  - C18-Säule (250 x 15 mm, 5 µm, 100 Å), Fließmittel A: ACN:MeOH (9:1) mit 0,01 % Ameisensäure, Fließmittel B: H<sub>2</sub>O mit 0,01 % Ameisensäure, Flussrate: 8 mL/min, UV-Detektor: 320 nm, Gradient: 15 % A auf 27,5 % A in 25 min, auf 45 % A in 20 min. 8-8(c)-DFS coeluiert mit FS nach 24 min, 8-8(nc)-DFS eluiert nach 26 min, 8-O-4/8-5(nc)-TriFS eluiert nach 33 min, 8-O-4/8-O-4-TriFS eluiert nach 45 min, 8-O-4/8-5(c) eluiert nach 45,5 min.
  - 8-8(c)-DFS mittels präparativer HPLC aufreinigen.
  - C18-Säule (250 x 15 mm, 5 µm, 100 Å), Fließmittel A: MeOH mit 0,01 % Ameisensäure, Fließmittel B: H<sub>2</sub>O mit 0,01 % Ameisensäure, Flussrate: 8 mL/min, UV-Detektor: 320 nm, Gradient: 25 % A auf 50 % A in 20 min. 8-8(c)-DFS eluiert nach 18 min, FS eluiert nach 21 min.
- Aufreinigung von Fraktion 4 nach Bunzel et al. (2004):
  - Die Säule (Kapitel 7.3) mit MeOH:0,5 mM TFA (5:95) äquilibrieren. Darauf achten, dass etwa 1 cm Platz zwischen Stempel und Säulenmaterial ist.
  - Fraktion 4 in MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1, 10 mL) lösen, auf die Säule geben und in 3 Schritten eluieren.
  - Schritt 1: Fließmittel: MeOH:0,5 mM TFA (5:95), Flussrate: 1,5 mL/min, Laufzeit: 73 h, UV-Detektor: 320 nm.
  - Schritt 2: Fließmittel: MeOH:0,5 mM TFA (50:50), Flussrate: 1,0 mL/min, Laufzeit: 53 h, UV-Detektor: 360 nm.
  - Schritt 3: Fließmittel: MeOH:0,5 mM TFA (60:40), Flussrate: 1,0 mL/min, Laufzeit: 64 h (eventuell länger), UV-Detektor: 360 nm.
  - Fraktionen mittels präparativer HPLC aufreinigen.

#### *LC-MS-Methode zum qualitativen Nachweis von Dehydrotri- und Tetraferulasäuren*

- Anlage: LC-DAD-MS (Kapitel 7.3); Injektionsvolumen: 20 µL, Ofentemperatur: 22 °C
- Phenyl-Hexyl-Säule (150 x 4,6 mm, 2,6 µm, 100 Å), Fließmittel A: H<sub>2</sub>O mit 0,01 % Ameisensäure, Fließmittel B: MeOH mit 0,1 % Ameisensäure, Flussrate: 0,5 mL/min, Gradient: 30 % B auf 80 % B in 59 min.

### 8.3.7 Enzymatische Synthese von 8-8(Tetrahydrofuran)-Dehydrodiferulasäuren und weiteren Ferulasäure-Dimeren

- Ethylferulat (4 x 250 mg, 4,5 mmol, Kapitel 8.3.2) in vier 250 mL-Erlenmeyerkolben geben.
- Phosphatpuffer (4 x 250 mL, 0,1 M, pH 2,5) in die Erlenmeyerkolben geben und unter kräftigem Rühren auf 60 °C erwärmen.
- Die Lösungen auf 38 °C abkühlen lassen, dann Meerrettichperoxidase (Typ II, gelöst in H<sub>2</sub>O, 9 x 125 µL, 16,7 mg/mL) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 x 25 µL, 30 %, insgesamt 4,9 mmol) portionsweise über einen Zeitraum von 4 h zugeben.
- Die Ansätze vereinen und am Rotationsverdampfer auf ca. 100 mL einengen.
- Mit Ethylacetat (3 x 50 mL) extrahieren und das Lösungsmittel auf ca. 1,5 mL einengen.
- Fraktionierung mittels Flash-Chromatographie.
- Säule: Einwegkartusche Si60 (30 g, 15–40 µm), Schleifenvolumen: 2,5 mL, Fließmittel A: Petrolether, Fließmittel B: Ethylacetat, Druck: 1 bar, Flussrate: ca. 70 mL/min, Gradient: 30 % B auf 60 % B innerhalb von 1065 mL, die ersten 201 mL verworfen, dann 48 Gläschen mit je 18 mL.
- Fraktion 1: Ethylferulat, Fraktion 2: Ester von 8-5(c)-DFS und 8-O-4-DFS, Fraktion 3: Ester von 8-8(c)-DFS, 8-8(nc)-DFS, 8-8(THF)-DFS.
- Aufreinigung von Fraktion 2 wie in Kapitel 8.3.6 beschrieben.
- Aufreinigung von Fraktion 3:
  - Lösungsmittel entfernen und mit NaOH (50 mL, 2 M) bei Raumtemperatur über Nacht verseifen.
  - Mit konz. HCl auf pH 1 bringen, dann mit Ethylacetat (3 x 20 mL) extrahieren und das Lösungsmittel entfernen.
  - Die verseiften Produkte in wenig THF:H<sub>2</sub>O (1:1) lösen und mittels präparativer HPLC aufreinigen.
  - C18-Säule (250 x 15 mm, 5 µm, 100 Å), Fließmittel A: MeOH mit 0,01 % Ameisensäure, Fließmittel B: H<sub>2</sub>O mit 0,01 % Ameisensäure, Flussrate: 8 mL/min, UV-Detektor: 280 nm, Gradient: 30 % A auf 43 % A in 30 min. *trans-trans-trans*-8-8(THF)-DFS eluiert nach 21 min, *trans-cis-trans*-8-8(THF)-DFS eluiert nach 23–24 min, *cis-trans-trans*-8-8(THF)-DFS eluiert nach 29 min, 8-8(c)-DFS eluiert im Spülschritt.
  - *trans-cis-trans*-8-8(THF)DFS in wenig THF:H<sub>2</sub>O (1:1) lösen und mittels semipräparativer HPLC (Knauer) aufreinigen.
  - C18-Säule (Kinetex, 150 x 4,6 mm, 2,6 µm, 100 Å), Fließmittel A: H<sub>2</sub>O mit 0,1% Ameisensäure, Fließmittel B: MeOH, Flussrate: 0,7 mL/min, UV-Detektor: 280 nm, Ofentemperatur: 23 °C, Gradient: 20 % B auf 37 % B in 29 min. *trans-cis-trans*-8-8(THF)-DFS eluiert nach 27 min.

#### GC-MS-Methode zur qualitativen Untersuchung der Reaktionsprodukte

- Probe trocknen und in 100 µL BSTFA:Pyridin (3:2) lösen.
- Mindestens 30 min bei 60 °C derivatisieren.
- Anlage: GC-MS (Kapitel 7.3); Injektionsvolumen: 1 µL; Port Temperatur: 300 °C; Splitrate: 10:1; Temperaturgradient: 150 °C, 1 min halten, mit 3 °C/min auf 250 °C, mit 30 °C/min auf 300 °C, 25 min halten, Gas: Helium (40 cm/s), Interface Temperatur: 300 °C, Ionenquellentemperatur 300 °C; Ionisierungsenergie: 70 eV, TIC: *m/z* 180–700; Scan Zeit: 0,3 s.

#### LC-MS-Methode zum qualitativen Nachweis von 8-8(THF)-DFS in Pflanzenproben

- Anlage: LC-DAD-MS (Kapitel 7.3); Injektionsvolumen: 20 µL
- C18-Säule (150 x 4,6 mm, 2,6 µm, 100 Å), Fließmittel A: H<sub>2</sub>O mit 0,01 % Ameisensäure, Fließmittel B: MeOH mit 0,1 % Ameisensäure, Flussrate: 0,5 mL/min, Gradient: 20 % B auf 40 % B in 29 min. *Trans-trans-trans*-8-8(THF)-DFS eluiert nach 24 min, *trans-cis-trans*-8-8(THF)-DFS eluiert nach 26,4 min, *cis-trans-trans*-8-8(THF)-DFS eluiert nach 30,2 min.

### 8.3.8 Synthese von Ferulasäure-Derivaten zur Photodimerisierung

#### *o*- und *p*-Nitrophenyl-FS

Durchgeführt von Hau (2016) nach Hegde et al. (2009).

- *p*-Nitrophenol bzw. *o*-Nitrophenol (160 mg) in 2 mL Dioxan lösen.
- Tropfenweise FS (230 mg, gelöst in 2 mL Dioxan) zugeben.
- Pyridin (200  $\mu$ L) und Triethylamin (200  $\mu$ L) zugeben und 10 min rühren.
- Dicyclohexylcarbodiimid (236 mg) zugeben und unter Stickstoffatmosphäre bei Raumtemperatur über Nacht rühren.
- Reaktionsgemisch filtrieren und das Filtrat mittels präparativer HPLC aufreinigen:
- C18-Säule (250 x 15 mm, 5  $\mu$ m, 100 Å), Fließmittel A: ACN mit 0,1 % Ameisensäure, Fließmittel B: H<sub>2</sub>O mit 0,1 % Ameisensäure, Flussrate: 8 mL/min, UV-Detektor: 320 nm, Gradient: 50 % A auf 65 % A in 15 min.

#### FS-Tosylat und FS-Ethylestertosylat

Durchgeführt von Hau (2016) nach Purushotham Reddy et al. (2014).

- Etwa 100 mg FS bzw. FS-Ethylester (Kapitel 8.3.2) in 1,1 mL Dichlormethan lösen und auf 0 °C abkühlen.
- Triethylamin (67  $\mu$ L, 49 mg) und Toluolsulfonsäurechlorid (85 mg) zugeben.
- Für 2 h bei Raumtemperatur rühren.
- Mit Salzsäure (444  $\mu$ L, 1 M) waschen.
- Sukzessive mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung, NaCl-Lösung und H<sub>2</sub>O waschen.
- Die Lösung unter N<sub>2</sub> trocknen.
- Den Rückstand in THF:H<sub>2</sub>O (1:1) lösen und mittels präparativer HPLC aufreinigen:
- C18-Säule (250 x 15 mm, 5  $\mu$ m, 100 Å), Fließmittel A: ACN mit 0,1 % Ameisensäure, Fließmittel B: H<sub>2</sub>O mit 0,1 % Ameisensäure, Flussrate: 8 mL/min, UV-Detektor: 320 nm, Gradient: 30 % A auf 100 % A in 40 min.

#### Bis(trimethylsilyl)-Ferulasäure

Durchgeführt von Hau (2016).

- FS (198,5 mg) mit 550 mL BSTFA versetzen.
- Bei 60 °C für 1 h reagieren lassen.
- Mittels Rotationsverdampfer trocknen, anschließend über Nacht gefriertrocknen.

#### FS-Acetat

Durchgeführt von Hau (2016) nach Yang et al. (2011).

- FS (194 mg, 1 mmol) in Pyridin (0,5 mL) lösen.
- Abkühlen auf 0 °C und unter Rühren Essigsäureanhydrid (1 mL) zutropfen.
- Langsam auf Raumtemperatur erwärmen und 3 h rühren.
- Lösung mit CHCl<sub>3</sub> (3 x 5 mL) extrahieren.
- Den Extrakt mit H<sub>2</sub>O (4 x 5 mL) waschen, das Lösungsmittel unter N<sub>2</sub> entfernen.
- Den Rückstand mittels präparativer HPLC aufreinigen:
- C18-Säule (250 x 15 mm, 5  $\mu$ m, 100 Å), Fließmittel A: ACN mit 0,1 % Ameisensäure, Fließmittel B: H<sub>2</sub>O mit 0,1 % Ameisensäure, Flussrate: 8 mL/min, UV-Detektor: 320 nm, Gradient: 50 % A auf 65 % A in 15 min.

## FS-Ethylester

- in Kapitel 8.3.2 beschrieben.

## Feruloyl- $\beta$ -D-glucose und FS-Amid

Durchgeführt nach Shimotori et al. (2012) und Gokhale (2011).

- FS (1,94 g, 10 mmol) in ACN (25 mL) und Diisopropylethylamin (2,6 mL, 15 mmol) lösen. Molekularsieb (3 Å) zugeben.
- 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosylbromid (4,11 g, 10 mmol) zugeben und 24 h rühren.
- Den Molekularsieb und Lösungsmittel entfernen.
- Den Rückstand in Ethylacetat lösen und mit NaHCO<sub>3</sub> waschen.
- Ethylacetat mittels Rotationsverdampfer entfernen.
- Den öligen Rückstand mit Ethanol (50 mL) und wässriger NH<sub>3</sub>-Lösung (25 %ig, 25 mL) versetzen und für 5 h bei Raumtemperatur rühren.
- Ethanol mittels Rotationsverdampfer entfernen und den Rückstand mit verdünnter Salzsäure (1 M) auf pH < 2 bringen.
- Lösung mit Ethylether waschen, um FS zu entfernen. Zurück bleibt ein Gemisch aus Feruloyl- $\beta$ -D-glucose, FS-Amid und geringen Mengen unbekannter Verbindungen.
- Ein Aliquot davon entnehmen und mittels präparativer HPLC aufreinigen.
- C18-Säule (250 x 10 mm, 5  $\mu$ m, 100 Å), Fließmittel A: MeOH, Fließmittel B: H<sub>2</sub>O, Flussrate: 5 mL/min, UV-Detektor: 320 nm, Gradient: 6 % A auf 35 % A in 20 min. FS-Amid eluiert nach 13–13,4 min, Feruloylglucose eluiert nach 13,4–13,8 min.

### 8.3.9 Photodimerisierung von Ferulasäure

#### Ferulasäure-Cyclobutandimer

- FS (500 mg, 2,58 mmol) in wenig MeOH lösen, in eine Kristallisierschale geben und trocknen, sodass eine dünne Kristallschicht entsteht.
- Mit Licht (Osram 64575 Halogendauerlicht, 1000 W) für 190 h bestrahlen, zwischendurch möglichst oft mit MeOH neu auskristallisieren.
- Das Rohprodukt mittels präparativer HPLC aufreinigen.
- C18-Säule (250 x 15 mm, 5  $\mu$ m, 100 Å), Fließmittel A: MeOH mit 0,01 % Ameisensäure, Fließmittel B: H<sub>2</sub>O mit 0,1 % Ameisensäure, Flussrate: 8 mL/min, UV-Detektor: 280 nm, Gradient: 20 % A auf 45 % A in 30 min. Das FS-CBD mit  $\alpha$ -Truxillsäure-Konfiguration (220,1 mg, 44 % Ausbeute) eluiert nach 25–26 min, FS eluiert nach 29–30 min.

#### [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Ferulasäure-Cyclobutandimer

<sup>13</sup>C<sub>2</sub> FS (150 mg, 0,77 mmol) in wenig MeOH lösen, in eine Kristallisierschale geben und trocknen, sodass eine dünne Kristallschicht entsteht.

- Mit Licht (Osram 64575 Halogendauerlicht, 1000 W) für 120 h bestrahlen, zwischendurch möglichst oft mit MeOH neu auskristallisieren.
- Das Rohprodukt mittels präparativer HPLC aufreinigen.
- C18-Säule (250 x 15 mm, 5  $\mu$ m, 100 Å), Fließmittel A: MeOH mit 0,01 % Ameisensäure, Fließmittel B: H<sub>2</sub>O mit 0,1 % Ameisensäure, Flussrate: 8 mL/min, UV-Detektor: 280 nm, Gradient: 20 % A auf 45 % A in 30 min. Das [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]FS-CBD mit einer Retentionszeit von 27,0 min (GC-MS) und 13,2 min (LC-MS) (8,2 mg, 5 % Ausbeute) eluiert nach 25–26 min, das [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]FS-CBD mit  $\alpha$ -Truxillsäure-Konfiguration (9,6 mg, 6 % Ausbeute) eluiert nach 25–26 min, [<sup>13</sup>C]FS eluiert nach 29–30 min.

*GC-MS-Methode zur qualitativen Untersuchung von Cyclobutandimeren*

- Probe trocknen und in 100  $\mu\text{l}$  BSTFA:Pyridin (3:2) lösen.
- Mindestens 30 min bei 60 °C derivatisieren.
- Anlage: GC-MS (Kapitel 7.3); Injektionsvolumen: 1  $\mu\text{L}$ ; Port Temperatur: 300 °C; Splitrate: 10:1; Temperaturgradient: 252 °C, mit 0,05 °C/min auf 254 °C, 1 min halten, mit 1 °C/min auf 258 °C, 1 min halten, mit 40 °C/min auf 300 °C, 10 min halten. Gas: Helium (0,64 mL/min), Interface Temperatur: 300 °C, Ionenquellentemperatur 300 °C; Ionisierungsenergie: 70 eV, TIC:  $m/z$  180–700; Scan Zeit: 0,3 s.

**8.4 PRÄPARATIVE BALLASTSTOFFISOLIERUNG**

Teilweise durchgeführt von Gerster (2015), Wefers (2016) und Schendel (2016).

- Pflanzenprobe gefriertrocknen und mahlen (Partikelgröße < 0,5 mm).
- Mehl (15–20 g) und Natriumphosphatpuffer (200 mL, 0,08 M, pH 6,2) in einen 500 mL-Erlenmeyerkolben geben.
- Thermostabile  $\alpha$ -Amylase (1,5 mL, Termamyl 120 L, Novozymes) zugeben.
- Inkubation für 20 min bei 92 °C. Den Kolben alle 5 min schwenken.
- Probe auf Raumtemperatur abkühlen und mit NaOH (0,275 M) auf pH 7,5 einstellen.
- Protease (1,2 g, Alcalase 1,5 MG Type FG, Novozymes) zugeben.
- Inkubation für 30 min bei 60 °C unter leichtem Schütteln.
- Probe auf Raumtemperatur abkühlen und mit HCl (0,325 M) auf pH 4,5 einstellen.
- Amyloglucosidase (700  $\mu\text{L}$ , AMG 300 L, Novozymes) zugeben.
- Inkubation für 30 min bei 60 °C unter leichtem Schütteln.
- Die warme Suspension zentrifugieren
- Den Rückstand, welcher die UBS enthält, mit H<sub>2</sub>O (60 °C, 2 x 100 mL, 1 x 50 mL) waschen.
- Den Rückstand mit Ethanol (99 %, 2 x 100 mL, 1 x 50 mL) waschen.
- Den Rückstand mit Aceton (1 x 100 mL, 1 x 50 mL) waschen.
- Den Rückstand im Vakuumtrockenschrank bei 40 °C trocknen.

**8.5 BESTIMMUNG VON FERULASÄURE, *p*-CUMARSÄURE UND OLIGO-FERULASÄUREN MITTELS LC-MS/MS****8.5.1 Probenvorbereitung**

- 10 mg Probe in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen einwiegen und mit 5 mL 2 M NaOH verseifen. Vorher NaOH mit N<sub>2</sub> begasen und Zentrifugenröhrchen mit N<sub>2</sub> füllen. Bei Raumtemperatur vor Licht geschützt für 18 h leicht schütteln.
- Interne Standardsubstanz zugeben und 20 min äquilibrieren lassen.

Für die Methode unter Verwendung der internen Standardsubstanz 5-5(me)-DFS:

- Proben in doppelter Ausführung aufarbeiten, einer Probe ca. 10  $\mu\text{g}$  *o*-Cumaräure und 0,05  $\mu\text{g}$  5-5(me)-DFS zugeben, der anderen 100  $\mu\text{g}$  *o*-Cumarsäure und 3  $\mu\text{g}$  5-5(me)-DFS.

Für die SIVA:

- Standardmix mit folgenden Konzentrationen herstellen:
  - \* [<sup>13</sup>C]8-5(dc)-DFS 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$
  - \* [<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]8-O-4/8-O-4-TriFS 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$
  - \* [<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]5-5/8-O-4-TriFS 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$

- \* [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]4-O-5-DFS 0,2 µg/mL
- \* [<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]8-8(nc)/8-O-4-TriFS 0,2 µg/mL
- \* [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]8-5(c)-DFS 4 µg/mL
- \* [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]8-O-4-DFS 10 µg/mL
- \* [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]5-5-DFS 7 µg/mL
- \* [<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]8-5(nc)/5-5-TriFS 2 µg/mL
- \* [<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]5-5/8-8(nc)-TriFS 0,4 µg/mL
- \* [<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]8-O-4/8-5(nc)-TriFS 1 µg/mL
- \* [<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]8-8(c)/5-5-TriFS 0,2 µg/mL
- \* [<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]5-5/8-8(c)-TriFS 0,2 µg/mL
- \* [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]8-5(nc)-DFS 8 µg/mL
- \* [<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]8-8(nc)-DFS 2 µg/mL
- \* [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]8-8(THF)-DFS (*cis-trans-trans*) 3 µg/mL
- \* [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]8-8(c)-DFS 4 µg/mL
- \* [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]FS-CBD 1 µg/mL

– Je nach Probe zugeben. Beispielsweise 300 µL für 10 mg Weizen-UBS.

- Mit konzentrierter Salzsäure auf pH < 2 ansäuern.
- Mit 3 x 2 mL Diethylether extrahieren, Extrakt in ein 4,5 mL Schraubdeckelglas überführen.
- Diethylether unter N<sub>2</sub> oder im Evaporator entfernen.
- Rückstand in 0,5 mL THF:H<sub>2</sub>O aufnehmen, gut vortexen/sonifizieren. Eventuell verdünnen.
- 150 µL in ein Vial überführen und mittels LC-MS/MS messen.

### 8.5.2 LC-MS/MS-Messung

- Anlage: LC-DAD-MS/MS (Kapitel 7.3), Ofentemperatur: 24 °C
- Injektionsvolumen: 20 µL, DAD-Detektor: 210–400 nm
- Phenyl-Hexyl-Säule (Phenomenex Kinetex, 150 x 4,6 mm, 2,6 µm, 100 Å), Fließmittel A: H<sub>2</sub>O mit 0,01 % Ameisensäure, Fließmittel B: MeOH mit 0,1 % Ameisensäure, Fließmittel C: ACN mit 0,1 % Ameisensäure, Flussrate: 0,5 mL/min, Gradient: 86 % A, 14 % C, innerhalb von 7 min zu 81 % A, 19 % C, innerhalb von 25 min zu 69 % A, 9 % B, 22 % C, innerhalb von 1 min zu 74 % A, 26 % C, innerhalb von 16 min zu 64 % A, 36 % C, spülen und äquilibrieren.
- MS-Parameter: Tabelle 13.

**Tabelle 13:** Parameter der massenspektrometrischen Detektion zur Bestimmung von Oligoferulasäuren

Electrospray + Source		Analyser	
Capillary	3,0 kV	LM Resolution 1	15
Cone	variabel	HM Resolution 1	15
Extractor	2 V	Ion Energy 1	0,6
RF Lens	0,1 V	Entrance	1
Source Temp.	100 °C	Collision	variabel
Desolvation Temp.	450 °C	Exit	0
Gas Flow Desolvation	700 L/h	LM Resolution 2	15
Gas Flow Cone	60 L/h	HM Resolution 2	15
		Ion Energy 2	0,8
Collision Gas Pirani	3*10 <sup>-3</sup> mbar	Multiplier	650

- Die Cone-Spannungen, Kollisionsenergien und Massenübergänge sind in den Tabellen 23 und 20 zu finden.

## 8.6 UNTERSUCHUNGEN ZUR FLUORESCENZDERIVATISIERUNG VON FERULASÄURE-DIMEREN

Durchgeführt von Breuer (2016) in Anlehnung an Toyo'oka et al. (1991), Toyo'oka et al. (1992), Ueno et al. (1999) und Kubota et al. (2005).

### 8.6.1 Derivatisierung von Ferulasäure-Dimeren

- Folgende Bedingungen wurden variiert und die Vollständigkeit der Derivatisierungsreaktion mittels LC-DAD-MS/MS (Kapitel 7.3) untersucht.
  - Derivatisierungsreagenzien DBD-PZ und DBD-ED, Verhältnisse 1:1 bis 100:1 (Derivatisierungsreagenz:DFS).
  - Kondensationsreagenzien 2,2-Dipyridyldisulfid in Kombination mit Triphenylphosphan und Diethylcyanophosphonat, Verhältnis 7:1 (Kondensationsreagenz(ien):Derivatisierungsreagenz).
  - Lösungsmittel: ACN, Methanol, Aceton, THF.
- eine vollständige Derivatisierung mittels DBD-PZ und DBD-ED wurde erreicht mit
  - DFS-Stammlösung (50  $\mu$ L, 0,01 mg/mL), Derivatisierungsreagenz (10  $\mu$ L, 25 mM), 2,2-Dipyridyldisulfid (20  $\mu$ L, 87,5 mM) und Triphenylphosphan (20  $\mu$ L, 87,5 mM) im Eppendorfgefäß mischen. Die Lösungen zuvor jeweils in ACN herstellen.
  - Für 1 h bei 60 °C reagieren lassen.
  - H<sub>2</sub>O (50  $\mu$ L) zugeben.

### 8.6.2 Bestimmung von *Response*-Faktoren

- DFS-Stammlösungen (8-O-4-, 5-5-, 8-5(nc)-, 8-8(nc), 4-O-5-, 8-8(THF)-, 8-5(c)-, 8-8(c)-DFS und FS-CBD) wie in Kapitel 8.6.1 Punkt 2 beschrieben derivatisieren.
- Die derivatisierten Lösungen mittels HPLC-DAD-FLD (Kapitel 7.3) analysieren:
- C18-Säule (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m, 100 Å), Fließmittel A: H<sub>2</sub>O mit 0,01 % Ameisensäure, Fließmittel B: ACN mit 0,1 % Ameisensäure, Flussrate: 1 mL/min, Gradient: 40 % B auf 70 % B in 60 min, Injektionsvolumen: 20  $\mu$ L, Fluoreszenz-Detektor: Anregung 437 nm, Emission 553 nm (DBD-PZ) bzw. Anregung 437 nm, Emission 562 nm (DBD-ED).
- Peakflächen bestimmen und relative *Response*-Faktoren berechnen.

## 8.7 SUMMENBESTIMMUNG VON OLIGOFERULASÄUREN MITTELS SEC-FTIR

### 8.7.1 Probenvorbereitung

- Je nach Pflanzenprobe zwischen 100 und 1000 mg UBS einwiegen.
- Verseifung durch Zugabe von Natronlauge (5 mL pro 100 mg UBS, 2 M) und Überkopfschütteln für 18 h unter Ausschluss von O<sub>2</sub> und Licht.
- Die Suspension mit konz. HCl auf pH 1 ansäuern.
- Das Gemisch mit Diethyleter (3 x 5 mL) extrahieren.
- Das Lösungsmittel entfernen und den Rückstand in Ethylacetat lösen.
- Die Lösung mit wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (5 %, 3 x 3 mL) extrahieren.
- Die Extrakte mit Ethylacetat (3 x 3 mL) waschen, die Ethylacetat-Fraktion verwerfen.
- Die wässrige Fraktion vorsichtig mit konz. HCl auf pH 1 ansäuern, zwischendurch vorsichtig sonifizieren.

- Die Lösung mit Ethylacetat (3 x 4 mL) extrahieren und das Lösungsmittel trocknen.
- Den Rückstand in 360 mg THF aufnehmen und für die SEC/FTIR-Messung verwenden.

### 8.7.2 SEC-FTIR-Messung

- Anlage: SEC-FTIR (Kapitel 7.3).
- Injektionsvolumen: 100 µL.
- Säulen: 2 x Tosoh TSKgel G1000H<sub>XL</sub> (300 x 15 mm, 5 µm).
- Fließmittel: THF, isokratisch.
- Flussrate: 0,3 mL/min bei Raumtemperatur.
- Scanzahl: 67.



**Tabelle 14:** Nachweisgrenzen, Bestimmungsgrenzen und Wiederfindungsraten von Ferulasäure und Ferulasäure-Metaboliten in Milch. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von [ $^{13}\text{C}_2$ ]Hippursäure waren mit den durchgeführten Versuchen nicht bestimmbar (n.b.).

Analyt	Nachweisgrenze <sup>a</sup> [µg/kg]	Bestimmungsgrenze <sup>a</sup> [µg/kg]	Wiederfindungsrate <sup>b</sup> [%]	Wiederfindungsrate <sup>a</sup> [%]	Wiederfindungsrate <sup>c</sup> [%]
[ $^{13}\text{C}_2$ ]3-Hydroxyhippursäure (1)	0,15	0,4	67	69	68
[D <sub>2</sub> ]4-Hydroxybenzoesäure (2)	0,2	0,7	52	56	55
[ $^{13}\text{C}_2$ ]Hippursäure (3)	n.b.	n.b.	61	64	63
[ $^{13}\text{C}_2$ ]3,4-Dihydroxyphenylpropionsäure (4)	0,7	2	41	37	38
[D <sub>3</sub> ]3-Hydroxybenzoesäure (5)	0,15	0,4	60	63	59
[ $^{13}\text{C}_2$ ]Kaffeesäure (6)	0,15	0,4	76	74	84
[ $^{13}\text{C}_2$ ]4-Hydroxyphenylpropionsäure (7)	3	9	43	41	30
[ $^{13}\text{C}_2$ ]3-Hydroxyphenylpropionsäure (8)	0,1	0,3	29	25	45
[ $^{13}\text{C}_2$ ]Dihydroferulasäure (9)	0,2	0,7	22	21	47
[ $^{13}\text{C}_2$ ]p-Cumarsäure (10)	0,03	0,1	60	64	64
[D <sub>2</sub> ]Phenylelessigsäure (11)	0,7	2	31	30	29
[D <sub>2</sub> ]Benzoesäure (12)	2	7	39	44	42
[ $^{13}\text{C}_2$ ]Ferulasäure (13)	0,1	0,3	90	94	90
[ $^{13}\text{C}_2$ ]Phenylpropionsäure (14)	0,2	0,6	59	61	47
[ $^{13}\text{C}_2$ ]Zimtsäure (15)	0,07	0,2	60	62	56

<sup>a</sup>: gemessen in konventioneller Milch mit 3,5 % Fettgehalt

<sup>b</sup>: gemessen in konventioneller Milch mit 1,5 % Fettgehalt

<sup>c</sup>: gemessen in ökologischer Milch mit 3,8 % Fettgehalt

**Tabelle 15:** Kalibrierdaten der Stabilisotopenverdünnungsanalyse zur Bestimmung von Ferulasäure und Ferulasäure-Metaboliten in Milch. Nummerierung nach Elutionsreihenfolge (Abbildung 18). NKP: Niedrigster Kalibrierpunkt, R<sup>2</sup>: Bestimmtheitsmaß.

Analyt	NKP [µg/mL]	Kalibriergleichung <sup>a</sup> (NKP-1 µg/mL)	R <sup>2</sup>	Kalibriergleichung <sup>a</sup> (1-11 µg/mL)	R <sup>2</sup>
3-Hydroxyhippursäure (1)	0,005	$y = -6163,66x^2 + 54610,42x + 3,20$	0,999 99	$y = -1240,58x^2 + 40879,31x + 8794,48$	0,999 69
[ <sup>13</sup> C] <sub>3</sub> -Hydroxyhippursäure (1)	0,005	$y = -5129,54x^2 + 48533,708x - 1,86$	0,999 99	$y = -1024,93x^2 + 35527,96x + 8935,23$	0,999 83
4-Hydroxybenzoesäure (2)	0,025	$y = -3652,18x^2 + 64510,75x + 29,31$	0,999 95	$y = -1560,89x^2 + 56804,96x + 6549,16$	0,999 93
[D <sub>2</sub> ]-4-Hydroxybenzoesäure (2)	0,025	$y = -7741,37x^2 + 69114,40x - 68,40$	0,999 39	$y = -1533,40x^2 + 57405,16x + 7849,06$	0,999 95
Hippursäure (3)	0,005	$y = -4796,57x^2 + 41409,25x + 5,96$	0,999 96	$y = -704,16x^2 + 32078,89x + 4934,99$	0,999 74
[ <sup>13</sup> C] <sub>2</sub> ]Hippursäure (3)	0,005	$y = -5355,09x^2 + 41557,83x + 0,88$	0,999 85	$y = -619,48x^2 + 31072,73x + 6224,93$	0,999 51
3,4-Dihydroxyphenylpropionsäure (4)	0,005	$y = -453,56x^2 + 27213,196x - 17,70$	0,999 92	$y = -613,59x^2 + 24708,4546x + 2737,89$	0,999 67
[ <sup>13</sup> C] <sub>2</sub> ]-3,4-Dihydroxyphenylpropionsäure (4)	0,005	$y = -464,67x^2 + 24370,40x - 11,35$	0,999 85	$y = -434,04x^2 + 20663,44x + 3842,84$	0,999 48
3-Hydroxybenzoesäure (5)	0,005	$y = -4517,41x^2 + 56068,35x - 0,81$	0,999 82	$y = -930,82x^2 + 45440,91x + 7283,44$	0,999 58
[D <sub>3</sub> ]-3-Hydroxybenzoesäure (5)	0,005	$y = -6873,74x^2 + 65166,19x + 13,61$	0,999 89	$y = -1415,59x^2 + 55038,14x + 5370,07$	0,999 94
Kaffeensäure (6)	0,005	$y = -1527,42x^2 + 77767,75x - 64,29$	0,999 97	$y = -1791,70x^2 + 67860,64x + 13119,72$	0,999 14
[ <sup>13</sup> C] <sub>2</sub> ]Kaffeensäure (6)	0,005	$y = -2702,00x^2 + 91859,04x - 42,57$	0,999 86	$y = -2008,78x^2 + 78871,14x + 15054,20$	0,999 32
4-Hydroxyphenylpropionsäure (7)	0,025	$y = 68,39x^2 + 1943,31x - 1,36$	0,999 41	$y = -35,83x^2 + 2106,87x + 12,93$	0,999 88
[ <sup>13</sup> C] <sub>2</sub> ]-4-Hydroxyphenylpropionsäure (7)	0,025	$y = 108,86x^2 + 1834,36x - 0,74$	0,999 82	$y = -30,76x^2 + 1947,76x + 75,65$	0,999 72
3-Hydroxyphenylpropionsäure (8)	0,005	$y = -7187,23x^2 + 87843,14x - 13,11$	0,999 97	$y = -1453,87x^2 + 66017,93x + 19445,92$	0,999 25
[ <sup>13</sup> C] <sub>2</sub> ]-3-Hydroxyphenylpropionsäure (8)	0,005	$y = -7048,66x^2 + 95509,69x - 11,98$	0,999 98	$y = -1709,90x^2 + 73005,74x + 18985,64$	0,999 45
Dihydroferulasäure (9)	0,005	$y = -7749,06x^2 + 52160,46x - 16,82$	0,999 62	$y = -683,80x^2 + 30437,26x + 17065,50$	0,998 54
[ <sup>13</sup> C] <sub>2</sub> ]Dihydroferulasäure (9)	0,005	$y = -7915,49x^2 + 51371,02x - 20,6$	0,999 74	$y = -698,08x^2 + 29930,07x + 15733,76$	0,998 63
p-Cumarsäure (10)	0,005	$y = -1688,11x^2 + 128469,96x - 14,23$	0,999 71	$y = -2185,78x^2 + 103535,68x + 25990,06$	0,999 88
[ <sup>13</sup> C] <sub>2</sub> ]-p-Cumarsäure (10)	0,005	$y = -2681,35x^2 + 140329,39x - 32,94$	0,999 88	$y = -2291,10x^2 + 112070,76x + 28014,01$	0,999 93
Phenyllessigsäure (11)	0,005	$y = 109,72x^2 + 14030,99x + 0,06$	0,999 82	$y = -59,73x^2 + 16607,21x - 2219,39$	0,999 82
[D <sub>2</sub> ]Phenyllessigsäure (11)	0,005	$y = -178,86x^2 + 13732,97x - 7,06$	0,999 59	$y = -26,59x^2 + 15537,15x - 1653,99$	0,999 99
Benzoessäure (12)	0,025	$y = -92,43x^2 + 4744,17x + 86,33$	0,999 92	$y = -37,87x^2 + 4654,97x + 175,15$	0,999 84
[D <sub>2</sub> ]Benzoessäure (12)	0,025	$y = -262,17x^2 + 4375,13x - 3,39$	0,999 84	$y = -27,58x^2 + 4126,50x + 83,88$	0,999 89
Ferulasäure (13)	0,005	$y = 1284,21x^2 + 46816,70x + 5,14$	0,999 09	$y = -536,75x^2 + 46297,26x + 2725,98$	0,999 87
[ <sup>13</sup> C] <sub>2</sub> ]Ferulasäure (13)	0,005	$y = 2273,74x^2 + 45554,03x + 0,97$	0,998 70	$y = -459,34x^2 + 44581,16x + 4263,07$	0,999 93
Phenylpropionsäure (14)	0,025	$y = 291,68x^2 + 2477,92x + 0,21$	0,999 97	$y = 11,68x^2 + 2961,81x - 210,83$	0,999 99
[ <sup>13</sup> C] <sub>2</sub> ]Phenylpropionsäure (14)	0,025	$y = 271,99x^2 + 2736,43x - 2,20$	0,999 94	$y = 17,21x^2 + 3182,75x - 194,23$	1,000 00
Zimtsäure (15)	0,005	$y = 404,37x^2 + 14060,01x + 8,96$	0,999 98	$y = -87,45x^2 + 15405,87x - 865,67$	0,999 99
[ <sup>13</sup> C] <sub>2</sub> ]Zimtsäure (15)	0,005	$y = 439,62x^2 + 15382,77x + 4,81$	0,999 89	$y = -68,05x^2 + 16382,18x - 424,01$	0,999 90

<sup>a</sup> y: Peakfläche, x: Analytkonzentration [µg/mL]

**Tabelle 16:** NMR-Daten der in dieser Arbeit erstmals identifizierten Dehydrotriferulasäuren (TriFS) und Dehydrotetraferulasäure (TetraFS) nach oxidativ-chemischer Kopplung. Die Signale der  $^1\text{H}$ -Kerne sind angegeben als chemische Verschiebung  $\delta$  [ppm] (relatives Integral; Aufspaltung; Kopplungskonstanten [Hz]). Die chemischen Verschiebungen der  $^{13}\text{C}$ -Kerne wurden aus HSQC- und HMBC-Spektren ermittelt. nd: nicht bestimmbar, a-f: Zuordnung nicht eindeutig möglich.

Position	8-O-4/(8-5(c)-TriFS)		8-8(c)/(5-5-TriFS)		5-5/8-8(c)-TriFS		8-8(nc)/8-O-4-TriFS		5-5/8-8(nc)-TriFS		8-5(nc)/5-5/8-5(nc)-TetraFS	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
A1	-	130,1	-	124,6	-	124,2	-	nd	-	128,0	-	127,5
A2	7,43 (1H; d; 1,9)	112,2	7,08 (1H; s)	113,0	7,21 (1H; s)	112,2	7,29 (1H; d; 2,0)	113,4	7,34 (1H; d; 2,0)	113,4	7,49 (2H; d; 2,0)	110,2
A3	-	150,3	-	147,5	-	147,9	-	nd	-	148,2	-	149,4
A4	-	148,6	-	149,6	-	147,7	-	nd	-	149,3	-	148
A5	6,83 (1H; d; 8,4)	114,3	6,79 (1H; s)	117,0	-	125,3	6,79 (1H; d; 8,4, 2,0) <sup>b</sup>	115,9 <sup>b</sup>	6,82 (1H; d; 8,2)	115,9	-	nd
A6	7,13 (1H; dd; 8,4, 1,9)	122,8	-	132,5	-	130,8	7,13 (1H; dd; 8,4, 2,0) <sup>c</sup>	125,5 <sup>c</sup>	7,15 (1H; dd; 8,2, 2,0)	125,5	7,07 (2H; d; 2,0)	125,7
A7	7,59 (1H; d; 16,0)	145,2	7,70 (1H; s)	138,2	7,79 (1H; s)	139,1	7,85 (1H; s) <sup>d</sup>	141,7 <sup>d</sup>	7,87 (1H; s)	142,5	7,63 (2H; d; 15,9)	145,6
A8	6,43 (1H; d; 16,0)	117,5	-	124,1	-	123,1	-	nd	-	126,0	6,47 (2H; d; 15,9)	116,4
A9	-	168,0	-	168,5	-	168,5	-	168,3	-	168,5	-	168,2
A3-OMe	4,00 (3H; s)	56,3	3,87 (3H; s)	56,2	3,96 (1H; s)	56,2	3,72 (3H; s) <sup>e</sup>	55,9 <sup>e</sup>	3,75 (3H; s)	55,9	3,98 (6H; s)	56,5
B1	-	nd	-	135,1	-	136,2	-	nd	-	nd	-	nd
B2	7,50 (1H; br s)	115,5 <sup>a</sup>	6,81 (1H; d; 2,0)	110,7	6,44 (1H; d; 2,0)	112,1	7,44 (1H; d; 2,0) <sup>f</sup>	114,1 <sup>f</sup>	7,35 (1H; d; 2,0)	112,1	6,74 (2H; d; 2,1)	111,9
B3	-	145,3	-	148,6	-	148,2	-	nd	-	148,4	-	148,3
B4	-	150,2	-	143,6	-	146,2	-	148,7	-	147,0	-	146,2
B5	-	127,4	-	125,4	6,62 (1H; d; 8,1)	115,3	6,76 (1H; d; 8,4) <sup>b</sup>	114,0 <sup>b</sup>	-	125,7	-	nd
B6	7,50 (1H; br s)	121,1 <sup>a</sup>	6,61 (1H; d; 2,0)	122,9	6,25 (1H; dd; 8,1, 2,0)	120,8	7,11 (1H; dd; 8,4, 2,0) <sup>c</sup>	124,6 <sup>c</sup>	7,24 (1H; d; 2,0)	127,9	6,61 (2H; d; 2,1)	128,6
B7	7,46 (1H; s)	129,9	4,66 (1H; d; 2,0)	46,1	4,37 (1H; bs)	44,1	7,86 (1H; s) <sup>d</sup>	142,6 <sup>d</sup>	7,90 (1H; s)	142,5	7,82 (2H; s)	141,6
B8	-	138,8	4,04 (1H; d; 2,0)	47,4	3,79 (1H; d; 1,4)	48,1	-	nd	-	126,0	-	nd
B9	-	164,7	-	173,5	-	173,3	-	168,3	-	168,5	-	169,0
B3-OMe	3,77 (3H; s)	55,9	3,80 (3H; s)	56,2	3,65 (3H; s)	56,1	3,82 (3H; s) <sup>e</sup>	56,0 <sup>e</sup>	3,79 (3H; s)	56,1	3,51 (6H; s)	55,6
C1	-	131,9	-	127,1	-	126,0	-	nd	-	126,6	-	-
C2	7,06 (1H; d; 1,9)	110,5	7,30 (1H; d; 1,9)	109,6	7,26 (1H; d; 2,0)	110,2	7,43 (1H; d; 2,0) <sup>f</sup>	113,7 <sup>f</sup>	7,34 (1H; d; 2,0)	109,8	-	-
C3	-	148,5	-	149,2	-	148,4	-	148,3	-	148,9	-	-
C4	-	147,8	-	147,2	-	147,6	-	149,4	-	147,0	-	-
C5	6,82 (1H; d; 8,2)	115,7	-	126,8	-	nd	6,8 (1H; d; 8,3)	115,9	-	125,7	-	-
C6	6,88 (1H; dd; 8,2, 1,9)	120	7,05 (1H; d; 1,9)	126,1	6,17 (1H; d; 2,0)	126,3	7,19 (1H; dd; 8,3, 2,0)	126,0	7,08 (1H; d; 2,0)	126,0	-	-
C7	6,00 (1H; d; 8,0)	88,3	7,59 (1H; d; 15,9)	145,9	7,26 (1H; d; 15,9)	145,8	7,38 (1H; s)	128,4	7,62 (1H; d; 15,9)	146,0	-	-
C8	4,37 (1H; d; 8,0)	55,8	6,38 (1H; d; 15,9)	116,1	5,98 (1H; d; 15,9)	115,6	-	138,2	6,43 (1H; d; 15,9)	116,1	-	-
C9	-	171,9	-	168,3	-	168,2	-	164,6	-	168,3	-	-
C3-OMe	3,81 (3H; s)	56,1	3,94 (3H; s)	56,4	3,96 (3H; s)	56,2	3,63 (3H; s)	55,6	3,96 (3H; s)	56,4	-	-

**Tabelle 17:** NMR-Daten des in Abbildung 22 dargestellten Abbauprodukts der 8-8(nicht cyclisch)-Dehydrodiferulasäure. Die Signale der  $^1\text{H}$ -Kerne sind angegeben als chemische Verschiebung  $\delta$  [ppm] (relatives Integral; Aufspaltung; Kopplungskonstanten [Hz]). Die chemischen Verschiebungen der  $^{13}\text{C}$ -Kerne wurden aus HSQC- und HMBC-Spektren ermittelt.

Position	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
A1	–	129,6
A2	7,40 (1H, s)	108,8
A3	–	150,0
A4	–	150,0
A5	7,21 (1H, s)	108,8
A6	–	131,3
A7	8,31 (1H, bd, 1,6)	129,3
A8	–	125,6
A9	–	168,2
A3-OMe	3,91 (3H, s)	56,1
B1	–	132,7
B2	6,91 (1H, d, 2,0)	114,1
B3	–	148,3
B4	–	146,9
B5	6,97 (1H, d, 8,0)	115,8
B6	6,79 (1H, dd, 8,0, 2,0)	123,0
B7	–	139,3
B8	7,65 (1H, d, 1,7)	125,1
B3-OMe	3,77 (3H, s)	56,2

**Tabelle 18:**  $^1\text{H}$ -NMR-Daten der Dehydrotetraferulasäuren (TetraFS), die nach oxidativ-chemischer Kopplung isoliert wurden, aber nicht eindeutig identifiziert werden konnten, angegeben als chemische Verschiebung  $\delta$  [ppm] (relatives Integral; Aufspaltung; Kopplungskonstanten [Hz]). Die TetraFS sind vorläufig nach ihren Retentionszeiten in der verwendeten LC-MS/MS-Messung (Kapitel 8.5.2) benannt.

Verbindung	$^1\text{H}$ -NMR-Signale
TetraFS 31,0 min	3,54 (3H; bs); 3,73 (3H; s); 3,74 (3H; s); 3,96 (3H; s); 6,49 (1H; bd; 15,9); 6,79 (1H; bs); 6,80 (1H; bs); 6,81 (1H; d; 8,2); 7,05 (1H; d; 2,0); 7,15 (1H; dd; 8,3, 2,0); 7,33 (1H; d; 2,0); 7,36 (1H; d; 2,0); 7,50 (1H; bs); 7,63 (1H; d; 15,9); 7,84 (1H; s); 7,85 (1H; s); 7,87 (1H; s)
TetraFS 35,3 min	3,36 (3H; s); 3,79 (3H; s); 3,94 (3H; s); 3,96 (3H; s); 6,40 (1H; d; 16,0); 6,41 (1H; d; 16,0); 6,61 (1H; d; 2,0); 6,76 (1H; d; 8,3); 6,85 (1H; bs); 6,92 (1H; d; 2,0); 6,98 (1H; d; 2,0); 7,05 (1H; dd; 8,3, 2,0); 7,28 (1H; d; 2,0); 7,33 (1H; d; 2,0); 7,36 (1H; d; 2,0); 7,47 (1H; d; 2,0); 7,47 (1H; s); 7,56 (1H; d; 16,0); 7,58 (1H; d; 2,0); 7,62 (1H; d; 16,0); 7,81 (1H; s)
TetraFS 39,4 min	3,73 (3H; s); 3,78 (3H; s); 3,87 (3H; s); 3,93 (3H; s); 4,02 (1H; d; 2,1); 4,64 (1H; d; 2,1); 6,43 (1H; d; 15,9); 6,56 (1H; d; 2,1); 6,75 (1H; s); 6,77 (1H; d; 2,1); 6,84 (1H; d; 8,3); 7,05 (1H; s); 7,13 (1H; dd; 8,3, 2,0); 7,18 (1H; d; 2,0); 7,41 (1H; s); 7,42 (1H; d; 2,0); 7,53 (1H; d; 2,0); 7,60 (1H; d; 15,9); 7,67 (1H; s)
TetraFS 41,8 min	3,72 (3H; s); 3,72 (3H; s); 3,75 (3H; s); 3,88 (3H; s); 6,45 (1H; d; 15,9); 6,76 (1H; d; 8,2); 6,80 (1H; d; 8,3); 6,90 (1H; d; 2,0); 7,04 (1H; dd; 8,2, 2,0); 7,10 (1H; dd; 8,3, 1,9); 7,13 (1H; d; 1,9); 7,37 (1H; d; 2,0); 7,37 (1H; s); 7,39 (1H; d; 1,9); 7,40 (1H; d; 2,0); 7,44 (1H; d; 1,9); 7,54 (1H; bs); 7,56 (1H; d; 15,9); 7,57 (1H; bs)

**Tabelle 19:** Verwendete Mengen und Reinheiten der Standardsubstanzen, die zur Methodenentwicklung verwendet wurden. FS-CBD: Ferulasäure-Cyclobutandimer ( $\alpha$ -Truxillsäure), DFS: Dehydroferulasäure, TriFS: Dehydrotriferulasäure, c: cyclisch, nc: nicht cyclisch, dc: decarboxyliert, THF: Tetrahydrofuran, me: methyliert.

Substanz	Einwaage [mg] <sup>a</sup>	UV/VIS-Reinheit	NMR-Reinheit	Substanz	Einwaage [mg] <sup>a</sup>	UV/VIS-Reinheit	NMR-Reinheit
FS-CBD	6,03	> 99 %	> 99 %	[ <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]FS-CBD	6,55	> 99 %	> 99 %
8-8(c)-DFS	6,14	> 96 %	> 97 %	[ <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]8-8(c)-DFS	6,55	> 99 %	> 99 %
8-8(nc)-DFS	7,66	> 99 %	> 99 %	[ <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]8-8(nc)-DFS	6,88	> 99 %	> 98 %
<i>cis-trans-trans</i> -8-8(THF)-DFS	7,07	> 98 %	> 98 %	[ <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ] <i>cis-trans-trans</i> -8-8(THF)-DFS	6,76	> 98 %	> 99 %
8-5(nc)-DFS	7,25	> 99 %	> 98 %	[ <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]8-5(nc)-DFS	6,72	> 99 %	> 99 %
8-5(c)-DFS	6,37	> 96 %	> 95 %	[ <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]8-5(c)-DFS	6,47	> 97 %	> 97 %
8-5(dc)-DFS	6,29	> 97 %	> 96 %	[ <sup>13</sup> C]8-5(dc)-DFS	7,03	> 99 %	> 99 %
8-O-4-DFS	6,68	> 99 %	> 98 %	[ <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]8-O-4-DFS	6,43	> 98 %	> 97 %
4-O-5-DFS	7,78	> 96 %	> 97 %	[ <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]4-O-5-DFS	6,80	> 97 %	> 99 %
5-5-DFS	4,86	> 99 %	> 99 %	[ <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]5-5-DFS	6,92	> 99 %	> 99 %
5-5/8-O-4-TriFS	7,07	> 97 %	> 98 %	[ <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]5-5/8-O-4-TriFS	7,53	> 99 %	> 99 %
8-O-4/8-O-4-TriFS	6,19	> 97 %	> 96 %	[ <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]8-O-4/8-O-4-TriFS	1,53	> 97 %	> 96 %
5-5/8-8(c)-TriFS	4,37	> 93 %	> 97 %	[ <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]5-5/8-8(c)-TriFS	1,57	> 96 %	> 95 %
8-8(c)/5-5-TriFS	5,79	> 97 %	> 96 %	[ <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]8-8(c)/5-5-TriFS	3,11	> 95 %	> 96 %
8-O-4/8-5(nc)-TriFS	3,98	> 96 %	> 97 %	[ <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]8-O-4/8-5(nc)-TriFS	2,93	> 97 %	> 96 %
5-5/8-8(nc)-TriFS	6,02	> 99 %	> 98 %	[ <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]5-5/8-8(nc)-TriFS	6,78	> 99 %	> 99 %
8-5(nc)/5-5-TriFS	5,76	> 98 %	> 98 %	[ <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]8-5(nc)/5-5-TriFS	6,64	> 98 %	> 97 %
8-8(nc)/8-O-4-TriFS	3,90	> 97 %	> 98 %	[ <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]8-8(nc)/8-O-4-TriFS	2,69	> 97 %	> 96 %
8-8(c)/8-O-4-TriFS	6,35	> 96 %	> 95 %				
5-5(me)-DFS	6,41	> 98 %	> 98 %				

<sup>a</sup> gelöst in THF:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) auf eine Konzentration von 1 mg/mL, verdünnt in MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) auf eine Konzentration von 100 µg/mL

**Tabelle 20:** Massenspektrometrische Parameter der Stabilisotopenverdünnungsanalyse zur Bestimmung des Ferulasäure-Cyclobutandimers (FS-CBD), Dehydrodiferulasäuren (DFS) und Dehydrotriferulasäuren (TriFS). IS: Interne Standardsubstanz, c: cyclisch, nc: nicht cyclisch, dc: decarboxyliert, THF: Tetrahydrofuran.

Analyt	Retentionszeit [min]	$m/z$ Mutterion Analyt	$m/z$ Quantifier Analyt	$m/z$ Qualifier Analyt	$m/z$ Mutterion $^{13}\text{C}$ -IS	$m/z$ Quantifier $^{13}\text{C}$ -IS	$m/z$ Qualifier $^{13}\text{C}$ -IS	Cone Spannung [V]	Kollisionsenergie Spannung [V]	Aufnahmezeitraum [min]
FS-CBD	13,0	387	134	149	389	134	149	34	33	5,0–15,0
8-8(c)-DFS	16,3	385	341	–	387	342	–	20	12	14,3–17,0
8-8(THF)-DFS	16,8	403	136	–	405	136	–	32	21	16,5–17,6
8-8(nc)-DFS	17,6	385	173	–	387	173	–	22	15	17,0–19,0
8-5(nc)-DFS	20,2	385	341	297	387	342	297	26	15	18,5–21,2
5-5/8-8(c)-TriFS	21,7	577	533	489	580	535	490	26	17	20,8–25,0
8-8(c)/5-5-TriFS	27,8	577	489	–	580	490	–	17	17	25,0–28,8
8-O-4/8-5(nc)-TriFS	28,3	577	193	–	580	194	–	23	18	27,0–29,3
5-5/8-8(nc)-TriFS	29,9	533	445	489	535	445	490	30	19	28,8–30,8
5-5-DFS	31,0	385	282	–	387	281	–	36	24	30,6–32,5
8-5(nc)/5-5-TriFS	31,0	533	489	–	535	490	–	30	16	30,8–32,5
8-8(c)/8-O-4-TriFS	31,7	577	341	–	a	a	–	22	18	30,8–33,5
8-O-4-DFS	35,0	385	193	–	387	194	–	22	12	32,5–36,0
8-5(c)-DFS	35,8	341	267	282	387	267	282	35	25	35,1–36,8
8-8(nc)/8-O-4-TriFS	37,0	577	297	–	580	297	–	25	24	36,2–39,0
4-O-5-DFS	40,1	385	370	309	387	372	310	38	20	38,0–42,0
5-5/8-O-4-TriFS	43,7	577	355	489	580	356	490	37	24	42,0–46,0
8-O-4/8-O-4-TriFS	48,3	577	193	–	580	194	–	25	25	46,0–49,4
8-5(dc)-DFS	49,5	341	267	282	342	267	282	35	25	49,0–52,0

<sup>a</sup> 8-8(c)/8-O-4-TriFS wurde auf [ $^{13}\text{C}_3$ ]8-5(nc)/5-5-TriFS bezogen

**Tabelle 21:** Nachweisgrenzen (NWG) und Bestimmungsgrenzen (BSG) der Dehydrodiferulasäuren (DFS), Dehydrotriferulasäuren (TriFS) und des Ferulasäure-Cyclobutandimers (FS-CBD). Das Typ-II-Zellwandimitat bestand aus Cellulose:Arabinoxylan (1:1). UBS: Unlösliche Ballaststoffe, nc: nicht cyclisch, c: cyclisch, dc: decarboxyliert, THF:Tetrahydrofuran.

Analyt	ohne Matrix		Typ-II-Zellwandimitat		Apfel-UBS		ohne Matrix		Typ-II-Zellwandimitat		Apfel-UBS	
	NWG <sup>a</sup>	BSG <sup>a</sup>	NWG <sup>a</sup>	BSG <sup>a</sup>	NWG <sup>a</sup>	BSG <sup>a</sup>	NWG <sup>b</sup>	BSG <sup>b</sup>	NWG <sup>b</sup>	BSG <sup>b</sup>	NWG <sup>b</sup>	BSG <sup>b</sup>
8-O-4-DFS	2	5	2	5	2	5	0,1	0,25	0,1	0,25	0,1	0,25
5-5-DFS	3	10	5	20	3	10	0,15	0,5	0,25	1	0,15	0,5
8-5(nc)-DFS	2	5	3	10	2	5	0,1	0,25	0,15	0,5	0,1	0,25
8-5(c)-DFS	3	10	3	10	3	10	0,15	0,5	0,15	0,5	0,15	0,5
8-5(dc)-DFS	3	10	20	50	5	20	0,15	0,5	1	2,5	0,25	1
8-8(c)-DFS	2	5	2	5	2	5	0,1	0,25	0,1	0,25	0,1	0,25
8-8(THF)-DFS	20	50	20	50	20	50	1	2,5	1	2,5	1	2,5
8-8(nc)-DFS	3	10	3	10	3	10	0,15	0,5	0,15	0,5	0,15	0,5
4-O-5-DFS	3	10	3	10	3	10	0,15	0,5	0,15	0,5	0,15	0,5
FS-CBD	3	10	3	10	3	10	0,15	0,5	0,15	0,5	0,15	0,5
5-5/8-O-4-TriFS	5	20	5	20	5	20	0,25	1	0,25	1	0,25	1
8-5(nc)/5-5-TriFS	5	20	5	20	5	20	0,25	1	0,25	1	0,25	1
8-8(c)/8-O-4-TriFS	3	10	5	20	5	20	0,15	0,5	0,25	1	0,25	1
8-O-4/8-O-4-TriFS	3	10	3	10	3	10	0,15	0,5	0,15	0,5	0,15	0,5
8-O-4/8-5(nc)-TriFS	3	10	3	10	3	10	0,15	0,5	0,15	0,5	0,15	0,5
5-5/8-8(c)-TriFS	5	20	20	50	5	20	0,25	1	1	2,5	0,25	1
8-8(c)/5-5-TriFS	5	20	5	20	5	20	0,25	1	0,25	1	0,25	1
5-5/8-8(nc)-TriFS	3	10	3	10	3	10	0,15	0,5	0,15	0,5	0,15	0,5
8-8(nc)/8-O-4-TriFS	5	20	5	20	5	20	0,25	1	0,25	1	0,25	1

<sup>a</sup> [ng/mL], bezogen auf die Lösung, die mittels LC-MS/MS analysiert wird

<sup>b</sup> [µg/g Probe], bezogen 10 mg Probe, deren Extrakt nach Trocknen in 0,5 mL THF:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) gelöst wird

**Tabelle 22:** Mittels Stabilisotopenverdünnungsanalyse ermittelte Gehalte des Ferulasäure-Cyclobutandimers (FS-CBD) sowie der Dehydroferulasäuren (DFS) und Dehydrotriferulasäuren (TriFS) in den unkorrigierten, unlöslichen Ballaststoffen von Mais- und Weizenkaryopsen, Zuckerrübenschnitzeln und Amaranthsamen [ $\mu\text{g/g}$ ]. MW: Mittelwert ( $n=4$ ), STD: Standardabweichung, n.b.: nicht bestimmbar, nc: nicht cyclisch, c: cyclisch, THF: Tetrahydrofuran.

	Mais Probe 1			Mais Probe 2			Weizen Probe 1			Weizen Probe 2		
	MW	STD	STD [%]	MW	STD	STD [%]	MW	STD	STD [%]	MW	STD	STD [%]
<b><math>\Sigma</math> Dimere</b>	<b>6358,1</b>	<b>48,6</b>	<b>0,8</b>	<b>6755,6</b>	<b>65,6</b>	<b>1,0</b>	<b>1198,5</b>	<b>7,7</b>	<b>0,6</b>	<b>1183,0</b>	<b>25,8</b>	<b>2,2</b>
8-O-4-DFS	1873,8	12,2	0,6	1980,2	16,1	0,8	281,7	3,5	1,2	277,6	5,0	1,8
5-5-DFS	1591,9	9,1	0,6	1716,2	12,7	0,7	166,7	1,6	1,0	165,2	3,4	2,1
$\Sigma$ 8-5-DFS	1652,3	23,7	1,4	1762,2	24,4	1,4	445,1	1,0	0,2	445,4	11,7	2,6
8-8(c)-DFS	550,7	2,7	0,5	560,8	6,7	1,2	140,3	2,1	1,5	137,3	3,3	2,4
$\Sigma$ 8-8(THF)-DFS	548,4	8,9	1,6	591,1	10,1	1,7	85,6	0,5	0,6	81,6	2,9	3,5
8-8(nc)-DFS	76,7	0,4	0,5	79,9	0,7	0,8	37,1	0,6	1,6	37,0	0,7	1,8
4-O-5-DFS	44,1	0,9	1,9	48,0	1,2	2,5	6,5	0,3	4,8	6,7	0,3	5,1
FS-CBD	20,3	0,2	0,9	17,2	0,1	0,4	35,6	0,3	0,9	32,2	0,8	2,6
<b><math>\Sigma</math> Trimere</b>	<b>1163,9</b>	<b>18,3</b>	<b>1,6</b>	<b>1231,2</b>	<b>19,4</b>	<b>1,6</b>	<b>259,8</b>	<b>3,7</b>	<b>1,4</b>	<b>248,5</b>	<b>12,0</b>	<b>4,8</b>
5-5/8-O-4-TriFS	466,3	5,9	1,3	496,7	3,9	0,8	73,7	2,7	3,7	69,9	4,0	5,7
8-5(nc)/5-5-TriFS	157,0	2,2	1,4	176,0	4,2	2,4	71,8	1,0	1,4	67,8	3,9	5,7
8-8(c)/8-O-4-TriFS	229,6	11,4	5,0	235,0	7,3	3,1	26,1	0,8	3,2	27,3	0,2	0,7
8-O-4/8-O-4-TriFS	106,4	1,2	1,1	110,4	1,1	1,0	33,5	0,6	1,9	31,5	1,6	5,0
8-O-4/8-5(nc)-TriFS	47,0	0,6	1,3	49,2	1,0	2,1	21,8	0,3	1,5	20,7	1,0	4,9
5-5/8-8(c)-TriFS	90,0	1,8	2,0	91,9	3,3	3,6	20,9	0,8	3,8	19,7	1,4	7,0
8-8(c)/5-5-TriFS	50,8	1,4	2,7	54,3	0,6	1,1	7,8	0,5	6,4	7,4	0,5	7,3
5-5/8-8(nc)-TriFS	13,4	0,3	2,0	14,3	0,3	1,9	3,4	0,1	2,7	3,3	0,3	8,6
8-8(nc)/8-O-4-TriFS	3,5	0,2	5,4	3,4	0,1	1,7	n.b.			n.b.		
	Zuckerrübe Probe 1			Zuckerrübe Probe 2			Amaranth Probe 1			Amaranth Probe 2		
	MW	STD	STD [%]	MW	STD	STD [%]	MW	STD	STD [%]	MW	STD	STD [%]
<b><math>\Sigma</math> Dimere</b>	<b>1061,0</b>	<b>1,6</b>	<b>0,1</b>	<b>1107,5</b>	<b>4,8</b>	<b>0,4</b>	<b>146,8</b>	<b>1,9</b>	<b>1,3</b>	<b>159,5</b>	<b>1,1</b>	<b>0,7</b>
8-O-4-DFS	263,6	1,8	0,7	278,5	3,3	1,2	31,7	1,1	3,6	34,4	0,4	1,2
5-5-DFS	146,1	0,7	0,5	152,7	1,2	0,8	16,1	0,1	0,8	17,9	0,3	1,5
$\Sigma$ 8-5-DFS	408,6	1,1	0,3	423,0	1,7	0,4	38,9	0,3	0,8	42,3	0,3	0,8
8-8(c)-DFS	73,1	0,1	0,2	76,2	0,5	0,7	31,7	0,3	0,8	34,6	0,2	0,6
$\Sigma$ 8-8(THF)-DFS	68,6	0,4	0,5	71,0	1,0	1,4	5,3	0,2	3,7	5,6	0,2	3,7
8-8(nc)-DFS	91,6	0,5	0,6	94,7	0,8	0,9	14,2	0,2	1,6	15,3	0,3	2,2
4-O-5-DFS	2,2	0,1	3,2	2,3	0,1	2,4	n.b.			n.b.		
FS-CBD	7,1	0,2	2,3	9,1	0,1	1,5	8,6	0,2	2,2	9,0	0,1	1,3
<b><math>\Sigma</math> Trimere</b>	<b>163,9</b>	<b>1,2</b>	<b>0,7</b>	<b>180,7</b>	<b>4,1</b>	<b>2,3</b>	<b>27,9</b>	<b>0,3</b>	<b>0,9</b>	<b>30,4</b>	<b>0,4</b>	<b>1,4</b>
5-5/8-O-4-TriFS	37,9	0,6	1,6	41,6	1,1	2,7	5,8	0,1	2,3	6,2	0,2	4,0
8-5(nc)/5-5-TriFS	38,3	0,3	0,8	45,6	0,9	2,1	5,5	0,1	2,6	5,8	0,2	3,6
8-8(c)/8-O-4-TriFS	26,6	0,2	0,6	27,0	0,2	0,6	4,4	0,1	2,4	4,7	0,1	1,6
8-O-4/8-O-4-TriFS	19,6	0,2	1,2	21,2	0,3	1,6	3,4	0,2	4,7	3,7	0,1	3,2
8-O-4/8-5(nc)-TriFS	11,6	0,1	1,1	12,5	0,4	2,9	1,9	0,1	4,3	1,9	0,1	4,0
5-5/8-8(c)-TriFS	15,4	0,3	2,0	17,2	1,2	6,8	5,4	0,2	4,5	6,3	0,3	4,2
8-8(c)/5-5-TriFS	2,7	0,1	1,9	3,0	0,2	8,1	n.b.			n.b.		
5-5/8-8(nc)-TriFS	8,3	0,2	1,9	8,7	0,1	1,5	0,6	0,03	4,3	0,7	0,03	4,9
8-8(nc)/8-O-4-TriFS	3,6	0,1	2,2	3,9	0,1	2,1	n.b.			n.b.		

**Tabelle 23:** Massenspektrometrische Parameter der LC-MS/MS-Methode unter Verwendung von 5-5(me)-Dehydrodiferulasäure (DFS) als interne Standardsubstanz. TriFS: Dehydrotriferulasäure, FS-CBD: Ferulasäure-Cyclobutandimer. c: cyclisch, nc: nicht cyclisch, dc: decarboxyliert, me: methyl, THF: Tetrahydrofuran.

Analyt	Retentionszeit [min]	<i>m/z</i> Mutterion	<i>m/z</i> Quantifier	<i>m/z</i> Qualifier	Cone Spannung [V]	Kollisionsenergie Spannung [V]	Aufnahmezeitraum [min]
FS-CBD	13,0	387	134	149	34	33	5,0–15,0
8-8(c)-DFS	16,3	385	341	–	20	12	14,0–17,1
8-8(THF)-DFS	16,8	403	136	151	32	21	16,5–17,9
8-8(nc)-DFS	17,6	385	173	282	22	15	17,0–19,0
8-5(nc)-DFS	20,2	385	341	297	26	15	18,5–21,2
5-5/8-8(c)-TriFS	21,7	577	533	489	26	17	20,8–25,0
8-8(c)/5-5-TriFS	27,8	577	489	–	17	17	25,0–28,8
8-O-4/8-5(nc)-TriFS	28,3	577	193	355	23	18	27,0–29,3
5-5/8-8(nc)-TriFS	29,9	533	445	489	30	19	28,8–30,8
5-5-DFS	31,0	385	282	326	36	24	30,8–32,5
8-5(nc)/5-5-TriFS	31,0	533	489	–	30	16	30,6–32,5
8-8(c)/8-O-4-TriFS	31,7	577	341	–	22	18	30,8–33,5
8-O-4-DFS	35,0	385	193	–	22	12	32,5–36,0
8-5(c)-DFS	35,8	341	267	282	35	25	35,1–36,8
8-8(nc)/8-O-4-TriFS	37,0	577	297	–	25	24	36,2–39,0
4-O-5-DFS	40,1	385	370	309	38	20	38,0–42,0
5-5/8-O-4-TriFS	43,7	577	355	489	37	24	42,0–46,0
5-5(me)-DFS	43,7	399	293	367	34	22	42,0–46,0
8-O-4/8-O-4-TriFS	48,3	577	193	–	25	25	46,0–49,4
8-5(dc)-DFS	49,5	341	267	282	35	25	49,0–52,0

**Tabelle 24:** Kalibrierdaten der LC-MS/MS-Methode unter Verwendung von 5-5(methyl (me))-Dehydrodiferulasäure (DFS) als interne Standardsubstanz. TriFS: Dehydrotriferulasäure, FS-CBD: Ferulasäure-Cyclobutandimer,  $R^2$ : Bestimmtheitsmaß, PG: Prüfgrößen des Mandel-Tests (Formeln 4–6), nc: nicht cyclisch, c: cyclisch, dc: decarboxyliert, THF: Tetrahydrofuran.

Analyt	Kalibriergleichung	$R^2$	PG
8-O-4-DFS	$y = 0,35548x - 0,000701$	0,9999	0,8
5-5-DFS	$y = 0,38152x + 0,00135$	0,9994	2,0
8-5(nc)-DFS	$y = 0,4545x - 0,00228$	0,9985	2,5
8-5(c)-DFS	$y = 0,79533x - 0,00516$	0,9975	1,7
8-5(dc)-DFS	$y = 0,59953x - 0,0056$	0,9982	2,1
8-8(c)-DFS	$y = 0,60885x - 0,00409$	0,9988	0,3
8-8(THF)-DFS	$y = 0,05416x - 0,00064$	0,9999	0,2
8-8(nc)-DFS	$y = 0,63229x - 0,00575$	0,9983	0,3
4-O-5-DFS	$y = 0,26432x + 0,000237$	0,9988	1,0
FS-CBD	$y = 0,40778x - 0,00086$	0,9993	0,3
5-5/8-O-4-TriFS	$y = 0,26275x - 0,00083$	0,9968	0,7
8-5(nc)/5-5-TriFS	$y = 0,59201x - 0,0013$	0,9992	0,7
8-8(c)/8-O-4-TriFS	$y = 0,26287x - 0,00298$	0,9977	0,4
8-O-4/8-O-4-TriFS	$y = 0,47334x - 0,00114$	0,9985	1,3
8-O-4/8-5(nc)-TriFS	$y = 0,19341x - 0,00218$	0,9987	0,4
5-5/8-8(c)-TriFS	$y = 0,35499x - 0,0049$	0,9968	0,2
8-8(c)/5-5-TriFS	$y = 0,39184x - 0,0035$	0,9988	0,7
5-5/8-8(nc)-TriFS	$y = 0,45382x - 0,00718$	0,9977	0,3
8-8(nc)/8-O-4-TriFS	$y = 0,57922x - 0,00751$	0,9955	0,5

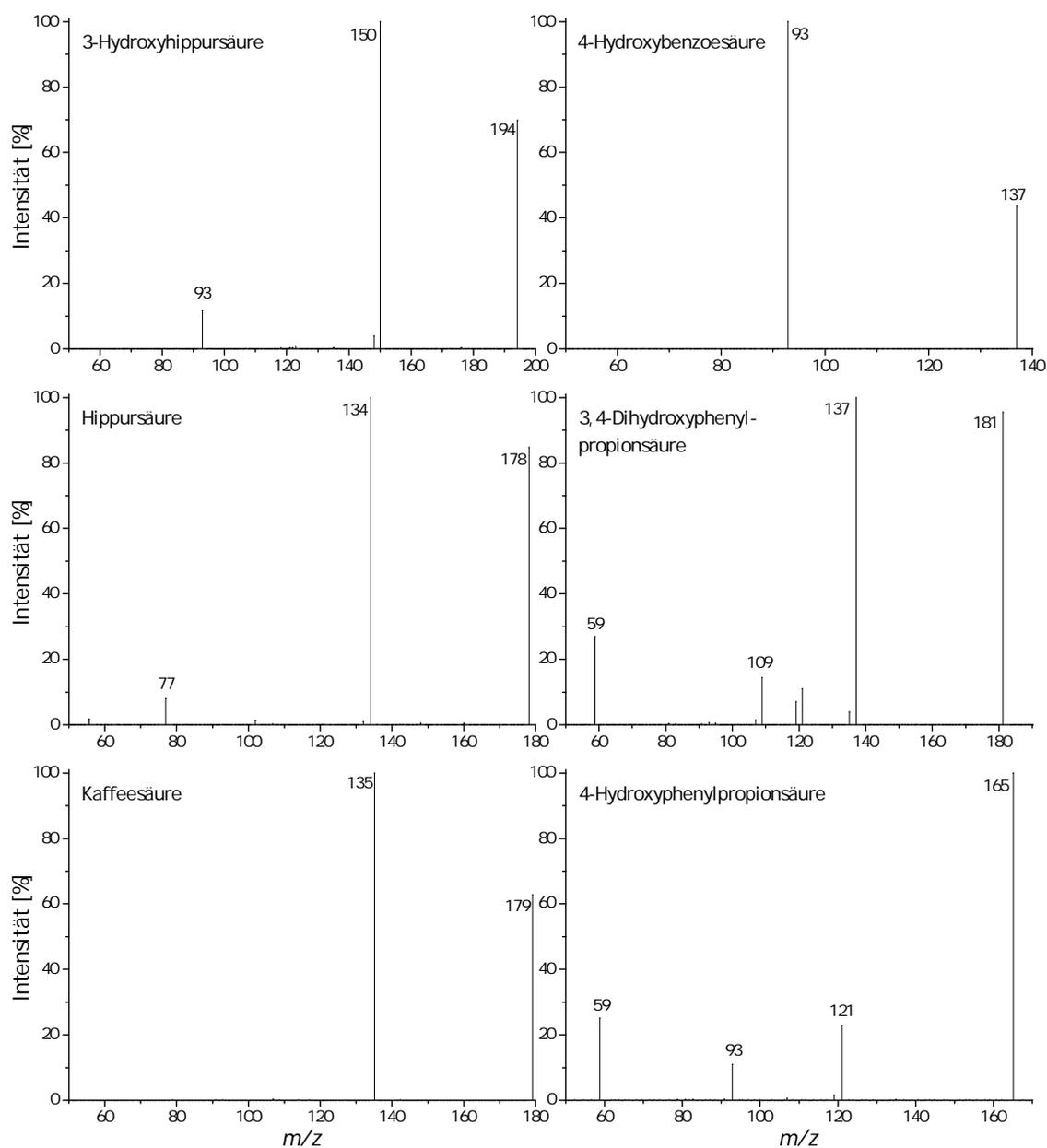
**Tabelle 25:** Ermittelte Gehalte von Ferulasäure (FS), *p*-Cumarsäure (*p*-CS), Ferulasäure-Cyclobutandimern (FS-CBD) sowie der Dehydrodiferulasäuren (DFS) und Dehydrotriferulasäuren (TriFS) in den unkorrigierten, unlöslichen Ballaststoffen von Mais- und Weizenkaryopsen, Zuckerrübenschnitzel und Amaranthsaamen [ $\mu\text{g/g}$ ]. *p*-CS und FS wurden mittels UV-Detektion unter Verwendung von *o*-Cumarsäure als interne Standardsubstanz bestimmt und die Oligoferulasäuren wurden mittels LC-MS/MS unter Verwendung von 5-5(methyl)-DFS als interne Standardsubstanz quantifiziert. MW: Mittelwert ( $n=4$ ), STD: Standardabweichung, nc: nicht cyclisch, c: cyclisch, THF: Tetrahydrofuran, n.b.: nicht bestimmbar.

	Mais Probe 1			Mais Probe 2			Weizen Probe 1			Weizen Probe 2		
	MW	STD	STD [%]	MW	STD	STD [%]	MW	STD	STD [%]	MW	STD	STD [%]
<i>cis-p</i> -CS	n.b.			n.b.			n.b.			n.b.		
<i>trans-p</i> -CS	824,2	7,5	0,9	715,4	3,5	0,5	165,3	5,7	3,5	132,7	0,2	0,2
<i>cis</i> -FS	2134,7	160,6	7,5	1430,3	27,9	1,9	1584,2	57,1	3,6	1433,2	7,9	0,6
<i>trans</i> -FS	19881,2	197,3	1,0	22579,2	280,7	1,2	4841,9	67,8	1,4	5038,7	59,2	1,2
<b><math>\Sigma</math> Dimere</b>	<b>7111,4</b>	<b>289,1</b>	<b>4,1</b>	<b>7280,8</b>	<b>74,5</b>	<b>1,0</b>	<b>1038,4</b>	<b>6,0</b>	<b>0,6</b>	<b>987,4</b>	<b>12,0</b>	<b>1,2</b>
8-O-4-DFS	2416,3	52,1	2,2	2280,5	31,0	1,4	241,5	1,7	0,7	224,6	2,0	0,9
5-5-DFS	1627,2	52,3	3,2	1920,9	18,4	1,0	164,6	0,7	0,4	165,5	3,3	2,0
$\Sigma$ 8-5-DFS	1620,0	111,0	6,8	1726,9	18,3	1,1	367,5	2,6	0,7	354,9	5,7	1,6
8-8(c)-DFS	633,1	35,3	5,6	589,6	10,2	1,7	114,8	0,7	0,6	111,4	1,6	1,4
$\Sigma$ 8-8(THF)-DFS	645,9	41,0	6,4	595,3	6,9	1,2	67,8	1,2	1,8	66,5	1,6	2,4
8-8(nc)-DFS	73,6	4,5	6,1	63,6	0,03	0,1	34,9	0,8	2,3	27,1	0,4	1,4
4-O-5-DFS	71,5	1,7	2,4	71,6	1,9	2,6	9,0	0,1	1,6	8,0	0,1	1,4
FS-CBD	23,8	0,6	2,7	32,3	1,1	3,5	38,3	1,1	2,8	29,3	0,2	0,7
<b><math>\Sigma</math> Trimere</b>	<b>1167,2</b>	<b>30,3</b>	<b>2,6</b>	<b>1350,4</b>	<b>14,1</b>	<b>1,0</b>	<b>227,3</b>	<b>1,1</b>	<b>0,5</b>	<b>198,1</b>	<b>2,5</b>	<b>1,3</b>
5-5/8-O-4-TriFS	469,6	18,1	3,8	576,4	8,6	1,5	63,8	0,6	0,9	64,8	1,1	1,7
8-5(nc)/5-5-TriFS	157,9	4,5	2,8	187,2	1,5	0,8	36,4	0,3	0,8	28,2	0,2	0,8
8-8(c)/8-O-4-TriFS	163,4	13,5	8,3	184,1	1,9	1,0	28,1	0,3	1,2	23,9	0,5	2,2
8-O-4/8-O-4-TriFS	116,5	8,9	7,7	129,6	1,6	1,3	34,5	0,9	2,7	28,7	0,3	1,2
8-O-4/8-5(nc)-TriFS	91,2	8,8	9,6	96,0	1,1	1,1	39,7	0,2	0,6	31,9	0,8	2,6
5-5/8-8(c)-TriFS	71,7	0,6	0,8	74,3	0,6	0,9	10,4	0,1	1,2	9,0	0,1	1,4
8-8(c)/5-5-TriFS	53,6	5,1	9,5	61,6	1,5	2,4	7,8	0,1	1,0	6,2	0,2	2,8
5-5/8-8(nc)-TriFS	37,8	0,6	1,6	36,1	0,2	0,6	5,7	0,1	2,4	4,4	0,1	1,7
8-8(nc)/8-O-4-TriFS	5,5	0,2	4,0	5,0	0,1	2,2	n.b.			n.b.		
	Zuckerrübe Probe 1			Zuckerrübe Probe 2			Amaranth Probe 1			Amaranth Probe 2		
	MW	STD	STD [%]	MW	STD	STD [%]	MW	STD	STD [%]	MW	STD	STD [%]
<i>cis-p</i> -CS	n.n.			n.n.			n.n.			n.n.		
<i>trans-p</i> -CS	n.b.			n.b.			45,1	0,5	1,2	44,5	0,8	1,7
<i>cis</i> -FS	412,1	24,2	5,9	432,3	22,6	5,2	183,6	11,2	6,1	172,1	8,0	4,6
<i>trans</i> -FS	6814,7	71,1	1,0	7187,2	33,8	0,5	613,2	3,3	0,5	590,8	8,6	1,4
<b><math>\Sigma</math> Dimere</b>	<b>936,6</b>	<b>13,6</b>	<b>1,5</b>	<b>1005,7</b>	<b>12,9</b>	<b>1,3</b>	<b>158,7</b>	<b>1,3</b>	<b>0,8</b>	<b>162,0</b>	<b>2,7</b>	<b>1,6</b>
8-O-4-DFS	226,8	4,3	1,9	247,1	4,7	1,9	33,2	0,3	0,9	34,0	0,7	1,9
5-5-DFS	146,3	2,5	1,7	159,1	2,9	1,8	20,8	0,1	0,6	19,3	0,2	1,0
$\Sigma$ 8-5-DFS	380,7	4,1	1,1	396,1	5,2	1,3	41,9	0,3	0,6	43,3	0,6	1,3
8-8(c)-DFS	62,8	1,0	1,5	69,5	1,1	1,5	36,8	0,2	0,5	37,9	1,0	2,6
$\Sigma$ 8-8(THF)-DFS	59,7	3,0	5,0	65,9	2,3	3,5	6,5	0,2	2,7	6,8	0,2	3,5
8-8(nc)-DFS	48,8	0,9	1,9	55,1	0,7	1,3	9,3	0,1	1,1	9,6	0,1	1,4
4-O-5-DFS	2,4	0,05	2,0	2,4	0,1	4,3	n.b.			n.b.		
FS-CBD	8,9	0,3	3,7	10,6	0,4	3,8	9,9	0,2	1,9	10,7	0,3	2,5
<b><math>\Sigma</math> Trimere</b>	<b>162,3</b>	<b>2,4</b>	<b>1,5</b>	<b>165,6</b>	<b>4,4</b>	<b>2,7</b>	<b>24,2</b>	<b>0,3</b>	<b>1,4</b>	<b>24,2</b>	<b>0,3</b>	<b>1,2</b>
5-5/8-O-4-TriFS	44,3	0,5	1,0	45,3	1,3	3,0	7,2	0,1	1,8	7,2	0,1	1,4
8-5(nc)/5-5-TriFS	23,4	0,4	1,6	23,5	0,8	3,3	2,5	0,1	2,6	2,5	0,03	1,3
8-8(c)/8-O-4-TriFS	24,4	0,6	2,3	24,9	0,6	2,4	4,0	0,1	2,3	4,0	0,1	2,2
8-O-4/8-O-4-TriFS	21,8	0,4	1,7	23,0	0,5	2,0	3,6	0,1	2,8	3,6	0,05	1,3
8-O-4/8-5(nc)-TriFS	23,0	0,5	2,2	23,5	0,7	2,8	2,9	0,1	2,5	2,9	0,1	3,4
5-5/8-8(c)-TriFS	7,5	0,2	2,1	7,4	0,4	5,1	2,4	0,1	3,1	2,4	0,1	4,1
8-8(c)/5-5-TriFS	2,6	0,1	2,7	2,7	0,1	4,7	n.b.			n.b.		
5-5/8-8(nc)-TriFS	11,8	0,2	1,5	11,9	0,4	3,4	0,8	0,02	2,0	0,7	0,03	4,1
8-8(nc)/8-O-4-TriFS	3,4	0,1	1,9	3,4	0,1	2,4	n.b.			n.b.		

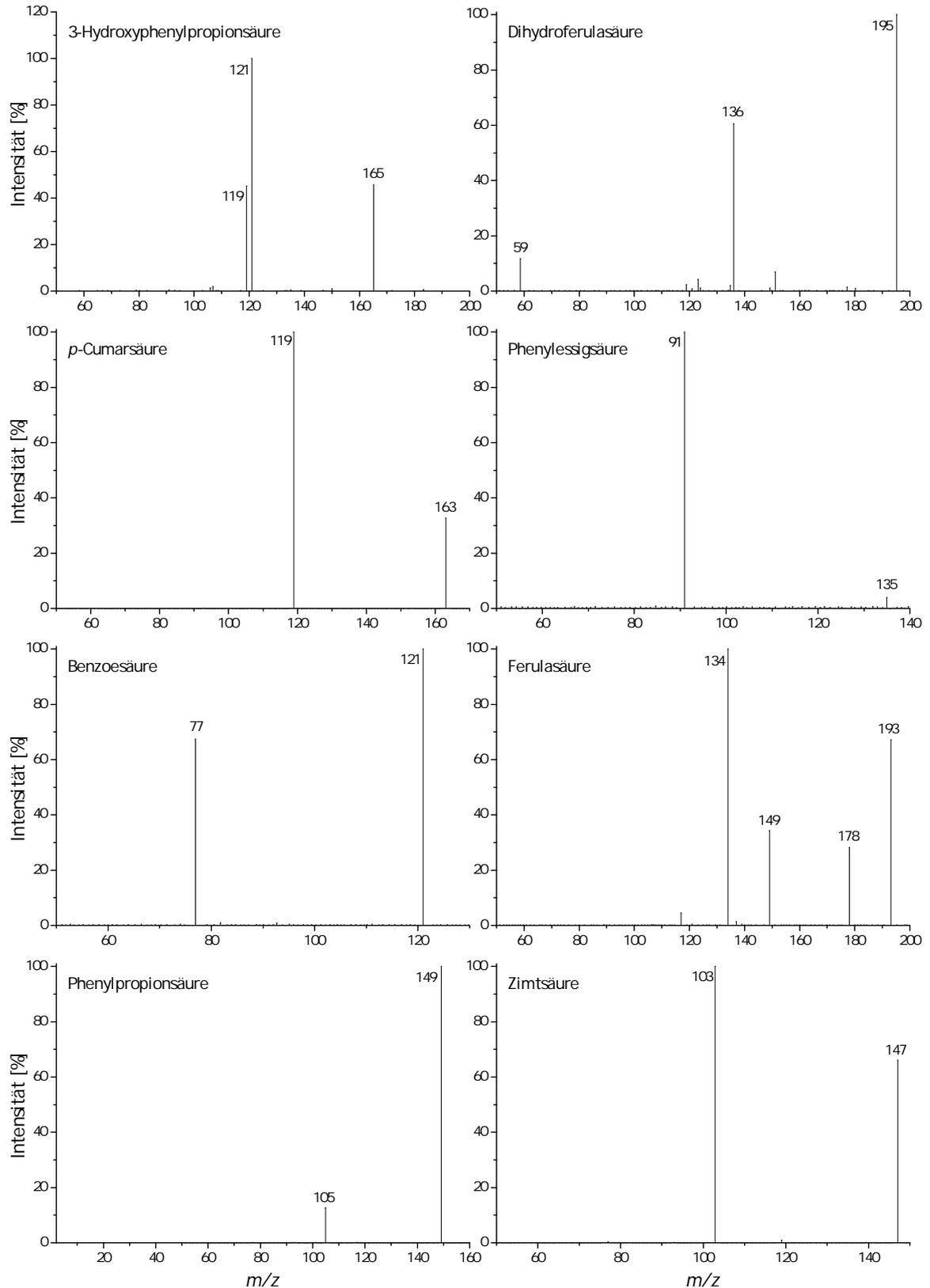
**Tabelle 26:** Ergebnisse der Wiederfindungsversuche, bei denen Leermatrizes mit Analyten und internen Standardsubstanzen versetzt und analysiert wurden. Links: LC-MS/MS-Methode unter Verwendung der internen Standardsubstanz 5-5(methyl)-Dehydrodiferulasäure (DFS), rechts: Stabilisotopenverdünnungsanalyse. MW: Mittelwert ( $n=4$ ), STD: Standardabweichung. nc: nicht cyclisch, c: cyclisch, THF: Tetrahydrofuran, TriFS: Dehydrotriferulasäure, FS-CBD: Ferulasäure-Cyclobutandimer

	Typ-II-Zellwandimitat		Apfel-UBS		Typ-II-Zellwandimitat		Apfel-UBS	
	MW [%]	STD [%]	MW [%]	STD [%]	MW [%]	STD [%]	MW [%]	STD [%]
<b>∑ Dimere</b>	<b>91,4</b>	<b>2,6</b>	<b>88,4</b>	<b>2,7</b>	<b>94,4</b>	<b>0,6</b>	<b>93,8</b>	<b>0,8</b>
8-O-4-DFS	101,2	3,5	93,6	3,5	97,5	0,7	96,8	0,6
5-5-DFS	89,9	0,9	92,2	1,3	88,2	1,6	87,0	2,9
∑ 8-5-DFS	82,5	2,2	82,7	3,5	96,2	0,5	95,6	0,5
8-5(nc)-DFS	96,9	2,5	94,6	2,6	99,5	0,3	99,1	0,5
8-5(c)-DFS	90,2	2,7	80,6	3,1	86,5	0,8	86,6	0,3
8-5(dc)	9,1	2,6	39,5	17,3	100,8	1,2	98,0	1,1
8-8(c)-DFS	88,5	10,3	77,8	2,7	91,7	0,7	91,3	0,6
8-8(THF)-DFS	97,2	6,5	92,5	2,3	99,1	0,5	99,4	1,6
8-8(nc)-DFS	100,9	4,5	96,0	4,8	90,4	0,6	90,3	0,4
4-O-5-DFS	111,1	3,4	112,8	3,1	100,5	3,1	98,8	2,1
FS-CBD	100,5	4,1	99,8	5,1	86,2	0,2	84,4	0,3
<b>∑ Trimere</b>	<b>88,1</b>	<b>3,8</b>	<b>83,4</b>	<b>1,2</b>	<b>99,9</b>	<b>0,7</b>	<b>98,8</b>	<b>0,4</b>
5-5/8-O-4-TriFS	107,8	5,1	102,2	2,9	101,2	0,7	99,9	0,5
8-5(nc)/5-5-TriFS	80,5	3,0	77,3	2,0	100,3	0,6	99,2	0,5
8-8(c)/8-O-4-TriFS	81,7	5,2	76,6	1,7	103,7	0,6	102,2	0,8
8-O-4/8-O-4-TriFS	110,9	4,8	102,4	0,5	99,6	0,9	98,7	0,3
8-O-4/8-5(nc)-TriFS	97,4	6,3	88,5	0,9	99,2	1,0	98,0	0,8
5-5/8-8(c)-TriFS	35,0	1,0	34,6	2,1	100,5	2,9	100,7	4,0
8-8(c)/5-5-TriFS	88,5	5,2	83,5	1,8	101,6	2,1	99,8	1,4
5-5/8-8(nc)-TriFS	101,5	4,6	95,5	1,8	86,6	1,1	85,1	1,2
8-8(nc)/8-O-4-TriFS	77,7	2,4	69,0	6,4	97,2	1,6	97,0	0,2

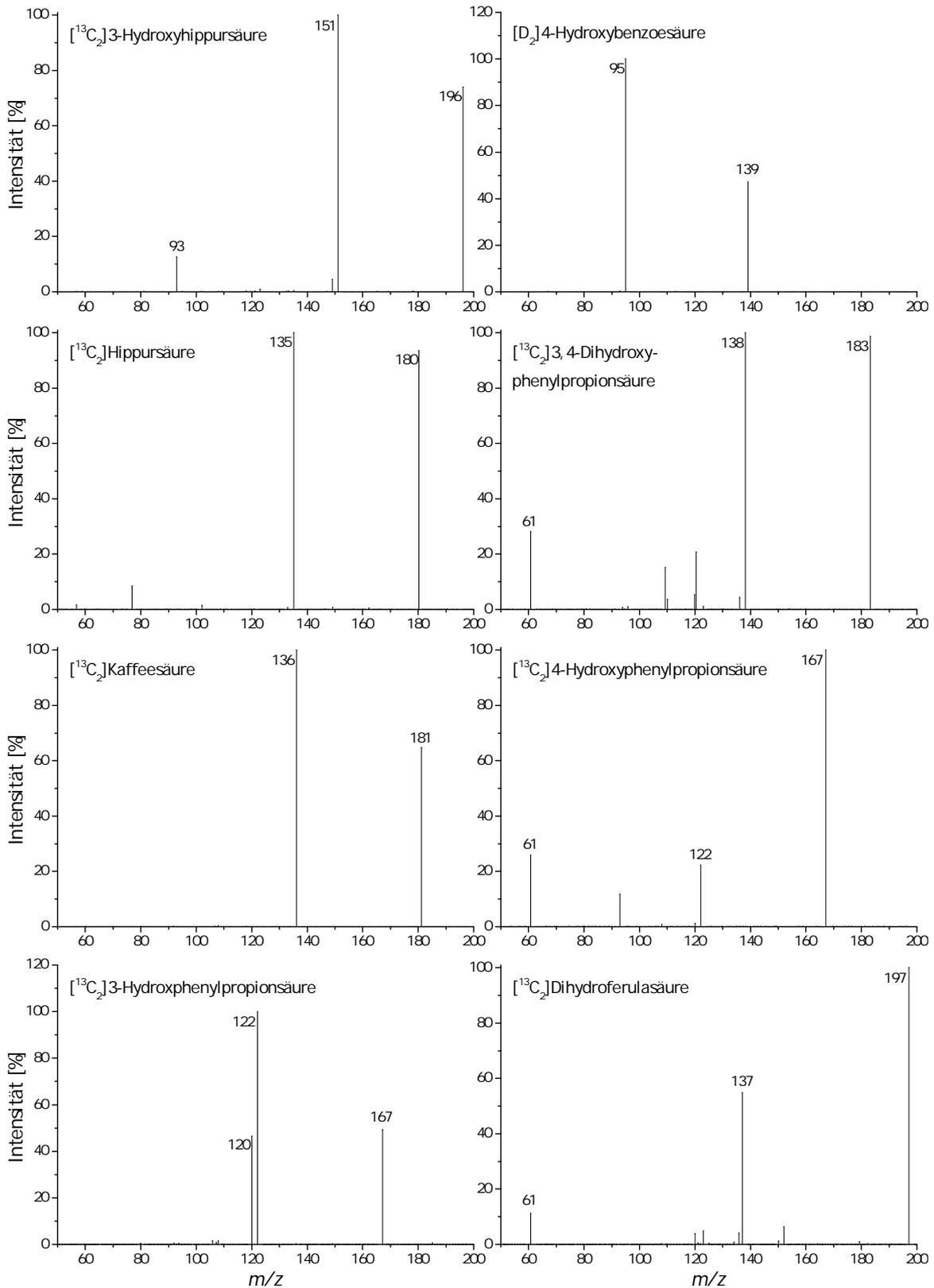
## ABBILDUNGEN



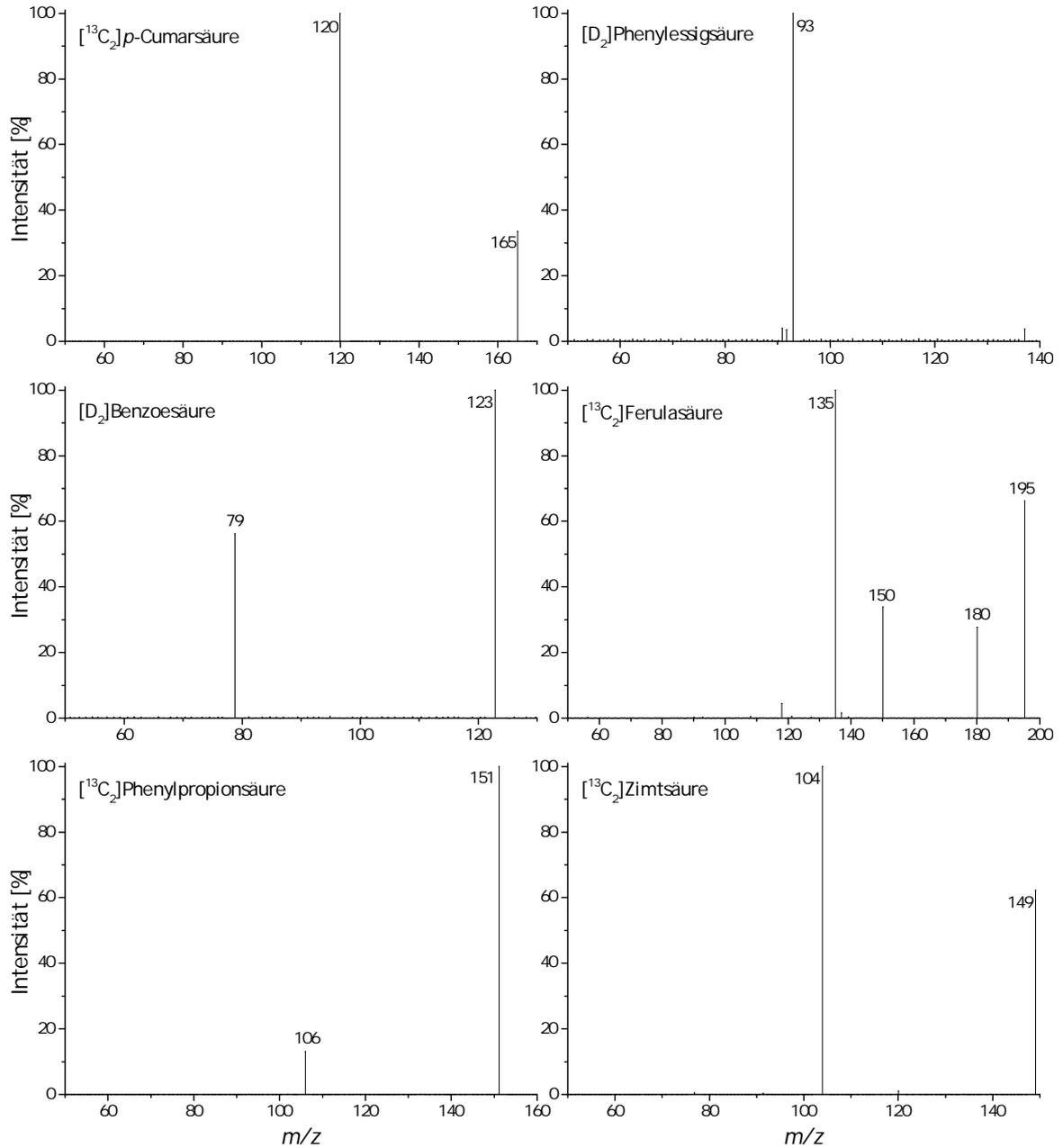
**Abbildung 44:** Massenspektren der Standardsubstanzen, die zur Entwicklung einer LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von Ferulasäure und Ferulasäure-Metaboliten in Milch verwendet wurden, nach flüssigchromatographischer Trennung und Elektrospray-Ionisation im negativen Modus.



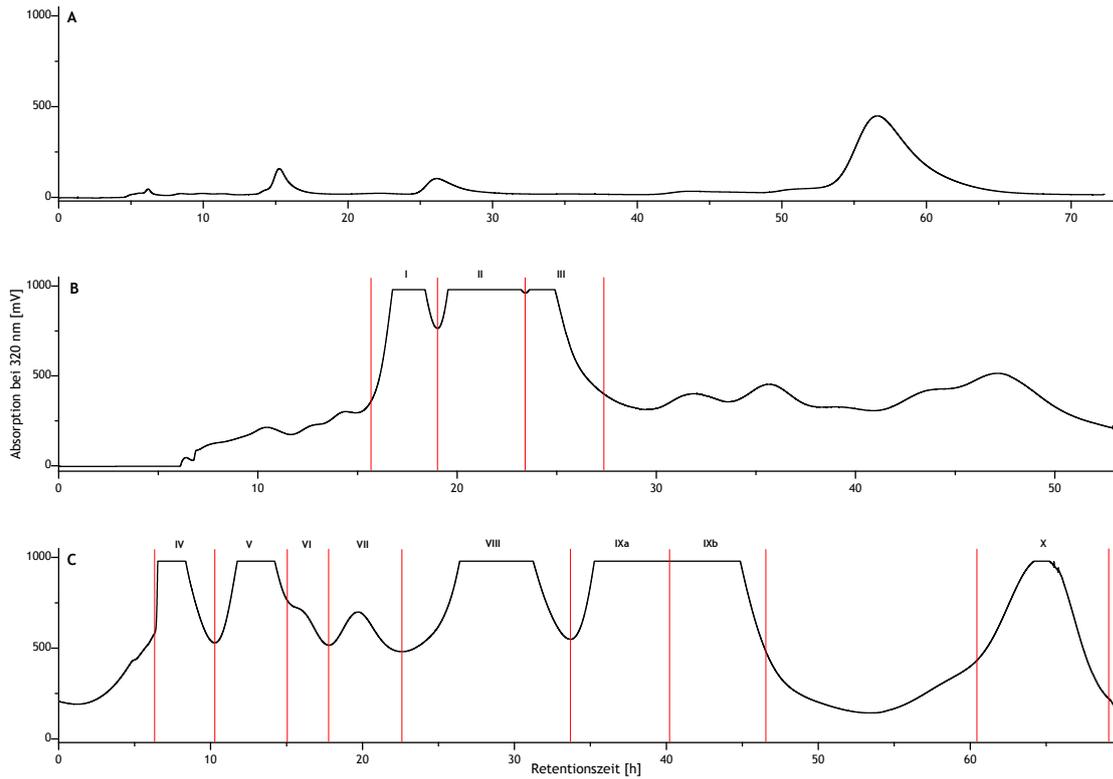
**Abbildung 45:** Massenspektren der Standardsubstanzen, die zur Entwicklung einer LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von Ferulasäure und Ferulasäure-Metaboliten in Milch verwendet wurden, nach flüssigchromatographischer Trennung und Elektrospray-Ionisation im negativen Modus.



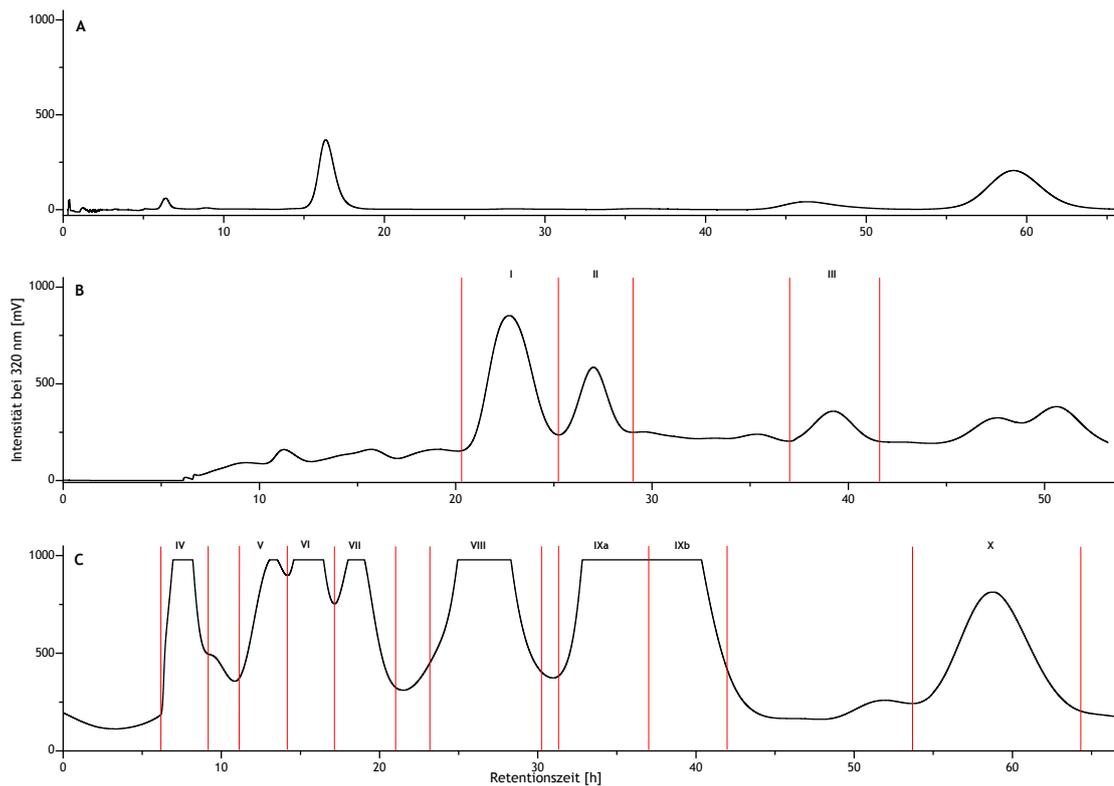
**Abbildung 46:** Massenspektren der isotopenmarkierten Standardsubstanzen, die zur Entwicklung einer LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von Ferulasäure und Ferulasäure-Metaboliten in Milch verwendet wurden, nach flüssigchromatographischer Trennung und Elektrospray-Ionisation im negativen Modus.



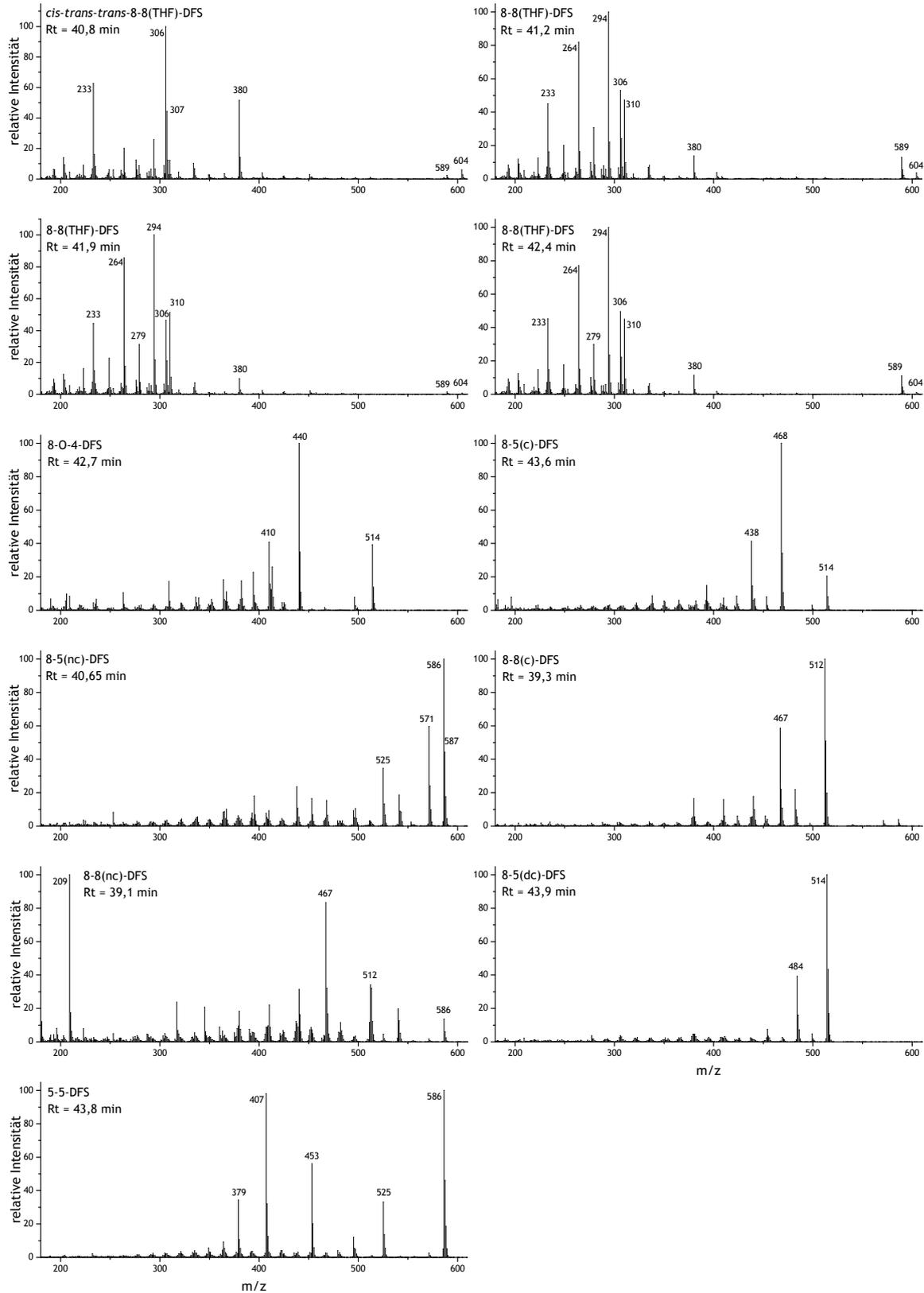
**Abbildung 47:** Massenspektren der isotopenmarkierten Standardsubstanzen, die zur Entwicklung einer LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von Ferulasäure und Ferulasäure-Metaboliten in Milch verwendet wurden, nach flüssigchromatographischer Trennung und Elektrospray-Ionisation im negativen Modus.



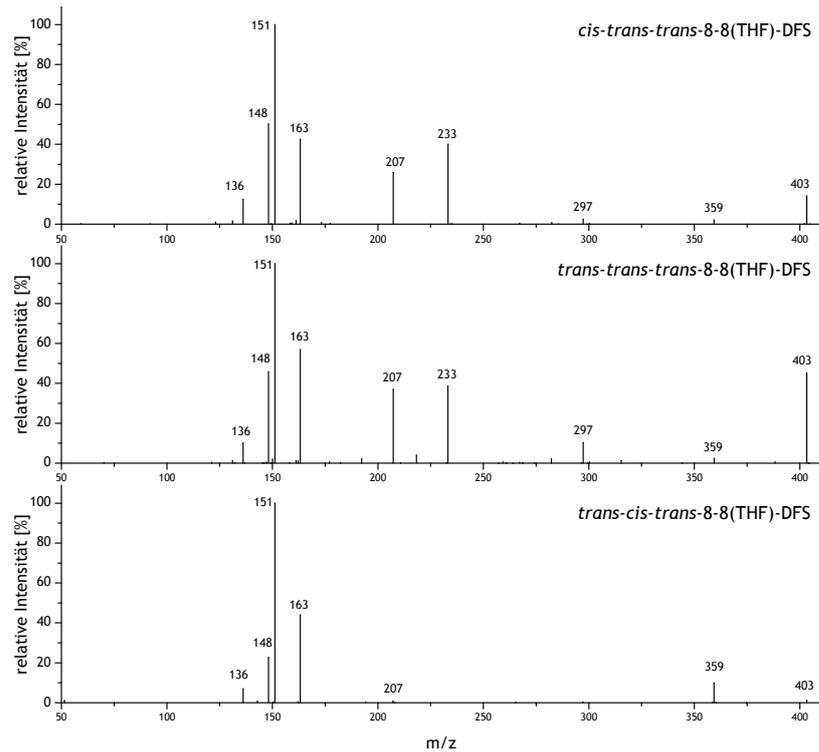
**Abbildung 48:** Chromatogramme der Sephadex LH-20-Trennung nach UV-Detektion in drei Elutionsschritten. So wurde ein Produktgemisch aufgereinigt, das hauptsächlich 5-5-Dehydrodiferulasäure, Dehydrotriferulasäuren und Dehydrotetraferulasäuren enthielt (Vergleich Abbildung 21). **A:** Trifluoressigsäure (0,5 mM):MeOH (95:5, v/v), 1,5 mL/min Flussrate; **B:** Trifluoressigsäure (0,5 mM):MeOH (50:50, v/v), 1 mL/min Flussrate; **C:** Trifluoressigsäure (0,5 mM):MeOH (40:60, v/v), 1 mL/min Flussrate.



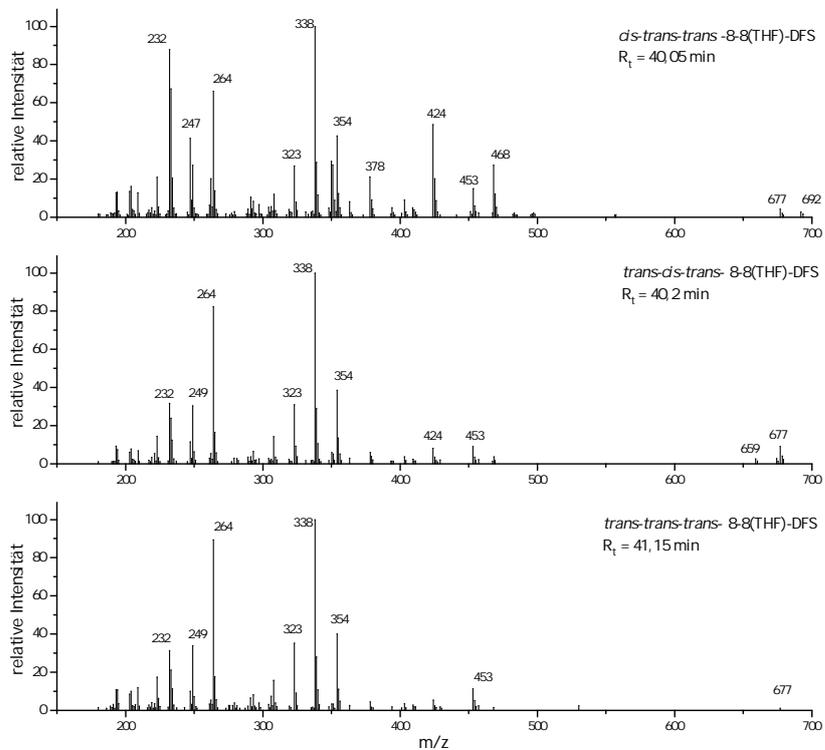
**Abbildung 49:** Chromatogramme der Sephadex LH-20-Trennung nach UV-Detektion in drei Elutionsschritten. So wurde ein Produktgemisch aufgereinigt, das hauptsächlich [ $^{13}\text{C}_2$ ]5-5-Dehydrodiferulasäure, [ $^{13}\text{C}_3$ ]Dehydrotriferulasäuren und [ $^{13}\text{C}_4$ ]Dehydrotetraferulasäuren enthielt (Vergleich Abbildung 21). **A:** Trifluoressigsäure (0,5 mM):MeOH (95:5, v/v), 1,5 mL/min Flussrate; **B:** Trifluoressigsäure (0,5 mM):MeOH (50:50, v/v), 1 mL/min Flussrate; **C:** Trifluoressigsäure (0,5 mM):MeOH (40:60, v/v), 1 mL/min Flussrate.



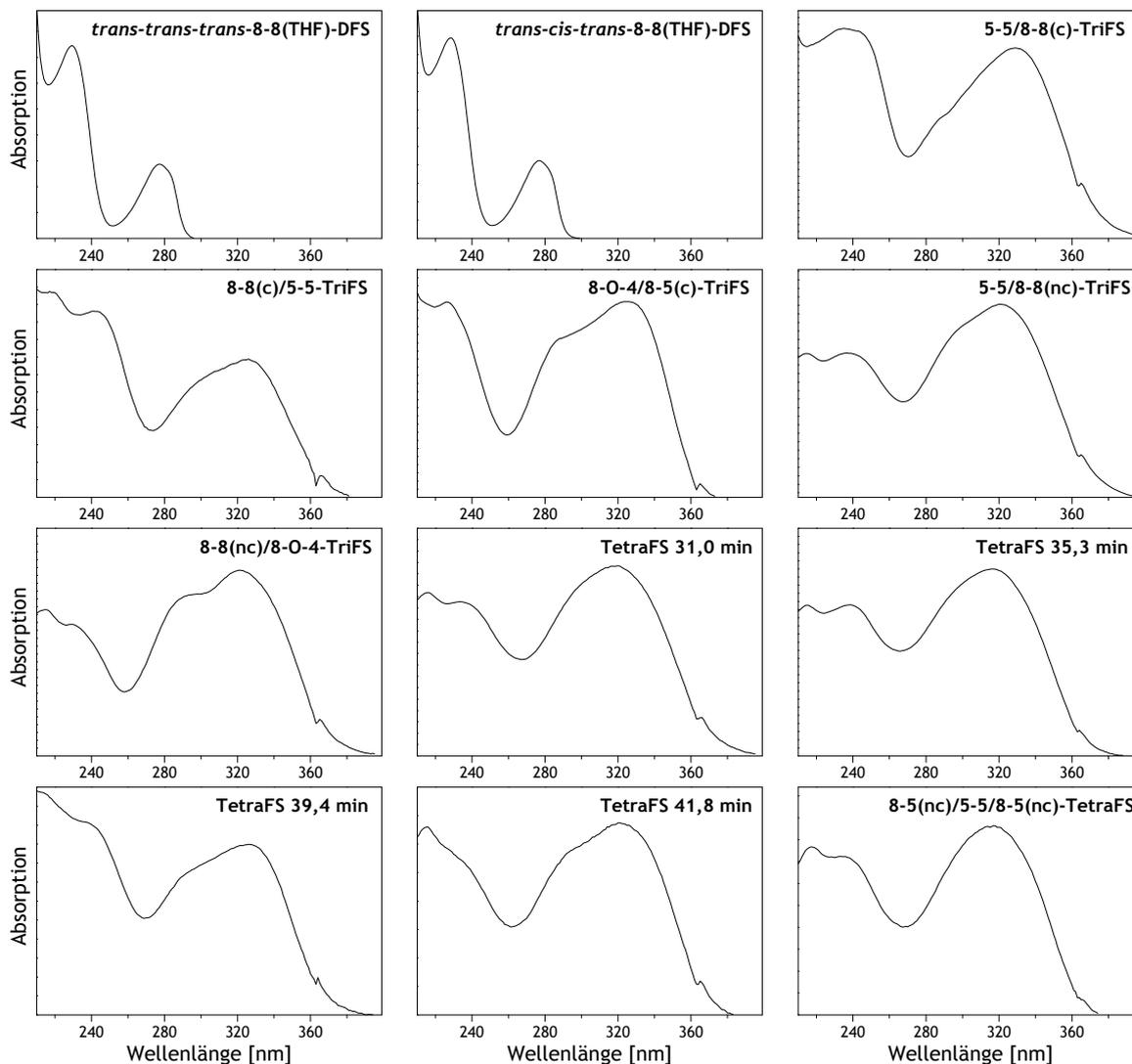
**Abbildung 50:** Massenspektren von Dehydrodiferulasäure (DFS)-Diethylestern nach Trimethylsilylierung, gaschromatographischer Trennung (Retentionszeiten (Rt) nach der Methode in Kapitel 8.3.7) und Elektronenstoß-Ionisation (70 eV). THF: Tetrahydrofuran, c: cyclisch, nc: nicht cyclisch, dc: decarboxyliert.



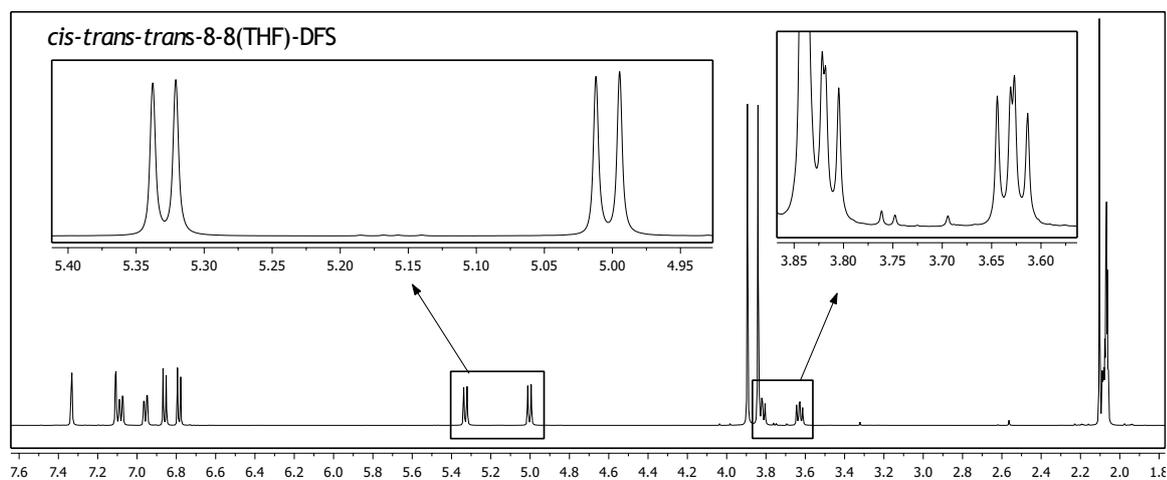
**Abbildung 51:** Massenspektren der synthetisierten 8-8(Tetrahydrofuran (THF))-Dehydrodiferulasäuren (DFS) nach flüssigchromatographischer Trennung und Elektrospray-Ionisation im Negativ-Modus.



**Abbildung 52:** Massenspektren der synthetisierten 8-8(Tetrahydrofuran (THF))-Dehydrodiferulasäuren (DFS) nach Trimethylsilylierung, gaschromatographischer Trennung und Elektronenstoß-Ionisation (70 eV). Retentionszeiten (Rt) nach der Methode in Kapitel 8.3.7.



**Abbildung 53:** UV-Spektren der im Rahmen dieser Arbeit erstmals beschriebenen Dehydrodiferulasäuren (DFS), Dehydrotriferulasäuren (TriFS) und Dehydrotetraferulasäuren (TetraFS). c: cyclisch, nc: nicht cyclisch, THF: Tetrahydrofuran.



**Abbildung 54:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der *cis-trans-trans*-8-8(Tetrahydrofuran)-Dehydrodiferulasäure (DFS).

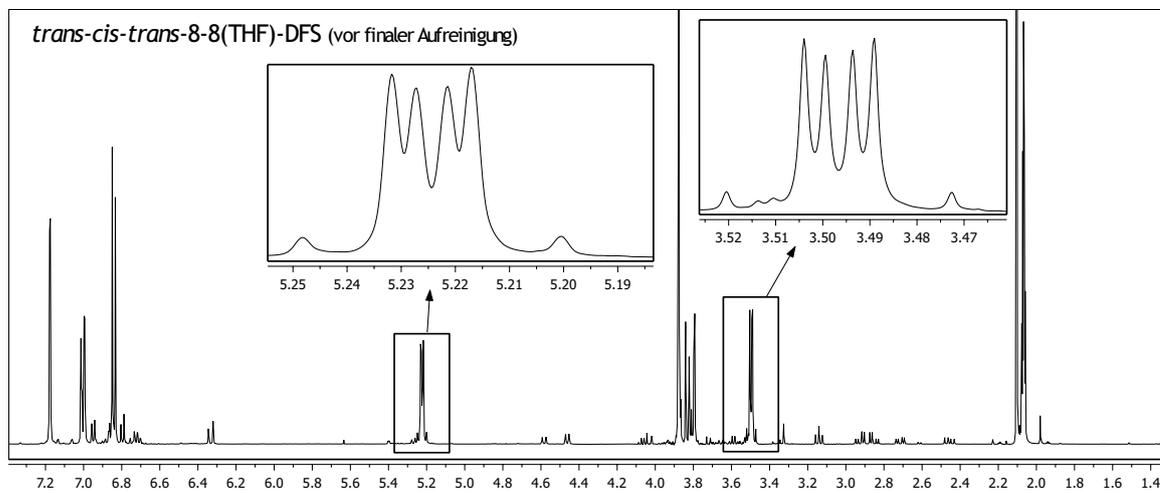


Abbildung 55:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der *trans-cis-trans*-8-8(Tetrahydrofuran)-Dehydrodiferulasäure (DFS).

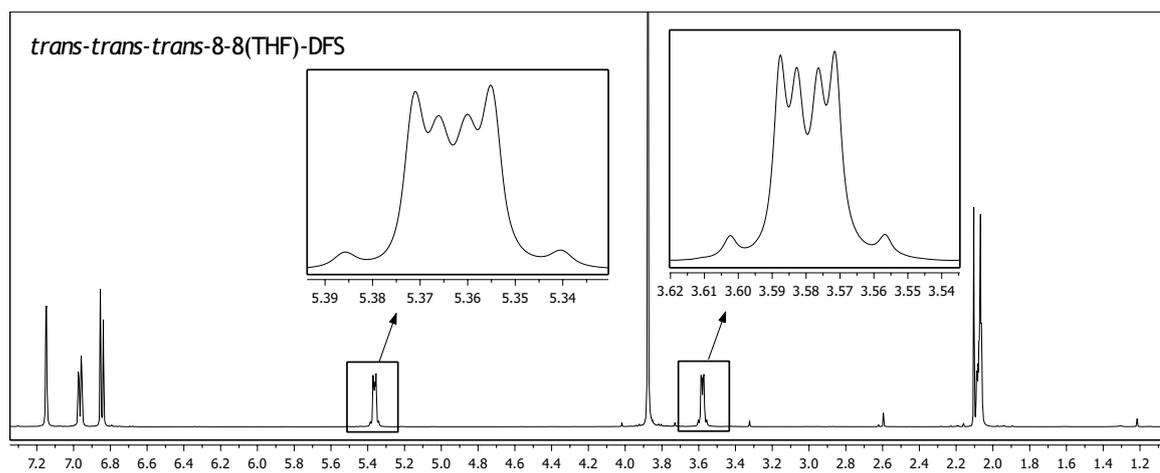
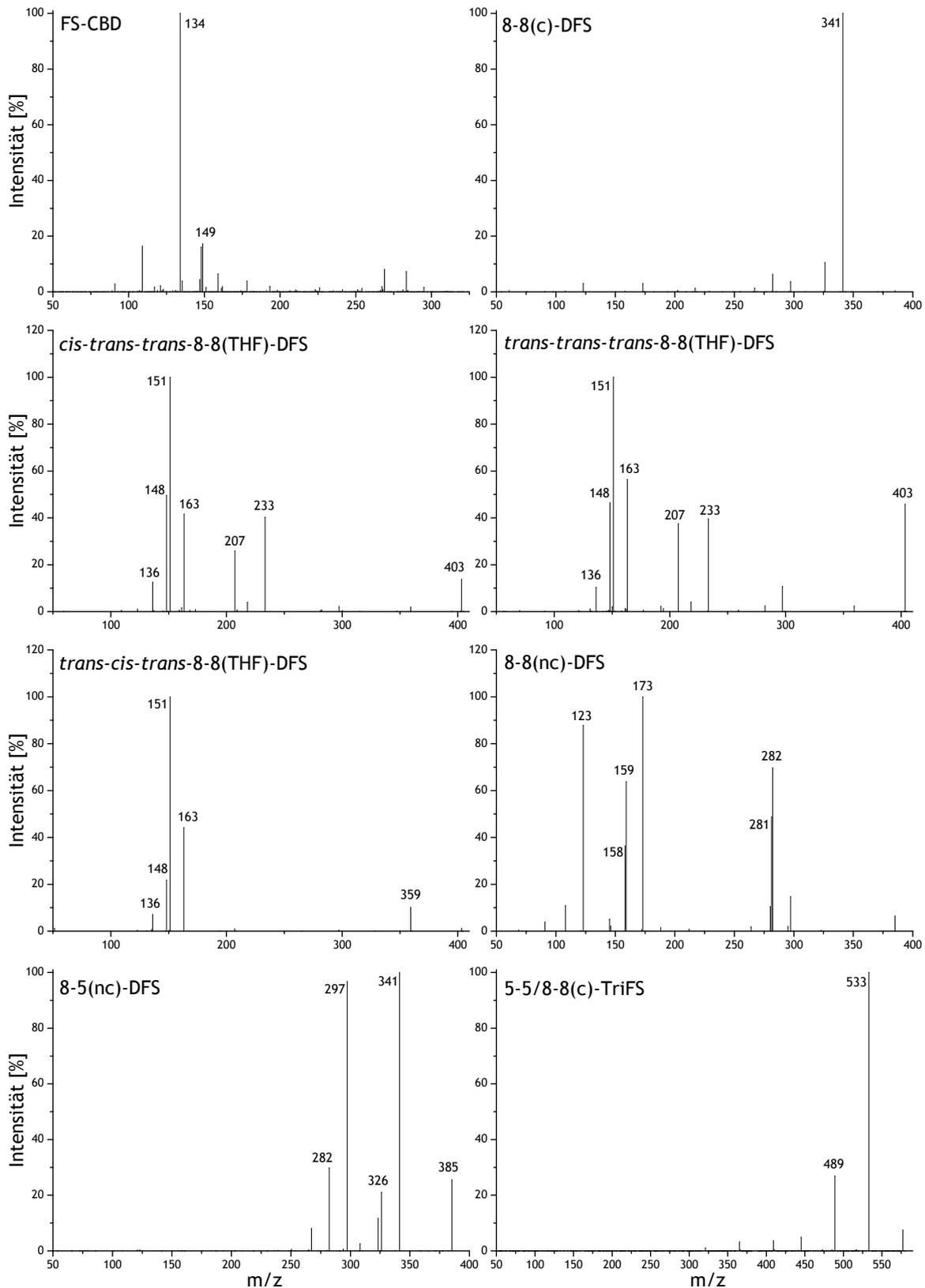
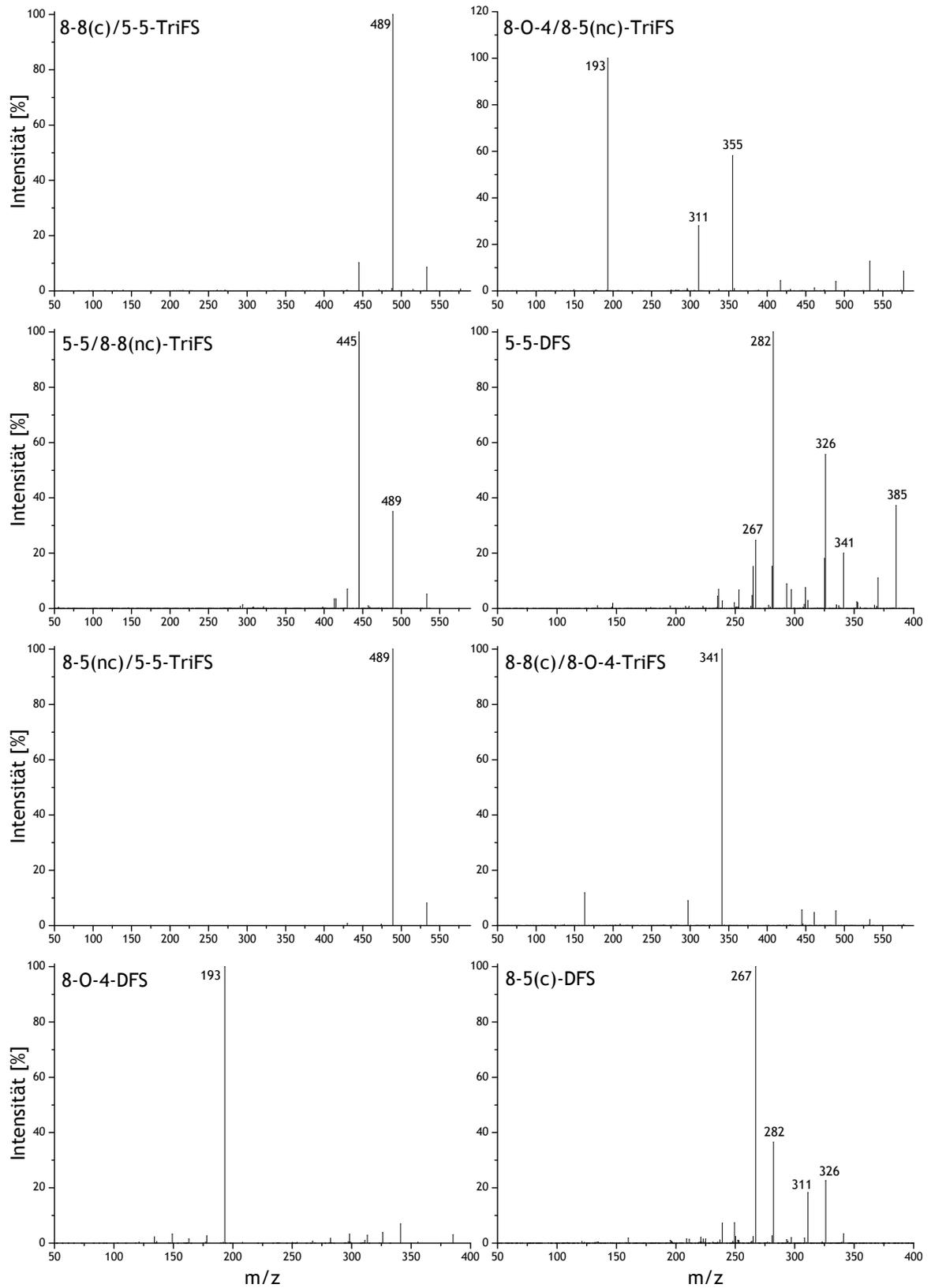


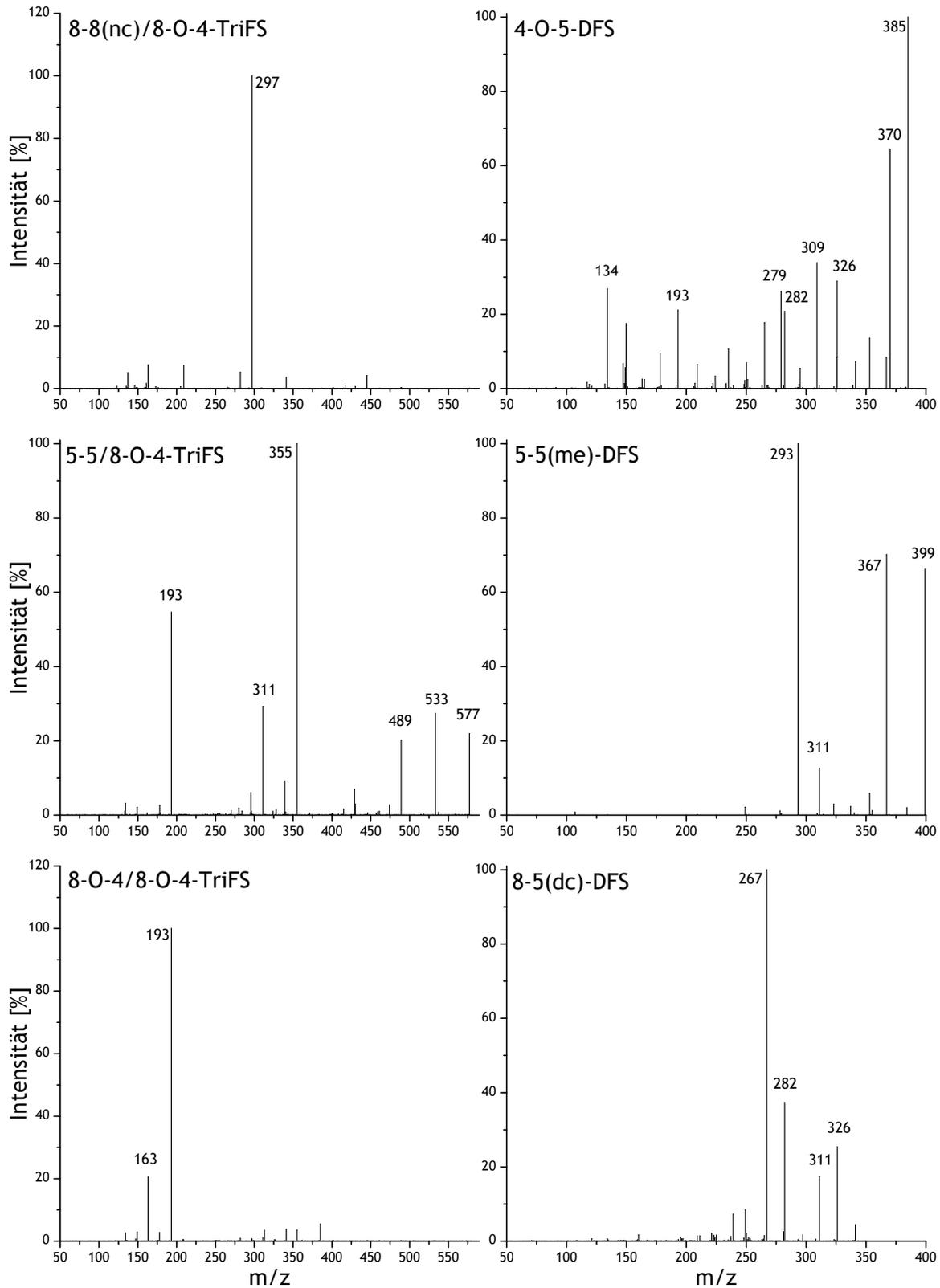
Abbildung 56:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der *trans-trans-trans*-8-8(Tetrahydrofuran)-Dehydrodiferulasäure (DFS).



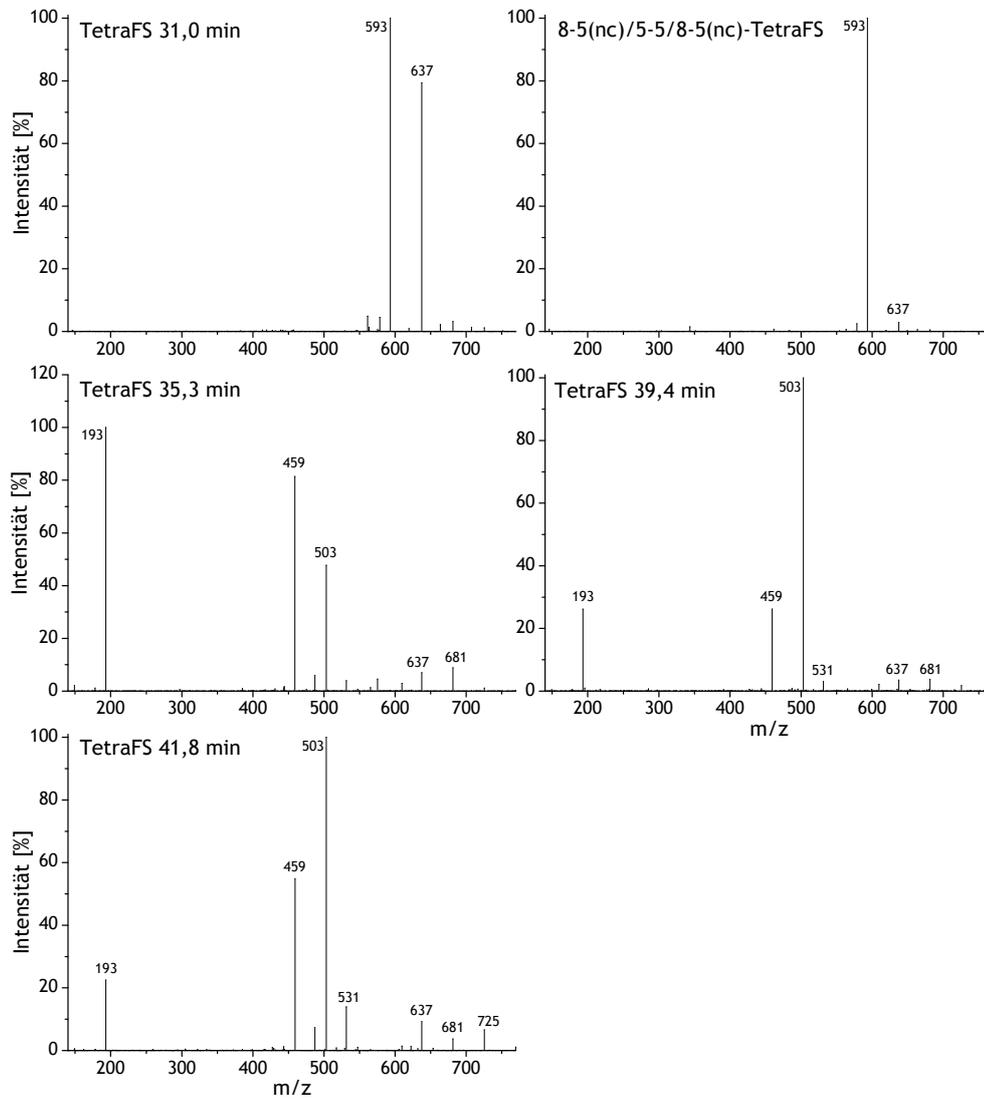
**Abbildung 57:** Massenspektren des Ferulasäure-Cyclobutandimers (FS-CBD) sowie der Dehydrodiferulasäuren (DFS) und Dehydrotriferulasäuren (TriFS) nach flüssigchromatographischer Trennung und Elektrospray-Ionisation im negativen Modus. c: cyclisch, THF: Tetrahydrofuran, nc: nicht cyclisch.



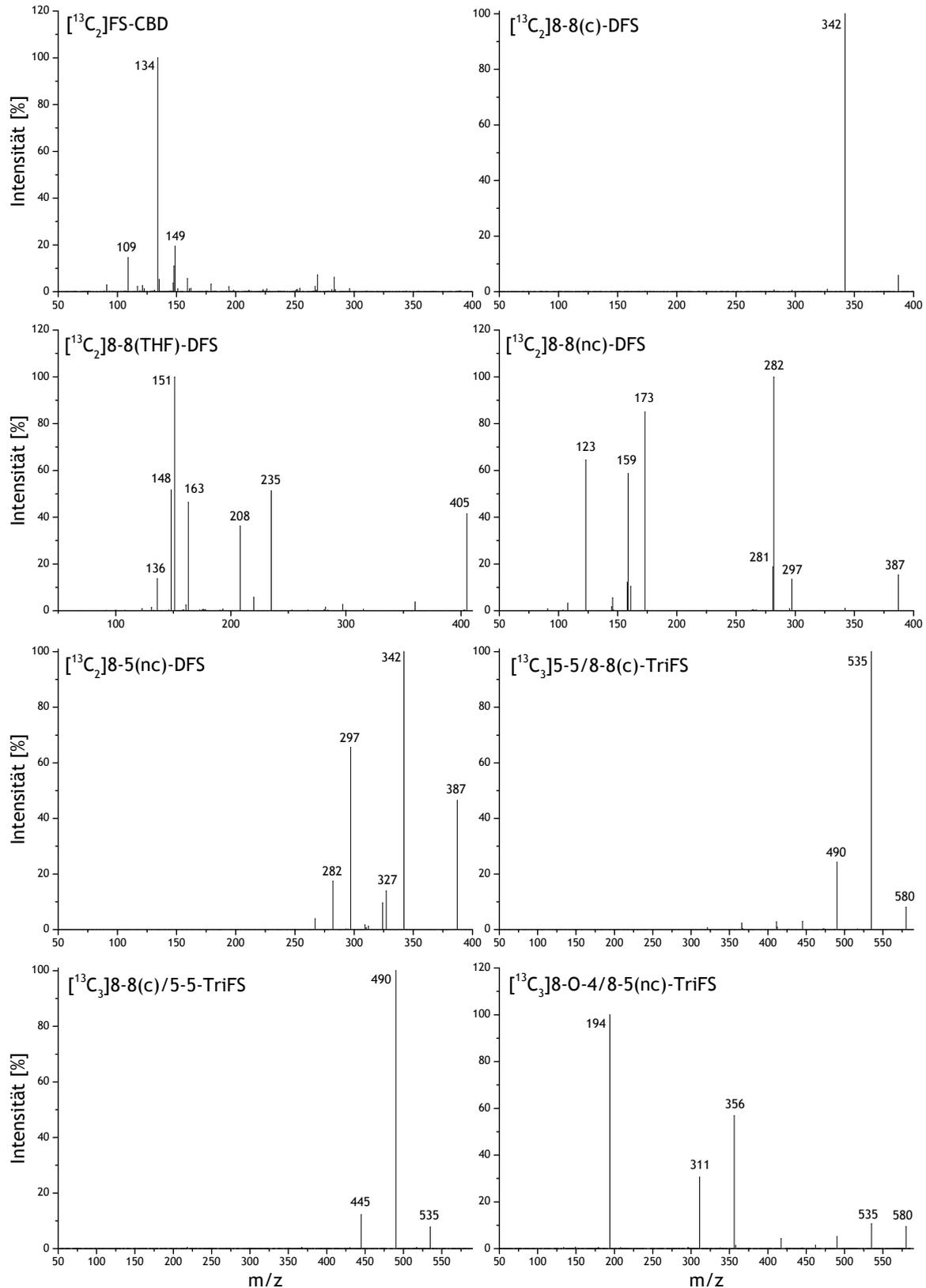
**Abbildung 58:** Massenspektren von Dehydrodiferulasäuren (DFS) und Dehydrotriferulasäuren (TriFS) nach flüssigchromatographischer Trennung und Elektrospray-Ionisation im negativen Modus. c: cyclisch, nc: nicht cyclisch.



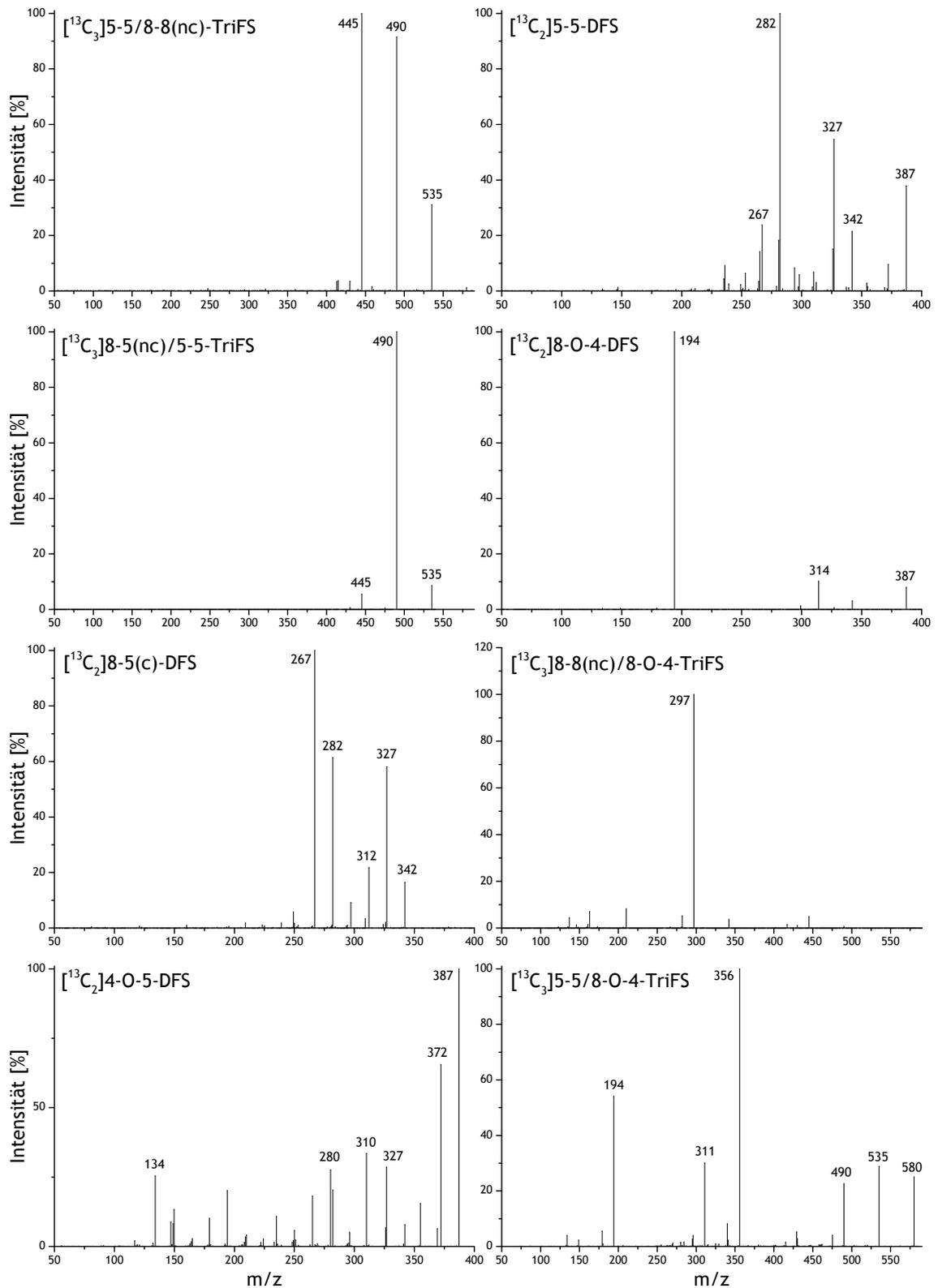
**Abbildung 59:** Massenspektren von Dehydrodiferulasäuren (DFS) und Dehydrotriferulasäuren (TriFS) nach flüssigchromatographischer Trennung und Elektrospray-Ionisation im negativen Modus. nc: nicht cyclisch, me: methyl, dc: decarboxyliert.



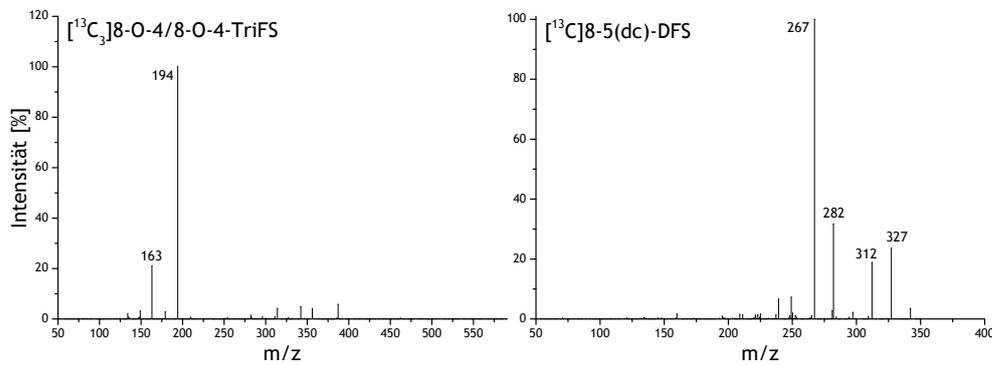
**Abbildung 60:** Massenspektren der synthetisierten und isolierten Dehydrotetraferulasäuren (TetraFS) nach flüssigchromatographischer Trennung und Elektrospray-Ionisation im negativen Modus mit einer Cone-Spannung von 25 V und einer Kollisionsenergie erzeugt durch 25 V.



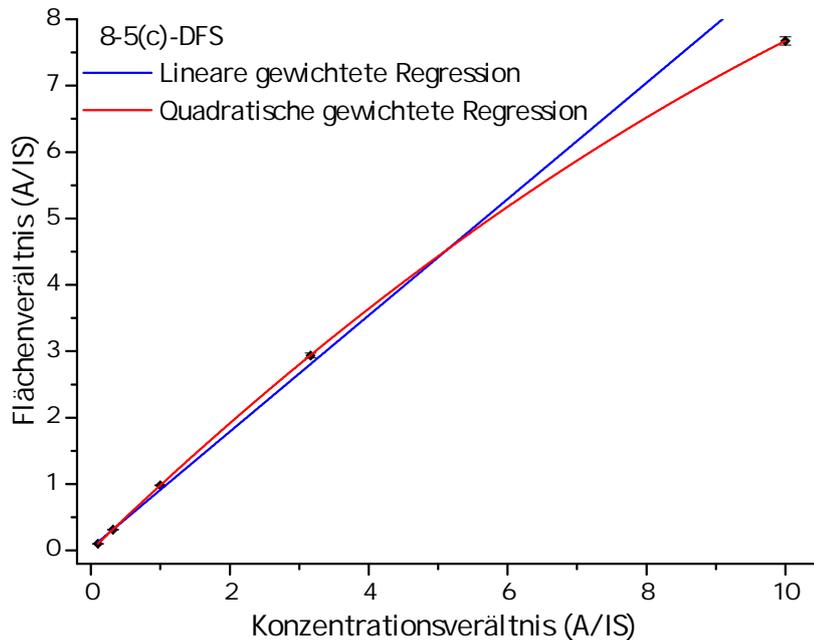
**Abbildung 61:** Massenspektren der isotopenmarkierten Standardsubstanzen nach flüssigchromatographischer Trennung und Elektrospray-Ionisation im negativen Modus. FS-CBD: Ferulasäure-Cyclobutandimer, DFS: Dehydrodiferulasäure, TriFS: Dehydrotriferulasäure, c: cyclisch, THF: Tetrahydrofuran, nc: nicht cyclisch.



**Abbildung 62:** Massenspektren der isotopenmarkierten Standardsubstanzen nach flüssigchromatographischer Trennung und Elektrospray-Ionisation im negativen Modus. DFS: Dehydrodiferulasäure, TriFS: Dehydrotriferulasäure, nc: nicht cyclisch, c: cyclisch.



**Abbildung 63:** Massenspektren der isotopenmarkierten Standardsubstanzen nach flüssigchromatographischer Trennung und Elektrospray-Ionisation im negativen Modus. DFS: Dehydrodiferulasäure, TriFS: Dehydrotriferulasäure, dc: decarboxyliert.



**Abbildung 64:** Zur Kalibrierung der Oligoferulasäuren wurden die Flächenverhältnisse der LC-MS/MS-Messung von Analyt (A) zu interner Standardsubstanz (IS) gegen die jeweiligen Konzentrationsverhältnisse aufgetragen. Mittels Mandel-Test wurde ermittelt, ob die quadratische Regression (rot) signifikant besser geeignet ist als die lineare Regression (blau). Als Beispiel ist hier die Kalibrierung von 8-5(cyclisch (c))-Dehydrodiferulasäure (DFS) gezeigt.



## PUBLIKATIONEN IN FACHZEITSCHRIFTEN

- Dilokpimol, A., Mäkelä, M. R., Mansouri, S., Belova, O., Waterstraat, M., Bunzel, M., de Vries, R. P. und Hildén, K. S. (2017). „Expanding the feruloyl esterase gene family of *Aspergillus niger* by characterization of a feruloyl esterase, FaeC“. *New Biotechnol.* 37, S. 200–209.
- Waterstraat, M., Bunzel, D. und Bunzel, M. (2016a). „Identification of 8-O-4/8-5(cyclic)- and 8-8(cyclic)/5-5-coupled dehydrotriferulic acids, naturally occurring in cell walls of mono- and dicotyledonous plants“. *J. Agric. Food Chem.* 64, S. 7244–7250.
- Waterstraat, M., Hildebrand, A., Rosler, M. und Bunzel, M. (2016b). „Development of a QuEChERS-based stable-isotope dilution LC-MS/MS method to quantitate ferulic acid and its main microbial and hepatic metabolites in milk“. *J. Agric. Food Chem.* 64, S. 8667–8677.

## VORTRÄGE AUF FACHTAGUNGEN

- Waterstraat, M. und Bunzel, M. (25.–27.09.2017). „Massenspektrometrische Methoden zur Bestimmung von Ferulasäurederivaten und –metaboliten in biologischen Matrices“. 46. *Deutscher Lebensmittelchemikertag*, Würzburg.
- Waterstraat, M., Hildebrand, A., Rosler, M. und Bunzel, M. (08.–09.03.2016). „Entwicklung einer QuEChERS-basierten LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von Ferulasäure-Metaboliten in Milch“. *LChG Regionalverbandstagung Südwest*, Freiburg.

## POSTERBEITRÄGE AUF FACHTAGUNGEN

- Hildebrand, A., Waterstraat, M. und Bunzel, M. (05.–08.10.2014). „A stable isotope dilution LC-MS/MS method for the quantification of ferulic acid and its microbial metabolites“. *AACC International Annual Meeting*, Providence, RI, USA.
- Waterstraat, M., Hildebrand, A. und Bunzel, M. (22.–24.09.2014). „Etablierung einer LC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von Ferulasäure und ausgewählten Metaboliten“. 43. *Deutscher Lebensmittelchemikertag*, Gießen.
- Waterstraat, M., Hildebrand, A., Rosler, M. und Bunzel, M. (12.–14.09.2016). „Stabilisotopenverdünnungsanalyse zur Bestimmung von Ferulasäure-Metaboliten in Milch“. 45. *Deutscher Lebensmittelchemikertag*, Freising-Weihenstephan.



DANKSAGUNG

---

Mein Dank gilt Prof. Dr. Mirko Bunzel für die Überlassung des interessanten Themas, für die unermüdliche Hilfsbereitschaft und kompetente Betreuung sowie für den Freiraum bei der Bearbeitung des Themas. Danke dafür, dass Sie mich darüber hinaus auch persönlich geprägt und unterstützt haben. Vielen Dank auch an Prof. Dr. Andrea Hartwig für die Übernahme des Korreferats.

Bei den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises, insbesondere bei Dr. Andreas Hildebrand, Dr. Rachel Schendel, Dr. Daniel Wefers, Dr. Judith Schäfer, Felix Urbat, Beate Kohn, Andreas Becker, Svenja Ackermann und Jan Steck, möchte ich mich für das großartige Arbeitsklima, die Kollegialität und Hilfsbereitschaft bedanken. Die freundliche Atmosphäre wurde ebenso von den Mitgliedern des AK Hartwig verursacht, weswegen ich diesen und insbesondere Matthias Hufnagel, Sarah Schoch, Rebecca Niemand und Paul Schumacher danken möchte. Von unschätzbarem Wert waren für mich auch die vielfältigen privaten Aktivitäten mit Euch.

Laura Gerster, Matthias Breuer, Thomas Kautz und Anna-Lena Hau danke ich für ihre Unterstützung, die sie mir durch ihre gute Zusammenarbeit und wissenschaftliche Sorgfalt im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeiten bzw. Masterarbeiten gaben.

Mein Dank gilt außerdem Dr. Jennifer Kübel, Dr. Timo Beskers, Dr. Diana Bunzel, Falco Beer, Malin Reller, Emine Sager und Dr. Ina Dix für ihre Hilfestellungen bei verschiedenen Messungen.

Herzlicher Dank geht an Simon Krüger, Dr. Johannes Hötzer, Christiane Ernst und alle anderen Freunde, die mir durch regelmäßige Burnout-Präventivmaßnahmen dabei halfen, anstrengende Phasen zu bewältigen. Einen besonderen Dank möchte ich auch an Kerstin Petroll richten, mit der ich seit Beginn des Studiums viele schöne Momente teilen durfte und auf die ich mich immer verlassen konnte.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich dafür, dass sie mir diesen Weg ermöglicht haben und mich in vielerlei Hinsicht unterstützt und motiviert haben. Genauso konnte ich immer auf die Hilfe meiner Geschwister zählen – danke dafür. Nicht zuletzt danke ich Mirjam Epp für ihre Unterstützung und ihr Verständnis.