

**Entwicklung von Nachweisverfahren für  
toxische *Solanum*-Glykoalkaloide  
und ihre Anwendung in  
Kartoffeln und daraus zubereiteten Produkten**

**Inaugural Dissertation**  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
**Diplom-Ökotrophologin**  
**Melanie Distl**  
aus Aalen  
**2007**

Gutachter: Prof. Dr. Michael Wink  
Prof. Dr. Thomas Rausch

Tag der mündlichen Prüfung: .....

# DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Biologie des Instituts für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg von Dezember 2002 bis Januar 2007 durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Michael Wink für die Überlassung dieses interessanten Themas, die wissenschaftliche Betreuung, seine wertvollen Ideen und Anregungen sowie den Freiraum bei der experimentellen Gestaltung des Projektes.

Prof. Dr. Thomas Rausch (Institut für Pflanzenwissenschaft, Universität Heidelberg) danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Prof. Dr. Thomas Efferth (Abteilung Toxikologie und Krebsrisikofaktoren, Deutsches Krebsforschungszentrum) und Prof. Dr. Gert Fricker (Institut für Pharmazeutische Technologie und Pharmakologie, Universität Heidelberg) möchte ich für die Übernahme des Rigorosum danken.

Des weiteren bedanke ich mich bei der Landesstiftung Baden-Württemberg für die finanzielle Unterstützung, die die Bearbeitung dieses Themas erst ermöglichte.

Bei Dr. Klaus Drehmer und dem Leibnitz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben möchte ich mich für die Bereitstellung von Knollen- und Blattproben der wilden *Solanum*-Arten bedanken sowie bei Dr. Heidi Lorey für die Überlassung traditioneller Kartoffelsorten aus Privatbeständen.

Mein Dank gilt ebenfalls der Firma Spark Holland, Emmen, Niederlande, besonders Herrn Martin Sibum und Herrn Michael Coors für die nette Zusammenarbeit und Hilfe bei der Entwicklung der automatisierten Alkaloidanalyse im Applikationslabor.

Daniela Fickel danke ich für die Überarbeitung meines Manuskriptes und nicht zuletzt für ihre seelisch und moralische Unterstützung auch während der schwierigeren Phasen. Bei Herrn Fleming möchte ich mich für die Korrektur meiner englischsprachigen Texte bedanken.

Dem kompletten Arbeitskreis, besonders Astrid Backhaus, Katja Sesterhen, Frank Sporer, Sukanya Dej-Adisai, Maren Möller, Sonja Schmitt, Angela Starke, Pablo Ibieta und Violetta, Ulrike Suschke und Bernhard Wetterauer danke ich für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft, die nette Arbeitsatmosphäre und die interessanten Gespräche auch außerhalb des fachlichen Rahmens. Des weiteren danke ich allen, besonders Nicole Pritzen, für die Überlassung ihrer gesprossenen Kartoffeln für Versuchszwecke.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich nie davon abgehalten haben zu studieren und durch deren Hilfe und Unterstützung die Durchführung meines Studiums und damit diese Doktorarbeit ermöglicht wurde.

Und schließlich möchte ich Thorsten für sein unendlich großes Verständnis und seine Geduld, sowie seine seelische Unterstützung vor, während und hoffentlich auch nach der Promotion danken.

**Für Thorsten...**

# INHALTSVERZEICHNIS

Danksagung .....	I
Inhaltsverzeichnis .....	III
Abbildungsverzeichnis .....	X
Tabellenverzeichnis .....	XIV
Abkürzungsverzeichnis .....	XVIII
<b>I EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b> Kartoffel .....	<b>1</b>
<b>1.1.1</b> Systematik .....	<b>1</b>
<b>1.1.2</b> Verbreitung der Kartoffel .....	<b>2</b>
<b>1.1.3</b> Kartoffelpflanze .....	<b>3</b>
<b>1.1.4</b> Kartoffelknolle .....	<b>3</b>
<b>1.1.5</b> Kartoffelsorten .....	<b>4</b>
<b>1.1.6</b> Inhaltsstoffe .....	<b>4</b>
<b>1.1.7</b> Verarbeitung der Kartoffel .....	<b>5</b>
<b>1.2</b> <i>Solanum</i> -Alkaloide .....	<b>6</b>
<b>1.2.1</b> Struktur .....	<b>7</b>
<b>1.2.2</b> Vorkommen im Gewebe .....	<b>10</b>
<b>1.2.3</b> Alkaloidvorkommen in wilden <i>Solanum</i> -Arten .....	<b>11</b>
<b>1.2.4</b> Biosynthese und Abbau .....	<b>13</b>
<b>1.2.5</b> Erwünschte Eigenschaften .....	<b>18</b>
<b>1.2.5.1</b> Pilzresistenz .....	<b>18</b>
<b>1.2.5.2</b> Bakterienresistenz .....	<b>19</b>
<b>1.2.5.3</b> Virenresistenz .....	<b>20</b>
<b>1.2.5.4</b> Insektenresistenz .....	<b>20</b>
<b>1.2.5.5</b> Nematodenresistenz .....	<b>21</b>
<b>1.2.6</b> Unerwünschte Eigenschaften .....	<b>22</b>
<b>1.2.7</b> Toxikologie .....	<b>25</b>

1.2.8	Metabolisierung im Körper .....	26
1.2.9	Einflussfaktoren auf die GA-Konzentration .....	27
1.2.9.1	Genetische Faktoren .....	28
1.2.9.2	Umweltfaktoren .....	28
1.2.9.3	Pathogeninfektion .....	30
1.2.9.4	Lagerungsbedingungen .....	30
1.2.10	Einfluss der Verarbeitungstechnik auf den GA-Gehalt .....	32
1.3	Methoden der GA-Analytik .....	35
1.3.1	Extraktion .....	35
1.3.2	Aufreinigung .....	36
1.3.3	Quantitative Analyseverfahren .....	37
1.3.3.1	Frühe Methoden .....	37
1.3.3.2	Chromatographische Verfahren .....	38
1.3.3.3	Massenspektrometrie .....	40
1.3.3.4	Elektrophoretische Verfahren .....	41
1.3.3.5	Immunologische Verfahren .....	42
1.3.3.6	Weitere Verfahren .....	43
<b>II AUFGABENSTELLUNG</b>		<b>45</b>
<hr/>		
<b>III MATERIAL UND METHODEN</b>		<b>46</b>
<hr/>		
3.1	Untersuchungsmaterial .....	46
3.1.1	Kommerzielle Kartoffelsorten .....	46
3.1.2	Traditionelle Kartoffelsorten .....	47
3.1.2.1	Anzuchtmaterial .....	47
3.1.2.2	weitere traditionelle Kartoffelsorten .....	49
3.1.3	Knollenbildende <i>Solanum</i> -Wildarten .....	50
3.1.4	Verarbeitungserzeugnisse .....	51
3.2	Verwendete Chemikalien und Geräte .....	52
3.3	Standard-Substanzen .....	53
3.4	Aufbereitung des Untersuchungsmaterials .....	54
3.4.1	Probenvorbereitung .....	54

3.4.1.1	Trocknung des Pflanzenmaterials und der Verarbeitungserzeugnisse.....	54
3.4.1.2	Homogenisierung.....	54
3.4.2	Extraktion.....	54
3.4.3	Extraktaufreinigung mittels Festphasenextraktion (SPE).....	55
3.5	Analytische Methoden.....	57
3.5.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	57
3.5.2	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS).....	58
3.5.3	Kolorimetrischer Assay.....	60
3.5.4	Hämolyse-Assay.....	61
3.5.5	Gaschromatographie (GLC).....	62
3.5.6	Automatisierte XLC-MS-Methode.....	64
3.5.7	Dünnschichtchromatographie.....	66
3.6	Untersuchung des GA-Gehaltes in Kartoffeln und <i>Solanum</i> -Wildarten.....	67
3.7	Weiterführende Untersuchungen zur Alkaloidverteilung in Kartoffelgewebe.....	67
3.7.1	GA-Akkumulation nach Licht- und Dunkellagerung.....	68
3.7.2	GA-Gehalt ergrüner Kartoffelknollen.....	68
3.7.3	GA-Gehalt in „Kartoffelaugen“.....	68
3.7.4	GA-Verteilung in Kartoffelfleisch.....	68
3.7.5	GA-Aufnahme durch Marienkäferlarven ( <i>Coccinellidae</i> ).....	68
3.8	Untersuchung des GA-Gehaltes in Verarbeitungserzeugnissen.....	69
3.8.1	Veränderung des GA-Gehaltes in Salz- und Pellkartoffeln.....	69
3.8.2	GA-Gehalt in Verarbeitungserzeugnissen.....	69
3.9	Isolierung der GAe aus Pflanzenmaterial.....	70
<b>IV METHODENENTWICKLUNG</b>		<b>72</b>
4.1	GA-Extraktion.....	72
4.2	GA-Aufreinigung mittels Festphasenextraktion.....	74
4.2.1	SPE-Sorbens.....	74
4.2.2	Aufreinigungsprotokoll.....	75
4.2.3	Wiederfindungsrate des gesamten Aufreinigungsprozesses.....	78
4.3	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC).....	78

4.3.1	Stationäre Phase.....	78
4.3.2	Mobile Phase.....	79
4.3.3	Flussrate.....	80
4.3.4	Detektionswellenlänge.....	81
4.3.5	Kalibrierung.....	81
4.3.6	Validierung des HPLC-Verfahrens.....	82
4.4	LC-ESI-MS.....	86
4.4.1	MS-Parameter.....	86
4.4.2	LC-Parameter.....	86
4.4.3	Kalibrierung.....	89
4.5	Kolorimetrischer Assay.....	90
4.5.1	Methodenentwicklung.....	90
4.5.2	Kalibrierung.....	90
4.6	Hämolyse-Assay.....	91
4.6.1	Methodenentwicklung.....	91
4.6.2	Kalibrierung.....	94
4.7	Gaschromatographie.....	95
4.7.1	GA-Hydrolyse.....	95
4.7.2	Interner Standard.....	97
4.7.3	Isolierung des Solanidins durch Flüssig-Flüssig-Extraktion.....	97
4.7.4	Gaschromatographische Methode.....	98
4.7.5	Extraktion der GAe aus Probenmaterial.....	99
4.7.6	Ermittlung der Wiederfindungsrate.....	99
4.8	Automatisierung der GA-Analyse über XLC-MS.....	100
4.8.1	GA-Extraktion.....	101
4.8.2	GA-Aufreinigung.....	101
4.8.3	MS-Parameter.....	104
4.8.4	LC-Parameter.....	105
4.8.5	Validierung des XLC-MS-Verfahrens.....	106

<b>V</b>	<b>ERGEBNISSE DER GA-ANALYSEN</b>	<b>109</b>
<b>5.1</b>	Kommerzielle Kartoffelsorten	109
5.1.1	Methodenanpassung	109
5.1.2	GA-Gehalt kommerzieller Kartoffelsorten	110
5.1.2.1	Frühkartoffeln	110
5.1.2.2	Herbstkartoffeln	115
5.1.3	Weiterführende Untersuchungen der Alkaloidverteilung in Kartoffelgewebe	120
5.1.3.1	Vergleich der GA-Gehalte nach Licht- und Dunkellagerung	123
5.1.3.2	GA-Gehalt ergrünter Knollenanteile	123
5.1.3.3	GA-Gehalt in „Kartoffelaugen“	124
5.1.3.4	Verteilung der GAe in Kartoffelfleisch	125
5.1.4	Veränderung des GA-Gehaltes in Salz- und Pellkartoffeln	127
<b>5.2</b>	Traditionelle Kartoffelsorten	128
5.2.1	Methodenanpassung	128
5.2.2	GA-Gehalt traditioneller Kartoffelsorten	129
5.2.2.1	Anzuchtmaterial	129
5.2.2.2	Weiteres Knollenmaterial	138
5.2.3	GA-Muster traditioneller Kartoffelsorten	141
5.2.4	GA-Aufnahme durch Marienkäferlarven ( <i>Coccinellidae</i> )	145
<b>5.3</b>	<i>Solanum</i> -Wildarten	146
5.3.1	Methodenanpassung	146
5.3.2	GA-Gehalt wilder <i>Solanum</i> -Arten	146
5.3.3	GA-Muster wilder <i>Solanum</i> -Arten	151
<b>5.4</b>	Verarbeitungserzeugnisse	157
5.4.1	Methodenanpassung	157
5.4.2	GA-Gehalt in Verarbeitungserzeugnissen	157
<b>5.5</b>	Vergleich der entwickelten Analyseverfahren an Verarbeitungserzeugnissen	159
5.5.1	Vergleich mit LC-ESI-MS	159
5.5.2	Vergleich mit dem Kolorimetrischen Assay	161
5.5.3	Vergleich mit dem Hämolyse-Assay	162

5.5.3.1	Vergleich der Hämolysewirkung verschiedener GAe.....	163
5.5.3.2	GA-Gehalt in Verarbeitungserzeugnissen.....	163
5.5.3.3	Überprüfung des Hämolyse-Assay.....	165
5.5.4	Vergleich mit Gaschromatographie.....	166
5.5.4.1	GA-Gehalt in Verarbeitungserzeugnissen.....	166
5.5.4.2	Überprüfung der GLC-Analyse mittels GLC-MS.....	168
5.5.5	Vergleich mit dem automatisierten XLC-MS-Verfahren.....	171
<b>VI</b>	<b>DISKUSSION DER GA-ANALYSEN</b> .....	<b>174</b>
6.1	Kommerzielle Kartoffelsorten.....	174
6.1.1	GA-Gehalt kommerzieller Kartoffelsorten.....	174
6.1.2	Verteilung der GAe.....	177
6.1.3	Veränderung der GA-Gehalte durch Lichteinfluss.....	178
6.1.4	Veränderung des GA-Gehaltes in Salz- und Pellkartoffeln.....	179
6.2	Traditionelle Kartoffelsorten.....	181
6.2.1	GA-Gehalt traditioneller Kartoffelsorten.....	182
6.2.2	Verteilung der GAe.....	183
6.2.3	GA-Muster traditioneller Kartoffelsorten.....	184
6.2.3.1	Identifizierung der GAe.....	184
6.2.3.2	GA-Muster.....	185
6.3	<i>Solanum</i> -Wildarten.....	187
6.3.1	GA-Gehalt wilder <i>Solanum</i> -Arten.....	187
6.3.2	GA-Muster wilder <i>Solanum</i> -Arten.....	192
6.3.2.1	Identifizierung der GAe.....	192
6.3.2.2	GA-Muster.....	193
6.4	Verarbeitungserzeugnisse.....	198
6.4.1	GA-Gehalt in Verarbeitungserzeugnissen.....	199
6.4.2	Verteilung der GAe.....	201
6.5	Vergleich der entwickelten Analyseverfahren an Verarbeitungserzeugnissen.....	202
6.5.1	Vergleich mit LC-ESI-MS.....	202
6.5.2	Vergleich mit dem Kolorimetrischen Assay.....	202

---

6.5.3	Vergleich mit dem Hämolyse-Assay.....	203
6.5.4	Vergleich mit Gaschromatographie.....	206
6.5.4.1	GA-Gehalt in Verarbeitungserzeugnissen.....	206
6.5.4.2	Überprüfung der GLC-Analyse in Verarbeitungserzeugnissen mittels GLC-MS.....	206
6.5.5	Vergleich mit der automatisierten XLC-MS-Analyse.....	208
<b>SCHLUSSBETRACHTUNG</b>		<b>210</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>		<b>212</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>		<b>214</b>
<b>ANHÄNGE</b>		<b>A-1</b>
Anhang A	Trivialnamen und systematische Nomenklatur der Glykoalkaloide.....	A-1
Anhang B	Strukturformeln, Hauptfragmente und Fragmentierungsschemata der Glykoalkaloide.....	B-1
Anhang C	Standardarbeitsanweisungen der entwickelten Nachweisverfahren für Glykoalkaloide.....	C-1
SOP-1	Extraktion und Aufreinigung von Glykoalkaloiden aus Kartoffeln und Verarbeitungsprodukten aus Kartoffeln.....	C-2
SOP-2	Bestimmung des $\alpha$ -Solanin und $\alpha$ -Chaconin-Gehaltes mittels HPLC.....	C-7
SOP-3	Bestimmung des $\alpha$ -Solanin und $\alpha$ -Chaconin-Gehaltes mittels LC-MS.....	C-13
SOP-4	Bestimmung des $\alpha$ -Solanin und $\alpha$ -Chaconin-Gehaltes mittels XLC-MS.....	C-19
SOP-5	Bestimmung des Gesamtalkaloid-Gehaltes mittels Hämolyse-Assay.....	C-27
SOP-6	Bestimmung des Gesamtalkaloid-Gehaltes mittels Kolorimetrie.....	C-32
SOP-7	Hydrolyse der Glykoalkaloide aus Kartoffeln und Verarbeitungsprodukten aus Kartoffeln.....	C-36
SOP-8	Bestimmung des Solanidin-Gehaltes mittels GLC.....	C-41

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

1.1	Vereinfachtes Diagramm zur Domestikation der Kulturkartoffel.....	2
1.2	Schematische Darstellung der Kartoffelpflanze.....	3
1.3	Schematische Darstellung der Kartoffelknolle.....	4
1.4.1	Struktur der häufigsten in <i>Solanum</i> -Arten vorkommenden Aglyka.....	9
1.4.2	Struktur der in <i>Solanum</i> -Arten vorkommenden Zuckerkomponenten.....	9
1.5.1	Biosynthese der GAe zum Cholesterol: a.) bis zum linearen Squalen b.) Cyclisierung zum Cholesterol.....	14
1.5.2	Biosynthese der GAe ausgehend von Cholesterol: a.) zum Spirosolan-Aglykon: Solasodin b.) zum Solanidan-Aglykon: Solanidin.....	16
1.6	Postulierter Metabolismus der GAe im Stoffwechsel.....	28
4.1	Flussdiagramm des Standard-GA-Aufarbeitsverfahrens.....	77
4.2	HPLC-Chromatogramm des Standardgemischs aus $\alpha$ -Solanin und $\alpha$ -Chaconin [100 ng/ $\mu$ l].....	81
4.3	Kalibriergeraden der HPLC-Methode für a.) $\alpha$ -Solanin und b.) $\alpha$ -Chaconin im Arbeitsbereich 5 bis 480 bzw. 7 bis 450 ng/ $\mu$ l mit Angabe der Gleichung der Regressionsgeraden und des Bestimmtheitsmaßes.....	82
4.4	a.) Ionenchromatogramm für die <i>m/z</i> -Werte 868 für $\alpha$ -Solanin und 852 für $\alpha$ -Chaconin. b.) MS-Spektrum für $\alpha$ -Solanin.....	88
4.5	Kalibriergeraden der LC-ESI-MS-Methode für a.) $\alpha$ -Solanin und b.) $\alpha$ -Chaconin im Arbeitsbereich 0,35 bis 44 bzw. 0,35 bis 46 ng/ $\mu$ l mit Angabe der Gleichung der Regressionsgeraden und des Bestimmtheitsmaßes.....	89
4.6	Kalibriergerade des kolorimetrischen Assays für $\alpha$ -Solanin im Arbeitsbereich 25 bis 250 $\mu$ g Gesamt-GAe mit Angabe der Gleichung der Regressionsgeraden und des Bestimmtheitsmaßes.....	91
4.7	Zeitverlauf der Hämolysewirkung von $\alpha$ -Chaconin bei 37°C auf Schafsblut- Erythrozyten.....	92
4.8	Direkter Vergleich der Hämolysewirkung von $\alpha$ -Chaconin und den GA- Mischungen $\alpha$ -Solanin: $\alpha$ -Chaconin im Verhältnis 70:30 und 63:37 (w/w).....	93
4.9	Kalibriergerade des Hämolyse-Assays für $\alpha$ -Chaconin- $\alpha$ -Solanin (70:30, w/w) im Arbeitsbereich 0 bis 25 $\mu$ g mit Angabe der Gleichung der Regressions- geraden und des Bestimmtheitsmaßes.....	94
4.10	GC-Chromatogramm nach Hydrolyse von $\alpha$ -Solanin in MeOH-A. bidest (1:1, v/v), 80 °C, 16 h mit internem Standard Gelsemin.....	98

<b>4.11</b>	Schematische Übersicht über das verwendete System Symbiosis™ (Spark Holland, Emmen, Niederlande).....	101
<b>4.12</b>	Übersicht über den Methodenentwicklungsprozess mit dem System Symbiosis™ (Spark Holland, Emmen, Niederlande).....	101
<b>4.13</b>	Gegenüberstellung der XLC- MS-Chromatogramme unter Verwendung von: a.) C-18HD bzw. b.) Resin SH als Sorbens .....	103
<b>4.14</b>	Tochterionenscan der XLC-MS-Methode für $\alpha$ -Chaconin ( $m/z$ 852,4).....	105
<b>4.15</b>	Vorgeschlagene Strukturformel des Schlüsselfragments $m/z$ 98,2 der XLC-MS-Analyse.....	105
<b>4.16</b>	Kalibriergeraden des XLC-MS-Verfahrens für a.) $\alpha$ -Solanin und b.) $\alpha$ -Chaconin im Arbeitsbereich 1 bis 1000 ng/ml.....	108
<b>5.1</b>	HPLC-Chromatogramm des methanolischen Extraktes der Frühkartoffelsorte Sieglinde-4.....	110
<b>5.2</b>	Gegenüberstellung der GA-Gehalte [mg/100 g TG] in Knollen der: a.) Frühkartoffeln aus konventionellem und ökologischen Anbau b.) Herbstkartoffeln aus konventionellem und ökologischen Anbau .....	119
<b>5.3</b>	Vergleich der GA-Gehalte [mg/100 g TG] in Fleisch, Schale und Gesamtknolle nach einwöchiger Licht- bzw. Dunkellagerung der Sorte: a.) Berber-2 b.) Nicola-7 c.) Bio-Ditta-1 d.) Bio-Valor-1.....	122 122 122 123
<b>5.4</b>	Vergleich der GA-Gehalte [mg/100 g TG] grüner Anteile mit Kontrollgewebe ohne Grünfärbung in den Frühkartoffelsorten Nicola-2 und Sieglinde-1 in: a.) Knollenfleisch b.) der Schale.....	124
<b>5.5</b>	Vergleich der GA-Gehalte [mg/100 g TG] in „Kartoffelaugen“ und Kontrollgewebe von: a.) Berber-2, b.) Nicola-7.....	125
<b>5.6</b>	Verteilung von $\alpha$ -Solanin und $\alpha$ -Chaconin innerhalb des Kartoffelfleisches von Außen nach Innen.....	126
<b>5.7</b>	HPLC-Chromatogramm des methanolischen Extraktes aus Kartoffelbeeren der Sorte La Ratte.....	129
<b>5.8</b>	Gegenüberstellung der GA-Gehalte [mg/100 g TG] in Knollen der: a.) traditionellen Kartoffelsorten aus Eigenanbau b.) weiteren traditionellen Kartoffelsorten.....	140
<b>5.9</b>	a.) Ionenchromatogramm für die Massenspuren $m/z$ 852, 868 und 884 des Beerenextraktes der Sorte La Ratte. b.) Zugehöriges MS-Spektrum des untersuchten Massenbereiches ( $m/z$ 100 bis 1200).....	144
<b>5.10</b>	MS-Spektrum des methanolischen Extraktes aus Marienkäferlarven ( <i>Coccinellidae</i> ).....	145
<b>5.11</b>	HPLC-Chromatogramm des Blattextraktes aus <i>S. phureja</i> ssp. <i>phureja</i> .....	147

<b>5.12</b>	a.) Ionenchromatogramm für die Massenspuren $m/z$ 852, 868 und 884 des Blattextraktes aus <i>S. phureja</i> ssp. <i>phureja</i> . b.) Zugehöriges MS-Spektrum des untersuchten Massenbereiches ( $m/z$ 100 bis 1200).....	152
<b>5.13</b>	HPLC-Chromatogramm des methanolischen Extraktes der Pommes Frites-Probe P 3.....	158
<b>5.14</b>	Vergleich der ermittelten Gehalte für: a.) $\alpha$ -Solanin b.) $\alpha$ -Chaconin c.) Gesamt-GA aus LC-ESI-MS und HPLC-Analyse.....	161
<b>5.15</b>	Vergleich der ermittelten Gesamt-GA-Gehalte aus kolorimetrischer Bestimmung und HPLC-Analyse.....	162
<b>5.16</b>	Vergleich der Hämolyseaktivität von $\alpha$ -Tomatin, $\alpha$ -Chaconin, GA-Gemisch ( $\alpha$ -Chaconin: $\alpha$ -Solanin = 70:30, w/w) und Digitonin.....	163
<b>5.17</b>	Vergleich der ermittelten Gesamt-GA-Gehalte aus Hämolyse-Assay und HPLC-Analyse.....	164
<b>5.18</b>	GC-Chromatogramm nach Hydrolyse der GAe aus P2 in MeOH-A. bidest (1:1, v/v), 80 °C, 16 h mit internem Standard Gelsemin.....	166
<b>5.19</b>	Vergleich der ermittelten Gesamt-GA-Gehalte aus GC- und HPLC-Analyse.....	168
<b>5.20</b>	GC-MS-Analyse nach Hydrolyse der GAe aus P2 in MeOH-A. bidest (1:1, v/v), 80 °C, 16 h mit internem Standard Gelsemin. a.) oberer Abschnitt Totalionenstrom unterer Abschnitt Massenspur bei $m/z$ 150 b.) Massenspektrum bei $R_t$ 24,9 min: Gelsemin ( $m/z$ 322) c.) Massenspektrum bei $R_t$ 26,7 min: Solanthren ( $m/z$ 379) d.) Massenspektrum bei $R_t$ 28,1 min: $m/z$ 411 e.) Massenspektrum bei $R_t$ 28,7 min: Solanidin ( $m/z$ 397).....	169 169 169 170 170
<b>5.21</b>	Vergleich der ermittelten GA-Gehalte der XLC-MS und HPLC-Analyse: a.) $\alpha$ -Solanin b.) $\alpha$ -Chaconin c.) Gesamt-GA-Gehalt aus XLC-MS und HPLC-Analyse.....	172 172 173
<b>6.1</b>	Von Lawson et al. (1997) vorgeschlagene Strukturformel des Schlüsselfragments $m/z$ 150 aus der EI-MS-Analyse.....	207
<b>6.2</b>	Strukturformel für Solanthren ( $m/z$ 379, $C_{27}H_{41}N$ ).....	207
<b>6.3</b>	Strukturformel des mutmaßlichen Solanidin-Methylesters ( $m/z$ 411, $C_{28}H_{45}NO$ ).....	207
<b>B.1</b>	Strukturformel, Massenspektrum, Hauptfragmente und Fragmentierungsschema von: a.) $\alpha$ -Solanin und b.) $\alpha$ -Chaconin.....	B-2
<b>B.2</b>	Strukturformel, Massenspektrum, Hauptfragmente und Fragmentierungsschema von: a.) Solasonin und b.) Solamargin.....	B-3
<b>B.3</b>	Strukturformel, Massenspektrum, Hauptfragmente und Fragmentierungsschema von: a.) $\alpha$ -Solamarin und b.) $\beta$ -Solamarin.....	B-4
<b>B.4</b>	Strukturformel, Massenspektrum, Hauptfragmente und Fragmentierungsschema von Demissin und Dehydrodemissin.....	B-5

<b>B.5</b>	Strukturformel, Massenspektrum, Hauptfragmente und Fragmentierungsschema von $\alpha$ -Tomatin and Dehydrotomatin.....	B-6
<b>B.6</b>	Strukturformel, Massenspektrum, Hauptfragmente und Fragmentierungsschema von Commersonin und Dehydrocommersonin.....	B-7
<b>B.7</b>	Strukturformel, Massenspektrum, Hauptfragmente und Fragmentierungsschema von: a.) Leptin I und b.) Leptin II.....	B-8

# Tabellenverzeichnis

1.1	Erntemenge und prozentuale Verteilung der Knollen auf verschiedene Verarbeitungsbereiche in Deutschland.....	5
1.2	Prozentualer Anteil verschiedener Convenience-Produkte an der Gesamtverarbeitung.....	6
1.3	MG, Form des Aglykon und der Zuckerkomponente der in Kulturkartoffeln häufigsten Glykoalkaloide.....	8
1.4	Gesamt-GA-Gehalte [mg/100 g FG] in unterschiedlichen Organen der Kulturkartoffel.....	11
1.5	MG, Form des Aglykon und der Zuckerkomponente der häufigsten in wilden <i>Solanum</i> -Arten vorkommenden GAe.....	12
1.6	Übersicht über beschriebene Vergiftungsfälle nach GA-Aufnahme.....	26
1.7	GA-Gehalte [µg/g] verschiedener Kartoffelprodukte.....	34
3.1	Analysierte Kartoffelsorten aus konventionellem Anbau.....	46
3.2	Analysierte Kartoffelsorten aus ökologischem Anbau.....	47
3.3	Kultivierte und analysierte traditionelle Kartoffelsorten.....	48
3.4	Analysierte Knollen weiterer traditioneller Kartoffelsorten.....	49
3.5	Analysierte <i>Solanum</i> -Wildarten.....	50
3.6	Analysierte Verarbeitungserzeugnisse.....	51
3.7	Gradientenprogramm zur Auftrennung der GAe mittels HPLC auf LiChrospher® RP-18.....	58
3.8	Gradientenprogramm zur Auftrennung der GAe in <i>Solanum</i> -Wildarten und den Kartoffelsorten mittels LC –ESI-MS auf LiChrospher® RP-18.....	59
3.9	Gradientenprogramm zur Auftrennung der GAe in Verarbeitungserzeugnissen mittels LC–ESI-MS auf LiChrospher® RP-18.....	60
3.10	Gradientenprogramm zur Aufreinigung und Trennung der GAe durch XLC-MS auf Xterra MS C-18.....	65
4.1	Vergleich der Extraktionsausbeute [µg/g] verschiedener Lösungsmittel in Fleisch- und Schalengewebe.....	73
4.2	Vergleich der Extraktionsausbeute [µg/g] der Soxhlet- und Essigsäure-Extraktion in Fleisch- und Schalengewebe.....	74
4.3	WFR für α-Solanin and α-Chaconin auf Supelclean™ ENVI™ -18-Kartuschen.....	78
4.4	Variationskoeffizienten [%] zur Ermittlung der Mess- und Methodenpräzision für α-Solanin und α-Chaconin.....	83
4.5	Wiederfindungsraten für α-Solanin and α-Chaconin.....	84

<b>4.6</b>	Wiederfindungsrate für Solanidin in der GC-Analyse.....	100
<b>4.7</b>	Wiederfindung von $\alpha$ -Solanin und $\alpha$ -Chaconin [jeweils 1 $\mu$ g/ml] unter Verwendung acht verschiedener Sorbentien in der XLC-MS-Analyse.....	103
<b>4.8</b>	Variationskoeffizienten zur Ermittlung der Mess- und Methodenpräzision für das XLC-MS-Verfahren.....	106
<b>4.9</b>	Wiederfindungsraten der XLC-MS-Methode für $\alpha$ -Solanin und $\alpha$ -Chaconin.....	107
<b>5.1</b>	Übersicht über Einwaage [g], Kartuschenbeladung [ml] und MeOH-Aufnahmevermögen [ml] für die Analyse kommerzieller Kartoffelsorten mittels HPLC.....	109
<b>5.2</b>	Übersicht über die in konventionell erzeugten Frühkartoffeln ermittelten GA-Gehalte [mg/100 g TG] in Fleisch, Schale und Gesamtknolle.....	112
<b>5.3</b>	Übersicht über die in ökologisch erzeugten Frühkartoffeln ermittelten GA-Gehalte [mg/100 g TG] in Fleisch, Schale und Gesamtknolle.....	113
<b>5.4</b>	Prozentualer GA-Anteil [%] in der Schale der analysierten Frühkartoffeln, links aus konventionellem, rechts aus ökologischem Anbau.....	114
<b>5.5</b>	Prozentualer Anteil an $\alpha$ -Chaconin [%] in Fleisch, Schale und Gesamtknolle der analysierten Frühkartoffeln, links aus konventionellem, rechts aus ökologischem Anbau.....	115
<b>5.6</b>	Übersicht über die in konventionell erzeugten Herbstkartoffeln ermittelten GA-Gehalte [mg/100 g TG] in Fleisch, Schale und Gesamtknolle.....	116
<b>5.7</b>	Übersicht über die in ökologisch erzeugten Herbstkartoffeln ermittelten GA-Gehalte [mg/100 g TG] in Fleisch, Schale und Gesamtknolle.....	116
<b>5.8</b>	Prozentualer GA-Anteil [%] in der Schale der analysierten Herbstkartoffeln, links aus konventionellem, rechts aus ökologischem Anbau.....	117
<b>5.9</b>	Prozentualer Anteil an $\alpha$ -Chaconin [%] in Fleisch, Schale und Gesamtknolle der analysierten Herbstkartoffeln, links aus konventionellem, rechts aus ökologischem Anbau.....	118
<b>5.10</b>	Vergleich des $\alpha$ -Solanin-, $\alpha$ -Chaconin- und Gesamt-GA-Gehaltes [mg/100 g TG] in Fleisch, Schale und Knollen der analysierten Frühkartoffelsorten nach einwöchiger Lagerung mit bzw. ohne Lichteinfluss mit Angabe der prozentualen GA-Veränderung.....	121
<b>5.11</b>	Vergleich des $\alpha$ -Solanin-, $\alpha$ -Chaconin- und Gesamt-GA-Gehaltes [mg/100 g TG] in grünen und unveränderten Anteilen der Frühkartoffelsorten Nicola-2 und Sieglinde-1.....	124
<b>5.12</b>	Vergleich des $\alpha$ -Solanin-, $\alpha$ -Chaconin- und Gesamt-GA-Gehaltes [mg/100 g TG] in „Kartoffelaugen„ und „augenloser“ Schale der Frühkartoffelsorten Nicola-2 und Sieglinde-1.....	125
<b>5.13</b>	Vergleich der $\alpha$ -Solanin- und $\alpha$ -Chaconin-Gehalte [mg/100 g TG] der drei Schichten äußeres, mittleres und inneres Fleisch mit Angabe des prozentualen Anteils am Gesamt-GA-Gehalt.....	126
<b>5.14</b>	Vergleich der $\alpha$ -Solanin- und $\alpha$ -Chaconin-Gehalte [mg/100 g TG bzw. mg/100 ml Wasser] in Fleisch, Schale und Kochwasser der zubereiteten Pell- und Salzkartoffeln mit Angabe der prozentualen Veränderung der Alkaloid-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle.....	127

5.15	Übersicht über Einwaage [g], Kartuschenbeladung [ml] und MeOH-Aufnahmenvolumen [ml] für die Analyse traditioneller Kartoffelsorten mittels HPLC	128
5.16	Übersicht über die ermittelten GA-Gehalte [mg/100 g TG] in Fleisch, Schale und Gesamtknolle der in Freiland (FL) und Gewächshaus (GH) kultivierten traditionellen Kartoffelsorten	131
5.17.1	Übersicht über die ermittelten GA-Gehalte [mg/100 g TG] in jungen und alten Blättern der in Freiland (FL) und Gewächshaus (GH) kultivierten traditionellen Kartoffelsorten	132
5.17.2	Übersicht über die ermittelten GA-Gehalte [mg/100 g TG] in jungen und alten Sprossachsen sowie in Wurzeln der in Freiland (FL) und Gewächshaus (GH) kultivierten traditionellen Kartoffelsorten	133
5.18.1	Übersicht über die ermittelten GA-Gehalte [mg/100 g TG] in Blattspitzen und Blättern der in Freiland (FL) und Gewächshaus (GH) kultivierten traditionellen Kartoffelsorten Bamberger Hörnchen, La Ratte, Nageler Kipfler und Pink Fir Apple	134
5.18.2	Übersicht über die ermittelten GA-Gehalte [mg/100 g TG] in jungen und alten Sprossachsen der in Freiland (FL) und Gewächshaus (GH) kultivierten traditionellen Kartoffelsorten Bamberger Hörnchen, La Ratte, Nageler Kipfler und Pink Fir Apple	134
5.19	Ermittelter GA-Gehalt [mg/100 g TG] in Kartoffelbeeren der Sorte La Ratte	136
5.20	Prozentualer GA-Anteil [%] in der Schale der analysierten traditionellen Kartoffelsorten	136
5.21	Prozentualer Anteil an $\alpha$ -Chaconin [%] in jungen und alten Blättern sowie jungen und alten Sprossachsen der analysierten traditionellen Kartoffelsorten	137
5.22	Prozentualer Anteil an $\alpha$ -Chaconin [%] in Fleisch, Schale und Gesamtknolle der analysierten traditionellen Kartoffelsorten	137
5.23	Ermittelte $\alpha$ -Solanin und $\alpha$ -Chaconin-Gehalte [mg/100 g TG] im Ausgangsmaterial der traditionellen Kartoffelsorten	138
5.24	Übersicht über die ermittelten GA-Gehalte [mg/100 g TG] in Fleisch, Schale und Gesamtknolle weiterer traditioneller Kartoffelsorten	138
5.25	Prozentualer GA-Anteil [%] in der Schale weiterer traditioneller Kartoffelsorten	139
5.26	Prozentualer Anteil an $\alpha$ -Chaconin [%] in Fleisch, Schale und Gesamtknolle in den weiteren traditionellen Kartoffelsorten	139
5.27	Übersicht über die in traditionellen Kartoffelsorten detektierten $m/z$ -Werte der GAe mit Angabe des Molekülions sowie der zugehörigen Fragmentionen	141
5.28	Übersicht über die in traditionellen Kartoffelsorten detektierten GAe mit Angabe ihres relativen Vorkommens	142
5.29	Übersicht über Einwaage [g], Kartuschenbeladung [ml] und MeOH-Aufnahmenvolumen [ml] für die Analyse traditioneller Kartoffelsorten mittels HPLC	146
5.30.1	Ermittelte Gehalte der vier Hauptalkaloide [mg/100 g TG] in Knollen wilder <i>Solanum</i> -Arten	148
5.30.2	Ermittelte Gehalte der vier Hauptalkaloide in Blättern [mg/100 g TG] wilder <i>Solanum</i> -Arten	149

5.31	Einfluss des Kultivierungsstandorts und des Knollengewichtes [g FG] auf den Alkaloidgehalt [mg/100 g TG].....	151
5.32	Übersicht über die in <i>Solanum</i> -Wildarten detektierten <i>m/z</i> -Werte der GAe mit Angabe des Molekülions und der zugehörigen Fragmentionen.....	153
5.33	Übersicht über die in <i>Solanum</i> -Wildarten detektierten GA mit Angabe ihres relativen Vorkommens.....	154
5.34	Übersicht über Einwaage [g TG], Kartuschenbeladung [ml] und Aufnahmevolumen [ml] für die Analyse der Verarbeitungserzeugnisse mittels HPLC.....	157
5.35	Ermittelte HPLC-Gehalte [µg/g TG] an α-Solanin, α-Chaconin, Gesamt-GA-Gehalt und Anteil von α-Chaconin [%] am Gesamt-GA-Gehalt.....	158
5.36	Über LC-ESI-MS ermittelte Gehalte [µg/g TG] an α-Solanin, α-Chaconin und Gesamtalkaloiden in Verarbeitungserzeugnissen.....	159
5.37	Mit Hilfe des kolorimetrischen Assays ermittelte Gesamt-GA-Gehalte [µg/g TG] in Verarbeitungserzeugnissen.....	162
5.38	Übersicht über Einwaage [g TG], Kartuschenbeladung [ml] und Aufnahmevolumen [ml] für die Analyse der Verarbeitungserzeugnisse durch den Hämolyse-Assay.....	164
5.39	Mit Hilfe des Hämolyse-Assays ermittelte Gesamt-GA-Gehalte [µg/g TG] in Verarbeitungserzeugnissen.....	164
5.40	Gaschromatographisch bestimmte Gesamt-GA-Gehalte [µg/g TG] in Verarbeitungserzeugnissen.....	167
5.41	Durch XLC-MS ermittelte α-Solanin, α-Chaconin und Gesamt-GA-Gehalte [µg/g TG] in Verarbeitungserzeugnissen.....	171
6.1.1	Ermittelte Gesamt-GA-Gehalte der vier Hauptalkaloide [mg/100 g TG] in Knollen wilder <i>Solanum</i> -Arten und Vergleich mit literaturbekannten Daten [mg/100 g FG].....	189
6.1.2	Ermittelte Gesamt-GA-Gehalte der vier Hauptalkaloide [mg/100 g TG] in Blättern wilder <i>Solanum</i> -Arten und Vergleich mit literaturbekannten Daten [mg/100 g FG].....	191
6.2	Übersicht über die in <i>Solanum</i> -Wildarten detektierten GAe und Vergleich mit literaturbekannten Daten.....	194
6.3	Ermittelte HPLC-Gehalte [µg/g TG] an α-Solanin, α-Chaconin, Gesamt-GA-Gehalt und Vergleich mit literaturbekannten Daten.....	200
A.1	Übersicht über die Trivialnamen und systematische Nomenklatur der in dieser Arbeit behandelten GAe.....	A-1

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A. bidest.	bidestilliertes Wasser
ACN	Acetonitril
AS	Aminosäure
C	Celsius
CE	Kapillarzonenelektrophorese
CoA	Coenzym A
DMSO	Dimethylsulfoxid
ec	nachsyliert (endcapped)
EI	Electron Impact
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESI	Electrospray Ionisation
EtOH	Ethanol
FAB	Fast Atom Bombardement
FAO	Food and Agriculture Organisation
FID	Flammenionisationsdetektor
FG	Frischgewicht
g	Gramm
GA	Glykoalkaloid
GLC	Gaschromatographie
GIT	Gastrointestinaltrakt
h	Stunde
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
HPLC	High-performance Liquid Chromatographie (Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie)
ICH	International Conference on Harmonisation Guidances
i. D.	innerer Durchmesser
KG	Körpergewicht
KH	Kohlenhydrat
LC	Liquid Chromatography (Flüssigkeitschromatographie)
m	Meter
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
min	Minute
ml	Milliliter
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie

N	Stickstoff
Q	Quadrupol
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
p. a.	zur Analyse
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
RT	Raumtemperatur
S.	<i>Solanum</i>
pH	ph-Wert
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
ssp.	Subspezies
TDI	Tolerable Daily Intake
TG	Trockengewicht
TOF	Time-of-Flight
Upm	Umdrehungen pro Minute
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
V	volume (Volumen)
v <sub>k</sub>	Variationskoeffizient
w	weight (Gewicht)
WFR	Wiederfindungsrate
WHO	World Health Organisation
XLC	Extraction Liquid Chromatography

# KAPITEL I

## EINLEITUNG

### 1.1 Kartoffel

#### 1.1.1 Systematik

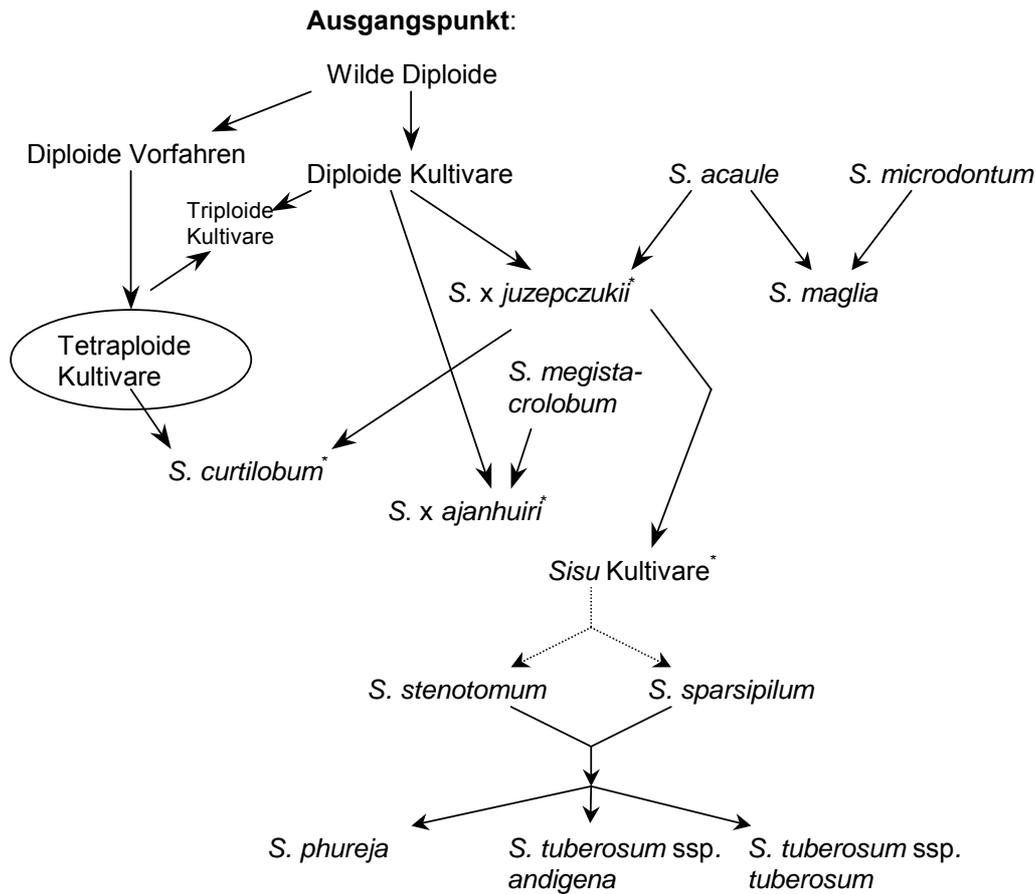
Die Kulturkartoffel gehört innerhalb der Familie der Nachtschattengewächse (Solanaceae) zur Gattung *Solanum*. Diese wird wissenschaftlich ins Reich der Plantae, Division Magnoliophyta, Klasse Magnoliopsida, Unterklasse Asteridae, Ordnung Solanales eingegliedert.

Innerhalb der Gattung *Solanum* werden die Kulturkartoffel und die übrigen 219 Wildarten in 21 Klassen der Sektion Petota eingeteilt. Die Sektion Petota wiederum gliedert sich in zwei Untersektionen: Estolonifera und Potatoe. Die knollenbildende Untersektion Potatoe besteht aus 19 Serien, Estolonifera nur aus zwei, die weder Knollen noch Stolone bilden (Hawkes 1990, 1994).

Die Kulturkartoffel *Solanum tuberosum* ist das Ergebnis menschlicher Züchtung. Abbildung 1.1 zeigt den von Brown (1999) postulierten Domestikationsprozess. Ihr tetraploider Chromosomensatz entstammt vermutlich aus der Kreuzung der beiden Wildarten *S. stenotomum* JUZ. & BUK. und *S. sparsipilum* (BITTER) JUZ. und BUK. (Teuscher & Lindequist 1994).

*S. tuberosum* wird in zwei nicht scharf zu trennende Unterarten gegliedert:

- *S. tuberosum* ssp. *andigena* HAWKES: überwiegend im Andengebiet, selten in Europa kultiviert, und
- *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* L.: in Nordamerika, Europa und den übrigen altweltlichen Gebieten angebaute Sorten. Sie wird weiter untergliedert nach der Farbe der Schalen und des Knollenfleisches sowie der Blütenfarbe in acht Convarietäten mit insgesamt 32 Varietäten (Schreiber 1961). Auf Grund des überwiegenden Gebrauchs dieser Unterart in Europa, ist in dieser Arbeit mit der Bezeichnung „Kartoffel“ grundsätzlich die Unterart *tuberosum* gemeint.



**Abb. 1.1** Vereinfachtes Diagramm zur Domestikation der Kulturkartoffel nach Bradshaw et al. (2006), Brown (1999), Volkov et al. (2003) und HagerROM (2004).

\* bittere Kultivare,

Sisu-Kultivare: von den Aymara-Indianern im „Altiplano“-Gebiet, westliches Bolivien, angebaute Kultivare (Osman et al. 1978),

.....> = Zwischenstufen unbekannt)

## 1.1.2 Verbreitung der Kartoffel

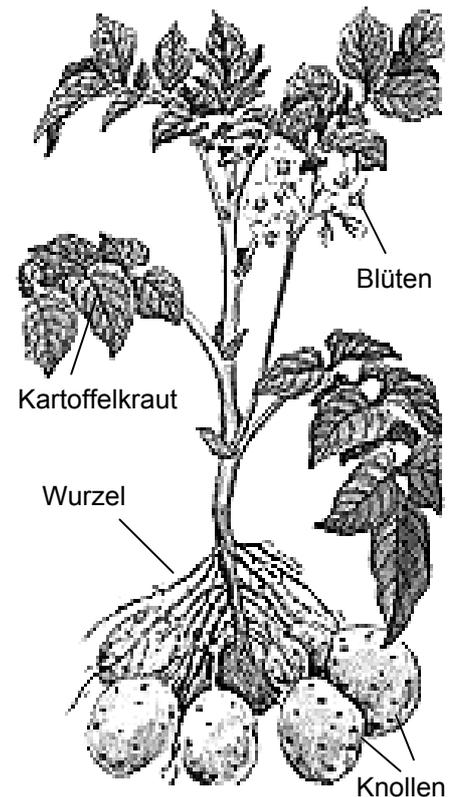
Das Ursprungsgebiet der Kartoffel liegt in den Zentral-Anden von Chile, Bolivien und Peru bis Kolumbien, wobei eine exakte Herkunft nicht definiert werden kann. Eine Übersicht möglicher Ursprungsgebiete findet sich bei Brücher (1975). In der ersten Hälfte des 16. Jahrhunderts erreichte die Kartoffel durch die Spanier Europa. Die landwirtschaftliche Nutzung begann erst Ende des 17. Jahrhunderts in England und Schottland, ab Mitte des 18. Jahrhunderts auch in Deutschland, hier zunächst in Sachsen und Preußen.

Die Kartoffel nimmt heute mit einer jährlichen Produktion von 322 Mio t (2005) wirtschaftlich gesehen die fünfte Position der wichtigsten Nahrungspflanzen ein (FAO 2006). Kühles Klima mit hohen Niederschlagsmengen, wie in Westeuropa, bieten beste Wachstumsbedingungen. Der Anbau erfolgt vorwiegend auf der nördlichen Erdhalbkugel, in Europa und Asien zwischen dem 40. und 60. Breitengrad. Auf der Südhalbkugel findet sich nur eine sporadische Kultivierung. Hauptanbaugebiete sind neben China, Russland, Indien, Ukraine

und den USA im europäischen Raum vor allem Deutschland (2004: 11,1 Mio t, ZMP 2005) und Polen. In Deutschland wird die Kartoffel vorwiegend in Niedersachsen/Bremen, Nordrhein-Westfalen, Bayern und Rheinland-Pfalz kultiviert. Baden-Württemberg steht an fünfter Stelle.

### 1.1.3 Kartoffelpflanze

Die Kartoffel ist eine krautige, mehrjährige, dikotyle Pflanze, die bis zu einem Meter groß werden kann (Abb. 1.2). Der Stängel ist aufrecht und verästelt. Die Laubblätter sind unterseitig behaart und unterbrochen fiederschnittig, d. h. größere Fiederblättchen wechseln sich regelmäßig mit kleineren ab, wobei die Endblättchen größer als die Seitenblättchen sind. In der Blütezeit von Juni bis August bildet sie Blüten mit einer weißen, rötlichvioletten oder blauen Blütenkrone und gelben Staubbeuteln, die sich nach innen kegelförmig zusammenneigen. Der Fruchtknoten ist oberständig, zweifächrig und eiförmig. Die ungenießbaren, kirschgroßen Früchte sind vielsamigen Beeren mit platten, nierenförmigen Samen. Sie werden nur in der Züchtung verwendet. Die Wurzeln sind langfaserig und an der Grundachse verästelt. An unterirdischen Seitentrieben (Stolone) wachsen ei- oder walzenförmige Knollen, die als Speicherorgane dienen (HagerRom 2004).

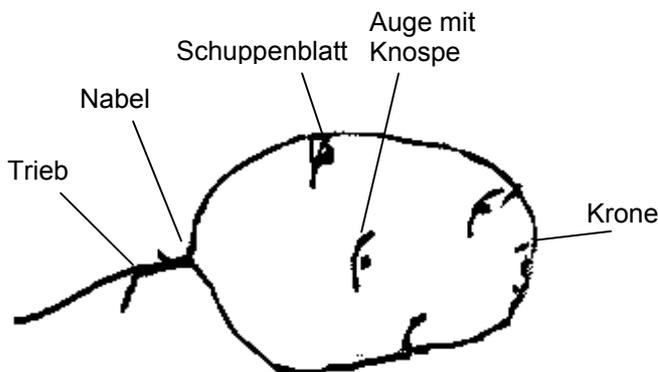


**Abb. 1.2** Schematische Darstellung der Kartoffelpflanze.

### 1.1.4 Kartoffelknolle

Die Kartoffelknolle (Abb. 1.3) wird als unterirdischer, verdickter Sprossabschnitt in jeder Vegetationsperiode neu gebildet. Sie ist aus unterschiedlichen Schichten aufgebaut. Die äußere Korkschicht bildet die Schale der Kartoffel. Sie schützt das Kartoffelfleisch vor dem Austrocknen und vor Schädlingsbefall, z. B. durch Pilze, Insekten oder Würmer. Auf der Schale sind gut die „Augen“ zu erkennen, aus denen bei der Keimung die Triebe wachsen. Über den Nabel ist die Kartoffelknolle mit der Mutterpflanze verbunden, die gegenüberliegende Seite bildet die Krone. Die Rindenschicht, die sich unter der Korkschicht befindet, enthält die wertvollsten Inhaltsstoffe, das Eiweiß und die meisten Mineralstoffe, allerdings

auch den Großteil der toxischen Steroidalkaloide. Im Innersten, in der Markschrift, sind schließlich Stärke und die Vitamine gespeichert (Mohler & Sulser 2001).



**Abb. 1.3** Schematische Darstellung der Kartoffelknolle.

### 1.1.5 Kartoffelsorten

Die Sorte stellt die unterste systematische Einheit einer Kulturpflanze dar. Weltweit gibt es etwa 5000 Kartoffelsorten. In Deutschland sind derzeit 206 Sorten beim Bundessortenamt für den Handel von Saatgut und Pflanzenteilen zugelassen, wovon ca. 150 kommerziell genutzt werden. Nach Untersuchung der Abstammungsbeziehungen der einzelnen Sorten ist das heute erhältliche Kartoffelsortiment aus relativ wenigen Ausgangssorten hervorgegangen (Mohler & Sulser 2001). Grund ist vermutlich die verheerende Krautfäule-Epidemie von 1845 bis 1848, der ein Großteil der damaligen Sorten zum Opfer fiel (Brücher 1975). Die Sorten sind nach Kriterien wie Erregerresistenz, Reifezeit, Ertrag, Blütenfarbe, Knollenform und Kochtyp gelistet (Reinberger 2005). Nach der Handelsklassenverordnung für Speisekartoffeln müssen sie einem der drei Kochtypen entsprechen: „festkochend“ (hoher Eiweißgehalt), „vorwiegend festkochend“ bzw. „mehligkochend“ (hoher Stärkegehalt). Nach dem Erntezeitpunkt werden sie in „erste frühe“ (bis Mitte August), „zweite frühe“ und „Haupternte“ (ab Ende September) eingeteilt. Die erst genannten bilden rasch kleinere Knollen, die jedoch durch Wasserabgabe schnell altern und zu Qualitätsverlusten führen. Spätere Sorten tragen eher große Knollen, die für die Einkellerung bestimmt sind. Die Schalenfarbe kann von ocker, gelb, rot bis hin zu lila und blau variieren. Die Fleischfarbe erscheint weiß oder spiegelt die Schalenfarbe wieder (aid 2002).

### 1.1.6 Inhaltsstoffe

Verwendete Teile für die menschliche wie tierische Ernährung sind vorwiegend die Knollen, die zu 74 bis 80% aus Wasser, 10 bis 30% aus Stärke, 0 bis 8% aus löslichen Kohlenhydraten

(Glucose, Fructose, Saccharose und Glucose-6-phosphat), 0,7 bis 4,6% Proteinen und 0,04 bis 1% Lipiden (Glycerophosphatide und wenig Triacylglycerole, Carotinoide und Phytosterole) bestehen (Lister & Munro 2000, Sotelo et al. 1998). Ernährungsphysiologisch wichtigster Inhaltsstoff ist die Stärke, gefolgt von den Proteinen durch deren hohe biologische Wertigkeit. Der Gesamtgehalt ist zwar gering, der Anteil essentieller Aminosäuren liegt mit ca. 35%, davon viel Lysin, jedoch im oberen Bereich (Fischnich 1959). Des weiteren ist noch ihr Vitamingehalt vor allem an Vitamin C (10 bis 25 mg/100 g FG) und B<sub>6</sub> (0,3 mg/ 100 g FG) sowie der Gehalt an Kalium (220 bis 940 mg/100 g FG) von Bedeutung (Lister & Munro 2000, Reinberger 2005, Schreiber 1961, Sotelo et al. 1998). Die gefärbten Kultivare beinhalten in ihren Schalen zusätzlich größere Mengen antioxidativ wirkender Anthocyane (v. a. Pelagonidin-, Penonidin-, Petunidin- und Malvidin-Glykoside), die durch das Entfernen der Schale jedoch meist verloren gehen (Lewis et al. 1998).

Neben diesen ernährungsphysiologisch bedeutenden Bestandteilen beinhalten Kartoffelknollen jedoch auch toxische Sekundärmetabolite, die Glykosidalkaloide (GA). In hohen Mengen bitter und giftig, tragen sie in niedriger Konzentration zum typischen „Kartoffel-Flavour“ bei (Edwards & Cobb 1999, Valkonen et al. 1996). Sinden et al. (1976) beobachteten, dass Gehalte über 14 mg/100 g FG als bitter empfunden werden, über 25 mg/100 g FG führten sie zu einem Brennen im Mund.

### 1.1.7 Verarbeitung der Kartoffel

Die Kartoffelknolle wird vorwiegend im Nahrungsmittelsektor genutzt, obwohl ihr Einsatz nicht nur auf den Food-Bereich beschränkt ist (vgl. Tab. 1.1). In Europa ist die Kartoffel industriell vor allem als Rohmaterial für die Stärkeproduktion bedeutend (1995: 1,9 Mio t, OECD 2002).

**Tab. 1.1** Erntemenge und prozentuale Verteilung der Knollen auf verschiedene Verarbeitungsbereiche in Deutschland (ZMP 2004).

Erntemenge	11.604.000 t
Saatgut	5,2%
Futter	9,1%
Industrielle Verwertung	29,3%
Menschliche Ernährung	50,0%
Ausfuhr	13,8%

Die Verarbeitungsmöglichkeiten der Knollen im Lebensmittelbereich sind sehr vielseitig (Kochen, Backen, Frittieren, Pürieren, Mikrowellen garen). In den letzten Jahrzehnten hat sie sich zu einem hochwertigen Nahrungsmittel weiterentwickelt. Und gerade diese Convenience-Produkte sorgen dafür, dass der Kartoffelverzehr im Zeitalter von Fastfood und Fertigmahlzeiten nicht aus der Mode gerät. Tabelle 1.2 zeigt eine Einteilung der Convenience-Produkte und deren Anteil an der Gesamtverarbeitung.

**Tab. 1.2** Prozentualer Anteil verschiedener Convenience-Produkte an der Gesamtverarbeitung (ZMP 2004).

	%
Trockenprodukte (Püree, Knödelpulver...)	25,8
Snackprodukte (Chips, Knabberartikel...)	12,4
Gefrierprodukte (Pommes frites, Kartoffelviertel, Rösti...)	43,6
Andere Produkte (Gratins, Nassprodukte...)	18,2

Insgesamt ist in den letzten Jahrzehnten ein Rückgang des Kartoffelverzehrs zu verzeichnen (1961/62 Westdeutschland: 130 kg/Jahr, 2003/04 Gesamtdeutschland 67 kg/Jahr). Während in den Jahren 1970/71 der Pro-Kopf-Verbrauch bei 102 kg/Jahr lag, von denen 86,4% direkt und 15,6% als Veredlungsprodukte verzehrt wurden, sank der Verbrauch bis 2004/05 auf 66,5 kg/Jahr, wobei jedoch nur noch 49,2% als Frischware und 50,8% als Veredlungsprodukte auf den Markt kamen (ZMP 2004).

## 1.2 *Solanum*-Alkaloide

*Solanum*-Alkaloide sind glykosidisch vorliegende Steroidalkaloide, die als Sekundärstoffe vorwiegend in den Gattungen *Solanum* und *Lycopersicon* vorkommen (Gemeinholzer & Wink 2002, Hänsel & Sticher 2004). Sekundärstoffe sind das Ergebnis eines evolutionären Selektionsprozesses. Sie sind für Pflanzenwachstum und -entwicklung nicht erforderlich, sondern erfüllen ihre Funktion als Kommunikations-, Abwehr- oder Schutzsubstanzen. Damit sind sie wichtige Komponenten des Überlebens- und Reproduktionssystems der Pflanzen (Luckner 1990, Wink 2003b). Häufig liegen sie als komplexe Gemische unterschiedlicher Sekundärstoffen mit verschiedenen Bioaktivitäten vor (Wink 2005).

Nach der Isolierung des Solanins 1820, konnte 1954 nachgewiesen werden, dass es sich um ein Gemisch zweier Komponenten,  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin, handelt (Friedman 2006, Kuhn

et al. 1955a, b). Das häufig paarweise Auftreten von *Solanum*-Alkaloiden ist ein Charakteristikum. Evolutionsbiologische Gründe nach Friedman (2002, 2006) könnten sein:

- die Antwort der Pflanze auf die Adaptation von Pathogenen
- die Bildung geringerer Konzentrationen durch Ausnutzen synergistischer Effekte
- das Erschweren des Adaptationsvorgangs durch die Pathogene oder
- die spezielle Anpassung der Alkaloide an bestimmte Pathogene.

### 1.2.1 Struktur

GAe ähneln von ihrem strukturellen Aufbau her den Saponinen (Heftmann 1983, Schreiber 1968a). Wie diese bestehen sie aus einem unpolaren Steroidkern, dem Aglykon, das über eine  $\beta$ -glykosidische Verbindung zwischen der Hydroxyl-Gruppe an C-3 in Ring A mit einem Zuckerrest verknüpft ist. Das Aglykon ist chemisch gesehen ein Alkamin mit einem C<sub>27</sub>-Cholestangerüst, d. h. es besteht aus dem eigentlichen Steroidanteil, ähnlich dem Cholesterol, der durch einen Stickstoff-enthaltenden Heterozyklus erweitert wurde (Lachman et al. 2001). Hier liegt der Unterschied zu den Saponinen, die statt des Stickstoffs ein Sauerstoff-Atom im Heterozyklus besitzen.

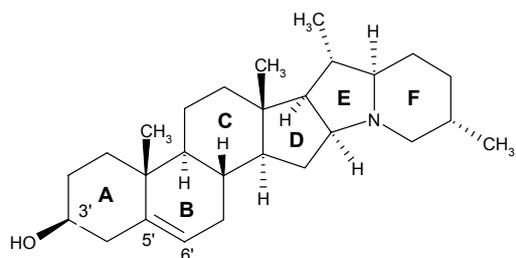
Bei den Alkaminen wird zwischen fünf Ausprägungen unterschieden: den Solanidanen, den Spirosolanen, den  $\alpha$ -Epiminocyclohemiketalen, den 3-Aminospirostanen und den 22,26-Epiminocholestanen. Bislang wurden mindestens 90 strukturell unterschiedliche Steroidalkaloide in 350 verschiedenen *Solanum*-Arten isoliert (Friedman & McDonald 1997). Die in Kartoffeln am häufigsten vorkommenden Typen gehören den Spirosolanen und Solanidanen an, wobei diese sich in der Bindung des Stickstoffs unterscheiden. In den Spirosolanen liegt er sekundär, im Solanidantyp tertiär gebunden vor. Die Spirosolane weisen das Aza-oxaspiransystem (vgl. Abb. 1.4.1) auf und sind somit analog den Steroidsapogeninen gebaut, mit denen sie häufig zusammen auftreten. In den Solanidanen liegt ein Indolizidin-System vor, das Stickstoff-Atom gehört zwei Ringen an. GAe vom Solanidantyp sind  $\alpha$ -Solanin,  $\alpha$ -Chaconin, Demissin, Commersonin sowie die Leptine und Leptidine. Den Spirosolan-Typ finden wir in Solasonin, Solamargin,  $\alpha$ -Tomatin und den Solamarinen (Hänsel & Sticher 2004, Lachman et al. 2001).

Als Zuckerkomponenten treten Tri- oder Tetrasaccharide auf. Die häufigsten Monomere sind D-Glucose, D-Galactose, D-Xylose und L-Rhamnose. Bei den Trisacchariden dominieren zwei Ausprägungen. Die in  $\alpha$ -Solanin auftretende Solatrioseform besteht aus je einem Baustein D-Glucose, D-Galactose und L-Rhamnose. In  $\alpha$ -Chaconin finden wir die Chacotriose, die aus zwei Anteilen L-Rhamnose und einer D-Glucose aufgebaut ist. In den  $\beta$ -,

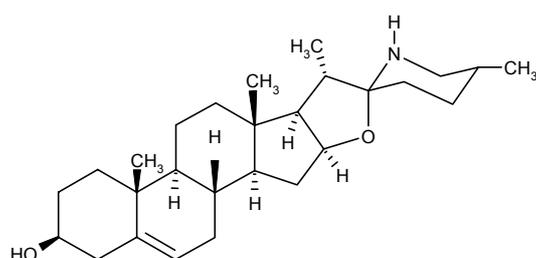
und  $\gamma$ -Formen sind jeweils ein bzw. zwei der Zuckermoleküle abgespalten. Das Tetrasaccharid  $\beta$ -Lycotetraose kommt in Demissin und  $\alpha$ -Tomatin vor. Es besteht aus zwei Glucose- und je einem Galaktose- und Xylose-Baustein. Commertetraose aus Commersonin ist ähnlich aufgebaut, endständiger Zuckerrest ist statt Xylose ein Glucosemolekül. In der Übersicht in Tabelle 1.4 sind Aglyka und Saccharid-Seitenketten der in der Kulturkartoffel häufigsten GAe dargestellt. Abbildung 1.4.1 zeigt die in *Solanum*-Arten fünf häufigsten Aglyka, Abbildung 1.4.2 die dazugehörigen Zuckerkomponenten.

**Tab. 1.3** MG, Form des Aglykon und der Zuckerkomponente der in Kulturkartoffeln häufigsten Glykoalkaloide.

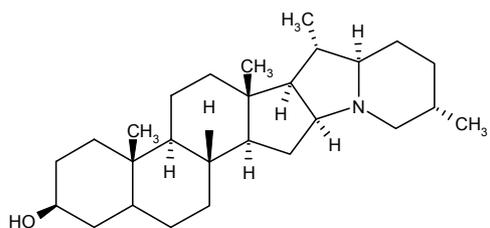
GA	Summenformel	MG [g/mol]	Aglykon	MG des Aglykons [g/mol]	Zuckerkomponente
$\alpha$ -Chaconin	$C_{45}H_{73}NO_{14}$	852.1	Solanidin	397.6	Chacotriose
$\alpha$ -Solanin	$C_{45}H_{73}NO_{15}$	868.1	Solanidin	397.6	Solatriose
$\alpha$ -Solamargin	$C_{45}H_{73}NO_{15}$	868.1	Solasodin	413.6	Chacotriose
$\alpha$ -Solasonin	$C_{45}H_{73}NO_{16}$	884.1	Solasodin	413.6	Solatriose



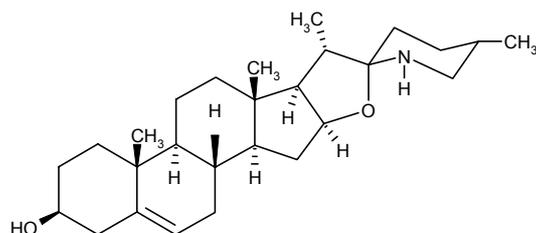
**Solanidin**  
22 $\alpha$ H, 22 $\beta$ H-Solanid-5-en  
MG 397,6 g/mol



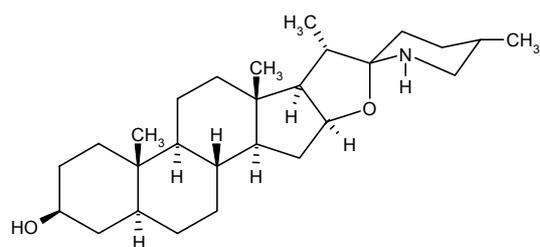
**Solasodin**  
(25R)-22 $\alpha$ N-Spirosal-5-en  
MG 413,6 g/mol



**Demissidin**  
5 $\alpha$ , 22 $\alpha$ H, 25 $\beta$ H-Solanidan  
MG 399,7 g/mol

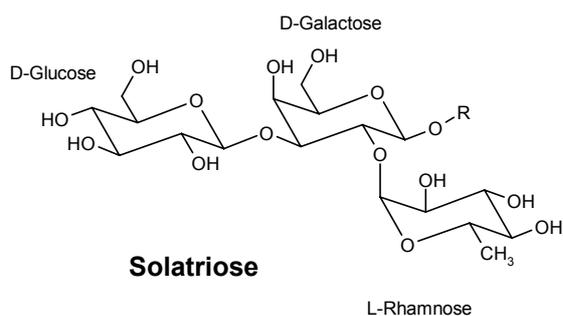


**Tomatidenol**  
(25S)-22 $\beta$ N-Spirosal-5-en  
MG 413,6 g/mol

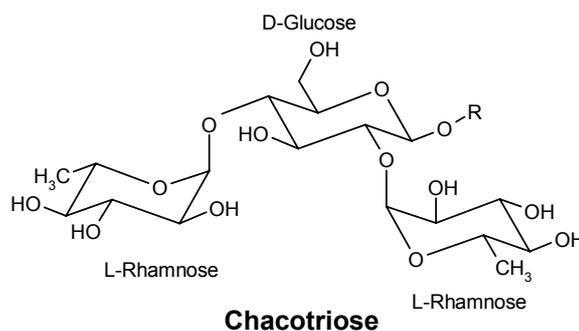


**Tomatidin**  
(25S)-22 $\beta$ N-5 $\alpha$ -Spirosolan  
MG 415,7 g/mol

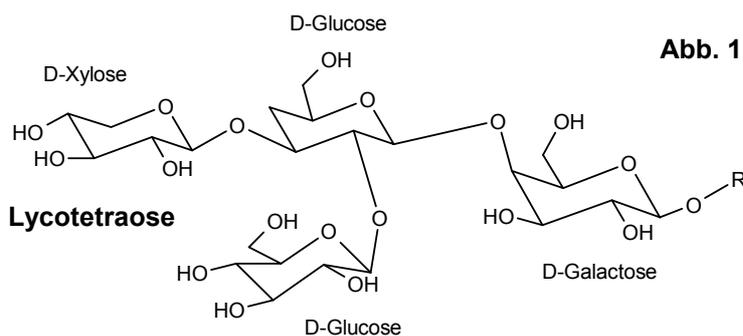
**Abb. 1.4.1** Struktur der häufigsten in *Solanum*-Arten vorkommenden Aglyka.



**Solatriose**



**Chacotriose**



**Lycotetraose**

**Abb. 1.4.2** Struktur der in *Solanum*-Arten vorkommenden Zuckercomponenten.

## 1.2.2 Vorkommen im Gewebe

Die bitter schmeckenden GAe kommen in allen Organen der Pflanze vor, in der Regel in höheren Konzentrationen in den oberirdischen Teilen. Höchste Gehalte finden sich in Geweben mit hohen Stoffwechselraten, z. B. Blüten, grüne Beeren und Sprosse (Jadhav et al. 1973, Jadhav & Salunkhe 1975). Haupt-GAe der Kulturkartoffel sind zu 95%  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin, wobei letzteres meist überwiegt. Das Verhältnis von  $\alpha$ -Solanin zu  $\alpha$ -Chaconin variiert in Knollen je nach Sorte und Jahreszeit zwischen 0,3 und 0,7 (Friedman & Dao 1992, Morris & Petermann 1985, Percival et al. 1993 & 1994, Percival 1999, Teuscher & Lindequist 1994). Wilde *Solanum*-Arten enthalten neben Solanidin-Alkaloiden noch eine Reihe weiterer GAe mit unterschiedlichen Aglyka (vgl. Abschnitt 1.2.3). Freies Solanidin, sowie die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Formen von  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin liegen in sehr niedrigen Konzentrationen vor, vermutlich sind sie nur Zwischenprodukte während der Biosynthese bzw. kommen als intermediäre Zwischenstufen beim hydrolytischen Abbau im Metabolismus vor.

Obwohl Natur und Menge der GAe genetisch festgelegt sind (Friedman 2006, Gregory et al. 1981, Schreiber et al. 1961, Sinden & Sanford 1981), kann die Gesamtkonzentration durch ökologische Einflüsse und Stressfaktoren mitbeeinflusst werden (Crush 1973). Daher variiert der Gehalt an GAen saisonal, wobei höchste Konzentrationen in der wachsenden Pflanze während der Blütezeit vorliegen. Mit zunehmender Reife fällt der Gehalt leicht (Ahmed & Müller 1979, Street et al. 1946) und bleibt während der Seneszenz konstant (Friedman & Levin 1998). Mehrfach wurde berichtet, dass die GA-Konzentration in Knollen und Blättern positiv korreliert ist (Deahl et al. 1973, Uppal 1987), es existieren jedoch auch gegenteilige Ergebnisse (Sarquis et al. 2000). Tabelle 1.4 zeigt den durchschnittlichen Gesamt-GA-Gehalt in verschiedenen Organen der Kartoffelpflanze [mg/100 g FG] (übernommen aus Friedman & McDonald 1997). Auf der rechten Seite ist zum Vergleich der Gehalt zweier Sorten mit bekanntermaßen hohen Alkaloidmengen dargestellt (Friedman & Dao 1992).

Der durchschnittliche Gehalt in kommerziellen Knollen liegt unter 12 mg/100 g FG, meist zwischen 1 und 15 mg, dies entspricht 20 bis 60 mg/100 g TG (Griffith et al. 1994, van Gelder 1990). In Knollen hält die Biosynthese an und kann den Alkaloidgehalt bei ungünstigen Bedingungen, wie z. B. Lichteinfluss oder mechanische Beschädigung, über eine *de-novo*-Synthese aus Vorstufen erhöhen (Cronk et al. 1974). Nach Keimung wurde ein Anstieg auf bis zu 35 mg/100 g FG festgestellt (aid 2002).

**Tab. 1.4** Gesamt-GA-Gehalte [mg/100 g FG] in unterschiedlichen Organen der Kulturkartoffel (Übersicht in Friedman & McDonald 1997, Friedman & Dao 1992, Wood & Young 1974).

Pflanzenteil	Gesamt-GA <sup>1</sup>	Gesamt-GA <sup>2</sup>
Wurzel	18-40	86
Stiel	2,3-7,1	32-45
Blätter	23-100	145
Blüten	215-500	-
Beeren	42	38
Sprosse	195-400	275-1000
Knolle gesamt	2,0-12,5	14,7
Bittere Knolle gesamt <sup>3</sup>	25-80	-
Schale	30-60	85
Schale bittere Knolle <sup>3</sup>	150-220	-
Fleisch	1,2-10,0	1,6-6,0

<sup>1</sup> Sorten mit durchschnittlichen Gehalten

<sup>2</sup> Sorten mit bekanntermaßen hohen Gehalten (NDA1725-1, Lenape)

<sup>3</sup> aus Wood & Young (1974)

Die höchsten GA-Mengen befinden sich direkt unter der Schale und im Bereich der Augen sowie der wachsenden Sprosse (Bushway et al. 1987, Friedman 2006, Kozukue et al. 1987). Kalac (1994) konnte 83-96% der GAe in der Schale detektieren, 3-14% in der Rindenschicht und nur 1-3% im Fleisch. Der Großteil befindet sich in einer 1,5-3 mm dicken Schicht direkt unter der Schale (Schulzová et al. 1992). Durch Schälen kann der Hauptteil der Alkaloide entfernt werden. Enthalten die Knollen jedoch natürlicherweise oder durch Stresseinfluss hohe Gehalte, können diese nur teilweise beseitigt werden (Hellenäs et al. 1995a, Lachman et al. 2001, Petersen 1993). So konnte Maga (1994) bei gesunden Knollen 60-96% der GAe durch Schälen entfernen, bei stark alkaloidhaltigen dagegen nur 35%. Da Schälen wiederum Stress für die Kartoffelknolle bedeutet, kann die Konzentration bei mehrstündiger Lagerung erneut ansteigen, Teuscher & Lindequist (1994) berichteten von einer GA-Zunahme innerhalb von 7 Stunden auf das 2,4-2,8-fache.

### 1.2.3 Alkaloidvorkommen in wilden *Solanum*-Arten

Während in der Kulturkartoffel *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* fast ausschließlich Solanidin-Alkaloide zu finden sind, je nach genetischen Vorfahren in Blättern auch Solasodin-Alkaloide, konnten in zahlreichen Untersuchungen von *Solanum*-Wildarten eine Reihe weiterer Aglyka nachgewiesen werden, darunter Demissidin, Tomatidin und Tomatidenol

(vgl. Abb. 1.2.1) (Gregory 1981, Osman et al. 1978, Schmiediche et al. 1980, 1982, Van Gelder et al. 1988b, Zrúst 2004). Die entsprechenden GAe ähneln vom Aufbau her den Kartoffelalkaloiden, indem das Aglykon mit einem Drei- oder Vierfachzucker verbunden ist. Die wichtigsten in wilden *Solanum*-Arten vorkommenden GAe sind mit ihrer strukturellen Verwandtschaft aus Tabelle 1.5 zu entnehmen.

**Tab. 1.5** MG, Form des Aglykon und der Zuckerkomponente der häufigsten in wilden *Solanum*-Arten vorkommenden GAe (Bianco et al. 2002, Cataldi et al. 2005, Falbe & Regitz 1991, Friedman et al. 1997, Lawson et al. 1997, Ono et al. 1997, Väänänen et al. 2005, Vázquez et al. 1997).

GA	Summenformel	MG [g/mol]	Aglykon	MG Aglykon [g/mol]	Zuckerkomponente
$\alpha$ -Chaconin	C <sub>45</sub> H <sub>73</sub> NO <sub>14</sub>	852.1	Solanidin	397.6	Chacotriose
$\alpha$ -Solanin	C <sub>45</sub> H <sub>73</sub> NO <sub>15</sub>	868.1	Solanidin	397.6	Solatriose
$\alpha$ -Solamargin	C <sub>45</sub> H <sub>73</sub> NO <sub>15</sub>	868.1	Solasodin	413.6	Chacotriose
$\alpha$ -Solasonin	C <sub>45</sub> H <sub>73</sub> NO <sub>16</sub>	884.1	Solasodin	413.6	Solatriose
$\beta$ -Solamarin	C <sub>45</sub> H <sub>73</sub> NO <sub>15</sub>	868.1	Tomatidenol	413.6	Chacotriose
$\alpha$ -Solamarin	C <sub>45</sub> H <sub>73</sub> NO <sub>16</sub>	884.1	Tomatidenol	413.6	Solatriose
Demissin	C <sub>50</sub> H <sub>83</sub> NO <sub>20</sub>	1018.2	Demissidin	399.7	Lycotetraose
Dehydrodemissin	C <sub>50</sub> H <sub>81</sub> NO <sub>20</sub>	1016.2	Solanidin	397.6	Lycotetraose
$\alpha$ -Tomatin	C <sub>50</sub> H <sub>83</sub> NO <sub>21</sub>	1034.2	Tomatidin	415.7	Lycotetraose
Dehydrotomatin	C <sub>50</sub> H <sub>81</sub> NO <sub>21</sub>	1032.2	Tomatidenol	413.6	Lycotetraose
Commersonin	C <sub>51</sub> H <sub>85</sub> NO <sub>21</sub>	1047.3	Demissidin	399.7	Commertetraose
Dehydrocommersonin	C <sub>51</sub> H <sub>83</sub> NO <sub>21</sub>	1045.3	Solanidin	397.6	Commertetraose
Leptinin I	C <sub>45</sub> H <sub>73</sub> NO <sub>15</sub>	868.1	Leptinidin	413.6	Chacotriose
Leptinin II	C <sub>45</sub> H <sub>73</sub> NO <sub>16</sub>	884.1	Leptinidin	413.6	Solatriose
Leptin I	C <sub>47</sub> H <sub>75</sub> NO <sub>16</sub>	909.8	Acetylleptidin	455.3	Chacotriose
Leptin II	C <sub>47</sub> H <sub>75</sub> NO <sub>17</sub>	925.8	Acetylleptidin	455.3	Solatriose

Neben den strukturell verwandten Aglyka kommen noch diverse Hydroxy- und Acetoxy-Derivate des Solanidins vor (Lachman et al. 2001). Eine Übersicht hierzu findet sich bei Schreiber (1968a, b). Die wichtigsten Vertreter der Hydroxy-Derivate sind Leptinin I und II, die häufigsten Acetoxy-Derivate Leptin I und II. Beide Derivatypen konnten in hohen Konzentrationen bislang nur in Blättern von *S. chacoense* identifiziert werden (Ronning et al. 1999, 2000). Die zugehörigen Aglyka sind das Leptinidin bzw. Acetylleptinidin. Bei beiden befindet sich die funktionelle Gruppe an C-23 des F-Ringes im Solanidin (Abb. 1.2.1).

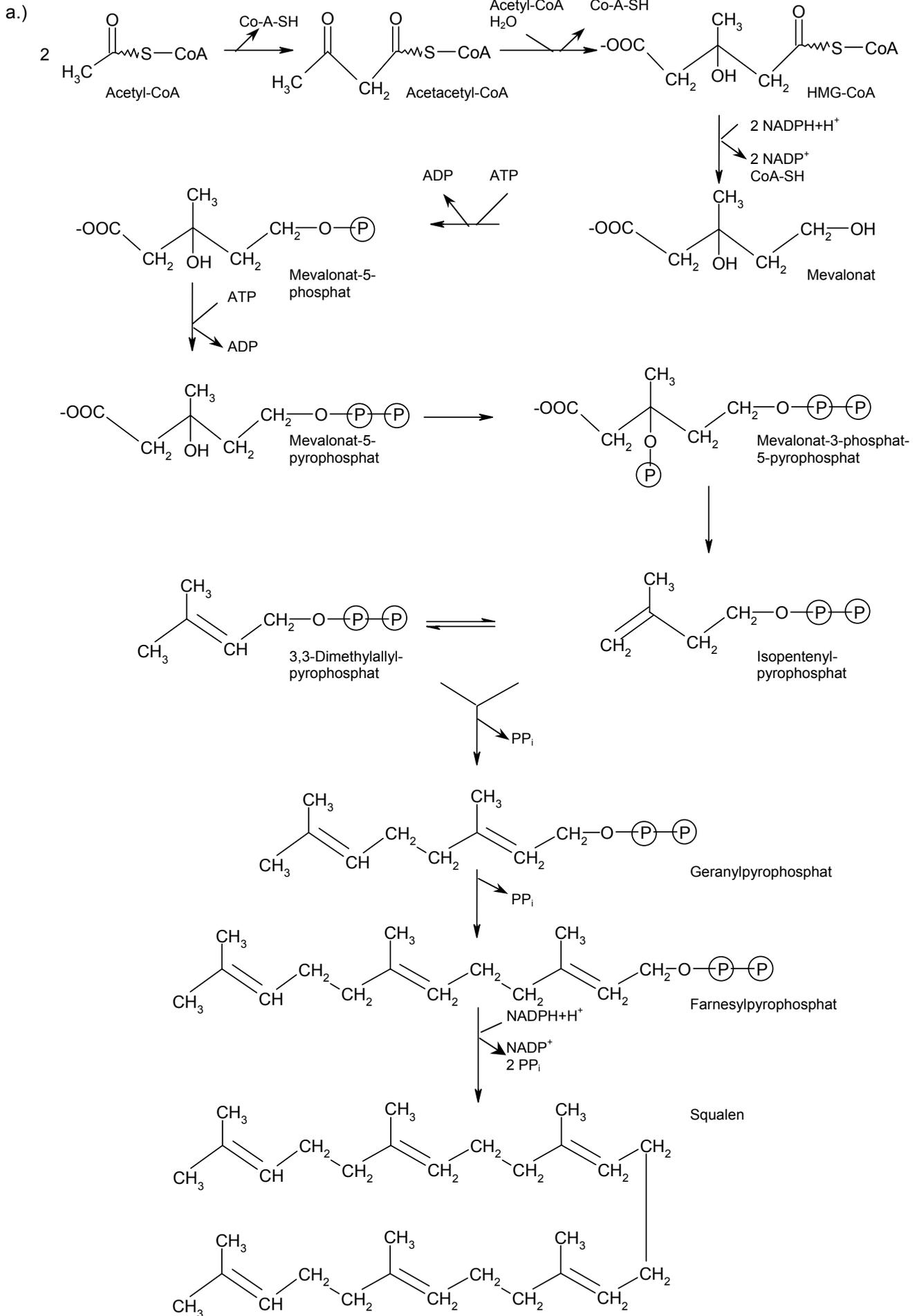
Wilde *Solanum*-Arten dienen heute noch zur Integration erwünschter Resistenzgene ins genetische Material der Kulturkartoffel (Bradshaw et al. 2006, Darsow 2002, Friedman 2006,

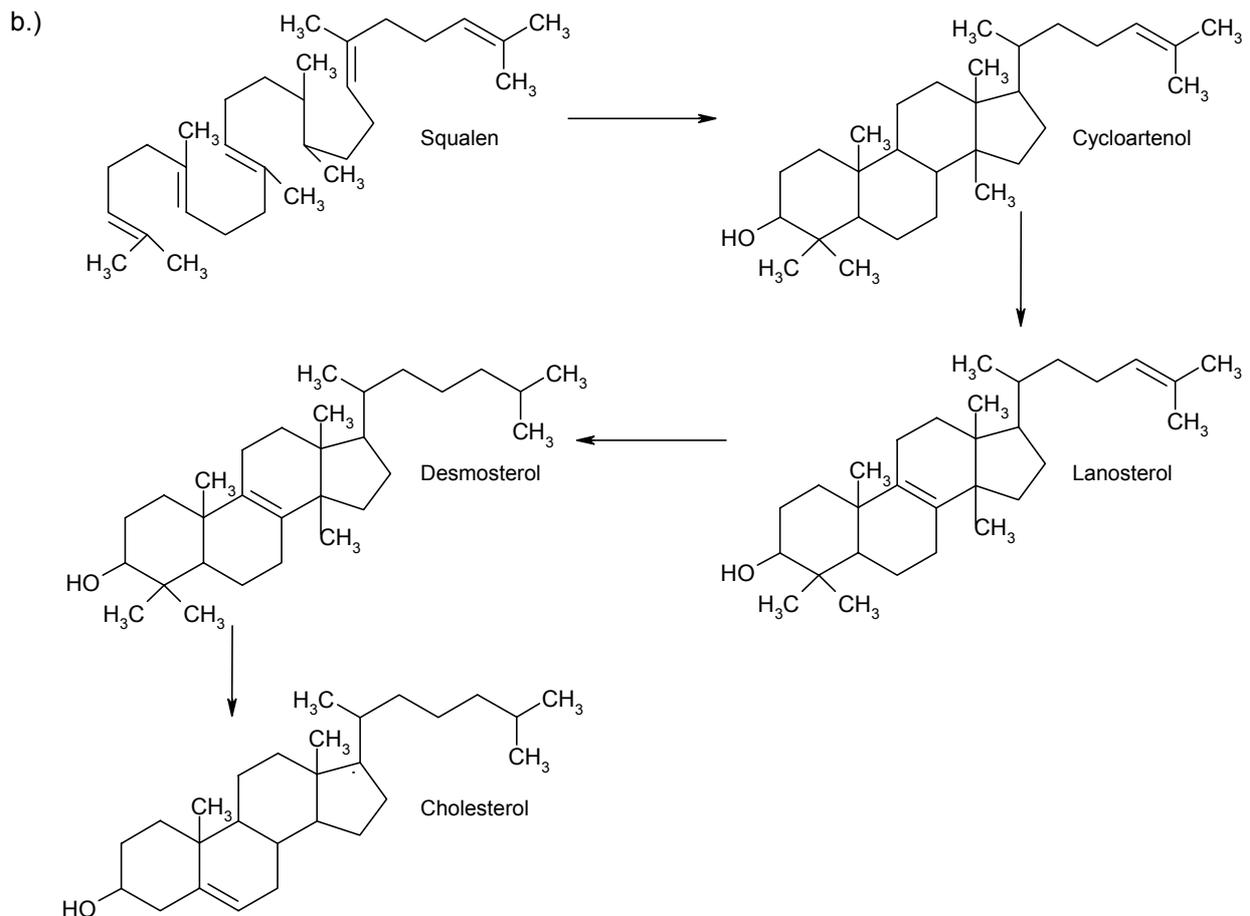
Gregory et al. 1981, Osman et al. 1978, Rangarajan et al. 2000, Wink 1988, Yencho et al. 2000). Wie Sharma & Salunkhe (1989) hinwiesen, muss jedoch berücksichtigt werden, dass dadurch auch unerwünschte GAe eingeführt werden können. Laurila et al. (1996) und Väänänen et al. (2005) konnten eine qualitative Veränderung in der GA-Zusammenstellung in somatischen Hybriden aus *S. tuberosum* und *S. acaule* bzw. *S. brevidens* feststellen.

#### 1.2.4 Biosynthese und Abbau

Die Biosynthese vieler Sekundärstoffen wird durch Verwundung oder Pathogeninfektion *de-novo* in Gang gesetzt (Wink 2003a), wobei Licht und Sauerstoff fördernd wirken (Teuscher & Lindequist 1994). Die Synthese der GAe verläuft zunächst über das Zwischenprodukt Cholesterol (Bergensträhle et al. 1996, Heftman 1983, Valkonen et al. 1996).

Im ersten Schritt der Steroid-Synthese (Abb. 1.5.1a) kommt es zunächst zur Reaktion eines Moleküls Acetyl-CoA ( $C_2$ ) mit Acetoacetyl-CoA ( $C_4$ ) zum ersten Zwischenprodukt 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA,  $C_6$ ). Dieses wird mittels NADPH unter gleichzeitiger Abspaltung des CoA-Restes zur Mevalonsäure reduziert. Anschließend wird das Mevalonat in drei enzymkatalysierten Schritten zu Mevalonat-3-phospho-5-pyrophosphat phosphoryliert. Dieses instabile Intermediat wird unter Abspaltung eines Phosphatrestes decarboxyliert, woraus aktives Isopren (Isopentenylpyrophosphat,  $C_5$ ) hervorgeht, das teilweise zu 3,3-Dimethylallylpyrophosphat ( $C_5$ ) isomerisiert. Durch Kondensation beider isomerer Formen entsteht ein  $C_{10}$ -Körper, das Geranylpyrophosphat. Nach Wiederholung dieser Reaktion mit einem weiteren  $C_5$ -Körper entsteht das aus 15 C-Atomen bestehende Farnesylpyrophosphat. Aus zwei dieser Farnesylpyrophosphat-Moleküle bildet sich durch reduktive Kondensation der unmittelbare Vorläufer des Cholesterols, das Squalen ( $C_{30}$ ). In der nächsten Phase (Abb. 1.5.1b) entsteht durch Cyclisierung aus dem linearen Squalen über die Zwischenstufen Cycloartenol, Lanosterol, Desmosterol und die Abspaltung von drei  $CH_3$ -Gruppen schließlich das Cholesterol ( $C_{27}$ ) (Bianchini et al. 1996, Heftmann 1983, Richter 1998). Sowohl Cholesterol als Vorläufermolekül, als auch der Ablauf bis zum Cholesterol wurde durch zahlreiche Studien mit radioaktiv markierten Ausgangsprodukten und Zwischenstufen untermauert (Übersicht bei Heftmann 1983, Beeler et al. 1963, Eltayeb & Roddick 1984, Kozukue et al. 2001). Bergensträhle et al. (1996) wiesen nach, dass bei Akkumulation der Alkaloide gleichzeitig die Cholesterol-Konzentration abnahm. Bei einer früheren Untersuchung verringerte sich die GA-Bildung nach Zusatz von Inhibitoren der Sterolsynthese (Bergensträhle et al. 1992b).





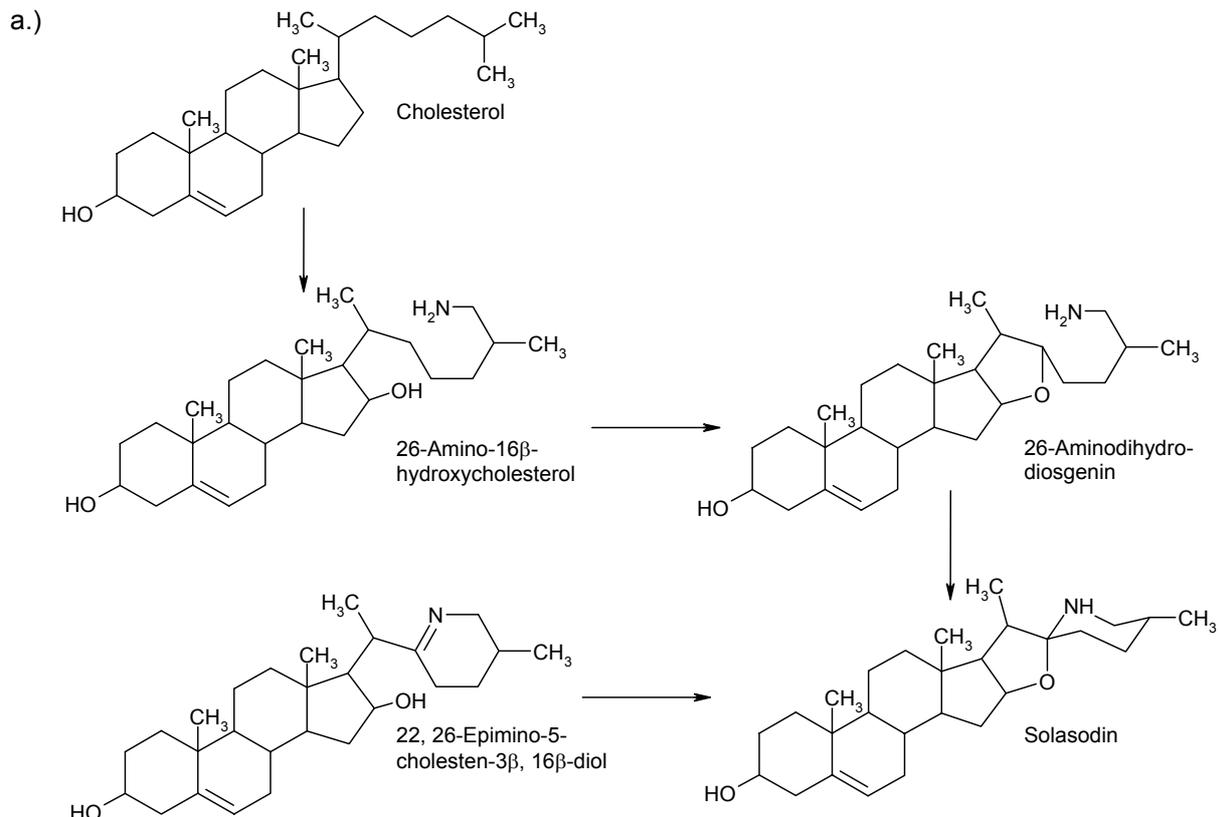
**Abb. 1.5.2** Biosynthese der GAe zum Cholesterol (nach Heftmann 1983, Richter 1998):  
 a.) bis zum linearen Squalen,  
 b.) Cyclisierung zum Cholesterol.

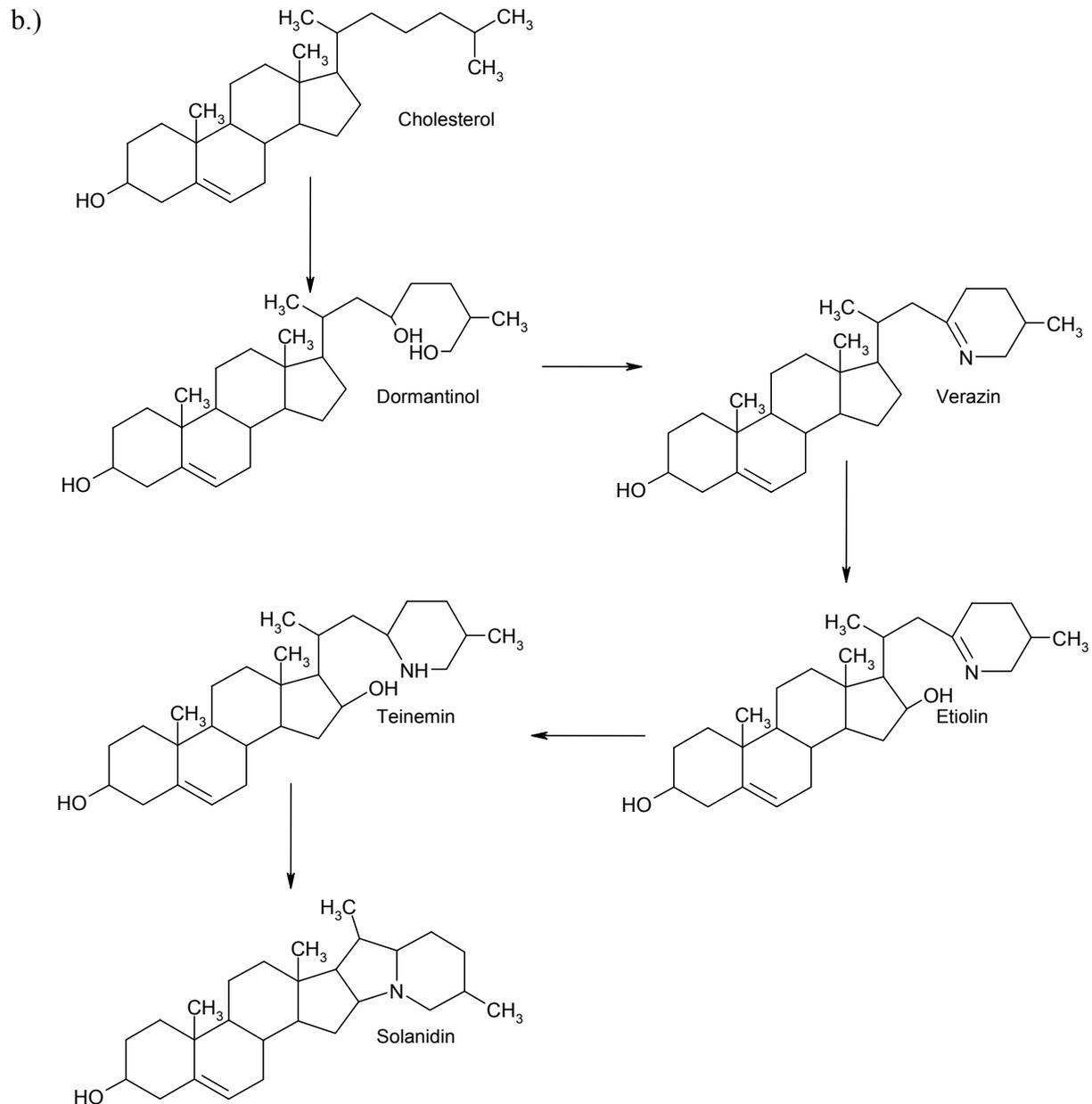
Der weitere Ablauf vom Cholesterol bis zum vollständigen GA ist trotz zahlreicher Untersuchungen bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Bekannt ist, dass sich der Biosyntheseweg zur Bildung der Solanidane und Spirosolane aufspaltet, wobei in beiden Fällen zunächst der Stickstoff ins Molekül integriert wird. Tschesche et al. (1976) fanden Hinweise, dass dies über einen einfachen Austausch der terminalen Hydroxylgruppe durch eine Aminogruppe erfolgt, ähnlich einer Transaminierungsreaktion. Als Donor scheint in *S. tuberosum* eine Aminosäure, z. B. Glycin oder Alanin zu fungieren (Jadhav & Salunkhe 1973).

Die meisten Publikationen gehen davon aus, dass die Synthese der Spirosolane (Abb. 1.5.2a) mit sekundär gebundenem Stickstoff entweder über 26-Amino-16 $\beta$ -hydroxycholesterol und dem Ringschluss von zunächst Ring E zum 26-Aminodihydrodiosgenin (Tschesche & Petersen 1975) oder über einen Ringschluss von Ring F und der Bildung von 22, 26-Epimino-5-cholesten-3 $\beta$ , 16 $\beta$ -diol (Schreiber 1968a) verläuft. Bei der Bildung der Solanidane (Abb. 1.5.2b), die einen tertiär gebundenen Stickstoff enthalten, entsteht zunächst Dormantinal. Erst danach wird der Stickstoff integriert und über die Zwischenstufen Verazin, Etiolin und Teinemin schließlich das fertige Solanidin gebildet. Einen leicht abweichenden Syntheseweg

schlugen Petersen et al. (1993) vor. Sie postulierten, dass Solanidin, Solasodin, Tomatidenol und Soladulcin direkt aus Cholesterol entstehen, während Tomatidin und Demissidin aus gesättigtem Cholesteranol hervorgehen. Auf dieser These basierend nehmen Friedman & McDonald (1997) an, dass zunächst ungesättigte Formen entstehen, darauf folgend erst die gesättigten.

Abgeschlossen wird die Bildung der GAe schließlich durch die Anheftung der Zuckerseitenkette. Das erste Zuckermolekül, bei Solanin eine UDP-Galaktose bzw. UDP-Glucose bei Chaconin, wird jeweils über eine Solanidin-UDP-Glycosyltransferase übertragen (Jadhav & Salunkhe 1973, Lavintman et al. 1977, Liljegren 1971, Moehs et al. 1997, Osman et al. 1980). Die Klonierung und Antisense-Unterdrückung des Genes zur Bildung der UDP-Glycosyltransferase, resultierte in verminderten GA-Gehalten in transgenen Kartoffelknollen und brachte somit den Beweis (McCue et al. 2005, Moehs et al. 1997, Stapleton et al. 1991). Die Glykosylierung des Aglykons erfolgt dabei recht schnell, so dass freies Solanidin in gesunden Knollen praktisch nicht anfällt (Osman et al. 1980).





**Abb. 1.5.2** Biosynthese der GAE ausgehend von Cholesterol (nach Heftmann 1983, Roddick 1974):  
 a.) zum Spirosolan-Aglykon: Solasodin  
 b.) zum Solanidan-Aglykon: Solanidin.

Der Bildungsort kann bislang nur vermutet werden. Basierend auf seinen Studien an Tomatenpflanzen geht Roddick (1979) von mikrosomalen Organellen als Syntheseapparate aus. Ramaswamy et al. (1976) schlugen die Bildung, zumindest von Vorstufen, in Plastiden vor. Sie entdeckten, dass in isolierten Chloroplasten  $^{14}\text{CO}_2$  aus radioaktiv markiertem  $\text{NaHCO}_3$  unter Lichteinfluss zu einem höheren Anteil in Solanidin eingebaut wird, als in Dunkelheit. Dagegen spricht die Beobachtung von Bergsträhle et al. (1992a), die die zur Glykosylierung der GAE notwendigen Transferasen nach Abzentrifugieren der Plastidfraktion noch im Überstand nachweisen konnten. Sicher ist, dass die Synthese der GAE mit der Keimung beginnt (Heftmann 1983). Die Akkumulation der fertigen Alkaloide erfolgt in der

löslichen Phase des Cytoplasma und/oder in der Vakuole (Hänsel & Sticher 2004, Roddick 1976, 1977). GAe häufen sie sich an ihren Syntheseorten an, da sie innerhalb der Pflanze nicht transportiert werden (Friedman 2006, Heftmann 1983, Roddick 1992).

Ein bemerkenswerter Abbau der GAe konnte in der Kartoffel bislang nicht festgestellt werden. Bei Tomatenpflanzen ist bekannt, dass die Zerlegung des  $\alpha$ -Tomatins in den Früchten mit der Reife erfolgt (Friedman 2002). Eltayeb & Roddick (1985) wiesen nach, dass die Abbauprodukte in geringen Mengen im Chlorophyll, vor allem aber in Carotinoiden und Xanthophyllen wiederzufinden sind. Die enzymatische Zerlegung innerhalb der Pflanze erfolgt dabei durch stufenweise Abspaltung der Zucker aus der Seitenkette (Schreiber 1968a, Heftmann 1983, Bushway et al. 1990). Der weitere Abbau des Aglykons liegt noch im Dunkeln.

## 1.2.5 Erwünschte Eigenschaften

Grundsätzlich ist das Vorkommen der GAe in Kartoffelpflanzen als nützlich anzusehen, dient sie doch der Ausbildung einer Resistenz gegen zahlreiche Schadorganismen. Wichtige Kartoffel-Krankheiten und ihre Erreger sind in Radtke & Rieckmann (2001) sowie in Salazar (2006) zu finden.

### 1.2.5.1 Pilzresistenz

Pilze, die die Kartoffelpflanze befallen sind sehr zahlreich. Schadwirkungen werden am häufigsten durch die Folgenden hervorgerufen:

*Phytophthora infestans* (Kraut- und Knollenfäule), *Alternaria solani* (Dürrfleckenkrankheit), *Rhizoctonia solani* (Pocken- oder Wurzeltöterkrankheit), *Spongospora subterranea* (Pulverschorf), *Helminthosporium solani* (Silberschorf), *Fusarium coeruleum* (Weißfäule), *Synchytrium endobioticum* (Kartoffelkrebs), *Fusarium oxysporum* ssp. *lycopersici* (Fusarium-Welke), *Septoria lycopersici* (Tomaten-Blattfleckenkrankheit), *Verticillium albo-atrum* (Vercillium-Welke), *Botrytis cinerea* (Grauschimmel).

Ein von Percival et al. (1999) durchgeführter Vergleich der Resistenz von Oberflächenknollen und Erdknollen gegen verschiedene Pilzerreger deutet auf die fungizide Wirkung der GAe hin. Wachstumsraten, Sporenbildung und Konidosporenanzahl waren signifikant erniedrigt bei Kultivierung auf den ergrünteten Oberflächenknollen, die höhere GA-Gehalte aufwiesen. Eine Abhängigkeit der Wirksamkeit vom Alkaloidtyp wurde aus zahlreiche Studien abgeleitet. Mehrfach zeigte sich eine höhere fungizide Aktivität von  $\alpha$ -Tomatin (Durbin & Uchytl 1969, Osbourn 1996), gefolgt von  $\alpha$ -Chaconin und Solamargin, während  $\alpha$ -Solanin bzw. Solasonin kaum wirksam waren (Fewell & Roddick 1997). Traten die Solanidin- und

Solasodin-Alkaloide gepaart auf, so wurden zusätzlich synergistische Effekte nachgewiesen (Fewell & Roddick 1993, Fewell et al. 1994). Nach Wolters (1964) war nicht die Zuckerkette allein für die Aktivität ausschlaggebend, sie beeinflusste aber weitgehend die Stärke der Wirkung, da allgemein GAe wirksamer waren. Worauf die fungitoxische Wirkung der GAe beruht, ist nicht genau bekannt. *In vitro*- und *in vivo*-Studien ließen vermuten, dass der fungitoxische Wirkmechanismus auf einer Komplexbildung der Alkaloide mit den Sterolen der Biomembran des Pilzes beruht, dies führt zur Porenbildung und schließlich dem Verlust der Membranintegrität (Mert-Türk 2006). Die Untersuchung von Nes et al. (1983) an *Phytophthora cactorum* lässt als zusätzlichen Mechanismus die Hydrolyse der GAe zum Aglykon und deren Einbau in die Mycelmembran des Pilzes vermuten, was wiederum die Störung der Sterolsynthese und der Membranfunktion durch Interaktion mit Membranproteinen zur Folge hat.

Einigen Autoren bezweifelten Effekte von GAen auf Pilze allerdings gänzlich. So konnten Andrivon et al. (2003) keine Auswirkungen auf *Phytophthora infestans*, Morrow & Caruso (1983) auf *Rhizoctonia solani* und Frank et al. (1975) auf Knollenfäule-, Welke- und Schorferreger feststellen. Eine mögliche Erklärung scheint die Anpassung einzelner Schaderreger auf ihre Wirtspflanze sein. Ford et al. (1977), Ito et al. (2004) sowie Lairini & Ruiz-Rubio (1997) konnten in *Fusarium oxysporum* ssp. *lycopersici* und Bouarab et al. (2002) in *Septoria lycopersici* ein Tomatinase-Enzym nachweisen, das in der Lage ist, die Lycotetraose-Seitenkette aus  $\alpha$ -Tomatin abzuspalten und das GA somit in das weniger toxische Aglykon umzuwandeln. Nach Mert-Türk enthalten auch *Botrytis cinerea*, *Verticillium albo-atrum* und *Alternaria solani* eine Tomatinase. Wie Hänsel & Sticher (2004) berichteten, kann es alternativ auch zur Ausbildung von Pilzmutanten kommen, die in ihrer Plasmamembran einen geringeren Sterolgehalt aufweisen und daher weniger anfällig für die Komplexbildung mit GAen sind.

### 1.2.5.2 Bakterienresistenz

Wichtige, durch bakterielle Infektion ausgelöste Krankheiten sind:

die Nassfäule durch *Erwinia carotovora*, Kartoffelschorf (*Streptomyces scabies*), Bakterienringfäule (*Corynebacterium sepedonicus*) und die Schleimkrankheit (*Pseudomonas solanacearum*).

Die Wirksamkeit von GAen gegen bakterielle Schädlinge wurde nur selten untersucht. Dabei konnten positive (Jadhav et al. 1981, Lachman et al. 2001, Rokka et al. 2005) wie negative Reaktionen (Andrivon et al. 2003, Frank et al. 1975, Paquin 1966) nachgewiesen werden. Obwohl Sterole in Prokaryoten fehlen, enthalten sie sterol-ähnliche, stabilisierende Hopanoide

(Rokka et al. 2005), so dass grundsätzlich eine Aktivität von GAen gegen Bakterien möglich ist, zumal auch Saponine durch Erhöhung der bakteriellen Membranpermeabilität bakterizid wirken. Die Wirksamkeit scheint dabei vom jeweils vorliegenden GA-Typ abhängig zu sein.

### 1.2.5.3 Virenresistenz

Durch Viren bedingte Krankheiten sind:

die Blattrollkrankheit durch das Kartoffelblattrollvirus (PLRV), Strichelkrankheit (persistentes Kartoffel-Virus Y), ABC-Krankheit (Tabaknekrose-virus), Büscheltriebkrankheit (Kartoffelbüscheltriebvirus), verschiedene Mosaikkkrankheiten (Rauh-, Roll- und Kräuselmosaik) sowie die Eisenfleckigkeit durch das Tabak-Rattle-Virus. Ein durch Mycoplasmosen hervorgerufene Infektion ist die Welkekrankheit.

Viruserkrankungen waren selten Gegenstand von Resistenzstudien. Anzeichen für eine Virus-Resistenz durch GAe zeigte die Untersuchung von Bianco et al. (2003). Sie wiesen in Schalen resistenter Klone gegen das Kartoffelvirus Y höhere Alkaloid-Konzentrationen nach als in Kontrolllinien. Als vorstellbares Target gilt die Störung der viralen Hüllmembran. Gegen eine Beteiligung der GAe an der Virusresistenz sprechen die erniedrigten Alkaloid-Gehalte der mit Tabak-Rattle-Virus infizierten Knollen verglichen mit gesundem Material bei Dale et al. (2000).

### 1.2.5.4 Insektenresistenz

Die sich auf Kartoffelpflanzen spezialisierten Insektenschädlinge sind Drahtwürmer (Larven des Saatschnellkäfer *Agriotes obscurus* und *A. lineatus*), die Kartoffelzikade (*Emboasca fabae*), Kartoffelerdfloh (*Psylloides affinis*) sowie der Kartoffelkäfer (*Leptinotarsa decemlineata*). Daneben kommen als Generalisten Blattläuse (u. a. Grüne Pflirsichblattlaus *Myzus persicae*, Grüngestreifte Kartoffelblattlaus *Macrosiphon euphorbiae*, Kartoffelkellerlaus *Rhopalosiphonium latysiphon*), Engerlinge der Mai-, Juni- und Gartenlaubkäfer, Springschwänze (*Sminthurus solani*, *Bourletiella pruinosa*), verschiedene Wanzenarten (Kartoffelwanze *Calocoris norvegicus*, grüne Futterwanze *Lygocoris pabulinus*) Erdraupen und Nacktschnecken (*Deroceras reticulatum*, *Milax budapestansis*) vor.

Insgesamt wurden mehrfach positive Korrelationen der GA-Gehalte zur Resistenz gegen Kartoffelkäfer (Sinden et al. 1980), Drahtwürmer (Jonasson & Olsson 1994) oder Kartoffelgrashüpfer (Tingey et al. 1978) beobachtet. Andere Studien wiederum zeigten keine Beziehung zwischen den GA-Gehalten und dem Auftreten der Insektenschädlinge (Flanders et al. 1992, Lachman et al. 2001). Eine Erklärung für diesen Widerspruch lieferten Flanders et al. (1992). In einer breit angelegten Studie verglichen sie wilde *Solanum*-Arten auf ihre Resistenz gegen eine Vielzahl pathogener Insekten. Ergebnis war, dass nicht der Gesamt-GA-

Gehalt entscheidet, sondern das Vorliegen bestimmter Alkaloid-Arten. So zeigten Leptine und  $\alpha$ -Tomatin bessere Wirksamkeit gegen Kartoffelzikade und Kartoffelkäfer als die Solanidin- und Solasodin-GAe. Entgegen früheren Meinungen waren Commersonin, Demissin und Solanocardenin unwirksam (Kuhn & Löw 1955c, Sinden et al. 1980, Flanders et al. 1992, Hänsel & Sticher 2004). Zusätzlich scheinen noch weitere Resistenzanlagen eine Rolle zu spielen. Ebenfalls Flanders et al. (1992) sowie De Medeiros & Tingey (2006) konnten zeigen, dass auch Drüsentrichome der Blätter Einfluss auf Kartoffelkäfer und Kartoffelzikade ausübten.

Gut untersucht ist die Aktivität von Leptin-Alkaloiden gegen den Kartoffelkäfer (Kuhn & Löw 1957, 1961, Schwarze 1963). Es konnte eine Dosis-Wirkungsbeziehung nachgewiesen, da höhere Leptin-Gehalte geringere Fraßschäden und höhere Mortalität des Käfers zur Folge hatte (Sinden et al. 1986, Sikinyi et al. 1997). Kowalski et al. (1999) konnten nach Aufnahme einer Leptin I-enthaltenden Diät eine verlangsamte Entwicklung in den Larven nachweisen.

Auf welchem Wirkungsmechanismus die Aktivität beruht, ist nicht genau bekannt. Wie die Arbeit von Hollister et al. (2001) zeigte, könnten chemosensitive Rezeptoren verantwortlich sein. Isolierte Neuronen chemosensitiver Haare des adulten Kartoffelkäfers reagierten dosisabhängig auf reines Leptin I im Konzentrationsbereich 0,03 bis 0,3 mM. Lag gleichzeitig  $\alpha$ -Solanin vor, war die Antwort abgeschwächt. Mögliche Gründe könnten noch Membranstörungen (Roddick et al. 1990, 1992, Fewell et al. 1994) oder Interaktionen mit dem Sterol-Metabolismus (Nes et al. 1982) der Insekten sein. Vermutet wird eine Aktivität über die Imminogruppe in Ring F.

In zahlreichen Tests offenbarte  $\alpha$ -Tomatin ebenfalls repellente Wirkung. Bei Zunahme des  $\alpha$ -Tomatin-Gehaltes einer synthetischen Diät konnten Kowalski et al. (1999) in den der Eiern des Kartoffelkäfers eine verlangsamte Umwandlung in adulte Tiere beobachten. Das Aglykon Tomatidin zeigte keine Wirkung. Für die Aktivität scheint das Vorliegen einer Tetrasaccharid-Seitenkette mit Xylose-Einheit und das Fehlen der 5, 6-Doppelbindung im Aglykon wichtig zu sein (Hänsel & Sticher 2004).

#### **1.2.5.5 Nematodenresistenz**

Die beiden wichtigsten Fadenwürmer sind der Gelbe und Weiße Kartoffelzystennematode (*Globodera rostochiensis* bzw. *Globodera pallida*).

Die Wirksamkeit der GAe auf Nematoden wurde bislang kaum untersucht. Allen & Feldmesser (1971) führten eine nematizide Wirkung auf die freie Base des  $\alpha$ -Chaconins zurück, da die Wirkung bei niedrigem pH-Wert ausblieb. Voinilo & Ponin (1979) konnten einen Anstieg des GA-Gehaltes in der resistenten Sorte Ariadna nach Nematodenbefall

nachweisen, während die Konzentration in der anfälligen Sorte Loshitski unverändert blieb. Dagegen zeigte die Untersuchung von Forrest & Coxon (1980) keinerlei Zusammenhang von Nematodenbefall und GA-Konzentration, weder in den Wurzeln resistenter noch anfälliger Sorten.

Allgemein wird die nematizide Wirkung eher den Phytoalexinen, wie z. B. den Sesquiterpenen Rishitin und Lubimin, Solavetivenon, Phytotuberin und Katahdion, zugeschrieben (Teuscher & Lindequist 1994).

### 1.2.6 Unerwünschte Eigenschaften

GAe wirken auch auf den Säugetierorganismus toxisch. Pharmakologisch stehen zwei Wirkungen im Vordergrund. Erstens die Fähigkeit an  $3\beta$ -Hydroxy-Sterole zu binden und daher Membranfunktionen zu stören (Keukens et al. 1995, Roddick 1979, Roddick et al. 1988, Stine et al. 2006) und zweitens die Cholinesterasen des Körpers zu inhibieren (Krakowski et al. 1997, Roddick et al. 2001).

Durch die strukturell enge Verwandtschaft mit Saponinen zeigen *Solanum*-Alkaloide ähnliche physikalische Eigenschaften. Wie sie sind sie oberflächenaktiv und besitzen ein gutes Schaumbildungsvermögen (Hänsel & Sticher 2004, Heftmann 1983). Des Weiteren lysieren sie durch Komplexbildung mit Cholesterol sämtliche Zellen des Körpers, wobei die Wirkung auf Epithelzellen (Keukens et al. 1996) und Erythrozyten (Roddick et al. 1988, 2001) im Vordergrund steht. Seit den Studien von Keukens et al. (1995, 1996) wird folgende Modellvorstellung dieses Mechanismus vermutet:

Zunächst schiebt sich der Aglykonanteil in die Membran und bildet mit Sterolen einen 1:1-Komplex. Daraus resultiert eine eingeschränkte Beweglichkeit der Phospholipide, die bereits zu Störungen der Fluidität der Membranen führt (Woldemichael & Wink 2001). Erreichen diese GA-Sterolkomplexe eine bestimmte Dichte, kommt es zu kooperativen Zucker-Zucker-Interaktionen, die wiederum die Bildung einer irreversiblen Matrix initiieren. Diese Matrix ist es schließlich, die den Verlust der Barrierenfunktion des Bilayers verursacht. Der Typ des Komplexes und damit das Ausmaß der Membranschädigung, hängt neben der Art und dem Gehalt des Sterols (Stine et al. 2006) stark von der Struktur des GAs, seines Aglykons und der Konzentration in der Membran ab. Roddick (1979) und Keukens (1992) wiesen unterschiedliche Assoziationsfähigkeiten mit verschiedenen Membran-Sterolen nach. Stärkste Wirkung trat mit  $\beta$ -Sitosterol und Fucosterol ein, gefolgt von Cholesterol und Ergosterol. Die Fähigkeit zur Komplexbildung scheint dabei sowohl vom Aglykon, wie auch von der Zuckerseitenkette abzuhängen. Roddick et al. (1992 & 2001) verglichen Chacotriose-

enthaltende GAe ( $\alpha$ -Chaconin,  $\beta$ -Solamarin, Solamargin) in ihrer Wirkung auf Membransterole. Den stärksten Effekt zeigten  $\alpha$ -Chaconin und Solamargin, gefolgt von  $\beta$ -Solamarin. Praktisch unwirksam waren die Aglyka Solanidin, Tomatidin und Solasodin. Eine weitere Studie von Roddick et al. (1988) untersuchte die Abhängigkeit von der Zuckerseitenkette. Ergebnis war die höhere Affinität von Chacotriose-enthaltenden GAen zu Cholesterol, während GAe mit Solatrioseanteil minimale bis gar keine Aktivität zeigten. Hintergrund, so wird vermutet, sind Zucker-Zucker-Interaktionen mit membranständigen KH-Ketten oder Zellrezeptoren (Blankemeyer et al. 1998, Friedman et al. 1992, Nakamura et al. 1996, Rayburn et al. 1994). Chataing et al. (1998) bewiesen für die  $\beta$ -Chacotriosyleinheit eine höhere Bindungsaffinität zu Zellrezeptoren, als für  $\beta$ -Solatriosyl. Kommen beide Alkaloide gemeinsam vor, existierte ein Synergismus (Roddick et al. 1990 & 2001). Das höchste Potenzial zeigte eine 1:2,3-Mischung aus  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin und gerade dieses Verhältnis ist natürlicherweise in Kartoffeln enthalten (Friedman 2006). Der Synergismus geht vermutlich aus dem Vorliegen der weiteren Zuckerkette hervor, wie die Untersuchung von Roddick et al. (1990) belegte. GAe mit unterschiedlichen Aglyka und Zuckerketten zeigten ebenso synergistische Wirkungen auf Phosphatidylcholin/Cholesterol-Liposomen.

Die destruktive Membranstörung wirkt sich direkt auf den Barriereeffekt der intestinalen Mucosa aus. Wie die Studie von Gee et al. (1996) offenbarte, reagierte die Mucosa auf  $\alpha$ -Tomatin, gefolgt von einem Gemisch aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Chaconin sowie  $\alpha$ -Solanin (1,9:1:1,8) stärker cytotoxisch auf menschliche Darmzellen (INT-407, Caco-2), als *Gypsophila*-Saponine. Nach Zerstörung der Membran wird die Mucosa einerseits für zahlreiche unerwünschte Stoffe bis zur Größe von Proteinen passierbar (Roddick et al. 1988), andererseits kommt es zum Verlust von Metaboliten, die aus den Zellen herausfließen.

Zweite bedeutende Wirkung entfalten GAe auf die Cholinesterasen des Organismus. Acetylcholin- (EC 3.1.1.7) und Butyrylcholinesterase (EC 3.1.1.8) sind wichtige Bestandteile des Nervensystems. Sie sind im synaptischen Spalt zwischen zwei Neuronen (Parasympathikus: präganglionär und postganglionär, Sympathikus: präganglionär) bzw. an der motorischen Endplatte für die Spaltung von Acetylcholin verantwortlich und damit für die Beendigung der Reizweiterleitung (Friedman & McDonald 1997, Friedman et al. 2003b, Lachman et al. 2001, Nigg et al. 1996). Apathie, Schwäche und Konfusion sind typische Symptome, die auf die Störung des Nervensystems zurückzuführen sind. Auch hier wurde die Abhängigkeit von den Saccharid-Seitenketten nachgewiesen. Das reine Aglykon Solanidin zeigte zwar kaum Wirksamkeit auf bovine Acetylcholinesterase (Bushway et al. 1987). Es spielt bei der Inhibition der Cholinesterasen jedoch eine größere Rolle als zuvor bei der

Membranwirkung (Roddick 1990, 2001). Bei Roddick (1989) zeigte  $\alpha$ -Chaconin starke Aktivität,  $\alpha$ -Solanin war kaum wirksam, eine Mischung von beiden erhöhte die Aktivität zusätzlich, während die Solasodin-Alkaloide Solasonin und Solamargin weder isoliert, noch im Gemisch Wirkung auf die Cholinesterasen aufwiesen.

Des Weiteren konnten unspezifischere Wirkungen in Tiermodellen und Tierstudien beobachtet werden. Die GAe induzierten die Ornithin-Decarboxylase, die die Decarboxylierung von Ornithin zu Putrescin katalysiert (Caldwell et al. 1991, Friedman 2006). Da Putrescin Ausgangsmolekül zur Bildung der Polyamine ist, bestimmt das Enzym die Geschwindigkeit ihrer Biosynthese. Polyamine interagieren mit Nukleinsäuren. Es wird angenommen, dass sie gefaltene DNA stabilisieren können. Des Weiteren scheinen sie als endogene Regulatorsubstanzen zu fungieren, wobei genaueres noch nicht bekannt ist. Die Untersuchung von Friedman et al. (2003a) belegte eine schwach östrogene Wirkung von Solanidin. Schließlich wurde häufiger von embryotoxischen und teratogenen (Friedman et al. 1991, Jelinek et al. 1976, Mun et al. 1975, Poswillo et al. 1973, Rayburn et al. 1994, Renwick et al. 1984, Waalkens-Berendsen et al. 1992, Wang et al. 2005) sowie genotoxischen (Ness et al. 1984) Effekten in verschiedenen Tierversuchen berichtet. Eindeutige Ergebnisse hierzu fehlen, da der genaue Wirkmechanismus bislang nicht vollständig geklärt ist. Ein Grund scheint die Interaktion der GAe mit Ionenkanälen der Membranen zu sein, wodurch es zur Störung des  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Na}^{+}$ -Transportes über die Zellmembran kommt. Da die relative Wirksamkeit der GAe auf Überlebensrate und Teratogenität von Froschembryos vergleichbar mit der Veränderung des Membranpotentials war (Blankemeyer et al. 1995), geht Friedman (2006) von einem möglichen Zusammenhang beider Beobachtungen aus. Des Weiteren spielen für Friedman (2006) nach Auswertung zahlreicher Studien folgende Merkmale für die Toxizität eine Rolle:

- die Seitenkette scheint Einfluss auf das toxische Potenzial zu besitzen, da die einzelnen GAe unterschiedliche Wirksamkeit zeigten und die Aglyka eine geringere Toxizität aufwiesen
- der Stickstoff des Steroidkerns ist wichtig für die teratogene Wirkung der GAe
- die Orientierung des ungepaarten Elektronenpaares am Stickstoff beeinflusst die Wirksamkeit nicht
- das Stickstoffatom im Steroidkern ist bei der Bindung an Membranrezeptoren beteiligt
- die Wirksamkeit ist pH-abhängig
- von der Toxizität der Einzelsubstanzen kann nicht auf die Wirksamkeit von GA-Mischungen geschlossen werden, da synergistische Effekte beschrieben wurden.

Für den Menschen konnten embryotoxische und teratogene Wirkung, die eindeutig auf eine GA-Aufnahme zurückzuführen waren, noch nicht beschrieben werden. Nach Hellenäs et al. (1992) führen die üblicherweise in Kartoffeln vorliegenden GA-Konzentrationen zu keinem teratogenen Risiko beim Menschen.

### **1.2.7 Toxikologie**

Obwohl Hall (1992) behauptete, dass GAe und cyanogene Glycoside für mehr menschliche Erkrankungen und Todesfälle verantwortlich sind, als andere pflanzliche Giftstoffe, ist davon auszugehen, dass ernsthafte Vergiftungen durch GAe in heutiger Zeit eher selten sind. Jedoch sind aus früheren Jahren schwerste Fälle bekannt, die bis hin zu Koma und Tod (ca. 30 Fälle) führten. Tabelle 1.6 zeigt eine Übersicht über bislang beschriebene Vergiftungsfälle, die mit hoher Wahrscheinlichkeit auf GA-Aufnahme zurückzuführen sind. Vermutlich ist die Dunkelziffer hoch, da die Symptome bei leichten Vergiftungen denen einer Lebensmittelintoxikation gleichen.

In niedrigeren Konzentrationen offenbaren sich vor allem abdominale Störungen wie Diarrhö, und Krämpfe. Diese sind auf die membranzerstörende Wirkung der GAe zurückzuführen. Zusätzlich kommt es ähnlich wie bei Saponinen zur Reizung des Nervus vagus, was einen Brechreiz und Erbrechen nach sich zieht. Werden höhere Menge aufgenommen, so kommen zusätzlich hoher Blutdruck und Hyperventilation, gefolgt von neurologischen Ausfällen durch die Cholinesterase-Inhibition hinzu (Rayburn et al. 1994). Basierend auf früheren Vergiftungsfällen wird die toxische Dosis beim Menschen auf 2-5 mg/kg KG geschätzt, die Letaldosis liegt bei ca. 3-6 mg/kg KG (Edwards & Cobb 1996, Hellenäs et al. 1992, Morris & Lee 1984). Die Anfälligkeit des Menschen scheint dabei sehr unterschiedlich zu sein, wie die Humanstudie von Mensinga et al. (2005) zeigte. Nach Aufnahme unterschiedlicher GA-Dosen, konnte eine geringe intra-individuelle, aber hohe inter-individuelle Variation der Blut-Konzentrationen beobachtet werden. Aufbauend auf diesen Ergebnissen bestätigte sich die toxische (140-350 mg GA für den Durchschnittsmenschen mit 70 kg) und letale Dosis (204-420 mg GAe). Des weiteren kann die Inhibierung der Cholinesterasen eine Veränderung der Arzneimittelkinetik hervorrufen, was z. B. bei Verwendung indirekter Parasympathomimetika zu beachten wäre (Krakowski et al. 1997).

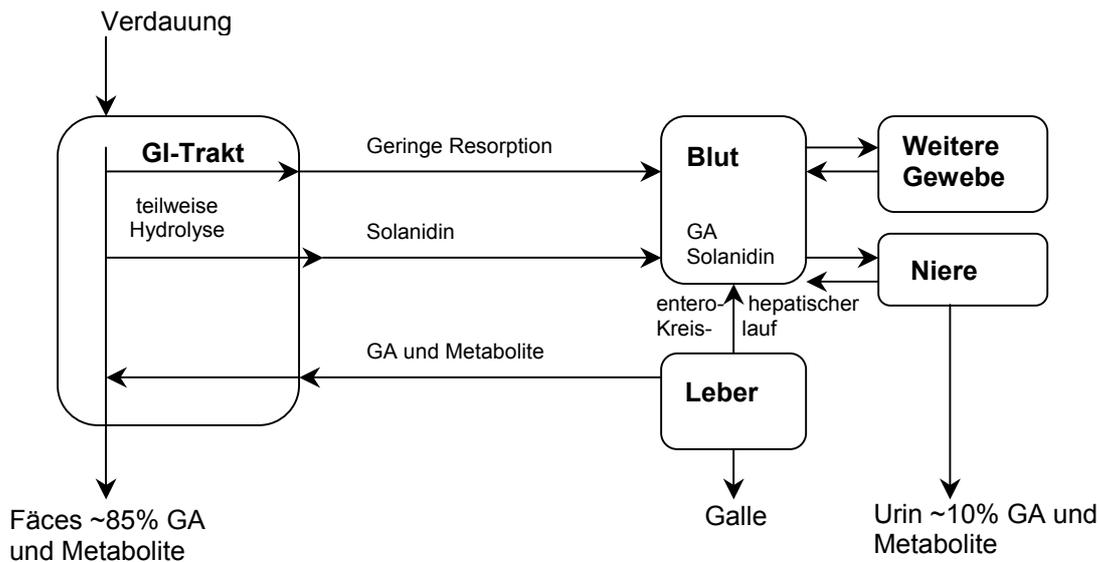
**Tab. 1.6** Übersicht über beschriebene Vergiftungsfälle nach GA-Aufnahme (Gonomori et al. 1993, Hellenäs et al. 1992, McMillan & Thompson 1979<sup>1</sup>, Morris & Lee 1984<sup>2</sup>, Swinyard & Chaube 1973<sup>3</sup>).

Autor	Publikations-jahr	Vergiftungsfälle
Gonomori et al.	1993	1 Frau
Goodman & Nawrot <sup>2</sup>	1984	61
McMillan & Thompson	1979	78 Kinder, 3 schwer erkrankt
Wilson <sup>2</sup>	1959	4 Personen
Reelah & Keem <sup>2</sup>	1958	404 Erwachsene, 22 tot
Rühl <sup>2</sup>	1951	Erwachsene
Terbruggen <sup>2</sup>	1936	1 Kind tot
Willimot <sup>2</sup>	1933	61 Personen, 1 tot
Autenreith <sup>1</sup>	1928	673 Erwachsene
Hansen <sup>2</sup>	1925	7 Personen, 2 tot
Griebel <sup>2</sup>	1924	keine genauen Angaben
Bömer & Mattis <sup>2</sup>	1924	keine genauen Angaben
Harris & Cockburn <sup>2</sup>	1918	60 Erwachsene, 1 Kind tot
Rothe <sup>2</sup>	1918	41 Personen
Pfuhl <sup>2</sup>	1899	56 Erwachsene
Schroff <sup>3</sup>	1865	Erwachsene

Als anerkannter Grenzwert für Knollen, die für die menschliche Ernährung bestimmt sind, gilt ein Gesamt-GA-Gehalt von 20 mg/100 g FG (entspricht 100 mg/100 g TG). Für neu gezüchtete Sorten muss sichergestellt sein, dass diese Grenze nicht überschritten wird (Lachman et al. 2001). Bei beginnender Grünung können in zugelassenen Sorten dennoch Gehalte von bis zu 1000 mg/100 g FG erreicht werden. Vielfach wurde der Grenzwert als zu gering angesehen. Morris & Lee (1984) wiesen darauf hin, dass dieses Limit nur dem vierfachen Sicherheitszuschlag entspricht. Von offizieller Seite wird durch das Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JEFCA) ein Gesamt-GA-Gehalt von unter 10 mg/100 g FG als unproblematisch angesehen (Grunenfelder et al. 2006). Ein No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) und eine tolerierbare tägliche Aufnahme (TDI) wurden bislang nicht aufgestellt, da bisher durchgeführte Human- und Tierstudien kein ausreichendes Datenmaterial zur Verfügung stellten (Mensinga et al. 2005).

### 1.2.8 Metabolisierung im Körper

Das Schicksal der aufgenommenen GAe im Körper wurde bislang kaum untersucht. Einige Studien zeigten, dass die Aufnahme direkt ins Blut erfolgt. Hellenäs et al. (1992) wies bei einer der wenigen Humanstudien die höchste Konzentration von  $\alpha$ -Solanin 5 (8,8 nM) bzw.  $\alpha$ -Chaconin 6 Stunden (16,9 nM) nach Aufnahme von 0,4 mg  $\alpha$ -Solanin/kg KG und 0,6 mg  $\alpha$ -Chaconin/kg KG nach. Ähnlich wie bei Rattenversuchen von Nishie et al. (1971) und der Untersuchung der Komplexbildung durch Friedman et al. (2000) deutete der Serumgehalt auf eine geringe intestinale Absorption. Sie lag bei Nishie et al. (1971) bei nicht mehr als 0,2%. Ist die Darmschleimhaut z. B. durch chronisch GA-Aufnahme vorgeschädigt, wird die Resorption drastisch erhöht. Der Nachweis von Solanidin im Blut (2,5 bis 12 nM) nach 8 bis 25 Stunden zeigte, dass ein nicht unerheblicher Teil der GAe zum Aglykon metabolisiert wird. Die biologische Halbwertszeit konnte für  $\alpha$ -Solanin auf 11 Stunden, für  $\alpha$ -Chaconin auf 19 Stunden geschätzt werden. Allgemein war der Gehalt im Blut gering, möglicherweise nehmen Leber und Niere einen Großteil auf. Hier scheint das Verhalten wieder den Saponinen zu ähneln, die ebenfalls im GIT nur in geringem Umfang resorbiert werden und deren Blutkonzentrationen durch einen enterohepatischen Kreislauf oder eine Plasmaproteinbindung niedrig sind (Hänsel & Sticher 2004). Die bereits erwähnte Studie von Mensinga et al. (2005) betrachtete die Pharmakokinetik über 96 Stunden. Verglichen wurde die Wirkungen zweier Aufnahmeformen mit je drei Konzentrationsbereichen (GA-Lösungen mit 0,3; 0,5 oder 0,7 mg GA/kg KG und Kartoffelpüree mit 0,95; 1,10 oder 1,25 mg GA/kg KG, wobei die höchste Konzentration dem oben genannten Grenzwert entsprach). Keine der Behandlungen zeigte systemische Effekte in den Testpersonen. Je nach aufgenommener GA-Menge konnte, wie zuvor, die Maximalkonzentration nach vier bis acht Stunden im Blut nachgewiesen werden. Die Clearance der GAe dauerte mehr als 24 Stunden. Die Halbwertszeiten waren bei  $\alpha$ -Chaconin länger (27-84 h) als bei  $\alpha$ -Solanin (5-42 h). Über die genaue Verstoffwechslung der GAe ist wenig bekannt. Der mutmaßliche Metabolismus der Alkaloide ist in Abbildung 1.6 dargestellt.



**Abb. 1.6** Postulierter Metabolismus der GAe (modifiziert nach Driedger 2000).

## 1.2.9 Einflussfaktoren auf die GA-Konzentration

### 1.2.9.1 Genetische Faktoren

Den stärksten Einfluss auf den GA-Gehalt einer Sorte hat der Genotyp. Er bestimmt einerseits den Grundgehalt in der Pflanze (Van Dam et al. 1999), aber auch die Akkumulationsfähigkeit unter Stressbedingungen (Papathanasiou et al. 1999a). Bislang konnte keine Beziehung zwischen der Alkaloid-Konzentration bei Ernte und der GA-Akkumulation während der Lagerung nachgewiesen werden (Griffith et al. 1997). Papathanasiou et al. (1998) beobachteten jedoch eine Veränderung des  $\alpha$ -Solanin: $\alpha$ -Chaconin-Verhältnisses während der Reifung in Abhängigkeit vom Genotyp. Während man zunächst von einigen wenigen Genen sprach, geht man heute davon aus, dass die Bildung der Alkaloide unter polygener Kontrolle steht (Sanford et al. 1996, Van Dam et al. 1999). Wie viele und welche Gene genau beteiligt sind, ist noch unbekannt.

### 1.2.9.2 Umweltfaktoren

Neben den genetischen Grundlagen beeinflussen Umweltfaktoren während des Wachstums die GA-Akkumulation. Wichtige Parameter sind neben den klimatischen Einflussgrößen (Lichtintensität, Temperatur, Feuchtigkeit, Tageslänge) auch Erntezeitpunkt und Düngung.

Der Einfluss der Strahlungsintensität auf die GA-Bildung in Kartoffelknollen war Gegenstand einiger Untersuchungen von Percival und seinen Mitarbeitern. In einer Studie von 1994 wurde unter Natrium- und Fluoreszenzlicht eine Akkumulation von Alkaloiden nachgewiesen, während die Verwendung einer Quecksilberlampe nur zu starken Schwankungen führte (Percival et al. 1994). Eine weitere Studie von Percival & Dixon

(1996b) bestätigte diese Beobachtung unabhängig vom Genotyp. Bei photosynthetisch aktiven Intensitäten von  $L \leq 500 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$  konnte eine signifikante Zunahme der GA-Konzentration ermittelt werden, während der Bereich  $L \geq 750 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$  zu einer Verringerung führte. Deahl et al. (1991) kamen zu ähnlichen Ergebnisse für die Gesamtpflanze. In den Blättern von *S. chacoense* stiegen die GA-Werte bei höherer Strahlungsintensität. 1999 bestätigten Nitithamyong et al. dies auch für *S. tuberosum*. Die Verlängerung der Tageslänge und sehr hohe bzw. relativ niedrige Temperaturen in der Wachstumsphase erhöhten ebenfalls den GA-Gehalt. Zu gleichem Ergebnis kamen auch Lafta & Lorenzen (2000). Im Gewächshausexperiment von Olsson (1996) fanden sich größere GA-Mengen in Pflanzen, die bei höherer Temperatur kultiviert wurden, als in denen aus dem Kalthaus. Dagegen konnten Papathanasiou et al. (1996) keinen erkennbaren Einfluss kühler Witterung während der frühen Wachstumsphase auf den GA-Gehalt nachweisen. Auch zum Erntezeitpunkt unterschieden sich die Konzentrationen in ihren Knollen nicht von denen, die bei klimatisch optimalen Bedingungen wuchsen.

Düngung kann sich ebenfalls auf die Alkaloidgehalte auswirken, oftmals waren die Ergebnisse jedoch nicht eindeutig. Stickstoffdüngung beispielsweise erhöhte die Alkaloidgehalte in der Untersuchung von Mondy & Mushi (1990), während dies bei Fragoyiannis et al. (2001) zur Verringerung der Alkaloidmengen führte. Hoffland et al. (1999) spekulierten, dass die Verfügbarkeit von Kohlenstoff eher entscheidend für die Bildung von  $\alpha$ -Tomatin in Tomaten-Pflanzen ist und nicht Stickstoff der limitierende Faktor sei. Rogozinska (1999) machte die Beobachtung, dass Düngung mit mineralisch-gebundenem Kalium aus  $\text{K}_2\text{SO}_4$  niedrigere GA-Gehalte nach sich zog, als wenn mit KCl gedüngt wurde. Versuche mit weiteren Mineralstoffen, wie z. B. Magnesium, Selen oder Molybdän zeigten ähnlich heterogene Auswirkungen (Evans & Mondy 1984, Turakainen et al. 2004). Des weiteren konnte ein positiver Einfluss des Wachstumsfaktors Indoleessigsäure auf den GA-Gehalt in Blättern von Kartoffelpflanzen (Ponnampalam & Mondy 1986) sowie das Aufbringen von Pestiziden (Friedman & McDonald 1997) nachgewiesen werden. Dagegen blieb die Anwendung von Herbiziden bei Zarzecka & Gugala (2003) wirkungslos. Eine regionale Abhängigkeit der Alkaloidgehalte in Knollen scheint nicht zu bestehen. Die Analyse gleicher Sorten aus drei unterschiedlichen Regionen Tschechiens von Panovská et al. (1994, 1997) erbrachte keine Unterschiede im GA-Gehalt. Unbeeinflusst zeigten sich die Alkaloidgehalte auch von der Anbauhöhe. Tendenziell weisen Pflanzen, die in höheren Regionen angebaut werden zwar höhere Gehalte auf, Hamouz et al. (1999) konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede feststellen.

Insgesamt ist durch die komplexe Zusammensetzung des Klimas mit seinen vielen Einflussfaktoren die Auswirkung eines einzelnen Faktors nur abzuschätzen, zumal die Studien mit verschiedenen Sorten durchgeführt wurden und die genetische Ausstattung der Haupteinflussfaktoren auf den GA-Gehalt ist. Als statistisch signifikant erwies sich der Unterschied der Alkaloidgehalte verschiedener Anbaujahre. Wie Papathanasiou et al. (1999b) folgerichtig ableiteten, beruhen sie vermutlich auf den unterschiedlichen klimatischen Bedingungen in den einzelnen Jahren.

### **1.2.9.3 Pathogeninfektion**

Die Verteilung der GAe und die erhöhte Synthese bei Stressbedingungen deuten auf die Funktion als Abwehrsubstanzen hin (Shih et al. 1973). Somit wäre anzunehmen, dass einer Pathogeninfektion der Pflanze ein Alkaloid-Anstieg nachfolgt. Eindeutige Ergebnisse hierzu fehlen. Während Matthews et al. (2005) eine Zunahme der GA-Konzentration als Antwort auf einen Pathogenangriff in infizierten Pflanzen beobachtete, verringerte sich der Alkaloid-Gehalt bei Fragoiannis et al. (2001) bei Befall mit der Grünen Pflirsichlaus. Sie führten dies auf eine durch die Besiedlung verminderte Verfügbarkeit an Zuckern für die GA-Synthese zurück. Vermutet wird ein Einfluss des Pathogentyps auf die Alkaloid-Konzentration. Hlywka et al. (1994) vermuteten einen Zusammenhang zwischen der Art des Pathogenangriffs und der Reaktion der Pflanze. Wird die Pflanze durch den Befall stark geschädigt, sollte ein GA-Anstieg resultieren, während ein Angriff von phloemsaugenden Läusen unbeantwortet bleiben kann.

### **1.2.9.4 Lagerungsbedingungen**

Den größten Einfluss auf die Alkaloidgehalte nach der Ernte hat der Genotyp einer Sorte, denn er bestimmt in welcher Weise die Knollen auf äußere Reize reagieren, ob sie stressresistent oder eher anfällig sind.

Levy et al. (1993) und Hellenäs et al. (1995b) wiesen in Früh- und Sommerkartoffeln höhere  $\alpha$ -Solanin- und  $\alpha$ -Chaconin-Werte als in der Herbsterte nach, womit ein Einfluss des Erntezeitpunktes belegt werden konnte. Van Gelder et al. (1988b) bestätigten dies auch für unreife Knollen und die Untersuchung von Olsson (1996) zeigte, dass physiologisch jüngere Knollen stärker auf äußere Stressreize reagierten als Ausgereifte. Ein Grund könnte die höhere Stoffwechselrate in Jungknollen sein.

Nach der Ernte kann es durch ungünstige Lagerbedingungen zur GA-Akkumulation in den Knollen kommen. Wichtige Parameter sind mit absteigender Bedeutung:

mechanische Beschädigung durch Ernte oder Transport, Licht, Temperatur und die Lagerzeit.

### **Mechanische Schädigung**

Die Schädigung der Knollen kann während der Ernte oder bei Verpackung und Transport geschehen. Der Grad der Alkaloid-Akkumulation wird dabei ähnlich wie bei Licht- und Temperatureinfluss vom Genotyp (Dale et al. 1998), aber auch von der Schwere der Schädigung beeinflusst. Starke Schädigungen, wie zerschneiden, führten bei Wu & Salunkhe (1976) zu den höchsten Alkaloid-Anstiegen. Die Studie von Olsson (1986) zeigte, dass das Fallenlassen von Knollen aus 1,5 m stärkere Verletzungen und signifikante höhere Alkaloidzunahmen nach sich zog, als der Fall aus 1 m.

### **Licht**

Vielfach untersucht ist die Erhöhung der Alkaloid-Gehalte durch Lichteinfluss (Ahmed & Müller 1981, Dale et al. 1993, Edwards & Cobb 1999, Griffith et al. 1994, Percival et al. 1993, 1994, Percival & Dixon 1994, 1996a, 1996b, Uppal 1987). Griffith et al. (2000, 2001) konnten sogar eine durch Lichteinfluss hervorgerufene Induktion neuer GA-Formen in *S. phureja* nachweisen. Auch das Verhältnis der einzelnen Alkaloide zueinander kann durch Belichtung beeinflusst werden (Dale et al. 1993). Vor allem die Untersuchungen von Percival (1999) und Percival et al. (1993, 1994, 1996) zeigten, dass vorwiegend die  $\alpha$ -Solanin-Synthese intensiviert wird. Eine Erklärung könnte der unter Lichteinfluss verstärkte Abbau von Stärke zu reduzierenden Zuckern, wie z. B. Galaktose oder Glucose sein. Die verglichen mit Rhamnose höhere Konzentration dieser Zuckertypen begünstigt eher die  $\alpha$ -Solanin-Synthese. Wie die Untersuchung von Haddadin et al. (2001) offenbarte, vollzieht sich die Neubildung der GAe vor allem im obersten Millimeter, direkt unter der Schale. Je weiter zum Zentrum vorgedrungen wurde, desto geringer fiel der Alkaloid-Anstieg aus. Die natürliche Färbung der Schale hatte keinerlei Einfluss auf die Neubildung (Percival et al. 1996).

Lange wurde davon ausgegangen, dass die unter Lichteinfluss verstärkt stattfindende Chlorophyll- und GA-Synthese genetisch miteinander gekoppelt sind. Mittlerweile existieren jedoch zahlreiche Untersuchungen, die dies widerlegen konnten (Dale et al. 1993, Dao & Friedman 1994, Edwards & Cobb 1997, 1999 sowie Griffith et al. 1994). Bei der Behandlung von Kartoffelknollen mit Inhibitoren der Chlorophyll-Synthese blieben die GA-Gehalte unbeeinflusst, woraus Edwards et al. (1998) schlossen, dass keine metabolische Verknüpfung beider Synthesewege existiert. Auch Kozukue et al. (2001) kamen zu diesem Ergebnis, nachdem radioaktiv markiertes Mevalonat vorwiegend in GAen gefunden wurde und nicht wie gedacht in Chlorophyll und Alkaloiden zu gleichen Teilen. Dass die Synthese der Alkaloide unter Lichteinfluss nicht ausschließlich negativ ist, zeigt ein aktuell laufendes Projekt im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau, das die Belichtung von

Pflanzknollen zur Verbesserung der Lagerqualität und Erhöhung der Krankheitsresistenz im Frühjahr nutzt (Benker 2006).

### **Temperatur**

Grundsätzlich fördert die Lagerung von Kartoffelknollen bei höheren Temperaturen die Akkumulation von Alkaloiden (Bergensträhle et al. 1992b, Love et al. 1994, Percival et al. 1993, Şengül et al. 2004). Wie die Untersuchung von Coria et al. (1998) verdeutlichte, hängt das Ausmaß stark vom Genotyp ab. Bei 35 °C und vierstündiger Behandlung eines hitzeempfindlichen Kultivars war die Alkaloidkonzentration um 74% höher verglichen mit 22 °C-Lagerung. Gleiches Verfahren einer hitzeresistenten Sorte ergab eine unveränderte GA-Akkumulation. Die ebenfalls ungünstig Auswirkung tiefer Temperaturen bewiesen Untersuchungen von Griffith et al. (1997, 1998). Der durchschnittlich stärkste GA-Anstieg wurde bei 7 °C gemessen, die insgesamt höchste Zunahme bei 4 °C. Wurden die Knollen neun Wochen bei 10 °C gelagert und danach bei niedrigerer Temperatur kam es zu keinen Veränderungen im Alkaloidgehalt mehr. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass die Knollen sich bei 10 °C im Ruhezustand befinden, der sie danach für Stressreize unempfindlich macht. Ein vergleichbares Ergebnis erhielten sie auch für den Parameter Licht nach vorausgegangener Lagerung bei verschiedenen Temperaturen.

### **Lagerzeit**

Eine verlängerte Lagerzeit erhöht generell die Alkaloid-Gehalte (Griffith et al. 1997, Percival et al. 1993, Şengül et al. 2004). Love et al. (1994) und Griffith et al. (1997) beobachteten, dass sich in den ersten 12 bzw. 9 Wochen die Konzentration schnell erhöht und danach relativ stabil bleibt. Nach 40 Wochen konnten Edwards & Cobb (1998) keinerlei Veränderung im Alkaloid-Gehalt mehr feststellen.

## **1.2.10 Einfluss der Verarbeitungstechnik auf den GA-Gehalt**

Da GAe thermisch sehr stabil sind (Jadhav & Salunkhe 1975), werden sie beim Kochen, Backen, Frittieren und Mikrowellengaren kaum zerstört (Bushway & Ponnampalam 1981, Friedman 2006, Friedman & McDonald 1999, Sotelo & Serrano 2000). Bei Pellkartoffeln bleiben sie praktisch vollständig erhalten. Beim Kochen von Salzkartoffeln gehen sie teilweise in das Kochwasser über (Schreiber 1961, Maga 1980, Sizer et al. 1980, Teuscher & Lindequist 1994, Wu & Salunkhe 1976). Porter (1972) erwähnte eine Zersetzungstemperatur von 260-270 °C, diese liegt noch 70-80 °C über den normalen Frittiertemperaturen, so dass selbst bei Pommes frites, Potato Wedges und Kartoffelchips kaum eine Reduktion der Gehalte zu erwarten ist. Beier & Nigg (1992) konnten in frittierten Kartoffelschalen, einer Delikatesse

im amerikanischen Raum, Mengen von bis zu 140 mg GA/100 g FG nachweisen. Friedman (2006) detektierten in frittierten Schalen verschiedener Restaurants in den USA GA-Gehalte von 56,3 bis 203,6 mg/100 g. Bei wiederholtem Frittieren im gleichen Fett kann es nach dessen Absättigung zu einer Rückdiffusion in das Frittiergut kommen.

Ist die Kartoffelverarbeitung mit einem Entzug von Wasser verbunden, beispielsweise bei der Chipsherstellung, können die GA-Gehalte bezogen auf das geringere Gewicht weiter ansteigen. Dies verdeutlichte die Untersuchung von Driedger & Sporns (1999). Aus Kartoffelknollen, die 6,6 mg GA/100 g FG im Ausgangsmaterial enthielten, wurde Kartoffelstärke hergestellt. Direkt in der Stärke lag der Alkaloidgehalt unter der Nachweisgrenze von 0,02 mg/100 g. Die Bestimmung in Proteinkonzentrat und getrocknetem Kartoffelfleisch aus denselben Knollen, ergab einen erkennbaren Übergang der Alkaloide in die hergestellten Produkte, gemessene Werte waren 60 bzw. 50 mg/100 g TG. Hoher Druck, der bei der Extruderbehandlung von Kartoffeln zur Snackherstellung angewendet wird, zeigte in einer Untersuchung von Surjawan et al. (2001) keine Auswirkungen auf die Alkaloidgehalte. Die Autoren konnten durch Zugabe schwefelhaltiger Substanzen (Thiamin bzw. Methionin) jedoch eine signifikante Reduktion der GA-Gehalte erzielen. Vermutlich wirkt die reaktionsfähige Thiolgruppe auf die Zuckerbindungen, so dass es zu deren Abspaltung kommt und das weniger giftige Solanidin entsteht.

Entscheidend für den GA-Gehalt in Kartoffelprodukten ist daher deren Konzentration im Ausgangsmaterial (Sotelo & Serrano 2000). Trotz der wachsenden Bedeutung der Kartoffelprodukte für die moderne Ernährung, liegen wenige Untersuchungen zum Alkaloidgehalt vor. Hinderlich ist die schwierige Matrix, mit ihrem meist hohen Fett- und Stärkeanteil. Tabelle 1.7 zeigt in einer Übersicht die Ergebnisse bislang durchgeführter Alkaloidanalysen verarbeiteter Kartoffelprodukte.

In neuester Zeit dienen Kartoffeln als billiges Ausgangsmaterial zur Herstellung hochwertiger Intermediate für die Lebensmittelindustrie, z. B. zur Gewinnung von Anthocyanen als Lebensmittelfarbstoffe (Wrolstad & Rodriguez-Saona 2001). Diese Zusatzstoffe können allerdings hohe Mengen an Alkaloiden enthalten (Rodriguez-Saona et al. 1999).

**Tab. 1.7** GA-Gehalte [ $\mu\text{g/g}$ ] verschiedener Kartoffelprodukte (Bushway & Ponnampalam 1981, Easton 1998, Friedman 1992, Friedman & Dao 1992, Kvasnika 1994, Marihart et al. 1979, Sizer et al. 1980).

Produkt	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-GA
Gekochte Kartoffel, Fertigprodukt	8,6-12,3	30-40,7	38,6-53,1
Kartoffel, in Dose	0,04-0,12	0,04-0,13	0,09-0,25
Kartoffelpulver, trocken	1,3-1,9	1,5-2	2,8-3,9
Kartoffelviertel, gefroren	20,1	23,9	44,0 76-120
Kartoffelviertel, frisch			44,0
Schale, geschnitten, gefroren			66,0-71,0
Schale, gebacken			31,0-63,0
Schale, frittiert	46,1-48,0	93,1-97,9	55,0-203,0 139,0-145,0
Pommes Frites, frisch	0,4	0,4	0,8
	0,42	0,42	0,84
			0,8-58 0,8-8,4
Bällchen, gefroren	0,6-1,2	0,7-1,2	1,4-2,3
Kroketten, gefroren	2,7	4,0	6,7
Chips	10,5	13,0	23,5
	17,6	31,6	49,2
	50,2	58,8	109,0
	2,2	4,1	6,3
	1,3	2,9	4,2
	1,6	2,3	3,9
	1,1-5,1	1,6-10,9	2,7-16,2
	0,2-1,4	0,4-1,4	0,3-2,9
0,5-1,6	0,6-3,8	1,1-5,4 24,0-720,0 24,0-109,0 12,3-23,6	
Ungeschälte Chips	1,8-6	3,3-15,6	5,1-21,3
Kartoffelsnack	2,2-6,9	2,1-3	5,2-8,0
Püreepulver, trocken	24,1	20,5	44,6
	19,2	24,8	44,2 45,0-65,0
	0,5-0,8	1,0-1,5	1,5-2,3
Püree, zubereitet	0,9	1,1	2,0
Proteinkonzentrat, trocken			10,0-240,0
Kartoffelmehl, trocken	3,1-3,7	3,4-4,0	6,5-7,5
Kartoffelstärke	0,4-0,8	0,5-1,1	0,9-1,9
	0,03-0,12	0,08-0,23	0,11-0,35

## 1.3 Methoden der GA-Analytik

Während der letzten dreißig Jahre wurden zahlreiche Methoden zur Isolierung und Detektion von GAen in Kartoffeln und daraus zubereiteten Produkten entwickelt. Die ersten waren gravimetrische Verfahren, während HPLC und Immunoassays erst seit den achtziger Jahren angewendet werden. Keine der entwickelten Methoden wurde bislang offiziell anerkannt. Weder das deutsche Lebensmittelbuch, noch das amerikanische AOAC Handbuch listen ein Standardverfahren auf (Deutsches Lebensmittelbuch § 15 LFBG, AOAC International Handbook 1999). Die Wahl der Methode hängt meist von der Laborausstattung und den Anforderungen ab. Eine gute Übersicht über bislang angewendete Methoden liefern Friedman & McDonald (1997) sowie Edwards & Cobb (1998).

Grundsätzlich gliedert sich eine analytische Methode zur Detektion von GAen in folgende Schritte:

1. Extraktion
2. Aufreinigung
3. Analyse der Alkaloide

### 1.3.1 Extraktion

Aus der chemischen Struktur ist ersichtlich, dass die quantitative Extraktion der GAe Schwierigkeiten bereitet. Ein hydrophober Steroidkern ist mit einem hydrophilen Zuckerrest verknüpft, woraus ein Molekül resultiert, das in fast allen Lösungsmitteln löslich ist, aber in keinem wirklich gut. Die basische Reaktion der GAe ( $pK_B$  Solanidin in 60% Alkohol-Wasser = 8,62; Kuronen et al. 1999) ermöglicht die Aufnahme eines Protons unter Bildung des Alkaloid-Salzes, wodurch die Löslichkeit verbessert wird. Daher bieten sich leicht saure Lösungsmittel an. Bisher wurden verschiedenste Extraktionsmittel verwendet, von angesäuerten, wässrigen (Bacigalupo et al. 2000, Driedger et al. 2000a, Gregory et al. 1981) über rein organische (Kobayashi et al. 1989, Plhak & Sporns 1992, Saito et al. 1990), Mischungen von beiden (Bushway et al. 1985, Osman & Sinden 1977, Zhao et al. 1994) bis hin zu Ionenpaarbildnern in sauren Lösungen (Carman et al. 1986, Driedger 2000, Edwards & Cobb 1996, Simonovska & Vovk 2000). Nach Friedman und McDonald (1995a) eignen sich für Frischmaterial vor allem MeOH-CHCl<sub>3</sub> (2:1) oder eine THF-Wasser-Mischung mit MeOH, CHCl<sub>3</sub> oder Essigsäure. Beste Ausbeute bei getrocknetem Gewebe wurde mit essigsauren, wässrigen Lösungen erreicht. Bei Ionenpaarbildnern, wie z. B. Heptansulfon-

säureextrakten beobachteten Bushway et al. (1986) eine partielle Hydrolyse der Zucker nach einigen Stunden, so dass diese direkt aufgearbeitet werden müssen.

### 1.3.2 Aufreinigung

Die Aufreinigung der Extrakte ist notwendig, um die GAe anzureichern und Störsubstanzen zu entfernen. Soll bei chromatographischen Analysen mit UV-Licht detektiert werden, so ist durch das Fehlen eines starken Chromophors im GA-Molekül ein aufgereinigter Extrakt Voraussetzung für eine genaue quantitative Analyse. Während in früheren Jahren das Ausfällen der GAe mit konzentrierten Basen erfolgte (Friedman & Dao 1992, Gregory et al. 1981, Osman et al. 1978), hat sich in letzter Zeit die Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) immer mehr durchgesetzt. Vorteil dieses Verfahrens ist der geringere Lösungsmittelverbrauch, kein Handtieren mit konzentrierten Basen, eine kürzere Probenvorbereitungszeit, eine leichtere Automatisierbarkeit und nicht zuletzt geringere Analytverluste (Henion et al. 1998). Sie führt zu genaueren Ergebnissen, da die Fällungsmethode oftmals nicht quantitativ erfolgte, teilweise kam es zu hydrolytischen Zuckerabspaltungen oder es verblieben Alkaloide im Überstand (Väänänen et al. 2000). Wie Untersuchungen wilder *Solanum*-Arten von Gregory et al. (1981) zeigten, sind bestimmte GA-Arten wie die Leptine überhaupt nicht fällbar.

Die SPE basiert ähnlich wie die HPLC auf Migrationsprozessen, bei denen die Komponenten an poröses Material adsorbiert und wieder eluiert werden. Zwischen Analyt und Sorbens kommen vorwiegend hydrophobe (Van-der-Waals-Kräfte), polare (Wasserstoffbrücken-Bindungen und Dipol-Dipol-Kräfte) oder ionische Wechselwirkungen vor. Für die Auswahl des Sorbens sind die funktionellen Gruppen der Analyten, die Natur der gebunden Phase sowie die Wechselwirkungen zwischen Analyt und Sorbens wie auch zwischen Matrixbestandteilen und Sorbens bzw. Analyt von Bedeutung. Als häufigste Matrix zur Anreicherung und Aufreinigung von GAen wurde unpolares RP-18-Material verwendet (Bushway et al. 1986, Carman et al. 1986, Driedger & Sporns 2001a, b, Edwards & Cobb 1996, Saito et al. 1990). Teilweise konnten auch NH<sub>2</sub>- (Saito et al. 1990) oder CN-Kartuschen (Jonker et al. 1992) erfolgreich eingesetzt werden. Ein Vergleich verschiedener Materialien ist bei Edwards & Cobb (1996) sowie Väänänen et al. (2000) zu finden. Im ersten Fall wurde beste Wiederfindung mit trifunktionellen, endcapped RP-18-Kartuschen erzielt. Väänänen et al. (2000) bevorzugten ein makroporöses Copolymer, wobei auch ein Benzolsulphonat-Kationenaustauscher und unpolares RP-18-Material akzeptable Ergebnisse lieferten.

Grundsätzlich gliedert sich die Extrakt-Aufreinigung mittels SPE in folgende Hauptschritte:

### 1. Konditionierung des Sorbens

Die Solvatisierung des Sorbens ist nötig, damit eine Umgebung geschaffen wird, die geeignet ist, die Analyten reproduzierbar zu adsorbieren. Unpolare Sorbentien konditioniert man üblicherweise mit einem wassermischbaren Lösungsmittel, gefolgt von dem Extraktionsmittel, in dem der Analyt gelöst ist.

### 2. Aufgabe der Probe

Die Probenaufgabe hängt von der Art des Sorbens ab. Sie sollte mit einer Flussrate von maximal 10 ml/min erfolgen, um reproduzierbare Wechselwirkungen zu ermöglichen.

### 3. Waschen des Sorbens

Üblicherweise dienen zum Waschen und damit zur Entfernung von Interferenzen Wasser oder Gemische aus Lösungsmittel und Wasser.

### 4. Elution

Die Elution mit einem geeigneten Eluenten sollte nicht zu schnell erfolgen, um die Analyten vollständig von der Kartusche zu entfernen. Abhängig von der Säulendimension und der Sorbensmenge wird eine Flussrate von ca. 1 ml/min empfohlen.

## 1.3.4 Quantitative Analyseverfahren

### 1.3.4.1 Frühe Methoden

Die ersten Methoden zur Bestimmung der GAe bedienten sich der Gravimetrie. 1937 veröffentlichte Conner eine volumetrische Methode, die auf der Abschätzung der freigesetzten Zucker nach Hydrolyse beruhte. In den 50er und 60er Jahren wurden verschiedene kolorimetrische Methoden entwickelt, die eine Reaktion mit Formaldehyd (Clarke 1958, Dabbs & Hilton 1953), Methylorange (Birner 1969) oder Titration mit Bromphenolblau (Dao & Friedman 1996, Fitzpatrick & Osman 1974, Gregory et al. 1981, Osman et al. 1978) vorsahen. Am häufigsten wurde die Reaktion mit phosphorsaurer *p*-Formaldehydlösung nach Clarke (1958) verwendet, die jedoch das Vorliegen einer Doppelbindung im Steroidanteil voraussetzt. Die Methode ist daher auf Alkaloide mit ungesättigtem Aglykon begrenzt. Nachteilig ist, dass die individuelle GA-Zusammensetzung nicht bestimmt werden kann. Hellenäs (1986) erarbeitete basierend auf der Reaktion mit Clarkes Reagenz eine Methode für Knollengewebe. Ein Vergleich mit HPLC und ELISA ergab mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,92 akzeptable Übereinstimmung der Verfahren. Bazioldanov & Tukalo (1973) verwendeten die Reaktion mit Methylorange und direkter Extraktion des Reaktionsproduktes in  $\text{CHCl}_3$  zur Bestimmung von Solanthren und Solanidin. Einen anderen Weg schritt Roddick (1980) ein, als er GAe über ungebundenes Sterol im

Überstand quantifizierte. Vorausgegangen war die Bildung eines GA-Sterolkomplexes. Aus der Abnahme der Sterolkonzentration konnte auf den GA-Gehalt geschlossen werden.

#### **1.3.4.2 Chromatographische Verfahren**

##### **Dünnschichtchromatographie**

Die Dünnschichtchromatographie wurde zunächst nur zur qualitativen Analyse des vorliegenden GA-Spektrums verwendet (Jellema et al. 1981, Van Gelder 1989). Zur Anwendung kamen überwiegend Kieselgelphasen mit Laufmittelsystemen aus MeOH, EtOH, CHCl<sub>3</sub>, Ethylacetat, Pyridin in unterschiedlichen Mengenverhältnissen, denen oft Diethylamin zur Erhöhung des pH-Wertes zugesetzt wurde. Als Detektionsreagentien eigneten sich Joddampf, 95%ige Schwefelsäure-MeOH (1:1, v/v), wässrige Kobalt(II)-thiocyanatlösung, Antimon (III)-chlorid, Cer(IV)-sulfat, *p*-Formaldehyd-Phosphorsäure oder auch das allgemein auf Alkaloide mit quartärem Stickstoff ansprechende Dragendorff-Reagenz (Kuronen et al. 1999, Marihart et al. 1979, Stahl 1966). Später wurden Systeme entwickelt, die eine quantitative Aussage ermöglichten. Cadle et al. (1978) nutzten Antimon-Trichlorid und ein Densitometer zur quantitativen Analyse. Ferreira et al. (1993) verwendeten Carr-Price- und Dragendorff-Reagenz ebenfalls mit Densitometrie und Simonovska & Vovk (2000) entwickelten ein HPTLC-Verfahren und verglichen verschiedene Detektionsmittel auf ihren Einsatz als Sprühreagenzien zur densitometrischen Bestimmung. Die Detektionsgrenze (0,1 µg) sowie die Wiederfindungsraten für je 1 µg α-Solanin (86%) bzw. α-Chaconin (92%) zeigten eine gute Methodenperformance. Jellema et al. (1981) quantifizierten GAe mit Hilfe eines optischen Fluoreszenzaufhellers. Trotz weiterer Verbesserung der Quantifizierungsverfahren sind die Ergebnisse noch recht wackelig und seit den 80er Jahren wurden immer wieder neue, genauere chromatographische Verfahren entwickelt. Die DC wird durch ihre einfache Anwendung jedoch heute noch in der qualitativen Analyse angewendet.

##### **Gaschromatographie**

Die Gaschromatographie bietet durch den universellen Flammenionisations-Detektor gute Auflösung und hohe Empfindlichkeit und damit beste Voraussetzungen für eine genaue Quantifizierung. Allerdings setzt sie die Flüchtigkeit der Analyten voraus, die bei GAen durch die polaren Zuckerreste nicht gegeben ist. Entweder müssen die OH-Gruppen im Zuckeranteil durch geeignete Methoden derivatisiert werden, beispielsweise durch Permethylierung (Herb et al. 1975, Osman et al. 1978) oder Trimethylsylierung (Roosen-Runge & Schneider 1977). Dies verlängert jedoch die Analysenzeit und hohe Temperaturen reduzieren die Lebenszeit der GLC-Säule (King 1980, Morgan et al. 1995). Oder es ist nur die Analyse der Aglyka nach

hydrolytischer Abspaltung der Zuckerreste möglich, was wiederum die Bestimmung einzelner Alkaloide unmöglich macht. Insgesamt kommt die GLC für die Analyse von Kartoffel-GAe eher selten zur Anwendung. Bushway et al. (1984) bevorzugten sie zur Bestimmung des Solanidin-Übertritts in die Milch von Rindern, die mit Nebenprodukten der Kartoffelverarbeitung gefüttert wurden. Auch King (1980), Van Gelder (1985) und Van Gelder et al. (1988a) nutzten die GLC zur Analyse der Solanidin-Gehalte in Knollen und Blattmaterial. Vorausgegangen war jeweils eine hydrolytische Spaltung der GAe mit 1 N methanolischer oder ethanolischer HCl. Der Einsatz der GLC zur Trennung der Aglyka verschiedener wilder *Solanum*-Arten gelang Van Gelder et al. (1989) für Solanidin, Solasodin, Demissidin und Tomatidin wie auch Lawson et al. (1992) zur Trennung von Solanidin, Leptinidin, Acetylleptinidin und Tomatidin.

In neuester Zeit wurden mehrfach Verfahren entwickelt, die versuchten einzelne Methodenschritte zu kombinieren. Während die Extraktion der GAe direkt durch das Hydrolysegemisch noch Probleme bereitete (Nicolic & Stankovic 2003), war die Kombination von Hydrolyse und direkter Extraktion der entstandenen Aglyka in organisches Lösungsmittel in einem Ein-Phasen-System erfolgreich (Nicolic et al. 2005, Weissenberg 2001). Vorteil ist, neben der Einsparung der Analysenzeit, der Schutz des Solanidins vor der Dehydrierung zu Solanthren, das unter den gegebenen Reaktionsbedingungen als unerwünschtes Nebenprodukt entsteht (King 1980, Nicolic et al. 2005).

### **High-performance liquid chromatography**

Das erste HPLC-Verfahren zur Bestimmung von GAen wurden 1979 von Bushway et al. veröffentlicht. Bis heute ist sie zusammen mit den Immunoassays die am häufigsten verwendete Technik, was die bislang zahlreich erschienenen Veröffentlichungen zeigen (Dao & Friedman 1996, Edwards & Cobb 1996, Friedman et al. 2003b, Hellenäs et al. 1992, Hellenäs & Brancell 1997, Houben & Brunt 1994, Saito et al. 1990, Sotelo & Serrano 2000). Zur Anwendung kommen vorwiegend RP-18- oder NH<sub>2</sub>-Säulen verschiedener Hersteller. Die Detektion erfolgt meist mit UV-Licht bei Wellenlängen zwischen 200 und 208 nm. Da zahlreiche Verunreinigungen in diesem Wellenlängenbereich ebenfalls absorbieren ist die zuvor besprochene Probenaufreinigung unentbehrlich. Vorteil der HPLC gegenüber zahlreichen anderen Methoden ist ihre hohe Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit. Die Wiederfindungsraten liegen typischerweise > 90% und relative Standardabweichungen < 10%, die Detektionsgrenzen bewegen sich zwischen 1 und 20 ng/μl. Des weiteren bietet sie die Möglichkeit einzelne Alkaloidarten zu unterscheiden. Während bei GLC-Analysen oder immunologischen Assays nur der Gesamtalkaloidgehalt angegeben werden kann, ermöglicht

die HPLC die getrennte Erfassung von  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin. Wichtig ist dies z. B. bei der Selektion verschiedener Kartoffelsorten für die Pathogenresistenz oder Sekundärstoffproduktion (Kobayashi et al. 1989). Voraussetzung, um Aussagen bezüglich der Pharmakokinetik anzustellen, war bei Hellenäs et al. (1992) die getrennte Detektion der Abbauprodukte aus GAen. Friedman & McDonald (1995a) nutzen HPLC, um den Verlauf der sauren Hydrolyse und ihrer Abbauprodukte zu untersuchen. Sowohl GAe wie auch deren Aglyka konnten Kuronen et al. (1999) innerhalb einer HPLC-Analyse detektieren. Dies bereitete lange Zeit Schwierigkeiten, da entweder das Aglykon Solanidin so stark retardiert wurde, dass es auf der Säule verblieb, oder sich die GAe durch die verwendete mobile Phase nicht auftrennen ließen. Eine beträchtliche Erhöhung der Nachweisgrenze auf 1,2 bis 1,3 ng/ml erreichte Kodamatani et al. (2005) durch die Reaktion der GAe mit Tris-(2,2'-bipyridin) ruthenium (III) und Verwendung von Chemilumineszenz-Messung.

#### 1.3.4.3 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie wurde ursprünglich zur Strukturanalyse und zum Identitätsnachweis der GAe verwendet. Nach Ionisation der Substanzen in der Ionenquelle und Auftrennung nach dem Masse/Ladungsverhältnis ( $m/z$ ), können die Ionen detektiert und als Massenspektrum mit ihren relativen Molekülmassen und dem relativen Vorkommen dargestellt werden. Dadurch wird ein spezifischer „Finger-print“ erzeugt, der eine genaue Identifizierung ermöglicht. Zur Quantifizierung kommen vorwiegend Kopplungstechniken mit voriger LC oder GLC-Trennung, zum Einsatz. Die Gewinnung struktureller und quantitativer Informationen erfolgte bereits mehrfach mit GLC-MS (Laurila 2004, Laurila et al. 1999, Lawson et al. 1997, van Gelder et al. 1989), LC-MS (Bushway et al. 1984, Chuda et al. 2004, Matsuda et al. 2004, Stobiecki et al. 2003, Väänänen et al. 2005), FAB-MS (Price et al. 1985), high resolution MS (Lawson et al. 1997) und auch Kapillaronenelektrophorese gekoppelt mit MS (Bianco et al. 2002, 2003, Cherkaoui et al. 2001).

Soll das gesamte GA-Spektrum in wilden *Solanum*-Proben oder Hybriden mit *S. tuberosum* untersucht werden so ist LC-MS (Stobiecki et al. 2003, Väänen et al. 2005, Zywicki et al. 2005) bzw. CE-MS (Bianco et al. 2003, Cherkaoui et al. 2001) das Mittel der Wahl. GLC-MS bietet sich durch die fehlende Verdampfbarkeit der polaren GAe nicht an und alleinige HPLC-UV-Identifikation scheitert an fehlenden Chromophoren in einigen GAen, die nur Einfachbindungen enthalten. Während zunächst vorwiegend die Electron-Impact-Ionisierung als Kopplungstechnik verwendet wurde, bei der es durch den Elektronenbeschuss jedoch zu starker Fragmentierung der Ionen kam, steht seit Einführung der Elektorspray-Ionisation (ESI) 1984 durch Fenn und seine Mitarbeiter ein noch effizienteres Werkzeug zur Verfügung,

das diese Fragmentierung auf ein Minimum reduziert. Bereits heute ist LC-ESI-MS mehrfach zur Identifikation oder Quantifizierung eingesetzt worden (Bianco et al. 2002, 2003, Chivanov et al. 2001, Chuda et al. 2004, Claeys et al. 1996, Matsuda et al. 2004, Stobiecki et al. 2003, Väänänen et al. 2005, Zywicki et al. 2005). Ist der weitere Zerfall der Ionen für genauere Identifizierungsnachweise erwünscht, bietet sich die Tandem-MS-Analyse an. Hier kann in einer Kollisionszelle eine erwünschte Fragmentierung erzeugt werden (Chen et al. 1994, Evans et al. 1993). Das von Abell & Sporns (1996), Coates & Wilkins (2005) sowie Driedger & Sporns (1999, 2001b) verwendete MALDI-TOF-MS-Verfahren zur Analyse von Kartoffel-Alkaloiden bietet durch die schnelle Analyse und geringe Probenvorbereitung einen weiteren Fortschritt zur Etablierung der Massenspektrometrie auch in der Routine-Analytik.

#### **1.3.4.4 Elektrophoretische Verfahren**

Die Elektrophorese kann grundsätzlich auf alle Stoffe angewendet werden, die unter den gegebenen Bedingungen geladen sind und sich in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit voneinander unterscheiden.

##### **Kapillarzonenelektrophorese**

Bei der Kapillarzonenelektrophorese (CE) basiert die Trennung auf einem unterschiedlichen Ladungs/Masse-Verhältnis der Analyten. Bisher konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass sich neben der LC auch die CE zur Trennung von GAen eignet. Meist wird dieses Verfahren mit MS kombiniert. Cherkaoui et al. (2001) quantifizierten Beeren-Extrakte aus *S. elaeagnifolium* sowie Blatt- und Samenproben aus *S. sodomaeum* mit Hilfe von CE-UV wie auch CE-MS. Bianco et al. (2002, 2003) entwickelten zur Trennung von GAen ein elektrophoretisches Verfahren, das mit nicht-wässrigen Lösungsmitteln arbeitet. Dies war Voraussetzung zur direkten on-line Kopplung mit ESI-MS, da die üblicherweise verwendeten Pufferlösungen nicht kombinierbar sind. In ihrer späteren Veröffentlichung wurde dieses Verfahren erfolgreich an genetisch veränderten Kartoffeln eingesetzt.

##### **Kapillar-Isotachophorese**

Das durch Kvasnika et al. (1994) entwickelte Verfahren erlaubt zwar keine Auftrennung einzelner GAe, dafür aber die simultane Analyse des Gesamt-GA-Gehaltes und vorhandener Aglyka. Da Kartoffel-Alkaloide leichte Basen sind, wandern sie unter den gegebenen Bedingungen zur Kathode, wobei die effektive Geschwindigkeit von der Struktur und dem Molekulargewicht abhängt. Da beide GAe das selbe Aglykon und fast identische Molekulargewicht aufweisen, konnten sie nicht getrennt werden.

### **1.3.4.5 Immunologische Verfahren**

#### **Radioimmunoassay**

Die Radioimmunoassay-Technik wurde von Vallejo & Ercegovich (1979) als erstes immunologisches Verfahren zur Detektion von GAen verwendet. Nach Zugabe von Anti-Solanin-Serum und Tritium-markiertem Solanidin zu einem Kartoffelextrakt, folgender Inkubation und Trennung, wird die Radioaktivität der gebundenen Antikörper bestimmt. Aus dieser kann die Gesamtsumme an Solanidin,  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin in der Probe ermittelt werden. Durch die niedrige Nachweisgrenze wurden Radioimmunoassays u. a. auch von Harvey et al. (1985a, b) und Matthew et al. (1983) zur Bestimmung der GA-Gehalte in Serum verwendet.

#### **Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Der erste ELISA für GAe, der 1983 von Morgen et al. entwickelt wurde, brachte eine große Erleichterung für die GA-Analyse. Vor allem die großen Probenmengen, die in Monitoringprogrammen anfallen, konnten in kurzer Zeit mit geringem Einsatz analysiert werden. Seitdem wurden zahlreiche Verfahren entwickelt, die entweder mit polyklonalen (Morgan et al. 1983, Pérez et al. 1999, Plhak & Sporns 1992) oder monoklonalen Antikörpern (Friedman et al. 1998, Plhak & Sporns 1994, Stanker et al. 1994, 1997) arbeiteten. Der Vorteil der ELISA-Verfahren liegt in ihrer hohen Nachweisgrenze bis in den nanomolaren Bereich, die sie zu einem geeigneten Analyseverfahren v. a. für pharmakologische und pharmakokinetische Untersuchungen in Blut macht. Eine aufwändige Probenaufreinigung kann entfallen, so dass ihre Anwendung recht einfach ist. Durch lange Inkubationszeiten und zahlreiche Waschschriffe umfasst die Analysenzeit dennoch einen ganzen Tag. Außerdem wurde mehrfach von einer fehlenden Spezifität der Antikörper oder der immunologischen Antwort berichtet (Morgan et al. 1983, Plhak & Sporns 1992, 1994, Thomson & Sporns 1995).

#### **Solution-phase Immunoassays**

Immunoassays, in denen die Immunreaktion in Lösung stattfindet, sind schneller und präziser als ELISA's, da lange Inkubationszeiten und zahlreiche Waschschriffe entfallen. Der durch Thomson & Sporns (1995) entwickelte Fluoreszenzpolarisations-Immunoassay verkürzte die Analysenzeit auf ein Minimum, da die Bindung von Antikörper und Antigen innerhalb von Minuten verläuft (Colbert et al. 1986). Das Prinzip basiert auf der Erhöhung der Fluoreszenzpolarisation bei Bindung eines fluoreszenzmarkierten Haptens an einen Antikörper im Vergleich zur markierten freien Substanz.

Driedger (2000) sowie Driedger & Sporns (2000 a, b) nutzten zur GA-Bestimmung in Kartoffelextrakten nach Komplexbildung mit Antigenen die CE gekoppelt mit einer Laser-induzierten Fluoreszenzdetektion. Hier wird die Konkurrenz zwischen den Kartoffel-GA und fluoreszenz-markiertem Solanidin um eine begrenzte Menge Anti-GA-Serum zur Quantifizierung verwendet. Nach der folgenden Auftrennung der Reaktionsprodukte durch CE war die Fläche des markierten Solanidin-Peaks proportional zur GA-Konzentration im Kartoffelextrakt.

Ebenfalls in der flüssigen Phase verläuft die Immunreaktion des von Glorio-Paulet & Durst (2000) entwickelten Liposomenimmunomigrations-Flüssigphasen-Assays. Auch dieser Ansatz basiert auf der Antikörperbindungs-Konkurrenz von GAen aus der Probe mit Solanin- und Biotin- sowie Farbstoffbeladenen Liposomen. Gemessen wird letztendlich die freie Liposomenmenge, deren Antikörper-Bindung nicht durch GAe inhibiert wurde. Die Farbbande auf Nitrocellulose wurde densitometrisch gemessen und war proportional zur Menge an GAen in der Probenlösung.

#### **1.3.4.6 Weitere Verfahren**

Während membranlytische und Enzym-inhibitorische Wirkungen der GAe im Organismus als unerwünscht gelten, konnten sie zur Entwicklung weiterer Detektionsverfahren ausgenutzt werden.

#### **GA-Bestimmung über membranaktive Eigenschaften**

Bacigalupo et al. (2000, 2004) stellten Cholesterol-enthaltende Phosphatidylcholin-Liposomen her, in die sie einen Tracer (Europium Chelator: 4,7-bis-(chlorosulfofenyl)-1,10 phenanthroline-2,9-Dicarbonsäure) einschlossen. Nach Zerstörung der Liposomen wird der Chelator freigesetzt und bindet im Überschuss zugesetztes  $\text{Eu}^{3+}$ . Die nach 20 min gemessene Fluoreszenz ist direkt proportional zur GA-Konzentration. Ein Vergleich mit einer HPLC-Methode ergab eine sehr gute Übereinstimmung mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,99.

Auch ein Hämolyse-Assay macht sich die membranlytische Wirkung zu Nutze. Nach Komplexbildung mit Cholesterol und Zerstörung der Erythrozytenmembran strömen  $\text{Na}^+$ -Ionen und Wasser in die Zellen bis sie platzen. In der Zelle enthaltenes Hämoglobin geht ins Plasma über und kann nach zentrifugieren im Überstand photometrisch bestimmt werden. Bereits Roddick et al. (1988, 1990) konnten die hämolytische Aktivität an Kaninchen-Erythrozyten bzw. Rinderblut nachweisen, die ähnlich schnell wie bei Steroidsaponinen eintritt (Takechi et al. 1991, Takechi & Tanaka 1995). Zur Gehaltsbestimmung von  $\alpha$ -Tomatin in Tomaten-Blättern wurde dieses Verfahren von Barbour & Kennedy (1991) eingesetzt.

**GA-Bestimmung über Enzym-Inhibition**

In neuester Zeit wurden vermehrt biosensorische Verfahren entwickelt. Ein Biosensor ist ein Messfühler, der eine biologische Komponente, z. B. ein Enzyme oder ganze Zellen, nutzt, um die gesuchten Moleküle oder Substanzen zu erkennen und ihre Menge zu bestimmen. Basierend auf den Untersuchungen von Korpan et al. (2002) wendeten Arkhypova et al. (2003) pH-sensitive Feldeffekttransistoren mit immobilisierter Butyrylcholinesterase als Biodetektionselement an Kartoffelproben erfolgreich an. Der Arbeitsbereich lag zwischen 0,2 und 100  $\mu\text{M}$ , was dem Vorkommen in Kartoffeln entspricht (25-250  $\mu\text{M}$ ). Die Nachweisgrenze war abhängig vom jeweiligen GAe (0,2  $\mu\text{M}$  für  $\alpha$ -Chaconin, 0,5 $\mu\text{M}$  für  $\alpha$ -Solanin und 1  $\mu\text{M}$  für Solanidin). Durch die Wiederherstellung der Butyrylcholinesterase konnte der Biosensor mindestens 100 Mal verwendet werden. Die Lagerung über 3 Monate bei 4 °C in Puffer führte zu keinem Verlust der Enzymwirkung.

# KAPITEL II

## AUFGABENSTELLUNG

Die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit gliederte sich in zwei Abschnitte.

Im ersten Abschnitt sollte zunächst ein Standardverfahren entwickelt werden, das verlässliche und reproduzierbare Aussagen über den Gehalt der toxischen Glykoalkaloide  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin in Kartoffelproben erlaubt. Diese Methode sollte durch Ermittlung gängiger Prüfparameter auf Präzision, Richtigkeit und Linearität validiert werden. Als Standardmethode bietet sich die hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC) an. Sie war für die Bestimmung von GAen in Kartoffeln schon immer das Mittel der Wahl und erfüllte die Vorgabe, einzelne Alkaloide getrennt voneinander bestimmen zu können. Zunächst musste ein Verfahren entwickelt werden, um die GAe quantitativ zu extrahieren, sauber aufzureinigen und mittels HPLC und Diodenarraydetektion zu bestimmen. Nachfolgend sollte dieses Verfahren zur Untersuchung verschiedener Kartoffelproben eingesetzt werden. Zu diesen gehörten kommerziell erhältliche Sorten, wobei sowohl zwischen konventionellem Anbau und Bioware, als auch zwischen Frühkartoffeln und Herbsterte unterschieden werden sollte. Des Weiteren dienten traditionelle Kultursorten als Untersuchungsmaterial, die im Eigenanbau sowohl im Freiland wie auch im Gewächshaus kultiviert wurden. Hier sollte ein Komplett-Screening der Alkaloidkonzentrationen in den einzelnen Pflanzenorganen durchgeführt werden. Des Weiteren sollte die Verwendbarkeit des Verfahrens für Proben mit schwieriger Matrix getestet werden, wozu stark fett- und/oder proteinhaltige Kartoffelerzeugnisse auf ihren GA-Gehalt untersucht wurden.

Die Analyse verschiedener knollentragender *Solanum*-Wildarten, in denen neben  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin eine Reihe weiterer GA-Typen zu finden sind, sollte der Überprüfung der Methode zur Anwendbarkeit für weitere Steroidalkaloidtypen dienen. Zur Bestätigung der HPLC-Ergebnisse sollten zusätzlich LC-MS-Analysen durchgeführt werden.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung einer Reihe weiterer Quantifizierungsverfahren, die sich ebenfalls zur Detektion von GAen in Kartoffelprodukten eignen. Durch die niedrigen Gehalte in diesen Verarbeitungserzeugnissen und die schwierige Matrix sind empfindliche Verfahren von Nöten, um verlässliche Aussagen treffen zu können. Nachfolgend sollten die Ergebnisse dieser Methoden mit der HPLC-Standardmethode verglichen und Aussagen zu deren Übereinstimmung und damit Verwendbarkeit gemacht werden. Im letzten Schritt sollte eines der Verfahren ausgewählt werden, um darauf basierend einen Automatisierungsprozess zu entwickeln, der sich für die Routineanalytik eignet.

# KAPITEL III

## MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Untersuchungsmaterial

#### 3.1.1 Kommerziell erhältliche Kartoffelsorten

Die untersuchten Kartoffelsorten aus konventionellem (Tab. 3.1) und ökologischem Anbau (Tab. 3.2) stammten ausschließlich aus dem kommerziellen Handel.

#### Untersuchungsmaterial

Nach dem Kauf wurden für jede Sorte drei Knollen in Standardgröße ausgewählt und der Länge nach halbiert. Eine Hälfte diente der Bestimmung des Alkaloidgehaltes in der Gesamtknolle, die zweite Hälfte wurde mit einem Kartoffelschäler in Fleisch und Schale (Schalendicke 2 mm) aufgeteilt und getrennt analysiert. Vor der Bearbeitung wurde das Material eingefroren und gefriergetrocknet.

**Tab. 3.1** Analysierte Kartoffelsorten aus konventionellem Anbau.

Sorte		Jahr <sup>1</sup>	Herkunft	Handel
<b>Frühkartoffeln</b>				
Ana1	Annabelle-1	1999	Deutschland	Gemüsehandel, Heidelberg
Bam1	Bamberger Hörnchen-1	1870	Deutschland	Gemüsehandel, Heidelberg
Ber1	Berber-1	1983	Deutschland	Gemüsehandel, Heidelberg
Ber2	Berber-2		Deutschland	Plus, Heidelberg
Ber3	Berber-3		Deutschland	Gemüsehandel, Heidelberg
Ber4	Berber-4		Deutschland	Markt, Heidelberg
Ber5	Berber-5		Deutschland	Markt, Heidelberg
Nic1	Nicola-1	1973	Südländer	Handelshof, Heidelberg
Nic2	Nicola-2		Ägypten	Penny, Heidelberg
Nic3	Nicola-3		Südländer	Lidl, Heidelberg
Nic4	Nicola-4		Ägypten	Plus, Heidelberg
Nic5	Nicola-5		Ägypten	Rewe, Heidelberg
Nic6	Nicola-6		Südländer	Selgros, Heidelberg
Nic7	Nicola-7		Deutschland	Penny, Heidelberg
Sieg1	Sieglinde-1	1954	Italien	Markt, Heidelberg
Sieg2	Sieglinde-2		Deutschland	Gemüsehandel, Heidelberg
Sieg3	Sieglinde-3		Deutschland	Markt, Heidelberg

**Herbsternte**

Bam2	Bamberger Hörnchen-2		Deutschland	Markt, Heidelberg
Bin1	Binova-1	1971	Deutschland	Toom, Frankfurt
Che1	Cherie-1	1997	Deutschland	Familia Center, Heidelberg
Fra1	Franceline-1	1993	Deutschland	Familia Center, Heidelberg
LaR1	La Ratte-1	1972	Deutschland	Markt, Heidelberg
Nic7	Nicola-7		Deutschland	Penny, Heidelberg
Qua1	Quarta-1	1979	Deutschland	Markt, Heidelberg
Prim1	Primura-1	1963	Deutschland	Lidl, Heidelberg
Rov1	Rosval-1	1950	Deutschland	Markt, Heidelberg
Sieg4	Sieglinde-4		Deutschland	Markt, Heidelberg
Spu1	Spunta-1	1967	Italien	City-Markt, Heidelberg

<sup>1</sup> Jahr der Zulassung, Angaben nach Bundessortenamt (2006)

**Tab. 3.2** Analyisierte Kartoffelsorten aus ökologischem Anbau.

Sorte		Jahr <sup>1</sup>	Herkunft	Handel
<b>Frühkartoffeln</b>				
BAti1	Atica-1	1971	Deutschland	Füllhorn, Heidelberg
BDit1	Ditta-1	1991	Deutschland	Handelshof, Heidelberg
BRos1	Rosara-1	1991	Deutschland	Füllhorn, Heidelberg
BVal1	Valor-1	1993	Ägypten	Plus, Heidelberg
<b>Herbsternte</b>				
BAgr1	Agria-1	1985	Deutschland	Bioland, Heidelberg
BAgr2	Agria-2		Deutschland	Bioland, Heidelberg
BAti2	Atica-2	1972	Deutschland	Markt, Heidelberg
BRos2	Rosara-2	1991	Deutschland	Markt, Heidelberg
BRos3	Rosara-3		Deutschland	Markt, Heidelberg
BSel1	Selma-1	1972	Deutschland	Markt, Heidelberg

<sup>1</sup> Jahr der Zulassung, Angaben nach Bundessortenamt (2006)

## 3.1.2 Traditionelle Kartoffelsorten

### 3.1.2.1 Anzuchtmaterial

Kartoffelsorten, die nicht mehr in der offiziellen Sortenliste des Bundessortenamtes vermerkt sind, werden als traditionell bezeichnet. Der Großteil der hier untersuchten Sorten (Tab. 3.3) wurde ursprünglich um die Jahrhundertwende kultiviert. Bamberger Hörnchen, La Ratte und Rosara sind jedoch auch heute noch im deutschen Handel, Balmoral und Golden Wonder in

England und Bildstar in den Niederlanden zu beziehen und gehören damit streng genommen nicht zu den traditionellen Sorten. Da neben dem Alter ein zusätzlicher Einfluss der Knollenfarbe analysiert werden sollte, wurden sie in die Untersuchung mitaufgenommen.

Der Bezug des Probenmaterials, das aus Pflanz- und Speiseknollen bestand, erfolgte aus der Altmark (Kartoffelspezialitäten Altmark, Riebau, Deutschland). Nach Ankunft in Heidelberg wurde jede Sorte in drei Gruppen eingeteilt. Gruppe eins diente der Anzucht im Gewächshaus. Gruppe zwei wurde zum Freilandanbau verwendet und der dritte Teil direkt aufgearbeitet. Zum Vergleich wurde die konventionelle Sorte Agria unter den gleichen Bedingungen kultiviert.

**Tab. 3.3** Kultivierte und analysierte traditionelle Kartoffelsorten.

Sorte	Herkunft/Jahr	Schale	Fleisch	
AV	Arran Victory	Schottland 1912	violett-blau	weiß
BA	Balmoral	Schottland 1989 <sup>1</sup>	rot-braun	gelb
BH	Bamberger Hörnchen	Deutschland 1870	ocker	gelb
BI	Bildstar	Niederlande 1981 <sup>1</sup>	rot	gelb
EB	Edzell Blue	Schottland vor 1890	violett	hellgelb
FA	Fischbacher Alpe	Österreich <sup>2</sup>	ocker	hellgelb
GW	Golden Wonder	England 1906	ocker	hellgelb
LR	La Ratte	Frankreich 1872	rot-braun	gelb
NK	Nagler Kipfler	Österreich 1956	hellocker	gelb
PF	Pink Fir Apple	Deutschland 1850	hellrot	hellgelb
RD	Red Duke of York	Schottland 1891	rot	gelb
RL	Rote Löschtaler	Schweiz <sup>2</sup>	rot	hellgelb
RO	Rosara	Deutschland 1991 <sup>1</sup>	rot	gelb
AG	Agria	Deutschland 1985	ocker	gelb

<sup>1</sup> Jahr der Zulassung (im betreffenden Land)

<sup>2</sup> keine Angaben

Angaben zu Herkunft, Jahr, Schale, Fleischfarbe nach ZADI (2000)

### Anbaubedingungen

Jede Sorte wurde im Freiland und in Pflanztöpfen im Gewächshaus des Botanischen Gartens der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg gepflanzt. Der Anbau des Untersuchungsmaterials erfolgte im Jahr 2004 von April bis Ende Juli. Im Freiland-Anbau wurden 6-8 Knollen in getrennten Beeten ca. 3 cm unter der Erde gepflanzt. Bei längeren Trockenperioden wurde bei Bedarf zusätzlich zur natürlichen Niederschlagsmenge gegossen. Die Kultivierungsdauer betrug 16 Wochen. Der Gewächshaus-Anbau erfolgte ebenfalls sortenrein in 20 l Pflanztöpfen

in Naturerde. Verwendet wurden 3-5 Knollen, die ebenfalls ca. 3 cm unter der Oberfläche angepflanzt wurden. Bei täglicher Wässerung und gleichbleibenden Temperaturbedingungen ( $20 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ ) erfolgte die Kultivierung durch das schnellere Wachstum nur 14 Wochen. Bei beginnender Seneszenz wurden die Pflanzen geerntet, eingefroren und gefriergetrocknet.

### Untersuchungsmaterial

Es wurden folgende Pflanzengewebe auf ihren GA-Gehalt hin untersucht:

junges Blatt, altes Blatt, junge Sprossachse, alte Sprossachse, Gesamtknolle, Schale, Fleisch und Wurzel. Die Sorte La Ratte bildete zusätzlich Früchte aus, die als ganze Beere und getrennt in Pulpa und Samen analysiert wurden. Für jede Sorte wurde die größte Pflanze und für jedes Gewebe mindestens zwei Proben für die Alkaloid-Analyse ausgewählt. Bei Knollen wurde nach Möglichkeit auf eine einheitliche Größe geachtet. Die Trennung von Schale und Fleisch erfolgte mittels eines Kartoffelschälers (Schichtdicke 2 mm).

#### 3.1.2.2 weiteres Knollenmaterial

Zusätzliches Knollenmaterial traditioneller Kartoffelsorten (Tab. 3.4) wurde aus Eigenbeständen von Dr. Lorey, Steinhagen, Deutschland zur Verfügung gestellt. Die Proben stammten alle aus dem Freilandanbau.

### Untersuchungsmaterial

Da bei oberirdischem Material bereits Seneszenz eingetreten war, stand zur Untersuchung nur Knollengewebe zur Verfügung. Jeweils drei Knollen identischer Größe wurden auf den Alkaloid-Gehalt in der Gesamtknolle und in Schalen- bzw. Fleischgewebe untersucht, wobei zum Schälen wieder der Kartoffelschäler verwendet wurde.

**Tab. 3.4** Analytierte Knollen weiterer traditioneller Kartoffelsorten.

Sorte	Herkunft/Jahr <sup>1</sup>	Schale	Fleisch	
AS	Ackersegen	Deutschland, 1929-1963	ocker	gelb
BH2	Bamberger Hörnchen	Bamberg, vor 1900	ocker	gelb
DS	Dänische Spargelkartoffel	Dänemark, vor 1900	ocker	gelb
ER	Early Rose	USA, 1861	hellrot	weiß
FR	Fransen	Niederlande, vor 1900	ocker	hellgelb
OB	Odenwälder Blaue	Großbierau, 1908	blau-violett	hellgelb
PB	Peruanisch Blaue	Peru <sup>2</sup>	blau-violett	hellgelb
PV	Patersons Victoria	Schottland, 1863	ocker	weiß

<sup>1</sup> Jahr der Zulassung (im betreffenden Land)

<sup>2</sup> keine Angaben

Angaben zu Herkunft, Jahr, Schale, Fleischfarbe nach ZADI (2000)

### 3.1.3 Knollenbildende *Solanum*-Wildarten

Blatt- und Knollenmaterial verschiedener *Solanum*-Wildarten (Tab. 3.5) wurde durch das Leibnitz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Außenstelle Groß-Lüsewitz, Gatersleben, Deutschland, zur Verfügung gestellt. Der Anbau erfolgte im Jahr 2005 teils im Freiland, teils im Gewächshaus. Außer den Arten *S. ajanhuiri* JUZ. & BUKASOV, *S. chomatophilum* BITTER und *S. pascoense* OCHOA konnte von allen Arten Blatt- und Knollenproben erhalten werden. Die drei Genannten bildeten im Untersuchungsjahr keine Knollen aus.

#### Untersuchungsmaterial

Bei den *Solanum*-Wildarten wurden Blätter und Knollen analysiert. Da sich die Knollen der unterschiedlichen Arten sehr stark in ihrer Größe unterschieden und z. T. wenig Material zur Verfügung stand, wurde auf die getrennte Untersuchung von Schale und Fleisch verzichtet und die Knollen nur in ihrer Gesamtheit analysiert. Die Proben erreichten binnen zwei Tagen nach der Ernte Heidelberg und wurden direkt eingefroren und gefriergetrocknet.

**Tab. 3.5** Analysierte *Solanum*-Wildarten.

<i>Solanum</i> -Art	Accessions- Nummer	Herkunft	Kultivierung
<i>S. acaule</i> ssp. <i>acaule</i> BITTER	0053	Bolivien	Gewächshaus
<i>S. ajanhuiri</i> JUZ. & BUKASOV	2308	Bolivien	Feldanbau
<i>S. alandiae</i> CARDENAS	1565	Bolivien	Gewächshaus
<i>S. bulbocastanum</i> ssp. <i>bulbocastanum</i> DUNAL	1758	Mexiko	Gewächshaus
<i>S. chaucha</i> JUZ. & BUKASOV	6166	Peru	Feldanbau
<i>S. chomatophilum</i> BITTER	1672	Peru	Gewächshaus
<i>S. curtilobum</i> JUZ. & BUKASOV	5514	Peru	Feldanbau
<i>S. demissum</i> LINDLEY	5484	Mexiko	Gewächshaus
<i>S. maglia</i> SCHLTDL.	5290	Argentinien	Feldanbau
<i>S. microdontum</i> BITTER	0858	Argentinien	Gewächshaus
<i>S. pascoense</i> OCHOA	5377	Peru	Gewächshaus
<i>S. phureja</i> ssp. <i>phureja</i> JUZ. & BUKASOV	6227	Bolivien	Feldanbau
<i>S. polyadenium</i> GREENMAN	5375	Mexiko	Gewächshaus
<i>S. raphanifolium</i> CARDENAS & HAWKES	0645	Peru	Gewächshaus
<i>Solanum sparsipilum</i> (Bitter) JUZ. & BUKASOV	0939	Peru	Gewächshaus
<i>Solanum tarijense</i> HAWKES	1577	Bolivien	Gewächshaus
<i>Solanum tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> HAWKES (violett blühend)	4258/1	Argentinien	Feldanbau
<i>Solanum tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> HAWKES (weiß blühend)	4258/2	Argentinien	Feldanbau
<i>Solanum tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> HAWKES	5518	Peru	Feldanbau

### 3.1.4 Verarbeitungserzeugnisse

Die in dieser Arbeit untersuchten, verarbeiteten Kartoffelerzeugnisse stammten aus dem kommerziellen Handel. Tabelle 3.6 zeigt einen Überblick über die analysierten Verarbeitungsprodukte.

#### Untersuchungsmaterial

Die in Tab. 3.6 genannten wasserhaltigen Frisch- (B1, C1-C2) und Tiefkühlerzeugnisse (P1-P3, R1, W1-W3) wurden zunächst gefriergetrocknet. Kartoffelchips (C1-C2) wurden nach der Gefriertrocknung sofort extrahiert, um eine Wasseraufnahme durch ihren hohen Salzgehalt zu verhindern. Trockenprodukte (F1-F3, K1) konnten direkt analysiert werden.

**Tab. 3.6** Analysierte Verarbeitungserzeugnisse.

Code	Produkt	Hersteller	Händler
B1	Kartoffelknollen, eingeschweißt	Friweika Kartoffelbabies	Aldi, Heidelberg
C1	Kartoffelchips	KClassic	Handelshof, Heidelberg
C2		Chio Chips	Selgros, Aschaffenburg
F1	Kartoffelpüreeflocken	Marena	Penny, Heidelberg
F2		Potato Master	Norma, Heidelberg
F3		Gut Friedlingshof	Lidl, Heidelberg
F4		Maggi	Kaufland, Heidelberg
K1	Kartoffelknödel	Le Gusto	Aldi, Heidelberg
P1	Pommes Frites	Backofen-Frites	Aldi, Heidelberg
P2		Harvest Basket Crispy Frites	Lidl, Heidelberg
P3		Harvest Basket Jumbo Frites	Lidl, Heidelberg
R1	Kartoffelpuffer	Potato Rösti	Lidl, Heidelberg
W1	Potato Wedges	Tenergy	Lidl, Heidelberg
W2		Tenergy	Lidl, Neuenheim
W3		KClassic	Handelshof, Heidelberg

## 3.2 Verwendete Chemikalien und Geräte

Folgend sind die Chemikalien und Geräte aufgelistet, die wiederholt für die Versuche verwendet wurden. Chemikalien, die für eine bestimmte Methode nötig waren, sind unter dem entsprechenden Abschnitt zu finden.

### Chemikalien

A. bidest.:	Eigendestillat, Labor des IPMB, Universität Heidelberg, Deutschland
Methanol (p. a.):	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Ethanol (96%):	Chemikalienlager des Theoretikums, Eigenabfüllung, Universität Heidelberg, Deutschland
Phosphorsäure (85%):	VWR International, Fontenais sous Bois, Frankreich

### Geräte

Bi-Destilliergerät:	Brand GmbH & Co., Wertheim, Deutschland
Feinwaage:	Sartorius Basic, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Gefriertrocknungs- anlage:	Christ Alpha I-6, Typ 1052, Christ Martin GmbH, Osterode, Deutschland
Glasgeräte:	Schott AG, Mainz, Deutschland
Heizblock:	Bioblock scientific, Barnstead Thermolyt, Dubuque, USA
Heizplatte:	Schott AG, Mainz, Deutschland
Kaffeemühle:	KSW 2669, CLAtronic, Kempen, Deutschland
Magnetrührer:	MR 3001, Heidolph Instrumente GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Membranvakuum- pumpe:	Büchi System B-168, Büchi Labortechnik GmbH, Essen, Deutschland
Petrischalen:	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
pH-Meter:	MP 120, Mettler Toledo GmbH, Schwerzenbach, Schweiz
pH-Meter-	pH 7,0 und pH 4,0, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pufferlösungen:	
Reaktionsgefäße:	Polypropylen-Tubes (15 und 50 ml), Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland Eppendorf-Safe-lock Tubes (1,5 und 2 ml), Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Rotationsschüttler:	Pilot Shake System Kuhner, B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Rotationsverdampfer:	Rotavapor-R, Büchi Labortechnik GmbH, Essen, Deutschland
Trockenschrank:	T 6030, Heräeus Instruments, Hanau, Deutschland
Ultraschallgerät:	Sonorex Super RK 106, Bandelin Elektronik GmbH, Berlin, Deutschland
Vortex:	REAX Top, Heidolph Instrumente GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Vakuumpfuge:	Univapo H 150 Konzentratorzentrifuge, Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau, Deutschland
Varipetten:	10-100 µl und 100-1000 µl, Gilson Inc., Middleton, USA
Wasserbad:	M 240N, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Schweiz
Zentrifugen:	Megafuge 1.0R, Kendro Laboratory Products, Osterode, Deutschland Biofuge fresco, Kendro Laboratory Products, Osterode, Deutschland

### 3.3 Standard-Substanzen

#### Chemikalien

Solanidin (purum):	Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
$\alpha$ -Solanin (CHR):	Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
$\alpha$ -Chaconin (99%):	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz

#### Standardlösungen

Zur Herstellung der Standardlösungen wurden jeweils 10 mg GA-Standardsubstanz bzw. 10 mg Solanidin-Standard in 10 ml MeOH gelöst. Aus diesen Stammlösungen [1 mg/ml] wurden durch Verdünnen mit MeOH die Kalibrierlösungen für die einzelnen Verfahren hergestellt.

#### Standardlösung des Hämolyse-Assays ( $\alpha$ -Chaconin: $\alpha$ -Solanin = 70:30, w/w)

Zur Herstellung der Kalibrierstandards des Hämolyse-Assays wurde aus den GA-Stammlösungen zunächst eine Hämolyse-Stammlösung mit dem Verhältnis  $\alpha$ -Chaconin: $\alpha$ -Solanin = 70:30 (w/w) hergestellt, indem aus der  $\alpha$ -Solanin Stammlösung 300 µl und aus der  $\alpha$ -Chaconin-Stammlösung 700 µl entnommen und miteinander vermischt wurden, um eine

Endkonzentration von 1 mg Gesamt-GA/ml zu erhalten. Aus dieser Hämolyse-Stammlösung wurden anschließend die Kalibrierlösungen (2,5; 5; 10; 15; 20; 25 µg Gesamt-GA) hergestellt.

## 3.4 Aufbereitung des Untersuchungsmaterials

### 3.4.1 Probenvorbereitung

#### 3.4.1.1 Trocknung des Pflanzenmaterials und der Verarbeitungserzeugnisse

Wasserhaltiges Frischmaterial wurde zunächst bei  $-20\text{ °C}$  im Gefrierschrank eingefroren. Zur Entfernung des Wassers wurde die Probe 48 h an der Gefriertrocknungsanlage im Ölpumpenvakuum gefriergetrocknet. Trockene Pulverproben konnten direkt eingesetzt werden.

#### 3.4.1.2 Homogenisierung

Um eine quantitative Extraktion sicherzustellen, wurde das Gewebe zunächst homogenisiert. Bei Blattmaterial und Sprossachsen erfolgte dies in einer Kaffeemühle. Bei Knollen, Schalen, Fleischproben und Verarbeitungserzeugnissen kamen Mörser und Pistill zum Einsatz.

### 3.4.2 Extraktion

#### Chemikalien

Eisessig (99,8%):	Sigma Aldrich Schweiz, Buchs, Schweiz
Salzsäure (37%):	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
n-Pentan:	Grüssing, Filsum, Deutschland

#### Geräte

Membranfilter:	Rotilabo Spritzensterilfilter, 45 µm, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Einmalspritzen:	Inject 5 ml, B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland

#### Herstellung der Lösungen

##### Extraktionsmittel Variante A: 1% Essigsäure

Zu 10 ml 99,8%iger Essigsäure wurden 990 ml A. bidest. zugesetzt.

##### Extraktionsmittel Variante B: 1% Essigsäure-MeOH (70:30, v/v)

70 ml 1%ige Essigsäure aus Variante A wurden mit 30 ml MeOH vermischt.

##### Extraktionsmittel Variante C: 1 N HCl in MeOH-A. bidest (1:1, v/v)

Zunächst wurden 45 ml A. bidest mit 55 ml MeOH versetzt. Diesem Gemisch wurden 10 ml rauchende Salzsäure (37%) zugesetzt.

## Durchführung

Je nach vorliegendem Probenmaterial bzw. verwendetem Analyseverfahren kamen drei Extraktionsvarianten zum Einsatz. Variante A und B wurden für das HPLC- und LC-ESI-MS-Verfahren sowie die kolorimetrische Methode und den Hämolyse-Assay verwendet. Variante C diente ausschließlich zur Alkaloid-Bestimmung mittels GLC.

### Variante A: für Pflanzenmaterial

Abhängig vom GA-Gehalt wurde eine definierte Menge des gepulverten Pflanzenmaterials eingewogen und zweimal mit je 20 ml 1% Essigsäure unter zu Hilfenahme von 1 min Ultraschall extrahiert. Die erste Extraktion erfolgte über Nacht (> 12 h), die zweite 30 min jeweils auf einem Rotationsschüttler. Nach Abzentrifugieren der festen Bestandteile (8 min, 4000 Upm) und Vereinigung der Überstände, erfolgte die Aufreinigung eines definierten Extraktvolumens über Festphasenextraktion (weiter Abschnitt 3.4.3).

### Variante B: für Verarbeitungserzeugnisse

Wiederum wurde eine definierte Menge des gepulverten Materials eingewogen und mit einer Mischung aus 1% Essigsäure-MeOH (70:30, v/v) extrahiert. Die Extraktion erfolgte erneut zweifach mit je 20 ml des Extraktionsmittels, begleitet von 1 min Ultraschallbehandlung und jeweils über Nacht (> 12 h) und 30 min auf dem Rotationsschüttler. Nach Entfernung der festen Bestandteile durch Zentrifugieren (8 min, 4000 Upm) wurde bei stark fetthaltigen Proben eine Entfettung des Extrakts mit n-Pentan durchgeführt. Nach Abnehmen der n-Pentanolösung, wurde ein Aliquot der verbleibenden Lösung über sterile Spritzenfilter filtriert. Von diesem Filtrat konnte eine definierte Menge über SPE aufgereinigt werden (weiter Abschnitt 3.4.3).

### Variante C: GLC-Bestimmung

Eine definierte Menge der gepulverten Probe wurde zweimal mit je 20 ml des Hydrolyse-Mediums (1 N HCl in MeOH-A. bidest 1:1, v/v) und 1 min Ultraschall über Nacht (> 12 h) bzw. 30 min auf dem Rotationsschüttler extrahiert. Nach Abzentrifugieren fester Bestandteile (8 min, 4000 Upm) wurden jeweils 8-12 ml zur Hydrolyse verwendet (weiter Abschnitt 3.5.5).

## 3.4.3 Extraktaufreinigung mittels Festphasenextraktion (SPE)

Als moderne analytische Methode zur Aufreinigung der unpolaren Steroidalkaloide hat sich die Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) etabliert (Väänänen et al. 2000).

### Chemikalien

NaHCO<sub>3</sub>: Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

**Geräte**

SPE-Vakuumblock: Visiprep™ Vacuum Manifold, Supelco, Bellefonte, USA  
 SPE-Kartuschen: Supelclean™ ENVI™-18, 100 mg, 1 ml, Supelco, Bellefonte, USA  
 Einmalinjektions- 8 x 40 mm, B. Braun Melsungen, Melsungen,  
 kanülen: Deutschland

**Herstellung der Lösungen****Konditionierungslösung: 1% Essigsäure**

Zu 10 ml 99,8%iger Essigsäure wurden 990 ml A. bidest. zugesetzt.

**Waschlösung 1: 0,05 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8,4)**

420 mg Natriumhydrogencarbonat wurden in 100 ml A. bidest gelöst.

**Waschlösung 2 :MeOH-NaHCO<sub>3</sub> (60:40, v/v)**

60 ml MeOH wurden mit 40 ml Waschlösung 1 gemischt.

**Elutionsmittel: MeOH-1% Essigsäure (90:10, v/v)**

90 ml MeOH wurden mit 10 ml 1% Essigsäure vermischt.

**Durchführung**

Die im Extrakt vorliegenden GAe wurden über 1 ml SPE-Kartuschen, die mit 100 mg der unpolaren RP-18-Matrix gefüllt waren, aufgereinigt. Hierzu diente folgendes Aufarbeitungsprotokoll:

Konditionierung: 2 ml MeOH  
 2 ml 1% Essigsäure  
 Probenbeladung: 1-15 ml Extrakt (vgl. Kapitel V)  
 Waschschritte: 2 ml 0,05 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8,4)  
 2 ml MeOH-0,05 M NaHCO<sub>3</sub> (60:40, v/v)  
 1 ml A. bidest  
 Elution: 2 ml MeOH-1% Essigsäure (90:10, v/v)

Nach Elution der GAe wurde das Lösungsmittel durch Vakuumzentrifugation (5 h) entfernt und der Rückstand je nach dem verwendeten, analytischen Verfahren weiterbearbeitet.

## 3.5 Analytische Methoden

### 3.5.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

#### Chemikalien

Acetonitril: Gradient grade, J. T. Baker, Deventer, Niederlande  
 Wasser: Chromanorm HPLC-grade, VWR International, Leuven, Belgien

#### Geräte

Gerätetyp: Beckman Instruments, Fullerton, USA:  
 Binäres Pumpensystem Typ 125 P  
 Dioden-Array-Detektor Typ 168  
 Probengeber Marathon, 20 µl Probenschleife, Spark Holland, Emmen, Niederlande

Stationäre Phase: Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland:  
 Säule: LiChrospher<sup>®</sup> 100-RP-18 (250 mm x 4 mm)  
 Korndurchmesser 5 µm  
 Vorsäule: LiChrospher<sup>®</sup> 100-RP-18 (4 mm x 4 mm)  
 Korndurchmesser 5 µm

Mobile Phase: Eluent A: Wasser (pH 2,5, eingestellt mit 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)  
 Eluent B: Acetonitril

Gradientenprogramm: binärer Gradient, Gradientenprogramm siehe Tab. 3.7

Injektionsvolumen: 20 µl

Detektionswellenlänge: 202 nm, Bandbreite 4 nm

Datensystem: System Gold Nouveau, Beckman Instruments, Fullerton, USA

HPLC-Vials: Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

#### Herstellung der Lösungen

##### Eluent A: Wasser (pH 2,5)

1 l Wasser (HPLC-grade) wurde mit 500 µl 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> versetzt.

#### Durchführung

Der mittels SPE aufgereinigte Rückstand wurde in MeOH gelöst, so dass die Endkonzentration innerhalb des Kalibrierbereiches der HPLC-Methode lag. Die jeweils eingewogenen Mengen, das Aufreinigungsvolumen des Extraktes und das MeOH-Aufnahmevervolumen sind den zugehörigen Abschnitten aus Kapitel V zu entnehmen. Die

Lösung wurde in ein HPLC-Vial überführt und jeweils 20 µl in das Gerät injiziert. Tabelle 3.7 zeigt das zur chromatographischen Trennung der GAe verwendete Gradientenprogramm.

**Tab. 3.7** Gradientenprogramm zur Auftrennung der GAe mittels HPLC auf LiChrospher® RP-18. Eluent A: Wasser (pH 2,5), Eluent B: Acetonitril.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Flussrate [ml/min]	Elutionsprofil
0,0	90	10	1,3	Gradient
10,0	70	30	1,3	Gradient
11,0	40	60	0,9	Isokratisch
19,0	40	60	0,9	Gradient
20,0	0	100	0,9	Isokratisch
22,0	0	100	0,9	Gradient
22,0	90	10	0,9	

### 3.5.2 Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS)

#### Chemikalien

Acetonitril: Gradient grade, J. T. Baker, Deventer, Niederlande  
 Wasser: Chromanorm HPLC-grade, VWR International, Leuven, Belgien  
 Ameisensäure (98%): Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

#### Geräte

Massenspektrometer: Micromass VG Quattro II, Waters, Manchester, Großbritannien:  
 Interface: Electrospray-Ionisation (ESI)  
 ternäres Pumpensystem, Latek Labortechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland  
 Injektionsventil: Rheodyne, Modell 7725i  
 Stickstoffgenerator: Parker NG-7, Netten-Leur, Niederlande  
 Stationäre Phase: Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland:  
 Säule: LiChrospher® 100-RP 18 (250 mm x 4 mm i. D.)  
 Korndurchmesser 5 µm  
 Vorsäule: LiChrospher® 100-RP 18 (4 mm x 4 mm i. D.),  
 Korndurchmesser 5 µm  
 Mobile Phase: Eluent A: 0,1% Ameisensäure  
 Eluent B: 0,1% Ameisensäure in Acetonitril

Gradientenprogramm:	binärer Gradient, Gradientenprogramm für <i>Solanum</i> -Wildarten siehe Tab. 3.8 Gradientenprogramm für Verarbeitungserzeugnisse siehe Tab. 3.9
Injektionsvolumen:	20 µl
Splitverhältnis:	1:10
Datensystem:	Mass Lynx 4.0, Waters, Manchester, Großbritannien

### Herstellung der Lösungen

#### Eluent A: 0,1% Ameisensäure

1 l Wasser (HPLC-grade) wurde mit 1 ml Ameisensäure versetzt.

#### Eluent B: 0,1% Ameisensäure in Acetonitril

1 l Acetonitril (Gradient-grade) wurde mit 1 ml Ameisensäure vermischt.

### Durchführung

Für die LC-ESI-MS-Analyse wurden die Extrakte der HPLC-Bestimmung verwendet. Wiederum wurden 20 µl des methanolischen Extraktes in das Gerät injiziert und die GAe mit Hilfe der in den Tabellen 3.8 (*Solanum*-Wildarten, traditionelle Kartoffelsorten) und 3.9 (für Verarbeitungserzeugnisse) dargestellten Gradientenprogrammen aufgetrennt.

**Tab. 3.8** Gradientenprogramm zur Auftrennung der GAe in *Solanum*-Wildarten und den traditionellen Kartoffelsorten mittels LC –ESI-MS auf LiChrospher® RP-18. Eluent A: 0,1% Ameisensäure, Eluent B: 0,1% Ameisensäure in Acetonitril

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Flussrate [ml/min]	Elutionsprofil
0,0	90	10	1,0	Isokratisch
0,5	90	10	1,0	Gradient
20,5	40	60	1,0	Gradient
30,5	0	100	1,0	Isokratisch
31,5	0	100	1,0	Gradient
32,5	90	10	1,0	

**Tab. 3.9** Gradientenprogramm zur Auftrennung der GAe in Verarbeitungserzeugnissen mittels LC-ESI-MS auf LiChrospher® RP-18.  
Eluent A: 0,1% Ameisensäure, Eluent B: 0,1% Ameisensäure in Acetonitril.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Flussrate [ml/min]	Elutionsprofil
0,0	90	10	1,0	Isokratisch
0,5	90	10	1,0	Gradient
5,5	40	60	1,0	Isokratisch
10,5	40	60	1,0	Gradient
12,5	0	100	1,0	Isokratisch
13,5	0	100	1,0	Gradient
14,5	90	10	1,0	

Die massenspektrometrische Detektion positiv geladener GAe erfolgte über den Massenbereich  $m/z$  100-1200, wobei das Gerät auf folgende Parameter eingestellt wurde:

Verneblungsgasdruck: 13 l/h

Trocknungsgasdruck: 350 l/h

HV-Lens: 0,5 kV

Cone Spannung: 90 V

Quellentemperatur: 120°C

### 3.5.3 Kolorimetrische Methode

#### Chemikalien

*para*-Formaldehyd: Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

EtOH absolut (p. a.): Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland

#### Geräte

Photometer: Ultrospec plus 4054 UV/VIS Spectrophotometer, LKB Biochrom, Cambridge, Großbritannien

Einmalmikro-  
küvetten: No./REF. 67.742, Sarsted AG & Co., Numbrecht, Deutschland

#### Herstellung der Lösungen

##### 10% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

Zu 10 ml konzentrierter Phosphorsäure wurden 75 ml A. bidest. gegeben.

##### 10% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-99% EtOH (1:1, v/v)

50 ml 10% Phosphorsäure wurden mit 50 ml 99% EtOH vermischt.

#### Clarkes Reagenz

50 mg *para*-Formaldehyd wurden in 100 ml 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> gelöst.

## Durchführung

Der durch SPE aufgereinigte und getrocknete Rückstand wurde in 300 µl eines Gemischs aus 10% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-99% EtOH (1:1, v/v) gelöst. Dazu wurde 1,5 ml frisch zubereitetes Clarkes Reagenz zugesetzt. Nach erneutem Durchmischen konnte nach 60 min inkubieren bei Raumtemperatur die Absorption bei 595 nm gegen den Blindwert gemessen werden.

## 3.5.4 Hämolyse-Assay

### Chemikalien

Schafsblut mit SR0053D, Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland

Alseverzusatz:

Krebs-Ringer-Puffer: Krebs-Ringer-Puffer-Tabletten, Merck, Darmstadt, Deutschland

Digitonin: Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland

### Geräte

Photometer: Ultrospec plus 4054 UV/VIS Spectrophotometer, LKB Biochrom  
Cambridge, Großbritannien

Einmalmikro- No./REF. 67.742, Sarsted AG & Co., Numbrecht, Deutschland  
küvetten:

Brutschrank: Modell 100-800, Memmert, Schwalbach, Deutschland

### Herstellung der Lösungen

#### **¾ konzentrierter Krebs-Ringer-Puffer (isotonisch, pH 7,4)**

Zur Herstellung einer ¾ konzentrierten Pufferlösung wurde eine Krebs-Ringer-Puffer-Tablette in 166,7 ml A. bidest. gelöst. Eine Tablette enthält 1,125 g NaCl, 0,0525 g KCl, 0,0225 g CaCl<sub>2</sub>, 0,025 g NaHCO<sub>3</sub>.

#### **Positivkontrolle: 0,98 mM Digitonin in MeOH**

12,0 mg Digitonin wurden in 10 ml MeOH gelöst.

#### **Komplexierungsassay: 20 mM Cholesterollösung in 96% EtOH**

Zur Herstellung der 20 mM Cholesterollösung wurden 200,6 mg Cholesterollösung in 25 ml 96% EtOH gelöst.

## Durchführung

### Quantifizierung

Das nach SPE aufgereinigte Pellet wurde in 1,0 ml Krebs-Ringer-Puffer (¾ konzentriert) gelöst. Nach Zusatz von 250 µl Schafsblut und 2 sec durchmischen mit dem Vortex wurde 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Abtrennung der festen Bestandteile erfolgte durch zentrifugieren (10 min, 2000 Upm, 10 °C). Die überstehende Lösung diente der

photometrischen Bestimmung des Hämoglobingehaltes bei 540 nm gegen den Blindwert. Bei jedem Ansatz wurde als Negativkontrolle reiner Puffer und als Positivkontrolle 5 µg Digitonin in Krebs-Ringer-Puffer verwendet.

### **Komplexierungsassay**

Der aufgereinigte Extrakt wurde zunächst in 300 µl 96% EtOH aufgenommen. Zu dieser Lösung wurden 100 µl 20 mM Cholesterol in EtOH zugesetzt und 5 min bei 90 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Abkühlung auf RT und Lagerung bei 4°C über Nacht (> 16 h) erfolgte die Trennung des  $\alpha$ -Chaconin-Cholesterol-Komplexes von ungebundenem Cholesterol durch 30 min zentrifugieren bei 13 000 Upm und 4 °C. Nach Abdekantieren des Überstandes wurde das Lösungsmittel unter einem leichten Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand gemäß der Anleitung dem Hämolyse-Assay unterworfen.

Bei Anwendung des Assays auf die Standardsubstanzen  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin wurde die Cholesterol-Konzentration im Überstand gaschromatographisch vermessen. Hierzu diente das zur Quantifizierung der GAe verwendete GLC-Verfahren

## **3.5.5 Gaschromatographie (GLC)**

### **Chemikalien**

Ammoniumhydroxid (25%):	Sigma Aldrich Schweiz, Buchs, Schweiz
Chloroform:	Sigma Aldrich Schweiz, Buchs, Schweiz
Gelseminhydrochlorid:	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Helium 4.6:	Air Liquid Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Salzsäure (37%):	Merck, Darmstadt, Deutschland
Synthetische Luft:	20,5% O <sub>2</sub> in N <sub>2</sub> , Messer, Griesheim, Deutschland
Wasserstoff 3.0:	Messer Griesheim GmbH, Krefeld, Deutschland

### **Geräte**

Gaschromatographie (GLC):

Gerätetyp:	Carlo Erba, Mailand, Italien: GC 6000 Vega Series 2 Gaschromatograph Flammenionisationsdetektor (FID)
Säule:	Ohio Valley, Marietta, USA: Kapillarsäule OV-1, 30 m x 0,25 mm i. D., 0,25 µm Filmdicke

Trärgas:	Helium, lineare Geschwindigkeit 1 ml/min
Injektortemperatur:	270 °C
Detektortemperatur:	270 °C
Splitverhältnis:	1:25
Temperaturprogramm:	150 °C, 2 min isotherm, linearer Temperaturgradient von 150 auf 300 °C mit 8°C/min, 10 min isotherm
Datensystem:	ChromStar 4.0, Latek Labortechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland
Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GLC-MS):	
Gerätetyp:	GLC: HP 5890 Series II, Palo Alto, USA MS: Finnigan, SSQ 7000, Thermo Finnigan, Waltham, USA Interface: Electron Impact (EI)
Säule:	Ohio Valley, Marietta, USA Kapillarsäule OV-1, 30 m x 0,25 mm i. D., 0,25 µm Filmdicke
Trärgas:	Helium, lineare Geschwindigkeit 1 ml/min
Injektortemperatur:	250 °C
Splitverhältnis:	1:10
Temperaturprogramm:	150 °C, 2 min isotherm, linearer Temperaturgradient von 150 auf 300 °C mit 8°C/min, 10 min isotherm
Datensystem:	Xcalibur 1.4
Reaktionsgefäße:	Wheaton-V-Vials, 3 ml, NeoLab Migge Laborbedarf Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland Enghalsflasche 20 ml, gasdicht, Buddeberg, Mannheim, Deutschland

### **Herstellung der Lösungen**

#### **Hydrolyselösung: 1 N HCl in MeOH-A. bidest (1:1, v/v)**

Zur Herstellung der Hydrolyselösung wurden zunächst 45 ml A. bidest. mit 55 ml MeOH vermischt. Diesem Gemisch wurden 10 ml rauchende Salzsäure zugesetzt.

#### **Interner Standard: Gelsemin**

Als interner Standard wurde Gelsemin verwendet. Zur Herstellung der Gelsemin-Stammlösung wurden 5 mg Gelseminhydrochlorid in 10 ml MeOH gelöst.

#### **Kalibrierlösung**

Zur Quantifizierung des Solanidins in den Extrakten wurden vor jeder Analysenserie fünfmal 2 µl eines Standardgemischs aus Gelsemin und Solanidin injiziert. Die Herstellung der

Kalibrierlösung erfolgte durch Vermischen von 50 µl der Gelseminhydrochloridlösung mit 50 µl der Solanidin-Stammlösung.

## Durchführung

### Hydrolyse der GAe zum Aglykon Solanidin

Die Extraktion der GAe erfolgte direkt durch die Hydrolysemischung (vgl. Abschnitt 3.4.2, Variante C). Nach zentrifugieren (8 min, 4000 Upm) wurden aus diesem Extrakt 8 bis 12 ml in gasdichte Enghalsflaschen gefüllt, 50 µl der Gelsemin-Stammlösung [0,5 mg/ml] als interner Standard zugegeben und das Gemisch 16 h bei 80 °C im Trockenschrank hydrolysiert.

### Extraktion des Solanidin

Nach Abkühlen des Hydrolysegemischs auf RT wurde der pH-Wert mit 500 µl 25% NH<sub>4</sub>OH auf pH 10 eingestellt. Das als freie Base vorliegende Solanidin konnte durch zweimaliges Ausschütteln mit je 2 ml CHCl<sub>3</sub> extrahiert werden. Bei Emulsionsbildung wurde zur Phasentrennung 1 min bei 4000 Upm zentrifugiert. Nach Abnahme der Cholorformphasen und deren Vereinigung konnte das Lösungsmittel unter einem leichten Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in jeweils 100 µl MeOH aufgenommen werden. Nach Lösen des Rückstandes wurde zum Schutz der GC-Säule nochmals 1 min bei 2000 Upm zentrifugiert.

### GLC-Analyse

2 µl des methanolischen Extraktes wurde zur Analyse in das Gerät injiziert.

## 3.5.6 Automatisierte XLC-MS-Methode

### Chemikalien

Acetonitril:	HPLC grade, J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Ameisensäure (98%):	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Ammonium- hydroxid:	Sigma Aldrich Schweiz, Buchs, Schweiz
MeOH:	HPLC-grade, J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Wasser:	Chromanorm HPLC-grade, VWR International, Leuven, Belgien

### Geräte

XLC-Gerätetyp:	Symbiosis™ Pharma, Spark Holland, Emmen, Niederlande:
	Binäres Pumpensystem mit Degasser
	Automatisches Kartuschenaustauschmodul
	Hochdruck-Probengeber
	Autosampler mit Wellplatten-Halter

Massenspektrometer:	API 3000™, MDS Sciex, Concord, Kanada
	Interface: Turbo-Ionenspray
Aufreinigungs-	HySpere C-18HD (10 mm x 1 mm i. D., 20 mg)
kartusche:	Konditionierung: 1 ml ACN 1 ml 5% ACN in 1% NH <sub>4</sub> OH
	Injektionsvolumen: 50 µl
	Waschlösung: 2 ml 20 % ACN in 1% NH <sub>4</sub> OH
	Flussrate: 2 ml/min
Stationäre Phase:	Waters, Manchester, Großbritannien, Säule: Xterra MS C-18 ( 50 mm x 2 mm i. D.), Korndurchmesser 3 µm
Mobile Phase:	Eluent A: 0,1% Ameisensäure Eluent B: 0,1% Ameisensäure in MeOH
Gradientenprogramm:	binärer Gradient, Gradientenprogramm siehe Tabelle 3.10
Flussrate:	0,5 ml/min
Splitverhältnis:	1:1
Datensystem:	Analyst 1.4.1, MDS Sciex, Concord, Kanada

**Tab. 3.10** Gradientenprogramm zur Aufreinigung und Trennung der GAe durch XLC-MS auf Xterra MS C-18.  
Eluent A: 0,1% Ameisensäure, Eluent B: 0,1% Ameisensäure in MeOH

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Flussrate [ml/min]	Elutionsprofil
0,0	90	10	1,0	Isokratisch
0,1	90	10	1,0	Gradient
2,1	10	90	1,0	Gradient
2,5	10	90	1,0	Isokratisch
3,0	90	10	1,0	Gradient
5,0	90	10	1,0	Isokratisch

Die massenspektrometrische Detektion positiv geladener GAe erfolgte durch Multiple Reaction Monitoring (MRM) (Q1:  $m/z$  852,4 für  $\alpha$ -Chaconin bzw.  $m/z$  868,4 für  $\alpha$ -Solaniin, Q3:  $m/z$  98,2), wobei das Massenspektrometer auf folgende Parameter eingestellt wurde:

Verneblungsgasdruck:	15 l/h
Curtaingasdruck:	10 l/h
Kollisionsgasdruck:	9 l/h
Ionenspray-Spannung:	5,5 kV
Quellentemperatur:	400 °C

## Herstellung der Lösungen

### Extraktionsmittel Variante A: 1% Essigsäure

Zu 10 ml 99,8%iger Essigsäure wurden 990 ml A. bidest. zugesetzt.

### Extraktionsmittel: 1% Essigsäure

Zu 10 ml 99,8%iger Essigsäure wurden 990 ml A. bidest. zugesetzt.

### Konditionierungslösung: 5% ACN in 1% NH<sub>4</sub>OH

49,5 ml Acetonitril wurden mit 940,5 ml A. bidest versetzt. Zu dieser Lösung wurden 10 ml NH<sub>4</sub>OH gegeben.

### Waschlösung: 20 % ACN in 1% NH<sub>4</sub>OH

198 ml Acetonitril wurden mit 792 ml A. bidest versetzt. Zu dieser Lösung wurden 10 ml NH<sub>4</sub>OH gegeben.

### Eluent A: 0,1% Ameisensäure

1 l Wasser (HPLC-Qualität) wurde mit 1 ml Ameisensäure versetzt.

### Eluent B: 0,1% Ameisensäure in MeOH

1 l MeOH (HPLC-Qualität) wurde mit 1 ml Ameisensäure versetzt.

## Durchführung

50 µl des essigsäuren Extraktes wurden direkt in das XLC-System injiziert, über SPE-Kartuschen aufgereinigt, direkt über on-line Kopplung flüssigchromatographisch getrennt und massenspektrometrisch detektiert.

## 3.5.7 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die DC diente ausschließlich der qualitativen Analyse von GA-Abbauprodukten während der Methodenentwicklung, bei der Isolierung von GAen aus Pflanzenmaterial und bei der Überwachung von Reaktionen, z. B. dem Hydrolyseverlauf. Sie wurde nicht zur Quantifizierung verwendet.

### Chemikalien

Ammonium-                      Sigma Aldrich Schweiz, Buchs, Schweiz

hydroxid (25%):

Dichlormethan p. a.:      Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Elementares Jod:            Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

### Geräte

Stationäre Phase:          DC-Alufolien Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 20 cm x 20 cm, Merck,  
Darmstadt, Deutschland

Mobile Phase:              MeOH-Dichlormethan-25% NH<sub>4</sub>OH (70:30:1, v/v/v)

## Herstellung der Lösungen

### Mobile Phase: MeOH-Dichlormethan-25% NH<sub>4</sub>OH (70:30:1, v/v/v)

Zur Herstellung der mobilen Phase wurden 70 ml MeOH mit 30 ml Dichlormethan vermischt, anschließend wurde zur Alkalisierung 1 ml 25% NH<sub>4</sub>OH zugesetzt.

## Durchführung

Die DC-Kammer wurde mit 100 ml der mobilen Phase gefüllt, wobei die Kammersättigung durch das Einbringen von Filterpapierstreifen unterstützt wurde. Nach 30 min konnte die mit den Proben bestückte DC-Platte eingestellt und innerhalb einer Stunde entwickelt werden, so dass die Laufstrecke ca.  $\frac{3}{4}$  der Platte betrug. Die Detektion der Alkaloide erfolgte im Joddampf. Nach ca. 2 min waren die Alkaloide als braune Spots sichtbar. Alternativ kann auch Dragendorff-Reagenz (reagiert mit quartärem Stickstoff) oder Clarkes Reagenz (reagiert mit Steroidgerüst) verwendet werden.

## 3.6 Untersuchung des GA-Gehaltes in Kartoffeln und *Solanum*-Wildarten

Das Probenmaterial der in Abschnitt 3.1.1 bis 3.1.3 beschriebenen Kartoffelsorten sowie die in Abschnitt 3.1.4 dargestellten *Solanum*-Wildarten wurden nach trocknen und homogenisieren gemäß den unter 3.4.2 und 3.4.3 beschriebenen Verfahren extrahiert und aufgereinigt. Als Analysenmethode kam die HPLC zum Einsatz, da das individuelle Verhältnis der GAe  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin interessierte. Bei traditionellen Kartoffelsorten und den Wildarten wurden zur Ermittlung des GA-Musters zusätzlich LC-ESI-MS-Analysen durchgeführt.

## 3.7 Weiterführende Untersuchungen zur Alkaloid-Verteilung in Kartoffelgewebe

Als Untersuchungsmaterial der in diesem Abschnitt beschriebenen Analysen dienten aufgrund ihrer hohen Stoffwechselaktivität Frühkartoffeln. Die Proben wurden ebenfalls den unter Punkt 3.4.2 und 3.4.3 beschriebenen Verfahren der Extraktion und Aufreinigung unterzogen und mittels HPLC und bei Bedarf LC-ESI-MS analysiert.

### **3.7.1 GA-Akkumulation nach Licht- und Dunkellagerung**

Jeweils drei gleich große Knollen der Sorten Berber-2, Ditta-1, Nicola-4 und Valor-1 wurden in Petrischalen eine Woche lang bei RT unter Tageslicht oder abgedeckt im Dunkeln gelagert. Anschließend wurden die Knollen geteilt. Eine Hälfte wurde als Gesamtknolle analysiert, die zweite Hälfte als Schale und Fleisch getrennt untersucht.

### **3.7.2 GA-Gehalt ergrüner Kartoffelknollen**

Als Untersuchungsmaterial dienten die Frühkartoffelsorten Nicola-2 und Sieglinde-1, die bereits beim Kauf eine partielle Grünfärbung einzelner Knollen aufwiesen. Die grün gefärbte Schale sowie das bis zu 1 cm darunter liegende Fleisch wurden entfernt und jeweils getrennt voneinander analysiert. Als Vergleich diente ungefärbtes Gewebe derselben Knolle.

### **3.7.3 GA-Gehalt in „Kartoffelaugen“**

Die Ursprungsgebiete der Seitensprosse, die „Kartoffelaugen“, von jeweils drei Knollen der Sorten Berber-2 und Nicola-7 wurden im Radius 3 mm um den Mittelpunkt entfernt und auf ihren GA-Gehalt hin untersucht. Die restliche „augenlose“ Schale diente als Vergleichsprobe.

### **3.7.4 GA-Verteilung in Kartoffelfleisch**

Die Untersuchung der Alkaloid-Verteilung innerhalb des Fleisches erfolgte an Berber-2, da diese Sorte unter den analysierten Frühkartoffeln den höchsten Gesamt-GA-Gehalt aufwies. Vier Kartoffelknollen wurden zunächst von ihrer Schale befreit, wobei darauf geachtet wurden, dass die braune Korkschicht vollständig entfernt wurde. Anschließend wurde das darunter liegende Fleisch mit einem Kartoffelschäler in die Kategorien: äußeres Fleisch (4 mm), mittleres Fleisch (4 mm) und restliches inneres Fleisch unterteilt und getrennt voneinander analysiert.

### **3.7.5 GA-Aufnahme durch Marienkäferlarven (*Coccinellidae*)**

Die im Freilandanbau kultivierten traditionellen Kartoffelsorten wurden von Blattläusen befallen. Dies hatte die Ansiedlung der Marienkäferlarven als natürliche Fraßfeinde zur Folge. Diese wurden auf das Vorkommen von GAen hin untersucht wurden.

## **Chemikalien**

Isooktan (Rotsolv<sup>®</sup>) Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

## **Durchführung**

5-6 auf Kartoffelkraut lebende Marienkäferlarven wurden mit 3 ml 1%iger Essigsäure homogenisiert. Nach zentrifugieren (5 min, 13000 Upm) und dekantieren des Überstandes wurde gleiche Prozedur wiederholt und die Überstände vereinigt. Die Entfettung der Lösung erfolgte durch Ausschütteln mit 2 ml Isooktan. Nach zentrifugieren (1 min, 2000 Upm) wurde die wässrige Lösung zwischen Pellet und der Isooktanphase über das bekannte SPE-Protokoll (Abschnitt 3.4.3) aufgereinigt. Als Kontrolle dienten 5-6 nicht auf Kartoffelkraut vorkommende Marienkäferlarven, die dem gleichen Verfahren unterzogen wurden. Die aufgereinigten Extrakte wurden mit LC-ESI-MS untersucht.

## **3.8 Untersuchung des GA-Gehaltes in Verarbeitungserzeugnissen**

### **3.8.1 Veränderung des GA-Gehaltes in Salz- und Pellkartoffeln**

Als Untersuchungsmaterial dienten Knollen der Sorte Primura. Um die interindividuelle Variation des GA-Gehaltes auszuschließen wurden drei Knollen gleicher Größe zunächst in jeweils vier Teile zerlegt. Ein Viertel wurde als Referenz direkt gefriergetrocknet und die Alkaloid-Konzentration in Fleisch und Schale analysiert. Der zweite Teil wurde geschält und als Salzkartoffel in 100 ml Salzwasser (+ 800 mg NaCl) 15 min gekocht. Nach abkühlen und zerkleinern wurden die Proben eingefroren und gefriergetrocknet. Der dritte und vierte Anteil der Kartoffelknolle wurde als Pellkartoffel einmal in 100 ml Salzwasser (+ 800 mg NaCl), das zweite Mal in 100 ml 1% Essigsäure 15 min lang gegart. Die Pellkartoffelproben wurden sofort geschält und Schale und Fleisch getrennt gefriergetrocknet und analysiert.

Nach Homogenisieren der Proben kamen die unter Abschnitt 3.4.2 und 3.4.3 beschriebenen Extraktions- und Aufreinigungsverfahren zur Anwendung. Die Bestimmung der Alkaloid-Konzentration erfolgte per HPLC. Zusätzlich wurde jedes Kochwasser ebenfalls über SPE aufgereinigt und per HPLC und LC-ESI-MS analysiert.

### **3.8.2 GA-Gehalt in Verarbeitungserzeugnissen**

Als Untersuchungsmaterial dienten die in Abschnitt 3.1.5, Tabelle 3.6 beschriebenen Verarbeitungserzeugnisse. Neben der HPLC-Analyse wurden zusätzlich die unter Punkt 3.5.2

bis 3.5.6 genannte Quantifizierungsverfahren angewendet und miteinander verglichen. Für das HPLC- und LC-ESI-MS-Verfahren sowie den kolorimetrischen Test und den Hämolyse-Assay erfolgte die Bearbeitung des getrockneten und homogenisierten Probenmaterials nach den unter 3.4.2 Variante B und 3.4.3 beschriebenen Verfahren der Extraktion und Aufreinigung. Zur XLC-MS-Analyse diente der unbearbeitete 1%ige Essigsäureextrakt. Für die gaschromatographische Analyse wurde die in Abschnitt 3.4.2 beschriebenen Variante C zur Extraktion verwendet. Die sich anschließende weitere Bearbeitung ist Punkt 3.5.5 zu entnehmen.

## 3.9 Isolierung der GAe aus Pflanzenmaterial

### Chemikalien

Ethanol absolut (p. a.): Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Ethylacetat: Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

### Herstellung der Lösungen

#### Extraktionsmittel: 1% Essigsäure

Zu 10 ml 99,8%iger Essigsäure wurden 990 ml A. bidest. zugesetzt.

#### Waschlösung: 2% NH<sub>4</sub>OH

20 ml 25% NH<sub>4</sub>OH wurden mit 230 ml A. bidest. verdünnt.

#### Extraktionslösung 1: EtOAc-99% EtOH-5% NH<sub>4</sub>OH (80:16:4, v/v/v)

Zunächst wurden 10 ml 25% NH<sub>4</sub>OH mit 40 ml A. bidest. gemischt und anschließend zu 8 ml dieser Lösung 160 ml Ethylacetat und 32 ml absolutes EtOH zugesetzt.

#### Extraktionslösung 2: 95% EtOH:

190 ml 99% EtOH wurden mit 8 ml A. bidest. vermengt.

#### Kristallisationslösung: 80% EtOH:

Zu 160 ml absolutem EtOH wurden 38 ml A. bidest. gegeben.

### Durchführung

Die Isolation der Alkaloide erfolgte durch Ausfällung nach den Angaben bei Friedman et al. (1993) mit geringen Modifikationen. Hierzu wurde trockenes, gepulvertes Sprossmaterial 5 h mit 1% Essigsäure auf dem Magnetprüher extrahiert, so dass pro 10 g TG 300 ml Extraktionsmittel zur Verfügung stand. Nach Abfiltrieren der festen Bestandteile erfolgte eine Re-Extraktion des Filterkuchens in gleicher Weise. Nach Vereinigung der Filtrate wurde dieses mit konzentriertem NH<sub>4</sub>OH auf pH 10 eingestellt, auf der Heizplatte 30 min bei 70°C erhitzt und zur Ausfällung der Alkaloide 12 h bei 4 °C gelagert. Nach Abzentrifugieren (15 min,

4000 Upm) der ausgefällten GAe wurde der Überstand verworfen. Das erhaltene Pellet wurde solange mit kalter 2%iger  $\text{NH}_4\text{OH}$ -Lösung gewaschen, bis der Überstand fast farblos war.

Die Extraktion des  $\alpha$ -Chaconins erfolgte drei mal mit je 50 ml einer Mischung aus EtOAc-99% EtOH-5%  $\text{NH}_4\text{OH}$  (80:16:4, v/v/v). Nach Abzentrifugieren wurde der Überstand vereinigt und am Rotationsverdampfer eingeengt. Der restliche Filterkuchen wurde anschließend mit 95% EtOH erneut dreimal extrahiert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der jeweils verbliebene Rückstand wurde in 80% EtOH aufgenommen und die Alkaloide auskristallisiert. Nach Abzentrifugieren konnte  $\alpha$ -Chaconin in einer Reinheit von ca. 80%,  $\alpha$ -Solanin von etwa 85% erhalten werden.

# KAPITEL IV

## METHODENENTWICKLUNG

### 4.1 GA-Extraktion

Zur Extraktion der GAe aus dem Probenmaterial wurde grundsätzlich homogenisiertes, gefriergetrocknetes Gewebe verwendet. Bereits Dao & Friedman (1996) stellten in trockenem Material eine geringere Variation der Alkaloidkonzentrationen fest. Zugleich wird die Vergleichbarkeit der Gehalte zwischen den Pflanzen, zwischen verschiedenen Geweben einer Pflanze, als auch innerhalb des gleichen Gewebes der selben Pflanze verbessert. Der Trockenmassegehalt in den Knollen liegt zwar durchschnittlich bei 20% (Edwards & Cobb 1996), dennoch kann er stark abweichen, so zeigte z. B. die Sorte Sieglinde-2 eine Variation von 7,1 bis 20% im Trockenmassegehalt.

Weitere Vorteile der Verwendung gefriergetrockneter Proben sind nach Dao & Friedman (1996) und Friedman (2006):

- die Unterdrückung enzymkatalysierter oder verletzungsinduzierter Veränderungen des GA-Gehaltes
- die Lagerung des Probenmaterials
- die Untersuchung weiterer Inhaltsstoffe wie Proteine, Polyphenole u. a.
- die Verwendung des selben Pflanzenmaterials für GA-Gehaltsanalysen als auch für Fütterungsversuche.

Wie in der Einleitung bereits angedeutet, gestaltet sich die quantitative Extraktion der Kartoffelalkaloide durch ihren chemischen Aufbau schwierig. Die hydrophilen Zuckermoleküle verbunden mit dem hydrophoben Aglykon führen zu einem Molekül, für das sich kein Lösungsmittel wirklich gut eignet. Der im Indolizidin-System gebundene Stickstoff mit seinem freien Elektronenpaar bietet jedoch die Möglichkeit, durch Aufnahme eines Protons, das Alkaloid-Salz zu bilden. Als ionisches und damit polares Molekül besitzt diese Verbindung eine wesentlich bessere Löslichkeit in wässriger Lösung. Zum Vergleich wurde zunächst die Fähigkeit der Lösungsmittel A. bidest., 1% Essigsäure, 5% Essigsäure, 1% essigsäures MeOH und reines MeOH zur Extraktion der GAe in Fleisch- und Schalengewebe gegenübergestellt. Die Ergebnisse sind Tabelle 4.1 zu entnehmen. Als Analysenmethode diente zur Entwicklung der Extraktions- und Aufreinigungsverfahren die HPLC.

**Tab. 4.1** Vergleich der Extraktionsausbeute [ $\mu\text{g/g}$ ] verschiedener Lösungsmittel in Fleisch- und Schalengewebe.

Probe	Lösungsmittel	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-GA
Fleisch	1% Essigsäure	14,23 $\pm$ 0,57	35,05 $\pm$ 1,24	49,28 $\pm$ 1,79
	5% Essigsäure	13,63 $\pm$ 2,91	33,93 $\pm$ 5,07	47,56 $\pm$ 7,98
	MeOH	14,26 $\pm$ 2,42	23,09 $\pm$ 3,34	37,29 $\pm$ 5,12
Schale	A. dest.	n. q. <sup>1</sup>	n. q. <sup>1</sup>	n. q. <sup>1</sup>
	1% Essigsäure	611,47 $\pm$ 16,94	1164,34 $\pm$ 93,25	1775,81 $\pm$ 110,19
	5% Essigsäure	612,73 $\pm$ 1,72	1308,81 $\pm$ 69,12	1915,53 $\pm$ 69,83
	1% Essigsäure in MeOH	619,43 $\pm$ 123,33	1102,38 $\pm$ 210,84	1721,80 $\pm$ 334,16
	MeOH	539,22 $\pm$ 47,48	1233,33 $\pm$ 110,44	1774,55 $\pm$ 157,92

<sup>1</sup> nicht quantifizierbar

Während A. bidest. praktisch keine GAe herauslösen konnte, zeigten 1% essigsäures MeOH sowie reines MeOH ebenfalls geringere Ausbeuten, als die essigsäuren wässrigen Auszugsmittel. Nachteilig wirkt sich darüber hinaus der für methanolische Extraktionsmittel zusätzliche Aufarbeitungsschritt aus, weil eine quantitative Adsorption der Alkaloide an die RP-Matrix der nachfolgenden SPE-Aufreinigung nur aus wässrigen Lösungen erfolgt. Die Ergebnisse zwischen 1% und 5%iger Essigsäure unterschieden sich insgesamt nicht deutlich. Zwar konnte in Schalengewebe mit 5% Essigsäure eine höhere Ausbeute erzielt werden, was jedoch auf deren schwierige Homogenisierbarkeit und damit verbunden höhere Variation des GA-Gehaltes zurückzuführen ist. In leicht homogenisierbarem Kartoffelfleisch ergaben sich identische Konzentrationen. Um die Gefahr einer Hydrolyse der GAe zum Aglykon bei höherer Säurekonzentration zu verringern, wurde 1% Essigsäure bevorzugt.

Um die Extraktionsfähigkeit der 1%igen Essigsäure zu bewerten, wurde deren Ausbeute zusätzlich mit einer sechszehnstündigen Extraktion nach Soxhlet unter Verwendung von MeOH verglichen. Wie aus Tabelle 4.2 hervorgeht, lagen die Unterschiede beider Extraktionsweisen sowohl für Fleisch wie auch in höherkonzentriertem Schalengewebe innerhalb der jeweiligen Standardabweichungen und zeigten somit keinen signifikanten Unterschied. Ein Nachteil der Soxhlet-Extraktion ist zudem die lange Dauer sowie der zusätzliche Arbeitsschritt zur Entfernung des organischen Lösungsmittels.

**Tab. 4.2** Vergleich der Extraktionsausbeute [ $\mu\text{g/g}$ ] der Soxhlet- und Essigsäure-Extraktion in Fleisch- und Schalengewebe.

Probe	Extraktionsverfahren	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-GA
Fleisch	Soxhlet	34,16 $\pm$ 5,35	46,45 $\pm$ 4,30	81,98 $\pm$ 8,05
	1% Essigsäure	23,91 $\pm$ 5,13	40,93 $\pm$ 5,59	64,84 $\pm$ 10,62
Schale	Soxhlet	449,84 $\pm$ 144,27	1074,04 $\pm$ 320,84	1523,87 $\pm$ 465,11
	1% Essigsäure	466,54 $\pm$ 138,81	820,81 $\pm$ 143,48	1287,36 $\pm$ 282,29

Abgesehen vom Extraktionsmittel ist das eingesetzte Lösungsmittelvolumen, die Anzahl der Extraktionsschritte sowie die Extraktionszeit von Bedeutung. Die besten Ergebnisse konnte durch eine zweifache Extraktion erhalten werden, wobei für Fleisch und Gesamtknolle pro Gramm TG 5 ml Lösungsmittel, für Schalengewebe 40 ml nötig waren. Als Extraktionszeit erwiesen sich 12 h für den ersten und 30 min für den zweiten Extraktionsschritt als ausreichend. Die lange Dauer der ersten Extraktion war zur vollständigen Benetzung des trockenen Probenmaterials nötig, zur Vereinfachung kann sie über Nacht erfolgen. Unterstützend wurde jeweils kurz mit Ultraschall behandelt.

Eine Verbesserung des Extraktionsvorgangs durch 30 min Erwärmung auf 70 °C konnte nicht erreicht werden, da es zum teilweisen Abbau der Glykoside durch hydrolytische Zuckerabspaltungen kam.

## 4.2 GA-Aufreinigung mittels Festphasenextraktion

Die geringe Alkaloidkonzentration im Extrakt machte eine Aufkonzentrierung notwendig. Zusätzlich enthielt die essigsäure Lösung neben den GAen noch eine Reihe weiterer Matrixbestandteile, die in den sich anschließenden Quantifizierungsverfahren zu falschen Ergebnissen führen können und daher entfernt werden müssen. Zur Entfernung dieser Matrixbestandteile und zur Anreicherung der GAe bietet sich die SPE durch ihre hohe Effizienz und einfache Handhabung an. Zur Aufstellung eines geeigneten Aufreinigungsprotokolls muss zunächst ein passendes Sorbens gefunden werden. Anschließend kann die Suche nach geeigneten Wasch- und Elutionsmitteln erfolgen.

### 4.2.1 SPE-Sorbens

Ein geeignetes Phasensystem ist so auszuwählen, dass eine hohe Affinität zum Analyten und eine geringe gegenüber Matrix bzw. Störsubstanzen besteht. Die zu isolierende Substanz sollte dabei einen Kapazitätsfaktor von über 100 zeigen (Unger 1989). Andererseits darf die

Retention des Analyten nicht zu hoch sein, da er sich quantitativ wieder eluieren lassen muss. Durch den eher unpolaren Charakter der GAe eignen sich zu ihrer Aufreinigung RP-18-Materialien, wobei sich die Sorbentien verschiedener Hersteller unterscheiden können. Folgende Kartuschen wurden in ihrem Retentions- und Elutionsverhalten gegenüber GAen verglichen:

- Supelco Supelclean™ LC-18 (3 ml, 500 mg Sorbens)
- Supelco Supelclean™ ENVI™-18 (1 ml, 100 mg)
- IST Isolute™ C-18ec (10 ml, 100 mg)

### Durchführung

Die Versuche zur Aufstellung eines geeigneten Aufreinigungsprotokolls wurden mit einem Standardgemisch aus  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin [je 250 ng/ $\mu$ l] in 1% Essigsäure durchgeführt. Bei keinem der Materialien konnte mit einem Volumen von 200  $\mu$ l bei dieser Konzentration ein Durchbruch festgestellt werden. Die sich anschließende Elution der Alkaloide mit reinem MeOH zeigte zwischen den Sorbentien erste Unterschiede in der Wiederfindungsrate (*WFR*). Als ungeeignet erwies sich die Supelclean™ LC-18-Kartusche. Für beide GAe konnte eine *WFR* von maximal 73% erzielt werden. Isolute™ C-18ec offenbarte mit 102 bzw. 106% zunächst eine gute Wiederfindung, zeigte im weiteren Verlauf jedoch bei der Verwendung aufgestockter Proben einen starken Matrixeinfluss. Die *WFR* schwankte zwischen 41 und 239% für  $\alpha$ -Chaconin und 32 und 174% für  $\alpha$ -Solanin. Das beste Ergebnis lieferte die 100 mg Supelclean™ ENVI™-18-Kartusche von Supelco. Sowohl bei Verwendung der Standardlösungen, als auch mit aufgestockten Proben lagen die Wiederfindungsraten nahe 100% ( $\alpha$ -Chaconin  $110 \pm 18,1\%$  bzw.  $\alpha$ -Solanin  $105 \pm 6,1\%$ ). Der Versuch, mit größerer Sorbensmenge (500 mg) zu arbeiten, resultierte in einem nicht unbedeutenden Verlust der Analyten. Wie Edwards & Cobb (1996) bereits feststellten könnte eine irreversible Adsorption der GAe an das Material Schuld sein.

### 4.2.2 Aufreinigungsprotokoll

Nachdem das Sorbens festgelegt war, konnte ein geeignetes Aufreinigungsprotokoll zur Entfernung der Matrixbestandteile und anschließenden Elution der GAe von der Kartusche erarbeitet werden.

Erster Schritt jeder SPE-Methode ist die Konditionierung des Sorptionsmaterials, meist wird Methanol zur Benetzung verwendet. Um eine optimale Umgebung zur Adsorption der Analyten zu schaffen, wird anschließend mit einem wässrigen Medium, häufig dem

Extraktionsmittel, nachgespült. Nach der Vorbereitung des Sorbens mit MeOH, gefolgt von 1% Essigsäure, wurden wiederum 200 µl des GA-Standardgemischs [je 250 ng/µl] aufgebracht. Das folgende Spülen der Kartusche mit Gemischen aus A. bidest. und MeOH mit steigender Elutionskraft zeigte das erste GA-Vorkommen im Eluat bei MeOH-A. bidest. (70:30, v/v). Der höchste Gehalt wurde in MeOH-A. bidest. (90:10, v/v) aufgefunden. Als Waschmedium diente fortan eine MeOH-A. bidest.-Mischung im Verhältnis 60:40 (v/v), als Elutionslösung wurde MeOH-A. bidest. (90:10, v/v) festgelegt. Im weiteren Verlauf konnte eine verbesserte Adsorption der GAe an das Sorbens bei Verwendung von 0,05 M NaHCO<sub>3</sub>-Puffer (pH 8,4) anstatt A. bidest. festgestellt werden. Durch den leicht alkalischen pH-Wert wird die Umwandlung des Alkaloid-Salzes in die unpolare Basenform begünstigt, wodurch die Adsorption an die RP-Matrix noch erhöht werden kann. Im Elutionsmedium wurde A. bidest. durch 1% Essigsäure ersetzt, da bei erniedrigtem pH-Wert der Alkaloid-Stickstoff wieder protoniert vorliegt, was wiederum die Ablösung der GAe vom Kartuschenmaterial erleichtert. Um Puffersalze vor der Elution zu entfernen, wurde vor der Ablösung zusätzlich mit A. bidest. durchgespült.

Nach Elution der GAe von der Kartusche in 2 ml Eppendorfgefäße erfolgte die Entfernung des Lösungsmittels in einer Vakuumzentrifuge. Nach dem Trocknen konnte der alkaloidhaltige Rückstand je nach dem verwendeten Quantifizierungsverfahren weiterbehandelt werden.

Zusammenfassend ergab sich für Extraktion und Aufreinigung das in Abbildung 4.1 dargestellte Flussdiagramm. Die SPE-Kartuschen konnten bis zu zehn mal wiederverwendet werden, bevor es zu Leistungseinbußen kam.

**Extraktion**

gefriergetrocknetes, homogenisiertes Probenmaterial



2 x 20 ml Extraktionsmittel  
 a.) Pflanzenmaterial: 1% Essigsäure  
 b.) Verarbeitungsprodukte: 1% Essigsäure-MeOH (70:30, v/v)  
 1 min Ultraschall  
 1. Extraktion 12 h, 2. Extraktion 30 min



Zentrifugieren (8 min 4000 Upm)  
 Überstände vereinigen

**Aufreinigung und  
Konzentrierung**

Überstand über Supelclean™ ENVI™-18 aufreinigen:  
 Benetzung: 2 ml MeOH  
 Konditionierung: 2 ml 1% Essigsäure



Probenaufgabe: Aliquot aus Überstand



Waschschritt 1: 2 ml 0,05 M NaHCO<sub>3</sub>-Puffer (pH 8,4)  
 2: 2 ml MeOH-0,05 M NaHCO<sub>3</sub>-Puffer (60:40, v/v)  
 3: 1 ml A. bidest.



Elution: 2 ml MeOH-1% Essigsäure (90:10, v/v)



Entfernung des Lösungsmittels durch Vakuumzentrifugation

**Quantifizierung**

HPLC  
 LC-ESI-MS  
 Kolorimetrischer Assay  
 Hämolyse-Assay

**Abb. 4.1** Flussdiagramm des Standard-GA-Aufarbeitsverfahrens.

### 4.2.3 Wiederfindungsrate des gesamten Aufarbeitungsprozesses

Die korrekte Arbeitsweise des aufgestellten Extraktions- und Aufreinigungsverfahrens wurde über die *WFR* mit Hilfe aufgestockter Testansätze kontrolliert. Als Matrix diente wie zuvor Fleisch- und Schalengewebe. Für beide Gewebe konnten akzeptable *WFR* ermittelt werden, wie Tabelle 4.3 verdeutlicht. Die für Schalenmaterial abweichende *WFR* für  $\alpha$ -Solanin ist vermutlich wieder auf dessen schlechtere Homogenisierbarkeit zurückzuführen.

**Tab. 4.3** *WFR* für  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin mit Supelclean™ ENVI™ -18-Kartuschen.

	GA-Zusatz [ $\mu\text{g/g TG}$ ] <sup>1</sup>	Wiederfindung <sup>2</sup> [%]	
		$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin
Schale	100	128	102
	200	144	106
Frucht- fleisch	2	113	89
	5	93	96
	8	97	105
	10	92	93
	20	103	103
	40	105	119

<sup>1</sup> GA-Zusatz zu Schalen- oder Fleischgewebe

<sup>2</sup> Mittelwert einer Doppelbestimmung für jedes Gehaltsniveau und jede Komponente

## 4.3 Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC war schon immer Mittel der Wahl zur Detektion der Einzelalkaloide in Kartoffelextrakten. Sie wurde daher als Referenzmethode ausgewählt, auf die die später entwickelten Quantifizierungsverfahren zu beziehen waren. Wichtige festzulegende Parameter sind das Säulenmaterial, die Zusammensetzung der mobilen Phase sowie deren Flussrate.

### 4.3.1 Stationäre Phase

Als Säulenmaterial eignen sich Sorbentien mit unpolarer Charakteristik. Eine gewisse Restpolarität ist für die Trennung von  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin allerdings nötig, da sich beide nur in ihrer polaren Zuckerkomponente unterscheiden (vgl. Kapitel I, Abschnitt 1.2.1). Die bislang bevorzugten Sorbentien waren C-18, C-8 und Aminophasen (Edwards & Cobb

1996, Kuronen et al. 1999, Shakya & Navarre 2006, Sotelo & Serrano 2000) oder die speziell für die Auftrennung von Zuckern geeigneten Kohlenhydrat-Phasen (Bushway et al. 1979, 1980).

In dieser Arbeit standen folgende Säulenmaterialien zur Trennung der GAe zur Verfügung:

- Merck LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18 (250 mm x 4 mm i. D., Korndurchmesser 5 µm)
- Merck LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18ec (250 mm x 4 mm i. D., Korndurchmesser 5 µm)
- Merck LiChrospher<sup>®</sup> 100 NH<sub>2</sub> (250 mm x 4 mm i. D., Korndurchmesser 5 µm)

Als geeignete stationäre Phase erwies sich die RP-18-Säule ohne Nachsilanierung. Hierbei handelt es sich um mit Octadecyldimethylmonochlorsilan modifiziertes Kieselgel. Da der Platzbedarf eines Silans etwa doppelt so groß wie der einer Hydroxylgruppe ist, ist nur die Hälfte der Hydroxylgruppen des Kieselgels umgesetzt. Die Verbleibenden sind den zu trennenden Substanzen mehr oder weniger zugänglich. Neben hydrophoben zeigen diese Sorbentien somit gleichzeitig hydrophile Eigenschaften (Unger 1989), die zur Trennung der GAe ausgenutzt werden können. Das Material erwies sich als unpolar genug zur Retardierung der GAe und konnte durch seine Restpolarität dennoch zu deren Trennung beitragen. Absolut ungeeignet erwies sich die nachsilanierte Säule. Ihre Oberfläche war zu unpolar, so dass es zu keiner Retardierung der GAe kam. Diese Art von Säulenmaterial eignet sich nur zur Trennung unpolarer Aglyka, wie Kuronen et al. (1999) bereits feststellten. Bedingt geeignet war das Aminopropyl-Material. Dieses Sorbens stellt bereits den Übergang zu den Ionenaustauschern dar, da die NH<sub>2</sub>-Gruppen in saurer Lösung protoniert vorliegen. Im Übersichtsgradienten zeigte sich ein starkes Tailing der Peaks, was auf eine ungleichmäßige Elution der GAe deutete. Da das Material gegenüber modifizierten Kieselgelen zudem eine geringere Stabilität aufweist (Friedman & Dao 1992, Hellenäs 1986, Kuronen et al. 1999), wurde die RP-18-Säule bevorzugt.

### 4.3.2 Mobile Phase

Als zweiter Parameter ist die Auswahl eines geeigneten Fließmittelsystems notwendig. Dabei spielen nicht nur die verwendeten Lösungsmittel eine Rolle, sondern auch deren Mischungsverhältnis und der pH-Wert. Umkehrphasen werden meist mit stark wasserhaltigen Fließmitteln kombiniert, da Wasser in der eluotropen Reihe der Umkehrphasen durch seine geringe Elutionskraft am Anfang steht (Unger 1989). Zunächst wurden Übersichtsgradienten mit Wasser und Acetonitril (ACN) bei neutralem pH und pH 2,5 (eingestellt mit 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) verglichen. Als Testgemisch diente eine  $\alpha$ -Solanin- $\alpha$ -Chaconin-Standardmischung

[je 100 ng/ $\mu$ l], die Flussrate betrug 1 ml/min. Während bei neutralem pH-Wert keine Peaks detektiert werden konnten, zeigte das phosphorsaure System ein deutliches Signal. Vermutlich war die Elutionskraft des neutralen Fließmittelsystems nicht ausreichend, um die GAe vom Säulenmaterial zu lösen. Bereits Friedman & Levin (1992) berichteten, dass freiliegende Silanolgruppen der RP-Phasen zu einem zweiten Retentionsmechanismus in Form eines Kationenaustauschs führen, was gerade bei basischen Substanzen zu starkem Tailing und verlängerten Elutionszeiten führt. Kuronen et al. (1999) stellten fest, dass mobile Phasen mit niedrigem pH-Wert zur Trennung basischer Substanzen vorzuziehen sind, weil die basische funktionelle Gruppe der GAe wie auch die freien, sauren Silanolgruppen des Kieselgels vollständig protoniert vorliegen, was die ionischen Interaktionen zwischen ihnen verringert und so zu reproduzierbareren Ergebnissen führt.

Als nächstes musste die Zusammensetzung der Fließmittel so variiert werden, dass es zur Auftrennung des Alkaloid-Peaks kommt. Aus dem Übersichtsgradienten konnte das Mischungsverhältnis der mobilen Phase zur Elution der GAe abgeschätzt werden, es lag bei ACN-Wasser (pH 2,5) im Verhältnis 60:40 (v/v). Der Versuch das GA-Standardgemisch mit dieser Mischung durch isokratische Arbeitsweise aufzutrennen, misslang. Eine Antrennung konnte mit einem leicht ansteigenden Gradienten von 10 auf 60% ACN erreicht werden. Nach weiteren Testläufen mit variierenden Fließmittelzusammensetzungen wurde deutlich, dass die Trennung der GAe vor allem im ersten Teil des Gradienten von 10 auf 30% ACN erfolgt. Darauf basierend wurde schließlich das in dieser Arbeit verwendete Elutionsprofil ermittelt (vgl. Kapitel III, Abschnitt 3.5.1, Tab. 3.7):

Nach langsamem Anstieg der ACN-Konzentration von 10 auf 30% innerhalb von 10 min, in der die Trennung der GAe stattfindet, wurde innerhalb einer Minute auf das Elutionsgemisch ACN-Wasser (pH 2,5) (60:40, v/v) erhöht, mit dem die GAe in weiteren 10 min eluiert wurden. Die isokratische Arbeitsweise im zweiten Teil der Methode wurde bevorzugt, da es bei der verwendeten, niedrigen Detektionswellenlänge zu keinem Grundlinienanstieg kommt. Nach Steigerung auf 100% ACN, um sehr unpolare Substanzen von der Säule zu spülen, wurde 2 min lang wieder mit der Ausgangszusammensetzung konditioniert.

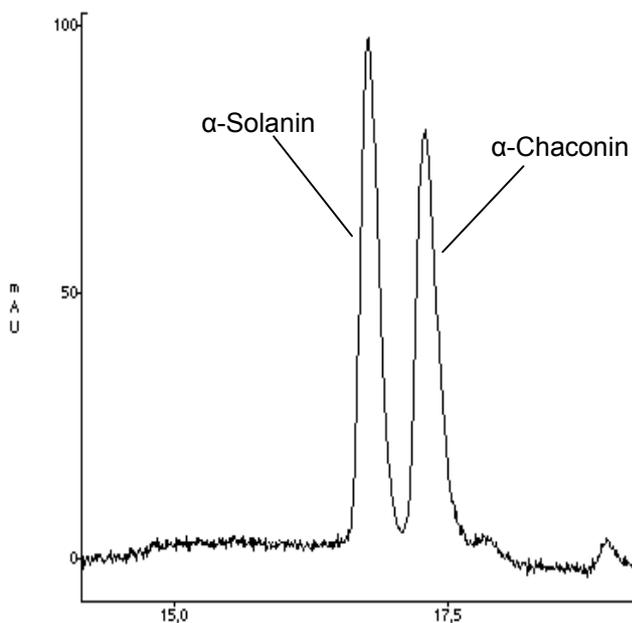
### 4.3.3 Flussrate

Die Variation der Flussrate kann zu einer weiteren Verbesserung der Auftrennung beitragen. Durch deren Erhöhung auf 1,3 ml/min während der Gradientenelution und Absenkung auf 0,9 ml/min bei isokratischer Arbeitsweise konnte die Trennung von  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin weiter optimiert werden.

### 4.3.4 Detektionswellenlänge

Zur Detektion der GAe stand ein Diodenarray-Detektor zur Verfügung, der die spektrale Absorption der Analyten im UV- und VIS-Bereich ausnutzt. Die Absorption bei gegebener Wellenlänge folgt dabei dem Lambert-Beer'schen-Gesetz und liefert ein konzentrationsabhängiges Signal. Da  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin durch ihre Doppelbindung nur ein schwaches Chromophor besitzen, muss bei niedriger Wellenlänge detektiert werden. Prinzipiell zeigen Doppelbindungen zwar bis 215 nm Absorption, der Detektor reagiert jedoch umso empfindlicher, je niedriger die Wellenlänge gewählt wird. Als Detektionswellenlänge wurden daher 202 nm verwendet.

Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen konnte das in Kapitel III, Abschnitt 3.5.1 beschriebene HPLC-Verfahren als Standardmethode festgelegt werden. In Abbildung 4.2 ist das Chromatogramm der Auftrennung eines  $\alpha$ -Solanin- $\alpha$ -Chaconin-Gemischs [je 100 ng/ $\mu$ l] dargestellt. Die Retentionszeit für  $\alpha$ -Solanin lag bei 16,8 min, für das unpolarere  $\alpha$ -Chaconin ergaben sich 17,3 min.

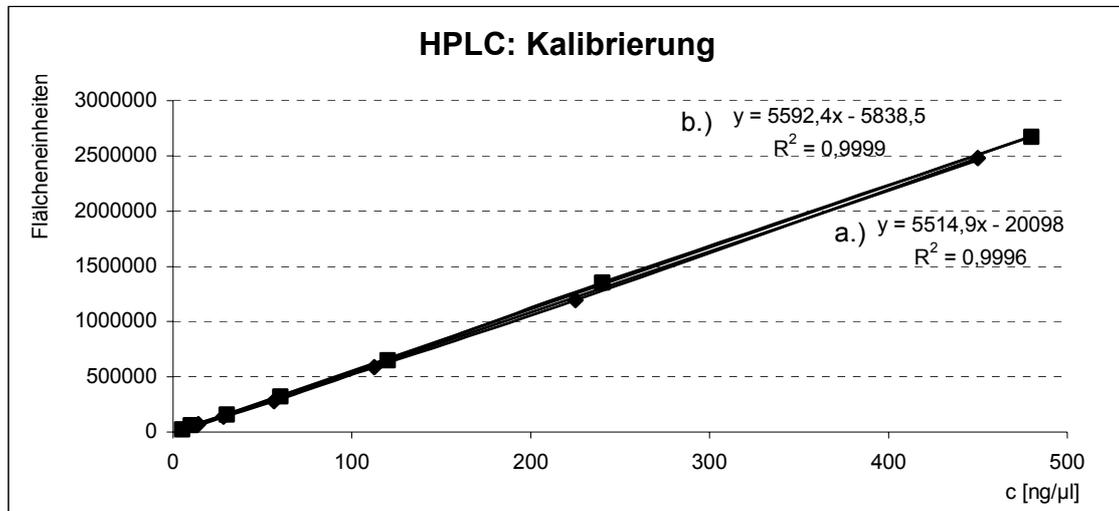


**Abb. 4.2**  
HPLC-Chromatogramm des Standardgemischs aus  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin [100 ng/ $\mu$ l].  $R_t$   $\alpha$ -Solanin 16,8 min,  $R_t$   $\alpha$ -Chaconin 17,3 min. (Chromatographische Bedingungen siehe Kapitel III, Abschnitt 3.5.1)

### 4.3.5 Kalibrierung

Die Bestimmung des GA-Gehaltes im Probenmaterial erfolgte auf Basis der Injektion externer Standards und der Aufstellung einer sechs-Punkt-Kalibriergeraden (vgl. Abb. 4.3). Hierzu wurde aus der  $\alpha$ -Solanin- bzw.  $\alpha$ -Chaconin-Stammlösung [1 mg/ml] jeweils ein Aliquot entnommen und mit MeOH zu den verwendeten Kalibrierkonzentrationen verdünnt. Die aufgestellten Kalibriergeraden ergaben sich aus einer Doppelbestimmung und zeigten für

$\alpha$ -Solanin im Bereich von 5 bis 480  $\mu\text{g/ml}$ , für  $\alpha$ -Chaconin im Bereich 3,5 bis 450  $\mu\text{g/ml}$  eine lineare Abhängigkeit.



**Abb. 4.3** Kalibriergeraden der HPLC-Methode für a.)  $\alpha$ -Solanin und b.)  $\alpha$ -Chaconin im Arbeitsbereich 5 bis 480 bzw. 7 bis 450  $\text{ng}/\mu\text{l}$  mit Angabe der Gleichung der Regressionsgeraden und des Bestimmtheitsmaßes.

### 4.3.6 Validierung des HPLC-Verfahrens

Zur Sicherstellung der korrekten Arbeitsweise wurde die HPLC-Methode mit gängigen Parametern validiert. Die Methodvalidierung dient ganz allgemein der Beurteilung einer analytischen Methode. In der DIN EN ISO 17025 wird u. a. gefordert, dass „ein Laboratorium nicht genormte, selbst entwickelte Verfahren“ validieren muss, „um zu bestätigen, dass die Verfahren für den beabsichtigten Gebrauch geeignet sind“ (DIN EN ISO 17025, 2000). Im Verlauf der Validierung werden die Leistungsmerkmale in Bezug auf den Anwendungsbereich, die Matrix und die Qualitätsanforderungen der für den bestimmten Anwendungszweck entwickelten Verfahren, festgestellt. Aufwand und Umfang der Validierung müssen dabei in einem angemessenen Verhältnis zu den Forderungen stehen (Kromidas 2000), daher ist es wichtig, sich über die Art und Ziele der Analytik im Klaren zu sein. Die hier entwickelte HPLC-Methode wurde gemäß den Richtlinien der International Conference on Harmonisation Guidances (ICH) validiert, wobei folgende Parameter zu bestimmen waren (ICH Q2B, 1997):

#### 1. Präzision (Precision):

Die Präzision ist ein Maß für die Streuung von Analysenwerten auf Grund von zufälligen Fehlern. Sie wird unterschieden in:

*Messpräzision* (Schwankungen durch das Analysensystem):

Die Bestimmung erfolgte durch aufeinanderfolgende, sechsmalige Injektion eines Standardgemisches aus  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin [50 ng/ $\mu$ l] und der Berechnung des Variationskoeffizienten  $v_k$  (Soll:  $v_k < 1$ ) nach folgender Formel:

$$v_k = \frac{s_{x0}}{\bar{x}} * 100\% \quad \begin{array}{l} s_{x0} = \text{Standardabweichung} \\ \bar{x} = \text{Mittelwert} \end{array}$$

Wie Tabelle 4.4 zeigt, konnte die Bedingung  $v_k < 1\%$  erfüllt und somit die Messpräzision nachgewiesen werden.

*Methodenpräzision* (Schwankungen innerhalb der gesamten Methode):

Die Bestimmung erfolgte durch Mehrfachanalyse einer Probe von der Homogenisierung bis zur HPLC-Analyse. Wiederum wurde oben genannte Gleichung zur Auswertung verwendet. Die Methodenpräzision und somit auch die  $v_k$ -Werte sind stark abhängig von der jeweiligen Matrix. Während in der pharmazeutischen Qualitätskontrolle  $v_k$ -Werte zwischen 1 und 2% üblich sind, werden in der Umweltanalytik 10 bis 15% akzeptiert. Da es sich bei den vorliegenden Proben um biologisches Material handelt, wurden auch hier  $v_k$ -Werte bis zu 15% toleriert. Zur Bestimmung der Methodenpräzision wurden die Kartoffelprodukte B1, F4, P2 und W1 verwendet. Tabelle 4.4 verdeutlicht durch  $v_k \leq 15\%$ , dass auch die Methodenpräzision nachgewiesen wurde.

**Tab. 4.4** Variationskoeffizienten [%] zur Ermittlung der Mess- und Methodenpräzision für  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin.

Testprodukt	$v_k$ $\alpha$ -Solanin	$v_k$ $\alpha$ -Chaconin
Standardlösung [50 ng/ $\mu$ l]	0,69	1,03
B1	13,00	6,68
F4	12,26	15,44
P2	12,50	14,03
W1	18,16	12,07

## 2. Richtigkeit (Accuracy of the mean)

Die Richtigkeit ist ein Maß für die Abweichung eines Messwertes vom Referenzwert auf Grund eines systematischen Fehlers. Belegt werden kann sie u. a. über die Wiederfindungsrate (*WFR*). Mit der *WFR* kann die gesamte Probenaufarbeitung bewertet werden, da sie deren Ausbeute aufzeigt und Verluste, die während Extraktion, Aufreinigung oder Injektion geschehen, aufdeckt. In der Praxis wird sie häufig durch Aufstockung einer

Probe mit der Standardsubstanz bestimmt. Die Differenz aus den Konzentrationen der aufgestockten ( $x_a$ ) und der Urprobe ( $x_0$ ) im Verhältnis zur hinzugefügten Konzentration an Standard ( $\Delta x$ ) ergibt schließlich die *WFR*.

$$WFR = \frac{x_a - x_0}{\Delta x} * 100\%$$

$x_a$  = Konzentration [ $\mu\text{g/g}$ ] der aufgestockten Probe  
 $x_0$  = Konzentration [ $\mu\text{g/g}$ ] ohne Aufstockung  
 $\Delta x$  = zugefügte Konzentration an Standard-Substanz [ $\mu\text{g/g}$ ]

Tabelle 4.5 gibt die während der Validierung ermittelten *WFR* wieder. Als Testsubstanz wurde alkaloidarme Kartoffelstärke verwendet. Für  $\alpha$ -Solanin wurde eine mittlere Wiederfindung von  $113,8 \pm 6,2\%$ , für  $\alpha$ -Chaconin  $99,7 \pm 5,3\%$  ermittelt. Somit konnte die Richtigkeit der Methode nachgewiesen werden.

**Tab. 4.5** Wiederfindungsraten für  $\alpha$ -Solanin and  $\alpha$ -Chaconin.

	GA-Zusatz [ $\mu\text{g/g TG}$ ] <sup>1</sup>	Wiederfindung <sup>2</sup> [%]	
		$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin
Kartoffel-	1	118	93
stärke	10	117	98
	50	108	105

<sup>1</sup> GA-Zusatz zu Kartoffelmehl

<sup>2</sup> Mittelwert einer Doppelbestimmung für jedes Gehaltsniveau und jede Komponente.

Die Gesamtheit aus Präzision und Richtigkeit ergibt die Genauigkeit. Sie ist damit ein Maß für den Gesamtfehler einer Analyse. Das Ergebnis ist genau, wenn es frei von zufälligen und systematischen Fehlern ist (Kromidas 2000).

### 3. Nachweisgrenze (Limit of Detection)

Die Nachweisgrenze ist die niedrigste Konzentration einer Substanz, die qualitativ noch erfasst werden kann. Nach DIN 32645 muss sie über die direkte Leerwert oder indirekte Kalibriergeraden-Methode berechnet werden. In der chromatographischen Praxis gelten meist das zwei- bis dreifache Grundlinienrauschen als Nachweisgrenze. Oftmals wird nicht die absolute Höhe der Rausch-Signale, sondern deren Standardabweichung ( $s_R$ ) in die Berechnung miteinbezogen. Es wird daher gefordert, dass das Messsignal um die  $k$ -fache (mindestens 3) Standardabweichung größer sein muss als der Mittelwert der Rauschsignale ( $\bar{x}_R$ ) (Rücker et al. 2001). Zur Bestimmung von  $x_{NG}$  wurde eine zehnfache Leerwertbestimmung durchgeführt. Nach folgender Gleichung ergab sich für die Nachweisgrenze der beiden GAe eine Konzentration von  $1,2 \text{ ng}/\mu\text{l}$ .

$$x_{NG} = \bar{x}_R + k * s_R$$

$x_{NG}$  = Nachweisgrenze (als Höhe des Messsignals)  
 $\bar{x}_R$  = Mittelwert der Rauschsignale  
 $k$  = Faktor  
 $s_R$  = Standardabweichung der Rauschsignale

#### 4. Bestimmungsgrenze (Limit of Quantification)

Die Bestimmungsgrenze ist die Konzentration, die mit einer vorgegebenen Mindestpräzision (z. B. 33,3% Standardabweichung) und -richtigkeit noch quantitativ bestimmt werden kann. In der chromatographischen Praxis gilt die dreifache Nachweisgrenze bzw. das neun- bis zehnfache Grundlinienrauschen als Bestimmungsgrenze (Wellnitz & Gluschke 2005). Analog zur Nachweisgrenze ergibt sich für die Berechnung der Bestimmungsgrenze folgende Gleichung:

$$x_{BG} = \bar{x}_R + k * s_R$$

$x_{BG}$	=	Nachweisgrenze (als Höhe des Messsignals)
$\bar{x}_R$	=	Mittelwert der Rauschsignale
$k$	=	Faktor
$s_R$	=	Standardabweichung der Rauschsignale

Als Bestimmungsgrenze konnte nach obiger Formel für  $\alpha$ -Solanin wie für  $\alpha$ -Chaconin eine Konzentration von 3,0 ng/ $\mu$ l berechnet werden. Mit 2,92 für  $\alpha$ -Solanin bzw. 9,24 für  $\alpha$ -Chaconin war die Präzision tolerierbar.

#### 5. Spezifität (Specificity)

Die Spezifität zeigt die Fähigkeit eines Analysenverfahrens nur den gesuchten Analyten zu erfassen. Weitere Bestandteile oder Merkmale in der Probe beeinflussen das Ergebnis nicht. Häufig wird die Selektivität synonym zur Spezifität verwendet. Sie wird über die Richtigkeit bestimmt, da Spezifität bzw. Selektivität Voraussetzung für die Richtigkeit ist, ist eine richtige Methode automatisch auch selektiv (Komidas 2000). Da die Richtigkeit der Methode bereits unter Punkt 2 bewiesen wurde, war somit ihre Spezifität gegeben.

#### 6. Linearität und Arbeitsbereich (Linearity and range)

Die Linearität zeigt die Proportionalität des Messsignals zur Analytkonzentration in der Probe an. Die Linearität wird aus der Kalibrierfunktion ersichtlich. Ist die Steigung konstant, so ist die Linearität gegeben. Häufig wird in diesem Zusammenhang der Arbeitsbereich genannt. Es ist der durch die gewählten Randbedingungen (Kalibrierpunkte, Konzentrationsniveaus...) festgelegte und experimentell überprüfte Gültigkeitsbereich einer Methode (Komidas 2000). Die Linearität im Arbeitsbereich wurde bereits bei der Kalibrierung unter Abschnitt 4.3.5 nachgewiesen.

#### 7. Robustheit (Robustness)

Die Robustheit stellt die relative Unempfindlichkeit eines Analysensystems gegenüber Änderungen der analytischen Rahmenbedingungen (Methodenparameter wie Lösungsmittel, pH-Wert, Gerät, Labor) dar. Zur Bestimmung der Robustheit wird die Verfahrensstabilität, Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit zusammengefasst. Da bei dem vorliegenden HPLC-

Verfahren nur ein Gerät und ein Labor zur Verfügung stand, wurde auf die Untersuchung der Robustheit verzichtet.

### **8. Systemeignung (System Suitability)**

Die Eignung des analytischen Systems ist natürlich grundlegende Bedingung für eine erfolgreiche Validierung und wurde vorausgesetzt.

## **4.4 LC-ESI-MS**

Die Massenspektrometrie allein oder in Verbindung mit voriger LC-Trennung wurde bislang hauptsächlich zur Identifizierung von GA-Gemischen verwendet. Durch ihre universelle Detektion und geringe Nachweisgrenze bietet sie auch für die Quantifizierung beste Voraussetzungen (Stobiecki et al. 2003, Zywicki et al. 2005).

### **4.4.1 MS-Parameter**

Zunächst wurden die Parameter des Massenspektrometers so optimiert, dass höchste Empfindlichkeit für die GAe gegeben war. Es wurde eine  $\alpha$ -Solanin-Standardlösung mit der Konzentration 5 ng/ $\mu$ l in MeOH-0,1% Ameisensäure (1:1, v/v) hergestellt und per Direkteinlass injiziert. Zur Optimierung der angelegten Spannungen und der Temperatur diente das  $m/z$ -Verhältnis 868, das sich aus der Molekülmasse des  $\alpha$ -Solanins von 867 g/mol und der Masse eines Protons, das zur Ionenbildung im ESI-Verfahren angelagert wird, ergibt. Die Parameter der MS-Methode sind in Kapitel III, Abschnitt 3.5.2 aufgelistet.

Die Detektion positiv geladener Ionen erfolgte im Full Scan-Modus durch die Darstellung der Massenspuren  $m/z$  868 für  $\alpha$ -Solanin und  $m/z$  852 für  $\alpha$ -Chaconin. Ohne weiteres hätte auch der empfindlichere Single Ion Mode gewählt werden können. Da in der vorliegenden Arbeit zusätzlich das Vorkommen von Nebenprodukten, z. B. aus einer Hydrolyse, überprüft werden sollte, wurde der Full Scan-Modus im Massenbereich  $m/z$  100 bis 1200 bevorzugt.

### **4.4.2 LC-Parameter**

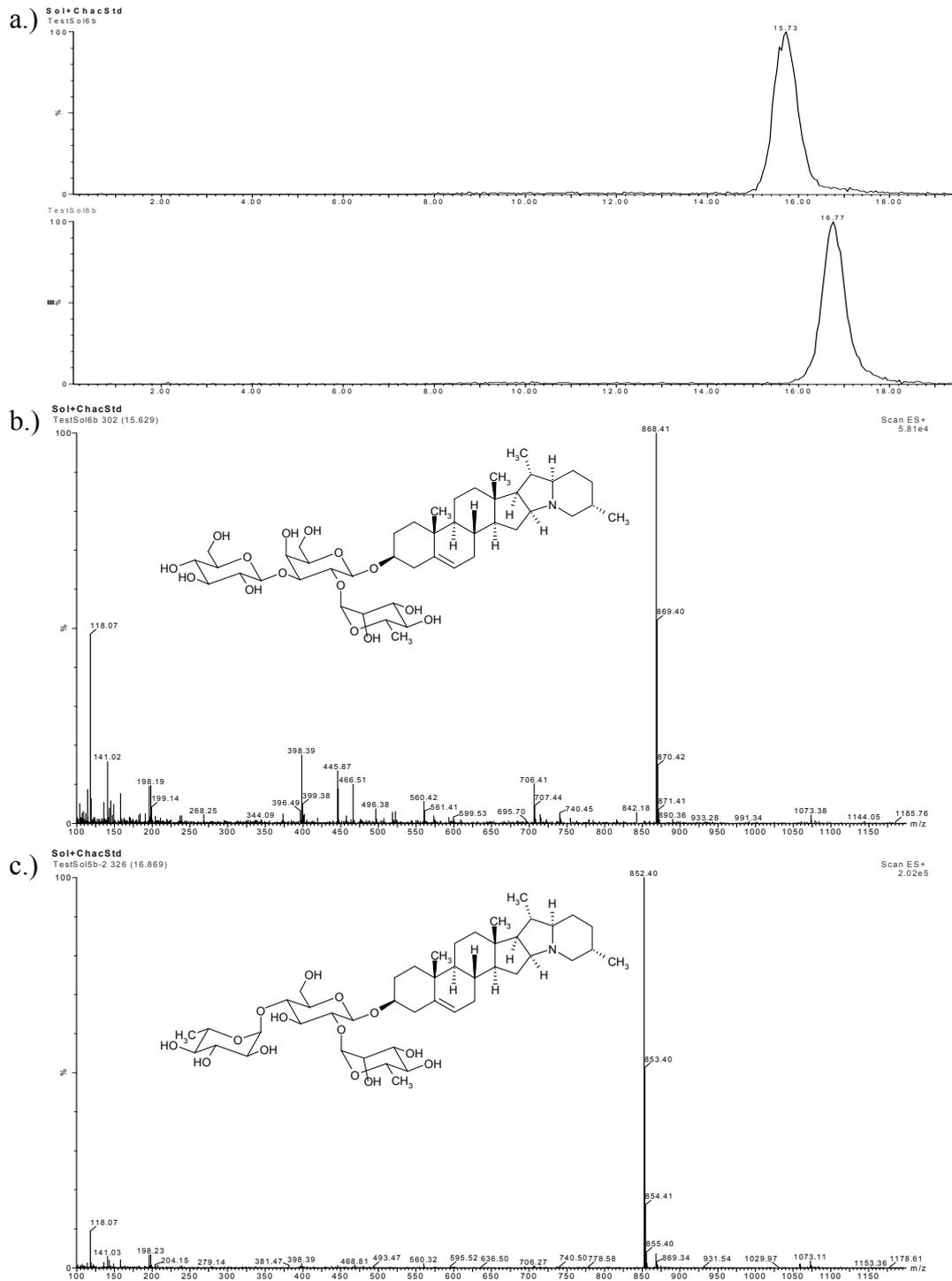
Die Parameter zur chromatographischen Trennung der GAe wurde basierend auf den Erkenntnissen des HPLC-Verfahrens erarbeitet. Als Säulenmaterial kam wiederum die Merck LiChrospher<sup>®</sup> 100-RP-18-Säule (250 mm x 4 mm i. D., Korndurchmesser 5  $\mu$ m) zum Einsatz. Bei der Ermittlung des geeigneten Fließmittelsystems stand bei der massenspektrometrischen Detektion die schnelle Elution der Analyten von der stationären Phase mit möglichst schmaler Peakbreite im Vordergrund. Auf eine vollständige Trennung der GAe konnte verzichtet

werden, da im Full-Scan-Modus Massenspuren mit den gesuchten  $m/z$ -Verhältnissen gelegt werden können. Die Elutionszeit sollte allerdings nicht zu kurz gewählt werden, um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen.

Im Vergleich zur HPLC-Methode war der Austausch der Phosphorsäure wichtig, da diese nicht verdampfbar ist und somit die Ionenquelle verschmutzen würde. Dennoch war ein Säurezusatz zu beiden Lösungsmitteln nötig, um Protonen für die Bildung der positiv geladenen Molekülonen im ESI-Verfahren zur Verfügung zu stellen. Meist werden Ameisensäure oder Trifluoressigsäure als Protonenspender verwendet. In dieser Arbeit wurde Ameisensäure aufgrund ihrer geringeren Giftigkeit und der guten Molekülonenbildung bevorzugt und in einer Konzentration von jeweils 0,1% den beiden Fließmitteln Wasser und ACN zugefügt.

Das zur Trennung von  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin in Kartoffelprodukten verwendete Gradientenprogramm ist in Kapitel III, Abschnitt 3.5.2, Tabelle 3.9 dargestellt. Im zeitlichen Verlauf stieg der Anteil des ameisensauren ACN innerhalb von 6 min von 10 auf 60%. Dies wurde weitere 5 min in isokratischer Arbeitsweise aufrechterhalten. Nach einer weiteren Erhöhung auf 100% 0,1% Ameisensäure in ACN zur Entfernung stark retardierter Substanzen, wurde wiederum 1 min lang mit der Ausgangszusammensetzung zur Säulenkonditionierung gespült. Als Retentionszeiten ergaben sich für  $\alpha$ -Solanin 15,7 min, für  $\alpha$ -Chaconin 16,7 min. Diese Zeit konnte gerätespezifisch nicht weiter verringert werden.

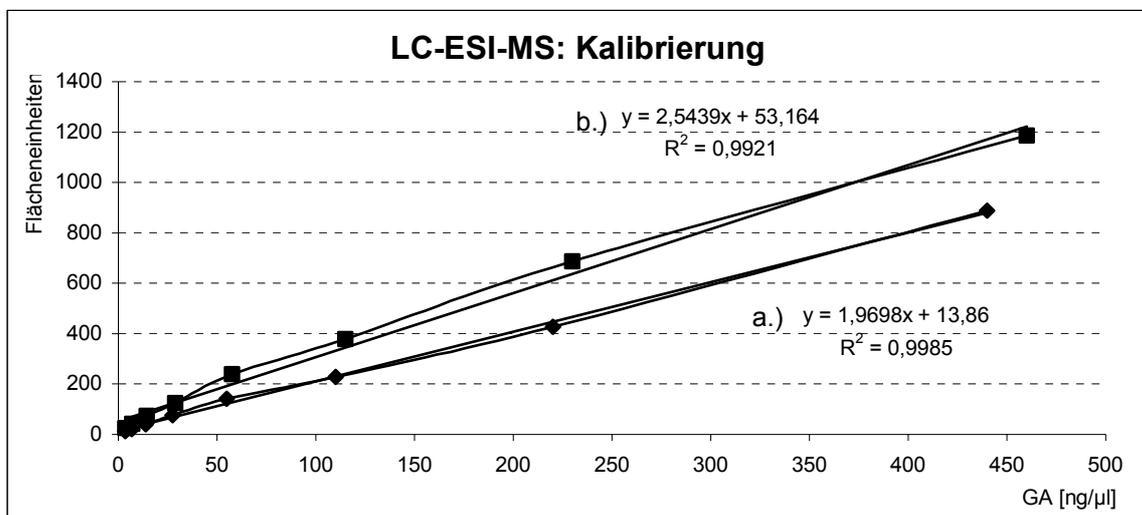
Das Ergebnis der Auftrennung der beiden GAe ist in Abbildung 4.4 zu sehen. Bild 4.4a zeigt das Ionenchromatogramm bei  $m/z$  868 für  $\alpha$ -Solanin und  $m/z$  852 für  $\alpha$ -Chaconin. In den Abbildungen 4.4b und c sind jeweils die zugehörigen Massenspektren dargestellt.



**Abb. 4.4** a.) Ionenchromatogramm für die  $m/z$ -Werte 868 für  $\alpha$ -Solanin und 852 für  $\alpha$ -Chaconin.  
 b.) MS-Spektrum für  $\alpha$ -Solanin  
 (charakteristische Fragmentationen  $m/z$  722, 706, 560, 398, vgl. Anhang B.1)  
 c.) MS-Spektrum für  $\alpha$ -Chaconin  
 (charakteristische Fragmentationen  $m/z$ , 706, 560, 398, vgl. Anhang B.1).

### 4.4.3 Kalibrierung

Die Quantifizierung der GAe erfolgte wiederum mit Hilfe von externen Standards und der Aufstellung einer acht-Punkt-Kalibriergeraden. Hierzu wurde aus der  $\alpha$ -Solanin- bzw.  $\alpha$ -Chaconin-Stammlösung [1 mg/ml] jeweils ein Aliquot entnommen und mit MeOH zu den verwendeten Kalibrierkonzentrationen verdünnt. Die aufgestellten Kalibriergeraden (Abb. 4.5) waren das Ergebnis einer Doppelbestimmung und zeigten für  $\alpha$ -Solanin im Bereich von 0,35 bis 44 ng/ml, für  $\alpha$ -Chaconin im Bereich 0,35 bis 46 ng/ml eine lineare Abhängigkeit. Die höhere Steigung der  $\alpha$ -Chaconin-Geraden ergibt sich aus dessen besserer Ionisierbarkeit. Gleiches Phänomen wurde bereits von Väänänen et al. (2005) beobachtet.



**Abb. 4.5** Kalibriergeraden der LC-ESI-MS-Methode für a.)  $\alpha$ -Solanin und b.)  $\alpha$ -Chaconin im Arbeitsbereich 0,35 bis 44 bzw. 0,35 bis 46 ng/ $\mu$ l mit Angabe der Gleichung der Regressionsgeraden und des Bestimmtheitsmaßes.

Mit  $v_k$ -Werten von 0,3 für  $\alpha$ -Solanin und 1,5 für  $\alpha$ -Chaconin zeigte die LC-ESI-MS gute Messpräzision. Als Bestimmungsgrenze ergab sich bei Verwendung des Full-Scan-Modus eine Konzentration von 10 ng/ml für  $\alpha$ -Solanin und 5 ng/ml für  $\alpha$ -Chaconin durch dessen bessere Ionisierbarkeit. Durch Anwendung des empfindlicheren SIR-Modes kann sie noch verbessert werden.

## 4.5 Kolorimetrischer Assay

### 4.5.1 Methodenentwicklung

In frühen Zeiten der GA-Forschung wurden zu deren Quantifizierung oftmals Kolorimetrische Methoden eingesetzt. Der 1958 von Clarke entwickelte und von Hellenäs (1986) modifizierte Assay macht sich die Reaktion von *para*-Formaldehyd mit Sterolen in Anwesenheit starker Säuren zu Nutze. Verwendet wird eine Abwandlung des zum Morphinnachweis eingesetzten Marquis-Reagenz. Die dabei verwendete Schwefelsäure wurde von Clarke durch Phosphorsäure ausgetauscht, da die direkte Anwendung an Pflanzenmaterial zur Schwarzfärbung der Lösung führte und somit eine photometrische Bestimmung unmöglich machte. Voraussetzung für die Reaktion ist das Vorliegen einer Doppelbindung, da die Reaktion auf der Umsetzung des *para*-Formaldehyd mit dieser Doppelbindung beruht.

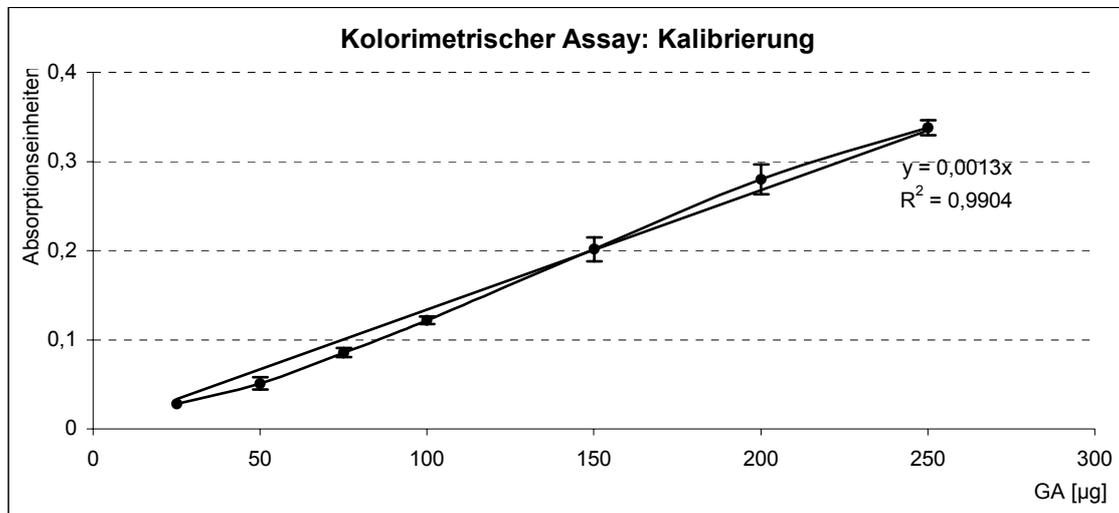
Ausgehend von der Vorschrift bei Hellenäs (1986) wurde die Methode für das in dieser Arbeit verwendete Probenmaterial leicht modifiziert. Zu 100 µg  $\alpha$ -Solanin-Standard in 300 µl einer Mischung aus 10% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-99% EtOH (1:1, v/v) wurden 3 ml frisch zubereitetes Clarke's Reagenz (50 mg *para*-Formaldehyd in 100 ml 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) zugesetzt. Nach Durchmischung wurde genau 60 min bei RT inkubiert. Nach dieser Zeit war eine stahlblaue Färbung zu erkennen, deren Absorption bei 595 nm gegen das Lösungsmittel gemessen werden konnte. Da die GA-Konzentration der später verwendeten Verarbeitungserzeugnisse niedriger ist und zur einfacheren Handhabung in 2 ml Eppendorfgefäßen gearbeitet werden sollte, wurde der Ansatz um den Faktor 2 verkleinert, so dass nach Zusatz von 300 µl der 10% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-99% EtOH-Mischung (1:1, v/v) nur noch 1,5 ml Clarke-Reagenz zugesetzt wurden.

Ein Vergleich der Absorptionswerte von  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin erbrachte keine Unterschiede. Auch die Anwendung auf ein Gemisch aus beiden Alkaloiden, lieferte identische Ergebnisse. Einzig bei Verwendung des Aglykons ergaben sich doppelt so hohe Werte, was sich aus dessen etwa halb so hoher Molekülmasse erklärt. Es ist somit unerheblich, welche Art von GA oder ob ein Gemisch aus beiden vorliegt.

### 4.5.2 Kalibrierung

Zur Quantifizierung der GAe in den Proben wurde eine Kalibriergerade im Bereich 25 bis 250 µg  $\alpha$ -Solanin aufgestellt. Aus der  $\alpha$ -Solanin-Stammlösung [1 mg/ml] wurde jeweils ein Aliquot entnommen, in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und das Lösungsmittel unter einem leichtem Stickstoffstrom entfernt, so dass die Kalibrierkonzentrationen 25, 50, 75, 100, 150, 200 und 250 µg  $\alpha$ -Solanin enthalten waren. In Abbildung 4.6 ist die ermittelte

Kalibriergerade dargestellt, die sich aus den Absorptionenwerten einer Dreifachbestimmung ergab. Auf Grund des zu vernachlässigenden Massenunterschiedes beider GAe kann das Ergebnis auf  $\alpha$ -Chaconin bzw. die Mischung beider Alkaloide übertragen werden.



**Abb. 4.6** Kalibriergerade des kolorimetrischen Assays für  $\alpha$ -Solanin im Arbeitsbereich 25 bis 250  $\mu\text{g}$  Gesamt-GAe mit Angabe der Gleichung der Regressionsgeraden und des Bestimmtheitsmaßes.

Die Wiederholung verschiedener Konzentrationen zeigte gute Messpräzision. Als Variationskoeffizienten  $v_k$  für 48  $\mu\text{g}$ , 120  $\mu\text{g}$  und 336  $\mu\text{g}$  ergaben sich 6,5; 3,3 bzw. 1,2%. Die Bestimmungsgrenze des Testes lag bei 20  $\mu\text{g}$  pro Ansatz mit  $v_k = 12,0\%$ .

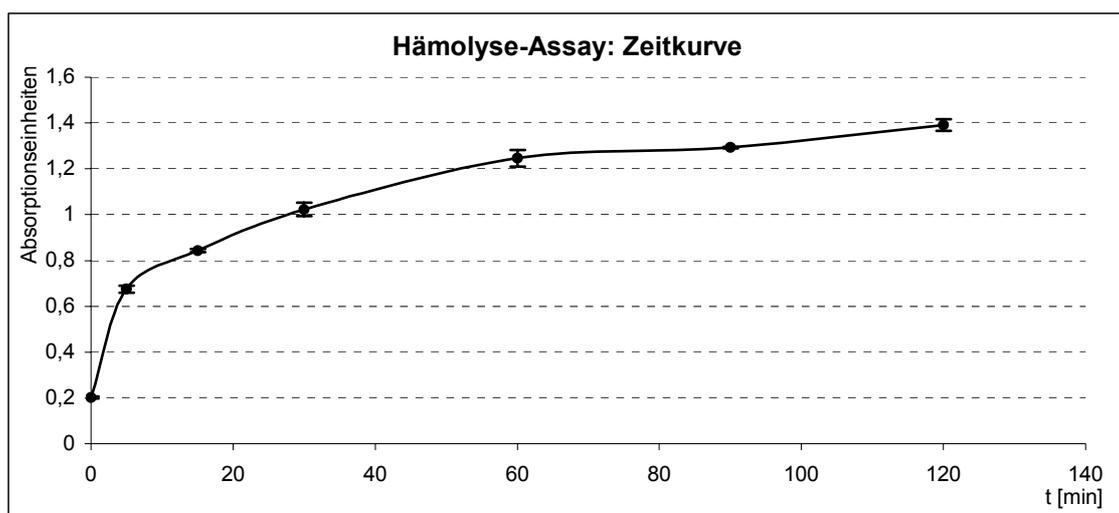
## 4.6 Hämolyse-Assay

### 4.6.1 Methodenentwicklung

Hintergrund des Hämolyse-Assays ist das Komplexierungsvermögen der GAe. Dabei treten sie in Wechselwirkung mit Membransterolen, lösen sie aus dem Membranverbund heraus und führen so zur Zerstörung des Bilayers. Diese Aktivität zeigen die GAe u. a. mit Cholesterol, das in die Erythrozytenmembran eingelagert ist. Nach Membranlyse entweicht Hämoglobin aus den Erythrozyten und kann nach zentrifugieren photometrisch im Überstand bestimmt werden. Die Konzentration der GAe ist dabei proportional zur Anzahl der zerstörten Blutzellen und damit zur Rotfärbung durch Hämoglobin.

Als Ausgangspunkt für die Methodenentwicklung dienten die Untersuchungen von Abe et al. (1978), Oda et al. (2000), Santos et al. (1997), Takechi et al. (1991), Takechi & Tanaka (1995) sowie Woldemichael & Wink (2001), die die lysierende Wirkung von Steroidsaponinen auf Erythrozyten untersuchten sowie die GA-Studien von Keukens et al.

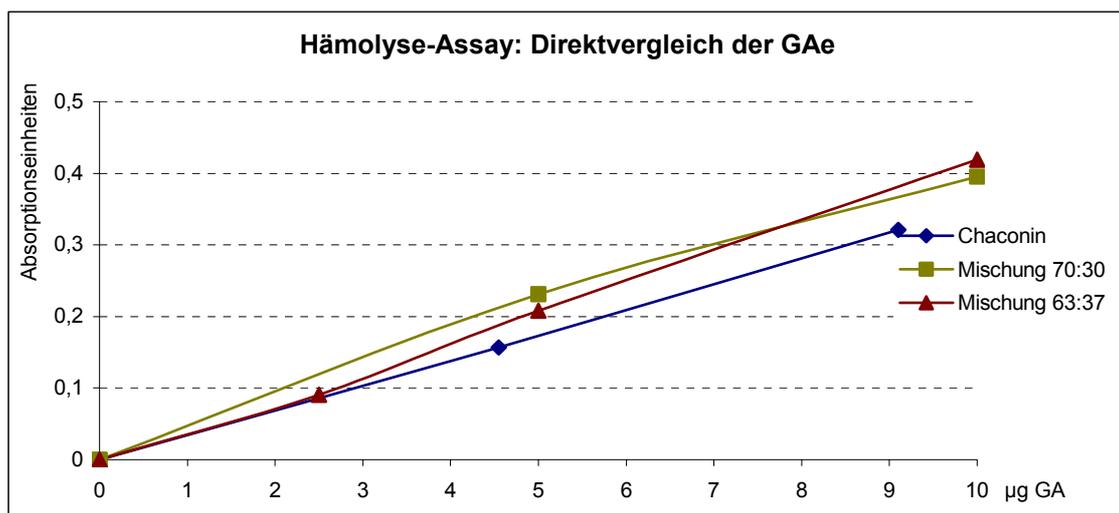
(1996) und Roddick et al. (1988, 2001). Auf Grund ihrer saponinähnlichen Struktur und den entsprechenden Eigenschaften, zeigen auch GAe diese hämolysierende Wirkweise. Bekannt war die stärkere Wirksamkeit von  $\alpha$ -Chaconin gegenüber  $\alpha$ -Solanin, weshalb während der Entwicklung des Assays nur  $\alpha$ -Chaconin als Testsubstanz verwendet wurde. Zu Beginn wurden 20 und 50  $\mu\text{g}$   $\alpha$ -Chaconin-Standard in 1 ml isotonischem Krebs-Ringer-Puffer (pH 7,4) gelöst. Nach Zusatz von 250  $\mu\text{l}$  Schafsblut mit Alseverzusatz und kurzem Durchmischen mit Hilfe des Vortex, wurde 60 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Bei der Durchmischung ist auf eine kurze Zeitdauer zu achten, da die wirkenden Scherkräfte bereits hier zu einer Zerstörung der Erythrozyten führen können. Nach dem Inkubieren wurde sofort 10 min bei 2000 Upm und 10 °C zentrifugiert, um intakte und zerstörten Erythrozyten zu entfernen. Beide Ansätze zeigten eine deutliche Rotfärbung mit einer etwa doppelt so hohen Intensität der 50  $\mu\text{g}$  Probe, was auf eine konzentrationsabhängige Farbbildung schließen ließ. Zur Ermittlung der Inkubationszeit wurde eine Hämolyse-Zeitkurve aufgenommen. Sechs Testlösungen mit je 10  $\mu\text{g}$   $\alpha$ -Chaconin wurden nach obigem Schema angesetzt und 0, 5, 15, 30, 60 und 120 min lang bei 37°C inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren der Erythrozyten wurde die Absorption in den einzelnen Proben in Relation zur Inkubationszeit gesetzt, wodurch sich die Zeitkurve in Abbildung 4.7 ergab. Deutlich ist die sehr rasch verlaufende Hämolyse zu erkennen. Zum Zeitpunkt 0, d. h. ohne Inkubation, war bereits eine partielle Hämolyse eingetreten. Das Ausmaß stieg bis zum Zeitpunkt 30 min noch steil an und näherte sich dann asymptotisch einem Grenzwert. Da die Steigung der Kurve ab der 30. Minute nur noch gering ausfiel wurde eine Inkubationszeit von 30 min als ausreichend betrachtet.



**Abb. 4.7** Zeitverlauf der Hämolysewirkung von  $\alpha$ -Chaconin bei 37°C auf Schafsblut-Erythrozyten.

In dieser Eigenschaft ähneln die GAe den Steroidsaponinen, die im Gegensatz zu Triterpenoid-Saponinen ebenfalls zu einer schnellen Hämolyse führen. Vermutet wird eine sehr viel höhere Affinität des Steroidanteils zum Cholesterol der Erythrozytenmembran (Takechi et al. 1991, Takechi & Tanaka 1995).

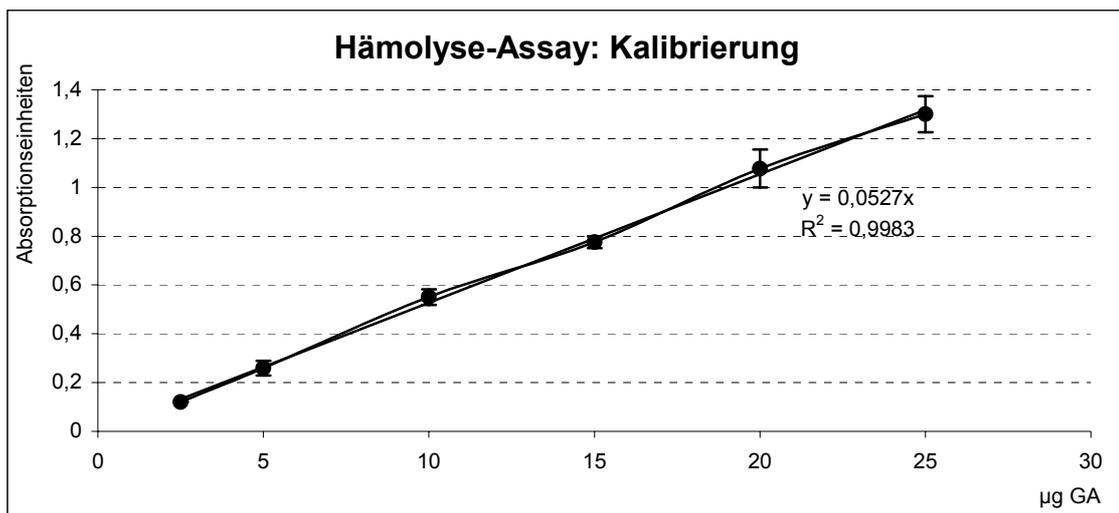
Im letzten Schritt musste noch die Wirksamkeit der Einzelalkaloide und ihrer Mischungen auf die Hämolyse-Aktivität untersucht werden. Wie vielfach in früheren Studien erwähnt, reagierte  $\alpha$ -Chaconin grundsätzlich aktiver auf sterolhaltige Membranen als  $\alpha$ -Solanin (Roddick et al. 1988, Rayburn et al. 1994), bei Vorliegen beider Alkaloide wurde von einer synergistischen Wirkungsweise berichtet (Roddick et al. 1990, 2001). Der Effekt der Einzelalkaloide und ihrer Mischungen auf das Ausmaß der Hämolyse wurde durch Vergleich der gemessenen Absorptionen bei Einsatz gleicher Mengen  $\alpha$ -Chaconin,  $\alpha$ -Solanin, einem Gemisch im Verhältnis 70:30 (w/w, entspricht 2,3) und einer Mischung 63:37 (w/w, entspricht 1,7) untersucht. Die Mischungsverhältnisse richteten sich dabei nach der natürlicherweise in Knollen vorkommenden Zusammensetzung von durchschnittlich 0,8 bis 2,6 (Friedman 2006). Das Ergebnis ist in Abbildung 4.8 zu sehen. Wie vermutet, zeigten die Alkaloid-Mischungen eine höhere Wirksamkeit auf Erythrozyten, als die Einzelalkaloide. Auf die Darstellung der Testreihe mit  $\alpha$ -Solanin wurde verzichtet, da dieses im dargestellten Konzentrationsbereich keine Hämolyse zeigte. Ein direkter Vergleich der GA-Mischung 70:30 und 63:37 ließ auf keine unterschiedliche Aktivität schließen.



**Abb. 4.8** Direkter Vergleich der Hämolysewirkung von reinem  $\alpha$ -Chaconin und den GA-Mischungen  $\alpha$ -Solanin: $\alpha$ -Chaconin im Verhältnis 70:30 und 63:37 (w/w).

## 4.6.2 Kalibrierung

Zur Quantifizierung der GAe in den Proben wurde eine Kalibriergerade im Bereich 0 bis 25  $\mu\text{g}$  GA aufgestellt. Durch die synergistische Interaktion von  $\alpha$ -Chaconin und  $\alpha$ -Solanin erfolgte die Kalibrierung mit einer Mischung aus  $\alpha$ -Chaconin :  $\alpha$ -Solanin im Verhältnis 70:30 (w/w). Hierzu wurde zunächst eine Hämolyse-Stammlösung [1 mg/ml] hergestellt, indem 700  $\mu\text{l}$  der  $\alpha$ -Chaconin-Stammlösung mit 300  $\mu\text{l}$  der  $\alpha$ -Solanin-Stammlösung vermischt wurden. Aus dieser Hämolyse-Stammlösung wurde jeweils ein Aliquot in 2 ml Eppendorfgefäße überführt, das Lösungsmittel abgedampft und in 1 ml Krebs-Ringer-Puffer aufgenommen. Die folgende Bearbeitung erfolgte gemäß den Angaben aus Kapitel III, Abschnitt 3.5.4. Die resultierende Kalibrierkurve in Abbildung 4.9 war das Ergebnis einer Dreifachbestimmung für jedes Konzentrationsniveau. Sie zeigte Linearität im Bereich 2,5 bis 25  $\mu\text{g}$  Gesamt-GAe.



**Abb. 4.9** Kalibriergerade des Hämolyse-Assays für  $\alpha$ -Chaconin- $\alpha$ -Solanin (70:30, w/w) im Arbeitsbereich 0 bis 25  $\mu\text{g}$  mit Angabe der Gleichung der Regressionsgeraden und des Bestimmtheitsmaßes.

Die Messpräzision des Hämolyse-Assays war für die Standard-Konzentrationen 5, 10, 15, 20 und 25  $\mu\text{g}$  Gesamt-GA mit  $v_k$  zwischen 3,0 und 12,4% gut. Die Konzentration 2,5  $\mu\text{g}$  bildete die Bestimmungsgrenze,  $v_k$  ergab hier einen Wert von 24,9%.

## 4.7 Gaschromatographie

Vorraussetzung für die gaschromatographische Analyse ist die Hydrolyse der GAe zum Aglykon Solanidin, da nur dieses unzersetzt verdampfbar ist. Durch die Kohlenhydratketten besitzen die GAe eine zu hohe Polarität, die durch Derivatisierungsreaktionen, wie Permethylierung oder Trimethylsylierung zwar erniedrigt werden kann, doch rechnet sich dieser Aufwand nicht für die Routineanalyse.

### 4.7.1 Hydrolyse

Bei der Hydrolyse werden die glykosidischen Bindungen zwischen den Kohlenhydraten aufgespalten. Basierend auf den Untersuchungen von BeMiller (1967) und Capon (1969) handelt es sich beim säurekatalysierten Hydrolyse-Mechanismus um eine schnelle Protonierung des glykosidischen Sauerstoffs, was zu einem Carbonium-Ion führt. Dieses ist sehr reaktionsfähig und führt schließlich zur Spaltung der glykosidischen Bindung. Die konventionelle Hydrolyse hängt vorwiegend von der Konzentration der Mineralsäure, der Temperatur, dem verwendeten Lösungsmittel und der Hydrolysezeit ab.

Erste Vorversuche zur Hydrolysestabilität von  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin ergaben eine höhere Beständigkeit von  $\alpha$ -Solanin, weshalb dieses als Testsubstanz in einer Konzentration von 0,5 ng/ $\mu$ l für die Methodenentwicklung verwendet wurde. Zur Detektion der Spaltprodukte diente auf Grund ihrer einfachen Handhabung zunächst die Dünnschichtchromatographie. Die verwendete DC-Methode ist aus Kapitel III, Abschnitt 3.5.7 ersichtlich.

Nach Friedman (2006) erhöht sich die Hydrolyserate mit zunehmender Säurekonzentration und Temperatur, sie verringert sich, je höher der Wasseranteil im Hydrolysemedium ist. Die Verwendung von HCl gegenüber H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ist vorzuziehen, da es im allgemeinen zu einem reineren Reaktionsprodukt führt (King 1980).

In den Vorversuchen wurden zunächst folgende Parameter variiert, wobei jedes Hydrolysemedium jeweils den verschiedenen Temperaturen und Zeiten ausgesetzt wurde:

- Hydrolysemedium: Säurekonzentration und Lösungsmittel  
0,1; 0,2; 0,5 und 1 N HCl sowie dieselben Konzentrationen in MeOH, in MeOH-A. bidest (1:1, v/v) und in MeOH-A. bidest. (3:1, v/v)
- Hydrolysetemperatur: 65, 80 und 100 °C
- Hydrolysezeit: 1; 2,5, 5, 8 und 16 h

Wie bereits aus Literaturdaten bekannt war (Friedman 2006, Friedman & McDonald 1995b, King 1980, Nicolich et al. 2005, Niolic & Stankovic 2003, Weissenberg 2001), lassen sich die

GAE in Alkohol-Wassermischungen wesentlich besser hydrolysieren, als in rein wässrigem Milieu. Die Wirkung des Alkohols basiert vermutlich auf der Kontrolle der Hydrolyse-Rate über die Diffusion von Protonen aus der Salzsäure zum glykosidischen Sauerstoffatom. Da die Protonierung des Sauerstoffs für die Spaltung notwendig ist, ist dieser Schritt entscheidend. Auf Grund ihrer amphiphilen Natur bevorzugt der Kohlenhydratanteil die Lösung in hydrophilen Lösungsmitteln, während das Aglykon organische Lösungsmittel vorzieht. Durch sein optimales Gleichgewicht zwischen hydrophilem und hydrophoben Charakter, ermöglicht MeOH eine effizientere Hydrolyse, da MeOH die Protonenkonzentration in der Zwischenschicht erhöht, die die GAE umgibt. (Friedman & McDonald 1995b).

Die aus den Vorversuchen gewonnenen Ergebnisse bestätigten diese Beobachtung. In rein wässriger Lösung wie auch in reinem MeOH war nach 5 h in allen HCl-Konzentrationen noch  $\alpha$ -Solanin enthalten, während sowohl die 0,5 und 1 N-Konzentration der 1:1 und 3:1-Mischung keinen  $\alpha$ -Solanin-Spot mehr anzeigten. Die größte Ausbeute an den Zwischenprodukten  $\beta$ - und  $\gamma$ -Solanin wurde mit 1N HCl in MeOH-A. bidest. (1:1) erhalten. Als Hydrolysezeit waren mindestens 5 h notwendig, um  $\alpha$ -Solanin vollständig zu hydrolysieren. Die Spaltung von  $\beta$ -Solanin zum  $\gamma$ -Produkt verlief schnell, während die Abspaltung des letzten Zuckermoleküls wiederum recht lange dauerte. Nach 8 h war  $\alpha$ - und  $\beta$ -Solanin in beiden Alkohol-Wasser-Mischungen mit der Konzentration 0,5 und 1 N HCl vollständig hydrolysiert. Ein Spot für  $\gamma$ -Solanin war immer noch vorhanden, der erst bei Hydrolyse über Nacht verschwunden war.

Als Hydrolysetemperatur lieferte 80 °C die besten Resultate. Eine Temperatur von 65 °C war zu gering und zog lange Hydrolysezeiten nach sich. 100 °C bewirkte bereits eine starke Braunfärbung der Lösung, was vermutlich auf Karamelisierungsreaktionen der entstandenen Zucker zurückzuführen ist, die durch das saure Medium unterstützt werden (Belitz & Grosch 1985).

Zusammenfassend ließen sich folgende Hydrolysebedingungen aus den vorangegangenen Untersuchungen ableiten:

- Medium: 1 N HCl in MeOH-A. bidest. (1:1, v/v)
- Temperatur: 80 °C
- Dauer: 16 h

Problematisch war ein unter den gewählten Bedingungen entstandenes Nebenprodukt, das sich nach GC-MS-Untersuchungen als Solanthren herausstellte. Gleiches Nebenprodukte stellten bereits King (1980), Nicolic & Stankovic (2003), Osman & Sinden (1977) und Van

Gelder (1984) in ihren Untersuchungen fest. Es unterscheidet sich von Solanidin durch die Einführung einer weiteren Doppelbindung zwischen C-3 und C-4 in den Ring A des Solanidins (vgl. Kapitel V, Abschnitt 5.5.4.2, Abb. 5.39).

Da weder die Zugabe von Natriumbisulfit, noch die Variation der Hydrolysebedingungen zu einer vollständige Unterdrückung der Solanthren-Bildung führte, wurden die Flächen beider Substanzen zur späteren Quantifizierung addiert.

### 4.7.2 Interner Standard

An einen geeigneten internen Standard werden folgende Anforderungen gestellt:

- er darf kein Inhaltsstoff der untersuchten Probe sein
- er sollte eine verwandte chemische Natur besitzen, um bei den gegebenen Bedingungen ähnlich wie die Analyten zu reagieren
- er darf sich im GLC-Chromatogramm nicht mit den Analyten überlagern

Weder das von Van Gelder et al. (1988b) verwendete 5 $\alpha$ -Cholestan, noch Cholesterol oder das von Lawson et al. (1992) favorisierte Tomatidin erfüllten die letzte Bedingung, da sie sich mit Solanidin überlagerten. Als geeigneter interner Standard erwies sich Gelsemin. Mit Sicherheit kommt es nicht in *Solanum*-Arten vor, es besitzt als Alkaloid einen dem Solanidin entsprechenden Charakter und hatte mit 21,8 min eine ähnliche Retentionszeit ohne sich zu überlagern.

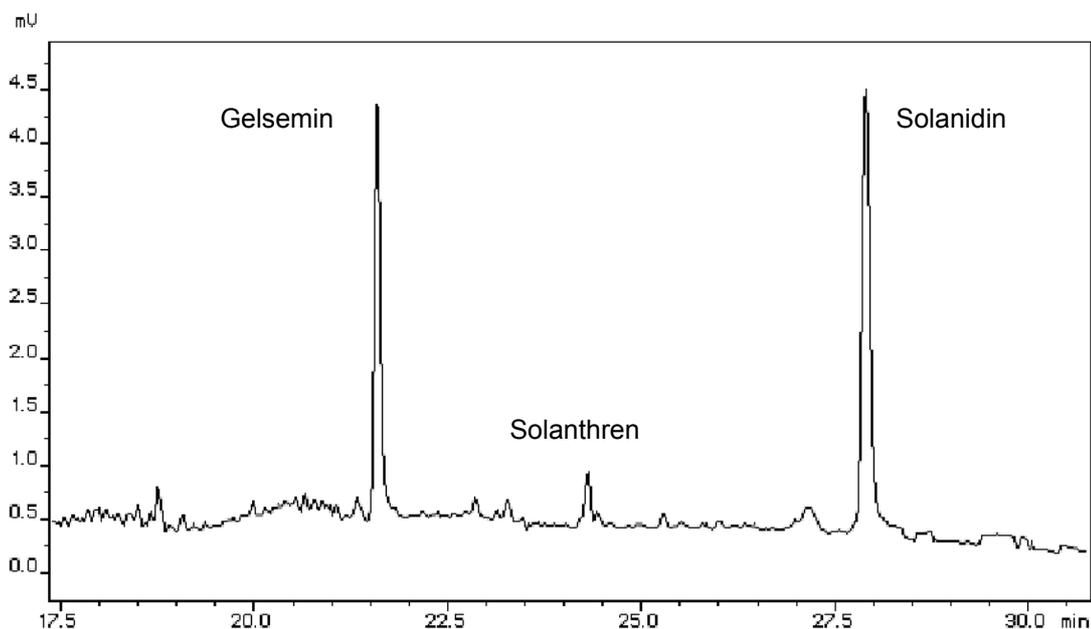
### 4.7.3 Isolierung des Solanidins durch Flüssig-Flüssig-Extraktion

Das nach der Hydrolyse entstandene Solanidin musste mit einem organischen Lösungsmittel, das sich nicht mit dem Hydrolysemedium vermischt, isoliert werden. Die Verwendung von Dichlormethan, Chloroform, Diethylether und Hexan ergab nach einmaligem Ausschütteln die höchsten Ausbeuten für Chloroform (83%), gefolgt von Dichlormethan (57%). Diethylether und Hexan erwiesen sich als ungeeignet. Dies bestätigte die Ergebnisse von Van Gelder et al. (1989), Nicolic & Stankovic (2003) und Nicolic et al. (2005). Letztgenannte konnten mit Chloroform praktisch 100% des Solanidins extrahieren. Das noch verbliebene Solanidin konnte in einem zweiten Extraktionsschritt vollständig isoliert werden. Die Extraktionsausbeute des Gelsemins war zunächst dürftig, konnte aber durch Alkalisieren der Lösung auf pH 10 mit NH<sub>4</sub>OH vor der Isolation optimiert werden.

#### 4.7.4 Gaschromatographische Methode

Die gaschromatographische Methode wurde ausgehend von den GC-Parametern bei Herb et al. (1975) und Nicolice et al. (2005) entwickelt. Als Säulenmaterial erwies sich das im Labor des IPMB standardmäßig verwendete OV-1-Material von Ohio Valley (30 m x 0,25 mm i. D., 0,25 µm Filmdicke) als geeignet. Carriergas war Helium 4.6 mit einer linearen Geschwindigkeit von 1 ml/min. Durch den unpolaren Charakter des Solanidins konnte die Temperaturführung des Säulenofens bei hoher Temperatur (150 °C) begonnen werden. Mit einer linearen Erhöhung um 8 °C/min bis 300 °C gelang die Trennung des Substanzgemisches aus Solanidin, Solanthren und dem Internen Standard Gelsemin. Nach weiteren 10 min isothermer Temperatur bei 300 °C wurden die Substanzen schließlich von der Säule eluiert. Die genauen Parameter der gaschromatographischen Trennung sind aus Kapitel III, Abschnitt 3.5.5 zu entnehmen.

Abbildung 4.10 zeigt das Chromatogramm eines  $\alpha$ -Solanin-Standards, der durch das entwickelte Verfahren zunächst hydrolysiert und anschließend gaschromatographisch vermessen wurde. Als Retentionszeiten ergaben sich für den internen Standard Gelsemin 21,8 min und die beiden aus  $\alpha$ -Solanin entstandenen Hydrolyseprodukte Solanthren 23,6 min und Solanidin 28,6 min.



**Abb. 4.10** GC-Chromatogramm nach Hydrolyse von  $\alpha$ -Solanin in MeOH-A. bidest (1:1, v/v), 80 °C, 16 h mit internem Standard Gelsemin.  
 $R_t$  Gelsemin: 21,8 min,  $R_t$  Solanthren: 23,6 min,  $R_t$  Solanidin: 28,6 min.

Die Quantifizierung des Solanidins erfolgte anhand des Internen Standards und der Berechnung des relativen Response-Faktors (vgl. Kapitel V, Abschnitt 5.5.4.1). Vorteil ist,

dass Schwankungen des Injektionsvolumens zu keiner Verfälschung des Analyseergebnisses führen. Als Bestimmungsgrenze des Solanidins ergab sich eine Konzentration von 15 ng/ $\mu$ l. Auf die Angabe der Messpräzision wird durch die unvermeidbare Variation des Injektionsvolumens verzichtet.

#### 4.7.5 Extraktion der GAe aus Probenmaterial

Voraussetzung für die Extraktion der GAe aus dem Probenmaterial war ein Lösungsmittel, das einerseits leicht sauer reagiert, um die Alkaloide in ihre Salzform zu überführen. Andererseits war ein Lösungsmittelanteil von mindestens 30% nötig, um eine Stärkequellung zu vermeiden, da ansonsten ein Großteil der Säure für die Stärkespaltung verloren geht. Beide Bedingungen konnte das Hydrolysemedium erfüllen, so dass versucht wurde, dieses direkt als Auszugsmittel zu verwenden. Eine Gegenüberstellung der Ausbeute mit 1%iger Essigsäure ergab übereinstimmende Gehalte, so dass als Extraktionsmittel fortan 1N HCl in MeOH-A. bidest. (1:1, v/v) eingesetzt wurde.

Die Isolation des nach Hydrolyse der GAe entstandenen Solanidins in Chloroform erfolgt sehr selektiv, so dass auf eine SPE-Aufreinigung verzichtet werden konnte. Im nächsten Schritt wurde versucht, Hydrolyse und Isolation des Aglykon zeitlich zu verbinden, so dass das während der Hydrolyse entstandene Solanidin direkt in Chloroform extrahiert wird. Vorteil wäre eine weitere Zeitersparnis durch Verbindung zweier Verfahrensschritte, sowie der Schutz des Aglykons vor der Nebenreaktion zum Solanthren, da das Solanidin dem wässrigen Milieu direkt entzogen wird (Nicolic & Stankovic 2003). Unerwarteterweise verringerte sich allerdings die Solanidin-Ausbeute deutlich. Scheinbar verhinderte der Chloroform-Zusatz eine optimale Hydrolyse. Möglicherweise könnte eine ständige Durchmischung der Lösung wie bei Nicolic & Stankovic (2003) sowie Nicolic et al. (2005) zu einer Verbesserung führen. Durch den höheren apparativen Aufwand wurde auf weitere Versuche verzichtet.

#### 4.7.6 Ermittlung der Wiederfindungsrate

Zur Überprüfung der Hydrolyse- und Extraktionseffizienz wurde die *WFR* bestimmt. Als Testsubstanzen dienten die Verarbeitungsprodukte F2, F3 und W2, die mit variierenden Mengen Solanidin-Standard aufgestockt wurden. Die Wahl fiel bewusst auf komplexe Proben, um den Einfluss der Probenmatrix bei der Hydrolyse abzuschätzen zu können. Die Berechnung der Wiederfindung erfolgte nach der bekannten Gleichung aus Abschnitt 4.3.6 Punkt 2. Tabelle 4.7 zeigt die berechneten *WFR*. Mit einer mittleren *WFR* von  $85 \pm 9,1\%$  lag

sie im akzeptablen Bereich, da bei Pflanzenmaterial immer mit natürlichen Schwankungen zu rechnen ist.

**Tab. 4.6** Wiederfindungsrate des Solanidins für die GC-Analyse.

	<b>GA-Zusatz [µg/Ansatz]<sup>1</sup></b>	<b>Wiederfindung [%] Solanidin</b>
F2	30	77
	80	86
F4	10	104
	50	90
W2	5	75
	10	89
	25	70
	50	78
	55	90

<sup>1</sup> GA-Zusatz zum Probenextrakt

## 4.8 Automatisierung der GA-Analyse über XLC-MS

Die Entwicklung eines automatisierten und schnellen Analyseverfahrens, das sich für den Einsatz in der Routineanalytik eignet, erfolgte in Zusammenarbeit mit der Firma Spark Holland, Emmen, Niederlande. Die im System Symbiosis<sup>TM</sup> integrierte XLC-MS-Technik bietet durch die Zusammenführung von SPE-Aufreinigung, chromatographischer Trennung und massenspektrometrischer Detektion die Möglichkeit, Probenaufgabe, Probenaufreinigung und LC-Trennung parallel zu bearbeiten, wodurch die Aufarbeitungszeit auf null reduziert und daher ein hoher Probendurchsatz und eine hohe Effizienz garantiert wird. Abbildung 4.11 zeigt eine schematische Übersicht über das von Spark Holland vertriebene System Symbiosis<sup>TM</sup>.

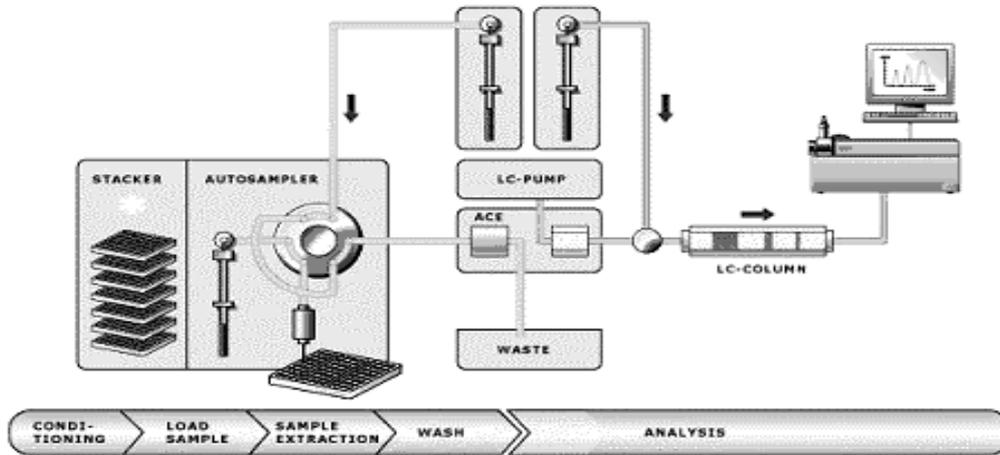


Abb. 4.11 Schematische Übersicht über das verwendete System Symbiosis™ (Spark Holland, Emmen, Niederlande).

### 4.8.1 GA-Extraktion

Die Methodenentwicklung erfolgte zunächst mit Kartoffelproben, so dass zur Extraktion der Alkaloide, wie unter Kapitel III, Abschnitt 3.4.2, Variante B beschrieben, 1% Essigsäure verwendet wurde.

### 4.8.2 GA-Aufreinigung

Der Methodenentwicklungsprozess ist schematisch in Abbildung 4.12 dargestellt. Ausgehend von einem Standardverfahren zur Aufreinigung hydrophober Substanzen, wurden die folgenden Parameter zur Aufreinigung und massenspektrometrischen Detektion der GAe optimiert. Im Entwicklungsprozess wurde zunächst ein Standardgemisch aus  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin [jeweils 500 ng/ml] verwendet.

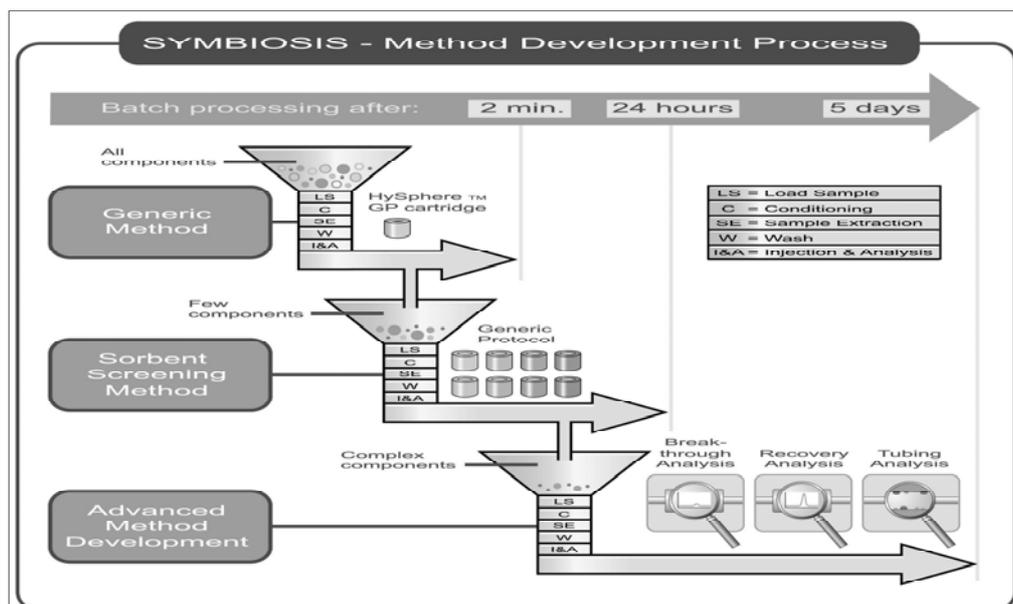


Abb. 4.12 Übersicht über den Methodenentwicklungsprozess mit dem System Symbiosis™ (Spark Holland, Emmen, Niederlande).

Während des Methodenentwicklungsprozesses wurde jeweils eine Arbeitsanweisung erstellt für:

### **1. die Autosamplerkonfiguration:**

Wichtige Parameter sind das benötigte Probenvolumen und ein Reinigungsprotokoll für die Probenschleife. Mit einem Injektionsvolumen von 50 µl konnte sowohl für das GA-Gemisch während der Methodenentwicklung, als auch bei den späteren Probenextrakten eine für die Detektion ausreichende Alkaloidmenge in das System injiziert werden.

Zur Reinigung der Probenschleife wurde ein Standardprotokoll, bestehend aus 700 µl ACN-0,1% Ameisensäure (1:1, v/v), gefolgt von 700 µl ACN-0,1% Ameisensäure (9:1, v/v) verwendet.

### **2. die SPE-Bedingungen:**

Folgende Schlüsselparameter waren zur Aufstellung einer Arbeitsanweisung festzulegen:

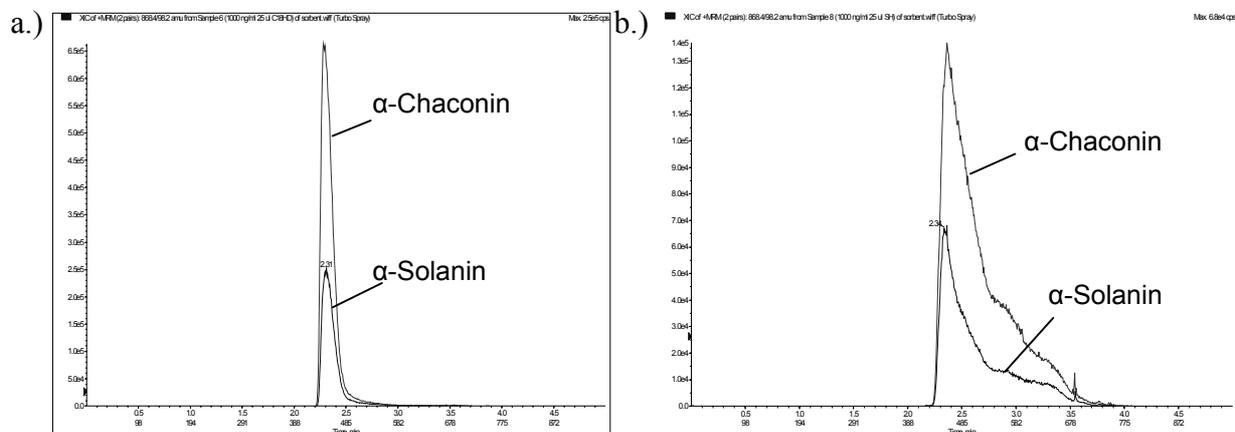
#### **Sorbent-Screening:**

Zunächst musste ein geeignetes Sorbens gefunden werden, um die GAe quantitativ aus der Lösung zu adsorbieren und wieder vollständig zu eluieren. Kenngrößen, die hierzu Aufschluss geben sind die Wiederfindung sowie die Peakform des Analyten bzw. dessen Breite und Asymmetriefaktor (Patsias et al. 2000). Die Wiederfindung zeigt die Retardierungsfähigkeit des Sorbens, die Peakform verdeutlicht, wie gut sich die Analyten wieder vom Sorbens eluieren lassen.

Durch Injektion von 50 µl GA-Standardgemisch auf acht verschiedene Sorbentien (CN, C-2, C-8, C-8ec, C-18ec, C-18HD, Resin GP, Resin SH) und Vergleich der Wiederfindungsraten (Tab 4.7) erwiesen sich C-18HD und Resin GP als geeignet. Auf Grund der besseren Peakform mit geringerer Peakbreite wurde die C-18HD-Kartusche für die weitere Arbeit ausgewählt. Abbildung 4.13 zeigt die Gegenüberstellung des gewählten C-18HD- mit ungeeignetem Resin SH-Material.

**Tab. 4.7** Wiederfindung von  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin [jeweils 500 ng/ml] bei Verwendung acht verschiedener Sorbentien in der XLC-MS-Analyse.

Sorbens	WFR $\alpha$ -Solanin [%]	WFR $\alpha$ -Chaconin [%]
CN	85	93
C-2	59	80
C-8	130	120
C-8ec	144	123
C.18	149	106
C-18HD	124	99
Resin GP	115	96
Resin SH	3	40

**Abb. 4.13** Gegenüberstellung der XLC-MS-Chromatogramme für  $m/z$  868 und 852 unter Verwendung von: a.) C-18HD bzw. b.) Resin SH als Sorbent.**Konditionierung des Sorbens:**

Zur Benetzung des Sorbens wurde 1 ml ACN verwendet, gefolgt von 1 ml 5% ACN in 1%  $\text{NH}_4\text{OH}$  zur Konditionierung.

**Probenbeladung:**

Es wurde das unter Punkt 1. verwendete Probenvolumen von 50  $\mu\text{l}$  injiziert.

**Zusammensetzung der Waschlösung:**

Hier galt es, die Zusammensetzung so zu optimieren, dass Störsubstanzen vollständig von der Kartusche entfernt werden, die Analyten jedoch auf dem Sorbens retardiert bleiben. Der Anteil des organischen Lösungsmittels wurde hierzu in 10%-Schritten erhöht, bis die GAe begannen, sich vom Sorbens zu lösen. Eine Konzentration von 20% ACN konnte toleriert werden, bevor GA-Elution kam.

**Flussrate während des Waschvorgangs:**

Entscheidende Einflussgrößen zur Bestimmung der Flussrate waren das Waschvolumen und die Waschzeit. Beide Parameter wurden so gewählt, dass Störsubstanzen vom Sorbens entfernt werden, ohne Zeit durch unnötiges Spülen zu vergeuden. Mit 2 min und einem Volumen von 4 ml, was letztlich einer Flussrate von 2 ml/min entsprach, konnten alle Interferenzen auf der Kartusche beseitigt werden. Ein höherer Organikanteil und eine längere Waschzeit resultierten in einem partiellen Verlust der Analyten.

**Elutionszeit:**

Ein Feintuning der Elutionszeit war wichtig, um die GAe vollständig von der Kartusche zu entfernen, ohne störende Matrixbestandteile, die sehr unpolar sind und sich noch auf dem Sorbens befinden ebenfalls abzulösen. Um den XLC-Prozess ökonomisch zu gestalten ist die Verwendung des LC-Gradienten zur Elution sinnvoll. Eine Elutionszeit von 5 min mit steigendem MeOH-Anteil von 10 auf 90% war zweckmäßig.

**Durchbruch:**

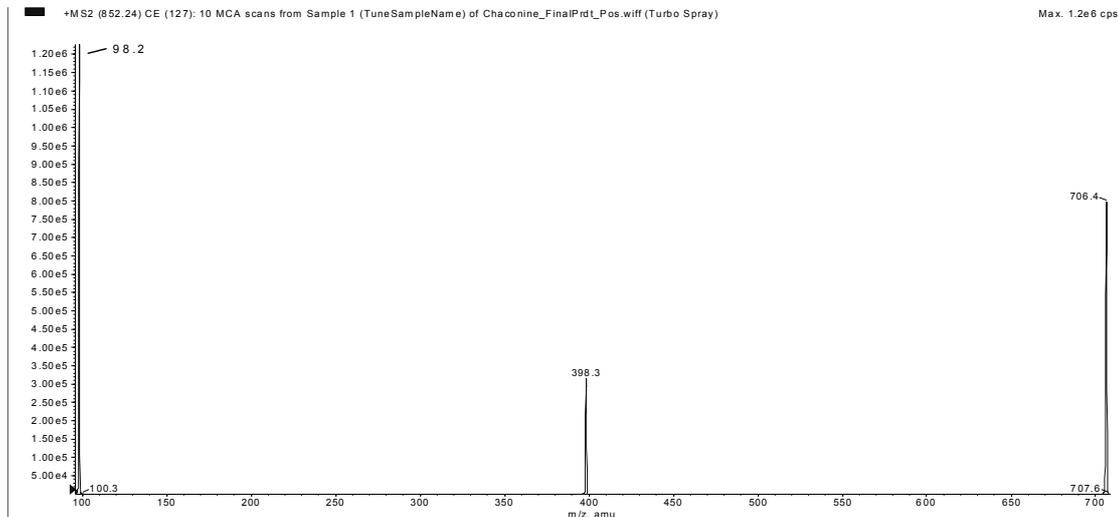
Die Prüfung auf Durchbruch ist für die Abschätzung der Maximalbeladung wichtig. Das Durchbruchsvolumen stellt das maximale Volumen dar, das mit einer theoretischen Wiederfindungsrate von 100% aufgegeben werden kann. Wird dieses Volumen überschritten, so bricht der Analyt am Säulenende durch und es kommt zu Analytverlusten, die wiederum eine Verfälschung des Analysenergebnisses bewirken. Die Konzentration in den späteren Proben ist so zu wählen, dass es zu keinem Durchbruch kommt (Unger 1989). Die Injektion einer GA-Standardlösung mit 1 µg/ml zeigte einen Durchbruch von 0,5%, was im tolerierbaren Bereich lag. Somit konnten die späteren Extrakte eine Konzentration von bis zu 1 µg/ml besitzen, ohne dass Analytverluste auf Grund von Durchbruch zu befürchten wären.

### 4.8.3 MS-Parameter

Die Parameter des Massenspektrometers wurden so eingestellt, dass höchste Empfindlichkeit für die  $m/z$ -Werte 868 für  $\alpha$ -Solanin und 852 für  $\alpha$ -Chaconin gewährleistet war. Dies resultierte in den in Kapitel III, Abschnitt 3.5.6 beschriebenen Kenngrößen.

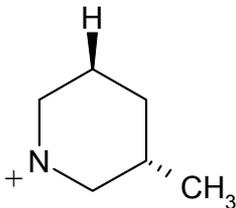
Spezifität und hohe Identifizierungssicherheit der Analyten konnte durch Fragmentierung der GAe und die Detektion im MRM-Modus sichergestellt werden. Für  $\alpha$ -Solanin zeigte das Molekülion  $[M+H]^+$  bei  $m/z$  868,3, für  $\alpha$ -Chaconin bei  $m/z$  852,4 maximale Intensität. Nach Fragmentierung in der Kollisionszelle trat bei beiden Alkaloiden ein Fragment bei  $m/z$  98,2 in Erscheinung (vgl. Tochterionenscan in Abb. 4.14), das charakteristisch für diese

Substanzklasse ist und daher als Identifikationsion verwendet wurde. Die Quantifizierung erfolgte über die jeweiligen Molekülonen bei  $m/z$  868,3 und  $m/z$  852,4.



**Abb. 4.14** Tochterionenscan der XLC-MS-Methode für  $\alpha$ -Chaconin ( $m/z$  852,4).

Um welches Bruchstück es sich beim  $m/z$ -Verhältnis 98,2 genau handelt kann nur spekuliert werden. Bei dem aus EI-Spektren bekannten Schlüsselfragment  $m/z$  150 handelt es sich um den Indolizidin-Ring (vgl. Kapitel VI, Abschnitt 6.5.4.2, Abb. 6.1). Somit könnte dieser in der Kollisionszelle weiter zerfallen sein und die Strukturformel aus Abbildung 4.15 besitzen.



**Abb. 4.15** Vorgeschlagene Strukturformel des Schlüsselfragments  $m/z$  98,2 der Tochterionenanalyse der XLC-MS-Methode.

#### 4.8.4 LC-Parameter

Um einen möglichst hohen Probendurchsatz zu erreichen, werden für XLC-Systeme oft kurze Säulen (20-50 mm) mit niedriger Auflösung gewählt. Systeme, die mit diesen Säulen arbeiten, können sehr schnell betrieben werden und eine Gesamtanalysenzeit von 5 min und weniger ist zu erreichen (Allanson et al. 1996). In dieser Arbeit wurde eine 50 mm Xterra MS-C18-Säule von Waters eingesetzt. Eine fehlende oder ungenügende Auflösung der Analyten auf dieser Säule bereitete keine Probleme, da eine massenspektrometrische Detektion folgte. Durch Verwendung des selektiven MRM-Modus wurden Massenspuren für  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin festgelegt (vgl. 4.8.4), so dass eine vollständige Trennung der Analyten zur Quantifizierung nicht nötig war. Die Hauptfunktion des LC-Gradienten war

somit nicht die Auftrennung der Substanzen, sondern deren Elution von der SPE-Kartusche. Daher wurde die mobile Phase dahingehend optimiert, höchste Wiederfindung in der kürzester Zeit zu erlangen. Der resultierende LC-Gradient stieg innerhalb von 2 min von 10 auf 90% 0,1% Ameisensäures MeOH, gefolgt von 1 min isokratischer Arbeitsweise mit der selben Mischung. Anschließend wurden innerhalb von 0,5 min wieder die Initialbedingungen mit 10% 0,1% Ameisensäures MeOH, hergestellt. Die genauen LC-Bedingungen können aus Kapitel III, Abschnitt 3.5.6 entnommen werden. Die Retentionszeiten lagen bei 2,6 min für  $\alpha$ -Solanin und 2,7 min für  $\alpha$ -Chaconin bei einer Gesamtlänge von 5 min pro XLC-MS-Analyse.

### 4.8.5 Validierung des XLC-MS-Verfahrens

Zur Validierung des automatisierten XLC-MS-Verfahrens wurden die bereits unter Abschnitt 4.3.6 beschriebenen Parameter überprüft. Auf die Überprüfung auf Robustheit wurde wieder verzichtet.

#### 1. Präzision (Precision)

*Meßpräzision:*

Der Variationskoeffizient  $v_k$  lag nach vierfacher Injektion eines  $\alpha$ -Solanin-Standards [50 ng/ml] mit 1,2% im tolerierbaren Bereich.

*Methodenpräzision:*

Die Schwankung innerhalb der Methode wurde durch jeweils vierfache Analyse der Karoffelproduktproben B1, C2, F3, P2 und R1 überprüft. Tabelle 4.8 zeigt die ermittelten Werte für  $v_k$ . In allen Fällen konnte die Bedingung  $v_k \leq 15\%$  erfüllt werden. Somit wurde sowohl Mess- als auch Methodenpräzision nachgewiesen.

**Tab. 4.8** Variationskoeffizienten zur Ermittlung der Mess- und Methodenpräzision für das XLC-MS-Verfahren.

Testprodukt	$v_k$ $\alpha$ -Solanin [%]	$v_k$ $\alpha$ -Chaconin [%]
Standardlösung [50 ng/ml]	3,34	2,50
B1	5,36	3,37
C1	6,02	5,36
F3	5,36	6,02
P2	6,52	15,39
R1	5,27	5,50

## 2. Richtigkeit (Accuracy of the mean)

Die Richtigkeit wurde wie unter Abschnitt 4.3.6 Punkt 2 mit Hilfe der Wiederfindungsrate bestimmt. Als Testsubstanz kam wiederum alkaloidarme Kartoffelstärke zur Anwendung, die mit unterschiedlichen GA-Mengen aufgestockt wurde. Durch die hohe Empfindlichkeit der XLC-MS-Methode erfolgte der Standardzusatz als Lösung direkt zum Kartoffelstärke-Extrakt. Tabelle 4.9 zeigt die ermittelten *WFR*. Die Berechnung erfolgte nach der unter Abschnitt 4.3.6 Punkt 2 beschriebenen Formel.

Für  $\alpha$ -Solanin wurde eine mittlere Wiederfindung von  $84,1 \pm 9,3\%$ , für  $\alpha$ -Chaconin  $87,2 \pm 6,0\%$  ermittelt. Die *WFR* bewegen sich zwar im unteren Erwartungsbereich, lassen sich durch die natürlichen Schwankungen innerhalb des Materials jedoch begründen (unveränderte Kartoffelstärke  $\alpha$ -Solanin  $53,35 \pm 8,27$  ng/ml,  $\alpha$ -Chaconin  $75,85 \pm 9,55$  ng/ml). Die geringe Wiederfindung bei höchstem Standardzusatz ist vermutlich auf die Überladung der Kartusche zurückzuführen.

**Tab. 4.9** Wiederfindungsraten [%] der XLC-MS-Methode für  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin.

	GA-Zusatz [ng/ml] <sup>1</sup>		Wiederfindung <sup>2</sup> [%]	
	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin
Kartoffel-	104	94	83	88
stärke	416	376	94	93
	1560	1410	75	81

<sup>1</sup> GA-Zusatz zum Kartoffelstärkeextrakt

<sup>2</sup> Mittelwert einer Doppelbestimmung für jedes Gehaltsniveau und jede Komponente

## 3. Nachweis- und Bestimmungsgrenze

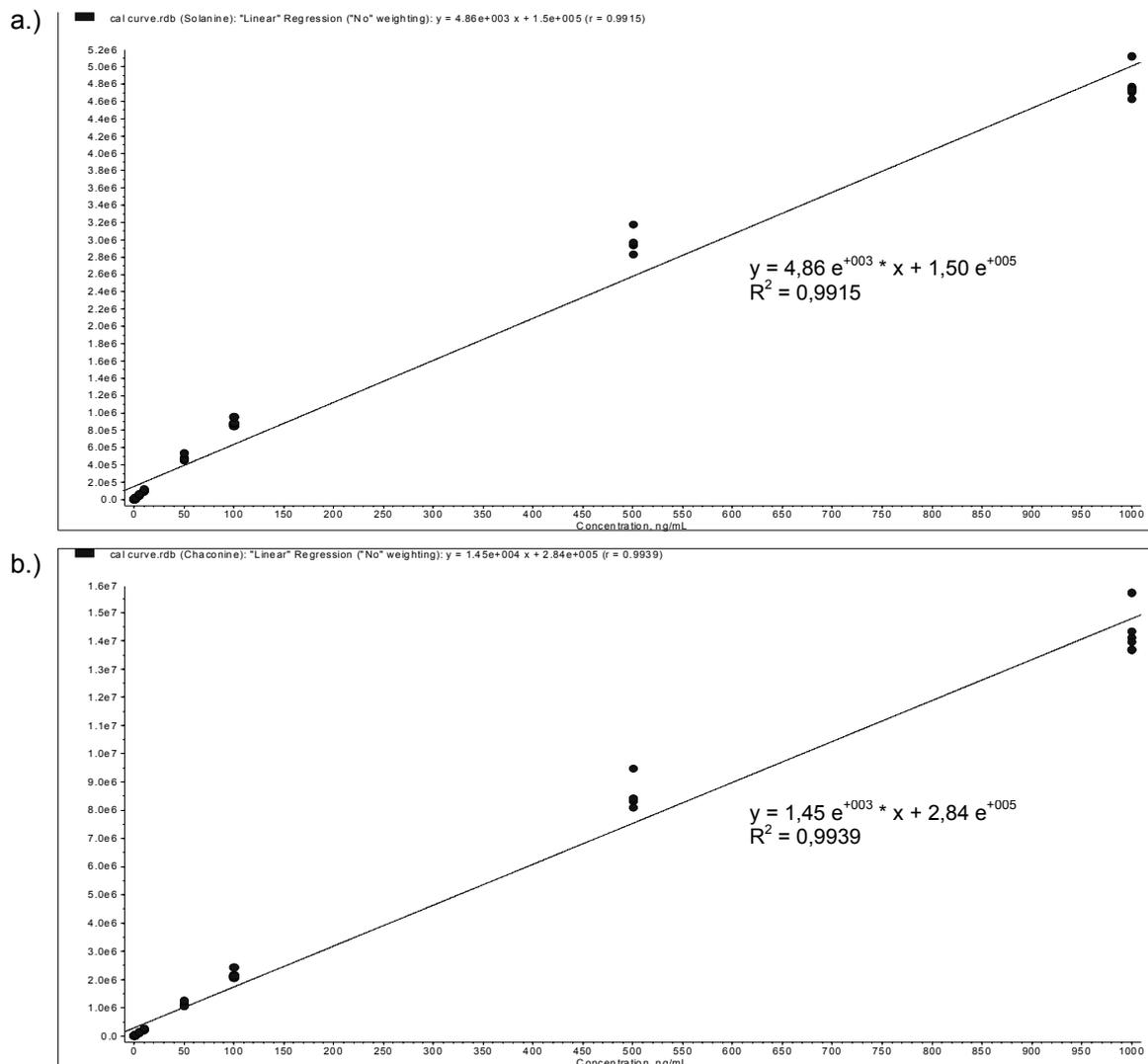
Sowohl die Nachweis- als auch die Bestimmungsgrenze wurden aus der Kalibriergeraden durch das Softwaresystem Analyst 1.4.1 berechnet. Als Nachweisgrenze ergab sich eine Konzentration von 0,3 ng/ml für  $\alpha$ -Chaconin bzw. 0,5 ng/ml für  $\alpha$ -Solanin. Die Bestimmungsgrenze lag bei 1,0 bzw. 1,5 ng/ml.

## 4. Spezifität

Die Spezifität konnte wiederum aus der Richtigkeit abgeleitet werden, die unter Punkt 2 bewiesen wurde. Durch die Verwendung des selektiven MRM-Modus mit dem Identifikationsion bei  $m/z$  98 und den Molekülionen bei  $m/z$  868,4 und 852,3 wurde hohe Spezifität garantiert. Die chromatographische Trennung, gefolgt von einer massenspektrometrischen Detektion im MRM-Modus mit zwei  $m/z$ -Werten für jede Substanz ist ausreichend, um die Identität einer Substanz sicher zu bestätigen (Bacaloni et al. 2005).

## 5. Linearität und Arbeitsbereich

Die Quantifizierung der GAe erfolgte durch die Injektion externer Standards und der Aufstellung einer Fünf-Punkt-Kalibriergeraden. Hierzu wurde aus den  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin-Stammlösungen [1 mg/ml] zunächst eine GA-Stammlösung [1000 ng/ml] hergestellt, aus der jeweils ein Aliquot entnommen und mit MeOH zu den Kalibrierkonzentrationen [1, 5, 10, 100, 500, 1000 ng/ml] verdünnt wurde. Die aufgestellten Kalibriergeraden zeigten für  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin im kalibrierten Arbeitsbereich von 1 bis 1000 ng/ml eine lineare Abhängigkeit, wie die Abbildungen 4.16a und b zeigen.



**Abb. 4.16** Kalibriergeraden des XLC-MS-Verfahrens für a.)  $\alpha$ -Solanin und b.)  $\alpha$ -Chaconin im Arbeitsbereich 1 bis 1000 ng/ml.

# KAPITEL V

## ERGEBNISSE DER GA-ANALYSEN

### 5.1 Kommerzielle Kartoffelsorten

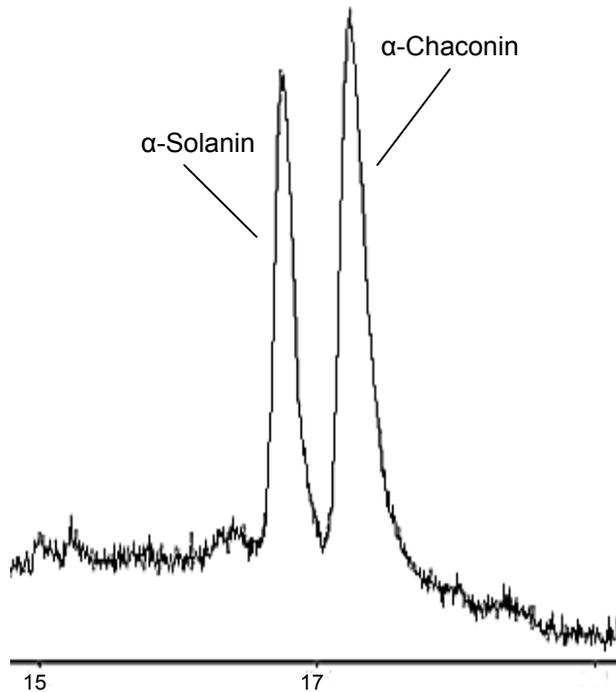
#### 5.1.1 Methodenanpassung

Die in Kapitel III, Abschnitt 3.1.1 aufgelisteten Kartoffelsorten wurden auf ihren GA-Gehalt in der Gesamtknolle sowie in Schale und Fleisch analysiert. Es wurde zunächst ein Protokoll für die benötigte Einwaage, Kartuschenbeladung und das Aufnahmevolumen nach Trocknung aufgestellt, das in Tabelle 5.1 dargestellt ist. Die vermerkten Mengen des trockenen, homogenisierten Probenmaterials wurden in 50 ml Polypropylen-Tubes eingewogen und nach dem unter Kapitel III, Abschnitt 3.4.2, Variante A beschriebenen Verfahren zweimal mit 1% Essigsäure extrahiert. Nach Aufreinigung eines Aliquots (vgl. Abschnitt 3.4.3) und Trocknung durch Vakuumzentrifugation wurde der Rückstand in MeOH aufgenommen, wovon 20  $\mu$ l per HPLC auf seinen GA-Gehalt untersucht wurden.

**Tab. 5.1** Übersicht über Einwaage [g], Kartuschenbeladung [ml] und MeOH-Aufnahmevermögen [ml] für die Analyse kommerzieller Kartoffelsorten mittels HPLC.

Probe	EW	SPE-Beladung	Aufnahmevermögen
Gesamtknolle	3,0	6	250
Schale	0,5	5	300
Fleisch	4,0	10	200

Als Sekundärstoffe in den kommerziell erworbenen Kartoffelsorten waren ausschließlich  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin nachweisbar. Abbildung 5.1 zeigt als Beispiel das HPLC-Chromatogramm der Sorte Sieglinde-4. Die Alkaloide wurden durch Vergleich ihrer Retentionszeit mit denen der Standardsubstanzen identifiziert. Als Retentionszeiten ergaben sich für  $\alpha$ -Solanin 16,8 min, für das unpolare  $\alpha$ -Chaconin 17,3 min.



**Abb. 5.1**  
HPLC-Chromatogramm des methanolischen Extraktes der Frühkartoffelsorte Sieglinde-4.  $R_t$   $\alpha$ -Solanin 16,8 min,  $R_t$   $\alpha$ -Chaconin 17,3 min. (Chromatographische Bedingungen siehe Kapitel III, Abschnitt 3.5.1).

## 5.1.2 GA-Gehalt kommerzieller Kartoffelsorten

Die im Handel erworbenen Kartoffelsorten unterschieden sich einerseits in ihrem Erntezeitpunkt (Frühkartoffeln und Herbsterte) wie auch im verwendeten Anbauverfahren (konventioneller und ökologischer Anbau). Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt daher getrennt als Frühkartoffeln-konventionell (Tab. 5.2), Frühkartoffeln-ökologisch (Tab. 5.3), Herbsterte-konventionell (Tab. 5.6) und Herbsterte-ökologisch (Tab. 5.7). Die Tabellen geben die Gehalte in den analysierten Geweben in mg/100 g TG wieder, wobei für jede Sorte mindestens drei verschiedenen Knollen jeweils als Doppelbestimmung untersucht und daraus der Mittelwert und seine Standardabweichung berechnet wurde. In der rechten Spalte ist der Gesamt-GA-Gehalt [mg/100 g] berechnet auf das Frischgewicht dargestellt. Die Abbildungen 5.1 und 5.2 am Ende des Abschnitts zeigen einen Überblick über die ermittelten GA-Gehalte in den Gesamtknollen der analysierten Sorten.

### 5.1.2.1 Frühkartoffeln

Die folgende Tabelle 5.2 zeigt zunächst die ermittelten  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin-Konzentrationen in Frühkartoffeln aus konventionellem Anbau, in Tabelle 5.3 sind die Ergebnisse aus biologischem Anbau zu sehen. In allen Geweben der analysierten Sorten konnten GAe nachgewiesen werden, deren Gehalte sich in der Gesamtknolle (14,71 bis 39,44 mg Gesamt-GA/100 g TG), Kartoffelfleisch (2,82 bis 16,05 mg Gesamt-GA/100 g TG) und Schale (54,59 bis 254,12 mg Gesamt-GA/100 g TG) z. T. erheblich unterschieden.

Vorherrschende Sorte zu Beginn der Frühkartoffelsaison im April war Nicola, die auf Grund des Klimas ausschließlich aus Mittelmeerländern bezogen werden konnte. Die in den Gesamtknollen enthaltenen Mengen an  $\alpha$ -Solanin,  $\alpha$ -Chaconin und der Gesamt-GA-Gehalt bewegten sich in dieser Sorte in einem engen Rahmen mit durchschnittlich 20 mg Gesamt-GA/100 g TG. In Fleisch und Schalengewebe war die Variation etwas höher, lag aber innerhalb der natürlichen Schwankungsbreite. Ein ähnliches Ergebnis zeigten auch die später, ab Juni, aus deutschem Anbau erworbenen Proben, die vorwiegend den Sorten Berber oder Sieglinde angehörten. Im Durchschnitt lag der Gesamt-Alkaloidgehalt hier mit 30 mg/100 g TG in der Gesamtknolle zwar auf einem etwas höheren Niveau, war aber innerhalb der jeweiligen Sorte konstant. Für die verbleibenden Sorten Annabelle und Bamberger Hörnchen konnte jeweils nur eine Probe analysiert werden, deren Gehalte sich im genannten Rahmen bewegten.

Als Untersuchungsmaterial ökologisch erzeugter Frühkartoffeln standen die Sorten Atica, Ditta, Rosara und Valor zur Verfügung, die auf Grund des begrenzten Angebots nur als Einzelproben untersucht werden konnten. Insgesamt betrachtet lag der Gesamt-GA-Gehalt (vgl. Tab. 5.3) trotz des hohen Wertes von 40,41 mg/100 g TG in Atica wie zuvor im Bereich von 20 bis 30 mg Gesamt-GA/100 g TG. Die Sorte Ditta enthielt mit 13,03 mg/100 g TG die niedrigste Alkaloidmenge. Auch die Konzentrationen in Fleisch (1,13 bis 4,20 mg Gesamt-GA/100 g TG) und Schale (54,28 bis 209,83 mg Gesamt-GA/100 g TG) zeigten keine Besonderheit.

**Tab. 5.2** Übersicht über die in konventionell erzeugten Frühkartoffeln ermittelten GA-Gehalte [mg/100 g TG] in Fleisch, Schale und Gesamtknolle.

	Fleisch			Schale			Knolle			
	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-GA	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-GA	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-GA TG	Gesamt-GA FG <sup>1</sup>
	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$
<b>Ana1</b>	0,59 ± 0,03	1,07 ± 0,02	1,66 ± 0,05	33,31 ± 1,22	111,57 ± 13,61	144,88 ± 14,83	6,21 ± 3,11	17,88 ± 6,94	24,09 ± 10,05	4,50 ± 1,74
<b>Bam1</b>	2,21 ± 1,23	2,59 ± 1,32	4,80 ± 2,55	22,61 ± 6,55	63,20 ± 5,58	85,81 ± 12,13	9,11 ± 1,85	22,68 ± 6,51	31,79 ± 8,36	7,87 ± 2,00
<b>Ber1</b>	2,12 ± 2,06	3,22 ± 1,79	5,34 ± 3,85	17,50 ± 1,90	37,09 ± 4,43	54,59 ± 6,33	7,54 ± 4,04	14,99 ± 4,59	22,53 ± 8,63	5,57 ± 2,95
<b>Ber2</b>	2,23 ± 1,35	3,58 ± 1,31	5,70 ± 2,66	49,12 ± 7,12	117,70 ± 13,74	166,82 ± 20,86	11,51 ± 6,46	26,03 ± 10,19	37,54 ± 7,22	7,79 ± 3,12
<b>Ber3</b>	3,95 ± 1,57	6,05 ± 2,35	10,00 ± 3,92	54,79 ± 12,21	107,22 ± 22,98	166,82 ± 35,19	14,26 ± 13,43	25,18 ± 18,82	39,44 ± 32,25	7,28 ± 5,38
<b>Ber4</b>	5,83 ± 3,55	10,22 ± 5,16	16,05 ± 8,71	30,49 ± 14,26	98,12 ± 46,42	128,61 ± 60,68	10,75 ± 5,67	25,45 ± 8,96	36,20 ± 14,63	7,60 ± 1,42
<b>Ber5</b>	1,85 ± 1,94	2,93 ± 2,58	4,78 ± 4,52	26,93 ± 6,70	86,70 ± 31,76	113,63 ± 38,76	10,42 ± 3,08	28,79 ± 16,35	39,21 ± 19,43	9,73 ± 1,00
<b>Nic1</b>	0,35 ± 0,02	0,70 ± 0,04	1,05 ± 0,06	42,56 ± 1,77	105,58 ± 13,49	148,14 ± 15,26	6,05 ± 0,69	14,95 ± 2,95	21,00 ± 3,64	4,48 ± 1,34
<b>Nic2</b>	1,88 ± 0,95	2,93 ± 1,18	4,81 ± 2,13	37,57 ± 6,92	94,61 ± 23,92	132,18 ± 30,84	6,86 ± 1,53	15,42 ± 4,28	22,28 ± 5,81	4,21 ± 1,19
<b>Nic3</b>	1,18 ± 0,42	2,18 ± 0,31	3,36 ± 0,73	23,90 ± 9,64	62,74 ± 20,33	86,64 ± 29,97	8,98 ± 1,74	15,54 ± 3,82	24,52 ± 5,56	4,85 ± 0,57
<b>Nic4</b>	3,69 ± 2,02	5,19 ± 1,96	8,88 ± 3,98	33,30 ± 4,51	88,93 ± 8,27	122,23 ± 12,78	9,56 ± 1,54	13,80 ± 3,77	23,36 ± 5,31	4,62 ± 1,75
<b>Nic5</b>	2,71 ± 1,21	3,88 ± 1,60	6,59 ± 2,81	19,91 ± 0,99	55,86 ± 4,41	75,87 ± 5,40	7,01 ± 0,70	14,54 ± 2,98	21,55 ± 3,68	4,12 ± 0,62
<b>Nic6</b>	0,94 ± 0,39	1,88 ± 0,19	2,82 ± 0,58	32,63 ± 1,52	85,49 ± 7,22	118,12 ± 8,74	4,10 ± 1,08	10,61 ± 1,39	14,71 ± 2,47	2,83 ± 0,05
<b>Sieg1</b>	1,83 ± 0,88	2,21 ± 0,96	4,04 ± 1,84	53,54 ± 16,71	129,97 ± 38,22	183,51 ± 54,93	10,62 ± 2,30	22,64 ± 4,38	33,26 ± 6,68	7,11 ± 1,75
<b>Sieg2</b>	3,91 ± 0,49	4,53 ± 0,53	7,11 ± 1,11	77,84 ± 9,02	132,89 ± 9,20	210,73 ± 18,22	11,98 ± 1,32	20,59 ± 5,90	32,57 ± 7,22	6,74 ± 1,36
<b>Sieg3</b>	2,81 ± 1,08	3,66 ± 1,19	6,47 ± 2,27	83,63 ± 49,28	170,49 ± 99,02	254,12 ± 148,30	7,18 ± 4,58	15,09 ± 9,33	22,27 ± 13,91	2,40 ± 1,29

<sup>1</sup> auf das FG berechnet

**Tab. 5.3** Übersicht über die in ökologisch erzeugten Frühkartoffeln ermittelten GA-Gehalte [mg/100 g TG] in Fleisch, Schale und Gesamtknolle.

	Fleisch			Schale			Knolle			
	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-GA	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-GA	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-GA TG	Gesamt-GA FG <sup>1</sup>
	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$
<b>BAti1</b>	1,04 ± 0,47	3,16 ± 2,34	4,20 ± 2,81	17,17 ± 5,48	45,86 ± 19,63	63,03 ± 25,11	11,94 ± 8,00	28,47 ± 10,85	40,41 ± 18,85	8,10 ± 3,82
<b>BDit1</b>	0,38 ± 0,27	0,75 ± 0,09	1,13 ± 0,36	43,55 ± 24,13	45,68 ± 29,65	94,63 ± 63,12	5,68 ± 2,62	7,35 ± 3,95	13,03 ± 6,57	2,26 ± 1,09
<b>BRos1</b>	0,53 ± 0,59	1,22 ± 0,76	1,75 ± 1,35	55,68 ± 24,22	154,15 ± 65,58	209,83 ± 89,90	6,78 ± 1,97	22,85 ± 13,34	29,63 ± 15,31	5,78 ± 2,39
<b>BVal1</b>	1,72 ± 0,96	2,28 ± 0,79	4,00 ± 1,75	25,57 ± 12,06	28,71 ± 4,60	54,28 ± 16,66	8,34 ± 2,75	9,91 ± 4,08	18,25 ± 6,83	4,07 ± 1,16

<sup>1</sup> auf das FG berechnet

Über den prozentualen Anteile der Alkaloide in Schale und Fleisch der Frühkartoffelsorten gibt Tabelle 5.4 Auskunft. Sie zeigt den Gesamt-GA-Anteil im Schalengewebe. Zur Berechnung wurden die detektierten Alkaloidwerte [mg/g TG] mit der Trockenmasse [g] multipliziert und die erhaltene Gesamtalkaloidmenge in Fleisch und Schale in Relation gesetzt. Sehr deutlich ist der hohe GA-Anteil in der äußeren Randschicht der Knolle zu erkennen, wobei der prozentuale Anteil in konventionell wie in ökologisch erzeugten Kartoffeln sortenunabhängig stark variierte (insgesamt 55,6 bis 97,7%).

**Tab. 5.4** Prozentualer GA-Anteil [%] in der Schale der analysierten Frühkartoffeln, links aus konventionellem, rechts aus ökologischem Anbau.

Konventioneller Anbau		Ökologischer Anbau	
Sorte	Schale	Sorte	Schale
Ana1	95,6	BAtt1	79,8
Bam1	86,6	BDit1	95,2
Ber1	73,6	BRos1	95,8
Ber2	80,0	BVal1	70,6
Ber3	84,4		
Ber4	71,0		
Ber5	80,7		
Nic1	97,7		
Nic2	82,6		
Nic3	85,1		
Nic4	73,9		
Nic5	55,6		
Nic6	88,7		
Sieg1	86,6		
Sieg2	85,5		
Sieg3	88,4		

Tabelle 5.5 stellt die prozentuale Verteilung der Einzelalkaloide dar. Angegeben ist jeweils der Anteil des toxischeren  $\alpha$ -Chaconin am Gesamt-GA-Gehalt.

In konventionell erzeugten Kartoffeln ist deutlich der höhere  $\alpha$ -Chaconin-Anteile im Schalengewebe zu erkennen. Während Fleisch durchschnittlich 60% als  $\alpha$ -Chaconin enthielt, lag dessen Anteil in der Schale bei über 70%. In den Kartoffelknollen aus ökologischem Anbau war durch den geringen Probenumfang eine ähnliche Tendenz nicht festzustellen. Auffallend war der, im Vergleich zu den übrigen Sorten geringe  $\alpha$ -Chaconin-Anteil in Fleisch und Schale der Sorte Valor. Beide Gewebe enthielten  $\alpha$ -Chaconin nur zu knapp über 50%.

**Tab. 5.5** Prozentualer Anteil an  $\alpha$ -Chaconin [%] in Fleisch, Schale und Gesamtknolle der analysierten Frühkartoffeln, links aus konventionellem, rechts aus ökologischem Anbau.

Konventioneller Anbau				Ökologischer Anbau			
Sorte	Fleisch	Schale	Gesamtknolle	Sorte	Fleisch	Schale	Gesamtknolle
Ana1	64,5	77,0	74,2	BAtt1	75,3	72,8	70,5
Bam1	54,0	73,6	71,3	BDit1	66,0	55,7	56,4
Ber1	60,3	67,9	66,5	BRos1	69,9	73,5	77,1
Ber2	61,6	70,6	69,3	BVal1	55,9	52,9	54,3
Ber3	60,5	64,6	63,2				
Ber4	63,7	72,7	70,3				
Ber5	61,2	76,3	73,4				
Nic1	66,8	71,3	71,2				
Nic2	60,9	71,6	69,2				
Nic3	66,1	72,4	63,4				
Nic4	58,4	72,8	71,3				
Nic5	58,9	73,7	67,5				
Nic6	66,7	72,4	72,1				
Sieg1	54,7	70,8	68,1				
Sieg2	60,9	64,6	63,2				
Sieg3	56,7	67,3	67,8				

### 5.1.2.2 Herbstkartoffeln

Die Herbsternte brachte eine sehr viel größere Vielfalt verschiedener Kartoffelsorten, die auf ihre GA-Konzentration untersucht werden konnten. Die Ergebnisse der Gehaltsanalysen sind in Tabelle 5.6 für den konventionellen und Tabelle 5.7 für den ökologischen Anbau dargestellt.

**Tab. 5.6** Übersicht über die in konventionell erzeugten Herbstkartoffeln ermittelten GA-Gehalte [mg/100 g TG] in Fleisch, Schale und Gesamtknolle.

	Fleisch			Schale			Knolle			
	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-GA	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-GA	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-GA TG	Gesamt-GA FG
	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$
<b>Bam2</b>	2,20 ± 1,51	3,87 ± 2,25	6,07 ± 3,76	40,30 ± 17,89	80,63 ± 36,20	120,93 ± 54,09	8,03 ± 5,65	15,62 ± 9,96	23,65 ± 15,61	5,52 ± 3,08
<b>Bin1</b>	3,21 ± 2,53	5,01 ± 4,05	8,22 ± 6,58	61,32 ± 4,28	118,01 ± 27,13	179,33 ± 31,41	15,85 ± 8,23	28,50 ± 18,75	44,35 ± 26,98	12,63 ± 6,66
<b>Che1</b>	1,63 ± 0,28	3,85 ± 0,80	5,48 ± 1,08	44,44 ± 5,76	132,11 ± 17,85	176,55 ± 23,61	8,45 ± 0,67	22,75 ± 1,23	31,20 ± 1,90	6,80 ± 0,22
<b>Fra1</b>	1,22 ± 0,57	1,69 ± 0,75	2,91 ± 1,32	11,76 ± 5,11	47,93 ± 20,80	59,69 ± 25,91	3,92 ± 0,97	11,97 ± 1,91	15,89 ± 2,88	3,15 ± 0,61
<b>Nic7</b>	1,58 ± 0,60	2,78 ± 1,06	4,36 ± 2,17	41,65 ± 15,43	130,26 ± 30,89	171,91 ± 46,32	6,61 ± 1,70	15,04 ± 5,60	21,65 ± 7,30	3,81 ± 0,86
<b>LaR1</b>	1,59 ± 0,81	2,45 ± 1,36	4,04 ± 2,17	25,72 ± 37,33	68,30 ± 22,51	94,02 ± 59,84	11,56 ± 9,57	26,63 ± 15,04	38,19 ± 24,61	4,89 ± 0,96
<b>Qua1</b>	0,28 ± 0,21	0,67 ± 0,33	0,95 ± 0,54	19,29 ± 4,04	24,22 ± 8,14	43,51 ± 12,18	3,37 ± 1,81	4,35 ± 1,51	7,72 ± 3,32	1,73 ± 0,67
<b>Prim1</b>	3,38 ± 0,41	5,71 ± 2,12	9,09 ± 2,53	40,24 ± 6,25	79,20 ± 14,80	119,44 ± 21,05	6,69 ± 0,42	11,75 ± 1,80	18,44 ± 2,22	3,96 ± 0,39
<b>Rov1</b>	0,55 ± 0,34	1,88 ± 0,74	2,43 ± 1,08	19,01 ± 8,20	59,43 ± 19,31	78,44 ± 27,51	3,82 ± 0,87	9,16 ± 7,04	12,98 ± 7,91	3,87 ± 0,37
<b>Sieg2</b>	1,08 ± 0,33	2,02 ± 0,69	3,10 ± 1,02	94,96 ± 12,29	120,89 ± 60,62	215,86 ± 72,91	13,22 ± 4,65	23,52 ± 7,35	36,74 ± 12,00	7,00 ± 1,99
<b>Spu1</b>	0,25 ± 0,14	0,63 ± 0,21	0,88 ± 0,35	14,91 ± 5,44	47,61 ± 20,45	62,52 ± 25,89	3,59 ± 1,46	10,33 ± 3,27	13,92 ± 4,73	2,70 ± 0,74

**Tab. 5.7** Übersicht über die in ökologisch erzeugten Herbstkartoffeln ermittelten GA-Gehalte [mg/100 g TG] in Fleisch, Schale und Gesamtknolle.

	Fleisch			Schale			Knolle			
	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-GA	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-GA	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-GA TG	Gesamt-GA TG
	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$
<b>BAgr1</b>	0,36 ± 0,23	1,01 ± 0,58	1,37 ± 0,81	30,76 ± 17,27	80,33 ± 40,61	111,09 ± 57,88	2,65 ± 0,79	7,18 ± 1,89	9,83 ± 2,68	2,23 ± 0,55
<b>BAgr2</b>	0,82 ± 0,41	0,80 ± 0,44	1,62 ± 0,85	27,21 ± 6,59	45,27 ± 18,80	72,48 ± 25,39	3,83 ± 0,88	4,11 ± 4,70	7,94 ± 5,58	2,10 ± 1,05
<b>BAti2</b>	5,99 ± 2,84	8,18 ± 4,23	14,17 ± 7,07	61,74 ± 4,24	102,06 ± 22,19	163,80 ± 26,43	17,95 ± 10,75	28,03 ± 15,58	45,98 ± 26,33	8,96 ± 3,29
<b>BRos2</b>	3,45 ± 2,05	3,96 ± 1,89	7,14 ± 3,94	52,01 ± 7,38	106,88 ± 17,30	158,89 ± 24,68	14,46 ± 10,01	23,26 ± 15,07	37,72 ± 25,08	7,62 ± 3,29
<b>BRos3</b>	0,46 ± 0,15	1,24 ± 0,21	1,70 ± 0,36	21,01 ± 5,75	31,83 ± 5,86	52,84 ± 11,61	3,53 ± 0,85	5,34 ± 1,10	8,87 ± 1,95	1,99 ± 0,47
<b>BSe1</b>	0,82 ± 0,19	1,83 ± 0,52	2,65 ± 0,98	36,98 ± 5,74	113,00 ± 18,13	149,98 ± 23,87	7,41 ± 3,24	20,78 ± 7,16	28,19 ± 10,40	6,05 ± 2,52

Insgesamt betrachtet, waren die ermittelten GA-Mengen heterogener als in den Frühkartoffeln, was auf die Vielzahl verschiedener Sorten zurückzuführen ist. Die Gesamtalkaloidkonzentrationen in der Gesamtknolle variierte in einem breiten Bereich, wobei die Sorte Quarta mit 7,72 mg/100 g TG den niedrigsten, die Sorten Sieglinde, La Ratte und Binova mit 36,74 bzw. 38,19 und 44,35 mg/100 g TG die höchsten Gehalte aufwiesen. Eine ähnliche Variation zeichnete sich auch in Kartoffelfleisch (0,88 bis 9,09 mg/100 g TG) und Schale (43,51 bis zu 215,86 mg/100 g TG) ab.

Die Sortenauswahl ökologisch erzeugter Knollen ermöglichte ebenfalls eine umfangreichere Untersuchung, in der sich die Heterogenität der Gehalte bestätigte. Agria wies mit 7,94 mg/100 g TG einen der niedrigsten Gehalte überhaupt auf, in Atica wurde mit 45,98 mg/100 g TG die insgesamt höchste Konzentration detektiert. Die Variabilität spiegelte sich innerhalb der Sorten wieder. Während die Probe Rosara-3 8,87 mg Gesamt-GA/100 g TG in der Knolle aufwies, war der Gehalt in Rosara-2 fast fünf mal so hoch.

Über die prozentuale Verteilung der GAe innerhalb der Knolle gibt Tabelle 5.8 Auskunft. Die Berechnung des Alkaloid-Vorkommens in der Schale erfolgte wie zuvor unter Einbeziehen der zugehörigen Trockenmassen.

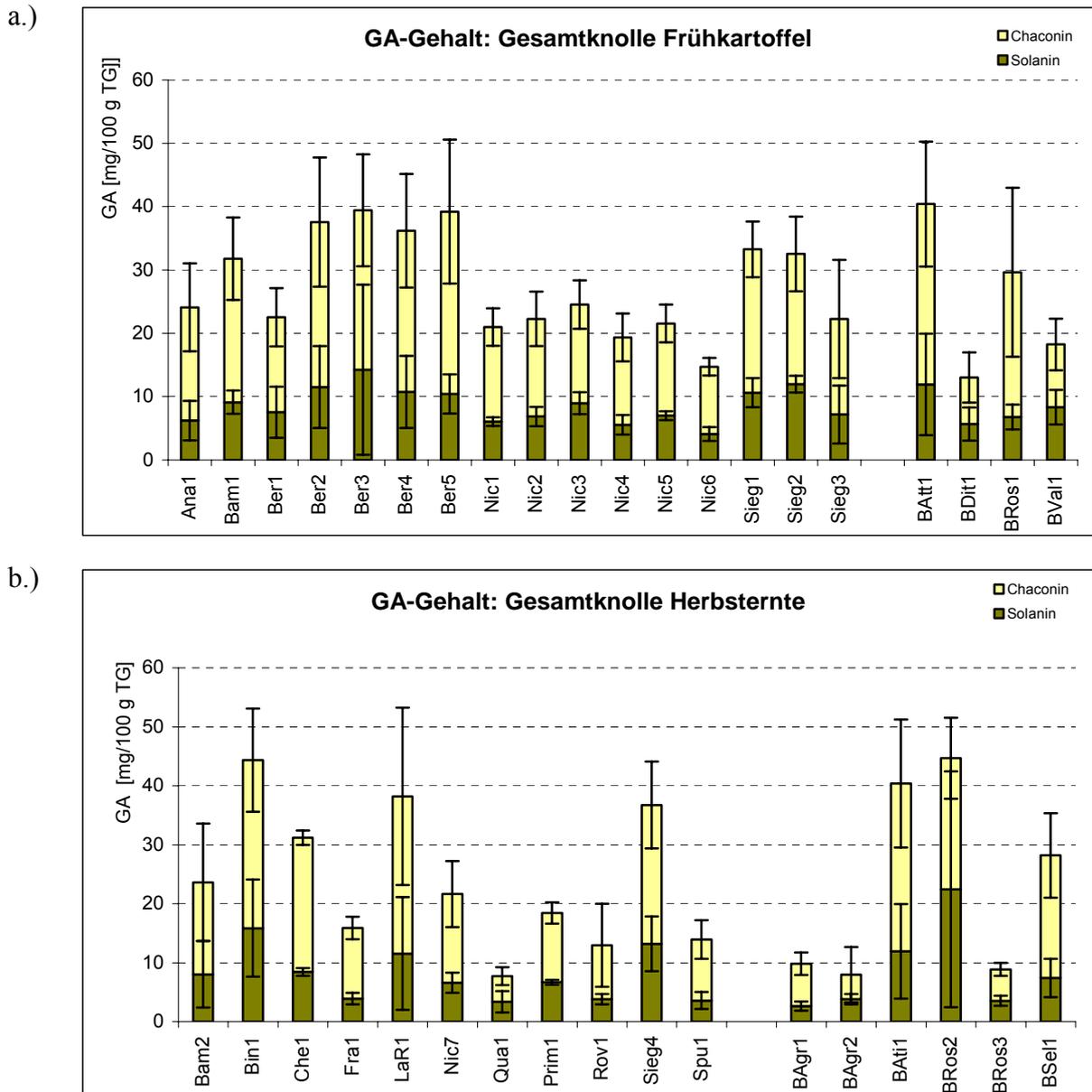
**Tab. 5.8** Prozentualer GA-Anteil [%] in der Schale der analysierten Herbstkartoffeln, links aus konventionellem, rechts aus ökologischem Anbau.

Konventioneller Anbau		Ökologischer Anbau	
Sorte	Schale	Sorte	Schale
Bam2	83,9	BAgr1	92,1
Bin1	88,5	BAgr2	87,5
Che1	83,5	BAti2	84,6
Franc1	82,8	BRos2	77,2
LaR1	88,9	BRos3	84,9
Nic7	85,6	BSel1	87,8
Qua1	86,2		
Prim1	75,1		
Ros1	87,3		
Sieg4	92,1		
Spu1	92,1		

Die Verteilung der Einzelalkaloide zeigt Tabelle 5.9. In konventionell erzeugten Sorten lag der Anteil des toxischeren  $\alpha$ -Chaconin im Fruchtfleisch durchschnittlich zwischen 60 und 70% des Gesamt-GA-Gehalts, im Schalenanteil dagegen nur bei knapp über 50 %. Demgegenüber wiesen ökologisch erzeugte Sorten mit mehr als 60% einen höheren Anteil  $\alpha$ -Chaconin in ihrer Schale auf, während im Fruchtfleisch etwas weniger  $\alpha$ -Chaconin als im konventionellen Anbau vorlag.

**Tab. 5.9** Prozentualer Anteil an  $\alpha$ -Chaconin [%] in Fleisch, Schale und Gesamtknolle der analysierten Herbstkartoffeln, links aus konventionellem, rechts aus ökologischem Anbau.

Konventioneller Anbau				Ökologischer Anbau			
Sorte	Fleisch	Schale	Gesamtknolle	Sorte	Fleisch	Schale	Gesamtknolle
Bam2	63,8	51,9	66,1	BAgr1	73,6	72,3	73,0
Bin1	60,9	51,3	64,3	Bagr2	49,5	62,5	51,9
Che1	70,2	51,3	72,9	BAti2	59,2	63,2	61,0
Franc1	58,1	52,9	75,4	BRos2	53,4	67,3	49,8
LaR1	62,1	52,2	69,7	BRos3	73,1	60,2	60,2
Nic7	63,8	51,2	69,5	BSe11	69,1	75,3	73,7
Qua1	70,6	56,4	56,3				
Prim1	62,8	62,5	63,7				
Ros1	77,4	53,1	70,6				
Sieg4	65,2	51,3	64,0				
Spu1	71,5	53,5	74,2				



**Abb. 5.2** Gegenüberstellung der GA-Gehalte [mg/100 g TG] in Knollen der:  
 a.) Frühkartoffeln aus links: konventionellem und rechts: ökologischen Anbau,  
 b.) Herbstkartoffeln aus links: konventionellem und rechts: ökologischen Anbau.

## **5.1.3 Weiterführende Untersuchungen zur Alkaloidverteilung in Kartoffelgewebe**

### **5.1.3.1 Vergleich der GA-Gehalte nach Licht- und Dunkellagerung**

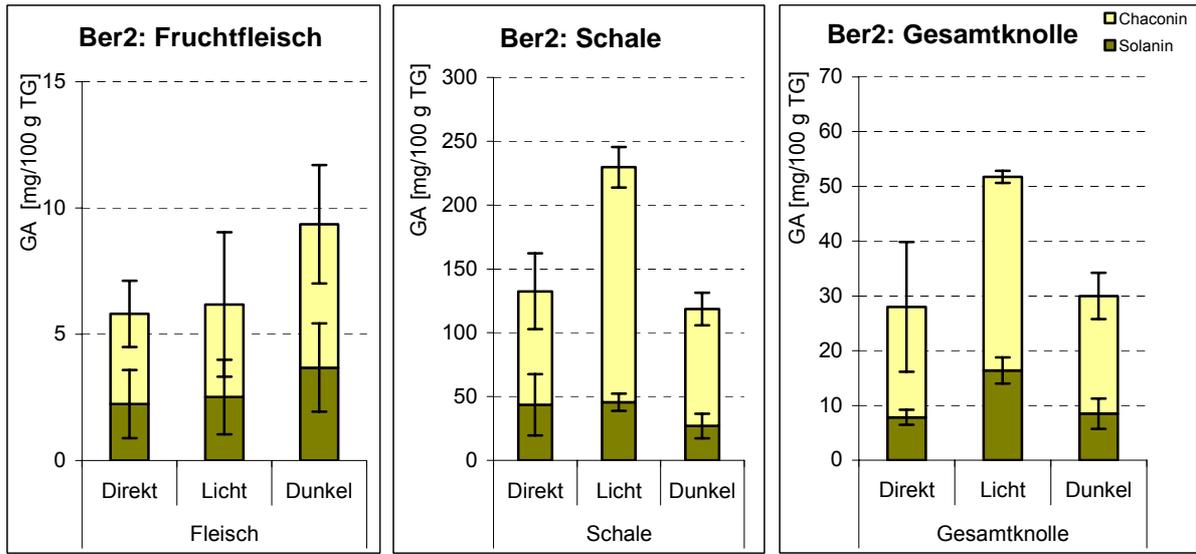
Lichteinwirkung wirkt bekanntermaßen als Stressfaktor auf Kartoffelknollen und hat daher den Anstieg des Alkaloidgehaltes zur Folge. Gegenstand dieser Untersuchung war es herauszufinden, in welcher Größenordnung dies während der Angebotszeit im Handel erfolgt. Es wurde von einer Aufbewahrungszeit von durchschnittlich einer Woche ausgegangen, in der die Knollen dem Kunden angeboten werden. Für jede untersuchte Sorte wurden drei Knollen bei Raumtemperatur eine Woche unter Lichteinfluss und weitere drei Knollen in Dunkelheit gelagert. Die genaue Versuchsbeschreibung ist Kapitel III, Abschnitt 3.7.1 zu entnehmen.

Nach einwöchiger Lagerung konnte weder in den belichteten, noch in den Knollen aus Dunkellagerung eine Chlorophyllbildung beobachtet werden. Wie Tabelle 5.10 sowie die sich anschließenden Abbildungen deutlich machen, kam es dennoch in fast allen Proben zu einer licht-unabhängigen Zunahme der Alkaloid-Gehalte. Die GA-Akkumulation in belichteten Knollen war erwartungsgemäß höher. Dies war nicht nur auf das Schalengewebe begrenzt, sondern vollzog sich im Fruchtfleisch weiter. Tabelle 5.10 zeigt die ermittelten GA-Gehalte [mg/100 g TG] der analysierten Frühkartoffelsorten Berber-2, Nicola-4, Ditta-1 und Valor-1 in der Kontrolle (entspricht den Gehalten der direkten Aufarbeitung) und den untersuchten Geweben nach Licht- und Dunkellagerung sowie deren prozentuale Alkaloidzunahme bezogen auf den Kontrollgehalt. Die sich anschließenden Abbildungen verbildlichen die Veränderungen des Alkaloidkonzentration in den analysierten Sorten.

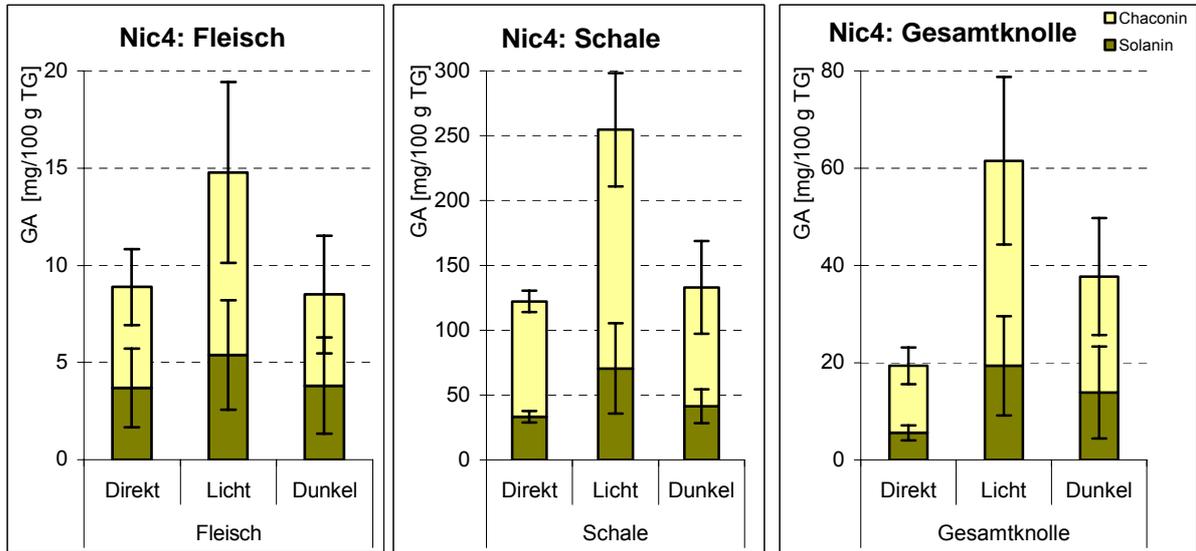
**Tab. 5.10** Vergleich des  $\alpha$ -Solanin-,  $\alpha$ -Chaconin- und Gesamt-GA-Gehaltes [mg/100 g TG] in Fleisch, Schale und Gesamtknolle der analysierten Frühkartoffelsorten nach einwöchiger Lagerung mit bzw. ohne Lichteinfluss mit Angabe der prozentualen Veränderung des GA-Gehaltes im Vergleich zur Kontrolle.

		$\alpha$ -Solanin	[%]	$\alpha$ -Chaconin	[%]	Gesamt-GA	[%]
<b>Berber-2</b>							
Fleisch	Kontrolle	2,23		5,58		5,81	
	Licht	2,51	12	3,67	3	6,18	6
	Dunkel	3,68	65	5,68	59	9,36	61
Schale	Kontrolle	50,25		120,11		170,37	
	Licht	37,90	-25	101,67	-15	139,57	-18
	Dunkel	38,13	-24	93,04	-23	131,17	-13
Gesamt- knolle	Kontrolle	7,82		20,16		27,99	
	Licht	16,39	110	35,35	75	51,75	85
	Dunkel	8,49	8	21,50	7	29,99	7
<b>Ditta-2</b>							
Fleisch	Kontrolle	0,31		0,73		1,03	
	Licht	1,11	261	1,62	123	2,72	164
	Dunkel	0,34	12	0,95	32	1,30	26
Schale	Kontrolle	43,55		45,68		89,63	
	Licht	45,55	5	50,48	11	96,03	8
	Dunkel	26,92	-38	30,78	-33	57,70	-35
Gesamt- knolle	Kontrolle	3,30		4,15		7,45	
	Licht	4,15	25	5,12	23	9,27	24
	Dunkel	4,67	42	8,16	97	12,23	72
<b>Nicola-4</b>							
Fleisch	Kontrolle	3,69		5,19		8,88	
	Licht	5,39	46	9,38	81	14,77	66
	Dunkel	3,81	3	4,70	-9	8,51	-4
Schale	Kontrolle	33,30		88,93		122,23	
	Licht	70,55	112	184,05	107	254,60	108
	Dunkel	41,33	24	91,67	3	133,01	9
Gesamt- knolle	Kontrolle	5,56		13,80		19,36	
	Licht	19,36	248	42,14	205	61,51	218
	Dunkel	13,84	149	23,86	73	37,70	95
<b>Valor-1</b>							
Fleisch	Kontrolle	1,72		2,18		3,90	
	Licht	5,52	221	6,17	183	11,69	200
	Dunkel	5,83	239	5,75	163	11,58	197
Schale	Kontrolle	28,07		30,15		58,21	
	Licht	61,47	119	75,35	150	136,82	135
	Dunkel	41,80	49	53,46	77	95,26	64
Gesamt- knolle	Kontrolle	9,10		11,27		20,37	
	Licht	15,08	66	16,27	44	31,35	54
	Dunkel	11,15	23	13,54	20	24,68	21

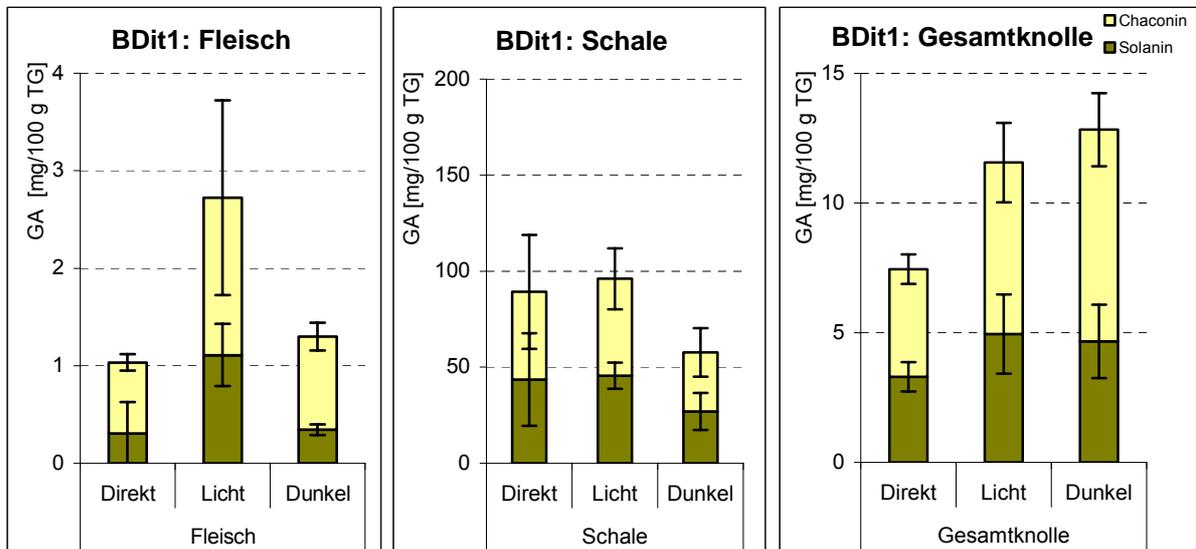
a.)



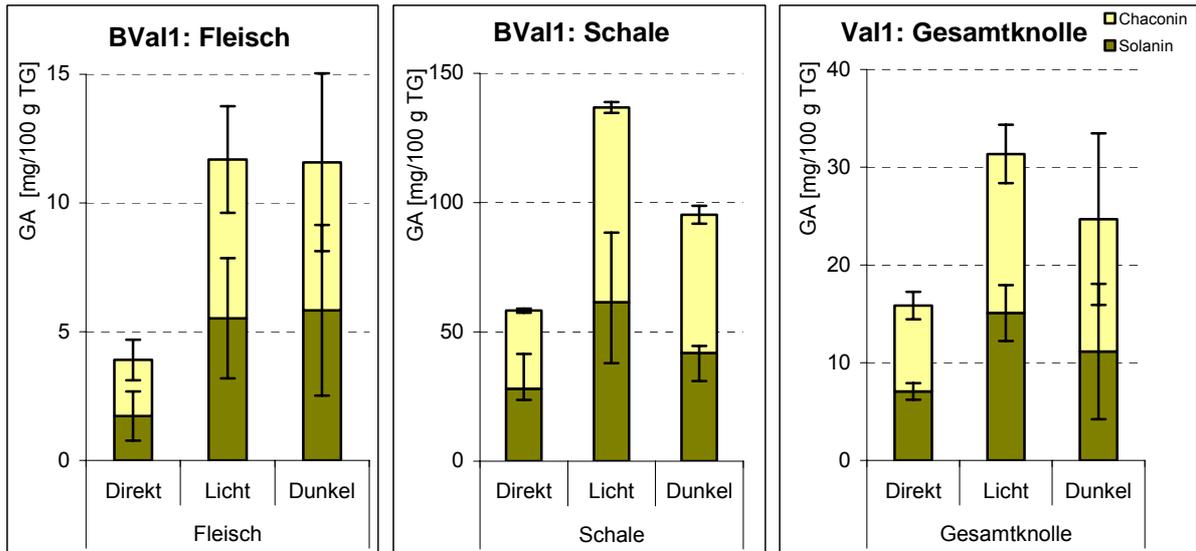
b.)



c.)



d.)



**Abb. 5.3** Vergleich der GA-Gehalte [mg/100 g TG] in Fleisch, Schale und Gesamtknolle nach einwöchiger Licht- bzw. Dunkellagerung der Sorte:  
a.) Berber-2  
b.) Nicola-7  
c.) Bio-Ditta-1  
d.) Bio-Valor-1

### 5.1.3.2 GA-Gehalt ergrüner Knollenanteile

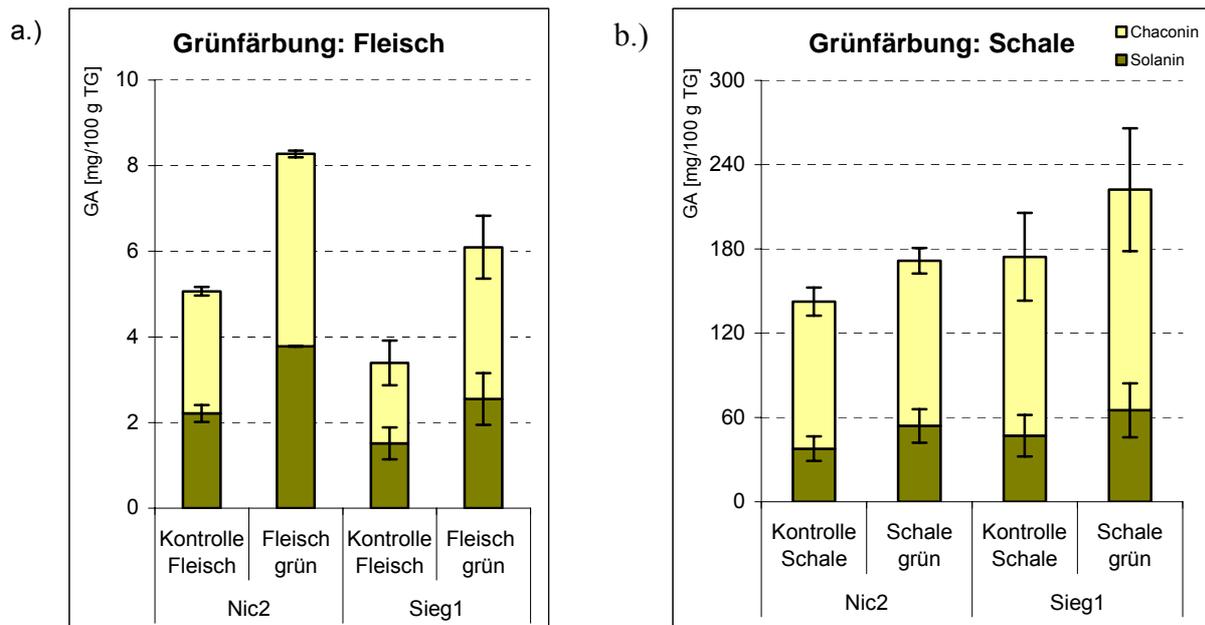
Junge Frühkartoffeln zeichnen sich durch eine hohe Stoffwechselaktivität aus, weshalb in ergrünten Knollen eine GA-Akkumulation zu erwarten ist. Keine der erworbenen Frühkartoffeln wies grüne Stellen auf, mit Ausnahme der Sorten Nicola-2 und Sieglinde-1, deren Alkaloidkonzentration in der grünen Schale und dem direkt darunter liegenden Fleisch mit der Kontrolle aus unverändertem Gewebe der gleichen Knolle verglichen wurden. Das Vorgehen ist aus Kapitel III, Abschnitt 3.7.2 zu entnehmen.

Tabelle 5.11 verdeutlicht, dass in beiden Sorten eine deutliche Erhöhung des Gesamtalkaloidgehaltes in den grünen Anteilen ausgemacht werden konnte, wobei keines der Einzelalkaloide bevorzugt synthetisiert wurde. Der stärkste prozentuale Anstieg erfolgte mit mehr als 50% jeweils im Fruchtfleisch unter der Schale. Im Schalengewebe zeigte sich zwar ebenfalls eine Akkumulation, die insgesamt geringer ausfiel.

**Tab. 5.11** Vergleich des  $\alpha$ -Solanin-,  $\alpha$ -Chaconin- und Gesamt-GA-Gehaltes [mg/100 g TG] in ergrünten und unveränderten Anteilen der Frühkartoffelsorten Nicola-2 und Sieglinde-1 mit Angabe der prozentualen Veränderung des GA-Gehaltes im Vergleich zur Kontrolle.

		$\alpha$ -Solanin	[%]	$\alpha$ -Chaconin	[%]	Gesamt-GA	[%]
<b>Nicola-2</b>							
Fleisch	Kontrolle	2,21		2,85		5,06	
	Grün	3,78	+71	4,49	+58	8,27	+63
Schale	Kontrolle	37,78		104,78		142,56	
	Grün	54,00	+43	117,60	+12	171,60	+20
<b>Sieglinde-1</b>							
Fleisch	Kontrolle	1,52		1,88		3,40	
	Grün	2,55	+67	3,54	+88	5,42	+79
Schale	Kontrolle	47,06		127,31		170,37	
	Grün	65,17	+38	157,00	+23	222,17	+30

Die folgende Abbildung 5.4 verdeutlichen den Alkaloid-Anstieg durch die Gegenüberstellung der GA-Konzentrationen in grünem und unverändertem Gewebe.



**Abb. 5.4** Vergleich des  $\alpha$ -Solanin,  $\alpha$ -Chaconin und GA-Gehaltes [mg/100 g TG] grüner Anteile mit Kontrollgewebe ohne Grünfärbung in den Frühkartoffelsorten Nicola-2 und Sieglinde-1 in: a.) Knollenfleisch b.) der Schale

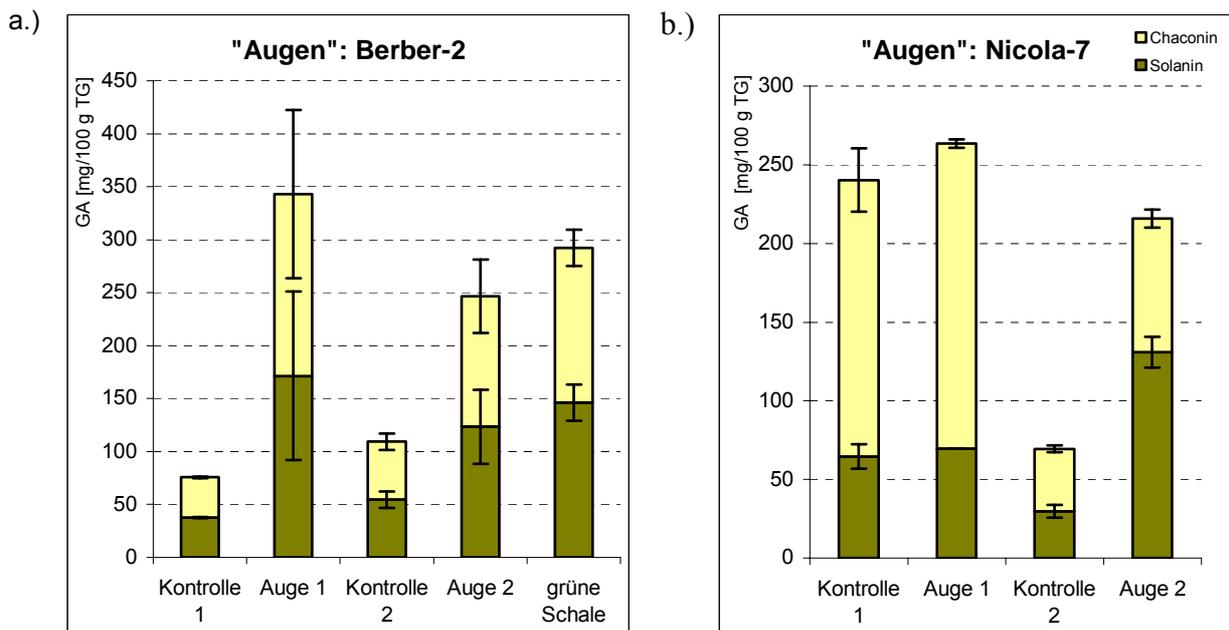
### 5.1.3.3 GA-Gehalt in „Kartoffelaugen“

Die „Kartoffelaugen“ sind die Ursprungsgebiete der Seitensprosse bei der Keimung der Knolle. Prozentual beinhalten sie neben den jungen Sprossen die größten Alkaloidgehalte aller Gewebearten. Die Gegenüberstellung der Konzentrationen (Tab. 5.12, Abb. 5.5) in der Region der „Kartoffelaugen“ mit denen in „augenloser“ Schale (Vorgehen siehe Kapitel III, Abschnitt

3.7.3) offenbarte eine zwei bis dreifach höhere GA-Konzentration in der „Augenregion“. Sie war damit vergleichbar mit den Alkaloidgehalten in der ergrünten Schale, die in den Knollen der Sorte Berber-2 zusätzlich auftrat.

**Tab. 5.12** Vergleich des  $\alpha$ -Solanin-,  $\alpha$ -Chaconin- und Gesamt-GA-Gehaltes [mg/100 g TG] in „Kartoffelaugen,, und „augenloser“ Schale der Frühkartoffelsorten Nicola-2 und Sieglinde-1 mit Angabe des prozentualen Unterschieds im GA-Gehalt verglichen mit der Kontrolle.

		$\alpha$ -Solanin [%]	$\alpha$ -Chaconin [%]	Gesamt-GA [%]		
<b>Berber-2</b>						
Schale	Kontrolle 1	37,80	108,99	146,79		
	Auge 1	171,50 +353	252,11 231	423,61 +189		
	Kontrolle 2	54,71	116,90	171,61		
	Auge 2	123,30 +125	274,78 135	398,03 +132		
	Grünung	146,14 +167	307,86 163	453,99 +165		
<b>Nicola-7</b>						
Schale	Kontrolle 1	64,62	175,68	240,29		
	Auge 1	69,80 +8	193,69 10	263,50 +9		
	Kontrolle 2	29,89	39,49	69,38		
	Auge 2	130,94 +339	84,92 115	215,87 +211		



**Abb. 5.5** Vergleich des  $\alpha$ -Solanin,  $\alpha$ -Chaconin und GA-Gehaltes [mg/100 g TG] in Kartoffelaugen und Kontrollgewebe von:  
 a.) Berber-2  
 b.) Nicola-7

### 5.1.3.4 Verteilung der Alkaloide im Kartoffelfleisch

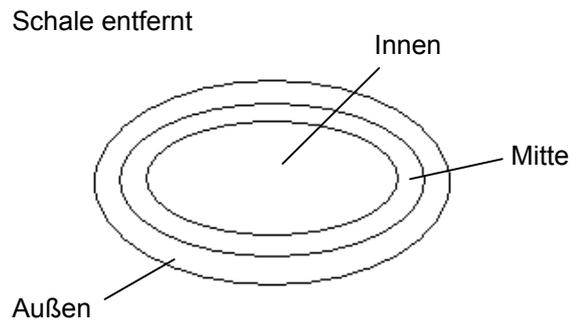
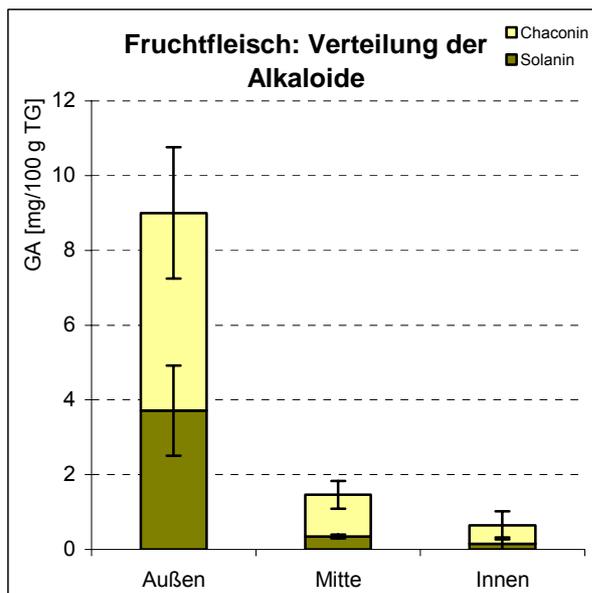
Wie bereits in Abschnitt 5.2.1 gezeigt, befand sich die Hauptmenge der Alkaloide in der Schale. In wie weit sich die Verteilung im Kartoffelfleisch von außen nach innen fortsetzt, war unbekannt. Wie in Kapitel III, Abschnitt 3.7.4 beschrieben, wurden die Knollen der Sorte

Berber-2 von ihrer Schale befreit und die drei Schichten 1: äußeres Fleisch (4 mm Schichtdicke), 2: mittleres Fleisch (4 mm Schichtdicke) und 3: inneres Fleisch auf ihren Alkaloidgehalt untersucht. Das Ergebnis der Untersuchung veranschaulicht Tabelle 5.13 und Abbildung 5.5.

**Tab. 5.13** Vergleich der  $\alpha$ -Solantin- und  $\alpha$ -Chaconin-Gehalte [mg/100 g TG] der drei Schichten äußeres, mittleres und inneres Fleisch mit Angabe des prozentualen Anteils am Gesamt-GA-Gehalt.

		$\alpha$ -Solantin [%]	$\alpha$ -Chaconin [%]	Gesamt-GA [%]	
<b>Nicola-1</b>	Außen	3,71 $\pm$ 1,21	5,29 $\pm$ 1,76	9,00 $\pm$ 2,97	78
	Mitte	0,34 $\pm$ 0,05	1,16 $\pm$ 0,38	1,50 $\pm$ 0,88	14
	Innen	0,15 $\pm$ 0,17	0,49 $\pm$ 0,38	0,64 $\pm$ 0,55	9

Deutlich ist die wesentlich höhere Alkaloid-Konzentration in den äußersten 4 Millimetern des Kartoffelfleisches zu erkennen, die zum Zentrum hin rapide abnimmt. Verglichen mit dem Alkaloidgehalt in der Schale war die Menge der äußersten Fleischschicht dennoch vernachlässigbar, für  $\alpha$ -Solantin betrug sie 0,9%, für  $\alpha$ -Chaconin sogar nur 0,7%.



**Abb. 5.6** Verteilung von  $\alpha$ -Solantin und  $\alpha$ -Chaconin innerhalb des Kartoffelfleisches von Außen nach Innen.

### 5.1.4 Veränderung des GA-Gehaltes in Salz- und Pellkartoffeln

Die Untersuchung der Gehaltsänderung bei Zubereitung von Pell- und Salzkartoffeln erfolgte an Knollen der Sorte Primura, die zunächst als Gesamtknollen nach den Verfahrensschritten in Kapitel III, Abschnitt 3.8.2 behandelt wurden. Durch die hohe interindividuelle Variabilität im  $\alpha$ -Solanin- ( $\pm 42\%$ ) und  $\alpha$ -Chaconin-Gehalt ( $\pm 24\%$ ) zwischen den Knollen, konnte auf dieser Basis jedoch keine Aussage getroffen werden.

Um die Variabilität zu verringern, wurde im zweiten Ansatz das Versuchsdesign so verändert, dass eine Knolle geviertelt und jeweils ein Viertel für die drei Zubereitungsformen (Salzkartoffel, Pellkartoffel in Wasser, Pellkartoffel in 1% Essigsäure) und zur Direktanalyse des Alkaloidgehalts verwendet wurde. Der gesamte Ansatz wurde einmal wiederholt, wobei für jede Zubereitungsform drei Knollen und diese als Doppelbestimmung analysiert wurden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigt Tabelle 5.14, in der der GA-Gehalt [mg/100 g TG] als Mittelwert der Knollen beider Ansätze dargestellt ist. Zusätzlich ist die prozentuale Veränderung des Alkaloid-Gehaltes gegenüber der Kontrolle (sofortige Aufarbeitung) angegeben.

**Tab. 5.14** Vergleich der  $\alpha$ -Solanin-,  $\alpha$ -Chaconin- und Gesamt-GA-Gehalte [mg/100 g TG bzw. mg/100 ml Wasser] in Fleisch, Schale und Kochwasser der zubereiteten Pell- und Salzkartoffeln mit Angabe der prozentualen Veränderung der Alkaloid-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle.

		$\alpha$ -Solanin [%]	$\alpha$ -Chaconin [%]	Gesamt-GA [%]
Wasser	Kontrolle	0	0	0
	Pellkartoffel	0,05 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,03
	Salzkartoffel	0,02 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,02
	1% Essigsäure	0,51 $\pm$ 0,02	0,69 $\pm$ 0,03	1,20 $\pm$ 0,05
Fleisch	Kontrolle	3,38 $\pm$ 0,41	5,71 $\pm$ 2,12	9,09 $\pm$ 2,53
	Pellkartoffel	4,90 $\pm$ 0,15 +45	6,75 $\pm$ 0,76 +18	11,65 $\pm$ 0,91 +28
	Salzkartoffel	1,44 $\pm$ 0,20 -57	1,90 $\pm$ 0,36 -67	3,34 $\pm$ 0,56 -63
	1% Essigsäure	2,79 $\pm$ 0,34 -17	4,44 $\pm$ 0,67 -22	7,23 $\pm$ 1,01 -20
Schale	Kontrolle	40,24 $\pm$ 6,25	79,20 $\pm$ 15,60	119,44 $\pm$ 21,85
	Pellkartoffel	42,89 $\pm$ 9,65 +7	73,69 $\pm$ 17,53 -7	116,58 $\pm$ 27,18 -2
	1% Essigsäure	19,31 $\pm$ 2,73 -52	26,78 $\pm$ 8,01 -66	46,09 $\pm$ 10,74 -61

Im Kochwasser aller Zubereitungsformen konnten GAe in niedriger Konzentration nachgewiesen werden. Die zusätzlich durchgeführte LC-ESI-MS-Analyse bestätigte das hauptsächliche Vorkommen von  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin in unveränderter Form und der  $\beta$ -Formen im Spurenbereich. Das Wasser der Salzkartoffeln enthielt grundsätzlich weniger Alkaloide als das Kochwasser der Pellkartoffeln. In 1%iger Essigsäure fanden sich wiederum zehnfach höhere Konzentrationen als im normalen Pellkartoffelsud.

Erstaunlich war die abweichende Veränderung des Alkaloidgehaltes in Abhängigkeit von der Garmethode. Während im Fleisch der Pellkartoffeln, die mit Schale gegart wurden, grundsätzlich ein Anstieg der GA-Konzentration zu verzeichnen war, verringerten sich die Mengen an  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin in allen Salzkartoffelproben beträchtlich. Ein verminderte Erniedrigung der Alkaloidkonzentration konnte ebenfalls in den in Essigsäure gekochten Pellkartoffeln beobachtet werden. Im Vergleich zu den herkömmlichen Pellkartoffeln sank der Gehalt an  $\alpha$ -Solanin sogar um 43%, von  $\alpha$ -Chaconin um 34%.

Ähnlich verhielt es sich im Schalengewebe der Pellkartoffelansätze. Der GA-Gehalt in der Schale der herkömmlichen Pellkartoffeln blieb praktisch unverändert, während in den in Essigsäure gekochten Knollen ein deutlicher Rückgang von über 50% zu verzeichnen war.

## 5.2 Traditionelle Kartoffelsorten

### 5.2.1 Methodenanpassung

Das trockene, homogenisierte Probenmaterial aus Kapitel III, Abschnitt 3.1.2 wurde auf die GA-Konzentration in Knolle, Schale, Fleisch, junges und altes Blatt, junge sowie alte Sprossachse und Wurzel analysiert. Durch die gewebeabhängig abweichenden Alkaloidkonzentrationen wurde wiederum ein Protokoll für Einwaage, RP-Beladung und MeOH-Aufnahmevermögen aufgestellt, das in Tabelle 5.15 dargestellt ist. Die Angabe zu Extraktion und Aufreinigung sind Kapitel III, Abschnitt 3.4.2 und 3.4.3 zu entnehmen. Von dem nach Trocknung in MeOH aufgenommenen Rückstand dienten 20  $\mu$ l zur Analyse des Alkaloidgehaltes per HPLC, weitere 20  $\mu$ l wurden zur Identifizierung des Alkaloidmusters massenspektrometrisch untersucht.

**Tab. 5.15** Übersicht über Einwaage [g], Kartuschenbeladung [ml] und MeOH-Aufnahmevermögen [ml] für die Analyse traditioneller Kartoffelsorten mittels HPLC und LC-ESI-MS.

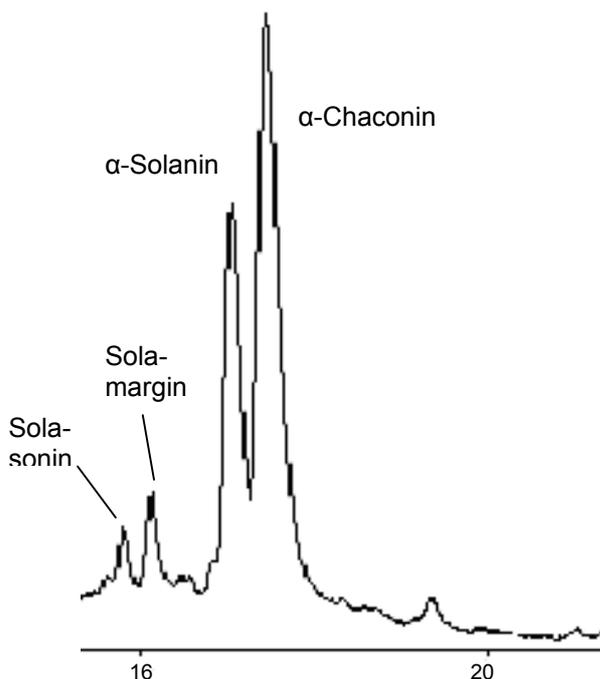
Probe	EW	RP-18-Beladung	Aufnahmevermögen
Blatt	0,4	4	250
Sprossachse	0,4	4	300
Wurze	1,0	5	500
Sprosse	0,1	5	400
Beere	0,2	4	400
Knolle gesamt groß	3,0	8	300
Knolle gesamt klein	0,5	1	400
Schale	1,0	5	250
Fleisch	4,0	10	250

Wie zuvor konnte in den Knollen  $\alpha$ -Solanin ( $R_t$  16,8 min) und  $\alpha$ -Chaconin ( $R_t$  17,3 min) durch Vergleich ihrer Retentionszeiten mit denen der Standardsubstanzen nachgewiesen werden. Im Blatt- und Stielmaterial der Sorten Bamberger Hörnchen, Nageler Kipfler, Pink Fir Apple und La Ratte sowie in dessen Beeren wurden darüber hinaus noch zwei weitere Alkaloide mit den Retentionszeiten 15,6 und 16,3 min detektiert, die sich nach LC-ESI-MS-Analyse als Solasonin und Solamargin herausstellten (vgl. Abschnitt 5.2.3).

## 5.2.2 GA-Gehalt traditioneller Kartoffelsorten

### 5.2.2.1 Anzuchmaterial

Die folgende Abbildung 5.7 zeigt zunächst als Beispiel das HPLC-Chromatogramm des Beerenextraktes der Sorte La Ratte. Die zur Quantifizierung verwendete Methode ist Kapitel III, Abschnitt 3.5.1 zu entnehmen. Die unvollständige Auflösung der Peaks für  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin war konzentrationsabhängig und konnte durch die Verdünnung der Probe verbessert werden. Da in der Abbildung die Peaks der beiden Nebenalkaloide Solasonin und Solamargin gezeigt werden sollten, wurde bei der Darstellung auf eine vollständige Auflösung verzichtet.



**Abb. 5.7**  
HPLC-Chromatogramm des methanolischen Extraktes aus Kartoffelbeeren der Sorte La Ratte. (Chromatographische Bedingungen siehe Kapitel III, Abschnitt 3.5.1).

Die analysierten Alkaloid-Gehalte [mg/100 g TG] der im Gewächshaus und Freiland kultivierten traditionellen Kartoffelsorten (Anbaubedingungen siehe Kapitel III, Abschnitt 3.1.2.1) sind in Tabelle 5.16 und 5.17 dargestellt. Zusätzlich wurde das Knollenmaterial weiterer 8 Sorten untersucht, deren Ergebnisse in Tabelle 5.23 zusammengestellt sind. Die

ermittelten Gehalte sind jeweils das Ergebnis mindestens einer Doppelbestimmung. Bei Untersuchung von mindestens drei Testgeweben sind zusätzlich die zugehörigen Standardabweichungen angegeben. Je nach Sorte musste teilweise auf die Untersuchung bestimmter Gewebe verzichtet werden, da entweder keine Knollen gebildet wurden oder durch die unterschiedliche Entwicklungsgeschwindigkeit der einzelnen Sorten, die Seneszenz so weit fortgeschritten war, dass kein repräsentatives Blattmaterial zur Verfügung stand. Durch die variierende Knollengröße der Sorten, wurden Knollen, die weniger als 5 g FG besaßen als kleine Knolle, alles was darüber lag als große Knolle deklariert.

In Tabelle 5.16 sind zunächst die Gehalte an  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin und der Gesamt-GA-Gehalt [mg/100 g TG] in den unterirdischen Geweben aus Gewächshaus- und Freilandanbau dargestellt. Da sich in den Knollen keiner der Sorten neben  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin andere GAe fanden, ergibt sich die Gesamt-GA-Konzentration aus der Summe der beiden Einzelalkaloide. Die letzte Spalte zeigt zur besseren Vergleichbarkeit den jeweils auf das FG berechneten Gesamtalkaloidgehalt, um ihn dem Grenzwert 20 mg Gesamt-GA/100 g FG gegenüberzustellen. In den sich anschließenden Tabellen 5.17a und 5.17b sind die zugehörigen Mengen [mg/100 g TG] in den oberirdischen Geweben dargestellt. Zum Gesamtgehalt wurde wiederum die Konzentration der Einzelalkaloide aufsummiert, wobei bei den Sorten Bamberger Hörnchen, La Ratte, Nageler Kipfler und Pink Fir Apple, deren GA-Gehalte in Tabelle 5.18 vermerkt sind, die zusätzlich vorkommenden GAe Solasonin und Solamargin mitberücksichtigt wurden.

**Tab. 5.16** Übersicht über die ermittelten GA-Gehalte [mg/100 g TG] in Fleisch, Schale und Gesamtknolle der in Freiland (FL) und Gewächshaus (GH) kultivierten traditionellen Kartoffelsorten.

		Fleisch			Schale			Knolle klein			Knolle groß			
		$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-GA	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-GA	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-GA	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-GA TG	Gesamt-GA FG
		x	x	x	x	x	x	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$
AV	GH	2,43	3,12	5,56	35,02	82,99	118,00	88,80 $\pm$ 26,27	50,53 $\pm$ 6,51	139,34 $\pm$ 32,79	6,81 $\pm$ 0,92	17,97 $\pm$ 2,52	24,78 $\pm$ 1,33	4,72 $\pm$ 0,35
	FL	1,22	1,31	2,53	44,24	149,94	194,18	20,24	54,19	74,37	8,26 $\pm$ 0,81	23,35 $\pm$ 2,11	31,61 $\pm$ 2,62	6,31 $\pm$ 0,52
BA	GH	x	x	x	31,43	50,73	82,16	55,85 $\pm$ 21,44	88,65 $\pm$ 8,14	144,50 $\pm$ 29,57	5,06 $\pm$ 1,38	3,30 $\pm$ 0,21	8,36 $\pm$ 1,60	6,33 $\pm$ 3,72
	FL	1,71	1,99	3,70	57,93	123,79	181,72	38,72 $\pm$ 29,86	99,96 $\pm$ 8,46	138,68 $\pm$ 38,32	7,88 $\pm$ 0,01	15,10 $\pm$ 1,60	22,98 $\pm$ 1,61	7,70 $\pm$ 3,54
BH	GH	3,31	4,93	8,24	61,87	133,68	195,55	78,54 $\pm$ 2,64	143,79 $\pm$ 0,49	222,33 $\pm$ 3,13	14,14	21,03	35,17	2,17
	FL	4,23	5,39	9,62	36,53	98,00	134,53	x	x	x	32,00 $\pm$ 7,66	46,65 $\pm$ 9,90	78,65 $\pm$ 17,56	13,64 $\pm$ 2,34
BI	GH	1,06	2,34	3,40	72,17	119,19	191,35	79,02 $\pm$ 6,61	81,32 $\pm$ 50,21	160,34 $\pm$ 56,82	21,78 $\pm$ 3,20	35,75 $\pm$ 7,91	57,62 $\pm$ 11,11	6,00 $\pm$ 1,63
	FL	0,76	1,10	1,86	90,42	160,74	251,16	x	x	x	17,65 $\pm$ 3,91	28,60 $\pm$ 5,61	46,25 $\pm$ 9,52	6,48 $\pm$ 0,97
EB	GH	0,98	1,64	2,62	48,96	91,23	140,19	x	x	x	21,01 $\pm$ 8,01	27,05 $\pm$ 7,42	48,06 $\pm$ 15,43	6,42 $\pm$ 2,34
	FL	0,41	0,60	1,01	32,97	70,66	103,63	x	x	x	14,90 $\pm$ 6,42	28,63 $\pm$ 12,12	43,53 $\pm$ 18,54	8,46 $\pm$ 3,08
FA	GH	x	x	x	x	x	x	46,50 $\pm$ 25,70	96,54 $\pm$ 52,49	143,04 $\pm$ 78,19	9,90 $\pm$ 0,63	20,90 $\pm$ 6,85	30,80 $\pm$ 7,48	5,48 $\pm$ 1,53
	FL	3,40	2,89	6,29	42,83	123,09	165,92	22,56 $\pm$ 10,72	64,78 $\pm$ 8,59	87,34 $\pm$ 19,31	5,84	16,62	22,46	4,42
GW	GH	0,60	0,68	1,28	40,54	43,74	84,28	42,14 $\pm$ 29,13	61,91 $\pm$ 28,91	104,05 $\pm$ 58,04	6,72 $\pm$ 3,92	6,18 $\pm$ 3,17	12,90 $\pm$ 7,09	1,74 $\pm$ 0,84
	FL	0,25	0,34	0,59	18,18	19,79	37,92	128,77 $\pm$ 27,84	148,82 $\pm$ 15,01	277,59 $\pm$ 42,85	4,18 $\pm$ 0,43	4,13 $\pm$ 0,44	8,31 $\pm$ 0,87	2,31 $\pm$ 1,26
LR	GH	1,83	4,03	5,86	45,42	85,72	131,14	44,60 $\pm$ 16,60	95,68 $\pm$ 30,33	140,28 $\pm$ 46,93	14,92	34,79	49,71	7,73
	FL	3,02	3,89	6,91	44,24	149,94	194,18	75,78 $\pm$ 78,55	142,35 $\pm$ 124,80	218,13 $\pm$ 203,31	8,26 $\pm$ 0,81	23,35 $\pm$ 2,11	31,61 $\pm$ 2,92	11,72 $\pm$ 0,57
NK	GH	0,16	0,74	0,90	24,83	42,99	67,82	27,26 $\pm$ 5,89	53,25 $\pm$ 10,44	80,51 $\pm$ 16,33	4,23 $\pm$ 1,07	7,86 $\pm$ 4,07	12,09 $\pm$ 5,14	1,72 $\pm$ 0,99
	FL	0,96	1,8	2,76	32,89	94,03	126,92	27,87 $\pm$ 9,54	66,26 $\pm$ 2,24	94,13 $\pm$ 11,78	7,85 $\pm$ 0,69	17,42 $\pm$ 1,44	25,00 $\pm$ 2,13	4,73 $\pm$ 0,63
PF	GH	x	x	x	x	x	x	15,85	30,17	46,02	x	x	x	x
	FL	1,29	2,06	3,35	61,74	147,46	208,20	48,96 $\pm$ 6,05	97,88 $\pm$ 10,45	146,84 $\pm$ 16,50	20,42	39,65	60,07	13,77
RD	GH	0,38	0,72	1,10	95,43	126,67	222,10	206,88 $\pm$ 5,79	211,63 $\pm$ 0,88	418,51 $\pm$ 6,67	13,60 $\pm$ 4,84	25,48 $\pm$ 2,10	39,08 $\pm$ 6,94	6,13 $\pm$ 0,59
	FL	0,47	1,01	1,48	83,57	103,84	187,41	73,08 $\pm$ 44,48	126,51 $\pm$ 66,25	199,59 $\pm$ 110,73	x	x	x	x
RL	GH	1,80	2,38	4,18	36,23	68,95	105,18	110,91 $\pm$ 7,93	141,20 $\pm$ 13,32	252,11 $\pm$ 21,25	7,99 $\pm$ 2,04	13,01 $\pm$ 2,00	21,00 $\pm$ 4,04	4,28 $\pm$ 2,14
	FL	0,08	0,44	0,52	10,74	31,69	42,43	44,35 $\pm$ 47,91	102,13 $\pm$ 43,08	146,48 $\pm$ 90,99	5,61 $\pm$ 2,01	13,88 $\pm$ 3,88	19,49 $\pm$ 5,89	3,11 $\pm$ 0,92
RO	GH	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
	FL	0,56	1,36	1,92	65,28	190,19	255,47	x	x	x	8,91	21,45	30,36	6,16
AG	GH	1,72	1,09	2,81	55,19	128,57	183,76	87,30 $\pm$ 8,63	113,35 $\pm$ 7,16	200,65 $\pm$ 15,79	7,16 $\pm$ 5,61	13,15 $\pm$ 10,28	20,31 $\pm$ 13,90	3,98 $\pm$ 0,22
	FL	1,04	1,27	2,31	29,50	47,36	76,86	x	x	x	5,56 $\pm$ 1,06	10,80 $\pm$ 1,75	16,36 $\pm$ 2,81	2,66 $\pm$ 1,99

**Tab. 5.17.1** Übersicht über die ermittelten GA-Gehalte [mg/100 g TG] in jungen und alten Blättern der in Freiland (FL) und Gewächshaus (GH) kultivierten traditionellen Kartoffelsorten.

		Blatt jung			Blatt alt		
		$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-GA	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-GA
		$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$
<b>AV</b>	GH	218,90 $\pm$ 130,82	642,57 $\pm$ 299,55	862,56 $\pm$ 411,98	97,73 $\pm$ 48,56	361,25 $\pm$ 140,26	458,98 $\pm$ 187,78
	FL	159,87 $\pm$ 33,38	518,42 $\pm$ 82,40	583,17 $\pm$ 235,53	174,64 $\pm$ 129,80	670,78 $\pm$ 135,57	845,42 $\pm$ 212,28
<b>BA</b>	GH	338,15 $\pm$ 189,85	465,89 $\pm$ 132,61	804,04 $\pm$ 322,46	159,63	315,58	475,21
	FL	x	x	x	x	x	x
<b>BI</b>	GH	156,48 $\pm$ 48,55	430,62 $\pm$ 111,60	587,10 $\pm$ 160,17	30,78 $\pm$ 16,80	134,86 $\pm$ 30,95	165,64 $\pm$ 47,75
	FL	96,18 $\pm$ 61,31	179,38 $\pm$ 114,90	275,56 $\pm$ 176,21	70,26 $\pm$ 22,34	120,32 $\pm$ 17,26	190,68 $\pm$ 5,77
<b>EB</b>	GH	149,97 $\pm$ 62,13	883,29 $\pm$ 424,90	1033,26 $\pm$ 486,99	153,42 $\pm$ 24,78	246,71 $\pm$ 0,35	400,13 $\pm$ 25,13
	FL	129,95 $\pm$ 9,33	475,95 $\pm$ 24,48	604,90 $\pm$ 33,81	133,94 $\pm$ 23,62	514,92 $\pm$ 13,39	648,85 $\pm$ 37,01
<b>FA</b>	GH	130,92 $\pm$ 40,80	674,33 $\pm$ 283,30	805,25 $\pm$ 324,10	56,04 $\pm$ 31,29	149,54 $\pm$ 43,76	205,58 $\pm$ 75,05
	FL	193,02 $\pm$ 50,23	406,68 $\pm$ 87,77	599,70 $\pm$ 137,85	141,02 $\pm$ 12,82	324,68 $\pm$ 37,27	465,70 $\pm$ 50,09
<b>GW</b>	GH	x	x	x	x	x	x
	FL	34,27 $\pm$ 16,45	84,42 $\pm$ 40,87	118,69 $\pm$ 57,32	34,49 $\pm$ 5,55	83,05 $\pm$ 4,24	117,54 $\pm$ 9,79
<b>RD</b>	GH	73,50 $\pm$ 29,31	241,18 $\pm$ 68,73	314,68 $\pm$ 98,04	115,53 $\pm$ 11,25	308,29 $\pm$ 104,80	423,82 $\pm$ 116,05
	FL	65,30	37,38	102,68	97,36 $\pm$ 1,42	217,06 $\pm$ 12,20	308,42 $\pm$ 13,62
<b>RL</b>	GH	72,67 $\pm$ 26,53	211,02 $\pm$ 35,97	283,69 $\pm$ 62,50	139,83	247,51	387,34
	FL	x	x	x	234,49 $\pm$ 117,45	305,25 $\pm$ 277,60	539,74 $\pm$ 395,05
<b>RO</b>	GH	153,35 $\pm$ 44,01	185,29 $\pm$ 26,18	338,64 $\pm$ 70,19	46,20 $\pm$ 4,51	114,35 $\pm$ 7,49	160,55 $\pm$ 12,00
	FL	155,38 $\pm$ 45,29	282,10 $\pm$ 67,72	437,48 $\pm$ 113,01	210,09 $\pm$ 33,67	318,18 $\pm$ 23,69	528,27 $\pm$ 57,36
<b>AG</b>	GH	129,32 $\pm$ 54,54	357,71 $\pm$ 171,80	487,03 $\pm$ 226,34	57,05 $\pm$ 17,25	155,95 $\pm$ 52,88	213,00 $\pm$ 70,13
	FL	x	x	x	x	x	x

**Tab. 5.17.2** Übersicht über die ermittelten GA-Gehalte [mg/100 g TG] in jungen und alten Sprossachsen sowie in Wurzeln der in Freiland (FL) und Gewächshaus (GH) kultivierten traditionellen Kartoffelsorten.

		Sprossachse jung			Sprossachse alt			Wurzel		
		$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-GA	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-GA	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-GA
		$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$
<b>AV</b>	GH	32,72 ± 8,43	75,06 ± 36,42	96,87 ± 56,22	37,51 ± 6,37	62,37 ± 13,41	99,88 ± 19,58	179,95	64,14	244,09
	FL	50,97 ± 2,10	104,79 ± 1,50	155,75 ± 0,60	44,80 ± 7,53	70,12 ± 7,90	114,91 ± 15,35	307,21	351,47	658,68
<b>BA</b>	GH	58,98	154,76	213,73	98,13 ± 45,79	146,41 ± 55,73	244,51 ± 102,52	103,35	32,59	135,94
	FL	x	x	x	65,04	10,72	172,05	58,40	45,97	104,37
<b>BI</b>	GH	11,61 ± 12,67	14,27 ± 3,31	25,88 ± 15,98	119,35 ± 18,10	178,77 ± 23,38	298,12 ± 41,48	58,36	0,00	58,36
	FL	13,67 ± 5,23	31,04 ± 12,43	44,71 ± 17,50	88,56 ± 26,30	124,06 ± 47,38	212,62 ± 73,77	x	x	x
<b>EB</b>	GH	38,30 ± 26,21	120,74 ± 10,51	159,04 ± 36,72	58,72 ± 26,33	106,70 ± 50,23	165,42 ± 75,56	69,28	77,16	146,44
	FL	30,56 ± 13,50	91,38 ± 69,78	111,94 ± 83,28	20,23 ± 4,08	46,20 ± 4,28	66,43 ± 8,36	114,41	120,47	234,88
<b>FA</b>	GH	21,32 ± 14,30	65,08 ± 24,20	86,40 ± 38,50	29,41 ± 4,47	49,09 ± 6,55	78,50 ± 11,02	58,10	46,80	104,90
	FL	48,83 ± 12,72	105,16 ± 20,61	153,99 ± 33,14	53,98 ± 12,40	89,26 ± 23,20	143,25 ± 40,50	181,99	241,07	423,06
<b>GW</b>	GH	x	x	x	x	x	x	73,56	61,60	135,16
	FL	19,50 ± 0,09	82,20 ± 8,55	101,07 ± 8,64	20,80 ± 0,84	51,26 ± 1,62	72,06 ± 2,46	90,42	91,56	181,98
<b>RD</b>	GH	11,17	79,65	90,82	110,85 ± 13,63	187,72 ± 31,01	298,57 ± 44,64	167,61	153,56	281,51
	FL	30,28	69,93	100,21	53,43	95,47	148,90	x	x	x
<b>RL</b>	GH	28,63 ± 18,47	54,05 ± 19,87	83,68 ± 38,34	45,20 ± 24,73	107,52 ± 50,29	152,72 ± 75,02	132,06	113,90	245,96
	FL	66,84 ± 32,58	142,14 ± 68,13	208,98 ± 100,71	84,88 ± 19,13	153,38 ± 29,35	238,26 ± 48,48	147,29	403,11	550,40
<b>RO</b>	GH	27,99 ± 0,00	38,49 ± 0,84	66,48 ± 0,84	38,80 ± 1,63	67,44 ± 7,50	106,24 ± 9,13	x	x	x
	FL	32,67 ± 2,91	60,39 ± 7,86	93,06 ± 10,77	160,68 ± 34,97	211,09 ± 43,18	371,77 ± 78,15	183,42	200,30	383,72
<b>AG</b>	GH	12,18 ± 6,95	33,87 ± 12,47	46,05 ± 19,42	31,82 ± 28,52	33,90 ± 21,59	65,72 ± 50,11	107,04	0,00	107,04
	FL	x	x	x	x	x	x	x	x	x

**Tab. 5.18.1** Übersicht über die ermittelten GA-Gehalte [mg/100 g TG] in jungen und alten Blättern der in Freiland (FL) und Gewächshaus (GH) kultivierten traditionellen Kartoffelsorten Bamberger Hörnchen, La Ratte, Nageler Kipfler und Pink Fir Apple

		Blatt jung					Blatt alt				
		α-Solanin	α-Chaconin	Solasonin	Solamargin	Gesamt-GA	α-Solanin	α-Chaconin	Solasonin	Solamargin	Gesamt-GA
		$\bar{x} \pm s_x$									
<b>BH</b>	GH	9,57 ± 4,99	24,48 ± 5,76	42,60 ± 25,53	80,65 ± 46,68	157,30 ± 82,96	8,85 ± 4,21	28,71 ± 15,79	3,70 ± 1,98	6,12 ± 1,27	47,38 ± 23,25
	FL	2,59 ± 0,00	12,72 ± 3,91	43,80 ± 25,91	72,61 ± 44,87	131,72 ± 74,69	3,97 ± 0,00	19,51 ± 13,02	43,36 ± 7,95	84,77 ± 14,11	151,61 ± 35,08
<b>LR</b>	GH	71,50 ± 0,00	59,67 ± 19,99	68,50 ± 35,05	69,24 ± 55,37	268,91 ± 110,41	x	x	x	x	x
	FL	4,17 ± 3,29	10,13 ± 0,72	134,98 ± 48,67	269,31 ± 98,19	418,59 ± 150,87	0,09	7,85	178,68 ± 23,19	350,92 ± 47,22	537,54 ± 70,41
<b>NK</b>	GH	0,60 ± 0,06	36,33 ± 3,36	121,06 ± 23,67	98,72 ± 7,78	256,71 ± 34,87	0,00	7,54	452,76 ± 294,91	33,05 ± 6,61	493,35 ± 301,52
	FL	1,66	11,76	227,65 ± 78,42	316,59 ± 98,50	190,34 ± 176,92	0,00	0,00	217,24 ± 16,04	309,70 ± 19,69	526,91 ± 35,73
<b>PF</b>	GH	31,81 ± 17,55	110,30 ± 63,52	148,89 ± 103,77	153,81 ± 109,55	444,81 ± 213,32	25,43 ± 10,23	22,72 ± 14,70	27,61 ± 17,09	36,94 ± 31,26	112,70 ± 73,28
	FL	0,00	0,00	192,91 ± 45,07	337,61 ± 82,59	530,52 ± 127,66	0,00	0,00	221,95 ± 25,06	402,25 ± 55,35	624,20 ± 80,41

**Tab. 5.18.2** Übersicht über die ermittelten GA-Gehalte [mg/100 g TG] in jungen und alten Sprossachsen der in Freiland (FL) und Gewächshaus (GH) kultivierten traditionellen Kartoffelsorten Bamberger Hörnchen, La Ratte, Nageler Kipfler und Pink Fir Apple.

		Sproßachse jung					Sproßachse alt				
		α-Solanin	α-Chaconin	Solasonin	Solamargin	Gesamt-GA	α-Solanin	α-Chaconin	Solasonin	Solamargin	Gesamt-GA
		$\bar{x} \pm s_x$									
<b>BH</b>	GH	3,95 ± 1,73	8,73 ± 0,79	4,12 ± 2,26	4,64 ± 3,21	21,44 ± 7,99	12,16 ± 1,14	22,81 ± 0,68	1,67 ± 0,11	1,62 ± 0,05	38,26 ± 1,98
	FL	1,60 ± 1,34	13,46 ± 0,91	6,70 ± 0,62	9,93 ± 0,91	31,69 ± 3,78	6,83 ± 4,54	16,24 ± 2,80	12,34 ± 3,66	13,17 ± 2,37	48,58 ± 13,37
<b>LR</b>	GH	x	x	x	x	x	29,96 ± 0,84	32,71 ± 10,89	85,04 ± 15,29	47,07 ± 5,25	194,78 ± 32,27
	FL	9,33	13,21	25,74 ± 2,93	70,41 ± 2,13	118,69 ± 5,06	6,14 ± 2,74	11,61 ± 0,65	0,00	0,00	17,75 ± 3,39
<b>NK</b>	GH	16,29	27,31	0,00	0,00	43,60	13,03	23,02	16,30 ± 11,82	21,34 ± 13,68	37,64 ± 25,50
	FL	3,09 ± 0,51	11,93 ± 0,74	160,19 ± 8,25	118,53 ± 49,54	293,74 ± 59,04	5,16 ± 3,17	16,12 ± 7,40	53,26 ± 50,81	39,12 ± 36,88	113,66 ± 98,26
<b>PF</b>	GH	8,42 ± 3,18	40,68 ± 23,76	14,23 ± 0,26	39,25 ± 0,00	102,58 ± 27,20	11,92 ± 8,32	22,28 ± 12,57	5,90 ± 4,47	5,70 ± 3,59	45,80 ± 28,95
	FL	2,13 ± 0,79	15,55 ± 0,44	21,30 ± 3,89	35,29 ± 5,48	74,27 ± 10,60	3,50 ± 2,49	10,87 ± 2,20	6,08 ± 0,29	3,24 ± 0,89	23,69 ± 5,87

V ERGEBNISSE DER GA-ANALYSEN

In allen analysierten Geweben konnten GAe nachgewiesen werden, wobei sich Knollen- und Blattmaterial sowohl quantitativ, als auch qualitativ unterschieden.

In Knollen und Wurzeln wurden ausschließlich Alkaloide vom Solanidin-Typ detektiert, wobei die Wurzelgehalte um das zwei bis 30-fache höher lagen. Die Gehalte in den Knollen bewegten sich im Freilandanbau im Bereich von 8,31 (GW) bis 78,65 mg/100 g TG (BH), bei Gewächshauskultivierung von 8,36 (BA) bis 57,62 mg/100 g TG (BI). Innerhalb einer Sorte korrelierten die Werte, d. h. Sorten, die unter Freilandbedingungen hohe Alkaloidwerte aufwiesen, zeigten auch im Gewächshausanbau eine höhere Konzentration. Die höchsten Knollenkonzentrationen konnten erwartungsgemäß in den kleinen Knollen unter 5 g FG detektiert werden. Sie wiesen bis zu zehn mal höhere Alkaloidmengen auf (z. B. RD: groß 39,08; klein 419,51 mg Gesamt-GA/100 g TG).

Das oberirdische Gewebe enthielt grundsätzlich höhere GA- Konzentrationen. Die höchsten Alkaloidwerte zeigten die Blätter, wobei keine Unterschiede zwischen jungem und älteren Blattmaterial bestand. Die Menge im jungen Gewebe variierte zwischen 102,68 (RD) und 1033,26 mg Gesamt-GA/100 g TG (EB), in den älteren Blättern zwischen 47,38 (BH) und 845,25 mg Gesamt-GA/100 g TG (AV). Auch das Anbauverfahren in Freiland oder Gewächshaus zeigte keine Auswirkung auf die Alkaloid-Konzentration der Blätter.

Die Sprossachse enthielt im Vergleich zu den Blättern geringere GA-Mengen bis maximal 293,74 (NK) in jungen und 371,77 mg Gesamt-GA/100 g TG (RO) in den älteren. Insgesamt betrachtet waren die Gehalte der älteren Abschnitte höher als die der jungen. In den Sorten Bamberger Hörnchen, La Ratte, Nageler Kipfler und Pink Fir Apple, die zusätzlich Solasodin-Alkaloide enthielten, waren beide Alkaloid-Typen in den Sprossachsen gleichmäßig verteilt. In den Blättern lagen die Solasodin-Alkaloide dagegen als Hauptalkaloide vor. Insgesamt ergaben sich trotz dem zusätzlichen Auftreten von Solasonin und Solamargin keine höheren Alkaloidkonzentrationen.

Einzig beerenbildende Sorte war La Ratte, wobei nur im Freilandanbau Früchte ausgebildet wurden. Wie in den Blättern enthielten die Beeren (Tab. 5.19) neben  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin ebenfalls die Solasodin-Alkaloide Solasonin und Solamargin. Verglichen mit dem Blattmaterial wurde in den Früchten ein etwa doppelt so hoher Gesamtalkaloidgehalt gemessen. Die getrennte Analyse der Alkaloid-Konzentration in Samen und umgebenden Fruchtfleisch zeigte keine Unterschiede.

**Tab. 5.19** Ermittelte  $\alpha$ -Solamin-,  $\alpha$ -Chaconin- und Gesamt-GA-Gehalte [mg/100 g TG] in Kartoffelbeeren der Sorte La Ratte.

	<b>Beeren</b>				
	$\alpha$ -Solamin	$\alpha$ -Chaconin	Solasolin	Solamargin	Gesamt-GA
	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$
<b>LR</b>	453,36 $\pm$ 34,92	399,14 $\pm$ 37,38	38,19 $\pm$ 18,07	86,94 $\pm$ 24,23	977,64 $\pm$ 114,60

Die Verteilung der Alkaloide in Schale und Kartoffelfleisch zeigt Tabelle 5.20. Dargestellt ist wiederum der Gesamt-GA-Anteil im Schalengewebe, wobei das zugehörige Trockengewicht jeweils in die Berechnung miteinbezogen wurde. Wie zuvor war die klare Dominanz in der Randschicht erkennbar, wobei die Variation sowohl zwischen den Sorten wie auch zwischen Gewächshaus- und Freilandkultivierung minimal war.

**Tab. 5.20** Prozentualer GA-Anteil [%] in der Schale der analysierten traditionellen Kartoffelsorten.

Sorte		Schale
<b>AV</b>	GH	85,1
	FL	95,8
<b>BA</b>	GH	x
	FL	85,9
<b>BH</b>	GH	96,6
	FL	90,7
<b>BI</b>	GH	96,7
	FL	96,3
<b>EB</b>	GH	93,8
	FL	97,1

Sorte		Schale
<b>FA</b>	GH	x
	FL	86,3
<b>GW</b>	GH	90,6
	FL	93,3
<b>LR</b>	GH	96,7
	FL	89,5
<b>NK</b>	GH	95,9
	FL	92,0
<b>PF</b>	GH	x
	FL	94,5

Sorte		Schale
<b>RD</b>	GH	97,2
	FL	95,0
<b>RL</b>	GH	90,0
	FL	95,3
<b>RO</b>	GH	x
	FL	95,8
<b>AG</b>	GH	96,4
	FL	94,4

Die Verteilung der Einzelalkaloide in den analysierten Geweben zeigt für oberirdisches Material Tabelle 5.21, für Knollen, Sprosse und Wurzeln Tabelle 5.22. Angegeben ist jeweils der Anteil des toxischeren  $\alpha$ -Chaconins am Gesamt-GA-Gehalt. Für die Sorten Bamberger Hörnchen, La Ratte, Nageler Kipfler und Pink Fir Apple wurden die Solasodin-Alkaloide in Blättern und Sprossachsen mitberücksichtigt, so dass sich die Angabe hier auf chacotriosyl-haltige GAe bezieht.

Insgesamt konnte wie zuvor tendenziell ein höheres  $\alpha$ -Chaconin- $\alpha$ -Solamin-Verhältnis in den Schalen festgestellt werden, wobei die Verteilung weniger eindeutig als bei den kommerziellen Sorten war.

**Tab. 5.21** Prozentualer Anteil an  $\alpha$ -Chaconin [%] in jungen und alten Blättern sowie jungen und alten Sprossachsen der analysierten traditionellen Kartoffelsorten.

Sorte		Blatt jung	Blatt alt	Sprossachse jung	Sprossachse alt	Sorte		Blatt jung	Blatt alt	Sprossachse jung	Sprossachse alt
AV	GH	74,6	78,7	69,6	62,4	LR <sup>1</sup>	GH	47,9	x	x	43,9
	FL	76,4	79,3	67,3	61,0		FL	68,7	82,6	65,9	65,4
BA	GH	57,9	66,4	72,4	59,9	NK <sup>1</sup>	GH	71,6	x	62,6	60,3
	FL	x	x	x	14,2		FL	72,9	x	61,0	59,0
BH <sup>1</sup>	GH	68,7	69,4	60,9	57,2	PF <sup>1</sup>	GH	64,2	52,2	78,1	57,1
	FL	72,7	74,6	74,5	61,0		FL	63,6	x	75,2	55,2
BI	GH	73,4	x	55,1	60,0	RD	GH	76,6	72,7	87,7	62,9
	FL	65,1	63,1	69,4	58,4		FL	36,4	69,0	69,8	64,1
EB	GH	85,5	61,7	75,9	64,5	RL	GH	74,4	63,9	65,4	70,4
	FL	78,6	79,6	74,9	69,6		FL	x	56,6	68,0	64,4
FA	GH	83,7	72,8	75,3	62,5	RO	GH	54,7	71,2	57,9	63,5
	FL	67,8	69,7	68,3	62,3		FL	64,5	60,2	64,9	56,8
GW	GH	x	x	x	x	AG	GH	73,5	73,2	73,6	51,6
	FL	71,1	x	80,8	71,1		FL	x	x	x	x

<sup>1</sup> Anteil auf chacotriosylhaltige GA bezogen**Tab. 5.22** Prozentualer Anteil an  $\alpha$ -Chaconin [%] in Fleisch, Schale und Gesamtknolle der analysierten traditionellen Kartoffelsorten.

Sorte		Fleisch	Schale	Gesamtknolle	Sproß	Wurzel	Sorte		Fleisch	Schale	Gesamtknolle	Sproß	Wurzel
AV	GH	56,1	70,3	36,3	54,3	26,3	LR	GH	68,8	65,4	68,2	52,0	22,5
	FL	51,8	77,2	72,9		53,4		FL	56,3	77,2	65,3		x
BA	GH	x	61,7	61,3	53,4	24,0	NK	GH	82,2	63,4	66,1	49,0	36,6
	FL	53,8	68,1	72,1		44,0		FL	65,2	74,1	70,4		x
BH	GH	59,8	68,4	64,7	56,5	45,7	PF	GH	x	x	65,6	56,5	36,9
	FL	56,0	72,8	x		32,7		FL	61,5	70,8	66,7		52,3
BI	GH	68,8	62,3	50,7	32,9	x	RD	GH	65,5	57,0	50,6	68,9	47,8
	FL	59,1	64,0	x		x		FL	68,2	55,4	63,4		x
EB	GH	62,6	65,1	x	55,2	52,7	RL	GH	56,9	65,6	56,0	45,5	x
	FL	59,4	68,2	x		51,3		FL	84,6	74,7	69,7		52,2
FA	GH	x	x	67,5	56,9	44,6	RO	GH	x	x	x	61,1	46,3
	FL	45,9	74,2	74,2		57,0		FL	70,8	74,4	x		73,2
GW	GH	53,1	51,9	59,5	50,3	45,6	AG	GH	38,8	70,0	x	x	x
	FL	57,6	52,2	53,6		50,3		FL	55,0	61,6	x		x

Neben den selbst kultivierten Pflanzengewebe wurde zusätzlich das Ausgangsmaterial auf seinen GA-Gehalt untersucht. Die ermittelten Konzentrationen sind in Tabelle 5.23 zu finden. Da es sich größtenteils um Pflanzknollen mit Sprossansatz handelte wurden die Konzentrationen in Kartoffelfleisch, Schale und den Sprossen untersucht.

**Tab. 5.23** Ermittelte  $\alpha$ -Solanin-,  $\alpha$ -Chaconin- und Gesamt-Gehalte [mg/100 g TG] im Ausgangsmaterial der traditionellen Kartoffelsorten.

	Fleisch			Schale			Sprosse		
	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-knolle	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-knolle	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-knolle
<b>AV</b>	1,98	4,94	6,92	71,88	134,44	206,32	2073,91	2468,19	4542,10
<b>BA</b>	1,65	3,00	4,65	152,14	148,99	300,63	3416,18	3908,90	7325,68
<b>BH</b>	10,45	10,98	21,43	111,92	211,30	323,22	3414,03	4430,27	7844,30
<b>BI</b>	1,27	2,15	3,41	102,20	38,08	140,28	2517,79	1234,63	3752,40
<b>EB</b>	8,47	11,62	20,21	123,33	135,9	262,23	2931,77	3610,78	6542,55
<b>FA</b>	1,14	2,34	3,48	49,25	90,32	138,57	2823,82	3721,43	6545,25
<b>GW</b>	10,36	9,32	19,68	53,65	56,74	113,39	4575,37	4621,76	9197,13
<b>LR</b>	5,42	8,11	13,53	75,74	168,42	262,16	1773,29	1920,78	3694,07
<b>NK</b>	1,04	1,82	2,86	42,11	66,71	108,82	2768,70	2663,71	5432,41
<b>PF</b>	8,12	11,05	19,17	90,05	149,17	239,22	3104,45	4034,67	7139,12
<b>RD</b>	0,16	0,78	0,94	297,17	265,53	562,70	2111,78	4678,07	6789,85
<b>RL</b>	1,48	2,28	3,76	64,49	81,13	145,62	3155,77	2632,14	5787,91
<b>RO</b>	1,41	3,07	4,48	66,84	86,79	153,63	1457,05	2285,57	3742,62

### 5.2.2.2 Weiteres Knollenmaterial

Die Ergebnisse acht weiterer traditioneller Kartoffelsorten, bei denen wiederum Fleisch, Schale und Gesamtknolle auf ihren Alkaloidgehalt analysiert wurden, zeigt Tabelle 5.24.

**Tab. 5.24** Übersicht über die ermittelten Gesamt-GA-Gehalte [mg/100 g TG] in Fleisch, Schale und Gesamtknolle weiterer traditioneller Kartoffelsorten.

	Fleisch			Schale			Knolle			
	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-GA	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-GA	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-GA TG	Gesamt-GA FG <sup>1</sup>
	x	x	x	x	x	x	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$
<b>AS</b>	0,36	0,80	1,16	33,51	88,63	122,14	8,84 $\pm$ 1,23	16,73 $\pm$ 6,51	25,57 $\pm$ 7,74	3,28 $\pm$ 1,28
<b>BH2</b>	1,31	2,18	3,48	42,19	86,72	128,90	38,88 $\pm$ 11,08	68,46 $\pm$ 11,22	107,33 $\pm$ 22,05	13,03 $\pm$ 2,80
<b>DS</b>	1,35	2,17	3,52	38,15	72,97	111,12	31,85 $\pm$ 0,48	54,23 $\pm$ 19,50	86,07 $\pm$ 19,89	10,54 $\pm$ 4,02
<b>ER</b>	0,51	0,98	1,48	54,00	111,33	165,33	37,07 $\pm$ 23,52	31,80 $\pm$ 20,77	68,87 $\pm$ 44,30	5,81 $\pm$ 3,50
<b>FR</b>	0,33	0,66	0,99	25,87	47,54	73,41	6,53 $\pm$ 0,89	8,62 $\pm$ 0,67	15,14 $\pm$ 1,56	1,92 $\pm$ 0,15
<b>OB</b>	0,63	1,20	1,82	25,62	60,13	85,74	7,73 $\pm$ 3,21	17,46 $\pm$ 4,43	25,18 $\pm$ 7,63	3,40 $\pm$ 1,02
<b>PB</b>	5,00	12,44	17,43	22,79	39,69	62,48	10,50 $\pm$ 0,75	19,37 $\pm$ 7,62	29,88 $\pm$ 8,38	3,06 $\pm$ 0,77
<b>PV</b>	0,87	1,51	2,37	36,16	40,69	76,85	18,06 $\pm$ 1,01	12,39 $\pm$ 3,07	30,45 $\pm$ 4,08	2,61 $\pm$ 0,80

<sup>1</sup> auf das FG berechnet

Über die Verteilung der Alkaloide in Schale und Kartoffelfleisch dieser Sorten gibt Tabelle 5.25 Auskunft. Wie zuvor konnte in den Randschichten eine höhere Alkaloidkonzentration detektiert werden. Auffallend war die geringere Dominanz der Schale, in der durchschnittlich nur 2/3 der Alkaloide lokalisiert waren.

**Tab. 5.25** Prozentualer GA-Anteil [%] in der Schale weiterer traditioneller Kartoffelsorten.

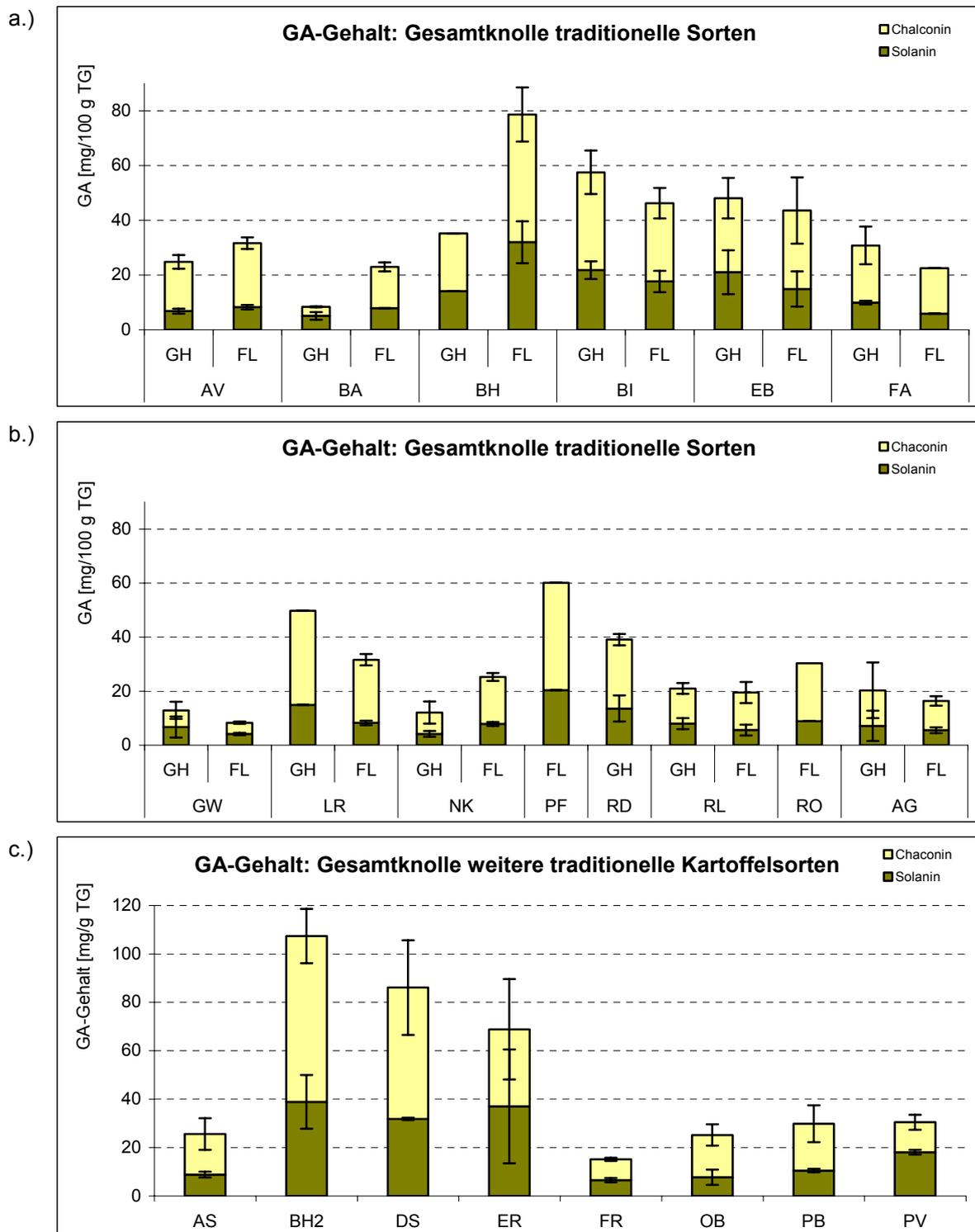
Sorte	Schale	Sorte	Schale
AS	69,5	FR	71,2
BH2	72,0	OB	65,9
DS	69,0	PB	75,4
ER	66,5	PV	60,0

Den Anteil des toxischeren  $\alpha$ -Chaconins im analysierten Gewebe zeigt Tabelle 5.26. Wie zuvor konnte eine Verteilung zu Gunsten des  $\alpha$ -Chaconins nachgewiesen werden, wobei zwischen Fleisch und Schale kein deutlicher Unterschied zu erkennen war. Der prozentuale Anteil im Schalengewebe war nur geringfügig höher als im Kartoffelfleisch.

**Tab. 5.26** Prozentualer Anteil an  $\alpha$ -Chaconin [%] in Fleisch, Schale und Gesamtknolle in den weiteren traditionellen Kartoffelsorten.

Sorte	Fleisch	Schale	Gesamt- knolle	Sorte	Fleisch	Schale	Gesamt- knolle
AS	69,2	72,6	65,4	FR	67,1	64,8	56,9
BH2	62,5	67,3	63,8	OB	65,6	70,1	69,3
DS	61,7	65,7	63,0	PB	63,5	53,0	40,7
ER	65,9	67,3	46,2	PV	71,3	63,5	64,8

Die folgenden Abbildungen 5.8a bis c zeigen einen Überblick über die in den Knollen der analysierten traditionellen Kartoffelsorten detektierten Alkaloidgehalte. Bild a und b zeigt die Sorten aus Eigenanbau, Bild c die Knollen der weiteren Sorten.



**Abb. 5.8** Gegenüberstellung der GA-Gehalte [mg/100 g TG] in Knollen der:  
a/b.) traditionellen Kartoffelsorten aus Eigenanbau,  
c.) weiteren traditionellen Kartoffelsorten.

### 5.2.3 GA-Muster traditioneller Kartoffelsorten

Zur Überprüfung der in den HPLC-Analysen detektierten Peaks wurden die methanolischen Extrakte aus Blattspitze und Gesamtknolle jeder Sorte per LC-ESI-MS untersucht. Die hierzu verwendeten Parameter sind Kapitel III, Abschnitt 3.5.2 zu entnehmen. Identifizierte Alkaloide waren in chronologischer Reihenfolge: Solasonin (16,4 min), Solamargin (17,0 min),  $\alpha$ -Solanin (18,5 min) und schließlich das unpolare  $\alpha$ -Chaconin (20,0 min) (vgl. Tab. 5.27). Zur Interpretation der MS-Spektren sei an dieser Stelle auf die *Solanum*-Wildarten in Abschnitt 5.3.3 verwiesen.

In Abbildung 5.9 ist als Beispiel die LC-ESI-MS-Analyse des Beerenextraktes der Sorte La Ratte dargestellt. Bild a zeigt die Ionenspuren  $m/z$  852, 868, 884 der genannten Alkaloide, im unteren Bild ist das Massenspektrum der gesamten Analyse zu sehen. In Anhang B, Abbildungen B.1 bis B.2 sind die zugehörigen MS-Spektren, Fragmentionen und Fragmentierungsschemata hinterlegt.

**Tab. 5.27** Übersicht über die in traditionellen Kartoffelsorten detektierten GAe mit Angabe des Moleküliions sowie der zugehörigen Fragmentionen.

Substanz	Moleküliion [M+H <sup>+</sup> ]	Fragmentionen				
$\alpha$ -Chaconin	852	706	560	398	380	
$\alpha$ -Solanin	868	722	706	560	398	380
Solamargin	868	722	576	414	396	
Solasonin	884	738	722	576	414	396

Tabelle 5.28 zeigt in einer Übersicht das Ergebnis der LC-ESI-MS-Analysen. Für jede Sorte ist das Vorkommen der verschiedenen GAe in den untersuchten Geweben dargestellt, wobei die Angabe der Menge relativ zu sehen ist. Mit (+++) wurden jeweils die Hauptalkaloide angegeben, mit (++) die nächst niedrigeren Gehalte. (+) entspricht dem Vorkommen in Spuren. Konnten keinerlei Anzeichen des betreffenden GAs gefunden werden, so wurde dies mit (–) gekennzeichnet. Ein Vergleich der Absolutmengen zwischen den Arten kann somit nicht angestellt werden. Die rechte Spalte gibt weitere  $m/z$ -Ionen an, die durch ihre Molekülmasse auf das Vorliegen von GAen deuten.

Übereinstimmend mit den HPLC-Resultaten konnte in den Knollen aller Sorten  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin als Hauptalkaloide detektiert werden. Ferner fanden sich in Golden Wonder und Nageler Kipfler Spuren von Solasodin und Solamargin. Durch ihre niedrige Konzentration unterhalb der HPLC-Nachweisgrenze, konnten sie dort weder registriert noch quantifiziert werden. Wie aus der Tabelle weiter zu entnehmen ist, wurden neben den bekannten

Alkaloiden noch weitere  $m/z$ -Ionen registriert, die auf das Vorkommen von GAen schließen lassen. Vorherrschend waren die  $m/z$ -Werte 850 und 866, in den Sorten La Ratte und Nageler Kipfler zusätzlich  $m/z$  926.

Im Gegensatz zu den Knollen konnten im oberirischen Material neben den Solanidin-Alkaloiden in allen Sorten mehr oder weniger große Mengen an Solasonin und Solamargin erfasst werden. In den Sorten Bamberger Hörnchen, La Ratte, Nageler Kipfler und Pink Fir Apple bildeten sie in Blättern und Sprossachsen die Hauptalkaloide. Wie zuvor im Knollenmaterial konnten weitere, alkaloidähnliche Strukturen nachgewiesen werden. Neben den bereits erwähnten  $m/z$ -Ionen 850 und 866 lag in den Sorten Balmoral, Bildstar, Nageler Kipfler und Rosara das  $m/z$ -Ion 886 vor. In Bamberger Hörnchen und La Ratte zusätzlich  $m/z$  910 und 926.

Ferner wurden exemplarisch drei Wurzelextrakte der Sorten Edzell Blue, Arran Victory und Agria auf ihre GA-Muster hin untersucht. Wie die HPLC-Analyse bereits offenbarte, waren die Hauptalkaloide  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin, Solasonin und Solamargin sowie die  $m/z$ -Ionen 850, 866 und 706 konnten in Spuren nachgewiesen werden. Bei letzterem handelt es sich um das Spaltprodukt  $\beta$ -Chaconin, das durch Abspaltung einer endständigen Rhamnose aus  $\alpha$ -Chaconin entsteht, woraus sich die um 146 Einheiten niedrigere Masse erklärt (vgl. Anhang B.1).

**Tab. 5.28** Übersicht über die in traditionellen Kartoffelsorten detektierten GAE mit Angabe ihres relativen Vorkommens.

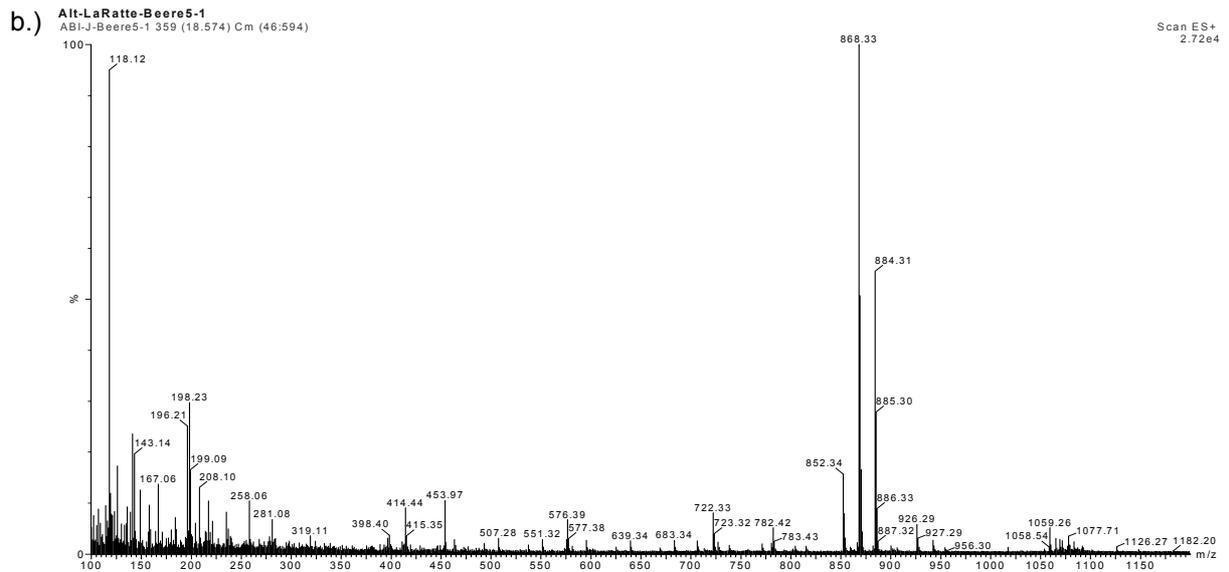
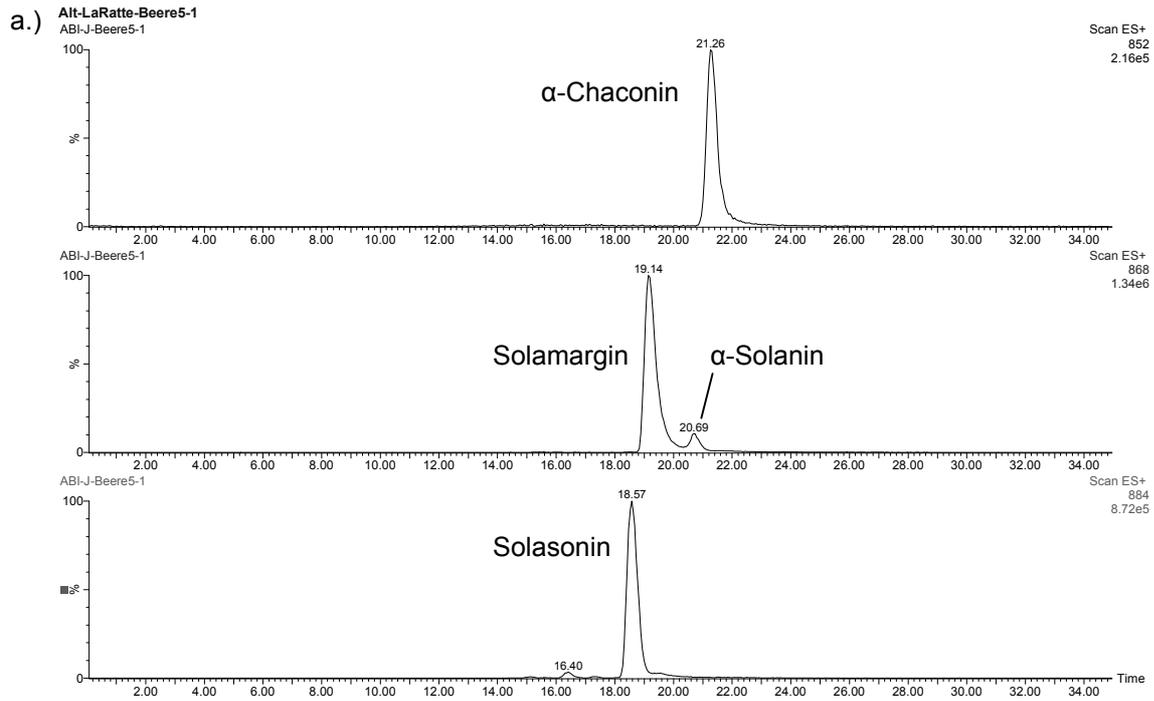
Sorte		$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Solasonin	Solamargin	$(m/z)^1$
AV	Blatt	+++	+++	+	+	850 866
	Knolle	+++	+++	-	-	866
	Wurzel	+++	+++	+	+	706 866
BA	Blatt	+++	+++	+	+	866 886
	Knolle	+++	+++	-	-	850 866
BH	Blatt	+	++	++	++	850 866 910 926
	Knolle	+++	+++	-	-	850 866
BI	Blatt	+++	+++	+	+	866 886
	Knolle	+++	+++	-	-	850 866
EB	Blatt	+++	+++	+	+	866
	Knolle	+++	+++	-	-	850 866
	Wurzel	+++	+++	+	+	-

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von voriger Seite

Sorte		$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Solasonin	Solamargin	( <i>m/z</i> ) <sup>1</sup>
FA	Blatt	+++	+++	+	+	866
	Knolle	+++	+++	-	-	866
GW	Blatt	+++	+++	+	+	-
	Knolle	+++	+++	+	+	-
LR	Blatt	++	++	++	++	866 926
	Knolle	+++	+++	-	-	866
	Beere	+	+	+++	+++	886 926
NK	Blatt	+	++	+++	+++	850 866 886
	Knolle	+++	+++	-	-	866
PF	Blatt	+	++	+++	+++	866
	Knolle	+++	+++	-	-	866
RD	Blatt	+++	+++	++	+	866
	Knolle	+++	+++	-	-	850 866
RL	Blatt	+++	+++	+	+	886
	Knolle	+++	+++	-	-	866
RO	Blatt	+++	+++	+	+	850 886
	Knolle	+++	+++	-	-	850 866
AG	Blatt	+++	+++	+	+	850 866
	Knolle	+++	+++	+	+	866
	Wurzel	+++	+++	+	+	706 850 866

<sup>1</sup> weitere *m/z*-Ionen mit alkaloidähnlicher Masse

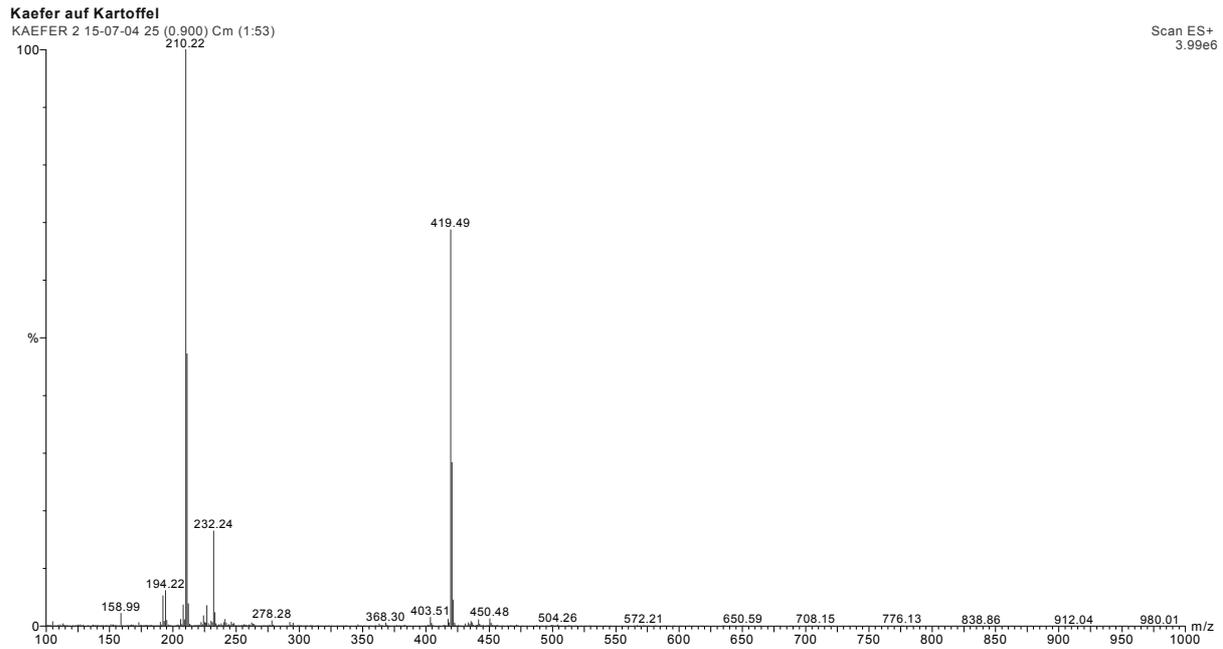


**Abb. 5.9**

- a.) Ionenchromatogramm für die Massenspuren  $m/z$  852, 868 und 884 des Beerenextraktes der Sorte La Ratte.  
 b.) Zugehöriges MS-Spektrum des untersuchten Massenbereiches ( $m/z$  100 bis 1200).

## 5.2.4 GA-Aufnahme durch Marienkäferlarven (*Coccinellidae*)

Die Untersuchung der methanolischen Extrakte aus Marienkäferlarven erfolgte auf Grund der erwarteten niedrigen Konzentration direkt per LC-ESI-MS. Das Vorgehen zur Aufarbeitung der Larven ist in Kapitel III, Abschnitt 3.7.5 beschrieben. Das in Abbildung 5.10 dargestellte MS-Spektrum zeigt das Ergebnis der Analyse. Im Extrakt konnten keinerlei Spuren der Alkaloide  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin oder des Aglykons Solanidin nachgewiesen werden.



**Abb. 5.10** MS-Spektrum des methanolischen Extraktes aus Marienkäferlarven (*Coccinellidae*).

## 5.3 *Solanum*-Wildarten

### 5.3.1 Methodenanpassung

Die in Kapitel III, Abschnitt 3.1.3 aufgelisteten Knollen- und Blattproben wurden quantitativ auf ihren Alkaloid-Gehalt sowie qualitativ auf das Vorkommen verschiedener Alkaloidarten untersucht. Zur Extraktion der GAe aus gefriergetrocknetem, homogenisierten Gewebe (vgl. Angaben Tab. 5.28) diente das in Kapitel III, Abschnitt 3.4.2, Variante A beschriebenen Verfahren. Nach der Aufreinigung der Extrakte gemäß den Vorgaben aus Abschnitte 3.4.3 wurde der trockene Rückstand in MeOH aufgenommen, wovon 20 µl zu quantitativen Analyse in die HPLC und weitere 20 µl zur qualitativen Untersuchung in die LC-ESI-MS injiziert wurden. War die Alkaloidkonzentration sehr hoch, wurde der Extrakt nochmals 1:1 (v,v) verdünnt.

**Tab. 5.29** Übersicht über Einwaage [g], Kartuschenbeladung [ml] und MeOH-Aufnahmevermögen [ml] für die Analyse traditioneller Kartoffelsorten mittels HPLC.

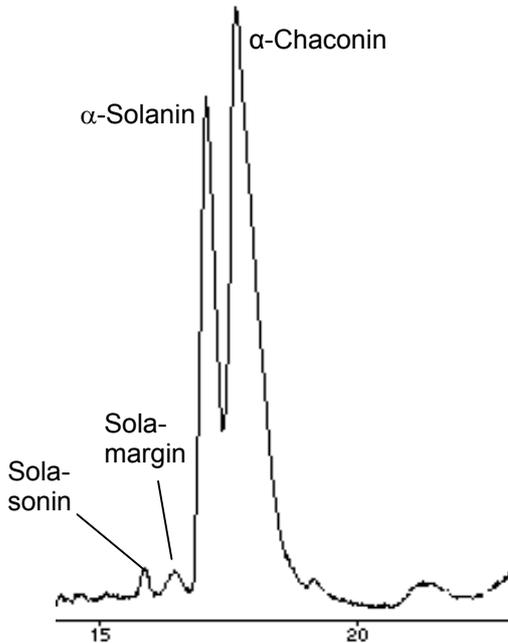
Probe	EW	RP-18-Beladung	Aufnahmevermögen
Blatt	0,3	5	250
Knolle	3,0	8	300

### 5.3.2 GA-Gehalt wilder *Solanum*-Arten

Zunächst wurden die GA-Gehalte der methanolischen Extrakte aus Abschnitt 5.3.1 mittels HPLC analysiert. Die zur Quantifizierung verwendete Methode ist Kapitel III, Abschnitt 3.5.1 zu entnehmen.

Da zur Detektion der GAe nur ein Diodenarray-Detektor zur Verfügung stand, war die Detektion auf Alkaloide begrenzt, die mindestens eine Doppelbindung aufwiesen. Dies sind die bereits bei den Kultursorten nachgewiesenen Solanidin- und Solasodin-Alkaloide sowie die Leptine, Leptidine und die Dehydroformen von Demissin,  $\alpha$ -Tomatin und Commersonin. Die Identifikation von  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin erfolgte wieder durch Vergleich der Retentionszeit nach Injektion von Standardsubstanzen, Solasonin und Solamargin durch Gegenüberstellung mit den LC-ESI-MS-Daten. Bei den übrigen detektierbaren Alkaloiden war eine direkte Zuordnung der Peaks aus LC-ESI-MS und HPLC nicht möglich. Da die meisten *Solanum*-Arten die identifizierten Alkaloide als Leitstrukturen enthielten, wurden nur diese zur Quantifizierung herangezogen. Die sich ergebenden Retentionszeiten waren in

chronologischer Reihenfolge für Solasonin 15,6 min, Solamargin 16,3 min,  $\alpha$ -Solanin 16,8 min und für das unpolare  $\alpha$ -Chaconin 17,3 min. Folgende Abbildung 5.11 zeigt das HPLC-Chromatogramm des Blattextraktes aus *S. phureja* ssp. *phureja*. Als Hauptalkaloide konnten  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin identifiziert werden, in geringer Konzentration auch die beiden Solasodin-Alkaloide.



**Abb. 5.11**  
HPLC-Chromatogramm des Blattextraktes aus *S. phureja* ssp. *phureja*.  
(Chromatographische Bedingungen siehe Kapitel III, Abschnitt 3.5.1).

Die sich anschließenden Tabellen 5.30.1 und 5.30.2 geben die nach HPLC-Analyse ermittelten Gehalte der vier Hauptalkaloide  $\alpha$ -Solanin,  $\alpha$ -Chaconin, Solasonin und Solamargin a.) in den Blättern bzw. b.) in Knollen wieder. Für jede Art und jedes Gewebe wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Gehalte verstehen sich als Mittelwerte dieser Doppelbestimmungen, wobei durch die geringe Zahl an Ansätzen auf die Angabe von Standardabweichungen verzichtet wurde.

In allen untersuchten Geweben konnten GAe nachgewiesen werden, wobei sich die Konzentrationen sowohl in den Blättern (28,87 bis 2664,57 mg/100 g TG) wie auch in den Knollen (2,12 bis 1038,86 mg/100 g TG) zwischen den Arten sehr unterschieden. Insgesamt waren bis auf eine Ausnahmen, *S. bulbocastanum* ssp. *bulbocastanum*, die Gehalte in oberirdischen Blättern höher. Zurückzuführen war dies unter anderem auf die zusätzlichen Vorkommen von Solasonin und Solamargin. Während die Solasodin-Alkaloide in Knollen nur in geringem Umfang enthalten waren, konnten sie in den Blattproben z. T. in beträchtlichem Umfang nachgewiesen werden. Hohe Gehalte (> 500 mg/100 g TG) zeigten *S. ajanhuiri*, *S. chaucha*, *S. demissum*, *S. microdontum*, *S. pascoense* und schließlich *S. tarjense*, dort traten sie als Hauptalkaloide auf.

**Tab. 5.30.1** Ermittelte Gehalte der vier Hauptalkaloide ( $\alpha$ -Solanin,  $\alpha$ -Chaconin, Solasonin, Solamargin) [mg/100 g TG] in den Blättern wilder *Solanum*-Arten.

Art	Detektierte GA-Gehalte					
	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ - Chaconin	Sola- sonin	Sola- margin	Gesamt-GA TG	Gesamt-GA <sup>3</sup> FW
<i>S. acaule</i> ssp. <i>acaule</i>	Sp. <sup>1</sup>	Sp. <sup>1</sup>	51,24	69,81	121,05	18,18
<i>S. ajanhuiri</i>	Sp. <sup>1</sup>	25,86	473,33	949,98	1449,17	217,38
<i>S. alandiae</i>	918,17	1743,17	3,23	Sp. <sup>1</sup>	2664,57	399,69
<i>S. bulbocastanum</i> ssp. <i>bulbocastanum</i>	10,66	34,93	<sup>2</sup>	<sup>2</sup>	45,59	6,82
<i>S. chaucha</i>	61,82	116,93	283,42	391,44	829,47	124,42
<i>S. chomatophilum</i>	2,99	16,98	28,03	16,07	64,07	9,61
<i>S. curtilobum</i>	37,68	106,82	Sp. <sup>1</sup>	Sp. <sup>1</sup>	144,50	21,68
<i>S. demissum</i>	Sp. <sup>1</sup>	9,13	583,25	297,20	889,58	133,44
<i>S. maglia</i>	13,13	31,51	29,86	152,84	227,34	34,10
<i>S. microdontum</i>	33,68	50,01	963,56	823,06	1870,31	280,55
<i>S. pascoense</i>	42,83	15,26	218,62	545,70	822,41	123,36
<i>S. phureja</i> ssp. <i>phureja</i>	425,61	974,70	22,34	30,61	1453,26	217,99
<i>S. polyadenium</i>	6,14	47,06	Sp. <sup>1</sup>	Sp. <sup>1</sup>	53,20	7,98
<i>S. raphanifolium</i>	1,68	27,19	Sp. <sup>1</sup>	Sp. <sup>1</sup>	28,87	4,33
<i>S. sparsipilum</i>	563,86	948,10	7,12	1,23	1520,31	228,05
<i>S. tarijense</i>	Sp. <sup>1</sup>	46,77	968,86	1353,89	2369,52	355,48
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> (Argentinien, weiß)	208,63	52,45	92,10	2,61	355,79	53,37
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> (Argentinien, violett)	8,91	64,43	6,84	Sp. <sup>1</sup>	80,18	12,03
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> (Peru)	Sp. <sup>1</sup>	11,12	352,45	208,63	572,20	85,83

<sup>1</sup> in Spuren<sup>2</sup> nicht detektiert<sup>3</sup> berechnet auf das Frischgewicht

**Tab. 5.30.2** Ermittelte Gehalte der vier Hauptalkaloide ( $\alpha$ -Solanin,  $\alpha$ -Chaconin, Solasonin, Solamargin) [mg/100 g TG ] in den Knollen wilder *Solanum*-Arten.

Art	Detektierte GA-Gehalte					
	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ - Chaconin	Sola-sonin	Sola-margin	Gesamt-GA TG	Gesamt-GA <sup>3</sup> FG
<i>S. acaule</i> ssp. <i>acaule</i>	0,97	1,15	Sp. <sup>1</sup>	Sp. <sup>1</sup>	2,12	0,84
<i>S. alandiae</i>	159,56	236,42	Sp. <sup>1</sup>	n. d. <sup>2</sup>	395,98	136,08
<i>S. bulbocastanum</i> ssp. <i>bulbocastanum</i>	4,99	6,91	256,07	770,89	1038,86	293,46
<i>S. chaucha</i>	13,89	16,28	Sp. <sup>1</sup>	Sp. <sup>1</sup>	30,17	6,26
<i>S. curtilobum</i>	14,85	13,43	0,19	1,32	29,79	6,14
<i>S. demissum</i>	3,61	0,63	Sp. <sup>1</sup>	Sp. <sup>1</sup>	4,24	1,33
<i>S. maglia</i>	187,48	250,01	2,02	1,81	441,32	144,12
<i>S. microdontum</i>	141,36	90,62	3,03	5,73	240,74	89,83
<i>S. phureja</i> ssp. <i>phureja</i>	15,91	7,65	Sp. <sup>1</sup>	Sp. <sup>1</sup>	23,56	5,95
<i>S. polyadenium</i>	Sp. <sup>1</sup>	Sp. <sup>1</sup>	n. d. <sup>2</sup>	n. d. <sup>2</sup>	Sp. <sup>1</sup>	Sp. <sup>1</sup>
<i>S. raphanifolium</i>	26,60	51,36	Sp. <sup>1</sup>	Sp. <sup>1</sup>	77,96	24,75
<i>S. sparsipilum</i>	69,86	115,87	1,03	0,94	187,70	142,20
<i>S. tarijense</i>	19,57	23,23	0,25	Sp. <sup>1</sup>	43,05	14,95
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> (Argentinien, weiß)	19,05	17,89	Sp. <sup>1</sup>	n. d. <sup>2</sup>	36,94	14,65
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> (Argentinien, violett)	2,83	4,58	n. d. <sup>2</sup>	Sp. <sup>1</sup>	7,41	1,97
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> (Peru)	19,31	32,67	Sp. <sup>1</sup>	Sp. <sup>1</sup>	51,98	5,00

<sup>1</sup> in Spuren<sup>2</sup> nicht detektiert<sup>3</sup> berechnet auf das Frischgewicht

In den Knollen waren, ähnlich der Kulturkartoffel,  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin die Leitstrukturen. Eine Ausnahme bildete, wie bereits angedeutet, *S. bulbocastanum* ssp. *bulbocastanum*. Vorkommende Alkaloidarten waren zwar wie in den anderen Sorten die Solanidin- und Solasodin-Alkaloide, die Mengenverteilung war jedoch gegensätzlich. Nicht die Solanidin-Alkaloide, sondern Solasonin und Solamargin traten als Hauptalkaloidfraktion in einer vergleichsweise hohen Konzentration auf. Von allen analysierten Wildarten enthielt

*S. bulbocastanum* ssp. *bulbocastanum* mit 1038,86 mg/100 g TG die höchsten Knollengehalte.

Ebenfalls hohe Knollenkonzentrationen, die über dem für Speisekartoffeln als unbedenklich geltenden Grenzwert von 20 mg/100 g FG lagen, fanden sich zudem in *S. alandiae*, *S. maglia*, *S. microdontum*, *S. raphanifolium* und *S. sparsipilum*. In diesem Zusammenhang ist allerdings das unübliche Alkaloidmuster der Spezies *S. acaule* ssp. *acaule*, *S. curtilobum*, *S. demissum* und *S. polyadenium* zu beachten (vgl. Abschnitt 5.3.3). Da sich die Quantifizierung auf die UV-detektierbaren Solanidin- und Solasodin-Alkaloide beschränkte, fällt deren Alkaloidgehalt zu niedrig aus.

Die GA-Konzentration in den Knollen der noch heute in Lateinamerika konsumierten Arten *S. tuberosum* ssp. *andigena* und *S. phureja* ssp. *phureja* rangierten mit maximal 14,65 mg/100 g FG unter dem Grenzgehalt.

Die Arten *S. ajanhuiri*, *S. pascoense* und *S. chomatophilum* fehlen in der Aufstellung der Knollenkonzentrationen, da sie im Untersuchungsjahr keine Knollen ausbildeten.

Bei Wildarten sollte zur besseren Vergleichbarkeit der Alkaloidgehalte die Knollengröße mit in die Betrachtung einbezogen werden, da unterschiedliche Entwicklungsgeschwindigkeiten durch verschiedene Kultivierungsarten (Freiland und Gewächshaus) und artspezifisch kleine Knollen die Alkaloidkonzentration stark beeinflussen können. Allgemein beinhalten kleine Knollen, durch deren größeres Verhältnis von alkaloidreicher Schale zu Kartoffelfleisch, höhere GA-Mengen als große Knollen mit kleinerem Quotienten. Tabelle 5.31 stellt diese Abhängigkeit dar. Die Knollengrößen der im Freiland kultivierten Arten *S. tuberosum* ssp. *andigena*, *S. chaucha*, *S. phureja* ssp. *phureja* und *S. curtilobum* lagen allesamt über 20 g FG, ihre Gesamt-GA-Gehalte unter 50 mg/100 g TG. Bei den übrigen Arten aus Gewächshausanbau stieg das Knollengewicht nicht über 20 g FG, während ihre Alkaloidkonzentration die Marke von 50 mg/100 g TG überschritten. Die vier Wildarten *S. acaule* ssp. *acaule*, *S. chomatophilum*, *S. demissum* und *S. polyadenium* sind aus den vorangegangenen Gründen als Ausnahmen zu betrachten.

**Tab. 5.31** Einfluss des Kultivierungsstandorts und des Knollengewichtes [g FG] auf den Alkaloidgehalt [mg/100 g TG].

<b>Solanum Art</b>	<b>Kultivierungs-ort</b>	<b>Knollen-gewicht</b>	<b>GA Gehalt</b>
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> (Argentinien)	Feldanbau	> 50	< 50
<i>S. chaucha</i>			
<i>S. phureja</i> ssp. <i>phureja</i>		20-50	
<i>S. curtilobum</i>			
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> (Peru)			
<i>S. raphanifolium</i>	Gewächs- haus	< 20	> 50
<i>S. microdontum</i>			> 100
<i>S. sparsipilum</i>			> 100
<i>S. alandiae</i>			> 100
<i>S. tarijense</i>			< 50
<i>S. maglia</i>			> 100
<i>S. acaule</i> ssp. <i>acaule</i>			< 50
<i>S. demissum</i>			< 50
<i>S. bulbocastanum</i> ssp. <i>bulbocastanum</i>			> 100
<i>S. polyadenium</i>			< 50

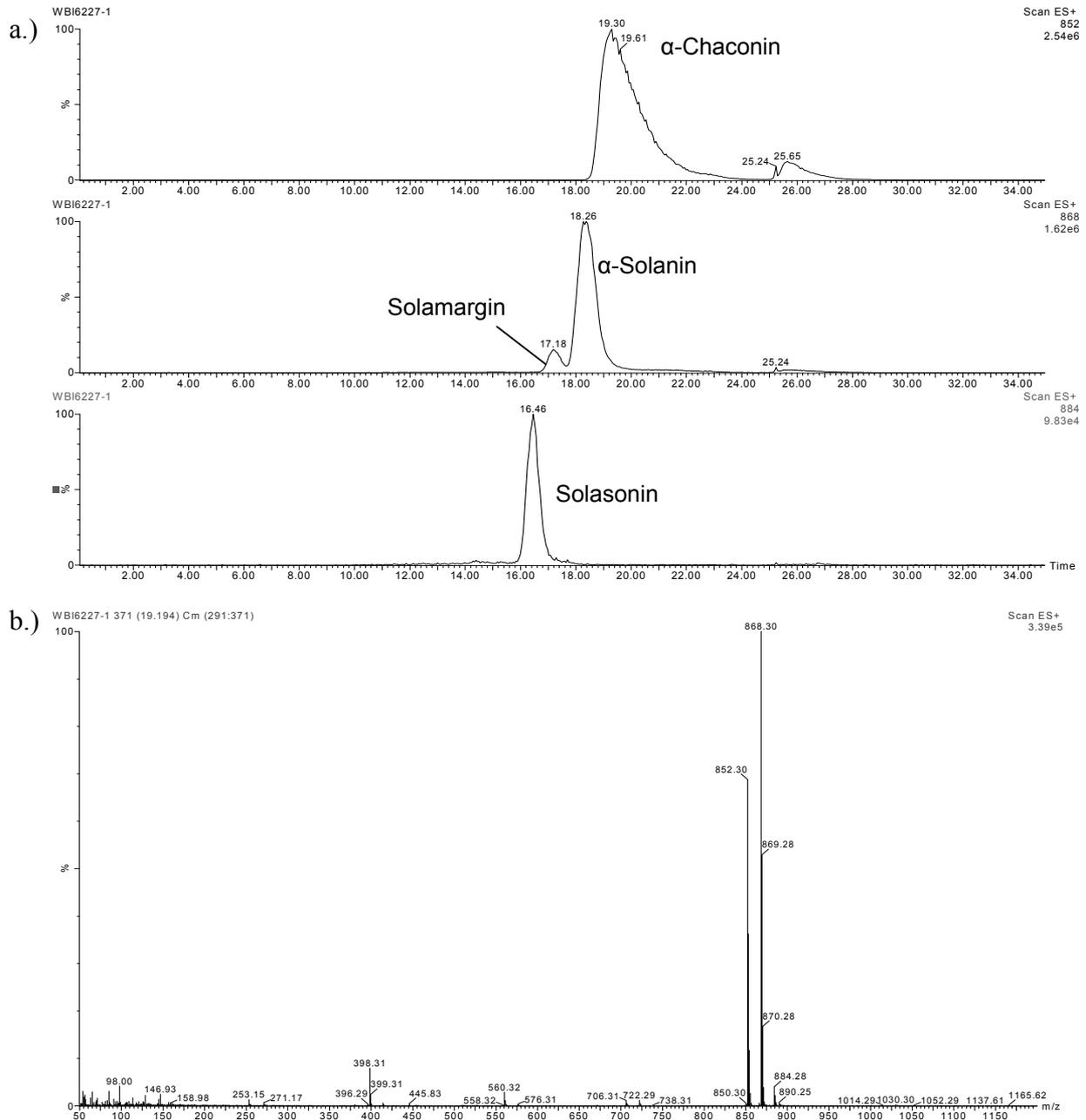
### 5.3.3 GA-Muster wilder *Solanum*-Arten

Die methanolischen Extrakte der 15 *Solanum*-Wildarten sowie drei identischer Arten unterschiedlicher Herkunft oder Blütenfarbe wurde nach der quantitativen Analyse einem qualitativen Screening ihrer Alkaloidmuster mittels LC-ESI-MS unterworfen. Die verwendeten Parameter der LC-Trennung und MS-Detektion sind aus Kapitel III, Abschnitt 3.5.2 zu entnehmen.

Die *Solanum*-Arten zeigten eine mehr oder weniger große Vielfalt an vorkommenden Strukturen. Detektierte Alkaloide waren in chronologischer Reihenfolge ihrer Retentionszeiten: Dehydrocommersonin (15,2 min), Dehydrotomatin (15,7 min), Solasonin (16,4 min), Commersonin (17,0 min),  $\alpha$ -Tomatin (17,0 min), Solamargin (17,0 min), Leptin II (17,5 min), Dehydrodemissin (17,9 min), Leptin I (18,2 min), Demissin (18,3 min) und schließlich die unpolaren GAe  $\alpha$ -Solanin (18,5 min) und  $\alpha$ -Chaconin (20,0 min).

Die Darstellung einzelner Massenspuren erlaubte es, auf eine vollständige chromatographische Auftrennung zu verzichten. Abb. 5.11 zeigt als Beispiel die

Ionenchromatogramme des bereits vorgestellten Blattextraktes aus *S. phureja* ssp. *phureja* mit den Massenspuren  $m/z$  852 für  $\alpha$ -Chaconin,  $m/z$  868 für  $\alpha$ -Solamin und Solamargin und  $m/z$  884 für Solasonin. Die zugehörigen MS-Spektren können in Anhang B, Abbildungen B.1 bis B.7 eingesehen werden. In der Abbildung ist das gesamte Massenspektrum über den analysierten Bereich  $m/z$  100 bis 1200 dargestellt.



**Abb. 5.12**

- a.) Ionenchromatogramm für die Massenspuren  $m/z$  852, 868 und 884 des Blattextraktes aus *S. phureja* ssp. *phureja*.  
 b.) Zugehöriges MS-Spektrum des analysierten Massenbereiches ( $m/z$  100 bis 1200).

Die MS-Spektren der einzelnen Massenspuren des LC-ESI-MS-Chromatogramms enthielten als Hauptpeak jeweils das protonierte Molekülion  $[M+H^+]$ . Zusätzlich fanden sich charakteristische Fragmentionen bei  $m/z$  722, 706, 560, 398 für die Solanidin-GAe bzw.  $m/z$  722, 704, 576, 414 und 396 für die Solasodin-Alkaloide. Sie sind auf den Verlust der Zuckermoleküle und von Wasser zurückzuführen. Die Übersicht in Tabelle 5.32 zeigt die in den *Solanum*-Arten detektierten Substanzen mit ihren protonierten Molekülionen sowie deren Fragmentionen. Zur Identifizierung der Substanzen wurden diese mit publizierten Literaturdaten verglichen. In Anhang B sind die MS-Spektren der in dieser Arbeit behandelten GAe aufgelistet sowie aus der Literatur entnommene Fragmentionen und die zugehörigen Fragmentierungsschemata der jeweiligen Substanzen.

**Tab. 5.32** Übersicht über die in *Solanum*-Wildarten detektierten GAe mit Angabe des Molekülions und der zugehörigen Fragmentionen.

Substanz	Molekülion [M+H <sup>+</sup> ]	Fragmentionen							
$\alpha$ -Chaconin	852	706	560	398	380				
$\alpha$ -Solanin	868	722	706	560	398	380			
Solamargin	868	722	576	414	396				
Solasonin	884	738	722	576	414	396			
Dehydrodemissin	1016	884	854	722	560	398			
Demissin	1018	886	856	724	562	400			
Dehydrotomatin	1032	1014	900	870	738	576	558	414	396
$\alpha$ -Tomatin	1034	1016	902	872	740	578	560	416	398
Dehydro- commersonin	1046	884	866	722	560	398			
Commersonin	1048	886	868	724	562	400			

Tabelle 5.33 zeigt in einer Übersicht das Ergebnis der LC-ESI-MS-Analysen. Wie bei den traditionellen Sorten erfolgte die Mengenangabe relativ und kann somit zwischen den Arten nicht verglichen werden. Spalte 9 gibt weitere detektierte  $m/z$ -Ionen an, die durch ihre Molekülmasse auf ein Vorliegen von GAen deuten.

**Tab. 5.33** Übersicht über die in *Solanum*-Wildarten detektierten GAE mit Angabe ihres relativen Vorkommens.  
(+++)= Hauptalkaloid, (++) = Nebenalkaloid, (+) = Spuren, (-) = nicht detektiert.

Art		Glykoalkaloide													9 [m/z]
		1	2a	2b	3	4	5a	5b	6a	6b	7a	7b	8a	8b	
<i>S. acaule</i> ssp. <i>acaule</i>	Blatt	+	+	+	++	++	+++	++	+++	++	++	+	-	-	886
	Knolle	+	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+	+	-	-	886
<i>S. ajanhuiri</i>	Blatt	+	++	+	+++	+++	-	-	-	-	+	-	+	+	850 866
<i>S. alandiae</i>	Blatt	+++	+++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	850 866
	Knolle	+++	+++	++	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	850 866 886
<i>S. bulbocastanum</i> ssp. <i>bulbocastanum</i>	Blatt	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	854 866
	Knolle	+	+	-	+++	+++	-	-	-	-	-	-	+	-	850 866
<i>S. chaucha</i>	Blatt	++	+++	-	+++	+++	-	-	-	-	+	-	-	-	850 866
	Knolle	+++	+++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	850 866
<i>S. chomatophilum</i>	Blatt	+	++	+	++	++	++	+	+++	++	++	+	-	-	886
<i>S. curtilobum</i>	Blatt	++	+++	+	+	+	++	+	++	++	+	-	-	-	854 870 886
	Knolle	+++	+++	+	+	+	++	+	++	++	+	-	-	-	870 886
<i>S. demissum</i>	Blatt	+	+	-	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	850 866
	Knolle	+	+	+	+	+	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	886
<i>S. maglia</i>	Blatt	+	+	-	+++	+++	-	-	+	-	-	-	+	++	886
	Knolle	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	++	+	-	-	850 866
<i>S. microdontum</i>	Blatt	++	++		+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	850 866
	Knolle	+++	++	+++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. pascoense</i>	Blatt	++	+	++	+++	+++	-	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>S. phureja</i> ssp. <i>phureja</i>	Blatt	+++	+++	+	++	++	-	+	-	-	-	-	+	-	850 866
	Knolle	+++	+++	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	850 866

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von voriger Seite

Art		1	2a	2b	3	4	5a	5b	6a	6b	7a	7b	8a	8b	9 [m/z]
<i>S. polyadenium</i>	Blatt	+	++	+	+	+	+++	+++	++	+++	-	-	+	-	-
	Knolle	+	+	+	-	-	+++	++	+++	+++	+	+	-	-	870
<i>S. raphanifolium</i>	Blatt	+	++	-	+++	+++	+	+	-	-	-	-	-	-	866 870
	Knolle	++	+++	+++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	866
<i>S. sparsipilum</i>	Blatt	+++	+++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Knolle	+++	+++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. tarijense</i>	Blatt	+++	+++	-	+++	+++	+	-	+	+	+	-	++	+	850 866
	Knolle	+++	+++	++	++	++	+	+	+	+	-	-	+	-	866
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> (Argentinien, violett)	Blatt	++	+++	-	+	+	+	+	+	+	++	++	-	-	886
	Knolle	+++	+	+++	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> (Argentinien, weiß)	Blatt	+++	+++	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	850 866
	Knolle	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	866
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> (Peru)	Blatt	+++	+++	-	+	++	+	-	++	++	++	++	-	-	850 866
	Knolle	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	850 866

1	$\alpha$ -Solanin	5a	$\alpha$ -Tomatin	7a	Commersonin
2a	$\alpha$ -Chaconin	5b	Dehydrotomatin	7b	Dehydrocommersonin
2b	$\beta$ -Chaconin	6a	Demissin	8a	Leptin I
3	Solasolin	6b	Dehydrodemissin	8b	Leptin II
4	Solamargin			9	weitere detektierte m/z-Werte

Die qualitative Analyse der wilden *Solanum*-Arten offenbarte z. T. große Unterschiede. Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, sind zwar in den meisten die Solanidin- und Solasodin-Alkaloide vorherrschend, die Arten *S. acaule* ssp. *acaule*, *S. comatophilum*, *S. demissum* und *S. polyadenium* bildeten jedoch eine Ausnahme.

In den Knollen dominierten, ähnlich wie in der Kulturkartoffel,  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin. Zusätzlich konnten in allen Arten geringe Mengen Solasonin und Solamargin detektiert werden. Die zugehörigen Blätter wiesen hingegen bis auf die Arten *S. tuberosum* ssp. *andigena* und *S. phureja* ssp. *phureja*, Solasodin und Solamargin als Hauptalkaloide auf. Einen Sonderfall in dieser Verteilung zeigte *S. bulbocastanum* ssp. *bulbocastanum*, womit die unübliche Mengenverteilung der Gehaltsanalyse bewiesen werden konnte. Neben geringen Mengen an Solanidin-GAen waren in den Knollen Solasonin und Solamargin vorherrschend. Die Blätter enthielten dagegen nur  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin.

Im oberirdischen Gewebe war die Alkaloid-Vielfalt reichhaltiger als in den Knollen. In fast allen Wildarten konnte, neben den Solanidin- und Solasodin-Alkaloiden, noch mindestens eine Alkaloidform mit Vierfachzucker (Demissin,  $\alpha$ -Tomatin, Commersonin) detektiert werden. Für gewöhnlich waren die Konzentrationen niedrig. Eine Ausnahme bildete *S. chomatophilum* sowie die bereits erwähnten *S. acaule* ssp. *acaule*, *S. demissum* und *S. polyadenium*, in denen diese Alkaloide als Hauptkomponenten vorlagen. Die Blätter von *S. chomatophilum* enthielten als Hauptalkaloid Demissin und Dehydrodemissin, gefolgt von  $\alpha$ -Tomatin, Commersonin sowie deren Dehydro-Formen Dehydrotomatin und -commersonin. In *S. acaule* ssp. *acaule* sowie *S. polyadenium* war in den Blättern wie auch in den Knollen  $\alpha$ -Tomatin und Demissin vorherrschend, daneben kamen noch Commersonin und die dehydrierten Formen vor. Und *S. demissum* enthielt, wie der Name bereits andeutet, hohe Konzentrationen an Demissin und  $\alpha$ -Tomatin, gefolgt von deren Dehydro-Formen und von Commersonin.

Der Vergleich drei verschiedener Akzessionen von *S. tuberosum* ssp. *andigena*, die sich in der Blütenfarbe (violett und weiß) bzw. im Herkunftsort (Argentinien oder Peru) unterschieden, offenbarte ein leicht abweichendes GA-Muster im Blattgewebe. Während in den Knollen aller drei Akzessionen  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Chaconin dominierten, konnte in den Blättern der violettblühenden Akzession aus Argentinien neben Solanidin- und Solasodin-Alkaloiden, zusätzlich größere Mengen Commersonin und Dehydrocommersonin detektiert werden. Ihre weißblühende Verwandte enthielt  $\alpha$ -Tomatin, Demissin und Commersonin nur in Spuren. Die Akzession aus Peru wies außer diesen noch Demissin und Dehydrodemissin auf.

Neben den in der Literatur bereits vielfach beschriebenen Alkaloiden enthielten die meisten Arten weitere Ionen, die auf Grund ihres  $m/z$ -Verhältnisses auf eine Alkaloidstruktur deuteten. Hierzu gehörten die  $m/z$ -Werte 850, 866, 870, 886 sowie 910 und 926. Die beiden letztgenannten sind bekannt und werden als Leptin I und II bezeichnet. Bislang wurden sie in nur in *S. chacoense* beschrieben. In den vorliegenden Arten wiesen *S. ajanhuiri*, *S. alandiae*, *S. bulbocastanum* ssp. *bulbocastanum*, *S. demissum*, *S. polyadenium* und *S. tarjense* Spuren dieses GAs auf. Mögliche Strukturen der übrigen Alkaloide werden in Kapitel VI, Abschnitt 6.3.2.1 diskutiert.

## 5.4 Verarbeitungserzeugnisse

### 5.4.1 Methodenanpassung

Durch die technologische Bearbeitung der Kartoffeln zur Herstellung der Industriewaren waren Veränderungen in der Probenaufarbeitung notwendig. Nach Einwaage von 3 bis 6 g gepulverter Trockensubstanz (vgl. Tab. 5.33), wurde zur Unterdrückung der Stärkequellung statt 1%iger Essigsäure ein Gemisch aus 1% Essigsäure-MeOH (70:30, v/v) verwendet. Zusätzlich musste bei den vorfrittierten Produkten C1 und C2, P1 bis P3 und W1 bis W3 vor der SPE-Aufreinigung eine Entfettung erfolgen. Hierzu wurde der vereinigte Extrakt mit der gleichen Menge n-Pentan ausgeschüttelt, das organische Lösungsmittel abgenommen und verworfen. Das genaue Vorgehen ist aus Kapitel III, Abschnitt 3.4.2, Variante B zu entnehmen. Die sich anschließende Aufreinigung über SPE konnte wie gewohnt stattfinden. Tabelle 5.34 gibt die eingesetzte Menge [g TG], die aufgearbeiteten Volumina [ml] und das Aufnahmevolumen [ml MeOH] nach Trocknung der gereinigten Extrakte wieder. Jeweils 20 µl des Extraktes dienten zur HPLC-Analyse.

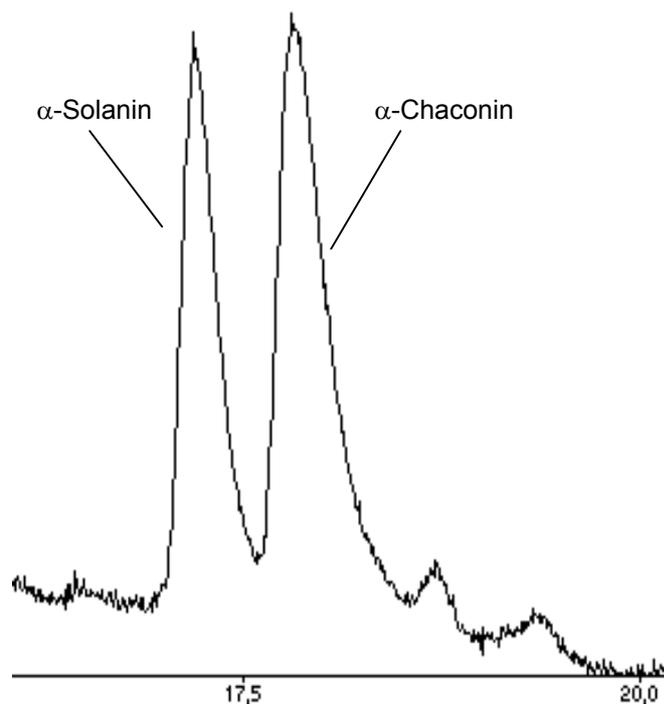
**Tab. 5.34** Übersicht über Einwaage [g TG], Kartuschenbeladung [ml] und Aufnahmevolumen [ml] für die Analyse der Verarbeitungserzeugnisse mittels HPLC

Probe	EW	SPE-Beladung	Aufnahmevolumen
B1	5	12	100
C1+2	6	10	100
F1-3	6	10	100
K1	6	10	100
P1-3	6	10	100
R1	6	12	100
W1-3	4	8	100

### 5.4.2 GA-Gehalt verarbeiteter Kartoffelprodukte

Der Alkaloidgehalt der 15 in Kapitel III, Abschnitt 3.1.4 aufgelisteten Verarbeitungsprodukte wurde zunächst mit dem validierten HPLC-Verfahren bestimmt. Die verwendeten Parameter sind aus Kapitel III, Abschnitt 3.5.1 zu entnehmen. Abbildung 5.13 zeigt als Beispiel das HPLC-Chromatogramm der Pommes Frites-Probe P3. Die ermittelten GA-Konzentrationen stellt Tabelle 5.32 dar, wobei jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung einer

mindestens dreifachen Doppelbestimmung angegeben wurde. Auf Grund der, verglichen mit Kartoffelknollen, niedrigeren GA-Gehalte wurden die Mengen in  $\mu\text{g/g}$  TG angegeben.



**Abb. 5.13**

HPLC-Chromatogramm des methanolischen Extraktes der Pommes Frites-Probe P 3.  $R_t$   $\alpha$ -Solanin 16,8 min,  $R_t$   $\alpha$ -Chaconin 17,3 min. (Chromatographische Bedingungen siehe Kapitel III, Abschnitt 3.5.1).

Die höchsten Alkaloidkonzentrationen konnten erwartungsgemäß in Kartoffelvierteln detektiert werden, da diese mit der alkaloidreichen Schale angeboten werden. Unterschiede ergaben sich bei verschiedenen Herstellern, aber auch zwischen den Chargen eines Herstellers. Den höchsten Gehalt zeigten die Viertel von Tenergy mit  $219,34 \mu\text{g/g}$  TG. Das selbe Produkt einer anderen Charge wies eine geringere Alkaloidmenge auf ( $130,70 \mu\text{g/g}$  TG). Ein Erzeugnis aus dem Hause KClassic enthielt mit  $97,35 \mu\text{g/g}$  TG noch niedrigere Gehalte.

Die vier analysierten Kartoffelpürees offenbarten ein ähnliches Bild. Die Proben von Marena, Potato Master und Maggi wiesen mit  $23,65$  bis  $43,50 \mu\text{g/g}$  TG einen relativ konstanten Alkaloidgehalt auf, das Produkt von Gut Friedlingshof enthielt zwei- bis dreimal so hohe GA-Konzentrationen. Der insgesamt niedrigsten Gesamtgehalt wurde in der Pommes Frites-Probe aus dem Hause Aldi detektiert ( $8,45 \mu\text{g/g}$  TG). Die übrigen Pommes Frites-Produkte lagen im Bereich von  $18$  bis  $41 \mu\text{g/g}$  TG.

Der Anteil des  $\alpha$ -Chaconins am Gesamt-GA-Gehalt lag in den Verarbeitungsprodukten im Bereich zwischen  $54,5$  und  $67,7\%$  und war damit relativ konstant.

**Tab. 5.35** Ermittelte HPLC-Gehalte [ $\mu\text{g/g}$  TG] an  $\alpha$ -Solanin,  $\alpha$ -Chaconin, Gesamtalkaloiden in Kartoffelerzeugnissen und Anteil von  $\alpha$ -Chaconin [%] am Gesamt-GA-Gehalt.

Probe	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-GA	Anteil $\alpha$ -Chaconin
B1	14,08 $\pm$ 1,83	20,06 $\pm$ 1,34	34,14 $\pm$ 2,95	58,9
C1	8,24 $\pm$ 3,67	14,00 $\pm$ 4,88	22,24 $\pm$ 8,49	65,9
C2	13,85 $\pm$ 1,67	26,69 $\pm$ 2,56	40,54 $\pm$ 4,21	63,5
F1	14,68 $\pm$ 3,02	28,82 $\pm$ 6,88	43,50 $\pm$ 8,36	58,1
F2	12,89 $\pm$ 4,28	16,77 $\pm$ 5,67	29,65 $\pm$ 9,49	56,1
F3	32,48 $\pm$ 5,06	45,65 $\pm$ 13,16	78,13 $\pm$ 16,10	57,5
F4	9,40 $\pm$ 1,15	15,45 $\pm$ 2,54	23,65 $\pm$ 5,32	66,4
K1	8,52 $\pm$ 4,46	13,84 $\pm$ 7,81	22,36 $\pm$ 12,14	61,4
P1	3,13 $\pm$ 0,48	5,32 $\pm$ 0,27	8,45 $\pm$ 0,75	63,1
P2	8,48 $\pm$ 2,45	10,03 $\pm$ 2,42	18,51 $\pm$ 4,74	54,5
P3	10,83 $\pm$ 1,35	16,48 $\pm$ 2,31	27,31 $\pm$ 3,61	60,3
R1	14,97 $\pm$ 4,79	18,90 $\pm$ 5,43	33,87 $\pm$ 10,03	58,1
W1	81,25 $\pm$ 14,25	138,08 $\pm$ 16,65	219,34 $\pm$ 28,55	63,1
W2	50,50 $\pm$ 15,78	80,20 $\pm$ 19,62	130,70 $\pm$ 33,63	61,6
W3	30,98 $\pm$ 4,58	66,52 $\pm$ 21,19	97,35 $\pm$ 24,55	67,7

## 5.5 Vergleich der entwickelten Analyseverfahren an Verarbeitungserzeugnissen

Um die Leistungsfähigkeit und Handhabung der in Kapitel IV entwickelten Bestimmungsverfahren zu vergleichen, wurden sie an verarbeiteten Kartoffelprodukten angewendet und die dabei erzielten Ergebnisse mit der validierten HPLC-Standardmethode verglichen. Die Wahl des Testmaterials fiel auf Verarbeitungsprodukte, da ihre Matrix im Vergleich zu Kartoffelknollen durch hohe Fettgehalte oder das Vorkommen von Stärkeabbauprodukten komplex aufgebaut ist und somit mehr von der Analysenmethode abverlangt.

### 5.5.1 Vergleich mit LC-ESI-MS

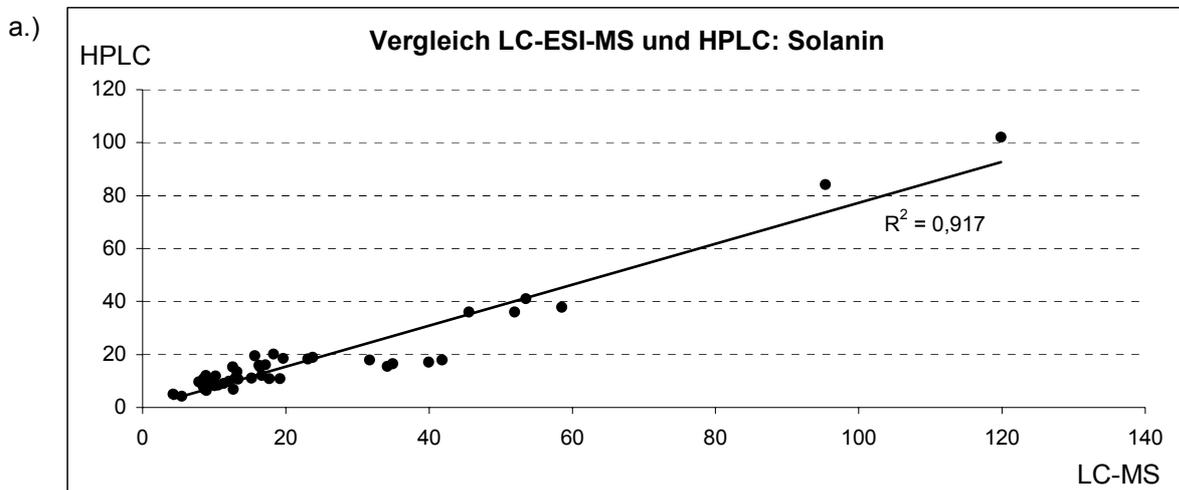
Die Bestimmung des GA-Gehalts mittels LC-ESI-MS erfolgte jeweils mit den selben über SPE aufgereinigten methanolischen Extrakten der HPLC-Analyse. Diese wurden zunächst 1:10 verdünnt, wovon je 20  $\mu\text{l}$  in das System injiziert wurden. Die Parameter der LC-ESI-MS-Methode sind aus Kapitel III, Abschnitt 3.5.2 zu entnehmen. In der folgenden Tabelle 5.33

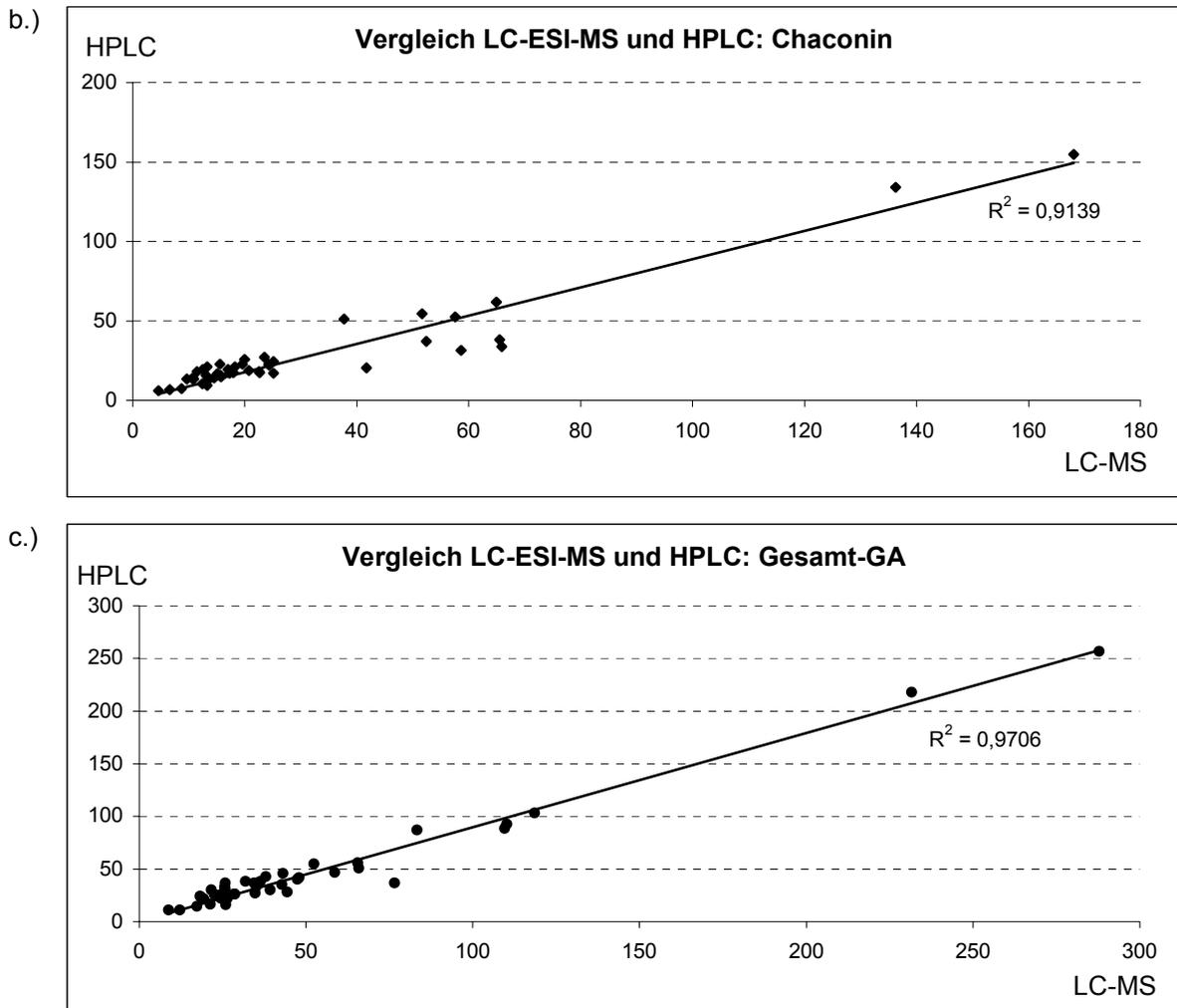
sind die ermittelten GA-Konzentrationen [ $\mu\text{g/g TG}$ ] der LC-ESI-MS-Analyse aufgelistet. Der Gehalt versteht sich als Mittelwert der Doppelbestimmungen von mindestens drei analysierten Extrakten für jedes Produkt.

**Tab. 5.36** Über LC-ESI-MS ermittelte Gehalte [ $\mu\text{g/g TG}$ ] an  $\alpha$ -Solanin,  $\alpha$ -Chaconin und Gesamtalkaloiden in Verarbeitungserzeugnissen.

Probe	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-GA
B1	13,01 $\pm$ 3,04	14,31 $\pm$ 3,49	27,32 $\pm$ 6,51
C1	10,33 $\pm$ 0,79	15,64 $\pm$ 1,18	25,97 $\pm$ 1,89
F1	23,70 $\pm$ 2,16	36,91 $\pm$ 4,77	60,61 $\pm$ 6,39
F2	19,93 $\pm$ 6,06	21,46 $\pm$ 4,90	41,28 $\pm$ 10,95
F3	63,77 $\pm$ 18,47	62,41 $\pm$ 10,26	126,18 $\pm$ 27,27
F4	8,97 $\pm$ 0,54	12,14 $\pm$ 1,09	21,10 $\pm$ 1,62
K1	11,70 $\pm$ 5,59	11,54 $\pm$ 4,55	23,23 $\pm$ 10,14
P2	13,95 $\pm$ 3,92	15,59 $\pm$ 6,01	30,28 $\pm$ 10,77
P3	17,57 $\pm$ 4,63	22,06 $\pm$ 7,09	39,65 $\pm$ 11,71
R1	10,94 $\pm$ 5,83	13,04 $\pm$ 6,92	23,98 $\pm$ 12,66
W1	107,57 $\pm$ 17,31	152,13 $\pm$ 22,50	259,70 $\pm$ 39,82
W3	14,56 $\pm$ 4,96	22,05 $\pm$ 3,54	36,61 $\pm$ 8,16

Die folgenden Abbildungen (5.14a bis c) zeigen die Übereinstimmung der mittels LC-ESI-MS ermittelten Gehalte für  $\alpha$ -Solanin,  $\alpha$ -Chaconin und den Gesamt-GA-Gehalt im Vergleich zur HPLC-Standardmethode. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  der Ausgleichsgeraden verdeutlicht die Übereinstimmung der beiden Analyse-Verfahren. Je näher es bei 1 liegt, desto einheitlicher sind die Ergebnisse. Mit  $R^2 = 0,92$  für  $\alpha$ -Solanin, 0,91 für  $\alpha$ -Chaconin bzw. 0,97 für den Gesamt-GA-Gehalt konnte eine gute Übereinstimmung nachgewiesen werden.





**Abb. 5.14** Vergleich der ermittelten Gehalte für  
 a.)  $\alpha$ -Solanin  
 b.)  $\alpha$ -Chaconin  
 c.) Gesamtalkaloide in Kartoffelerzeugnissen aus LC-ESI-MS und HPLC-Analyse.

## 5.5.2 Vergleich mit dem Kolorimetrischen Assay

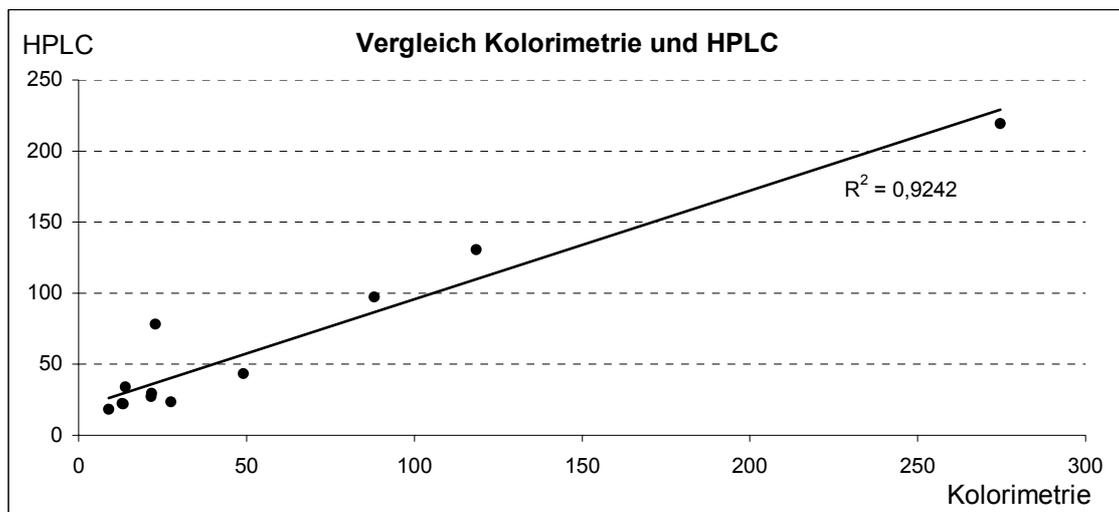
Mit Hilfe des kolorimetrischen Assays konnte nur der Gesamt-GA-Gehalt in den Proben bestimmt werden. Die Extraktion und Aufreinigung erfolgte gemäß den Angaben in Kapitel III, Abschnitt 3.4.2 und 3.4.3. Um im kalibrierten Arbeitsbereich zu bleiben wurden jeweils 6 g homogenisiertes Trockengewebe eingewogen und 15 ml des kombinierten Extraktes über SPE aufgereinigt. Durch die höheren Alkaloid-Gehalte in den Proben W1 bis W3 kamen hier 3 g TG und 8 ml Extrakt zum Einsatz. Nach Inkubieren wurden die Färbung der Lösung photometrisch bestimmt und mit Hilfe der Kalibriergeraden aus Kapitel IV, Abschnitt 4.5, Tab. 4.6 in die Alkaloidgehalte (Tab. 5.34) umgerechnet. Die Werte verstehen sich als Mittelwerte der Doppelbestimmungen mindestens dreier Ansätze.

**Tab. 5.37** Mit Hilfe des kolorimetrischen Assays ermittelte Gesamt-GA-Gehalte [ $\mu\text{g/g}$  TG] in Verarbeitungserzeugnissen.

Probe	Gesamt-GA
C1	13,28 $\pm$ 2,04
F1	49,09 $\pm$ 18,44
F2	21,72 $\pm$ 7,27
F3	22,80 $\pm$ 11,20
F4	27,46 $\pm$ 11,43
K1	12,87 $\pm$ 4,76

Probe	Gesamt-GA
P2	8,91 $\pm$ 4,97
P3	21,65 $\pm$ 6,18
R1	13,96 $\pm$ 2,91
W1	274,61 $\pm$ 79,09
W2	118,43 $\pm$ 28,54

Die folgende Abbildung 5.16 veranschaulicht die gute Übereinstimmung der Gesamt-GA-Gehalte des kolorimetrischen Assays im Vergleich zur HPLC-Standard-Methode an Hand der Ausgleichsgeraden und des Bestimmtheitsmaßes  $R^2$  von 0,92. Eine Ausnahme bildeten die Kartoffelpüreeflocken von Gut Friedlingshof. Die durch Photometrie erhaltene GA-Konzentration betragen mit 22,80  $\mu\text{g/g}$  TG nur ein Drittel des Gehaltes aus der HPLC-Analyse (78,13  $\mu\text{g/g}$ ). Mehrmalige Wiederholung dieser Probe bestätigte den Wert.

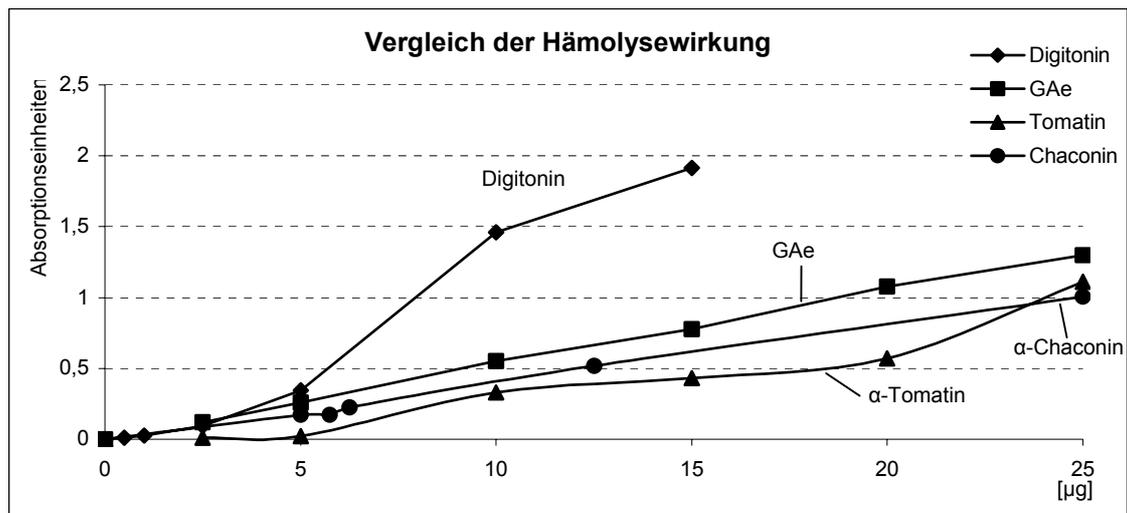


**Abb. 5.15** Vergleich der ermittelten Gesamt-GA-Gehalte aus kolorimetrischer Bestimmung und HPLC-Analyse.

### 5.5.3 Vergleich mit dem Hämolyse-Assay

#### 5.5.3.1 Vergleich der Hämolysewirkung verschiedener GAe

Steroidalkaloiden unterscheiden sich wie die Saponine in ihrer hämolytischen Aktivität. Um die Wirkung auf Erythrozyten vergleichen zu können wurden gleiche Konzentrationen an  $\alpha$ -Tomatin,  $\alpha$ -Chaconin und ein GA-Gemisch aus  $\alpha$ -Chaconin und  $\alpha$ -Solanin (70:30, w/w) mit Digitonin, einem für seine hämolytische Wirkung bekannten Steroidsaponin aus *Digitalis purpurea* verglichen. Abbildung 5.16 veranschaulicht das Ergebnis.



**Abb. 5.16** Vergleich der Hämolyseaktivität von  $\alpha$ -Tomatin,  $\alpha$ -Chaconin, GA-Gemisch ( $\alpha$ -Chaconin: $\alpha$ -Solanin = 70:30, w/w) und Digitonin.

Wie erwartet ging die stärkste Hämolyseaktivität von Digitonin aus. Für das GA-Gemisch aus  $\alpha$ -Chaconin und  $\alpha$ -Solanin konnte die zweithöchste Hämolysewirkung nachgewiesen werden, gefolgt von den Einzelsubstanzen  $\alpha$ -Chaconin und  $\alpha$ -Tomatin in absteigender Reihenfolge.

#### 5.5.3.2 GA-Gehalt in Verarbeitungserzeugnissen

Der Hämolyse-Assay ließ, wie zuvor, nur die Ermittlung des Gesamt-GA-Gehalt zu. Die Aufarbeitung erfolgte wiederum nach den in Kapitel III, Abschnitt 3.4.2 und 3.4.3 beschriebenen Verfahren. Da der Arbeitsbereich des Hämolyse-Assays sehr begrenzt ist (2,5 bis 25 µg pro Ansatz), musste auf genaue Einwaagen geachtet werden, so dass für jedes Kartoffelprodukt unterschiedliche Mengen zu verwenden waren. Diese sowie die Beladung der SPE-Kartuschen sind Tabelle 5.35 zu entnehmen.

**Tab. 5.38** Übersicht über Einwaage [g TG], Kartuschenbeladung [ml] und Aufnahmevolumen [ml] für die Analyse von Verarbeitungserzeugnissen mittels Hämolyse-Assay.

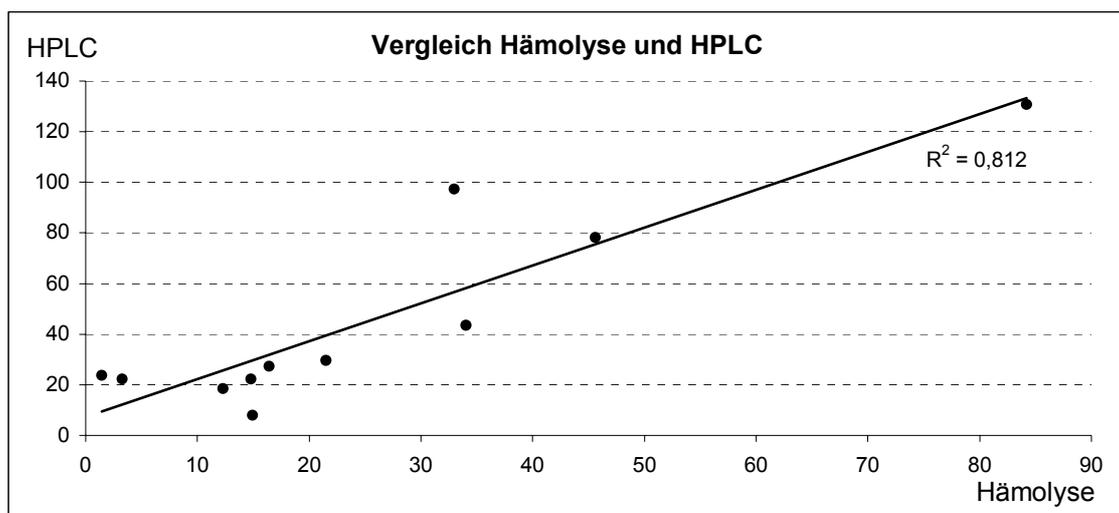
Probe	EW	SPE-Beladung	Aufnahmevolumen
F1-4	7	15	100
K1	8	15	100
P2+3	5	15	100
R1	8	15	100
W1+3	5	10	100

Die folgende Tabelle 5.36 gibt die durch den Hämolyse-Assay ermittelten GA-Konzentrationen wieder, die als Mittelwert der Doppelbestimmungen mindestens dreier Ansätze zu verstehen sind. Die sich anschließende Abbildung 5.16 veranschaulicht die Übereinstimmung dieser Gehalte im Vergleich zur HPLC-Analyse.

**Tab. 5.39** Mit Hilfe des Hämolyse-Assays ermittelte Gesamt-GA-Gehalte [ $\mu\text{g/g}$  TG] in Verarbeitungserzeugnissen.

Probe	Gesamt-GA
C1	3,27 $\pm$ 0,78
F1	34,04 $\pm$ 13,98
F2	21,50 $\pm$ 3,40
F3	45,60 $\pm$ 9,19
F4	1,45 $\pm$ 0,95
K1	14,77 $\pm$ 0,96

Probe	Gesamt-GA
P2	12,29 $\pm$ 3,53
P3	16,40 $\pm$ 7,24
R1	14,92 $\pm$ 8,06
W2	84,17 $\pm$ 31,63
W3	32,97 $\pm$ 12,99

**Abb. 5.17** Vergleich der ermittelten Gesamt-GA-Gehalte aus Hämolyse-Assay und HPLC-Analyse.

Die insgesamt hohe Variabilität zwischen den Proben, aber auch innerhalb der gleichen Probe bestätigte sich durch den deutlich von 1 abweichenden Wert des Bestimmtheitsmaßes ( $R^2 = 0,82$ ). Der Grund für die starke Schwankung der Alkaloid-Konzentrationen wurde in der unzureichenden Aufreinigung der Proben vermutet, weshalb zur Verbesserung des Aufreinigungsprotokolls drei weitere Sorbentien auf ihre Tauglichkeit getestet wurden. Alle drei gehörten der Klasse der Kationenaustauscher an, da sie sehr spezifisch die in saurer Lösung positiv geladen vorliegenden GAe adsorbieren können. Zur Anwendung kamen folgende Kartuschentypen:

- Supelco DSC-SCX (Benzylsulfonsäure) 500 mg, 3 ml
- Varian Bondelut<sup>TM</sup> PRS (Propylsulfonsäure) 100 mg, 10 ml
- Varian SCX Bondelut<sup>TM</sup> (Benzylsulfonsäure) 100 mg, 10 ml

Bei allen drei Sorbentien handelte es sich um starke Kationenaustauscher, die sich zur Isolierung schwach saurer Substanzen eignen. Nach ersten Versuchen mit GA-Standardlösung ergaben sich jedoch stark schwankende Wiederfindungsraten, die von 0 bis 300% reichten und weitere Versuche überflüssig machten.

Eine Erwärmung des Extraktes auf 90 °C vor der Standardaufreinigung, bei der thermisch labile Substanzen wie z. B. störende Proteine zerstört werden, brachte ebenfalls keinen Erfolg.

### 5.5.3.3 Überprüfung des Hämolyse-Assays

Die Kontrolle, ob die hämolysierende Wirkung tatsächlich auf die aufgereinigten GAe zurückzuführen ist, erfolgte mit Hilfe eines Komplexierungsassays. Hierzu wurden die enthaltenen GAe zunächst mit Cholesterol komplexiert und damit in ihrer Aktivität inhibiert. Nach Abzentrifugieren des Cholesterol-GA-Komplexes wurde der Überstand über Vakuumzentrifugation getrocknet und anschließend den üblichen Hämolyse-Verfahrensschritten unterzogen. Das genaue Vorgehen ist Kapitel III, Abschnitt 3.5.4 zu entnehmen. Als Arbeitsproben dienten sowohl die Standardsubstanzen  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin, die Kalibriermischung  $\alpha$ -Chaconin- $\alpha$ -Solanin (70:30) sowie ausgewählte Extrakte der Produktproben. Zur Kontrolle wurden identische Proben jeweils im gleichen Ansatz ohne vorherige Komplexierungsreaktion den Verfahrensschritten des Hämolyse-Assays unterzogen. Nach der Inkubation und zentrifugieren zeigten die unbehandelten Ansätze der Kartoffelprodukte die erwartete Rotfärbung im Überstand, die bei den komplexierten Testansätzen ausblieb.

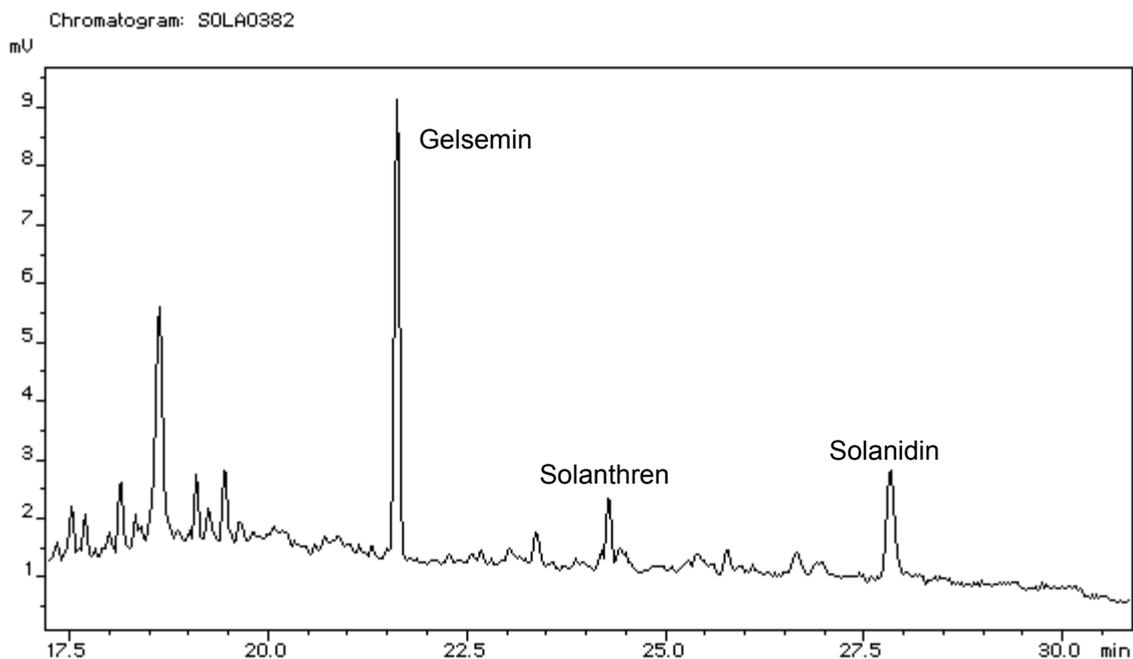
Um die Komplexierungsfähigkeit von  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin zu vergleichen wurde der Komplexierungsassay mit beiden Standardsubstanzen durchgeführt und die nach Inkubation

und Zentrifugieren noch vorhandene Menge Cholesterol im Überstand gaschromatographisch quantifiziert. Verwendet wurde die GLC-Methode zur Detektion von Solanidin. Während  $\alpha$ -Solanin praktisch keine Reaktion mit Cholesterol zeigte, verringerte sich dessen Konzentration bei Verwendung von  $\alpha$ -Chaconin auf 25 bis 50% der Ausgangskonzentration.

## 5.5.4 Gaschromatographie

### 5.5.4.1 GA-Gehalt in Verarbeitungserzeugnissen

Die gaschromatographische Methode vermochte ebenfalls nur den Gesamt-GA-Gehalt zu erfassen. Im Gegensatz zu den vorigen Methoden konnte auf eine SPE-Aufreinigung verzichtet werden. Zur Analyse wurden für die Proben W1 und W3 jeweils 5 g, für die übrigen Produkte 8 g gefriergetrocknetes, homogenisiertes Probenmaterial eingewogen. Nach der Extraktion der GAe mit Hilfe des Hydrolyse-Mediums wurden bei W1 und W3 10 ml, ansonsten jeweils 15 ml des Extraktes in gasdichten Enghalsflaschen hydrolysiert. Die genauen Bedingungen der Extraktion der GAe, deren Hydrolyse zum Aglykon sowie die Isolierung des Aglykons sind Kapitel III, Abschnitt 3.5.5 zu entnehmen. Die folgende Abbildung 5.17 zeigt als Beispiel das GLC-Chromatogramm eines Kartoffelpüree-Extraktes aus P2.



**Abb. 5.18** GLC-Chromatogramm nach Hydrolyse der GAe aus P2 in 1 N HCl in MeOH-A. bidest (1:1, v/v), 80 °C, 16 h mit internem Standard Gelsemin.  
 $R_t$  Gelsemin 21,6 min,  $R_t$  Solanthren 24,3 min,  $R_t$  Solanidin 27,8 min.

Nach gaschromatographischer Analyse konnten die in Tabelle 5.37 aufgeführten Solanidin-Gehalte [ $\mu\text{g/g TG}$ ] ermittelt werden. Die Berechnung der Konzentration erfolgte mit Hilfe des internen Standards Gelsemin. Vor jeder Analysenserie wurde zunächst fünfmal je  $2 \mu\text{l}$  des Standardgemischs aus Gelsemin und Solanidin eingespritzt und der Mittelwert der Gelsemin- bzw. der Solanidin-Fläche gebildet. Aus den Mittelwerten der Standardchromatogramme konnte der relative Responsefaktor ( $RF$ ) nach folgender Gleichung ermittelt werden. Er setzt sich aus den einzelnen Responsefaktoren ( $f_{\text{Sold}}, f_{\text{Gel}}$ ) der Analysensubstanz Solanidin und dem des inneren Standards Gelsemin zusammen.

$$RF = \frac{f_{\text{Sold}}}{f_{\text{Gel}}} = \frac{c_{\text{Sold}} / A_{\text{Sold}}}{c_{\text{Gel}} / A_{\text{Gel}}}$$

$RF$  = Relativer Responsefaktor  
 $f_{\text{Sold}}$  = Responsefaktor Solanidin  
 $c_{\text{Sold}}$  = Konzentration des Solanidin  
 $A_{\text{Sold}}$  = Peakfläche des Solanidin  
 $f_{\text{Gel}}$  = Responsefaktor Gelsemin  
 $c_{\text{Gel}}$  = Konzentration des Gelsemin  
 $A_{\text{Gel}}$  = Peakfläche des Gelsemin

In der unbekannt Probe kann die Konzentration unter zu Hilfenahme des oben berechneten  $RF$  nach folgender Gleichung bestimmt werden:

$$c_p = A_p * RF * \frac{c_s}{A_s}$$

$c_p$  = Konzentration des Solanidin in der unbekannt Probe  
 $A_p$  = Peakfläche des Solanidin in der unbekannt Probe  
 $c_s$  = Konzentration des internen Standards in der unbekannt Probe  
 $A_s$  = Peakfläche des internen Standards in der unbekannt Probe

Nach Auswertung der Chromatogramme und der Berechnung nach oben genannten Gleichungen ergaben sich die in Tabelle 5.37 aufgeführten Gesamt-GA-Gehalte [ $\mu\text{g/g TG}$ ], die die Mittelwerte der Doppelbestimmungen mindestens dreier Ansätze sind.

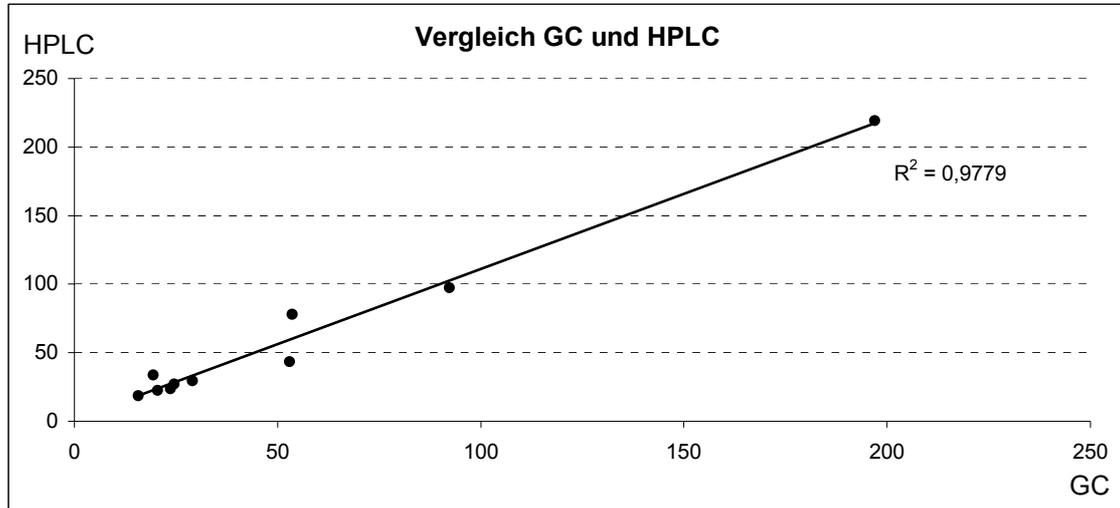
**Tab. 5.40** Gaschromatographisch bestimmter Gesamt-GA-Gehalt [ $\mu\text{g/g TG}$ ] in Verarbeitungserzeugnissen.

Probe	Gesamt-GA
F1	52,91 ± 5,48
F2	29,10 ± 8,80
F3	53,62 ± 4,78
F4	23,68 ± 11,39
K1	20,50 ± 10,53

Probe	Gesamt-GA
P2	15,68 ± 5,33
P3	24,59 ± 14,92
R1	19,35 ± 4,53
W1	197,00 ± 36,95
W3	92,26 ± 19,42

Die in der gaschromatographischen Analyse ermittelten Gesamt-GA-Gehalte stimmten gut mit den Werten der HPLC-Standard-Methode überein. Wie die folgende Abbildung 5.18

verdeutlicht, liegen die in beiden Verfahren ermittelten Konzentrationen nah an der Ausgleichsgeraden, die mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,97 die gute Übereinstimmung dokumentiert.



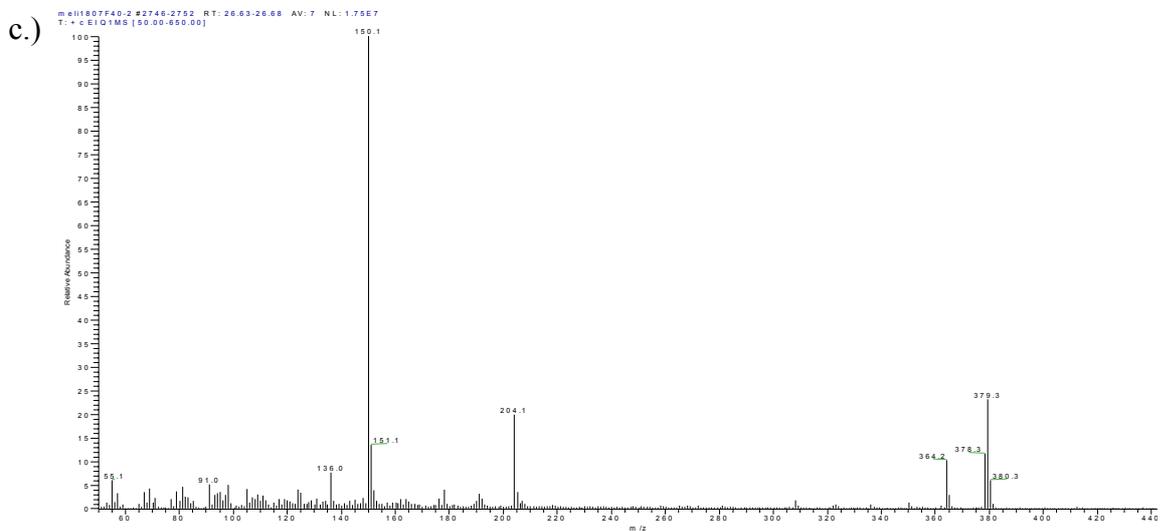
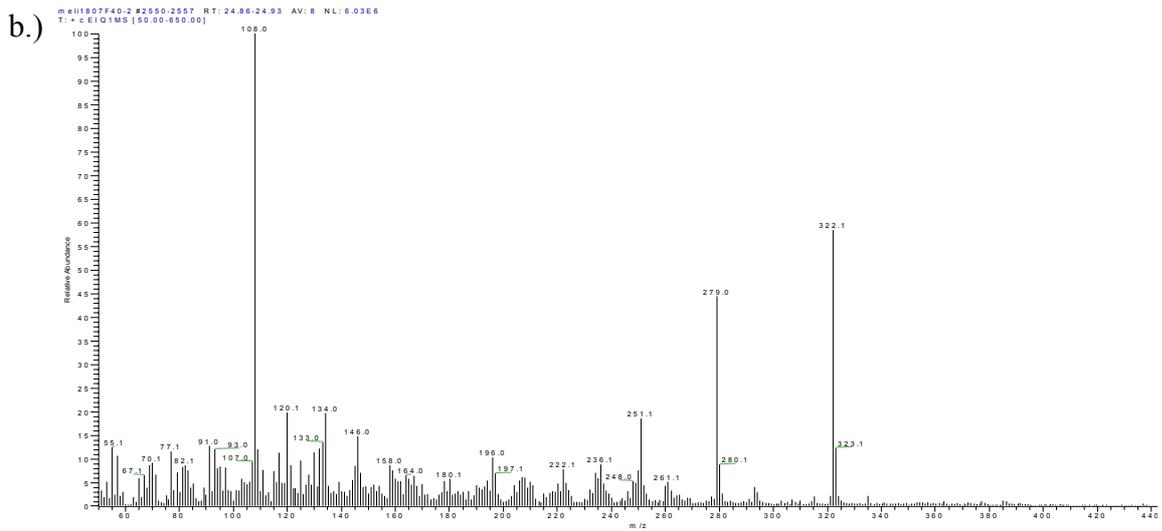
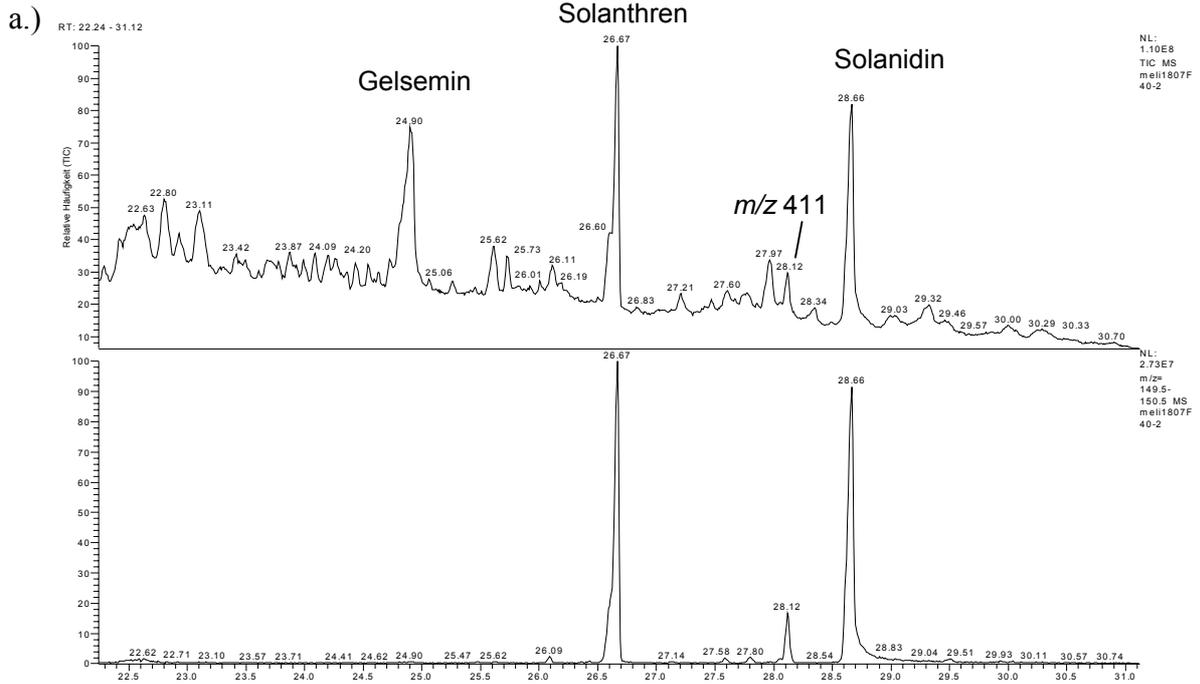
**Abb. 5.19** Vergleich der ermittelten Gesamt-GA-Gehalte aus GLC- und HPLC-Analyse.

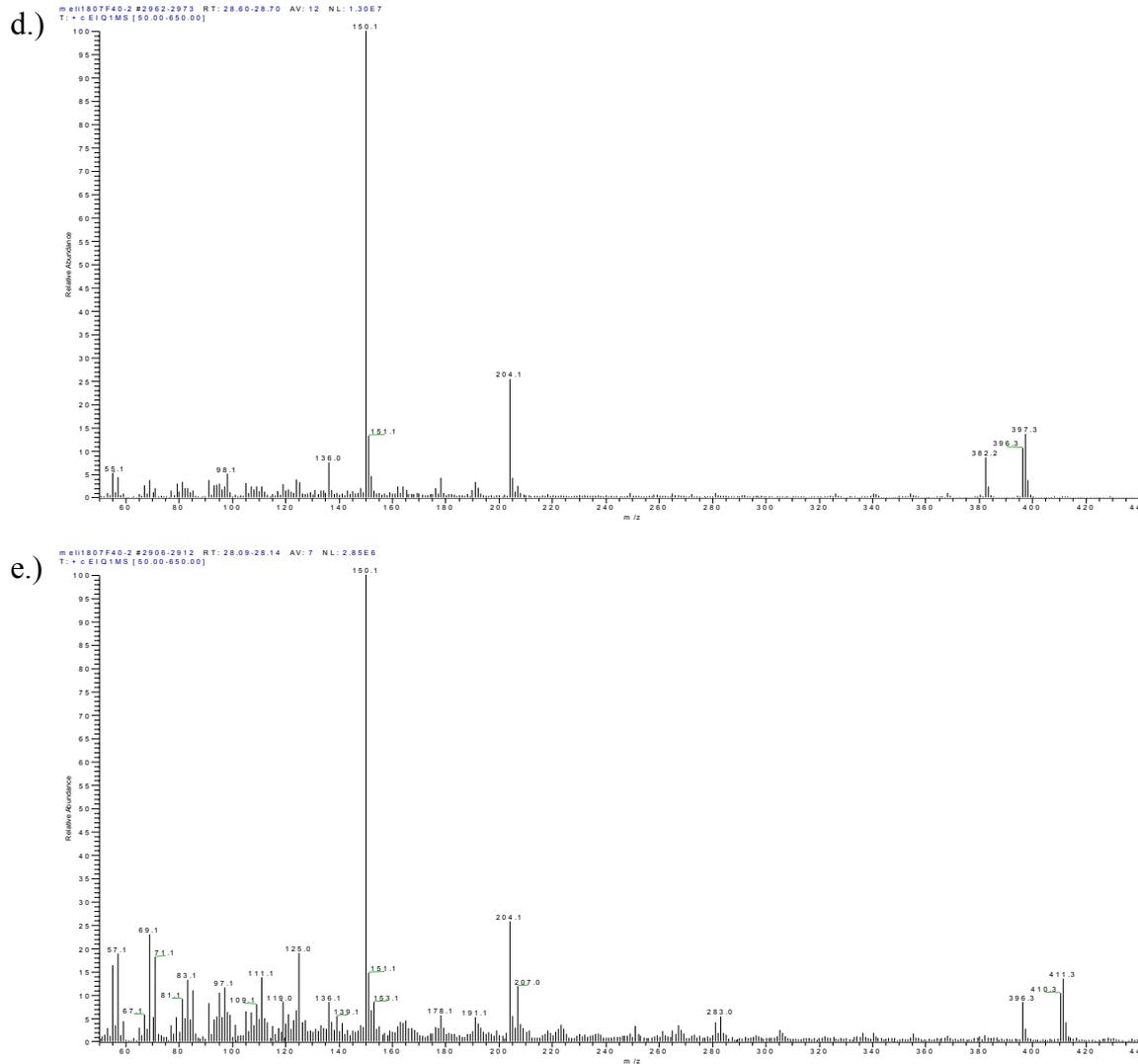
#### 5.5.4.2 Überprüfung der GLC-Analyse in Verarbeitungserzeugnissen mittels GLC-MS

Zur Überprüfung der im GLC-Chromatogramm detektierten Peaks wurde für jedes Produkt eine GLC-MS-Analyse durchgeführt. Die Trennung der Substanzen erfolgte mit dem in Kapitel III, Abschnitt 3.5.5 dargestellten Temperaturprogramm. Die Parameter der massenspektrometrischen Detektion sind unter dem gleichen Abschnitt aufgeführt.

Wie die Abbildungen 5.18a bis d zeigen, bestätigten die GLC-MS-Analysen die gaschromatographischen Ergebnisse. Bei den detektierten Peaks handelte es sich um die Substanzen:

Gelsemin:	$R_t$ GLC: 21,6 min	$R_t$ GLC-MS: 24,9 min	$m/z$ : 322
Solanthren:	$R_t$ GLC: 24,3 min	$R_t$ GLC-MS: 26,7 min	$m/z$ : 379
Solanidin:	$R_t$ GLC: 27,8 min	$R_t$ GLC-MS: 28,7 min	$m/z$ : 397





**Abb. 5.20** GLC-MS-Analyse nach Hydrolyse der GAe aus P2 in MeOH-A. bidest (1:1, v/v), 80 °C, 16 h mit internem Standard Gelsemin.  
 a.) oberer Abschnitt Totalionenstrom  
 unterer Abschnitt Massenspur bei  $m/z$  150  
 b.) Massenspektrum bei  $R_t$  24,9 min: Gelsemin ( $m/z$  322)  
 c.) Massenspektrum bei  $R_t$  26,7 min: Solanthren ( $m/z$  379)  
 d.) Massenspektrum bei  $R_t$  28,1 min:  $m/z$  411  
 e.) Massenspektrum bei  $R_t$  28,7 min: Solanidin ( $m/z$  397).

In Abbildung 5.19a ist im oberen Abschnitt zunächst der Totalionenstrom der Probe P2 dargestellt. Es sind deutlich die Peaks für Gelsemin, Solanthren und das Aglykon Solanidin sichtbar. Um weitere Solanidin-Derivate ausfindig zu machen, wurde eine Massenspur bei  $m/z$  150 gelegt, die im unteren Abschnitt der Abbildung zu sehen ist. Es handelt sich dabei um ein bei EI-Ionisierung auftretendes Schlüsselfragment des Solanidins und seiner Derivate, das vermutlich aus der Abspaltung des Indolizidin-Ringsystems hervorgeht (vgl. Kapitel VI, Abschnitt 6.4.1.2). Es sind deutlich zwei weitere Substanzen erkennbar, die durch ihr Schlüsselfragment als Solanidin-Derivate charakterisiert werden konnten. Wie vermutet handelte es sich bei  $R_t$  26,7 min um Solanthren ( $m/z$  379), das Dehydrierungsprodukt des

Solanidins. Solanthren entsteht durch Einführen einer weiteren Doppelbindung in den Ring A. Der zweite Peak besaß das  $m/z$ -Verhältnis 411. Die um 14 Einheiten höhere Masse deutet auf den Methylester des Solanidins (vgl. Kapitel VI, Abschnitt 6.5.4).

Die Abbildungen 5.19b bis e zeigen jeweils das Massenspektrum für die Substanzen b.)  $R_t$  24,9 min: Gelsemin ( $m/z$  322), c.)  $R_t$  26,7 min: Solanthren ( $m/z$  379), d.)  $R_t$  28,1 min:  $m/z$  411 und d.)  $R_t$  28,7 min: Solanidin ( $m/z$  397).

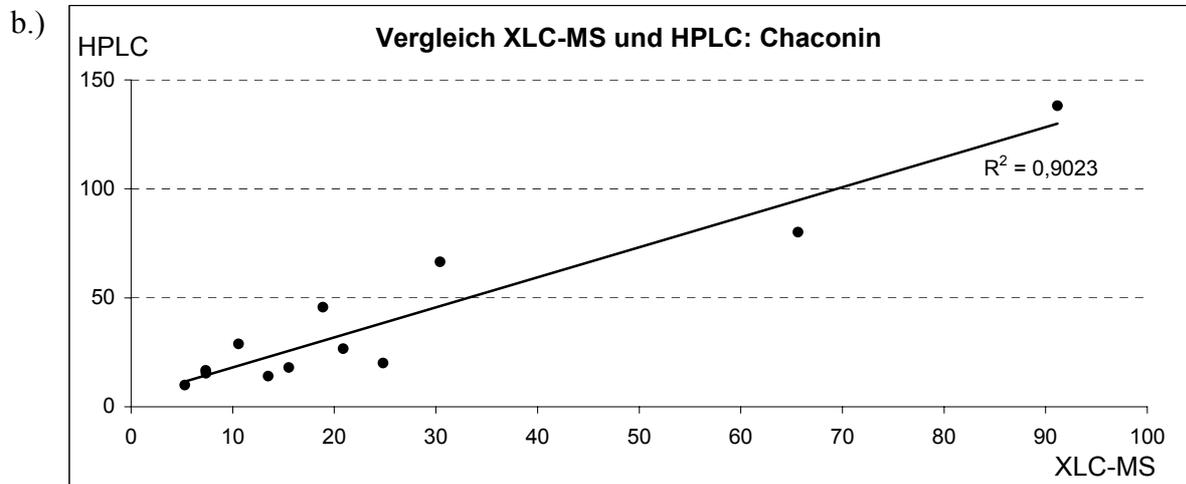
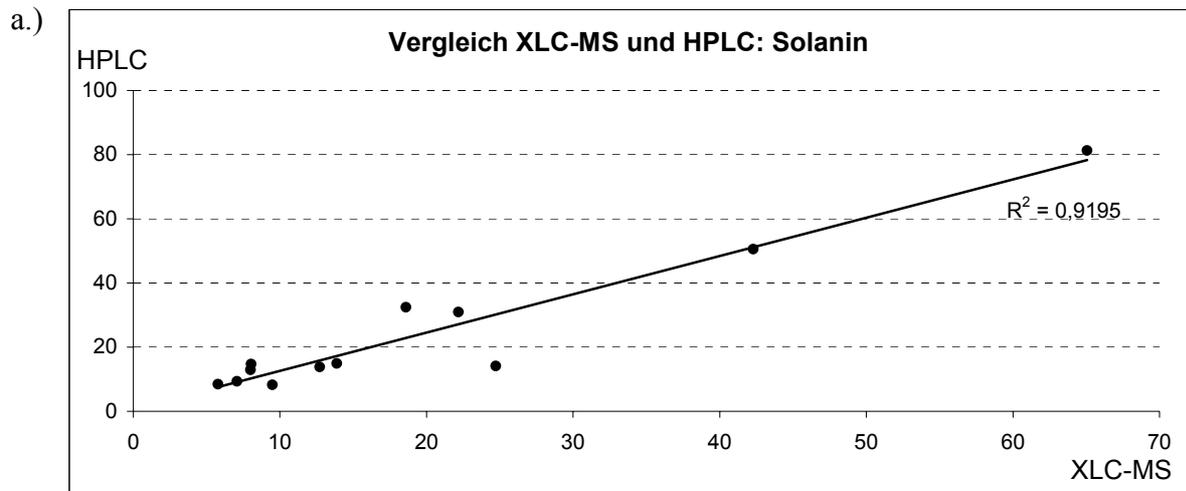
### 5.5.5 Vergleich mit XLC-MS

Ziel der in Kapitel IV, Abschnitt 4.8 dargestellten XLC-MS-Methode war die Entwicklung eines Verfahrens, das durch seinen hohen Automatisierungsgrad einen hohen Probendurchsatz garantiert und sich somit für die Routineanalytik anbietet. Um die Verlässlichkeit der Methode in der Praxis zu überprüfen wurde das Verfahren an den zuvor analysierten Kartoffelprodukten angewendet und die Ergebnisse wiederum mit dem HPLC-Standardverfahren verglichen.

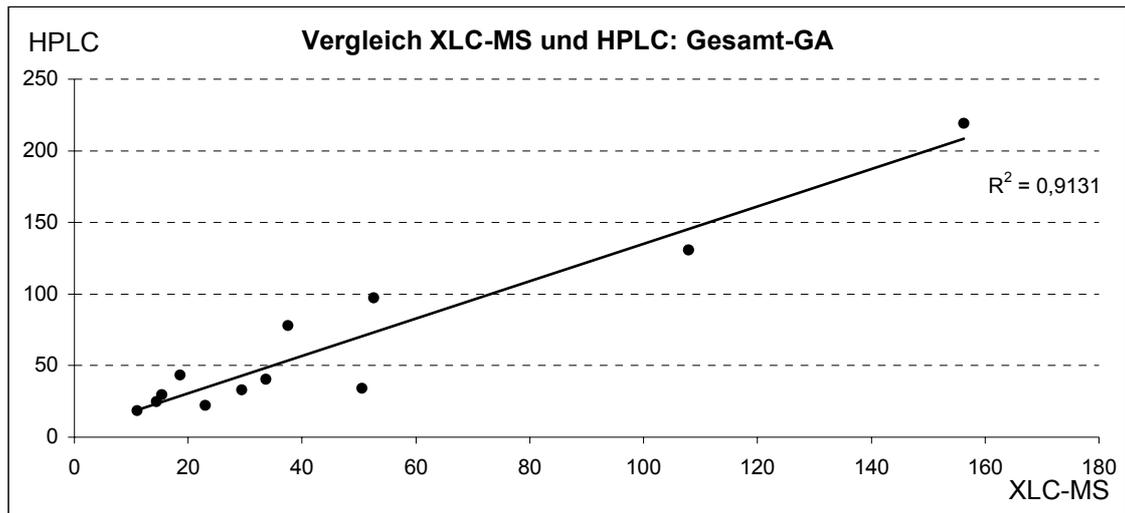
Die Extraktion der GAe erfolgte wiederum nach der in Kapitel III, Abschnitt 3.4.2 beschriebenen Variante C. Zur Analyse dienten 50  $\mu$ l des unbehandelten Essigsäure-MeOH-Extraktes. Tabelle 5.38 zeigt die Ergebnisse der Analyse, die die Mittelwerte von mindestens zwei Doppelbestimmungen sind. In den sich anschließenden Abbildungen 5.20a bis c ist die Übereinstimmung beider Verfahren ersichtlich. Sowohl für die Einzelalkaloide  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin wie auch für den Gesamt-GA-Gehalt deutet das Bestimmtheitsmaß  $R^2 = 0,90$  bis  $0,92$  auf eine gute Übereinstimmung.

**Tab. 5.41** Durch XLC-MS ermittelte  $\alpha$ -Solanin,  $\alpha$ -Chaconin und Gesamt-GA-Gehalte [ $\mu\text{g/g}$  TG] in Verarbeitungserzeugnissen.

Probe	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-GA
B1	24,73 $\pm$ 1,30	25,80 $\pm$ 1,03	50,52 $\pm$ 2,32
C1	9,48 $\pm$ 0,50	13,49 $\pm$ 0,57	22,97 $\pm$ 1,07
C2	12,72 $\pm$ 0,78	20,89 $\pm$ 0,82	33,61 $\pm$ 1,52
F1	8,04 $\pm$ 0,48	10,57 $\pm$ 0,47	18,59 $\pm$ 0,94
F2	7,99 $\pm$ 0,45	7,35 $\pm$ 0,31	15,35 $\pm$ 0,76
F3	18,59 $\pm$ 1,51	18,89 $\pm$ 1,66	37,48 $\pm$ 3,11
F4	7,07 $\pm$ 0,46	7,38 $\pm$ 0,32	14,45 $\pm$ 0,78
P2	5,77 $\pm$ 0,31	5,28 $\pm$ 0,27	11,06 $\pm$ 0,57
R1	13,87 $\pm$ 0,84	15,52 $\pm$ 0,58	29,39 $\pm$ 1,32
W1	65,06 $\pm$ 3,44	91,16 $\pm$ 3,45	156,22 $\pm$ 6,83
W2	42,28 $\pm$ 2,33	65,64 $\pm$ 2,49	107,92 $\pm$ 4,80
W3	22,18 $\pm$ 3,42	30,42 $\pm$ 4,71	52,60 $\pm$ 8,12



c.)



**Abb. 5.21** Vergleich der ermittelten GA-Gehalte der XLC-MS und HPLC-Analyse:  
a.)  $\alpha$ -Solanin  
b.)  $\alpha$ -Chaconin  
c.) Gesamt-GA-Gehalt aus XLC-MS und HPLC-Analyse.

# KAPITEL VI

## DISKUSSION DER GA-ANALYSEN

### 6.1 Kommerzielle Kartoffelsorten

#### 6.1.1 GA-Gehalt kommerzieller Kartoffelsorten

Obwohl zahlreiche Veröffentlichungen den Alkaloid-Gehalt verschiedener Kartoffelsorten behandelten, ist ein direkter Vergleich der Sorten mit publizierten Daten sehr schwierig. Die Autoren bevorzugten meist landesspezifische Kultivare, bei Hellenäs et al. (1995a, b) beispielsweise die schwedischen Sorten Ukama, Maris Bard, Provita, Silla, Ulster Chieftain, Magnum Bonum u. a. bei Papathanasiou et al. (1998) die britischen Sorten Home Guard, British Queen und Rocket oder bei Chuda et al. (2004) die in Japan erhältlichen Touya, May Queen oder Sayaka, so dass insgesamt zwar Daten zu einem reichhaltigen Sortiment vorliegen, jedoch waren die in Deutschland erhältlichen Kultivare selten Gegenstand dieser Analysen.

Insgesamt bewegte sich die Bandbreite der publizierten GA-Konzentrationen im Bereich zwischen 0,7 und 58,0 mg/100 g FG (Sinden et al. 1976). Morris & Peterman erhielten bei ihrer 1985 durchgeführten Analyse 55 verschiedener Kultivare eine Streubreite von 1,6 bis 31,7 mg/100 g FG, bei den Untersuchungen von Concon (1988), Friedman & Dao (1992), Friedman et al. (2003b), Parnell (1984) und Uppal (1987) wurden jeweils Gehalte unter 20 mg/100 g FG detektiert. Als Durchschnittsgehalt der im Handel erhältlichen Sorten geben Lachman et al. (2001) einen Wert von 7,5 mg/100 g FG an. Allein die Arbeit von Zywicki et al. (2005) behandelte einige in Deutschland verwendete Sorten, wobei nur die Schalen der Sorten Agria, Desiree, Granola, Linda und Solara untersucht wurden, die von Natur aus höhere Mengen enthielten (41 bis 90 mg/100 g FG).

In den Knollen aller in dieser Arbeit analysierten kommerziellen Sorten konnten, unabhängig von Erntezeitpunkt oder Kultivierungsart, Gesamt-GA-Gehalte unter dem als sicher geltenden Grenzwert von 20 mg/100 g FG festgestellt werden. Die Bandbreite erstreckte sich bezogen auf das Frischgewicht auf 1,73 bis 12,63 mg/100 g, im Durchschnitt 5,32 mg/100 g, womit das bislang publizierte Datenmaterial bestätigt werden konnte.

Ein direkter Vergleich der Alkaloid-Konzentrationen in Gesamtknollen kommerziell erhältlicher Frühkartoffeln mit den Werten der Herbsterte wie auch zwischen konventionellem und ökologischem Anbau gestaltete sich schwierig, da die verfügbare Sortenauswahl speziell für Früh- und Bio-Kartoffeln sehr eingeschränkt war. Für die Analyse standen meist nicht dieselben Sorten zur Verfügung, was die Bildung von Schlussfolgerungen erschwerte, besonders da dem Genotyp der stärkste Einfluss auf den Alkaloidgehalt zukommt (Friedman 2006, Papathanasiou et al. 1999a, Van Dam et al. 1999, Van Gelder 1990). Obwohl einige der bisherigen Untersuchungen in ökologisch erzeugten Kartoffeln und Frühkartoffeln höhere GA-Gehalte nachweisen konnten, sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit nicht dafür. Hajslova et al. (2005) untersuchten in einer der wenigen Vergleichsstudien während der Jahre 1996 bis 1999 verschiedene tschechische Sorten unter kontrollierten konventionellen und ökologischen Bedingungen u. a. auf die Konzentrationen an Sekundärmetaboliten. Nach Auswertung der Ergebnisse stellten sie in ökologisch erzeugten Knollen höhere GA-Gehalte ( $8,08 \pm 4,45$  mg/100 g FG) fest, als in konventionell kultivierten ( $5,85 \pm 4,41$  mg/100 g FG). Obwohl der Unterschied insgesamt statistisch nicht signifikant war, konnte in einzelnen Kultivaren (Rosara, Rosella und Monalisa) eine signifikant höhere Konzentration festgestellt werden. Neben erhöhten Alkaloidgehalten wurden ebenfalls gesteigerte Chlorogensäuregehalte ( $20,8 \pm 11,4$  mg/100 g FG gegenüber  $15,9 \pm 9,2$  mg/100 g FG) und eine höhere Polyphenoloxidase-Aktivität nachgewiesen. Höhere Chlorogensäure-Konzentrationen in ökologisch produzierten Knollen beschrieben ebenfalls Hamouz et al. (1999), der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Wszelaki et al. (2005) berichteten von tendenziell höheren GA-Mengen in ökologischem Anbau und Matthews et al. (2005) leiteten aus den höheren Alkaloid-Konzentrationen in den Knollen schädlingsbefallener Pflanzen ab, dass sich durch den fehlenden Einsatz von Pestiziden und damit zu erwartendem höheren Schädlingsbefall im ökologischen Landbau insgesamt höhere Alkaloid-Mengen ergeben können. Auch Friedman (2006) kam in seinem Übersichtsartikel zum Schluss, dass ökologisch kultivierte Kartoffelpflanzen die fehlende Anwendung von Herbiziden und Pestiziden mit einer höheren Syntheserate natürlicher Abwehrstoffe, darunter GAe wie auch phenolische Substanzen, kompensieren.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Alkaloid-Analysen lassen derartige Schlussfolgerungen allein vom Studiendesign nicht zu. Da das Probenmaterial aus dem kommerziellen Handel stammte, unterschieden sich nicht nur die Anbauorte, sondern auch die individuelle Vorgeschichte, sprich die Wachstums-, Ernte- und Transportbedingungen, die Zeit von der Ernte bis zum Verkauf usw. Wie Hajslova et al. (2005) feststellten, hatten diese Faktoren in

ihrer Untersuchung einen höheren Einfluss auf die Qualität der Knollen, als das jeweilige Kultivierungssystem. Abreu et al. (2006) konnten aus der Analyse kommerziell erworbener Knollen der portugiesischen Sorten Sante und Raja aus konventionellem, integriertem und ökologischem Anbau ebenfalls keine deutliche Tendenz im GA-Gehalt ablesen. Für Raja erhielten sie im konventionellem Landbau sogar bis zu 78% höhere GA-Mengen als für die beiden anderen Kultivierungsarten. Möglicherweise bewirkt jegliche Art von Stress, darunter auch eine Pestizidbehandlung, die Akkumulation von Sekundärstoffen als Reaktion der Pflanze, wie Zarzecka & Gugala (2003) aus ihren Untersuchungen an Kartoffelknollen nach Herbizid-Behandlung schlussfolgerten.

Allgemein anerkannt und oftmals nachgewiesen ist die Abnahme der Alkaloid-Gehalte mit zunehmender Reife und Knollengröße (Papathanasiou et al. 1998). Daher erscheint es nicht verwunderlich, dass Levy et al. (1993) in Frühjahr- und Sommerknollen höhere Werte nachwiesen, als in Kartoffeln der Herbststernte. Papathanasiou et al. (1998) führten die höhere Alkaloid-Konzentration kleiner, unreifer Knollen auf deren noch sehr aktiven Metabolismus zurück, der auch der Grund für die stärkere Reaktion physiologisch junger Kartoffeln auf Lichtreize sein mag (Olsson et al. 1996b). Die Angaben bei Hellenäs et al. (1995a), die in verschiedenen frühen Kultivaren in Schweden Werte zwischen 5,1 und 22,1 mg/100 g FG nachwiesen, lassen verglichen mit den oben genannten Mengen nicht auf höhere Alkaloid-Konzentrationen in frühen Knollen schließen. Wiederum ist ein direkter Vergleich schwer anzustellen, da ebenfalls bei Frühkartoffeln eine starke Abhängigkeit der GA-Gehalte vom jeweiligen Genotyp besteht. Festzuhalten bleibt die Tatsache, dass, falls die Alkaloidkonzentrationen in Frühkartoffeln im Vergleich zur Herbststernte höher sind, diese noch weit von gesundheitsgefährdenden Mengen entfernt liegen. Dennoch sollten, wie Friedman (2006) anführte, bevorzugt solche Kultivare als Konsumkartoffeln verwendet werden, die im Verlauf des Knollenwachstums zu geringen Alkaloid-Akkumulationen neigen. Speziell für Frühkartoffeln gilt eine frühe Einstellung der GA-Bildung als wünschenswert, da sie als kleine, z. T. nicht ausgereifte Knollen geerntet und bevorzugt ungeschält gegessen werden.

Wie die vorliegende Untersuchung trotz allem zeigen konnte, können tendenzielle Aussagen über den individuellen Alkaloidgehalt einzelner Sorten durchaus getroffen werden, sofern eine ausreichende Anzahl an Proben untersucht werden. Für die Sorte Nicola, von der sechs verschiedene Proben aus unterschiedlichen Ländern zur Verfügung standen, konnte ein durchschnittlicher Gesamt-GA-Gehalt von 21,24 mg/100 g TG mit einer Standardabweichung von 3,44 ermittelt werden. Die fünf Berber-Proben enthielten dagegen, bis auf Berber-1, mit

durchschnittlich  $34,98 \pm 7,09$  mg/100 g TG alle eine höhere Konzentration. Die für biologisches Material geringen Standardabweichungen belegen, dass trotz unterschiedlicher Herkunftsorte der Alkaloidgehalt ein sortenspezifisches Merkmal darstellt.

### 6.1.2 Verteilung der Glykoalkaloide

Der Großteil der Alkaloide befindet sich nach Kozukue et al (1987) und Schulzova et al. (1992) in einer 1 bis 3 mm dicke Schicht direkt unter der Schale. Kalac (1994) untersuchte die Konzentration innerhalb der Knolle und wies je nach Sorte 83 bis 96% in der Schale, 3 bis 14% in der Rindenschicht und 1 bis 3% im Kartoffelfleisch nach. Mit durchschnittlich 80 bis 90% im Schalenanteil wurden diese Angaben bestätigt, wobei die Variation mit 56 bis 98% in Frühkartoffeln höher als in den Knollen der Herbsterte (80 bis 90%) war. Dies ist vermutlich auf die höhere und im frühen Reifestadium noch sehr individuelle Stoffwechselaktivität der einzelnen Sorten zurückzuführen. Ein deutlicher Unterschied zwischen konventionell und ökologisch erzeugten Knollen konnte nicht festgestellt werden.

Die Abnahme des Alkaloidgehaltes hält innerhalb des Kartoffelfleisches zum Zentrum hin weiter an, wobei die äußerste 4 mm-Schicht des Fleisches mit 72% des  $\alpha$ -Chaconins und 84% des  $\alpha$ -Solanins noch die höchste GA-Konzentration im Fleisch aufweist, um dann zum Mittelpunkt hin schnell abzufallen (unter 1%). In der Schale konnte ebenfalls eine inhomogene Verteilung beobachtet werden. Als Akkumulationszentren erwiesen sich die Regionen um die „Kartoffelaugen“. Dies ist nicht verwunderlich, da aus diesen später beim Austreiben der Knollen die jungen Sprosse wachsen, die insgesamt die prozentual höchste Alkaloidmenge aller Gewebe enthalten (vgl. Abschnitt 6.2). Die GA-Konzentration der Augenregion ist vergleichbar mit der Alkaloidmenge in grünen Schalen (vgl. Tab. 5.12).

Nach Morris & Petermann (1985) ist die prozentuale Verteilung der Einzelalkaloide  $\alpha$ -Chaconin und  $\alpha$ -Solanin sorten- und gewebeabhängig. Die publizierten Angaben variieren in Knollen zwischen 43 und 73 %  $\alpha$ -Chaconin (Friedman 2006, Friedman & Dao 1992, Morris & Petermann 1985, Sotelo & Serrano 2000). Für Schalengewebe gibt Friedman (2006) einen Anteil von durchschnittlich 67% an, während im Fleisch nur 60% als  $\alpha$ -Chaconin vorliegen. Insgesamt entsprach die in dieser Arbeit ermittelte Verteilung den von Friedman (2006) genannten Angaben. Interessant war die Gegenüberstellung der  $\alpha$ -Chaconin-Anteile in Kartoffelfleisch und Schale der Früh- und Herbstkartoffeln. Während die Alkaloide in Frühkartoffeln sortenunabhängig im Fleisch zu etwa 60% und in den Schalen zu 70% aus  $\alpha$ -Chaconin bestanden, kehrte sich dies in der Herbsterte um. Während der Anteil im Fleisch relativ konstant blieb, verringerte er sich in der Schale auf etwas mehr als 50%  $\alpha$ -Chaconin.

Aus pflanzlicher Sicht betrachtet erscheint diese Verteilung durchaus sinnvoll, da  $\alpha$ -Chaconin potenter gegen Schädlinge wirkt und gerade die junge Pflanze sich gegen Angriffe schützen muss. Für den Konsumenten hingegen bedeutet der erhöhte  $\alpha$ -Chaconin-Gehalt der Frühkartoffeln ein höheres Toxizitätsrisiko. Zwischen konventioneller und ökologischer Anbauweise konnten keine Unterschiede ausgemacht werden.

Somit bleibt festzuhalten, dass Frühkartoffeln nicht nur durch ihren potentiell höheren Gesamtalkaloidgehalt, sondern auch durch ihr ungünstigeres Alkaloidverhältnis problematisch sein können. Da sie bevorzugt mit Schale gegessen werden, wirkt sich gerade das ungünstige  $\alpha$ -Solanin- $\alpha$ -Chaconin-Verhältnis der Schale nachteilig aus.

### 6.1.3 Veränderung der GA-Gehalte durch Lichteinfluss

Die durch Lichteinfluss bewirkte Grünfärbung von Kartoffelknollen ist deutlich sichtbar. Sie ist auf die Umwandlung von Amyloplasten in chlorophyllsynthetisierende Chloroplasten zurückzuführen. Entgegen der landläufigen Meinung belegten zahlreiche Studien (Dale et al. 1993, Dao & Friedman 1994, Edwards & Cobb 1997, 1998, 1999, Griffith et al. 1994 sowie Grunenfelder et al. 2006), dass die Synthese der Chlorophylle und der Steroidalkaloide unabhängig voneinander verläuft, sprich die Grünfärbung der Knollen ist nicht unbedingt ein Indiz höherer Alkaloidgehalte. Häufig konnte dennoch ein paralleler Anstieg der Alkaloid- und Chlorophyllkonzentration beobachtet werden (Dao & Friedman 1994, Grunenfelder et al. 2006, Percival 1999, Uppal 1987). Möglicherweise kann die verstärkte Bildung von Alkaloidvorstufen in grünen Knollenanteilen eine Erklärung dafür sein (Ramaswamy et al. 1976).

In den beiden Frühkartoffelsorten Nicola-2 und Sieglinde-1 waren bereits beim Kauf ergrünte Knollen enthalten. Nach Vergleich der Alkaloidkonzentration in der grünen Schale und dem darunter liegenden Fleisch mit ungefärbtem Gewebe der gleichen Knolle (Tab. 5.11) konnte in den ergrünten Stellen eine deutlich höhere Alkaloidkonzentration nachgewiesen werden.

Problematischer ist hingegen der umgekehrte Fall. Bei fehlender Grünfärbung unter Licht gelagerter Knollen kann nicht unbedingt auf unbedenkliche GA-Gehalte geschlossen werden. Bereits Dao & Friedman (1994) beobachteten in dunkel gelagerten Kartoffeln nach vierzehntägiger Einlagerung keine Chlorophyllbildung, trotzdem stiegen die GA-Konzentrationen an. Nach sieben Tagen verdoppelte sich der Gehalt für beide Alkaloide, nach 14 Tagen kam es zur Verdreifachung. Edwards & Cobb (1998) konnten durch Behandlung von Kartoffelknollen mit Inhibitoren der Chlorophyllsynthese diese zwar unterdrücken, dennoch war ein signifikanter GA-Anstieg zu beobachten, woraus die Autoren schlossen, dass metabolisch keine direkte Verbindung zwischen Chlorophyll und GA-Synthese besteht.

Teuscher & Lindequist (1994) berichteten von einem Alkaloidanteil in der Schale nicht ergrünter Knollen von bis zu 1,2%, wobei wiederum sortenabhängige Unterschiede bestehen (Grunenfelder et al. 2006, Haddadin et al. 2001, Percival 1999, Percival et al. 1996, Şengül et al. 2004). Die Auswertung der Lagerungsversuche verschiedener Frühkartoffelsorten über sieben Tage führten zum gleichen Ergebnis. Obwohl keine der Proben eine sichtbare Chlorophyllbildung aufwies, konnte in fast allen Knollen eine Alkaloidzunahme beobachtet werden. Diese war nicht ausschließlich lichtinduziert, Knollen aus der Dunkellagerung akkumulierten ebenfalls z. T. beträchtliche Alkaloidmengen, die partiell sogar höher als unter Lichteinfluss waren. Die Alkaloid-Akkumulation begrenzte sich nicht nur auf die Schale, sondern vollzog sich im Kartoffelfleisch weiter, so dass ein alleiniges Entfernen der Schale als nicht ausreichend betrachtet werden kann, um die toxischen Alkaloide gänzlich zu entfernen. Dies bestätigt wiederum die von Maga (1994) berichtete Reduktion alkaloidreicher Knollen durch schälen um nur 35%, während in gesunden Knollen durchschnittlich 60-96% entfernt werden konnten.

Die Aussagekraft dieses Versuches ist durch den eingeschränkten Probenumfang und das Nichteinbeziehen sortenabhängiger Eigenheiten natürlich begrenzt und soll hier nicht zur Verallgemeinerung dienen. Dennoch verdeutlicht er die oftmals unterschätzte Gefahr der Alkaloid-Anreicherung bereits nach relativ kurzer Lagerzeit, beispielsweise im Handel. Obwohl in keiner der Sorten grenzwertüberschreitende Mengen nachgewiesen wurden, so könnte der Verbraucher durch lichtundurchlässige Verpackungen besser vor der Aufnahme potentiell schädlicher Steroidalkaloide geschützt werden, zumal Untersuchungen der dauerhaften GA-Aufnahme bis heute fehlen (Grunenfelder et al. 2006). Die Untersuchung von Rosenfeld et al. (1995) verdeutlichte, dass durch die Wahl sinnvoller Verpackungsmaterialien durchaus Einfluss auf die Alkaloidgehalte der Knollen genommen werden kann. Bei der Lagerung von Knollen der Sorte Beate wurde zwar nach zwei Wochen in allen Packmaterialien ein GA-Anstieg nachgewiesen, der in Papiertüten mit schwarzer PE-Beschichtung jedoch wesentlich geringer ausfiel, als in lichtdurchlässigen Polyethylen-tüten. Abhängig von der Farbe der PE-Folie waren die Werte hier 1,4 bis 1,6 mal höher. Die oftmals für Kartoffeln verwendeten PE-Netze enthielten sogar 1,7 mal mehr Alkaloide.

#### **6.1.4 Veränderung des GA-Gehaltes in Salz- und Pellkartoffeln**

Wie einleitend bereits erwähnt, besitzen GAe mit 260-270°C eine hohe Zersetzungstemperatur (Porter 1972). Demzufolge ist nicht mit einer Zerstörung bei haushaltsüblichen Zubereitungsformen zu rechnen. Selbst beim Frittieren liegen die

Temperaturen gewöhnlich noch 70 bis 80°C niedriger. Nach dem Frittieren von Kartoffeln konnte Sizer et al. (1980) sogar eine Konzentrierung der Alkaloide feststellen, was vermutlich auf den Wasserverlust des Materials zurückzuführen ist. Neben dem Frittiervorgang waren die Auswirkungen von Backtemperaturen noch häufiger Gegenstand von Untersuchungen, während Daten zum Kochen nur bei Kvasnika et al. (1994) sowie Bushway & Ponnampalam (1981) aufgefunden werden konnten. Letztere beobachteten beim gewöhnlichen Kochvorgang wie auch beim Backen und Mikrowellengaren keine signifikante Veränderung, allein Frittieren führte zu etwas niedrigeren Alkaloidgehalten. Friedman (2006) berichtete von einer geringen Verringerung um 3,5% für  $\alpha$ -Chaconin und 1,2% für  $\alpha$ -Solanin. Demgegenüber berichteten Kvasnika et al. (1994) in gekochten Knollen von einer Reduktion der GA-Konzentration um über 50% und führten dies auf ein Auswaschen der Alkaloide ins Kochwasser zurück, das jedoch nicht analysiert wurde.

Der in dieser Arbeit verwendete Versuchsansatz verglich die Veränderung der GA-Konzentration während der Herstellung von Salz- und Pellkartoffeln im Produkt selbst wie auch im verwendeten Kochwasser. Er erlaubt daher auch Aussagen zu einem möglichen Einfluss der alkaloidreichen Schale während des Kochvorgangs zu treffen. Die GA-Konzentration in den schalenlosen Salzkartoffeln verringerte sich nach dem Kochen auf weniger als die Hälfte, was vermutlich wie von Kvasnika et al. (1994) berichtet, auf die Auswaschung zurückzuführen ist, da in allen Kochwässern Alkaloide nachgewiesen wurden. Im Fleisch der Pellkartoffeln erhöhte sich dagegen die GA-Konzentration leicht, eventuell wurden Alkaloide aus der Schale durch die Aufnahme von Wasser mit in das Fleisch geschleppt. Ein Einfluss unterschiedlicher Wasseraufnahmevermögen kann ausgeschlossen werden, da die Konzentrationen grundsätzlich auf das Trockengewicht bezogen wurden. Auch der partielle Abbau der  $\alpha$ -Formen zu ihren  $\beta$ - und  $\gamma$ -Formen ließ sich nach Auswertung von MS-Analysen ausschließen. Somit war zu vermuten, dass die alkaloidreiche Schale tatsächlich Einfluss auf die Alkaloidmenge im Kochgut ausübt. Ein Vergleich der Alkaloidkonzentrationen in der Schale der Pellkartoffeln mit der unbehandelten Kontrolle deutete auf keine Veränderung hin. Durch den insgesamt hohen GA-Gehalt in Schalen und deren schwere Homogenisierbarkeit sind geringste Veränderungen, wie hier, allerdings schwer nachzuvollziehen. Wurden die beiden Pellkartoffelansätze in Salzwasser bzw. verdünnter Essigsäure verglichen, so offenbarte sich eine unerwartete Verringerung der Alkaloid-Werte im Kartoffelfleisch der Essigsäurekartoffeln. Falls tatsächlich die Verschleppung von Alkaloiden aus der Schale ins Fleisch der Grund für die höhere Alkaloidkonzentrationen in Pellkartoffeln wäre, so sollte erwartet werden, dass sich der

Gehalt im Fleisch der Essigsäurekartoffeln stark erhöht. Eventuell mag die gegenüber der Verschleppung bevorzugte Auswaschung der Alkaloide ins Kochwasser ein Grund sein. Diese konnte in den Essigsäure-Proben eindeutig nachgewiesen werden. Zum einen wies das Essigsäurewasser eine zehnfach höhere GA-Konzentration auf, als das Salzwasser der Pellkartoffeln, andererseits verringerten sich die Alkaloidmengen in der Schale deutlich um mehr als 50%.

Der vorliegende Versuch soll und kann nur ein tendenzielles Verhalten der GAe während der Zubereitung widerspiegeln. Inwieweit diese Beobachtungen Richtigkeit besitzen, muss durch weitere Ansätze bestätigt werden. Sinnvoll wäre sicherlich, dabei auf verschiedene Kartoffelsorten zurückzugreifen, die sich untereinander in ihren GA-Mengen in Fleisch und Schale unterscheiden, um den Einfluss des Kochprozesses noch deutlicher darzustellen. Außerdem sollte einem eventuellen Einfluss durch das Zerschneiden der Knollen nachgegangen werden, in dem die Versuche nochmals mit Gesamtknollen wiederholt werden.

## 6.2 Traditionelle Kartoffelsorten

Die Datenlage zum Alkaloidgehalt und -muster der gesamten Kartoffelpflanze ist sehr rar. Meist beschränkten sich die Analysen auf die Überprüfung von wilden *Solanum*-Arten (Bianco et al. 2002, Stobiecki et al. 2003, Tingey et al. 1978, Väänänen et al. 2005, Van Gelder et al. 1989, Zywicki et al. 2005), die in Zuchtprogrammen zur Verbesserung der Schädlingsresistenz der Kulturkartoffel eingesetzt werden (vgl. Abschnitt 6.3). Andere Untersuchungen analysierten ausschließlich Blattmaterial, um den Einfluss biotischer und abiotischer Faktoren auf den GA-Gehalt zu erforschen (Eltayeb et al. 2005, Lafta et al. 2000, Uppal 1987). In einigen Quellen sind zwar Gehalte zu verschiedenen Pflanzenorganen erwähnt (Hänsel & Sticher 2004, Teuscher & Lindequist 1994, Lachman et al. 2001), jedoch handelt es sich hier jeweils um Zusammenstellungen aus verschiedenen Publikationen. Allein Friedman & Dao (1992) berichteten über GA-Konzentration verschiedener Organe einer Kartoffelpflanze. So konnten sie in der Sorte NDA 1725 die höchsten Gehalte in jungen Sprossen (997 mg Gesamt-GA/100 g FG) nachweisen, gefolgt von den Blättern (145 mg Gesamt-GA/100 g FG), der Wurzel (86 mg/100 g FG), der Sprossachse (Hauptstamm 32,0; Nebenast 45,6 mg Gesamt-GA/100 g FG), den Beeren (22,1 bis 15,9 mg/100 g FG) und schließlich den Knollen mit durchschnittlich 14,7 mg/100 g FG.

Die vorliegende Untersuchung diente dazu, eine Übersicht über die Alkaloidkonzentrationen in den verschiedenen Pflanzenorganen innerhalb einer Sorte aufzustellen und verschiedene Sorten zu vergleichen. Die Wahl fiel dabei auf Kartoffelsorten, die um die Jahrhundertwende

des vergangenen Jahrhunderts gebräuchlich waren, da einerseits hierzu keine Daten zur Verfügung stehen und es sich andererseits häufig um Kultivare handelt, die eine deutliche Färbung ihrer Knollen zeigen, wie z. B. die „blauen“ Sorten Edzell Blue, Arran Victory oder die „roten“ wie Pink Fir Apple oder Red Duke of York. Zusätzlich wurden heute kommerziell erhältliche, gefärbte Sorten wie Balmoral, La Ratte oder Rosara mit in die Untersuchung aufgenommen.

### 6.2.1 GA-Gehalt traditioneller Kartoffelsorten

Die optimale Kartoffelpflanze sollte laut Dao & Friedman (1996) niedrige Alkaloidgehalte in den Knollen und zum Schutz vor Schädlingsbefall hohe Mengen im Kartoffelkraut enthalten. Wie die Untersuchungen von Dao & Friedman (1994, 1996) und Friedman & Dao (1992) zeigen konnten, liegen die Blattalkaloidkonzentrationen mit maximal 908 mg /100 g TG tatsächlich über den Knollengehalten. Mit bis zu 845 mg Gesamt-GA/100 g TG in Blattgewebe und 1033 mg/100 g TG in den jungen Blättern bewegten sich die in dieser Arbeit analysierten traditionellen Kartoffelsorten im gleichen Bereich. Trotz des etwas höheren Maximalwertes war ein generell höherer Alkaloidgehalt in jungen Blättern nicht offensichtlich. Insgesamt war die hohe Variation problematisch, die nicht nur zwischen den Sorten, sondern auch innerhalb einer Pflanze der gleichen Sorte auftrat. Sie ist deutlich an den z. T. recht hohen Standardabweichungen erkennbar. Ähnliche Beobachtungen bestätigten auch Brown et al. (1999) sowie Dao & Friedman (1996). In beiden Untersuchungen konnte eine Abhängigkeit der Alkaloidkonzentration von der Blattposition an der Pflanze und dem Zeitpunkt der Probennahme beobachtet werden. Die Autoren empfahlen daher, beim Vergleich verschiedener Individuen oder Sorten Blätter zu verwenden, die dieselbe Position an der Pflanze besitzen. Über jahreszeitabhängige Konzentrationsunterschiede berichtete Schreiber bereits 1961. Er registrierte einen abfallenden Gesamtalkaloidgehalt in Blättern von Juni (330 mg/100 g FG) bis Ende August (130 mg/100 g FG), was einer Abnahme von immerhin 60% entsprach. Denkbar wäre sogar eine tageszeitliche Abhängigkeit der GA-Konzentrationen. So wiesen Sporer et al. (1993) an *Atropa belladonna*, ebenfalls einer Solanaceae, einen tageszeitlichen Rhythmus im Hyoscyamin-Gehalt nach. Höchste Blattkonzentrationen wurden am frühen Morgen und späten Abend detektiert, während am Mittag die Gehalte am niedrigsten waren. Begründet wurde dies u. a. durch die unterschiedlichen Lichtverhältnisse der Tageszeiten. Dass die Bestrahlungsintensität einen signifikanten Einfluss auf die Blattalkaloidkonzentrationen ausüben kann, bestätigten Lafta et al. (2000). Durch die zahlreichen Einflussparameter auf die GA-Gehalte in den Blättern ist es

somit schwierig verlässliche Aussagen zu treffen. Frühere Untersuchungen belegten, dass sich die GA-Konzentration mit zunehmender Reife des Blattes erhöht, nach vollständiger Ausreifung dann wieder leicht abnimmt, wobei die Blattgröße keine Rolle spielte (Brown et al. 1999).

Die in den Sprossachsen analysierten GA-Konzentrationen waren grundsätzlich niedriger als im Blattmaterial. Mit einem Gehalt zwischen 4,12 und 273,13 mg/100 g TG entsprachen sie den bereits von Friedman & Dao (1992) berichteten Werten. Tendenziell enthielt das ältere Gewebe höhere Mengen als die oberen, jüngeren Abschnitte. Dies mag damit zusammenhängen, dass sich die Alkaloidkonzentration im weiteren Verlauf in den Wurzeln noch leicht erhöht.

Der jeweils höchsten Alkaloidgehalt aller Organe wiesen die jungen Sprosse mit 3694 bis 9197 g/100 g TG auf, gefolgt von den Beeren, die nur bei La Ratte gebildet wurden. Mit 978 mg Gesamt-GA/100 g TG wurden die Angaben von Coxon 1981 (17,7 bis 135,4 mg/100 g FG) bestätigt. Ein Vergleich der Alkaloidkonzentration in den Samen und im umgebenden Fruchtfleisch erbrachte keine signifikanten Unterschiede.

## 6.2.2 Verteilung der GAe

Bei der Gegenüberstellung der Alkaloidverteilung in den verschiedenen Geweben (Kapitel V, Abschnitt 5.2.2.1, Tab. 5.21 und 5.22) fiel auf, dass der Anteil des toxischeren  $\alpha$ -Chaconins von den Blättern (durchschnittlich 60-80%) kontinuierlich über die Sprossachse (65-75%) bis hin zu den Wurzeln (unter 50%) abnimmt, um dann in den Knollen wieder anzusteigen (60-70%). Eine mögliche Erklärung könnte das für Blätter und Knollen höhere Risiko eines Pathogenangriffs sein, gegen den sich die Pflanze mit Hilfe des toxischeren  $\alpha$ -Chaconins schützen will. Dem widerspricht der relativ geringe  $\alpha$ -Chaconin-Anteil der jungen Sprosse (ca. 50%), die mit dieser Begründung den höchsten Gehalt aufweisen sollten, um sie am effektivsten zu beschützen. Da publizierte Daten bislang fehlen, kann an dieser Stelle nur spekuliert werden.

Hinsichtlich der Korrelation der GA-Gehalte in Blättern und Knollen existieren unterschiedliche Ansichten. Während Eltayeb et al. (2005) und Sarquis et al. (2000) eine Abhängigkeit von Blatt- und Knollengehalten bestritten, fanden Deahl et al. (1973), Sanford & Sinden (1972) sowie Uppal (1987,  $R^2=0,865$ ) eine positive Korrelation. Grund für diese widersprüchlichen Meinungen mag die bereits angesprochene hohe Varianz der Pflanzen zu sein. Möglicherweise verhalten sich einzelne Sorten unterschiedlich oder der Einfluss der Umweltbedingungen, vor allem Temperatur und Sonnenbestrahlung (Lafta et al. 2000), hat

einen so großen Einfluss, dass eine mögliche Korrelation überdeckt oder eine nicht vorhandene hineingedeutet wird. In der vorliegenden Untersuchung war kein Zusammenhang zwischen den Blatt- und Knollenkonzentrationen erkennbar.

Ähnliches gilt auch für den Vergleich von Gewächshaus- und Freilandpflanzen. Bereits Schwarze (1963) beklagte deren hohe Variabilität in seiner Gegenüberstellung. Durchschnittlich konnte er zwar viermal höhere Alkaloid-Werte in den Blättern von Gewächshauspflanzen finden, betonte jedoch die begrenzte Aussagekraft auf Grund der großen Schwankungen. Die zwei- bis dreimal höheren GA-Konzentrationen, die Van Gelder et al. (1988b) in den Knollen von Kartoffelpflanzen aus dem Gewächshausanbau detektierte, sind dagegen weniger auf die Umweltbedingungen zurückzuführen, sondern auf die starke Abhängigkeit der Alkaloidgehalte von der Knollengröße. Je kleiner die Knolle, desto größer ist der prozentuale Anteil der alkaloidreicheren Schale und damit auch der Gesamtalkaloidgehalt. Da die Kultivierung von Kartoffeln in Pflanzkübeln zu geringeren Knollengewichten führt, sind höhere Alkaloidkonzentrationen im Gewächshausanbau zu erwarten.

In der vorliegenden Arbeit wichen die Alkaloidmengen beider Anbauverfahren nicht voneinander ab, was mit fast identischen Knollengewichten zu erklären ist. Verglichen mit den in Kapitel 6.1 besprochenen kommerziellen Sorten wurde insgesamt ein geringeres Frischgewicht erzielt, was sich wiederum in deren durchschnittlich höherer GA-Konzentration widerspiegelt. Ein Einfluss der Knollenfarbe auf die Alkaloidgehalte konnte nicht beobachtet werden. Weder die „blauen“ Sorten Arran Victory, Edzell Blue, Odenwälder Blaue und Peruanisch Blaue, noch die „roten“ Vertreter Balmoral, Bildstar, Early Rose, La Ratte, Pink Fir Apple, Red Duke of York, Rosara oder Rote Löschtaler enthielten auffallend hohe Alkaloidmengen. Im Zuge des wachsenden Gesundheitsbewusstseins der Bevölkerung und der bekanntermaßen günstigen Effekte der farbgebenden Anthocyane auf die menschliche Gesundheit wäre es durchaus sinnvoll statt der üblichen braunen Kartoffeln von Zeit zu Zeit auch auf deren farbige Vertreter zurückzugreifen.

## **6.2.3 GA-Muster traditioneller Kartoffelsorten**

### **6.2.3.1 Identifizierung der GAe**

Die Identifizierung der durch LC-ESI-MS detektierten Alkaloide erfolgte durch Vergleich der *m/z*-Werte der protonierten Molekülonen mit literaturbekannten Daten (Bianco et al. 2002, 2003, Chen et al. 1994, Cherkaoui et al. 2001, Coates & Wilkins 1986, Kozukue et al. 1999, Lawson et al. 1997, Stobiecki et al. 2003, Väänänen et al. 2005, Van Gelder et al. 1989,

Zywicki et al. 2005). Eine zusätzliche Strukturinformation lieferten Fragmentionen, die durch die Spaltung der glykosidischen Bindungen beim Ionisierungsprozess und/oder Dehydrierung entstanden (Coates 1986). Die Zucker-Bindungen besitzen eine relativ niedrige Bindungsenergie, so dass es durch die zur Ionisierung verwendeten Spannungen bereits in der Ionenquelle zu einer „In-Source-Fragmentierung“ kommt. Cataldi et al. (2005) wie auch Price et al. (1985) zeigten an  $\alpha$ -Tomatin, dass bei der Fragmentierung die Spaltung der interglykosidischen Bindungen dominiert. Stobiecki et al. (2003) bestätigten diese Beobachtung für Solanidin- und Solasodin-Alkaloide. Chen et al. (1994) erklärten den Mechanismus der Spaltung mit einer Protonierung des interglykosidischen Sauerstoffs, gefolgt von einem Wasserstofftransfer und schließlich der Spaltung der Bindung distal vom Aglykon. Die Durchführung von MS/MS-Experimenten, bei denen die GAe in einer Kollisionszelle durch eine Spannung beschleunigt werden, auf Kollisionsgasmoleküle treffen und dadurch fragmentiert werden, brachte geringen Erfolg. Problematisch war die Einstellung der Kollisionsenergie, die entweder zu niedrig war, so dass es kaum zu Fragmentierungen kam oder bei zu hoher Einstellung das Molekül fast vollständig zertrümmerte. Ähnliches berichteten auch Bianco et al. (2002) sowie Chen et al. (1994), die in ihren MS/MS-Experimenten ebenfalls nur eine geringe Intensität der Fragmentionen feststellten. Auf Grund der informativeren „In-Source-Fragmentierung“ wurde daher auf die weitere Anwendung von MS/MS verzichtet. In Anhang B Abb. B.1 und B.2 sind die MS-Spektren der in der Kulturkartoffel (*Solanum tuberosum* L.) dominierenden Alkaloide mit ihren Fragmentierungsschemata dargestellt. Mit Hilfe der Molekülionen und der Fragmentionen durch „In-source-Fragmentierung“ konnten die in Kapitel V, Abschnitt 5.2.3, Tabelle 5.27 dargestellten GAe identifiziert werden.

### 6.2.3.2 GA-Muster

Die bisherigen massenspektrometrischen Untersuchungen von Kulturkartoffeln beschränkten sich meist auf den Nachweis von  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin im Knollengewebe. Analysen der oberirdischen Anteile fehlen fast gänzlich.

Die Kartoffelknollen aller untersuchten Sorten enthielten fast ausschließlich  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin. Im Blattgewebe wurden darüber hinaus die beiden Solasodin-Alkaloide Solasonin und Solamargin nachgewiesen, deren Mengen meist niedrig waren, in den Sorten Bamberger Hörnchen, La Ratte, Nageler Kipfler und Pink Fir Apple jedoch in hoher Konzentration vorlagen. Da die Beeren der Sorte La Ratte ebenfalls größere Solanidin und Solamargin-Gehalte aufwiesen, ist davon auszugehen, dass alle oberirdischen Teile dieser Sorten reich an Solasodin-Alkaloiden sind. Wie Uppal (1987) bereits anmerkte, ist eine Abweichung des

Alkaloidmusters in Knollen- und Blattmaterial in *Solanum*-Wildarten durchaus häufiger anzutreffen. Für Kulturkartoffeln wurde dies bislang nicht beschrieben. Grund für die unterschiedlichen Alkaloidmuster in Kartoffelsorten sind genotypische Unterschiede, die auf verschiedene Vorfahren zurückzuführen sind. Wie Mohler & Sulser (2001) anführten, gehen die heute erhältlichen Kultursorten auf einige wenige Ausgangssorten zurück, die der Krautfäule-Epidemie von 1845 bis 1848 widerstehen konnten. Es scheint, als existierten zwei Ausprägungen dieser Ursprungssorten. Die eine, die unabhängig vom Organ fast ausschließlich  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin produzierte und die zweite, in deren Knollen  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin vorherrschten, die in den oberirdischen Anteilen aber noch größerer Mengen Solasonin und Solamargin produzierte. Möglicherweise fand die Integration der Gene zur Solasodin-Produktion aber auch erst im späteren Verlauf der Kartoffelzucht statt.

Neben den vier Hauptalkaloiden konnten im Spurenbereich noch Ionen bei  $m/z$ - 850, 866, 886, 910 und 926 detektiert werden, die auf Grund ihres Masse/Ladungsverhältnisses vermutlich den GAen angehören. Hierauf soll in Abschnitt 6.3.2 näher eingegangen werden. Die Wurzeln enthielten zusätzlich große Mengen  $\beta$ -Chaconin ( $m/z$ -Verhältnis 706), das in dieser Größenordnung in keinem der anderen Organe auftauchte. Nach Friedman & Dao (1992) handelt es sich dabei um  $\beta_2$ -Chaconin, bei dem die an C-2 der Glucose gebundene Rhamnose fehlt (vgl. Kapitel I, Abschnitt 1.2.1, Tab. 1.4.1). In wie weit diese Beobachtung für die Biosynthese relevant ist, kann an dieser Stelle nicht gesagt werden. Bislang wurde kein bedeutender Transport von GAen innerhalb der Pflanze nachgewiesen, grundsätzlich sind alle Organe zur Synthese fähig und soweit man weiß, tun sie dies auch. Weitere Alkaloide, wie die in einigen Wildarten vorkommenden Formen  $\alpha$ -Tomatin, Demissin oder Commersonin konnten nicht gefunden werden.

Die LC-ESI-MS-Analyse von Marienkäferlarven, die sich auf den mit Läusen befallenen Freilandpflanzen ansiedelten, zeigte keinerlei Anzeichen einer Alkaloidaufnahme über die Läuse in die Larven. Dies könnte mit einer Aufnahmemenge in die Laus und nachfolgend in die Marienkäferlarve unterhalb der Nachweisgrenze zusammenhängen. Wie Hlywka et al. (1994) vermuteten, kommt es durch Lausbefall zu keinem messbaren Alkaloidanstieg in der Pflanze, da sie als Phloemsauger sehr sorgsam mit ihrem Wirt umgehen. Andererseits konnte auch beim destruktivem Befall durch den Kartoffelkäfer noch keine Aufnahme von GAen in die Insekten nachgewiesen werden (Amer 2004).

## 6.3 *Solanum*-Wildarten

Beide Unterarten von *Solanum tuberosum*, die in Europa kultivierte *tuberosum*, wie auch die in Lateinamerika bevorzugte *andigena*, sind das Ergebnis eines langen Domestikationsprozesses, in dem verschiedene Wildarten miteinander gekreuzt wurden. Dies geschah bereits in den Ursprungsgebieten in Südamerika, so dass die im 16. Jahrhundert durch die spanischen Eroberer eingeführten Knollen als indianische Züchtungsprodukte bereits Kulturformen waren (Johns & Alonso 1990). Führend in der Zucht waren vor allem Aymara- und Quechua-Stämme der Zentralanden (Brücher 1975, Johns & Alonso 1990). Ziel der züchterischen Bemühungen war es, eine Kulturform zu entwickeln, die großknollige Speicherorgane bildet, deren Alkaloidgehalt nach Aufnahme zu keinen toxischen Nebenwirkungen führt (Johns & Alonso 1990). Als die Kartoffel im Europa des 18. Jahrhunderts das Interesse als landwirtschaftliche Nutzpflanze erlangte, kam als weiteres Kriterium die Verbesserung der Anfälligkeit gegen verschiedene Krankheitserreger wie den Erreger der Kartoffelfäule (*Phytophthora infestans*) hinzu. Dies wurde und wird auch heute noch durch Einkreuzung verschiedener Wildsorten erreicht (Bradshaw et al. 2006, Darsow 2002, Gregory et al. 1981, Hijmans et al. 2003, Kuronen 1999, Osman et al. 1978, Van Gelder et al. 1988b). Bislang wurden mehr als 15 Wildarten als Quelle von Resistenzgenen verwendet, unter ihnen die in dieser Arbeit untersuchten Spezies: *S. acaule* ssp. *acaule*, *S. demissum*, *S. maglia*, *S. microdontum*, *S. raphanifolium* und *S. sparsipilum* (Bradshaw et al. 2006, Flanders et al. 1992, Petersen et al. 1993). Bei der Einkreuzung von Wildarten muss jedoch immer deren Alkaloidmuster und -gehalt berücksichtigt werden, da sie zu unerwünschten Begleiterscheinungen führen können und die Knollen der domestizierten Kultivare für Ernährungszwecke unbrauchbar werden lassen (Osman et al. 1978, Sharma & Salunkhe 1989, Van Gelder et al. 1988b). Ein Beispiel war die amerikanische Sorte Lenape, in die die Wildart *S. chacoense* eingekreuzt wurde. Sie musste durch ihre hohen Knollenalkaloidgehalte vom Markt genommen werden (Zitnak & Johnston 1970).

### 6.3.1 GA-Gehalt wilder *Solanum*-Arten

Der Alkaloidgehalt wilder *Solanum*-Arten liegt in Knollen wie Blättern allgemein über den Werten für Kulturkartoffeln. In den Knollen erwähnten Osman et al. (1986) Mengen von 20 bis 126 mit typischerweise um die 50 mg/100 g FG. Friedman (2006) berichtete von noch höheren Gehalten, die zwischen 3,6 bis 432 mg/100g FG liegen. Angaben in Blättern sind

selten, für einzelne Arten wurden Mengen von 20 bis zu 3900 mg/100 g angegeben (Gregory et al. 1981).

Die in dieser Arbeit analysierten Wildarten bildeten Alkaloidmengen zwischen 46 und 2993 mg/100 g Blatt-TG, in Knollen konnten Werte zwischen 2 und 1039 mg/100 g TG nachgewiesen werden. Die folgenden Tabellen 6.1a und 6.1b zeigen nochmals die in Knollen- und Blattgewebe ermittelten GA-Gehalte auf Trocken- und Frischgewicht bezogen und vergleichen diese mit den bislang in der Literatur beschriebenen Daten.

Die Knollen der Arten *S. acaule* ssp. *acaule*, *S. chaucha*, *S. curtilobum*, *S. demissum*, *S. polyadenium*, *S. tarijense*, *S. tuberosum* ssp. *andigena* und *S. phureja* ssp. *phureja* wiesen Gehalte unter dem für Kultursorten festgelegten Grenzwert von 20 mg/100 g FG auf. Für die Arten *S. acaule* ssp. *acaule*, *S. demissum* und *S. polyadenium* gilt dies jedoch nur eingeschränkt. Sie wiesen ein gegenüber der Kulturkartoffeln unübliches Alkaloidmuster auf, in dem nicht die vier quantifizierten GA-Formen Hauptalkaloide waren, sondern  $\alpha$ -Tomatin und Demissin (vgl. Abschnitt 6.3.3).

Die Wildart *S. acaule* ssp. *acaule* ist zwar für ihre von Natur aus variierende Knollenkonzentration bekannt. Der Gehalt von 2,12 mg/100 g TG (entsprechen 0,84 mg/100 g FG) erscheint bei den Angaben von Osman et al. (1978) mit 35 bis 126 mg/100 g FG oder Schmiediche et al. (1980 & 1982) mit 47,6 bis 122,7 mg/100 g FG dennoch zu niedrig. Beide Gruppen arbeiteten allerdings mit GLC und permethylierten GAen und quantifizierten somit alle Alkaloide. Osman et al. (1978) führten die hohen innerartlichen Abweichungen auf die Variabilität des genetischen Materials zurück und wiesen auf die Gefahr des Einsatzes dieser Art in Zuchtprogrammen hin.

Die Knollen und Blätter aus *S. polyadenium* enthielten nach Zrúst (2004) ähnlich niedrige Alkaloidmengen (Knolle: 78,02 mg/100 g FG, Blätter: 15,68), wie die in dieser Arbeit ermittelten Gehalte. Er quantifizierte allerdings nur die Solanidin-Alkaloide. Die hohen Angaben der Tingey Gruppe (1978, 688 mg/100 g FG) und Gregory et al. (1981, 2000 mg/100 g TG), die das gesamte Alkaloidspektrum in den Blättern untersuchten, sind somit ebenfalls durch die Einbeziehung der Hauptalkaloide erklärbar. Gleiches gilt für die Angaben von Sarquis et al. (2000) in *S. demissum*.

**Tab. 6.1.1** Ermittelte Gesamt-GA-Gehalte der vier Hauptalkaloide [mg/100 g TG] in Knollen wilder *Solanum*-Arten und Vergleich mit literaturbekannten Daten [mg/100 g FG].

Art	Ermittelte GA-Gehalte		Literaturdaten	
	Gesamt-GA TG	Gesamt-GA <sup>1</sup> FG	Gesamt-GA	Referenz
<i>S. acaule</i> ssp. <i>acaule</i>	2,12	0,84	3,3 35,0-126,0 53,4-122,7 11,5-50,3 118,0	B E F, G H I
<i>S. alandiae</i>	395,98	136,08		<sup>3</sup>
<i>S. bulbocastanum</i> ssp. <i>bulbocastanum</i>	1038,86	293,46	4,9	B
<i>S. chaucha</i>	30,17	6,26	27,7	B
<i>S. curtilobum</i>	29,79	6,14	14,6-53,0 3,8-29,0	F E
<i>S. demissum</i>	4,24	1,33	70,0	J
<i>S. maglia</i>	441,32	144,12	56,0	C
<i>S. microdontum</i>	240,74	89,83	0,4	B
<i>S. phureja</i> ssp. <i>phureja</i>	23,56	5,95	15,1 1,2-5,8	B K
<i>S. polyadenium</i>	Sp. <sup>2</sup>	Sp. <sup>2</sup>	78,0	B
<i>S. raphanifolium</i>	77,96	24,75	28,0-70,0	C
<i>S. sparsipilum</i>	187,70	142,20	91,8 40,0-164,0 25,5-278,0	B C H
<i>S. tarijense</i>	43,05	14,95		<sup>3</sup>
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> (Argentinien, weiß)	36,94	14,65		
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> (Argentinien, violett)	7,41	1,97	9,0 4,0-4,9 4,0-6,4	B E F
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> (Peru)	51,98	5,00		

<sup>1</sup> berechnet auf das Frischgewicht<sup>2</sup> Spuren<sup>3</sup> Keine Daten verfügbar

B Zrüst 2004

C Johns &amp; Alonso 1990

E Osman et al. 1978

F Schmiediche et al. 1980

G Schmiediche et al. 1982

H Van Gelder et al. 1988

I Kozukue et al. 1999

J Sarquis et al. 2000

K Griffith &amp; Dale 2001

Die Alkaloidkonzentration im Knollengewebe der übrigen Sorten überschreitet die Schwelle von 20 mg/100 g FG. Die höchsten Konzentrationen zeigten die Arten *S. alandiae*, *S. maglia*, *S. tarijense* und *S. bulbocastanum* ssp. *bulbocastanum*. Mit 1039 mg/100 TG wies *S. bulbocastanum* ssp. *bulbocastanum* den höchsten Knollengehalt auf, die Konzentration im Blattgewebe war jedoch sehr niedrig (46 mg/100 g TG). Niedrige Blattalkaloidgehalte in dieser Art stellten bereits Gregory et al. in ihrer 1981 durchgeführten Untersuchung fest. Die

Autoren vermuteten, dass ihre Akzession nahezu alkaloidfrei ist. Die niedrige Blattkonzentration könnte die beschriebene Anfälligkeit von *S. bulbocastanum* ssp. *bulbocastanum* gegenüber der Kartoffelzikade *Empoasca fabae* HARRIS erklären (Tingey et al. 1978).

Nach den Ausführung von Johns & Alonso (1990) scheint *S. maglia* eine lange Tradition in der Ernährung des Menschen zu besitzen. Basierend auf Stärkekornanalysen wurden Knollen der Ausgrabungsstätte Monte Verde, Chile, die vor ca. 13000 Jahren bewohnt wurde, als *S. maglia* identifiziert. Nach Ugent et al. (1987) war diese Art bereits bei den Einwohnern des späten Pleistocän Teil der täglichen Ernährung. Auch heute wird sie noch von den Indianern des Araucanier-Stammes in Zentralchile konsumiert (Laufer 1938). Dies verwundert, da sie als bitter schmeckende Art bekannt ist (De Candolle 1886), was auf ihren hohen Alkaloidgehalt zurückzuführen ist. Die Knollen wiesen mit 441 mg/100 g TG (144,12 mg/100 g FG) den zweithöchsten Alkaloid-Gehalt auf. Auf niedrigere Werte mit nur 56 mg/100 g FG kamen Johns & Alonso (1990). Mögliche Erklärung der erhaltenen hohen Alkaloidkonzentration könnte die kleine Knollengröße dieser Art sein. Wie bereits unter Abschnitt 6.2.1 erwähnt, ist die Größe der Knollen und damit das Verhältnis von alkaloidreicher Schale zum Kartoffelfleisch neben dem Genotyp die wichtigste Einflussgröße auf den Alkaloidgehalt. Dies könnte die Abweichungen in der Alkaloidkonzentration zahlreicher in dieser Arbeit analysierter Wildarten erklären, da einige Arten durch ihre speziellen Bedürfnisse nur in Pflanzkübeln im Gewächshaus kultiviert werden konnten (vgl. Kapitel V, Abschnitt 5.3.3, Tab. 5.29).

Neben *S. maglia* ist *S. curtilobum* ebenfalls als Bitterkartoffel bekannt. Sie wird daher von den Ureinwohnern entweder nach entgiftender Verarbeitung, z. B. durch Herstellung von „*chuño*“ (Hernando Bermejo & León 1994) oder zusammen mit essbarem Ton konsumiert (Johns 1986). Während Johns (1990), Osman et al. (1978) und Schmiediche et al. (1980) von Alkaloidgehalten zwischen 12 und 64 mg/100 g FG berichteten, lag die Konzentration der hier analysierten Akzession mit 29,79 mg/100 g TG, auf das FG bezogen 6,14 mg/100 g FG vergleichsweise niedrig, was nicht unbedingt auf einen bitteren Geschmack schließen lässt. *S. curtilobum* gehörte zu den im Freiland kultivierten Sorten mit höherem Knollengewicht. Dies könnte eine mögliche Erklärung sein.

Die Datenlage zu den Blattalkaloidkonzentrationen ist insgesamt sehr rar. Da sich individuelle Unterschiede zwischen den Pflanzen einer Art im Blattgewebe stärker auswirken als in den Knollen, kann die Analyse eines oder zwei Blätter nur einen ungefähren Einblick bieten. Auf einen direkten Vergleich soll daher an dieser Stelle verzichtet werden. Die in *S. acaule* ssp.

*acaule* sowie *S. polyadenium* detektierten niedrigen Alkaloidmengen sind wie zuvor bei den Knollen auf die fehlende Einbeziehung der Hauptalkaloide  $\alpha$ -Tomatin und Demissin zurückzuführen.

**Tab. 6.1.2** Ermittelte Gesamt-GA-Gehalte der vier Hauptalkaloide [mg/100 g TG] in Blättern wilder *Solanum*-Arten und Vergleich mit literaturbekannten Daten [mg/100 g FG].

Art	Ermittelte GA-Gehalte		Literaturdaten	
	Gesamt-GA TG	Gesamt-GA <sup>1</sup> FG	Gesamt-GA	Referenz
<i>S. acaule</i> ssp. <i>acaule</i>	121,05	18,18	TG <sup>3</sup> 780,0 1,9	A B
<i>S. ajanhuiri</i>	1449,17	217,38		<sup>2</sup>
<i>S. alandiae</i>	2664,57	399,69		<sup>2</sup>
<i>S. bulbocastanum</i> ssp. <i>bulbocastanum</i>	45,59	6,82	TG <sup>3</sup> 20,0 1,4	A B
<i>S. chaucha</i>	829,47	124,42	7,0	B
<i>S. chomatophilum</i>	64,07	9,61		<sup>2</sup>
<i>S. curtilobum</i>	144,50	21,68		<sup>2</sup>
<i>S. demissum</i>	889,58	133,44		<sup>2</sup>
<i>S. maglia</i>	227,34	34,10		<sup>2</sup>
<i>S. microdontum</i>	1870,31	280,55	3,0	B
<i>S. pascoense</i>	822,41	123,36		<sup>2</sup>
<i>S. phureja</i> ssp. <i>phureja</i>	1453,26	217,99	5,7	B
<i>S. polyadenium</i>	53,20	7,98	TG <sup>3</sup> 2100,0 15,7 6,9	A B D
<i>S. raphanifolium</i>	28,87	4,33		<sup>2</sup>
<i>S. sparsipilum</i>	1520,31	228,05	25,3	B
<i>S. tarijense</i>	2369,52	355,48		<sup>2</sup>
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> (Argentinien, weiß)	355,79	53,37	16,7	B
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> (Argentinien, violett)	80,18	12,03		
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> (Peru)	338,54	50,78		

<sup>1</sup> berechnet auf das Frischgewicht

<sup>2</sup> Keine Daten verfügbar

<sup>3</sup> Angaben auf das TG bezogen

A Gregory et al. 1981

B Zrúst 2004

C Johns & Alonso 1990

D Tingey et al. 1978

## 6.3.2 GA-Muster wilder *Solanum*-Arten

### 6.3.2.1 Identifizierung der GAe

Die Identifizierung der in Kapitel V, Abschnitt 5.3.2, Tabelle 5.32 dargestellten GAe erfolgte wie bereits unter Abschnitt 6.2.2.1 beschrieben durch Vergleich der massenspektrometrisch ermittelten Molekül- und Fragmentationen mit literaturbekannten Daten.

Im Verlauf der Auswertung zeigte sich, dass die exakte Zuordnung der  $m/z$ -Werte zu den Alkaloiden z. T. Schwierigkeiten bereitet. Grund ist der gleichartige Aufbau der GAe, die alle aus einem variablen Aglykon und einer Zuckereinheit bestehen, die sehr konserviert ist. Bei den Triosen dominieren zwei Ausprägungen, die Solatriose, die aus je einem Molekül Galaktose, Glucose und Rhamnose besteht und die Chacotriose aus einer Glucose und zwei Rhamnose-Molekülen. Ein Unterschied in der Molekülmasse zweier Substanzen ergibt sich somit nur, wenn die Masse des Aglykons variiert. Als problematisch erwiesen sich die  $m/z$ -Ionen 868 und 884 bei  $R_t$  17,0 und 16,4 min. Sie wurden zunächst als Solamargin und Solasonin identifiziert, wobei die Fragmentationen bei  $m/z$  722, 576, 414 für Solamargin und  $m/z$  738, 722, 576, 414 für Solasonin diese Annahme unterstützten. Nach Literaturvergleich wären jedoch auch  $\alpha$ - und  $\beta$ -Solamarin denkbar, die das Aglykon Tomatidenol enthalten oder Leptinin I und II mit dem Aglykon Leptinidin. Alle drei Alkaloid-Typen unterscheiden sich zwar strukturell in ihrem Aglykon, nicht aber in dessen Masse und der angehängten Zuckerkette. Tomatidenol kann als Epimer des Solasodin-Aglykons angesehen werden, das nur in der räumlichen Orientierung des Stickstoffatoms variiert (vgl. Kapitel I, Abschnitt 1.2.1, Abb. 1.4.1). Bereits Griffith & Dale (2001) schlussfolgerten in ihrer Untersuchung an *S. phureja*, dass gleich glykosilierte GAe, die Tomatidenol enthalten, sich auf der Basis ihrer Massenspektren aus LC-APCI-MS-Analysen nicht von Solasodin-GAen unterscheiden lassen. In wie weit Solasodin- und Tomatidenol-Alkaloide in ihrem Verhalten auf RP-Phasen abweichen, ist nicht bekannt. Da keine Vergleichssubstanzen verfügbar waren, konnten hierzu keine Testläufe durchgeführt werden. Vergleiche methanolischer Extrakte aus *S. nigrum*, in dessen Tomatidenol-Taxon u. a.  $\alpha$ - und  $\beta$ -Solamarin vorkommen (Ehmke & Eilert 1986, 1995, Valovics et al. 1969, Willuhn et al. 1982) erbrachten ebenfalls kein Ergebnis, da eine genaue taxonomische Zuordnung der vorliegenden Probe nicht möglich war.

Bislang sind nur wenige Daten über die Bildung von Tomatidenol-Alkaloiden in *Solanum*-Arten bekannt. Shih & Kuc (1974) wiesen sie in gealterten Scheiben der Knollen von *S. tuberosum*, Kultivar Kennebec nach, Griffith & Dale (2001) beobachteten die lichtinduzierte Bildung in *S. phureja*, Gregory et al. (1981) fanden höhere Mengen in *S. brachycarpum* und Schmiediche et al. (1980) wiesen niedrige Konzentrationen in

*S. curtilobum* nach. Auf Grund des seltenen Nachweises sollte es sich bei den in dieser Arbeit untersuchten Wildarten bei  $m/z$  868 und 884 nicht um  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Solamarin handeln. Einzig in *S. curtilobum* könnten Tomatidenol-Alkaloide vorliegen. Ähnliches gilt ebenso für Leptinin I und II, die als Aglykon Leptinidin enthalten. Dabei handelt es sich um ein Solanidin-Derivat, das an C-23 eine Hydroxylgruppe und somit eine um 16 Einheiten höhere Masse besitzt. Da die Bildung dieser Solanidin-Derivate in größeren Mengen bislang nur in Blättern von *S. chacoense* bekannt ist (Kowalski et al. 1999, Kuhn & Löw 1961, Lawson et al. 1997, Ronning et al. 1999, 2000, Weissenberg et al. 2001) wird davon ausgegangen, dass die  $m/z$ -Werte 868 und 884 tatsächlich auf Solasonin und Solamargin zurückzuführen sind.

Für  $m/z$  1034, 886 und 870 ergab sich ein ähnliches Problem, auf das bereits Väänänen et al. (2005) bei ihren Untersuchungen an *S. acaule* und *S. brevidens* stießen. Sowohl  $\alpha$ -Tomatin, als auch Soladulcin B (Soladulcin-Lycotetraose) besitzen rein rechnerisch die Masse 1033. Der Vergleich der Literaturdaten legt jedoch nahe, dass es sich bei den hier untersuchten Wildarten für  $m/z$  1034 um  $\alpha$ -Tomatin handelt.

Bei  $m/z$  886 könnte es sich um  $\beta$ -Soladulcin (Soladulcin-Solatriose) oder um Tomatidin-Solatriose handeln, bei  $m/z$  870 um Soladulcin A (Soladulcin-Chacotriose) oder Dihydro- $\beta$ -solamarin (Tomatidin-Chacotriose). Die Ionen  $m/z$  850 und 866 sind vermutlich auf die Dehydro-Formen von  $\alpha$ -Chaconin und  $\alpha$ -Solanin zurückzuführen, die durch das Einführen einer weiteren Doppelbindung, vermutlich zwischen C-3 und C-4 eine um zwei Einheiten niedrigere Masse besitzen.  $m/z$  854 entstammt wahrscheinlich der Substanz Demissin-Chacotriose und die Ionen 906 und 926 sind auf die hauptsächlich aus *S. chacoense* bekannten Leptin I- und II-Alkaloide zurückzuführen. Auf Grund der geringen Konzentrationen dieser GAe konnte kein Vergleich von Fragmentbruchstücken stattfinden.

### 6.3.2.2 GA-Muster

Wie die Ergebnisse zeigten, unterscheiden sich *Solanum*-Wildarten in ihrem Alkaloidmuster z. T. sehr deutlich. Tabelle 6.2 zeigte erneut die in dieser Arbeit ermittelten GA-Muster und vergleicht sie mit literaturbekannten Daten.

**Tab. 6.2** Übersicht über die in *Solanum*-Wildarten detektierten GAe und Vergleich mit literaturbekannten Daten.  
 (++++) = Hauptalkaloid, (++) = Nebenalkaloid, (+) = Spuren, (-) = nicht detektiert.

		Glykoalkaloide												Literaturdaten		
Art		1	2a	2b	3	4	5a	5b	6a	6b	7a	7b	8a	8b	GA-Muster	Referenz
<i>S. acaule</i> <i>ssp. acaule</i>	Blatt	+	+	+	++	++	+++	++	+++	++	++	+	-	-	Demissin, nicht identifiziert; Demissin, $\alpha$ -Tomatin, Soladulcin B	A; L
	Knolle	+	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+	+	-	-	Demissin, $\alpha$ -Tomatin, nicht identifiziert; Demissin, $\alpha$ -Tomatin, $\alpha$ -Solanin, $\alpha$ -Chaconin; $\alpha$ -Tomatin; Demissin; Solanidin-, Demissidin-, Tomatidin-GAe; Demissine, $\alpha$ -Tomatine	E, F; H; M; N; O; L, P, I
<i>S. ajanhuiri</i>	Blatt	+	++	+	+++	+++	-	-	-	-	+	-	+	+	$\alpha$ -Solanin, $\alpha$ - und $\beta$ - Chaconin; Commersonin	E; P
<i>S. alandiae</i>	Blatt	+++	+++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+		<sup>1</sup>
	Knolle	+++	+++	++	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-		<sup>1</sup>
<i>S. bulbocastanum</i> <i>ssp. bulbocastanum</i>	Blatt	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	nicht identifiziert	A
	Knolle	+	+	-	+++	+++	-	-	-	-	-	-	+	-	$\alpha$ -Solanin, $\alpha$ -Chaconin	B
<i>S. chaucha</i>	Blatt	++	+++	-	+++	+++	-	-	-	-	+	-	-	-	Solanidin-, Solasodin-, Tomatidin-GAe	B
	Knolle	+++	+++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-		<sup>1</sup>
<i>S. chomatophilum</i>	Blatt	+	++	+	++	++	++	+	+++	++	++	+	-	-		<sup>1</sup>

<sup>1</sup> keine Daten verfügbar  
 Fortsetzung nächste Seite

Art		Glykoalkaloide												Literaturdaten		
		1	2a	2b	3	4	5a	5b	6a	6b	7a	7b	8a	8b	GA-Muster	Referenz
<i>S. curtilobum</i>	Blatt	++	+++	+	+	+	++	+	++	++	+	-	-	-		<sup>1</sup>
	Knolle	+++	+++	+	+	+	++	+	++	++	+	-	-	-	$\alpha$ -Solanin, $\alpha$ -Chaconin, $\alpha$ -Solamarin, Demissin	E, F
<i>S. demissum</i>	Blatt	+	+	-	+++	+++	-	-	+	-	-	-	+	++	Demissin; Demissin, $\alpha$ -Tomatin; Demissin, $\alpha$ -Tomatin, Neotomatin	S; M, T; U
	Knolle	+	+	+	+	+	+++	+++	+++	++	++	+	-	-		<sup>1</sup>
<i>S. maglia</i>	Blatt	+	+	-	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-		<sup>1</sup>
	Knolle	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	++	+	-	-		<sup>1</sup>
<i>S. microdontum</i>	Blatt	++	++	-	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	$\alpha$ -Solanin, $\alpha$ -Chaconin	B
	Knolle	+++	++	+++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	$\alpha$ -Solanin, $\alpha$ -Chaconin	B
<i>S. pascoense</i>	Blatt	++	+	++	+++	+++	-	-	+	-	+	-	-	-		<sup>1</sup>
<i>S. phureja</i> <i>ssp. phureja</i>	Blatt	+++	+++	+	++	++	-	+	-	-	-	-	+	-	Solanidin-, Solasodin-, Tomatidin-GAe; $\alpha$ -Solanin, $\alpha$ -Chaconin	B; K, V
	Knolle	+++	+++	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-		<sup>1</sup>
<i>S. polyadenium</i>	Blatt	+	++	+	+	+	+++	+++	++	+++	-	-	+	-	$\alpha$ -Tomatin $\alpha$ -Tomatin, Polyanin	A R
	Knolle	+	+	+	-	-	+++	++	+++	+++	+	+	-	-		<sup>1</sup>
<i>S. raphanifolium</i>	Blatt	+	++	-	+++	+++	+	+	-	-	-	-	-	-		<sup>1</sup>
	Knolle	++	+++	+++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-		<sup>1</sup>

<sup>1</sup> keine Daten verfügbar  
Fortsetzung nächste Seite

		Glykoalkaloide												Literaturdaten		
Art		1	2a	2b	3	4	5a	5b	6a	6b	7a	7b	8a	8b	GA-Muster	Referenz
<i>S. sparsipilum</i>	Blatt	+++	+++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	α-Solanin, α-Chaconin	H
	Knolle	+++	+++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Solanidin-, Solanidadienol-, Solanidanediol, verschiedene substituierte Solanidenol- und Solanidanol-GAe	Q
<i>S. tarijense</i>	Blatt	+++	+++	-	+++	+++	+	-	+	+	+	-	++	+		<sup>1</sup>
	Knolle	+++	+++	++	++	++	+	+	+	+	-	-	+	-		<sup>1</sup>
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> (Argentinien, violett)	Blatt	++	+++	-	+	+	+	+	+	+	++	++	-	-	Solanidin-, Solasodin-, Tomatidin-GAe	B
	Knolle	+++	+	+++	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	α-Solanin, α-Chaconin; Solanidin-, Solanidadienol-, Solanidandiol, verschiedene substituierte Solanidenol-GAe	E; Q
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> (Argentinien, weiß)	Blatt	+++	+++	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	siehe oben	<sup>1</sup>
	Knolle	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	siehe oben	<sup>1</sup>
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> (Peru)	Blatt	+++	+++	-	+	++	+	-	++	++	++	++	-	-	siehe oben	<sup>1</sup>
	Knolle	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	siehe oben	<sup>1</sup>

<sup>1</sup> keine Daten verfügbar

1 α-Solanin

2a α-Chaconin

2b β-Chaconin

3 m/z 868

4 m/z 884

5a α-Tomatin

5b Dehydrotomatin

6a Demissin

6b Dehydrodemissin

7a Commersonin

7b Dehydrodemissin

8a Leptin I

8b Leptin II

A Gregory et al. (1981)

B Zrüst (2004)

E Osman et al. (1978)

F Schmiediche et al. (1980)

H Van Gelder et al. (1988)

I Kozukue et al. (1999)

K Griffith &amp; Dale (2001)

L Väänänen et al. (2005)

M Schreiber et al. (1963a)

N Prokoshev et al. (1952)

O Rokka et al. (2005)

P Osman et al. (1986)

Q Van Gelder et al. (1989)

R Schreiber (1961)

S Kuhn &amp; Low (1947)

T Shih and Kuc (1974)

U Osman et al. (1982)

V Griffith et al. (2000)

Wie bereits im Ergebnisteil geschildert, konnten im Gegensatz zur Kulturkartoffel, im Blattgewebe aller Wildarten zusätzlich Alkaloide mit Vierfachzuckeranteil nachgewiesen werden. Normalerweise in niedrigen Konzentrationen vorliegend, bildeten sie in den Arten *S. acaule* ssp. *acaule*, *S. chomatophilum*, *S. demissum* und *S. polyadenium* wieder die Hauptalkaloid-fraktion.

Über die Zusammensetzung des Alkaloidmusters in *S. acaule* ssp. *acaule* herrscht bis heute Uneinigkeit. Einige Autoren, darunter Kozukue et al. (1999), Schreiber (1963) und Väänänen et al. (2005) berichteten von  $\alpha$ -Tomatin als Hauptalkaloid, andere (Prokoshev et al. 1952, Rokka et al. 2005) wiesen nur Demissin nach. In der vorliegenden Untersuchung konnten übereinstimmend mit Osman et al. (1978) und Schmiediche et al. (1980) beide Alkaloide mit etwa gleicher Konzentration detektiert werden. Zusätzlich wurden noch deren Dehydroformen nachgewiesen. Als Grund für die abweichenden Alkaloidmuster könnte die bereits von Van Gelder et al. (1988b) und Flanders et al. (1992) beschriebene intraspezifische Heterogenität eine Rolle spielen. Gregory et al. (1981) gaben als Begründung an, dass die zuvor als eigenständig geltenden Arten *S. punae* JUZ, *S. schreiteri* BUK und *S. depexum* JUZ nun als Unterart von *S. acaule* gehandelt werden und sich diese Unterarten in ihrer relativen Alkaloidzusammensetzung unterscheiden. Eventuell wäre auch der Einfluss abweichender Umweltbedingungen auf das Alkaloidmuster denkbar, die die bevorzugte Bildung eines bestimmten Alkaloides begünstigen. Übereinstimmung herrscht im niedrigen Gehalt an Solanidin- und Solasodin-Alkaloiden in Blättern und Knollen. In den Untersuchungen von Rokka et al. (2005) belief sich der prozentuale Anteil an  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin auf nur 2 bis 3% des Gesamt-GA-Gehaltes.

Die Wildarten *S. demissum* und *S. polyadenium* sind neben *S. chacoense* bekannt für ihre hohe Resistenz gegen Kartoffelkäfer- und Kartoffelzikadenbefall. *S. demissum* wurde daher wiederholt in Zuchtprogrammen zur Erniedrigung der Resistenzanfälligkeit von Kultursorten der Kartoffel eingesetzt (Darsow 2002). Wie Flanders et al. (1992) nachwiesen, entscheidet nicht der Gesamt-GA-Gehalt über die Resistenzfähigkeit, sondern die individuelle Alkaloidzusammensetzung. Wiederholt wurde von der höheren Wirksamkeit von  $\alpha$ -Tomatin und den Leptinen berichtet (Kowalski et al. 2000, Sanford et al. 1996, Sinden et al. 1980). Der hohe Gehalt an  $\alpha$ -Tomatin in *S. demissum* und *S. polyadenium* würde diese Behauptung unterstützen. Ein von Osman et al. (1978, 1982) in *S. demissum* erstmals entdecktes GA, das Neotomatin, in dem das Aglykon Tomatidin unüblicherweise mit einer Commertetraose verknüpft ist und somit ein  $m/z$ -Verhältnis von 1063 zu erwarten wäre, konnte in dieser Untersuchung nicht nachgewiesen werden. Auch für das von Schreiber (1961) in

*S. polyadenium* detektierte Polyanin, das ebenfalls aus Tomatidin und einer in ihrer Zusammensetzung ungewöhnlichen Zuckerkomponente aus Glucose und zwei Xylose-Einheiten besteht (würde  $m/z$  841 entsprechen), konnten keine Anzeichen gefunden werden. Das Vorliegen von  $\alpha$ -Tomatin als Hauptalkaloid, gefolgt von Demissin und Commersonin und in geringer Menge den Solasodin-Alkaloiden wurde bestätigt.

Die drei Akzessionen der Subspezies *andigena* aus der Art *S. tuberosum*, die neben *S. phureja* ssp. *phureja* in Südamerika recht häufig zu finden ist (Volkov et al. 2003), zeigten ein insgesamt ähnliches GA-Muster. Hauptalkaloide in Knollen und Blättern waren grundsätzlich  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin, gefolgt von den Solasodin-Alkaloiden. Geringe Unterschiede in Blattmaterial zwischen den Akzessionen zeigte sich im Vorkommen von GAen mit Vierfachzuckeranteil. Während die violettblühende Varietät aus Argentinien wie auch die Akzession aus Peru  $\alpha$ -Tomatin, Demissin, Commersonin sowie die zugehörigen Dehydroformen deutlich ausbildeten, wies die weißblühende Variante aus Argentinien die drei erstgenannten Formen in Spuren, ihre Dehydroformen überhaupt nicht auf. Möglicherweise ist das Fehlen der Dehydroformen nur eine Konzentrationsfrage, dennoch verdeutlicht es wie bereits von Van Gelder et al. (1988b) beobachtet, dass Akzessionen ein und derselben Art unterschiedliche GA-Ausprägungen und unterschiedliche Organe verschiedene GA-Typen enthalten können. Die Autoren empfehlen die bisherigen Berichte über die GA-Zusammensetzung nicht als allgemeinen Leitfaden für die Kartoffelzucht zu verwenden und befürworten, die Alkaloide wilder Kreuzungseltern zu analysiert, bevor sie in Zuchtprogrammen eingesetzt werden. Dies erscheint sinnvoll, um derartige Probleme wie bei Lenape bereits im Vorhinein auszuschließen.

## 6.4 Verarbeitungserzeugnisse

In modernen Zeiten sind Vergiftungsfälle durch einmaligen Genuss stark alkaloidhaltiger Knollen sehr selten. Welche Auswirkungen sich jedoch durch deren wiederholte Aufnahme ergeben, ob und in welchem Umfang es zu Akkumulierungseffekten kommt, ist bislang ungeklärt. Einerseits fehlen Langzeitstudien, die die fortwährende Aufnahme von GAen beobachten, andererseits ist die Datenlage zum Alkaloidgehalt speziell der in den letzten Jahrzehnten immer beliebter gewordenen Verarbeitungsprodukte sehr rar. Es existieren zwar zahlreiche Methoden zur Detektion von GAen, die jedoch selten zum Nachweis in Kartoffelerzeugnissen angewendet wurden. Ein Grund liegt sicher in der schwierigen Matrix dieser Convenienceprodukte, die häufig sehr fetthaltig sind. Ziel dieses Teils der Dissertationsarbeit war es daher, verschieden Verfahren zum Nachweis der potenziell

toxischen GAe zu entwickeln und diese miteinander zu vergleichen, um letztendlich ein verlässliches Protokoll aufzustellen, das sich zur Anwendung in der Routineanalytik eignet.

### **6.4.1 GA-Gehalt in Verarbeitungserzeugnissen**

Die HPLC-Analytik ist neben dem Nachweis mit ELISA die Standardmethode zur Detektion von GAen. Der Vorteil der HPLC bei der Untersuchung von Kartoffelproben liegt sicher in ihrer Fähigkeit nicht nur den Gesamtalkaloidgehalt, sondern auch die Einzelalkaloide detektieren zu können. Für gewisse Untersuchungen, wie z. B. Metabolismusstudien an Tier und Mensch, das Screening von *Solanum*-Wildarten für den Einsatz in Zuchtprogrammen oder auch die Analyse der synergistischen Wirkung im Zusammenspiel verschiedener Alkaloide, ist das Wissen um die Einzelalkaloide Voraussetzung, um sinnvolle Schlussfolgerungen ziehen zu können. Ihr Nachteil liegt in der vergleichsweise langen Analysendauer sowohl für die Aufreinigung als auch für die chromatographische Trennung und in der geringen Empfindlichkeit, da GAe entweder kein oder nur ein schwaches Chromophor besitzen. Für die in dieser Arbeit behandelte Fragestellung bietet die HPLC jedoch die notwendigen Grundvoraussetzungen, um befriedigende Ergebnisse erzielen zu können. Ihre hervorragende Leistungsfähigkeit wurde durch verschiedene Validierungsparameter nachgewiesen, um auch in schwierigen Matrices, wie verarbeiteten Kartoffelprodukten, verlässliche Ergebnisse liefern zu können. Folgende Tabelle stellt nochmals die ermittelten Gehalte [ $\mu\text{g/g}$ ] an  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin dar und vergleicht sie mit literaturbekannten Daten.

**Tab. 6.3** Ermittelte HPLC-Gehalte [ $\mu\text{g/g}$  TG] an  $\alpha$ -Solanin,  $\alpha$ -Chaconin, Gesamt-GA-Gehalt und Vergleich mit literaturbekannten Daten [ $\mu\text{g/g}$  TG].

Probe	Ermittelte GA-Gehalte			Literaturangaben			Ref. <sup>1</sup>
	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-GA	$\alpha$ -Solanin	$\alpha$ -Chaconin	Gesamt-GA	
B1	14,08 $\pm$ 1,83	20,06 $\pm$ 1,34	34,14 $\pm$ 2,95				
C1	8,24 $\pm$ 3,67	14,00 $\pm$ 4,88	22,24 $\pm$ 8,49	10,5 $\pm$ 1,5 17,6 $\pm$ 0,4 50,2 $\pm$ 4,4 1,3-6,9	13,0 $\pm$ 2,7 31,6 $\pm$ 3,0 58,8 $\pm$ 3,7 1,5-15,6	23,5 $\pm$ 4,2 49,2 $\pm$ 3,4 109,0 $\pm$ 8,1 3,9-21,3 24-720 95-720 11,0-54,0	X; Y; Z; AA; BB; CC
C2	13,85 $\pm$ 1,67	26,69 $\pm$ 2,56	40,54 $\pm$ 4,21	5,0-16,0	9,0-38,0		
F1	14,68 $\pm$ 3,02	28,82 $\pm$ 6,88	43,50 $\pm$ 8,36				
F2	12,89 $\pm$ 4,28	16,77 $\pm$ 5,67	29,65 $\pm$ 9,49	32,9	31,7	64,6	X;
F3	32,48 $\pm$ 5,06	45,65 $\pm$ 13,16	78,13 $\pm$ 16,10	9,0	11,0	2,0	CC
F4	9,40 $\pm$ 1,15	15,45 $\pm$ 2,54	23,65 $\pm$ 5,32				
K1	8,52 $\pm$ 4,46	13,84 $\pm$ 7,81	22,36 $\pm$ 12,14				<sup>2</sup>
P1	3,13 $\pm$ 0,48	5,32 $\pm$ 0,27	8,45 $\pm$ 0,75	0,4 4,2 $\pm$ 2,0	0,4 4,2 $\pm$ 2,0	0,8 8,4 $\pm$ 4,0	X; Y;
P2	8,48 $\pm$ 2,45	10,03 $\pm$ 2,42	18,51 $\pm$ 4,74	1,6	2,3	3,9	Z;
P3	10,83 $\pm$ 1,35	16,48 $\pm$ 2,31	27,31 $\pm$ 3,61	15,0	16,0	0,8-58,0 31,0	AA; CC
R1	14,97 $\pm$ 4,79	18,90 $\pm$ 5,43	33,87 $\pm$ 10,03	24,1 $\pm$ 3,2 19,4 $\pm$ 1,1 14,9-24,1	20,5 $\pm$ 3,7 24,8 $\pm$ 1,8 20,5-24,8	44,6 $\pm$ 6,9 44,2 $\pm$ 2,9 45,0-65,0 44,2-44,6	X <sup>3</sup> ; Y <sup>3</sup> ; AA <sup>3</sup> ; DD <sup>3</sup>
W1	81,25 $\pm$ 14,25	138,08 $\pm$ 16,65	219,34 $\pm$ 28,55				
W2	50,50 $\pm$ 15,78	80,20 $\pm$ 19,62	130,70 $\pm$ 33,63	20,1 $\pm$ 2,9	23,9 $\pm$ 4,3	44,0 44,0 76-120	X; Y DD AA
W3	30,98 $\pm$ 4,58	66,52 $\pm$ 21,19	97,35 $\pm$ 24,55				

<sup>1</sup> Ref. = Literaturreferenz<sup>2</sup> keine Daten verfügbar<sup>3</sup> Trockenpulver

X Friedman &amp; Dao 1992

Y Friedman 1992

Z Kvasnika et al. 1994

AA Easton 1998

BB Sizer et al. 1980

CC Saito et al. 1990

DD Friedman 2006

Für den Großteil der analysierten Produkte lagen die GA-Gehalte im Bereich zwischen 8,45 (P1) und 78,13  $\mu\text{g}$  Gesamt-GA/g TG (F3) mit durchschnittlich 25  $\mu\text{g/g}$ . Dies deckt sich weitestgehend mit den in der Literatur beschriebenen Daten (vgl. Tab. 6.3). Die gefundenen hohen Konzentrationen in schalenhaltigen Kartoffelvierteln konnten allerdings nur bedingt bestätigt werden. Sowohl die Untersuchungen von Friedman (1992), Friedman & Dao (1992) sowie Kvasnika et al. (1994) offenbarten zwei- bis viermal niedrigere Werte. Einzig die Analyse von Easton (1998) ermittelte ähnliche Alkaloidmengen. Da sich der Hauptteil der

Knollenalkaloide in der Schale befindet (vgl. Kapitel V, Abschnitt 5.1, Tab. 5.4 und 5.8), dürfte eine solch hohe Alkaloidkonzentration in schalenhaltigen Kartoffelvierteln nicht verwundert, was eher für die Angaben von Easton (1998) spricht. Wie Friedman (2006) sowie Sotelo & Serrano (2000) anmerkten, wird der Alkaloidgehalt verarbeiteter Kartoffelprodukte durch die hohe thermische Stabilität der GAe vor allem von der verwendeten Kartoffelsorte bestimmt. Somit wäre durchaus denkbar, dass zur Herstellung der bei Friedman (1992), Friedman & Dao (1992) und Kvasnika et al. (1994) untersuchten Kartoffelviertel alkaloidärmere Sorten verwendet wurden. Dies könnte auch die in dieser Arbeit abweichenden Alkaloidkonzentrationen in den Proben verschiedener Hersteller erklären. Die frittierten Schalen bei Friedman (2006) enthielten beispielsweise je nach Produzent 56,3 bis 203,0  $\mu\text{g GAe/g FG}$ .

Eine deutliche Verringerung der GA-Konzentration verarbeiteter Kartoffelprodukte kann praktisch nur durch Schälen und alleiniger Verwendung des Kartoffelfleisches erzielt werden. Neuere Untersuchungen zielen darauf ab, durch den Zusatz schwefelhaltiger Substanzen Einfluss auf den GA-Gehalt zu nehmen. So konnten Surjawan et al. (2001) durch Zusatz von 1% DL-Methionin-HCl während der Extruderbehandlung von Kartoffeln die Alkaloid-Menge in Kartoffelflocken um mehr als die Hälfte reduzieren (0,71 mg/100 g verglichen mit 1,77 mg/100 g in der unbehandelten Kontrolle). Die Autoren führten den Effekt auf eine Reaktion der endständigen Thiolgruppe mit der Zuckerseitenkette des GAs zurück, wodurch es zur Abspaltung der Zucker und zur Bildung des weniger toxischen Solanidins kommt. Wie Zhao et al. (1994) berichtete, kann die Reduktion der Alkaloidkonzentration nicht auf die Extruderbehandlung zurückgeführt werden, da in ihrer Untersuchung Kartoffelschalen nach Extruderbehandlung bei 110 und 150°C gleich hohe GA-Mengen enthielten, wie das Ausgangsprodukt. Dies zeigt darüber hinaus die hohe Stabilität der GAe auch während den Verarbeitungsprozessen.

## 6.4.2 Verteilung der GAe

Die hohe Beständigkeit der GAe zeigt sich ebenfalls im konstanten  $\alpha$ -Solanin- $\alpha$ -Chaconin-Verhältnis. Wie aus der rechten Spalte von Tabelle 5.35 in Kapitel V, Abschnitt 5.4.2 hervorgeht, ändert sich der Anteil des toxischeren  $\alpha$ -Chaconins am Gesamt-GA-Gehalt (54 bis 67%) trotz der sehr unterschiedlichen Verarbeitungsprozesse nicht von den Verhältnissen in den Herbstkartoffeln (Tab. 5.9: 53 bis 75%).

## 6.5 Vergleich der entwickelten Analyseverfahren an Verarbeitungserzeugnissen

### 6.5.1 Vergleich mit LC-ESI-MS

In den Kartoffelprodukten sind die zu analysierenden Substanzen in ausreichend hoher Konzentration enthalten, so dass die LC-ESI-MS durch die Darstellung von Ionenchromatogrammen grundsätzlich geeignet ist auch ungereinigte Extrakte zu analysieren, wie bei Stobiecki et al. (2003) und Zywicki et al. (2005). Da die Elektrospray-Ionisation jedoch sehr anfällig gegenüber Matrixbestandteilen ist (Henion et al. 1998) und um das System vor starker Kontamination zu schützen, wurde dennoch die SPE-Aufreinigung bevorzugt. Die Analyse der GA-Gehalte mittels LC-ESI-MS erfolgte mit den zuvor für die HPLC-Bestimmung aufgearbeiteten Extrakte, weil es an dieser Stelle nicht auf einen Vergleich, sondern nur auf die Leistungsfähigkeit des Analyseninstrumentes ankam. Wie die Abbildung 5.13 und die Bestimmtheitsmaße für  $\alpha$ -Solanin (0,92),  $\alpha$ -Chaconin (0,91) und die Gesamtalkaloidmenge (0,97) deutlich zeigten, liegen die für HPLC und LC-ESI-MS ermittelten Alkaloidkonzentrationen nahe an der Ausgleichsgeraden, was die gute Korrelation beider Instrumente unterstreicht. Der Vorteil der LC-ESI-MS-Analyse ergibt sich aus den sehr niedrigen Bestimmungsgrenzen (10 ng/ml für  $\alpha$ -Solanin und 5 ng/ml für  $\alpha$ -Chaconin) und der kürzeren Analysenzeit, da eine vollständige Auftrennung der GAE nicht erforderlich ist. Nachteilig ist der hohe Preis dieser Anlagen, der einen Einsatz in der Routineanalytik praktisch ausschließt.

### 6.5.2 Vergleich mit dem Kolorimetrischen Assay

Zur kolorimetrischen Bestimmung wurde eine Abwandlung des zum Morphinachweis eingesetzten Marquis-Reagenz verwendet. Die hierzu verwendete Schwefelsäure wurde von Clarke (1958) durch Phosphorsäure ausgetauscht, da die direkte Anwendung an Pflanzenmaterial mit Schwefelsäure zur Schwarzfärbung der Lösung führte und somit eine photometrische Bestimmung unmöglich machte. Die vorherige Aufreinigung des Extraktes über SPE war notwendig, da Clarke's-Reagenz nicht spezifisch genug mit Steroidalkaloiden reagiert und es durch den MeOH-Anteil im Extraktionsmittel je nach Produkt zu einer mehr oder weniger starken Gelbfärbung der Extraktlösung kam, was wiederum die photometrische Bestimmung störte.

Insgesamt zeigt die Ausgleichsgerade und ihr Bestimmtheitsmaß (0,92) eine gute Übereinstimmung der in HPLC und kolorimetrischem Test erhaltenen Gesamtalkaloidgehalte.

Wie bereits Hellenäs (1986) bei der Anwendung an Kartoffelknollen feststellte, lagen die ermittelten Gehalte im Durchschnitt knapp unter den HPLC-Ergebnissen. Gründe für die misslungene Durchführung des Assays an den Kartoffelpüreeflocken F3 auch nach mehrmaliger Wiederholung, sind schwer auszumachen. Eventuell könnte die zur Herstellung verwendete Kartoffelsorte einen störenden Inhaltsstoff in höherer Konzentration besitzen, oder es wurde zur Herstellung ein Additiv zugesetzt, das den Reaktionsablauf behindert.

Der Vorteil dieser Methode liegt mit Sicherheit in ihrer einfachen Durchführung, die keine teuren Analysengeräte und ausgebildetes Laborpersonal erfordert. Nachteilig für Kartoffelprodukte wirkt sich jedoch die recht hohe Bestimmungsgrenze von 20 µg pro Ansatz aus, die eine Aufkonzentrierung der Extrakte erfordert, sowie die Fähigkeit nur den Gesamtalkaloidgehalt bestimmen zu können.

### 6.5.3 Vergleich mit dem Hämolyse-Assay

Kartoffeln enthalten neben den GAen weitere hämolytisch aktive Substanzen, wie z. B. Steroidsaponine (Van Damme et al. 2004), daher musste zur Erzielung verlässlicher Ergebnisse eine SPE-Aufreinigung erfolgen. Bei Verwendung der GA-Reinsubstanzen konnte mit dem Standardprotokoll und den Supelclean™ ENVI™-18-Kartuschen ein übereinstimmendes Ergebnis erzielt werden. Bei Anwendung der Extrakte aus Kartoffelprodukten zeigten sich jedoch erste Schwierigkeiten. Während Proben mit hohen GA-Gehalten, wie z. B. Kartoffelviertel, reproduzierbare Ergebnisse lieferten, konnte bei einigen Testmaterialien trotz ausreichend hoher Konzentration keinerlei Hämolyse beobachtet werden (Proben F2, F4, K1, P2, z. T. P3), andere dagegen zeigten selbst bei niedrigsten GA-Konzentrationen Totalhämolyse (Probe F1, F3).

Bei Letzteren wurde davon ausgegangen, dass die Alkaloide nicht ausreichend von störenden Matrixbestandteilen abgetrennt wurden, die je nach Kartoffelsorte in unterschiedlicher Menge vorliegen und daher die Schwankungen hervorrufen könnten. Somit musste das Aufreinigungsprotokoll so abgewandelt werden, dass sich ausschließlich GAe im aufgereinigten Extrakt befinden. Durch die Fähigkeit der GAe in saurer Lösung Protonen anzulagern und daher positiv geladen vorzuliegen, bietet sich eine Aufreinigung über Kationenaustauscherkartuschen an. Die Wechselwirkungen beruhen dabei in erster Linie auf elektrostatischen Anziehungskräften (Coulomb'sche Kräfte) zwischen Analyt und Ionenaustauscher. Die Mehrzahl der heute angebotenen Ionenaustauscher besteht aus einer Polymermatrix, an die die benötigte ionische Gruppe chemisch gebunden ist. Bei den hier verwendeten Sorbentien handelte es sich um Sulfonsäuregruppen, die eine starke

Austauschwirkung aufweisen und sich daher zur Isolierung schwach saurer Substanzen eignen (Meyer 1998). Bereits bei Anwendung von GA-Standardlösungen traten jedoch starke Schwankungen der Wiederfindungsraten auf. Zurückzuführen sind diese vermutlich auf einen zweiten Retentionsmechanismus, ausgehend von der unpolaren Grundmatrix des Kationenaustauschers. Die Verwendung unterschiedlicher „Spacer-Gruppen“ (Propyl- oder Benzylgruppe) brachte keine Verbesserung. Letztendlich war es nicht möglich ein geeignetes Elutionsmittel zu finden, das einerseits die ionischen, andererseits die unpolaren Wechselwirkungen mit der Kartuschenmatrix löst und so zu einer quantitativen Elution der GAe führt. Für weitere Versuche wurde daher wieder auf das SPE-Standardprotokoll zurückgegriffen.

Um eventuell im Extrakt vorliegende thermolabile Substanzen zu zerstören, auf die die Totalhämolysen zurückzuführen war, wurde der Extrakt vor der SPE-Aufreinigung 5 min auf 90°C erhitzt, abkühlt und nach dem üblichen Verfahren aufgereinigt. Eine Verbesserung konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Als Grund für die fehlenden Hämolysenaktivität wird vermutet, dass Inhaltsstoffe des Produktes oder zugesetzte Additive die Hämolysen behindern. Unterstützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass Testansätze, denen  $\alpha$ -Chaconin-Standardsubstanz (20  $\mu$ g) zugesetzt wurde, ebenfalls keine Hämolysen zeigten, obwohl die  $\alpha$ -Chaconinmenge hierzu hätte ausreichen müssen. Auch hier könnte der Einsatz spezifischerer Aufreinigungsmethoden möglicherweise zu einer erfolgreichen Durchführung des Hämolysen-Assays führen.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass sich ein Hämolysentest zur Quantifizierung von GAen in Kartoffelprodukten nur bedingt eignet. Die Matrix dieser Verarbeitungsprodukte ist zum einen sehr komplex, des weiteren enthalten Kartoffeln weitere hämolysenaktive Substanzen wie z. B. Saponine, deren fast identischer Aufbau große Schwierigkeiten bei der Abtrennung bereitet. Ein Schlüsselschritt zur erfolgreichen Durchführung des Assays ist daher die spezifische Abtrennung interagierender Substanzen. Als passendes Werkzeug könnte hierfür die Affinitätschromatographie dienen. Durch die Kopplung von Antikörpern an eine Matrix werden ausschließlich GAe gebunden, womit eine Möglichkeit gegeben wäre, sie von weiteren Inhaltsstoffen spezifisch zu isolieren.

Jedoch auch nach erfolgreicher Aufreinigung ergeben sich verglichen mit anderen Verfahren Nachteile. Zum einen ist der Arbeitsbereich mit 2,5 bis 20  $\mu$ g GA-Mischung sehr eng, zum anderen muss durch die synergistische Wirkung immer das individuelle Verhältnis von  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin beachtet werden, das bei geringeren Abweichungen noch nicht zu Veränderungen führt. Bei größeren, z. B. fast ausschließlichem Vorliegen von  $\alpha$ -Solanin, ist

jedoch mit ungenauen Ergebnissen zu rechnen. Des weiteren ist die Standardisierung des Testes recht aufwändig. Einerseits muss bereits vor Zugabe des Schafsblutes auf dessen ausreichende Durchmischung geachtet werden, um die Erythrozyten homogen in der Flüssigkeit zu verteilen. Andererseits dürfen das Blut wie auch die späteren Testansätze nicht zu stark geschüttelt werden, um ein Zerstören der Blutzellen durch Scherkräfte zu verhindern. Dennoch konnte mit Hilfe der Standardsubstanzen gezeigt werden, dass ein Hämolyse-Assay prinzipiell funktioniert und zu reproduzierbaren Resultaten führen kann, wenn vorgeschaltete Schritte wie die Aufreinigung sehr spezifisch erfolgen. Bei Anwendung an Proben mit höherer Alkaloidkonzentration wie Kartoffelviertel konnte eine genaue Quantifizierung erreicht werden.

Die Durchführung eines Komplexierungsassays mit Cholesterol unterstrich, dass die hämolysierende Wirkung auf die Existenz von GAe zurückzuführen war. Extrakte nach inkubieren mit Cholesterol zeigten keine hämolytische Aktivität mehr, während unbehandelte Extrakte zu einer Rotfärbung des Überstandes führten. Einschränkend muss jedoch die Reaktion von Steroidsaponinen beachtet werden, die ebenfalls eine hohe Affinität zu Cholesterol aufweisen (Hänsel & Sticher 2004).

Interessant war in diesem Zusammenhang die abweichende Wirkweise der Reinsubstanzen  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin mit dem Cholesterol. Wie bereits mehrfach beschrieben, zeigt  $\alpha$ -Chaconin durch Komplexbildung mit Cholesterol grundsätzlich eine stärkere Aktivität auf Membranen als  $\alpha$ -Solanin (Chataing et al. 1998, Roddick et al. 1988, 1990, 1992, 2001). Begründet wird dies meist durch die Interaktion der Chacotriose-Seitenkette mit membranständigen Rezeptoren (Chataing et al. 1998) oder KH-Ketten (Rayburn et al. 1994), da auch andere Chacotriosyl-Alkaloide, wie z. B. Solamargin, stärker hämolytisch wirken als deren Solatriosyl-Partner (Roddick et al. 1992, 2001). Aus dem vorliegenden Cholesterol-Versuch geht zwar die entscheidende Bedeutung der Zuckerkette hervor, die jedoch nicht nur auf KH- oder Rezeptorinteraktionen zurückgeführt werden kann. Insgesamt muss durch die Chacotriosyl-Einheit die Affinität des Moleküls zu Cholesterol erhöht sein, vermutlich durch eine optimale sterische Ausrichtung der Zuckermoleküle im  $\alpha$ -Chaconin, so dass die hydrophobe Natur des Aglykons stärker zur Geltung kommt als in  $\alpha$ -Solanin. Letztendlich spielen mit Sicherheit sowohl sterische Gründe wie auch KH-Interaktionen eine wichtige Rolle in der Ausbildung der membranlytischen Aktivität. Dadurch könnte zumindest die synergistische Wirkung von Alkaloidpaaren erklärt werden.

## 6.5.4 Vergleich mit Gaschromatographie

### 6.5.4.1 GA-Gehalt in Kartoffelprodukten

Die Isolierung des Aglykons Solanidin nach der Hydrolyse erfolgt sehr selektiv, wenn fetthaltiges Material zuvor mit n-Pentan entfettet wird. Daher kann auf die SPE-Aufreinigung verzichtet werden. Ein Nachteil der verwendeten Hydrolysebedingungen war die Bildung von Solanthren (Solanid-3,5-dien), das abhängig von der Säurekonzentration, Temperatur und Reaktionszeit in wasserhaltigen Lösungsmitteln entsteht (King 1980). Da die Entwicklung nicht vollständig unterdrückt werden konnte, wurden die Flächen beider Peaks, die des Solanidins und des Solanthrens, addiert. Für sehr ähnliche Moleküle ist dies möglich, weil die Empfindlichkeit des Flammenionisationsdetektors praktisch identisch ist.

Die gute Übereinstimmung der GA-Gehalte in HPLC- und GC-Analyse wurde durch das Bestimmtheitsmaß von 0,97 belegt. Im Vergleich zur HPLC-Analyse bietet die gaschromatographische Untersuchung den Vorteil einer einfachen Probenaufarbeitung. Trotz der relativ langen Zeitdauer zur vollständigen Hydrolyse, sind insgesamt weniger Verfahrensschritte bis zur Injektion in den Gaschromatographen notwendig, woraus eine Zeitersparnis resultiert. Eine weitere Verbesserung der Aufarbeitung sollte mit einem höheren apparativen Aufwand und der Direktextraktion der GAe in Chloroform bereits während der Hydrolyse möglich sein, wie durch die Arbeiten von Nikolic & Stankovic (2003) und Weissenberg (2001) erfolgreich gezeigt werden konnte. Die direkte Entfernung des Solanidins aus dem Reaktionsgemisch hätte zusätzlich den Vorteil, dass eine vollständige Hydrolyse sichergestellt und die Nebenreaktion zum Solanthren unterdrückt wird (Nicolic & Stankovic 2003, Weissenberg 2001). Als Nachteil zur HPLC wirkt sich die etwas höhere Bestimmungsgrenze (15 ng/ $\mu$ l) und die Ermittlung des Gesamtalkaloidgehaltes aus, da ausschließlich das Solanidin verdampfbar ist. Die GLC-Analyse eignet sich daher nicht zur Untersuchung von GA-Mischungen, sofern das gleiche Aglykon vorliegt.

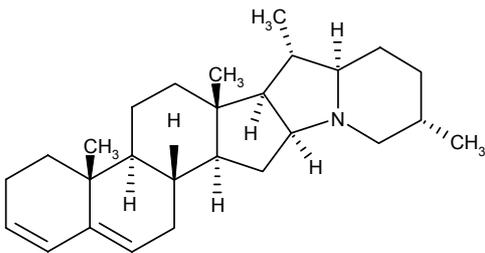
### 6.5.4.2 Überprüfung der GC-Analyse mittels GLC-MS

Wie im Ergebnisteil dargestellt, liegt bei  $m/z$  150 ein Schlüsselfragment des Solanidins vor, an Hand dessen weitere Solanidin-Derivate erkannt werden konnten. Nach Lawson et al. (1997) handelt es sich bei diesem Bruchstück um den Indolizidin-Anteil des Steroidgerüsts mit der Summenformel  $C_{10}H_{16}N$  und einer der in Abbildung 6.1 dargestellten Strukturformeln.



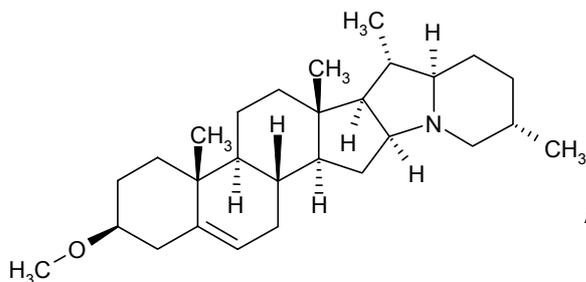
**Abb. 6.1** Von Lawson et al. (1997) vorgeschlagene Strukturformel des Schlüsselfragments  $m/z$  150 aus der EI-MS-Analyse.

Neben Solanidin zeigten zwei weitere Peaks bei  $m/z$  379 und 411 dieses Schlüsselfragment und wurden somit als Solanidin-Derivate identifiziert. Wie zuvor vermutet, bestätigte die massenspektrometrische Analyse, dass es sich bei der nach 23,6 min eluierten Substanz im GLC-Chromatogramm um das Dehydrierungsprodukt Solanthren handelt (Abb. 6.2). Die Einführung einer zweiten Doppelbindung zwischen C3 und C4 führt zum Verlust eines Wasserstoffatoms an C4 und der Hydroxylgruppe an C3 und damit zu einer um 18 Einheiten niedrigeren Masse verglichen mit dem Solanidin-Molekül.



**Abb. 6.2** Strukturformel für Solanthren ( $m/z$  379,  $C_{27}H_{41}N$ ).

Die unbekannte Substanz bei  $m/z$  411 wurde bislang nicht in der Literatur beschrieben. Vermutlich handelt es sich um den Methylester des Solanidins (Abb. 6.3) mit der Summenformel  $C_{28}H_{45}NO$ . Einerseits spricht die um 14 Einheiten höhere Masse, andererseits die verwendeten Reaktionsbedingungen dafür, die durch die hohe Temperatur in Anwesenheit von MeOH diese Reaktion begünstigen. Verglichen mit der Solanidin- und Solanthrenmenge war die Peakfläche allerdings so gering, dass die Substanz zur Quantifizierung nicht berücksichtigt werden musste.



**Abb. 6.3** Strukturformel des mutmaßlichen Solanidin-Methylesters ( $m/z$  411,  $C_{28}H_{45}NO$ ).

Das durch King (1980) beschriebene Solanidin-4-en-3-on mit dem  $m/z$ -Verhältnis 395 konnte nicht beobachtet werden.

### 6.5.5 Vergleich mit XLC-MS

Einer der Nachteile der HPLC-Methode ist die lange und arbeitsintensive Aufreinigung der Essigsäureextrakte, die das Verfahren sehr kostenintensiv werden lässt. Durch die Automatisierung der Extraktreinigung und die direkte on-line Kopplung mit dem Analysengerät, können nicht nur Zeit und damit Kosten eingespart werden, sondern es führt durch die Reduktion der manuellen Probenvorbereitung zu reproduzierbareren Ergebnissen mit höherer Präzision und Empfindlichkeit, da ein Probenverlust während der Aufarbeitung minimiert wird. Fast der komplette Aufarbeitungsprozess kann automatisiert werden, einzig die Probenhomogenisierung, -einwaage, -extraktion, -filtration sowie das Auffüllen des Autosamplers muss manuell erfolgen. Wie Rossi & Zhang (2000) in ihrem Artikel über die Perspektiven der on-line SPE darstellten, stehen bereits heute zahlreiche automatisierte Verfahren zur Verfügung, die sich jedoch meist auf die Untersuchung biologischer Proben oder den Umweltbereich konzentrieren. Vorrangig wurden Wasserproben auf Schadstoffbelastungen im Spurenbereich (Chiron et al. 1994, Hogenboom et al. 1999, López de Alda & Barceló 2001, Patsias & Papadopoulou-Mourkidou 2000, Riediker et al. 2002) oder Blut auf Medikamentenrückstände und deren Metabolisierungsprodukte (Barrón et al. 1996, Calderoli et al. 2003, Ding & Neue 1999, Pascual & Sanagustín 1999, Yritia et al. 1999) untersucht. Nur wenige Studien beschäftigten sich bislang mit der Analyse von Sekundärstoffen. Im Mittelpunkt stand dabei der Mykotoxinnachweis in Wein und Bier (Bacaloni et al. 2005) oder Futtermitteln (Newkirk et al. 1998). Stevens et al. (2003) analysierte ephedrinhaltige Nutraceuticals mit Hilfe eines automatisierten Verfahrens.

Das in dieser Arbeit erstellte XLC-MS-Protokoll stellt ein Beispiel für die neuartige Anwendung dieser Methode im Nahrungsmittelsektor dar, der gezwungen durch die hohe Konkurrenzdichte auf effiziente und billige Nachweisverfahren für toxische Inhaltsstoffe angewiesen ist. Die gute Leistungsfähigkeit konnte einerseits durch die Überprüfung von Präzision, Richtigkeit und Linearität sowie durch den Vergleich der Alkaloidkonzentration in Verarbeitungsprodukten mit der Standard-HPLC-Methode belegt werden. Um die Variation innerhalb des Probenmaterials zu minimieren, wurden die unaufgereinigten Essigsäureextrakte der HPLC-Analyse verwendet. Die Übereinstimmung der Alkaloidgehalte konnte anhand der Ausgleichsgeraden und des Bestimmtheitsmaßes ( $R^2$  zwischen 0,90 und 0,92) nachgewiesen werden. In den meisten Proben lagen die Abweichungen im Gehalt innerhalb der Standardabweichungen für das off-line Verfahren und sind somit nicht methodisch begründet. Eine Ausnahme bildeten, ähnlich wie beim Hämolyse- und kolorimetrischen Assay, die Kartoffelpüree-Proben. Der Grund bleibt auch hier ungeklärt, möglicherweise sind

wiederum zugesetzte Additive verantwortlich, die die Stabilität der GAe im Essigsäure-Extrakt verringerten.

Der Vorteil des automatisierten Verfahrens lag definitiv in der kürzeren Analysendauer, die verglichen mit der off-line HPLC auf ein Fünftel verringert werden konnte. Die Zeit für einen Analysenlauf betrug 5 min, was die Untersuchung von etwa 100 Proben in 8 h zulässt. Da das System völlig autark arbeitet, können manuell durchzuführende Vorbereitungen, wie das Abwiegen und Extrahieren nebenbei ausgeführt werden, so dass hierfür kein Zeitverlust entsteht. Die zudem präzisere Arbeitsweise der on-line Methode wird aus den geringen Standardabweichungen ersichtlich. Einschränkend lohnt sich ein derartiger apparativer Aufwand natürlich nur bei ausreichender Probenmenge, wobei auf die Kopplung von XLC und MS zur Verbilligung verzichtet werden könnte, allerdings müssten längere Analysenzeiten in Kauf genommen werden, da eine vollständige Auftrennung der Alkaloide zur Quantifizierung notwendig wird.

## SCHLUSSBETRACHTUNG

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zwar, dass weder von Verarbeitungsprodukten aus Kartoffeln noch von kommerziell erhältlichen Knollen, unabhängig, ob es sich um noch junge, frühe Sorten oder Herbstkartoffeln, Sorten aus konventionellem oder ökologischen Anbau handelt, ein akutes toxisches Potenzial ausgeht. Bei der Annahme eines durchschnittlichen Gesamtalkaloidgehaltes von 5 mg/100 g FG, was sowohl in Verarbeitungsprodukten wie auch geschälten Knollen eher im oberen Drittel liegt, werden bei Aufnahme einer Kartoffelmahlzeit von 500 g insgesamt 25 mg Alkaloide zugeführt. Diese Zahl scheint, verglichen mit den Angaben von Hopkins (1995) mit 14 mg GAe/Person und Tag für Großbritannien oder dem US National Toxicology Program mit 12,5 mg GAe/Person und Tag für die USA, durchaus realistisch. Auf den Durchschnittsmenschen mit 70 kg Körpergewicht (KG) berechnet, ergibt sich somit eine Aufnahmemenge von 0,36 mg GAe/kg KG. Dies liegt noch weit unter der in verschiedenen Literaturstellen genannten akut toxischen Dosis von 2-5 mg GAe/kg KG (Edwards & Cobb 1996, Hellenäs et al. 1992, Morris et al. 1984). Unter Berücksichtigung der geringen Absorptionsrate von ca. 0,2% (Nishi et al. 1971) ergeben sich sogar noch geringere Mengen, die letztlich in die Blutbahn gelangen.

Dennoch deuten zahlreiche Tierversuche und nicht zuletzt die Humanstudie von Mensinga et al. (2005) darauf hin, dass die Auswirkungen einer fortwährenden Aufnahme von GAen unklar und daher auch nicht zu unterschätzen sind. Mit Halbwertszeiten zwischen 21 und 44 Stunden und einer Clearance von mehr als 96 Stunden, ist bei häufigem Kartoffelverzehr, wie in nordischen Ländern üblich, Slanina (1990) spricht von 300 g pro Tag in Schweden, von einer GA-Akkumulierung im Körper auszugehen. Auch wenn diese zunächst, wie oben gezeigt, keine direkte Auswirkung auf den Normalbürger zeigt, so bleibt unklar, welche Effekte sich nach Jahrzehnten ergeben oder welche Auswirkungen GAe im heranwachsendem Organismus ausüben können.

Aus dieser Unwissenheit heraus sollte letztendlich auf eine möglichst geringe GA-Aufnahme geachtet werden. Dies fängt bereits bei der Sortenzüchtung an, da die Integration erwünschter Resistenzfaktoren aus *Solanum*-Wildarten sich durchaus im Alkaloidgehalt der Kulturkartoffel niederschlagen kann, so dass zunächst die Alkaloidmuster und -gehalte dieser Integrationspartner und im weiteren Verlauf die Auswirkungen auf die Kultursorten analysiert werden sollten.

Nach der Ernte der Kartoffel bleiben die Knollen metabolisch aktiv, wodurch sich im Verlauf von Lagerung und Verarbeitung erhöhte Alkaloid-Konzentrationen ergeben können, wie die Lagerungsversuche deutlich machten. Hier sind zunächst die Erzeuger und der Handel angesprochen, die darauf achten sollten, Kartoffeln kühl und lichtgeschützt zu lagern und zum Verkauf anzubieten. Im weiteren Verlauf sollten die Verarbeitungsbetriebe im Zuge einer Wareneingangskontrolle bereits alkaloidreiche Knollen vor ihrer Verarbeitung entfernen, um den Alkaloidgehalt des Endproduktes so niedrig wie möglich zu halten. Um den Herstellern dieser Verarbeitungsprodukte ein Instrument in die Hand zu geben, das einfach und verlässlich potenziell toxische GAe zu detektieren vermag, wurde unter anderem diese Dissertationsarbeit angefertigt.

Nun sind die Verarbeitungsbetriebe und staatliche Stellen gefragt, die Ergebnisse dieser Arbeit umzusetzen und im Routinebetrieb anzuwenden, um den Konsumenten vor einer unnötigen, potenziellen Gefahr ausgehend von GAen zu bewahren.

# ZUSAMMENFASSUNG

Die in Kartoffeln gebildeten Glykoalkaloide (GA)  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin stellen durch ihre annähernd tägliche Aufnahme ein potentiell toxisches Risiko für die menschliche Gesundheit dar. Um sie in Kartoffeln und verarbeiteten Lebensmitteln nachzuweisen, wurde ein Aufarbeitungsprotokoll, bestehend aus einer Essigsäureextraktion mit anschließender SPE-Aufreinigung an RP-18-Kartuschen, aufgestellt. Zur Quantifizierung wurde ein HPLC-Verfahren mit einer LiChrospher® 100-RP-18-Säule entwickelt, das zur Überprüfung der korrekten Arbeitsweise mit den gängigen Prüfparametern auf Präzision, Richtigkeit und Linearität validiert wurde.

Bei Anwendung dieses Verfahrens an Früh- und Herbstkartoffeln sowohl aus konventionellem wie auch ökologischem Anbau konnten keine bedenklichen Gesamt-GA-Gehalte nachgewiesen werden, die den als sicher geltenden Grenzwert von 20 mg/100 g FG überschritten. Gleiches konnte im Anbauversuch von traditionellen Kartoffelsorten mit z. T. gefärbten Knollen im Gewächshaus und Freiland festgestellt werden, wobei ein Einfluss des Kultivierungsortes oder der Schalenfarbe nicht offensichtlich war. Die Analyse verschiedener Organe der Pflanze zeigte die höchsten Gehalte in den jungen Sprossen, gefolgt von Blättern, Beeren, der Sprossachse, Wurzeln und schließlich den Knollen, wobei sich je nach Sorte 80-95% des Gesamt-GA-Gehaltes in der Schale befanden und der Gehalt zum Zentrum hin rapide abnahm. Weiterführende Untersuchungen zeigten eine GA-Akkumulation in „Kartoffelaugen“, in gelagerten, ergrüntem, aber auch ungefärbten Knollen um bis zu 200%. Zur Analyse des Alkaloidmusters in traditionellen Sorten sowie wilden *Solanum*-Arten wurde ein LC-ESI-MS-Verfahren entwickelt, wobei speziell in den Wildarten zahlreiche, in Kulturkartoffeln unübliche Alkaloide präsent waren.

Neben der HPLC-Methode wurden weitere Quantifizierungsverfahren, darunter LC-MS, GLC, ein Kolorimetrie- sowie ein Hämolyse-Assay entwickelt, um die GAe speziell in verarbeiteten Lebensmitteln mit schwieriger Matrix nachweisen zu können. Der Vergleich dieser Verfahren mit der validierten HPLC-Methode zeigte vielfach eine gute Übereinstimmung. Für den Hämolyse-Assay eigneten sich durch dessen geringere Empfindlichkeit nur höherkonzentrierte Proben, wie z. B. Kartoffelviertel. Zur Automatisierung der Alkaloid-Analytik in Verarbeitungsprodukten wurde in Zusammenarbeit mit Spark Holland ein on-line XLC-MS-Verfahren entwickelt, das einen hohen Probendurchsatz garantiert, um in der Routineanalytik eingesetzt zu werden. Die hohe Leistungsfähigkeit dieses Verfahrens konnte ebenfalls durch Validierung belegt werden.

Der Gehalt an Alkaloiden war in den verschiedenen Kartoffelprodukten vergleichbar mit den Mengen im Kartoffelfleisch der analysierten Sorten. Nur schalenhaltige Kartoffelviertel enthielten einen drei- bis siebenmal höheren Alkaloidgehalt, der jedoch bei üblichen Aufnahmemengen zu keinen kritischen Werten führt.

## SUMMARY

The Glycoalkaloids (GA)  $\alpha$ -solanine and  $\alpha$ -chaconine, which are formed in potatoes, represent a potential health hazard for humans because of their nearly daily intake. In order to demonstrate their presence in potatoes and in processed potato products, an efficient analytical procedure for their isolation and quantification was established consisting of an extraction with diluted acetic acid followed by a SPE-purification with RP-18-cartridges. For their quantification a HPLC method using a LiChrospher<sup>®</sup> 100-RP-18-column was developed, which was checked for correctness with common validation parameters for precision, accuracy and linearity.

The application of this procedure to early potatoes and tubers of the autumn harvest from conventional as well as organic cultivation, revealed no critical total-GA-contents, exceeding the accepted limit of 20 mg/100 g FG. The same results were found in traditional potato varieties with partial coloured tuber skin, which were cultivated in the greenhouse and in the field, so the place of cultivation or the colour of the skin did not appear to have any influence. The analysis of various plant organs revealed highest GA-concentrations in young sprouts, followed by leaves, fruits, stems, roots and finally the tubers. In tubers 80 to 95% of the GAs were present in the skin, while in the flesh, the content decreased rapidly from the outside layer to the centre. Further analysis showed a high GA-accumulation in potato “eyes” and stored greened, but also in colour-unchanged tubers, of up to 200% of the initial GA content.

For the analysis of the GA patterns in the traditional varieties and wild *Solanum* species a LC-ESI-MS procedure was established. Especially in wild *Solanum* species numerous GAs were identified, which are uncommon in domesticated varieties.

Besides the HPLC method, further quantification procedures, including LC-ESI-MS, GLC, a colorimetric and haemolysis assay were developed for the detection of GAs especially in processed potato products with complex matrices. A comparison of these procedures with the validated HPLC method usually showed good correspondence. For the haemolysis assay only high concentrated samples such as potato wedges were suitable because of its lower sensitivity. For the automation of the alkaloid analysis in processed potato products an on-line XLC-MS procedure was established in cooperation with Spark Holland, which guarantees a high sample throughput for use in routine analytics. The high efficiency of the procedure was again verified by several validation parameters. The GA content in the various processed potato products was comparable to the amounts in the flesh of the analysed potato cultivars. Only skin-containing potato wedges contained three to seven times more alkaloids. However, with usual ingestion amounts, this will not lead to critical levels.

# LITERATURVERZEICHNIS

- Abe H, Sakaguchi M, Konishi H, Tani T, Arichi S (1978): The effects of saikosaponins on biological membranes. *Planta Med.* **34**, 160-166.
- Abell DA, Sporns P (1996): Rapid quantification of potato glycoalkaloids by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 2292-2296.
- Abreu P, Relva A, Matthew S, Gomes Z, Morais Z (2006): High-performance liquid chromatographic determination of glycoalkaloids from conventional, integrated and organic crop systems. *Food Contr.* **18**, 40-44.
- Ahmed SS, Mueller K (1979): Seasonal changes and the effect of nitrogen- and potash-fertilization on the  $\alpha$ -solanine and  $\alpha$ -chaconine content in various parts of the potato plant. *Z. Pflanzern. Bodenkde.* **142**, 275-279.
- aid Infodienst (2002): Kartoffeln und Kartoffelerzeugnisse. aid Infodienst, Verbraucherschutz, Ernährung, Landwirtschaft e. V, Bonn.
- Allanson JP, Biddlecombe RA, Jones AE, Pleasance S (1996): The use of automated solid phase extraction in the '96 well' format for high throughput bioanalysis using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**, 811-816.
- Allen EH; Feldmesser J (1971): Nematicidal activity of  $\alpha$ -chaconine : effect of hydrogen-ion concentration. *J. Nematol.* **3**, 58-61.
- Armer CA (2004): Colorado potato beetle toxins revisited: evidence the beetle does not sequester host plants glycoalkaloids. *J. Chem. Ecol.* **30**, 883-888.
- Andrivon D, Corbière R, Lucas JM, Pasco C, Gravouelle JM, Pellé R, Dantec JP, Ellissèche D (2003): Resistance to late blight and soft rot in six potato progenies and glycoalkaloid contents in the tubers. *Am. J. Potato Res.* **80**, 125-134.
- AOAC International (1999): Official Methods of Analysis of AOAC International, 16<sup>th</sup> ed., 4<sup>th</sup> revision. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.

- Arkhypova VN, Dzyadevych SV, Soldatkin AP, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N (2003): Development and optimisation of biosensors based on pH-sensitive field effect transistors and cholinesterases for sensitive detection of solanaceous glycoalkaloids. *Biosensors & Bioelectronics* **18**, 1047-1053.
- Bacigalupo MA, Ius A, Longhi R, Meroni G (2000): Quantification of glycoalkaloids in tomato plants by time-resolved fluorescence using a europium chelator entrapped in liposomes. *Analyst* **125**, 1847-1850.
- Bacigalupo MA, Longhi R, Meroni G (2004): Alpha-solanine and alpha-chaconine glycoalkaloid assay in *Solanum tuberosum* extracts by liposomes and time-resolved fluorescence. *J. Food Compos. Anal.* **17**, 665-673.
- Bacaloni, A, Cavaliere C, Faberi A, Pastorini E, Samperu R, Lagana A (2005): Automated on-line solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray tandem mass-spectrometry method for the determination of Ochratoxin A in wine and beer. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 5518-5525.
- Barbour JD, Kennedy GG (1991): Role of steroidal glycoalkaloid  $\alpha$ -tomatine in host-plant resistance of tomato to colorado potato beetle. *J. Chem. Ecol.* **17**, 989-1005.
- Barrón D, Barbosa J, Pascual JA, Segura J (1996): Direct determination of anabolic steroids in human urine by on-line solid-phase extraction/liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **31**, 309-319.
- Bazioldanov T, Tukalo EA (1973): Extraction-photometric determination of solanidiene. *Zdravookhraenie Kazakhstana* **10**, 43-44.
- Beeler DA, Anderson DG, Porter JW (1963): The biosynthesis of squalene from mevalonic acid-2-C-14 and farnesyl pyrophosphate-4,8,12-C-14 by carrot and tomato enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **102**, 26-32.
- Beier RC; Nigg HN (1992): Natural toxicants in foods. *Phytochem. Resour. Med. Agric.* Meeting Date 1989, 247-367.
- Belitz HD, Grosch W (1985): *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 225.

- BeMiller (1967): Acid-catalysed hydrolysis of glykosides. *Adv. Carbohydr. Chem.* **22**, 25-108.
- Benker M (2006) Belichtung von Kartoffelknollen zur Krankheitsvorbeugung bei Pflanzkartoffeln. Projekt im Bundesprogramm Ökologischer Landbau (BÖL). [www.bundesprogramm-oekolandbau.de/projekt\\_02oe567.html](http://www.bundesprogramm-oekolandbau.de/projekt_02oe567.html).
- Bergenstråhle A, Tillberg E, Jonsson L (1992a) Characterization of UDP-glucose:solanidine glucosyltransferase and UDP-galactose:solanidine galactosyltransferase from potato tuber. *Plant Sci.* **84**, 35-44.
- Bergenstråhle A, Tillberg E, Jonsson L (1992b): Regulation of glycoalkaloid accumulation in potato tuber discs. *J. Plant Phys.* **140**, 269-275.
- Bergenstråhle A, Brogå P, Jonsson LMV (1996): Sterol composition and synthesis in potato tuber discs in relation to glycoalkaloid synthesis. *Phytochem.* **41**, 155-161.
- Bianchini GM, Stermer BA, Paiva NL (1996): Induction of early mevalonate pathway enzymes and biosynthesis of end products in potato (*Solanum tuberosum*) tubers by wounding and elicitation. *Phytochem.* **42**, 1563-1571.
- Bianco G, Schmitt-Kopplin P, De Benedetto G, Kettrup A, Cataldi TRI (2002): Determination of glycoalkaloids and relative aglycones by nonaqueous capillary electrophoresis coupled with electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Electrophoresis* **23**, 2904-2912.
- Bianco G, Schmitt-Kopplin P, Crescenzi A, Comes S, Kettrup A, Cataldi TRI (2003): Evaluation of glycoalkaloids in tubers of genetically modified virus Y-resistant potato plants (var. Désirée) by non-aqueous capillary electrophoresis coupled with electrospray ionization mass spectrometry (NACE-ESI-MS). *Anal. Bioanal. Chem.* **375**, 799-804.
- Birner J (1969): Determination of total steroid bases in *Solanum* species. *J. Pharm. Sci.* **58**, 258-259.
- Blankemeyer JT, Atherton R, Friedman M (1995): Effect of potato glycoalkaloids  $\alpha$ -chaconine and  $\alpha$ -solanine on sodium active transport in frog skin. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 636-639.

- Blankemeyer JT, McWilliams ML, Rayburn JR, Weissenberg M, Friedman M (1998): Developmental toxicology of solamargine and solasonine glycoalkaloids in frog embryos. *Food Chem. Toxicol.* **3**, 409-416.
- Bouarab K, Melton R, Peart J, Baulcombe D, Osbourn A (2002): A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences. *Nature* **418**, 889-892.
- Bradshaw JE, Bryan GJ, Ramsay G (2006): Genetic resources (including wild and cultivated *Solanum* species) and progress in their utilisation in potato breeding. *Potato Res.* **49**, 49-65.
- Brown CR (1999): A native American technology transfer: the diffusion of potato. *Hort. Sci.* **34**, 817-821.
- Brown MS, Mc Donald GM, Friedman M (1999): Sampling leaves of young potato (*Solanum tuberosum*) plants for glycoalkaloid analysis. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 2331-2334.
- Brücher H (1975): Domestikation und Migration von *Solanum tuberosum* L. *Kulturpflanze* **XXIII**, 11-74.
- Bundessortenamt. Bundesbehörde des Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz. [www.bundessortenamt.de](http://www.bundessortenamt.de).
- Bushway RJ, Barden ES, Bushway AW, Bushway AA (1979): High-performance liquid chromatographic separation of potato glycoalkaloids. *J. Chrom.* **178**, 533-544.
- Bushway RJ, Bureau JL, King J (1986): Modification of the rapid high-performance liquid chromatographic method for the determination of potato glycoalkaloids. *J. Agric. Food Chem.* **34**, 277-279.
- Bushway RJ, Bureau JL, Stickney MR (1985): A new efficient method for extracting glycoalkaloids from dehydrated potatoes. *J. Agric. Food Chem.* **33**, 45-46.
- Bushway AA, Bushway RJ, Kim CH (1990): Isolation, partial purification and characterization of a potato peel  $\alpha$ -solanine cleaving glycosidase. *Am. Potato J.* **67**, 233-238.

- Bushway RJ, McGann DF, Bushway AA (1984): Gas-chromatographic method for the determination of solanidine and its application to a study for feed-milk transfer in the cow. *J. Agric. Food Chem.* **32**, 548-551.
- Bushway RJ, Ponnampalam R (1981):  $\alpha$ -Chaconine and  $\alpha$ -solanine content of potato products and their stability during several modes of cooking. *J. Agric. Food Chem.* **29**, 814-817.
- Bushway RJ, Savage SA, Ferguson BS (1987): Inhibition of acetylcholinesterase by Solanaceae glycoalkaloids and alkaloids. *Amer. Potato J.* **64**, 409-413.
- Cadle LS, Stelzig DA, Harper KL, Young RJ (1978): Thin-layer chromatographic system for identification of potato tuber glycoalkaloids. *J. Agric. Food Chem.* **26**, 1453-1454.
- Calderoli S, Colombo E, Frigerio E, James CA, Sibus M (2003): LC-MS-MS determination of brostallicin in human plasma following automated on-line SPE. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **32**, 601-607.
- Caldwell KA, Grosjean OK, Henika PR, Friedman M (1991): Ornithine hepatic decarboxylase induction by potato glycoalkaloids in rats. *Food Chem. Toxicol.* **29**, 531-535.
- Capon B (1969): Mechanism in carbohydrate chemistry. *Chem. Rev.* **69**, 407-498.
- Carman AS Jr., Kuan SS, Ware GM, Francis OJ Jr., Kirschenheuter GP (1986): Rapid-high performance liquid chromatographic determination of the potato glycoalkaloids  $\alpha$ -solanine and  $\alpha$ -chaconine. *J. Agric. Food Chem.* **34**, 279-282.
- Cataldi TRI, Lelario F, Bufo SA (2005): Analysis of tomato glycoalkaloids by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **19**, 3103-3110.
- Chataing B, Concepción JL, Lobatoón R, Usubillaga A (1998): Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth in vitro by *Solanum* alkaloids: a comparison with ketoconazole. *Planta Med.* **64**, 31-36.

- Chen S, Derrick PJ, Mellon FA, Price KR (1994): Analysis of glycoalkaloids from potato shoots and tomatoes by four-sector tandem mass spectrometry with scanning-array detection: comparison of positive ion and negative ion methods. *Anal. Biochem.* **218**, 157-169.
- Cherkaoui S, Bekkouche K, Christen P, Veuthey JL (2001): Non-aqueous capillary electrophoresis with diode array and electrospray mass spectrometric detection for the analysis of selected steroidal alkaloids in plant extracts. *J. Chrom. A* **922**, 321-328.
- Chiron S, Dupas S, Scribe P, Barceló D (1994): Application of on-line solid phase extraction followed by liquid chromatography-thermospray mass spectrometry to the determination of pesticides in environmental waters. *J. Chrom. A* **665**, 295-305.
- Chivanov V, Aksonov S, Kalinkevich A, Peter-Katalinic J, Kabanetz V, Cherniavskaya T (2001): The use of ESI-MS, MALDI-MS and PDMS soft-ionization mass spectrometry to study the glycoalkaloids in potato breeding. *Adv. Mass Spectrom.* **15**, 639-640.
- Chuda Y, Tsuda S, Ohara-Takada A, Kobayashi A, Suzuki K, Ono H, Yoshida M, Nagata T, Kobayashi S, Mori M (2004): Quantification of light-induced glycoalkaloids,  $\alpha$ -solanine and  $\alpha$ -chaconine, in four potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) distributed in Japan by LC/MS. *Food Sci. Technol. Res.* **10**, 341-345.
- Claeys M, Van den Heuvel H, Chen S, Derrick P, Mellon FA, Price KR (1996): Comparison of high- and low energy collision-induced dissociation tandem mass spectrometry in the analysis of glycoalkaloids and their aglycons. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **7**, 173-181.
- Clarke EGC (1958): Identification of solanine. *Nature* **181**, 1152-1153.
- Coates ML, Wilkins CL (2005): Laser desorption/fourier transform mass spectra for glycoalkaloids and steroid glycosides. *Biol. Mass Spectrom.* **13**, 199-204.
- Colbert DL, Smith DS, Landon J, Sidki AM (1986): Single-reagent polarisations flouroimmunoassay for the cocaine metabolite, benzoylecgonine, in urine. *Ann. Clin. Biochem.* **23**, 37-41.

- Concon (1988): Food toxicology: principles and concepts. Part A. Marcel Dekker Inc., N. Y.
- Coria N, Sarquis JL, Peñalosa I, Urzúa M (1998): Heat-induced damage in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers: membrane stability, tissue viability and accumulation of glycoalkaloids. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 4524-4528.
- Coxon DT (1981): The glycoalkaloid content of potato berries. *J. Sci. Food Agric.* **32**, 412-414.
- Cronk TC, Kuhn GD, McArdle FJ (1974): The influence of stage of maturity, level of nitrogen fertilization and storage on the concentration of solanine in tubers of three potato cultivars. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **11**, 163-168.
- Crush, JR (1973): Mineral nutrition and alkaloid accumulation in *Solanum laciniatum* and *Solanum aviculare*. *New Zealand J. Experim. Agric.* **1**, 187-190.
- Dabbs DH, Hilton RJ (1983): Methods for the analysis for solanine in tubers of *Solanum tuberosum*. *Can. J. Technol.* **31**, 213-220.
- Dale MFB, Griffith DW, Bain H, Todd D (1993): Glycoalkaloid increase in *Solanum tuberosum* on exposure to light. *Ann. Appl. Biol.* **123**, 411-448.
- Dale MFB, Griffith DW, Bain H (1998): Effect of bruising on the total glycoalkaloid and chlorogenic acid content of potato (*Solanum tuberosum*) tubers of five cultivars. *J. Sci. Food Agric.* **77**, 499-505.
- Dale MFB, Robinson DJ, Griffiths DW, Todd D, Bain H (2000): Effects of tuber-borne M-type strain of tobacco rattle virus on yield and quality attributes of potato tubers of the cultivar Wilja. *Eur. J. Plant Pathol.* **106**, 271-282.
- Dao L, Friedman M (1994): Chlorophyll, chlorogenic acid, glycoalkaloid and protease inhibitor content of fresh and green potatoes. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 633-639.
- Dao L, Friedman M (1996): Comparison of glycoalkaloid content of fresh and freeze-dried potato leaves determined by HPLC and colorimetry. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 2287-2291.

- Darsow U (2002): *Phytophthora*-Resistenz der Kartoffel-Das Wunschmerkmal für den ökologischen Kartoffelbau. Forschungsreport Verbraucherschutz-Ernährung-Landwirtschaft, 16-19.
- Deahl KL, Cantelo WW, Sinden SL, Sanford LL (1991): The effect of light intensity on Colorado potato beetle resistance and foliar glycoalkaloid concentration of four *Solanum chacoense* clones. *Am. Potato J.* **68**, 659-666.
- Deahl KL, Young RJ, Sinden SL (1973): A study of the relationship of late blight resistance to glycoalkaloid content in fifteen potato clones. *Am. Potato J.* **50**, 248-253.
- De Candolle A (1886): Nouvelle recherches sur le type sauvage de la pomme de terre (*Solanum tuberosum*). Bibliothèque *Universelle Archive des Sciences Physique et Naturelles* **15**, 425-438.
- De Medeiros AH, Tingey WM (2006): Glandular trichomes of *Solanum berthaultii* and its hybrids with *Solanum tuberosum* affect nymphal emergence, development, and survival of *Empoasca fabae* (Homoptera: Cicadellidae). *J.Econ. Entomol.* **99**, 1483-1489.
- Deutsches Lebensmittelbuch: § 15, 16 LFGB. Internet: <http://bundesrecht.juris.de/lfgb/index.html>
- DIN EN ISO 17025 (2000): Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien, April 2000.
- Ding J, Neue UD (1999): A new approach to the effective preparation of plasma samples for rapid drug quantification using on-line solid phase extraction mass spectrometry. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **13**, 2151-2159.
- Driedger DR (2000): Analysis of potato glycoalkaloids by immunoassay coupled to Capillary electrophoresis or Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. PhD Thesis, University of Alberta, Canada.
- Driedger DR, LeBlanc RJ, LeBlanc EL, Sporns P (2000a): A capillary electrophoresis laser-induced fluorescence method for analysis of potato glycoalkaloids based on a solution-phase immunoassay. 1. Separation and quantification of immunoassay products. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1135-1139.

- Driedger DR, LeBlanc RJ, LeBlanc EL, Sporns P (2000b): A capillary electrophoresis laser-induced fluorescence method for analysis of potato glycoalkaloids based on a solution-phase immunoassay. 2. Performance evaluation. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 2292-2296.
- Driedger DR, Sporns P (1999): Glycoalkaloid concentration in by-products of potato starch extraction as measured by matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry. *J. Food Process. Preserv.* **23**, 377-390.
- Driedger DR, Sporns P (2001a): Development of an antibody against diosgenin and spiroaminoketal alkaloids. *Food Agric. Immunol.* **13**, 33-38.
- Driedger DR, Sporns P (2001b): Immunoaffinity sample purification and MALDI-TOF MS analysis of alpha-solanine and alpha-chaconine in serum. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 543-548.
- Durbin RD, Uchytel TF (1969): Purification and properties of a fungal  $\beta$ -glucosidase acting on  $\alpha$ -tomatine. *Biochim. Biophys. Acta* **191**, 176-178.
- Easton J (1998): Potatoes prolong anesthetic action. Archive of Press Releases, University of Chicago Medical Center. Internet: [www.uchospitals.edu/news/1998/19981020-spudstudy.html](http://www.uchospitals.edu/news/1998/19981020-spudstudy.html)
- Edwards EJ, Cobb AH (1996). Improved high-performance liquid chromatographic determination of the potato glycoalkaloids. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 2705-2709.
- Edwards EJ, Cobb AH (1997): Effect of temperature on glycoalkaloid and chlorophyll accumulation in potatoes (*Solanum tuberosum* L. cv. King Edward) stored at low photon lux density, including preliminary modeling using an artificial neural network. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 1032-1038.
- Edwards EJ, Cobb AH (1998): Current methods of potato glycoalkaloid analysis: problems and potential. *Asp. Appl. Biol.* **52**, 331-337.
- Edwards EJ, Cobb AH (1999): The effect of prior storage on the potential of potato tubers (*Solanum tuberosum* L.) to accumulate glycoalkaloids and chlorophylls during light exposure, including artificial neural network modelling. *J. Sci. Food Agric.* **79**, 1289-1297.

- Edwards EJ, Saint RE, Cobb AH (1998): Is there a link between greening and light-enhanced glycoalkaloid accumulation in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers? *J. Sci. Food Agric.* **76**, 327-333.
- Ehmke A, Eilert U (1986): Steroidal alkaloids in tissue cultures and regenerated plants of *Solanum dulcamara*. *Plant Cell Rep.* **5**, 31-34.
- Eltayeb EA, Al-Sinani SS, Khan IA (2005): Determination of the glycoalkaloids  $\alpha$ -solanine and  $\alpha$ -chaconine levels in 18 varieties of potato (*Solanum tuberosum* L.) grown in Oman. *Potato Res.* **46**, 57-66.
- Eltayeb EA, Roddick JG (1984): Changes in the glycoalkaloid content of developing fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *J. Exp. Bot.* **35**, 252-260.
- Eltayeb EA, Roddick JG (1985): Biosynthesis and degradation of  $\alpha$ -tomatine in developing tomato fruits. *Phytochem.* **24**, 253-257.
- Evans S, Buchanan R, Hoffman A, Mellon FA, Price KR, Walls FC, Hall S, Burlingame AL, Chen S, Derrick PJ (1993): Structural characterization of a glycoalkaloid at the femtomole level by means of four-sector tandem mass spectrometry and scanning array detection. *Org. Mass Spectrom.* **28**, 289-290.
- Evans D, Mondy NI (1984): Effect of magnesium fertilization on glycoalkaloid formation in potato tubers. *J. Agric. Food Chem.* **32**, 465-466.
- Falbe J, Regitz M (1991): Römpp Chemie Lexikon, Band 5, Thieme-Verlag, Stuttgart, 4200-4201.
- FAO (2006): FAOSTAT data, online-database. Rome, Italy: FAO Updated 2006. Internet: <http://faostat.fao.org/site/340/Default.aspx>
- Ferreira F, Moyna P, Soule S, Vazquez A (1993): Rapid determination of *Solanum* glycoalkaloids by thin-layer chromatographic scanning. *J. Chrom. A* **653**, 380-384.
- Fewell AM, Roddick JG (1993): Interactive antifungal activity of the glycoalkaloids  $\alpha$ -solanine and  $\alpha$ -chaconine. *Phytochem.* **33**, 323-328.
- Fewell AM, Roddick JG (1997): Potato glycoalkaloid impairment of fungal development. *Mycol. Res.* **101**, 597-603.

- Fewell AM, Roddick JG, Weissenberg M (1994): Interactions between the glycoalkaloids solasonine and solamargine in relation to inhibition of fungal growth. *Phytochem.* **37**, 1007-1011.
- Fischnich O, Heilinger F (1959): Formation, origin, and importance of constituents of the potato. *Angew. Bot.* **33**, 49-70.
- Fitzpatrick TJ, Osman SF (1974): Comprehensive method for determination of total potato glycoalkaloids. *Am. Potato J.* **51**, 318-323.
- Flanders KL, Hawkes JG, Radcliffe EB, Lauer FI (1992): Insect resistance in potatoes: sources, evolutionary relationships, morphological and chemical defenses and ecogeographical associations. *Euphytica* **61**, 83-111.
- Ford JE, McCance DJ, Drysdale RB (1977): The detoxification of  $\alpha$ -tomatine by *Fusarium oxysporum* F. sp. *lycopersici*. *Phytochem.* **16**, 545-546.
- Forrest JMS, Coxon DT (1980): The relationship between glycoalkaloids and resistance to the white potato cyst nematode, *Globodera pallida* in potato clones derived from *Solanum vernei*. *Ann. Appl. Biol.* **94**, 265-268.
- Fragoyiannis DA, McKinlay RG, D'Mello JPF (2001): Interactions of aphid herbivory and nitrogen availability on the foliar glycoalkaloid content of potato plants. *J. Chem. Ecol.* **27**, 1749-1762.
- Frank JA, Wilson JM, Webb RE (1975): Relation between glycoalkaloids and disease resistance in potatoes. *Phytopathology* **65**, 1045-1049.
- Friedman M (1992): Dietary impact of food processing. *Ann. Rev. Nutr.* **12**, 119-137.
- Friedman M (2002): Tomato glycoalkaloids: role in the plant and in the diet. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 5751-5780.
- Friedman M (2006): Potato glycoalkaloids and metabolites: roles in the plant and in the diet. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 8655-8681.
- Friedman M, Bautista FF, Stanker LH, Larkin KA (1998): Analysis of potato glycoalkaloids by a new ELISA kit. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 5097-5102.

- Friedman M, Dao L (1992): Distribution of glycoalkaloids in potato plants and commercial potato products. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 419-423.
- Friedman M, Dao L (1999): Postharvest changes in glycoalkaloid content of potatoes. *Adv. Exp. Med. Biol.* **459**, 121-143.
- Friedman M, Fitch TE, Yokoyama WE (2000): Lowering of plasma LDL cholesterol in hamsters by the tomato glycoalkaloid tomatine. *Food Chem. Toxicol.* **38**, 549-553.
- Friedman M, Henika PR, Mackey BE (2003a): Effect of feeding solanidine, solasodine and tomatidine to non-pregnant and pregnant mice. *Food Chem. Toxicol.* **41**, 61-71.
- Friedman M, Levin CE (1992): Reverse-phase high-performance liquid chromatographic separation of potato glycoalkaloids and hydrolysis products on acidic columns. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 2157-2163.
- Friedman M, Levin CE (1998): Reversed-phase high performance liquid chromatographic separation of potato glycoalkaloids and hydrolysis products on acidic columns. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 2157-2163.
- Friedman M, McDonald G (1995a): Extraction efficiency of various solvents for glycoalkaloid determination in potatoes and potato products. *Am. Potato J.* **72**, 66A.
- Friedman M, McDonald G (1995b): Acid-catalyzed partial hydrolysis of carbohydrate groups of the potato glycoalkaloid  $\alpha$ -chaconine in alcoholic solutions. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 1501-1506.
- Friedman M, McDonald G (1996): Glycoalkaloids in fresh and processed potatoes. *ACS Symp. Ser.* **631**, 189-205.
- Friedman M, McDonald G (1997): Potato glycoalkaloids: chemistry, analysis, safety and plant physiology. *Crit. Rev. Plant Sci.* **16**, 55-132.
- Friedman M, McDonald G (1999): Steroidal glycoalkaloids. In: Ikan R (Hrsg.): Naturally occurring glycosides. John Wiley & Sons Ltd., 311-343.
- Friedman M, Rayburn JR, Bantle JA (1991): Developmental toxicology of potato alkaloids in the frog embryo teratogenesis assay –Xenopus (FETAX). *Fd. Chem. Toxic.* **29**, 537-547.

- Friedman M, Rayburn JR, Bantle JA (1992): Structural and developmental toxicities of Solanum alkaloids in the frog embryo teratogenesis assay Xenopus (FETAX). *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1617-1624.
- Friedman M, Roitman JN, Kozukue N (2003b): Glycoalkaloid and calystegine contents of eight potato cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 2964-2973.
- Gee JM, Wortley GM, Johnson IT, Price KR, Rutten AAJJL, Houben GF, Penninks (1996): Effects of saponins and glycoalkaloids on the permeability and viability of mammalian intestinal cells and on the integrity of tissue preparations *in vitro*. *Toxicology in Vitro* **10**, 117-128.
- Gemeinholzer B, Wink M (2002): Solanaceae: occurrence of secondary compounds versus molecular Phylogeny. In: Van den Berg RG , Barendse GWM, van der Weerden GM, Mariani D (Hrsg.) Solanaceae. V-Advances in Taxonomy and Utilisation, Nijmegen University Press, 165-178
- Gloria-Paulet, P, Durst R (2000): Determination of potato glycoalkaloids using a liposome immunomigration, liquid-phase competition immunoassay. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1678-1683.
- Gonomori K, Meguro H, Lu YQ, Yoshioka N, Hori K, Kikkawa S (1993). The risk of solanine poisoning in a folk remedy and solanin production in potato. *Res. Pract. Forensic. Med.* **36**, 91-95.
- Gregory P, Sinden SL, Osman SF, Tingey WM, Chessin DA (1981): Glycoalkaloids of wild, tuber-bearing *Solanum* species. *J. Agric. Food Chem.* **29**, 1212-1215.
- Griffith DW, Dale MFB, Bain H (1994): The effect of cultivar, maturity and storage on photoinduced changes in the total glycoalkaloid and chlorophyll contents of potatoes (*Solanum tuberosum*). *Plant Sci.* **98**, 103-109.
- Griffith DW, Bain H, Dale MFB (1997): The effect of low-temperature storage on the glycoalkaloid content of potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *J. Sci. Food Agric.* **74**, 301-307.
- Griffith DW, Bain H, Dale MFB (1998): Effect of storage temperature on potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber glycoalkaloid content and the subsequent accumulation of

- glycoalkaloids and chlorophyll in response to light exposure. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 5202-5208.
- Griffith DW, Bain H, Deighton N, Robertson GW, Dale MFB (2000): Photo-induced synthesis of tomatidenol-based glycoalkaloids in *Solanum phureja* tubers. *Phytochem.* **29**, 1212-1215.
- Griffith DW, Dale MF (2001) Effect of light exposure on the glycoalkaloid content of *Solanum phurja* tubers. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5223-5227.
- Grunenfelder LA, Knowles LO, Hiller LK, Knowles NR (2006): Glycoalkaloid development during greening of fresh market potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *J. Agric. Food Chem.* **54**, 5847-5864.
- Haddadin MSY, Humeid MA, Qaroot FA, Robinson RK (2001): Effect of exposure to light on the solanine content of two varieties of potato (*Solanum tuberosum*) popular in Jordan. *Food Chem.* **73**, 205-208.
- HagerROM (2004): Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe. Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, New York.
- Hajslova J, Schulzova V, Slanina P, Janne K, Hellenäs KE, Andersson C (2005): Quality of organically and conventionally grown potatoes: Four-year study of micronutrients, metals, secondary metabolites, enzymic browning and organoleptic properties. *Food Add. Contam.* **22**, 514-534.
- Hall RL (1992): Toxicological burdens and the shifting burden of toxicology. *Food Technol.* **46**, 109-112.
- Hamouz K, Cepl J, Vokál B, Lachman J (1999): Influence of locality and way of cultivation on the nitrate and glycoalkaloid content in potato tubers. *Rost. Vým.* **45**, 495-501.
- Hänsel R, Sticher O (2004): Pharmakognosie und Phytopharmazie. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1042-1050.
- Harvey MH, McMillan M, Morgan MRA, Chan HWS (1985a): Solanidine is present in serum of healthy individuals and in amounts dependent on their dietary potato consumption. *Hum. Toxicol.* **4**, 187-194.

- Hawkes JG (1990): The potato. Evolution, biodiversity and genetic resources. Bellhaven Press, London, 259.
- Hawkes JG (1994): Origins of cultivated potatoes and species relationship. In: Potato genetics, Bradshaw, JE, Mackay GR (Hrsgs.). CAB International, Wallingford, 3-42.
- Heftmann E (1983): Biogenesis of steroids in Solanaceae. *Phytochem.* **22**, 1843-1860.
- Hellenäs KE (1986): A simplified procedure for quantification of potato glycoalkaloids in tuber extracts by H. p. l. c.; comparison with ELISA and a colorimetric method. *J. Sci. Food Agric.* **37**, 776-782.
- Hellenäs KE, Nyman A, Slanina P, Loof L, Gabrielsson J (1992): Determination of potato glycoalkaloids and their aglycone in blood-serum by high-performance liquid-chromatography – application to pharmacokinetic studies in humans. *J. Chrom.* **573**, 69-78.
- Hellenäs KE, Branzell C, Johnsson H, Slanina P (1995a): Glycoalkaloid content of early potato varieties. *J. Sci. Food Agric.* **67**, 125-128.
- Hellenäs KE, Branzell C, Johnsson H, Slanina P (1995b): High levels of glycoalkaloids in the established Swedish potato variety Magnum Bonum. *J. Sci. Food Agric.* **68**, 249-255.
- Hellenäs KE, Branzell C (1997): Liquid chromatographic determination of the glycoalkaloids alpha-solanine and alpha-chaconine in potato tubers. NMKL Interlaboratory study. *J. AOAC Int.* **80**, 549-554.
- Henion J, Brewer E, Rule G (1998): Sample preparation for LC\MS\MS: analysing biological and environmental samples. *Anal. Chem.* **70**, 650A-656A.
- Herb SF, Fitzpatrick TJ, Osman SF (1975): Separation of potato glycoalkaloids by gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **23**, 520-523.
- Hijmans RJ, Jacobs M, Bamberg JB, Spooner DM (2003): Frost tolerance in wild potato species: Assessing the predictivity of taxonomic, geographic, and ecological factors. *Euphytica* **130**, 47-59.

- Hlywka JJ, Stephenson GR, Sears MK, Yada RY (1994): Effects of insect damage on glycoalkaloid content in potatoes (*Solanum tuberosum*). *J. Agric. Food Chem.* **42**, 2545-2550.
- Hoffland E, van Beusichem ML, Jeger MJ (1999): Nitrogen availability and susceptibility of tomato leaves to *Botrytis cinerea*. *Plant Soil* **210**, 263-272.
- Hollister B, Dickens JC, Perez F, Deahl KL (2001): Differential neurosensory responses of adult Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, to glycoalkaloids. *J. Chem. Ecol.* **27**, 1105-1118.
- Hogenboom AC, Niessen WMA, Brinkman UAT (1999): On-line solid-phase extraction-short column liquid chromatography combined with various tandem mass spectrometric scanning strategies for the rapid study of transformation of pesticides in surface water. *J. Chrom. A* **841**, 33-44.
- Hopkins (1995): The glycoalkaloids: Naturally of interest (but a hot potato?). *Food Chem. Toxicol.* **22**, 223-339.
- Houben RJ, Brunt K (1994): Determination of glycoalkaloids in potato-tubers by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chrom. A* **661**, 169-174.
- ICH *Q2B* (1997): Validation of Analytical Procedures: Methodology. Internet: [www.fda.gov/cber/gdlns/ichq2bmeth.pdf](http://www.fda.gov/cber/gdlns/ichq2bmeth.pdf)
- Ito S, Eto T, Tanaka S, Yamauchi N, Takahara H, Ikeda T (2004): Tomatidine and lycotetraose, hydrolysis products of  $\alpha$ -tomatine by *Fusarium oxysporum* tomatinase, suppress induced defense responses in tomato cells. *FEBS Letters* **571**, 31-34.
- Jadhav SJ, Salunkhe DK, Wyse RE, Dalvi RR (1973): Solanum alkaloids. Biosynthesis and inhibition by chemicals. *J. Food Sci.* **38**, 453.
- Jadhav SJ, Salunkhe DK (1975): Formation and control of chlorophyll and glycoalkaloids in tubers of *Solanum tuberosum* and evaluation of glycoalkaloid toxicity. *Adv. Food Res.* **21**, 307-354.
- Jadhav SJ, Sharma RP, Salunkhe DK (1981): Naturally occurring toxic alkaloids in foods. *Crit. Rev. Toxicol.* **9**, 21-104.

- Jellema R, Elema ET, Malingre TM (1981): Fluorodensitometric determination of potato glycoalkaloids on thin-layer chromatograms. *J. Chrom.* **210**, 121-129.
- Jelinek R, Kyzlink V, Blattny C Jr. (1976): An evaluation of the embryotoxic effects of blighted potatoes on chicken embryos. *Teratol.* **14**, 335-342.
- Johns T (1986): Detoxification function of geophagy and the domestication of the potato. *J. Chem. Ecol.* **12**, 635-646.
- Johns T, Alonso JG (1990) Glycoalkaloid change during domestication of the potato, *Solanum* Section *Petota*. *Euphytica* **50**, 203-210
- Jonasson T, Olsson K (1994): The influence of glycoalkaloids, chlorogenic acid and sugars on the susceptibility of potato tubers to wireworm. *Potato Res.* **37**, 205-216.
- Jonker HH, Koops AJ, Hoogendoorn JC (1992): A rapid method for the quantification of steroidal glycoalkaloids by reversed phase HPLC. *Potato Res.* **35**, 451-455.
- Kalac P (1994): Steroid glycoalkaloids in foodstuffs and food raw materials. Dissertation, VŠCHT Praha, Institute of Chemical Technology, Tschechien.
- Keukens EAJ, de Vrije T, Fabrie CHJP, Demel RA, Jongen WMF, de Kruijff B (1992): Dual specificity of sterol-mediated glycoalkaloid induced membrane disruption. *Biochim. Biophys. Acta* **1110**, 127-136.
- Keukens EAJ, de Vrije T, van den Boom C, de Waard P, Plasman HH, Thiel F, Chupin V, Jongen WMF, de Kruijff B (1995): Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. *Biochim. Biophys. Acta* **1240**, 216-228.
- Keukens EAJ, de Vrije T, Jansen LAM, de Boer H, Janssen M, de Kroon AIPM, Jongen WMF, de Kruijff B (1996): Glycoalkaloids selectively permeabilize cholesterol containing biomembranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1279**, 243-250.
- King R (1980): Analysis of potato glycoalkaloids by gas-liquid chromatography of alkaloid compounds. *J. AOAC Int.* **63**, 1226-1230.
- Kobayashi K, Powell AD, Toyoda M, Saito Y (1989): High-performance liquid-chromatography method for the simultaneous analysis of alpha-solanine and alpha-chaconine in potato plants cultured in vitro. *J. Chrom.* **462**, 357-364.

- Kodamatani H, Saito K, Niina N, Yamazaki S, Tanaka Y (2005): Simple and sensitive method for determination of glycoalkaloids in potato tubers by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. *J. Chrom. A* **1100**, 26-31.
- Kozukue N, Kozukue E, Mizuno S (1987): Glycoalkaloids in potato plants and tubers. *Hort. Sci.* **22**, 294-296.
- Kozukue N, Misoo S, Yamada T, Kamijima O, Friedman M (1999): Inheritance of morphological characters and glycoalkaloids in potatoes of somatic hybrids between dihaploid *Solanum acaule* and tetraploid *Solanum tuberosum*. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 4478-4483.
- Kozukue N, Tsuchida H, Friedman M (2001): Traces studies on the incorporation of [2-<sup>14</sup>C]-DL-Mevalonate into chlorophylls *a* and *b*,  $\alpha$ -chaconine and  $\alpha$ -solanine of potato sprouts. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 92-97.
- Korpan YI, Volotovskiy VV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N, Nazarenko EA, El'skaya, AV, Soldatkin AP (2002): A novel biosensor for steroidal glycoalkaloids detection based on pH-sensitive field effect transistors. *Bioelectrochemistry* **55**, 9-11.
- Kowalski SP, Domek JM, Deahl KL, Sanford L (1999): Performance of Colorado potato beetle larvae, *Leptinotarsa decemlineata* (Say), reared on synthetic diets supplemented with *Solanum* glycoalkaloids. *Am. J. Potato Res.* **76**, 305-312.
- Kowalski SP, Domek JM, Sanford LL, Deahl KL (2000) Effect of  $\alpha$ -tomatidine on the growth and development of the Colorado potato beetle (*Coleoptera*: Chrysomelidae): studies using synthetic diets. *J. Entom. Sci.* **35**, 290-300
- Krakowski MD, McGehee DC, Moss J (1997): Natural inhibitors of cholinesterases: implications for adverse drug reactions. *Can. J. Anaesth.* **44**, 525-534.
- Kromidas S (2000): Handbuch Validierung in der Analytik. Wiley VCH GmbH, Weinheim.
- Kuhn R, Löw I, Trischmann H (1955a): Die Konstitution des Solanins. *Chem. Berichte* **88**, 1492-1507.
- Kuhn R, Löw I, Trischmann H (1955b): Die Konstitution des  $\alpha$ -Chaconins. *Chem. Berichte* **88**, 1690-1693.

- Kuhn R, Löw I (1955c): Resistance factors against *Leptinotarsa decemlineata* Say, isolated from the leaves of wild *Solanum* species. In: Sevag MG, Reid TD, Reynolds OE (Hrsg.): Origins of resistance to toxic agents. Academic Press, New York, 122-132.
- Kuhn R, Löw I (1957): New alkaloid glycosides in the leaves of *Solanum chacoense*. *Angew. Chem.* **69**, 236.
- Kuhn R, Löw I (1961): Zur Konstitution der Leptine. *Chem. Ber.* **94**, 1088-1095.
- Kuiper-Goodman T, Nawrot PS : Solanine and Chaconine. WHO Additives Series 30, Bureau of Chemical Safety, Health and Welfare, Ottawa, Canada. Internet: [www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v30je19.htm](http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v30je19.htm)
- Kuronen P, Väänänen T, Pehu E (1999): Reversed-phase liquid chromatographic separation and simultaneous profiling of steroidal glycoalkaloids and their aglycones. *J. Chrom. A* **863**, 25-35.
- Kvasnika F, Price KR, NG K, Fenwick GR (1994): Determination of potato glycoalkaloids using isotachopheresis and comparison with a HPLC method. *J. Liq. Chrom.* **17**, 1941-1951.
- Lachman J, Hamouz K, Orsák M, Pivec V (2001): Potato glycoalkaloids and their significance in plant protection and human nutrition – review. Series *Rost. Vým.* **47**, 181-191.
- Lafta AM, Lorenzen JH (2000): Influence of high temperature and reduced irradiance on glycoalkaloid levels in potato leaves. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **125**, 563-566.
- Lairini K, Ruiz-Rubio M (1997): Detection of tomatinase from *Fusarium oxysporum* F. sp. *lycopersici* in infected tomato plants. *Phytochem.* **45**, 1371-1376.
- Laufer B (1938): The American plant migration: Part I: The potato. *Field Museum of Natural History* **28**, 1-132
- Laurila J, Laakso I, Väänänen T, Kuronen P, Huopalahti R, Pehu E (1999): Determination of solanidine- and tomatidine-type glycoalkaloid aglycons by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food Sci.* **47**, 2738-2742.

- Laurila J, Laakso I, Valkonen JPT, Hitunen R, Pehu E (1996): Formation of parental-type and novel glycoalkaloids in somatic hybrids between *Solanum brevidens* and *S. tuberosum*. *Plant Sci.* **118**, 145-155.
- Laurila J (2004): Interspecific hybrids of potato: determination of glycoalkaloid aglycones and influence of bacterial infection. Dissertation, University of Helsinki. Department of Applied Biology. Section of Crop Husbandry.
- Lavintman N, Tandecarz J, Caridini CE (1977): Enzymic glycosylation of steroid alkaloids in potato tuber. *Plant Sci. Letters* **8**, 65-70.
- Lawson DR, Erb WA, Miller AR (1992): Analysis of *Solanum* alkaloids using internal standardization and capillary gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 2186-2191.
- Lawson DR, Green TP, Haynes LW, Miller AR (1997): Nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry of solanidine, leptinidine and acetylleptinidine. Steroidal alkaloids from *Solanum chacoense* BITTER. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 4122-4126.
- Levy D, Lisker N, Dimstein L (1993): The effect of temperature on the content of glycoalkaloids in the tubers. Abstr 12<sup>th</sup> Trienn Vonf EAPR, Paris, 196-197.
- Lewis CE, Walker JRL, Lancaster JE, Sutton KH (1998): Determination of anthocyanins, flavonoids and phenolic acids in potatoes: coloured cultivars of *Solanum tuberosum* L. *J. Agric. Food Chem.* **77**,45-57.
- Liljegren DR (1971): Glucosylation of solasodine by extracts from *Solanum laciniatum*. *Phytochem.* **10**, 3061-3064.
- Lister CE, Munro J (2000): Nutrition and health qualities of potatoes-a future focus. Crop & Food Research Confidential Report No. 143. New Zealand Federation of Vegetable and Potato Growers. New Zealand Institute for Crop & Food Research, Christchurch, New Zealand.

- López de Alda MJ, Barreló D (2001): Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by fully automated on-line solid-phase extracton-liquid chromatography-diode array detection. *J. Chrom. A* **911**, 203-210.
- Love SL, Herrman TJ, Thompson-Johns A, Baker TP (1994): Effect and interaction of crop management factors on the glycoalkaloid concentration of potato tubers. *Potato Res.* **37**, 77-85.
- Luckner M (1990): Secondary metabolism in microorganisms, plants and animals. Springer-Verlag, Berlin, 563.
- Maga JA (1980): Potato glycoalkaloids. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **12**, 371-405.
- Maga JA (1994): Glycoalkaloids in Solanaceae. *Food Rev. Int.* **10**, 385-418.
- Marihart J, Wurth H, Steyrer W (1979): Quantitative determination of total solanine in potato proteine products. II. Rapid method. *Ernährung* **3**, 572-573.
- Matsuda F, Morino K, Miyazawa H, Miyashita M, Miyagawa H (2004): Determination of potato glycoalkaloids using high-pressure liquid chromatography-electrospray ionisation/mass spectrometry. *Phytochem. Anal.* **15**, 121-124.
- Matthew JA, Morgan MRA, McNerner R, Chan HW, Coxon DT (1983): Determination of solanidine in human plasma by RIA. *Food Chem. Toxicol.* **21**, 637-641.
- Matthews D, Jones H, Gans P, Coates S, Smith LM (2005): Toxic secondary metabolite production in genetically modified potatoes in response to stress. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 7766-7776.
- McCue KF, Allen PV, Shepherd LV, Blake A, Whitworth J, Maccree MM, Rockhold DR, Steward D, Davies HV, Beiknap WR (2005): The primary *in-vivo* steroidal alkaloid glucosyltransferase from potato. *Phytochem.* **67**, 1590-1597.
- McMillan M, Thompson JC (1979): An outbreak of suspected solanine poisoning in schoolboys: Examination of criteria of solanine poisoning. *Quart. J. Med.* **48**, 227-243.

- Mensinga TT, Sips AJAM, Rompelberg CJM, van Twillert K, Meulenbelt J, van den Top H, van Egmond HP (2005): Potato glycoalkaloids and adverse effects in humans: an ascending dose study. *Reg. Tox. Pharmacol.* **41**, 66-72.
- Mert-Türk F (2006): Saponins versus plant fungal pathogens. *J. Cell Mol. Biol.* **5**, 13-17.
- Moehs CP, Allen PV, Friedman M, Belknap WR (1997): Cloning and expression of solanidine UDP-glucose glucosyltransferase from potato. *Plant J.* **11**, 227-236.
- Mohler H, Sulser H (1968): Kartoffeln und Kartoffel-Erzeugnisse in Acker L, Bergner KG, Diemair D, Heimann W, Kiermeier F, Schormüller J, Souci SW (Hrsg.): Handbuch der Lebensmittelchemie. V/2: Obst, Gemüse, Kartoffeln, Pilze. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 471-496.
- Mondy NI, Mushi CB (1990): Effect of nitrogen fertilization on the glycoalkaloid and nitrate content of potatoes. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 565-567.
- Morgan MRA, McNerney R, Matthew JA, Coxon DT, Chan WS (1983): An enzyme-linked immunosorbent assay for total glycoalkaloids in potatoes. *J. Sci. Food Agric.* **34**, 593-598.
- Morgan MRA, Coxon DT, Bramham S, Chan HW, Van Gelder WMJ, Allison MJ (1995): Determination of the glycoalkaloid content of potato tubers by three methods including enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Sci. Food Agric.* **36**, 282-288.
- Morris SC, Lee TH (1984): The toxicity and teratogenicity of Solanaceae glycoalkaloids, particularly those of the potato (*Solanum tuberosum*): a review. *Food Technol. Aust.* **36**, 118-124.
- Morris SC, Petermann JB (1985): Genetic and environmental effects on levels of glycoalkaloids in cultivars of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Food Chem.* **18**, 1065-1067.
- Morrow LS, Caruso FL (1983): Effect of potato seed tuber glycoalkaloid content on subsequent infection by *Rhizoctonia solani*. *Amer. Potato. J.* **60**, 403-407.
- Mun AM, Barden ES, Wilson JM, Hogan JM (1975): Teratogenic effects in early chicken embryos of solanine and glycoalkaloids from potatoes infected with late-blight, *Phytophthora infestans*. *Teratol.* **11**, 73-78.

- Nakamura T, Komori C, Lee YY, Hashimoto F, Vahara S, Nohara T, Ejima A (1996): Cytotoxic activities of Solanum steroidal glycoalkaloids. *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 564-566.
- Nes WD, Saunders GA, Heftmann E (1983): A reassessment of the role of steroidal alkaloids in the physiology of *Phytophthora*. *Phytochem.* **22**, 75-78.
- Ness E, Joner PE, Dahle HK (1984): Alpha-solanine tested for mutagenicity with the Ames test. *Acta Vet. Scand.* **25**, 145-147.
- Newkirk DK, Benson RW, Howard PC, Churchwell MI, Doerge DR, Roberts DW 1998: On-line immunoaffinity capture, coupled with HPLC and electrospray mass spectrometry, for automated determination of fumonisins. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1677-1688.
- Nicolic NC, Stankovic MZ (2003): Solanidine hydrolytic extraction and separation from the potato (*Solanum tuberosum* L.) vines by using solid-liquid-liquid systems. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 1845-1849.
- Nicolic NC, Stankovic MZ, Markovic DZ (2005): Liquid-liquid systems for acid hydrolysis of glycoalkaloids from *Solanum tuberosum* L. tuber sprouts and solanidine extraction. *Med. Sci. Monitor.* **11**, 200-205.
- Nigg HN, Ramos LE, Graham EM, Sterling J, Brown S, Cornell JA (1996): Inhibition of human plasma and serum butyrylcholinesterase (EC 3.1.1.8) by  $\alpha$ -chaconine and  $\alpha$ -solanine. *Fundamental Appl. Toxicol.* **33**, 272-281.
- Nishie K, Gumbmann MR, Keyl AC (1971): Pharmacology of solanine. *Toxicol. Appl. Pharm.* **19**, 81-92.
- Nitithamyong A, Vonelbe JH, Wheeler RM, Tibbitts TW (1999): Glycoalkaloids in potato tubers grown under controlled environments. *Am. J. Potato Res.* **76**, 337-343.
- Oda K, Matsuda H, Murakami T, Katayama S, Ohgitani T, Yoshikawa M (2000): Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. *Biol. Chem.* **381**, 67-74.

- OECD (2002): Consensus document on compositional considerations for new varieties of potatoes: key food and feed nutrients, anti-nutrients and toxicants. Organisation of Economic Co-operation and Development, Environmental Health and Safety Publications, Series of the safety of novel foods and feeds, No. 4, Paris.
- Olsson K (1986): The influence of genotype on the effects of impact damage on the accumulation of glycoalkaloids in potato tubers. *Potato Res.* **29**, 1-12.
- Olsson K(1996): Attempts to unveil potato clones disposed to stress-induced accumulation of glycoalkaloids in the field. Abstr 13<sup>th</sup> Trienn Conf EAPR, Veldhoven, 538-539.
- Ono H, Kozuka D, Chiba Y, Horigane A, Isshiki K (1997) Structure and cytotoxicity of dehydrotomatine, a minor component of tomato glycoalkaloids. *J. Agric. Food Chem.* **45**: 3743-3746
- Osbourn AE (1996): Preformed antimicrobial compounds and plant defence against fungal attack. *Plant Cell* **8**, 1821-1831.
- Osman SF, Herb SF, Fitzpatrick TJ, Schmiediche P (1978): Glycoalkaloid composition of wild and cultivated tuber-bearing *Solanum* species of potential value in potato breeding programmes. *J. Agric. Food Chem.* **26**, 1246-1248.
- Osman SF, Johns TA, Price KR (1986) Sisunine, a glycoalkaloid found in hybrids between *Solanum acaule* and *Solanum x ajanhuiri*. *Phytochem* **25**, 967-968.
- Osman SF, Sinden SL (1977): Analysis of mixtures of solanidine and demissidine glycoalkaloids containing identical carbohydrate units. *J. Agric. Food Chem.* **25**, 955-957.
- Osman SF, Sinden SL (1982) The glycoalkaloids of *Solanum demissum*. *Phytochem* **21**, 2763-2764
- Osman SF, Sinden SL (1989): High-performance liquid chromatographic analysis of *Solanum* steroidal alkaloids. *J. Chrom.* **479**, 189-193.
- Osman SF, Zacharius RM, Naglak D (1980): Solanidine metabolism in potato tuber tissue slices and cell suspension cultures. *Phytochem.* **19**, 2599-2601.

- Panovská Z, Hajslová J, Kosinková P (1997): Glykoalkaloid content of potatoes sold in Czechia. *Nahrung* **41**, 146-149.
- Panovská Z, Hajslová J, Kotal F (1994): Levels of glykoalkaloids in cultivars of potatoes grown in the Czech Republic. *Rost. Vým.* **40**, 1123-1128.
- Papathanasiou F, Harvey BMR, Mitchell SH (1996): Effect of some environmental factors on glykoalkaloid content in potato. Abstract 13<sup>th</sup> Trienn Conf EAPR, Veldhoven, 541-542.
- Papathanasiou F, Mitchell SH, Harvey BMR (1998): Glykoalkaloid accumulation during tuber development of early potato cultivars. *Potato Res.* **41**, 117-125.
- Papathanasiou F, Mitchell SH, Watson S, Harvey BMR (1999a): Variation in glykoalkaloid concentration of potato tubers harvested from mature plants. *J. Sci. Food Agric.* **79**, 32-36.
- Papathanasiou F, Mitchell SH, Watson S, Harvey BMR (1999b): Effect of environmental stress during tuber development on accumulation of glykoalkaloids in potato (*Solanum tuberosum* L.). *J. Sci. Food Agric.* **79**, 1183-1189.
- Paquin R (1966): Role of the glykoalkaloids in the resistance of potato to bacterial ring rot. *Amer. Potato J.* **43**, 349-354.
- Parnell A, Bhuva VS, Bintcliffe EJB (1984): The glykoalkaloid content of potato varieties. *Journal of the National Institute of Agricultural Botany UK* **16**, 531-535.
- Pascual JA, Sanagustín J (1999): Fully automated analytical method for codeine quantification in human plasma using on-line solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chrom. B* **724**, 295-302.
- Patsias J, Papadopoulou-Mourkidou E (2000): Development of an automated on-line solid-phase extraction-high-performance liquid chromatographic method for the analysis of aniline, caffeine and various selected substituted aniline and phenol compounds in aqueous matrices. *J. Chrom. A* **904**, 171-188.
- Percival G (1999): Light-induced glykoalkaloid accumulation of potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *J. Sci. Food Agric.* **79**, 1305-1310.

- Percival G, Dixon G (1996a): Glycoalkaloid concentration in aerial tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). *J. Sci. Food Agric.* **70**, 439-448.
- Percival G, Dixon G (1996b): Effect of light intensity on glycoalkaloid content of potato tubers. Abstr. 13<sup>th</sup> Trienn Conf EAPR, Veldhoven, 43-44.
- Percival G, Dixon G, Sword A (1993): The influence of temperature on light enhanced glycoalkaloid synthesis in potato. *Ann. Appl. Biol.* **123**, 141-153.
- Percival G, Dixon G, Sword A (1994): Glycoalkaloid concentration of potato tubers following continuous illumination. *J. Sci. Food Agric.* **66**, 139-144.
- Percival G, Dixon G, Sword A (1996): Glycoalkaloid concentration of potato tubers following exposure to daylight. *J. Agric. Food Chem.* **71**, 59-63.
- Percival G, Karim MS, Dixon GR (1999): Pathogen resistance in aerial tubers of potato cultivars. *Plant Pathol.* **48**, 768-776.
- Peréz J, Glorio-Paulet P, Trognitz B, Delgado C, Espanola N (1999): Development an evaluation of an enzyme immunoassay for the quality control of total glycoalkaloids in improved potato tubers. Presented at 218<sup>th</sup> National Meeting of the American Chemical Society, New Orleans, LA, 22-26.
- Petersen HW, Mølgaard P, Nyman U, Olsen E (1993): Chemotaxonomy of the tuber-bearing *Solanum* species, subsection *Potatoe* (Solanaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* **21**, 629-644.
- Plhak L, Sporns P (1992): Enzyme-immunoassay for potato glycoalkaloids. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 2533-2540.
- Plhak L, Sporns P (1994): Development and production of monoclonal-antibodies for the measurement of solanidine potato glycoalkaloids. *Am. Potato. J.* **71**, 297-313.
- Ponnampalam R, Mondy NI (1983): Effect of cooking on the total glycoalkaloid content of potatoes. *J. Agric. Food Chem.* **31**, 493-495.
- Porter WL (1972): A note on the melting point of  $\alpha$ -solanine. *Am. Potato J.* **49**, 403-406.
- Poswillo DE, Sopher D, Mitchell SJ, Coxon DT, Curtis FR, Price KR (1973): Investigations into the teratogenic potential of imperfect potatoes. *Teratol.* **8**, 339-347.

- Price KR, Mellon FA, Self R, Fenwick FR, Osman SF (1985): Fast atom bombardment mass spectrometry of Solanum glycoalkaloids and its potential for mixture analysis. *Biomed. Mass Spectr.* **12**, 79-85.
- Prokoshev SM, Petrochenko EI, Baranova VZ (1952): Glycoalkaloids of tuber-bearing forms of *Solanum* in connection with their resistance to Colorado beetle. *Doklady Akademii Nauk SSSR* **82**, 955-958
- Radtke W, Rieckmann W (2001): Krankheiten und Schädlinge der Kartoffel. Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen-Buer.
- Ramaswamy NK, Behere AG, Nair PM (1976): A novel pathway for the synthesis of solanidine in the isolated chloroplast from greening potatoes. *Eur. J. Biochem.* **67**, 275-282.
- Rangarajan A, Miller AR, Veilleux RE (2000): Leptine glycoalkaloids reduce feeding by Colorado potato beetle in diploid *Solanum* sp. hybrids. *J. Am. Soc. Horti. Sci.* **125**, 689-693.
- Rayburn et al. (1994): Role of carbohydrate chains of potato glycoalkaloids in developmental toxicity. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 1511-1515.
- Reinberger S (2005): Die Kartoffel –die tolle Knolle. *Spektrum der Wissenschaft* **10**, 64-65.
- Rennwick JH, Claringbold WDB, Earthy ME, Few JD, McLean ACS (1984): Neural-tube defects produced in Syrian hamsters by potato glycoalkaloids. *Teratol.* **30**, 371-381.
- Richter G (1998): Stoffwechselfysiologie der Pflanzen. Thieme-Verlag Stuttgart, New York, 331-355.
- Riediker S, Obrist H, Varga N, Stadler RH (2002): Determination of chlormequat and mepiquat in pear, tomato and wheat flour using on-line solid-phase extraction (Prospekt) coupled with liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chrom. A* **966**, 15-23.
- Roddick JG (1976): Intracellular distribution of steroidal glycoalkaloid  $\alpha$ -tomatine in *Lycopersicon esculentum* fruit. *Phytochem.* **15**, 475-477.

- Roddick JG (1977): Subcellular localization of steroidal glycoalkaloids in vegetative organs of *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum*. *Phytochem.* **16**, 805-807.
- Roddick JG (1979): Complex formation between Solanaceous steroidal glycoalkaloids and free sterols in vitro. *Phytochem.* **18**, 1467-1470.
- Roddick JG (1980): A sterol-binding assay for potato glycoalkaloids. *Phytochem.* **19**, 2455-2457.
- Roddick JG (1989): The acetylcholinesterase activity of steroidal glycoalkaloids and their aglycons. *Phytochem.* **28**, 2631-2634.
- Roddick JG, Rijnenberg AL, Osman SF (1988): Synergistic interactions between potato glycoalkaloids alpha-solanine and alpha-chaconine in relation to destabilisation of cell membranes: ecological implications. *J. Chem. Ecol.* **14**, 889-902.
- Roddick JG, Rijnenberg AL, Weissenberg M (1990): Membrane-disrupting properties of the steroidal glycoalkaloids solasonine and solamargine. *Phytochem.* **29**, 1513-1518.
- Roddick JG, Rijnenberg AL, Weissenberg M (1992): Alteration to the permeability of liposome membranes by the solasodine-based glycoalkaloids solasonine and solamargine. *Phytochem.* **31**, 1951-1954.
- Roddick JG, Weissenberg M, Leonard AL (2001): Membrane disruption and enzyme inhibition by naturally-occurring and modified chacotriose-containing *Solanum* steroidal glycoalkaloids. *Phytochem.* **56**, 603-610.
- Rodriguez-Saona LE, Wrolstad RE, Pereira C (1999): Glycoalkaloid content and anthocanin stability to alkaline treatment of red-fleshed potato extracts. *J. Food Sci.* **64**, 445-450.
- Rogozinska I (1999): The effect of environmental factors on the solanine content in tubers of potato edible varieties. Abstr 14<sup>th</sup> Trien Conf EAPR, Sorrento, 628-629.
- Rokka VM, Laurila J, Tauriainen A, Laakso I, Larkka J, Metzler M, Pietilae L (2005): Glycoalkaloid aglycone accumulations with infection by *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in potato species *Solanum acaule* and *Solanum tuberosum* and their specific somatic hybrids. *Plant Cell Reports* **23**, 683-691

- Ronning CM, Stommel JR, Kowalski SP, Sanford LL, Kobayashi RS, Pineada O (1999): Identification of molecular markers associated with leptine production in a population of *Solanum chacoense* BITTER. *Theor. Appl. Gen.* **98**, 39-46.
- Ronning CM, Kowalski SP, Sanford LL, Stommel JR (2000): Geographical variation of solanidane aglycone glycoalkaloids in the wild species *Solanum chacoense* BITTER. *Gen. Res. Crop Evol.* **47**, 359-369.
- Roosen-Runge C, Schneider E (1977): Determination of *Solanum* alkaloids solanine and chaconine. *Z. Lebensmittel-Untersuch. Fors.* **164**, 96-97.
- Rosenfeld HJ, Sundell HA, Ringstad L, Ringstad M (1995): Influence of packaging materials and temperature on the glycoalkaloid content of potato tubers. *Food Res. Intern.* **28**, 481-484.
- Rossi DT, Zhang N (2000): Automated solid-phase extraction: current aspects and future prospects. *J. Chrom. A* **885**, 97-113.
- Rücker G, Neugebauer M, Willems GG (2001): Instrumentelle pharmazeutische Analytik. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 28-30.
- Saito K, Horie M, Hoshino Y, Nose N, Nakazawa H (1990): HPLC determination of glycoalkaloids in potato products. *J. Chrom.* **508**, 141-147.
- Salazar LF (2006): Emerging and Re-emerging potato diseases in the Andes. *Potato Res.* **49**, 43-47.
- Sanford LL, Kobayashi RS, Deahl KL, Sinden SL (1996): Segregation of leptines and other glycoalkaloids in *Solanum tuberosum* (4x) x *S. chacoense* (4x) crosses. *Am. Potato J* **73**, 21-33.
- Sanford LL, Sinden SL (1972): Inheritance of potato glycoalkaloids. *Am. Potato J.* **49**, 209-217.
- Santos WR, Bernardo RR, Torres Peçanha LM, Palatnik M, Parente JP, Palatnik de Sousa CB (1997): Haemolytic activities of plant saponins and adjuvants. Effect of *Periandra mediterranea* saponin on the humoral response to the FML antigen of *Leishmania donovani*. *Vaccine* **15**, 1024-1029.

- Sarquis JI, Coria NA, Aguilar I, Rivera A (2000): Glycoalkaloid content in *Solanum* species and hybrids from a breeding program for resistance to late blight (*Phytophthora infestans*). *Am. J. Potato Res.* **77**, 295-302.
- Schmiediche PE, Hawkes JG, Ochoa CM (1980): Breeding of the cultivated potato species *Solanum x juzepczukii* Buk. and *Solanum x curtilobum* Juz. et Buk. I. A study of the natural variation of *S. juzepczukii*, *S. x curtilobum* and their progenitor *S. acaule* Bitt. *Euphytica* **29**, 685-704.
- Schmiediche PE, Hawkes JG, Ochoa CM (1982): The breeding of the cultivated potato species *Solanum x juzepczukii* and *S. x curtilobum*. II. The resynthesis of *S. x juzepczukii* and *S. x curtilobum*. *Euphytica* **31**, 695-707
- Schreiber K (1961) Die Kartoffel – ein Handbuch, Bd. 1. In: Schick R, Klinkowski M (Hrsg.), Deutscher Landwirtschaftsverlag, 191-352.
- Schreiber K (1963): Isolierung von Solasodinglykosiden aus Pflanzen der Gattung *Solanum* L. *Solanum*-Alkaloids, XXVIII. Mitteilungen. *Kulturpflanzen* **11**, 451.
- Schreiber K (1968a): Steroid alkaloids. The *Solanum* group. In: Manske, RHF (Hrsg.): The alkaloids; chemistry and physiology, Volume X. Academic Press, New York, 1-192.
- Schreiber K (1968b): Toxic constituents of food plants. *Kulturpflanze* **16**, 255-276.
- Schilling J, Zobel M (1966): Paper chromatographic method for the determination of solanine in potato and potato products. *Pharmazie* **21**, 103-105.
- Schulzová V, Hajslová J, Roztocil T, Vodrich M (1992): The determination of the glycoalkaloids  $\alpha$ -solanine and  $\alpha$ -chaconine in potato by HPLC method. *Potrav. vědy* **10**, 281-292.
- Schwarze P (1963): Über den Glykoalkaloidgehalt und die Zusammensetzung des Glykoalkaloidkomplexes Nachkommen der Artkreuzung *Solanum tuberosum* x *Solanum chacoense*. *Theor. Appl. Gen.* **33**, 275-281.
- Şengül, M, Keleş F, Keleş MS (2004): The effect of storage conditions (temperature, light, time) and variety on the glycoalkaloid content of potato tubers and sprouts. *Food Control* **15**, 281-286.

- Shakya R, Navarre NA (2006): Rapid screening of ascorbic acid, glycoalkaloids and phenolics in potatoes using high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Sci.* **54**, 5433-5460.
- Sharma RP, Salunkhe DK (1989): *Solanum* glycoalkaloids. In: Cheeke, PR (Hrsg.): Toxicants of Plant Origin, Vol. 1 Alkaloids. CRC Press, Boca Raton, 179-236.
- Shih, MJ, Kuć J (1974):  $\alpha$ - and  $\beta$ -solamarine in Kennebec *S. tuberosum* leaves and aged tuber slices. *Phytochem.* **13**, 997-1000.
- Shih, MJ, Kuć J, Williams EB (1973): Suppression of steroid glycoalkaloid accumulation as related to rishitin accumulation in potato tubers. *Phytopathology* **63**, 821-826.
- Sikinyi E, Hannapfel DJ, Imerman PM, Trahr HM (1997): Novel mechanism for resistance to Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) in wild *Solanum* species. *J.Econ. Entomol.* **90**, 689-696.
- Simonovska B, Vovk I (2000): High-performance thin-layer chromatographic determination of potato glycoalkaloids. *J. Chrom.* **903**, 219-225.
- Sinden SL (1972): Effect of light and mechanical injury on the glycoalkaloid content of greening-resistant potato tubers. *Am. Potato. J* **49**, 368.
- Sinden SL, Deahl KL, Aulenbach BB (1976): Effect of glycoalkaloids and phenolics on potato flavour. *J. Food Sci.* **41**, 520-523.
- Sinden SL, Sanford LL, Osman SF (1980): Glycoalkaloids and resistance to the colorado potato beetle in *Solanum chaconense* BITTER. *Am. Potato. J.* **57**, 331-343.
- Sinden, SL; Sanford LL (1981): Origin and inheritance of solamarine glycoalkaloids in commercial potato cultivars. *Am. Potato. J.* **58**, 305-325.
- Sinden SL, Sanford LL, Cantelo WE, Deahl KL (1986): Leptine glycoalkaloids and resistance to the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) in *Solanum chacoense*. *Environ. Entomol.* **15**, 1057-1062.
- Sizer CE, Maga JA; Craven CJ (1980): Total glycoalkaloids in potatoes and potato chips. *J. Agric. Food Chem.* **28**, 578-579.

- Slanina P (1990): Solanine (glycoalkaloids) in potatoes: toxicological evaluation. *Food Chem. Toxicol.* **28**, 759-761.
- Sotelo A, Contreras E, Sousa H, Hernandez V (1998): Nutrient composition and toxic factor content of four wild species of Mexican potato. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1355-1358.
- Sotelo A, Serrano B (2000): High-performance liquid chromatographic determination of the glycoalkaloids alpha-solanine and alpha-chaconine in 12 commercial varieties of Mexican potato. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 2472-2475.
- Sporer F, Sauerwein, M, Wink M (1993): Diurnal and developmental variation of alkaloid accumulation in *Atropa belladonna*. *Acta Hort.* **331**, 381-386.
- Stahl, E (1966): Dünnschicht-Chromatographie-Ein Laboratoriumshandbuch. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 438-441.
- Stanker LH, Kampsholtzapple C, Friedman M (1994): Development and characterisation of monoclonal-antibodies that differentiate between potato and tomato glycoalkaloids and aglycons. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 2360-2366.
- Stanker LH, Holtzapple C, Friedman M (1997): Monoclonal antibodies to potato, tomato and eggplant glycoalkaloids and assays for the same. United States Patent, Application No. 544748, Washington DC, USA.
- Stapleton A, Allen PV, Friedman M, Belknap WR (1991): Purification and characterization of solanidine glucosyltransferase from the potato (*Solanum tuberosum* L.). *J. Agric. Food Chem.* **39**, 1187-1193.
- Stevens J (2003): The ephedra story: an automated SPE procedure and analysis for the determination of ephedra and ephedra-like compounds in dietary supplements. Application note 215, Gilson Inc., Middleton, WI, USA.
- Stine KJ, Hercules RK, Duff JD, Walker BW (2006): Interaction of the glycoalkaloid tomatine with DMPC and sterol monolayers studied by surface pressure measurements and Brewster angle microscopy. *J. Phys. Chem. B*, in press.
- Stobiecki M, Matysiak-Mata I, Franski R, Skala J, Szopa J (2003): Monitoring changes in anthocyanin and steroid alkaloid glycoside content in lines of transgenic potato plants using liquid chromatography/mass spectrometry. *Phytochem.* **62**, 959-969.

- Street HE; Kenyon AE; Watson JM (1946): Nature and distribution of various forms of nitrogen in the potato. *Ann. Appl. Biol.* **33**, 1-12.
- Surjawan I, Dougherty MP, Bushway RJ, Bushway AA, Briggs JL, Camire ME (2001): Sulfur compounds reduce potato toxins during extrusion cooking. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 2835-2838.
- Swinyard CA, Chaube S (1973): Are potatoes teratogenic for experimental animals? *Taratomol.* **8**, 349-358.
- Takechi M, Shimada S, Tanaka Y (1991): Time course and inhibition of saponin-induced haemolysis. *Planta Med.* **58**, 128-129.
- Takechi, M, Tanaka Y (1995): Hemolytic time course differences between steroid and triterpene saponines. *Planta Med.* **61**, 76-77
- Teuscher E, Lindequist U (1994): Giftstoffe der Nachtschattengewächse. In: Biogene Giftstoffe, Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart, 526-529.
- Thomson CA, Sporns P (1995): Fluorescence polarisation immunoassay for potato glycoalkaloids. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 254-260.
- Tingey WM, MacKenzie JD, Gregory P (1978): Total foliar glycoalkaloids and resistance of wild potato species to *Empoasca fabae* (Harris). *Am. Potato. J.* **55**, 577-585.
- Tschesche R, Piestert G (1975): Biosynthesis of steroid derivatives in the plant kingdom. XXI. Biogenesis of tigogenin in *Digitalis lanata* and of solasodine in *Solanum laciniatum*. *Phytochem.* **14**, 435-438.
- Tschesche R, Goossens B, Töpfer A (1976): Biosynthesis of steroid derivatives in the plant kingdom. Part 22. Nitrogen supply and the common occurrence of 25(R)- and 25(S)-steroid alkaloids in Solanaceae. *Phytochem.* **15**, 1387-1389.
- Turakainen M, Väänänen T, Anttila K, Ollilainen V, Hartikainen H, Seppänen M (2004): Effect of selenate supplementation on glycoalkaloid content of potato (*Solanum tuberosum* L.). *J. Agric. Food Chem.* **52**, 7139-7143.

- Urgent D, Dillahay T, Ramirez C (1987): Potato remains from a Late Pleistocene settlement in Southcentral Chile. *Econ. Bot.* **41**, 17-27.
- Unger KK (1990): Handbuch der HPLC. GIT-Verlag, Darmstadt.
- Uppal DS (1987): Varietal and environmental effect on the glycoalkaloid content of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Food Hum. Nutr.* **37**, 333-340.
- Väänänen T, Kuronen P, Pehu E (2000): Comparison of commercial solid-phase extraction sorbents for the sample preparation of potato glycoalkaloids. *J. Chrom. A* **869**, 301-305.
- Väänänen T, Ikonen T, Rokka VM, Kuronen P, Serimaa R, Ollilaninen V (2005): Influence of incorporated wild *Solanum* genomes on potato properties in terms of nanostructure and glycoalkaloid content. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 5313-5325
- Valkonen JPT, Keskitalo M, Vasara T, Pietila L (1996): Potato glycoalkaloids: a burden or a blessing? *Crit. Rev. Plant Sci.* **15**, 1-20.
- Valovics NA, Bartok N (1969): Determination of solasodine, soladulcidine and tomatidenol in *Solanum dulcamara*. *Herba Hungarica* **8**, 107-111.
- Vallejo RP, Ercegovich CD (1979): Analysis of potato for glycoalkaloid content by radioimmunoassay (RIA). *NBS Special Publication* **519**, 333-340.
- Van Dam J, Levin I, Struik PC, Levy D (1999): Genetic characterisation of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) emphasising genetic control of glycoalkaloid content in the tubers. *Euphytica* **110**, 67-76.
- Van Damme EJ, Barre A, Rouge P, Peumans WJ (2004): Potato lectin: an updated model of a unique chimeric plant protein. *Plant J.* **37**, 34-35.
- Van Gelder WMJ (1984): A new hydrolysis technique for steroidal glycoalkaloids with unstable aglycones from *Solanum* spp. *J. Sci. Food Agric.* **35**, 487-497.
- Van Gelder WMJ (1985): Determination of total C27-steroidal alkaloid composition of *Solanum* species by high-resolution gas chromatography. *J. Chrom.* **331**, 285-293.

- Van Gelder WMJ (1990): Chemistry, Toxicology and occurrence of steroidal glycoalkaloids: potential contaminants of the potato (*Solanum tuberosum* L.). In: Rizk, AF (Hrsg.): Poisonous plant contamination of edible plants. CRC press, Boca-Raton, 117-156.
- Van Gelder WMJ, Jonker HH, Huizing HJ, Scheffer JJC (1988a): Capillary gas chromatography of steroidal alkaloids from Solanaceae. Retention indices and simultaneous flame ionization/nitrogen-specific detection. *J. Chrom.* **442**, 133-145.
- Van Gelder WMJ, Tuinstra LGMT, Van der Greef J, Scheffer JJC (1989): Characterisation of novel steroidal alkaloids from tubers of *Solanum* species by combined gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chrom.* **482**, 13-22.
- Van Gelder WMJ, Vinke JH, Scheffer JJC (1988b): Steroidal glycoalkaloids in tubers and leaves of *Solanum* species used in potato breeding. *Euphytica* **37S**, 147-158.
- Vázquez A, González G, Ferreira F, Moyna P, Kenne L (1997): Glycoalkaloids of *Solanum commersonii* DUN. ex POIR. *Euphytica* **95**, 195-201.
- Voinilo VA, Ponin IY (1979): Role of glycoalkaloids and phytoalexins in the resistance of potatoes to nematodes. *Seryya Biyalagichnykh Navuk* **4**, 73-75.
- Volkov RA, Komarova NY, Panchuk II, Hemleben V (2003): Molecular evolution of rDNA external transcribed spacer and phylogeny of sect. Petota (genus *Solanum*). *Mol. Phylogenet. Evol.* **29**, 187-202.
- Waalkens-Berendsen DH, Smits-van Prooije AE, Koeter HBWM, Leeman WR, Dijkstra A (1992): Potential teratogenic effects of some glycoalkaloids. *Teratol.* **46**, 31A.
- Wang S, Panter KE, Gaffield W, Evans RC, Bunch TD (2005): Effects of steroidal glycoalkaloids from potatoes (*Solanum tuberosum*) on in vitro bovine embryo development. *Anim. Reprod. Sci.* **85**, 243-250.
- Weissenberg M (2001): Isolation of solasodine and other steroidal alkaloids and sapogenins by direct hydrolysis-extraction of *Solanum* plants or glycosides therefrom. *Phytochem.* **58**, 501-508.
- Wellmitz J, Gluschke M (2005): Leitlinie zur Methodvalidierung. Umweltbundesamt 2005. Internet: <http://www.umweltbundesamt.de>

- Willuhn G, May S, Merfort I (1982): Triterpene und Steroide im Samen von *Solanum dulcamara*. *Planta Med.* **46**, 99-104.
- Wink M (1988): Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theor. Appl. Genet.* **75**, 225-233.
- Wink M. (2003a), Alkaloids: Toxicology. In: L. Trugo, P. M. Finglas (Hrsg.): Encyclopedia of food science and nutrition. Academic Press, 132-143.
- Wink M (2003b): Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochem.* **64**, 3-19.
- Wink (2005): Wie funktionieren Phytopharmaka? *Zeitschrift für Phytotherapie* **26**, 262-270.
- Woldemichael GM, Wink M (2001): Identification and biological activity of triterpenoid saponins from *Chenopodium quinoa*. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 2327-2332.
- Wolters B (1964): Relations between structure and antibiotic activity of certain steroid alkaloids. *Arch. Pharm.* **297**, 748-754.
- Wood FA, Young DA (1974): Total glycoalkaloids in potatoes. *Agric. Can. Publ.* **1533**, 1-2.
- Wrolstad RE, Rodriguez-Saona LE (2001): Natural colorant from potato extract. US Patent No. 6.180.154. Oregon, USA
- Wszelaki AL, Delwiche JF, Walker SD, Liggett RE, Scheerens JC, Kleinhenz MD (2005): Sensory quality and mineral and glycoalkaloid concentrations in organically and conventionally grown redskin potatoes (*Solanum tuberosum*). *J. Sci. Food Agric.* **85**, 720-726.
- Wu MT, Salunke DK (1976): Changes in glycoalkaloid content following mechanical injuries to potato tubers. *J. Am. Soc. Horti. Sci.* **101**, 329-331.
- Yencho GC, Kowlaski SP, Kennedy GG, Sanford LL (2000): Segregation of leptine glycoalkaloids and resistance to Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) in F2 *Solanum tuberosum* (4x) x *S. chacoense* (4x) potato progenies. *Am. J. Potato Res.* **77**, 167-178.

- Yritia M, Parra P, Fernández JM, Barbanoj JM 1999: Piroxicam quantitation in human plasma by high-performance liquid chromatography with on- and off-line solid-phase extraction. *J. Chrom. A* **846**, 199-205.
- ZADI (2000): Zentralstelle für Agrardokumentation und -information. Internet: [www.gengres\eva\kartoffel.htm](http://www.gengres\eva\kartoffel.htm).
- Zarzecka K, Gugala M (2003): The effect of herbicide applications on the content of ascorbic acid and glycoalkaloids in potato tubers. *Plant Soil. Environ.* **49**, 237-240.
- Zhao J, Camire ME, Bushway RJ, Bushway AA (1994): Glycoalkaloid content and in vitro glycoalkaloid solubility of extruded potato peels. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 2570-2573.
- Zitnak A, Johnston GR (1970): Glycoalkaloid content of B5141-6 potatoes. *Am. Potato. J.* **47**, 256-260.
- ZMP (2005): Agrarmärkte in Zahlen 2004. Zentrale Markt- und Preisberichtsstelle für Erzeugnisse der Land-, Forst- und Ernährungswirtschaft GmbH. Internet: [www.zmp.de](http://www.zmp.de).
- Zrůst J (2004): Glykoalkaloidy u brambor a ostatnich komodit. VVF: PROJ/2003/19/deklas. Internet: [www.Phytosanitary.org](http://www.Phytosanitary.org)
- Zywicki B, Catchpole G, Draper J, Fiehn O (2005): Comparison of rapid liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry methods for determination of glycoalkaloids in transgenic field-grown potatoes. *Anal. Biochem.* **336**, 178-186.

**Anhang A**

**Trivialnamen**

**und**

**systematische Nomenklatur**

**der Glykoalkaloide**

**Tab. A.1** Übersicht über die Trivialnamen und systematische Nomenklatur der in dieser Arbeit behandelten GAe.

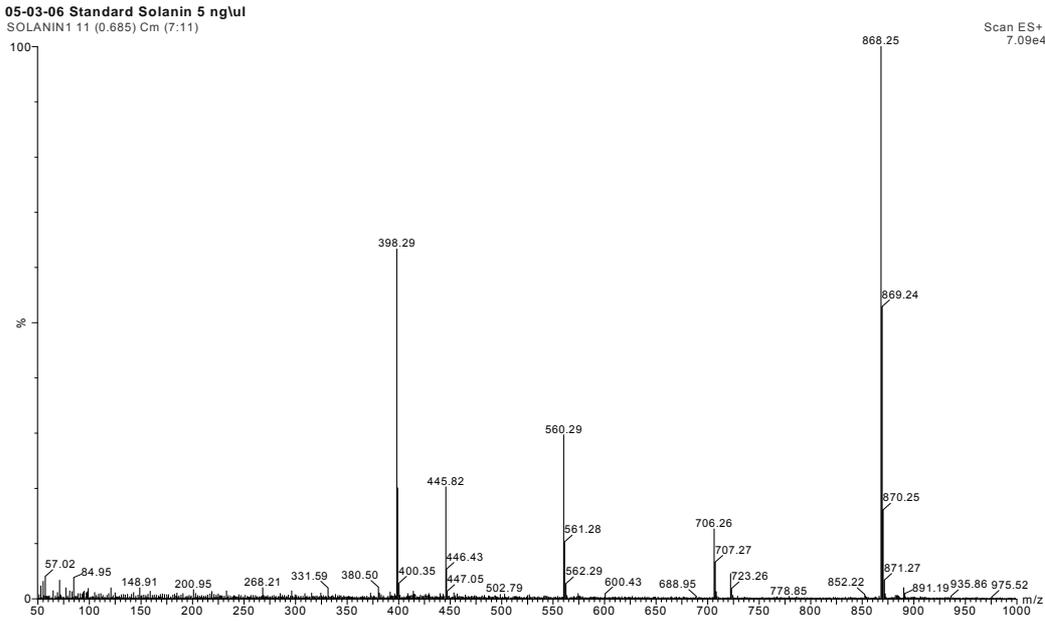
<b>Trivialname</b>	<b>Systematische Nomenklatur</b>	<b>CAS-Nummer</b>
$\alpha$ -Chaconin	$\beta$ -D-Glucopyranosid, (3 $\beta$ )-solanid-5-en-3-yl O-6-deoxy- $\alpha$ -L-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O-[6-deoxy- $\alpha$ -L-mannopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4)]-(9CI)	20562-03-2
Commersonin	$\beta$ -D-Galaktopyranosid, (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ )-solanidan-3-yl O- $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)-O-[( $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3))-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]-(9CI)	60776-42-3
Dehydrocommersonin	$\beta$ -D-Galaktopyranosid, (3 $\beta$ )-solanid-5-en-3-yl O- $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)-O-[( $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3))-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]-(9CI)	65248-74-2
Dehydrotomatin	$\beta$ -D-Galaktopyranosid, (3 $\beta$ , 22 $\beta$ , 25S)-spirosol-5-en-3-yl O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]-(9CI)	57604-98-3
Dehydrodemissin	$\beta$ -D-Galaktopyranosid, (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ )-solanid-5-en-3-yl O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]-(9CI)	195433-57-9
Demissin	$\beta$ -D-Galaktopyranosid, (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ )-solanidan-3-yl O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]-(9CI)	6077-69-6
Leptin I	$\beta$ -D-Galaktopyranosid, (3 $\beta$ ,23 $\beta$ )-23-(acetyloxi)solanid-5-en-3-yl O-6-deoxy- $\alpha$ -L-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- O-[6-deoxy- $\alpha$ -L-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]-(9CI)	101030-83-5
Leptin II	$\beta$ -D-Galaktopyranosid, (3 $\beta$ ,23 $\beta$ )-23-(acetyloxi)solanid-5-en-3-yl O-6-deoxy- $\alpha$ -L-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-(9CI)	101054-39-1
Leptinin I	$\beta$ -D-Galaktopyranosid, (3 $\beta$ ,23 $\beta$ )-23-hydroxysolanid-5-en-3-yl O-6-deoxy- $\alpha$ -L-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O-[6-deoxy- $\alpha$ -L-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]-(9CI)	101009-59-0
Leptinin II	$\beta$ -D-Galaktopyranosid, (3 $\beta$ ,23 $\beta$ )-23-hydroxysolanid-5-en-3-yl - O-6-deoxy- $\alpha$ -L-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-(9CI)	100994-57-8

Solamargin	$\beta$ -D-Glucopyranosid, (3 $\beta$ , 22 $\alpha$ , 25R)-spirosol-5-en-3-yl O-6-deoxy- $\alpha$ -L-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O-[6-deoxy- $\alpha$ -L-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]-(9CI)	20311-57-7
$\alpha$ -Solamarin	$\beta$ -D-Glucopyranosid, (3 $\beta$ , 22 $\beta$ , 25S)-spirosol-5-en-3-yl O-6-deoxy- $\alpha$ -L-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-(9CI)	20318-30-3
$\beta$ -Solamarin	$\beta$ -D-Glucopyranosid, (3 $\beta$ , 22 $\beta$ , 25S)-spirosol-5-en-3-yl O-6-deoxy- $\alpha$ -L-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O-[6-deoxy- $\alpha$ -L-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]-(9CI)	3671-38-3
$\alpha$ -Solamin	$\beta$ -D-Galactopyranosid, (3 $\beta$ )-solanid-5-en-3-yl O-6-deoxy- $\alpha$ -L-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-(9CI)	20562-02-1
Solasonin	$\beta$ -D-Glucopyranosid, (3 $\beta$ , 22 $\alpha$ , 25R)-spirosol-5-en-3-yl O-6-deoxy- $\alpha$ -L-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-(9CI)	19121-58-5
$\alpha$ -Tomatin	$\beta$ -D-Galaktopyranosid, (3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 22 $\beta$ , 25S)-spirosolan-3-yl O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- O-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-(9CI)	17406-45-0

# **Anhang B**

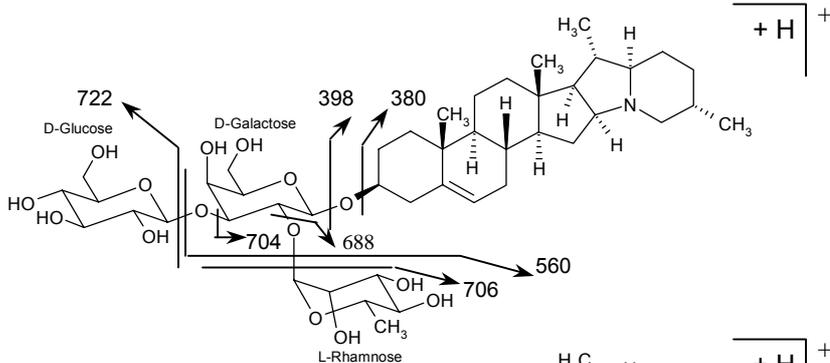
## **Strukturformeln, Hauptfragmente und Fragmentierungsschemata der Glykoalkaloide**

1.)  $\alpha$ -Chaconin /  $\alpha$ -Solanin ( $m/z$  852 / 868)



Substanz	Aglycon	[M+H] <sup>+</sup>	Fragmentionen [m/z]
$\alpha$ -Solanin	Solanidin	868	722
$\alpha$ - Chaconin		852	706 688 560 398 380

a.)  $\alpha$ -Solanin



b.)  $\alpha$ -Chaconin

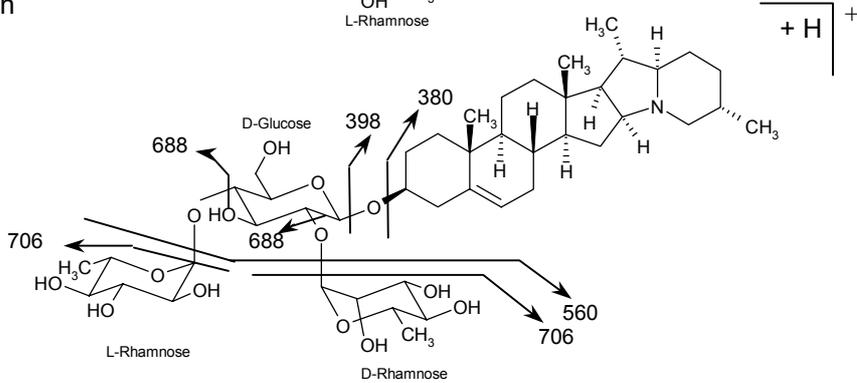
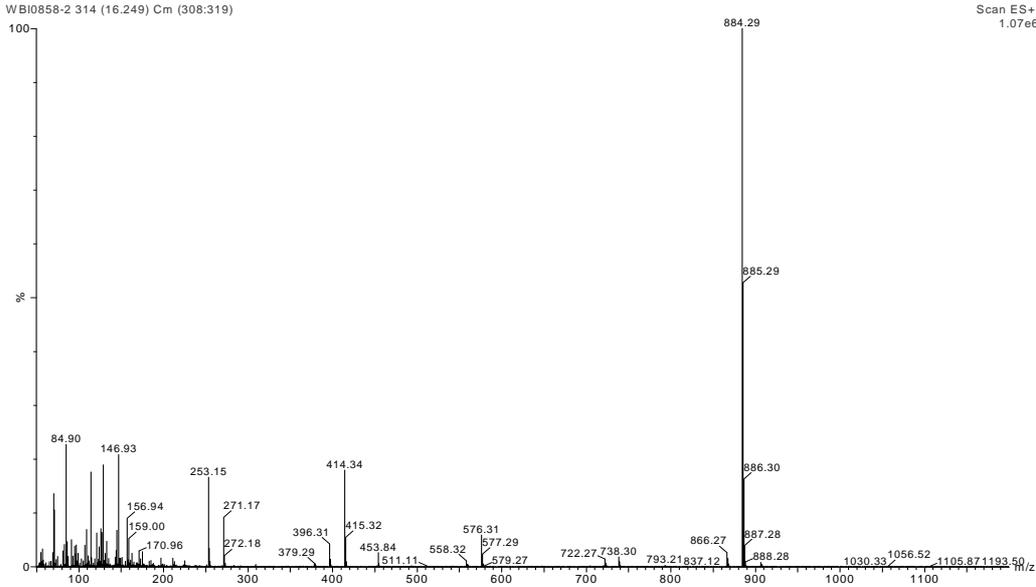


Abb. B.1 Strukturformel, Massenspektrum, Hauptfragmente und Fragmentierungsschema von: a.)  $\alpha$ -Solanin und b.)  $\alpha$ -Chaconin.

2.) Solamargin / Solasonin (m/z 868 / 884)



Substanz	Aglycon	[M+H] <sup>+</sup>	Fragmentionen [m/z]
Solasonin	Solasodin	884	738 720
Solamargin		868	722 704 576 414 396

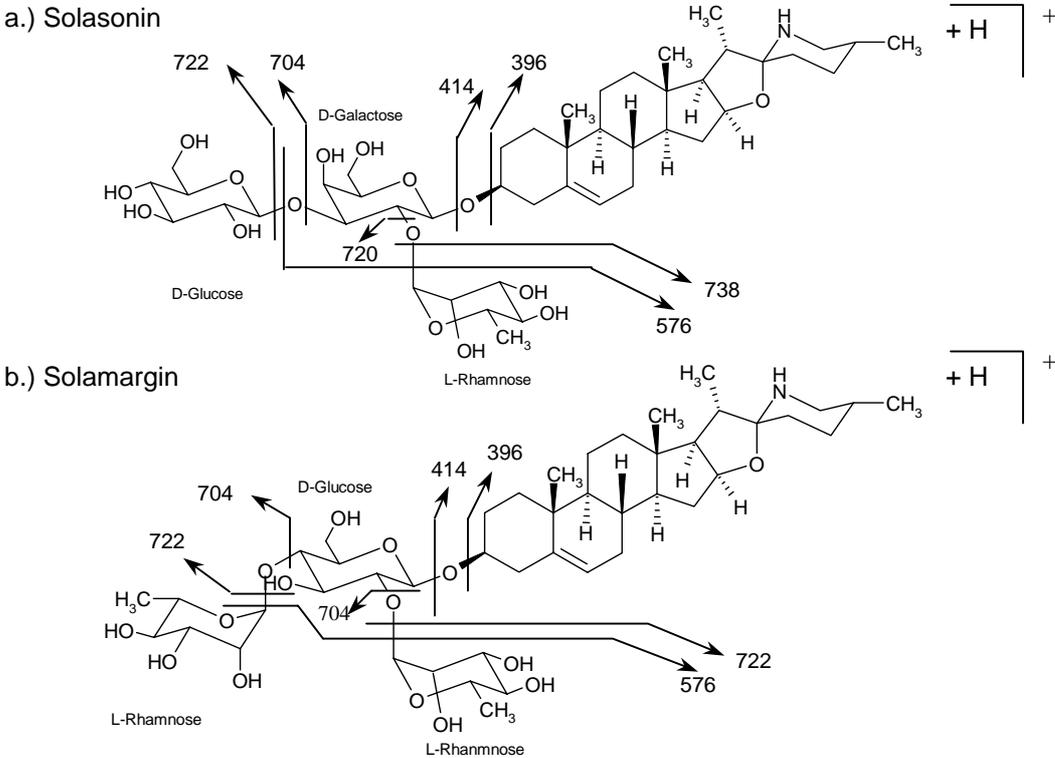
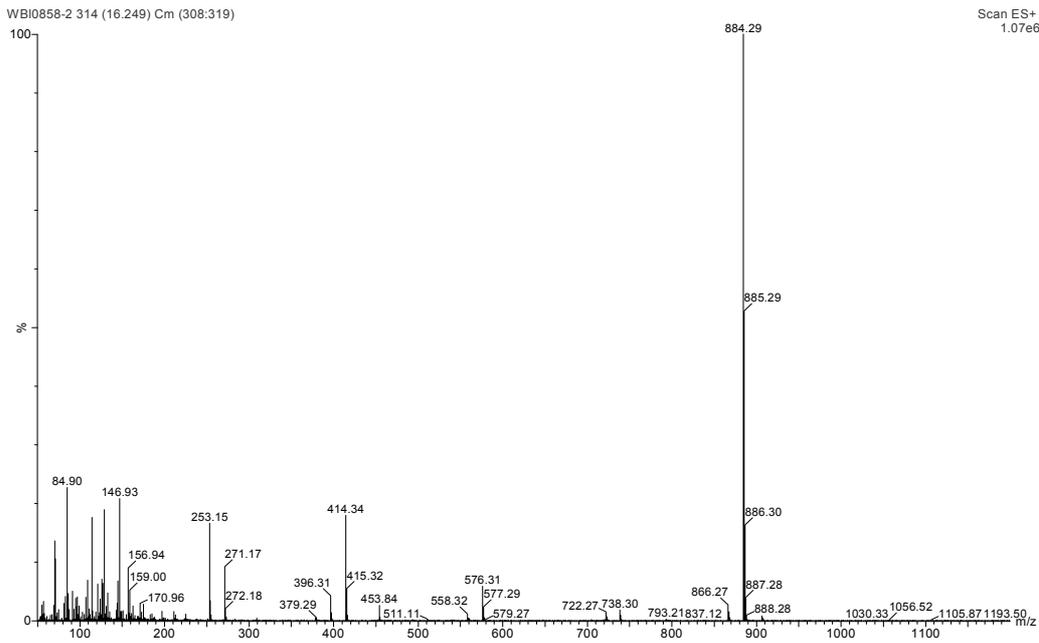


Abb. B.2 Strukturformel, Massenspektrum, Hauptfragmente und Fragmentierungsschema von: a.) Solasonin und b.) Solamargin.

3.)  $\alpha$ -Solamarin /  $\beta$ -Solamarin ( $m/z$  868 / 884)



Substanz	Aglycon	[M+H] <sup>+</sup>	Fragmentionen [ $m/z$ ]
$\alpha$ -Solamarin	Tomatidenol	884	738
$\beta$ -Solamarin	Tomatidenol	868	720
			722
			704
			576
			414
			396

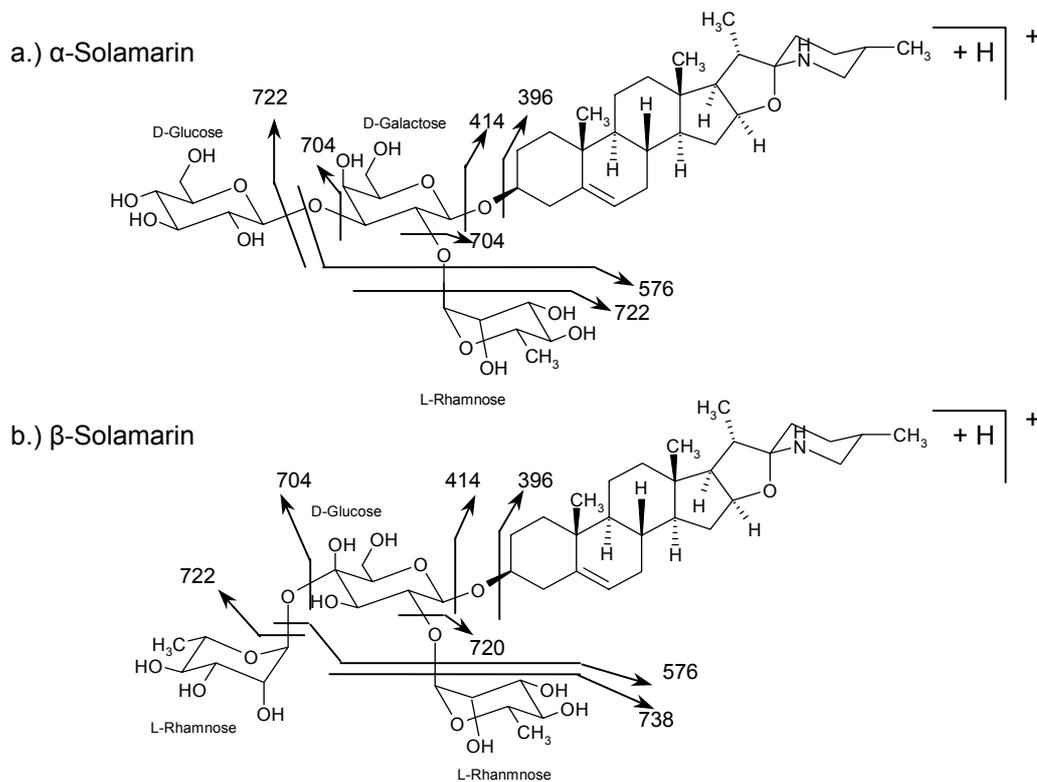
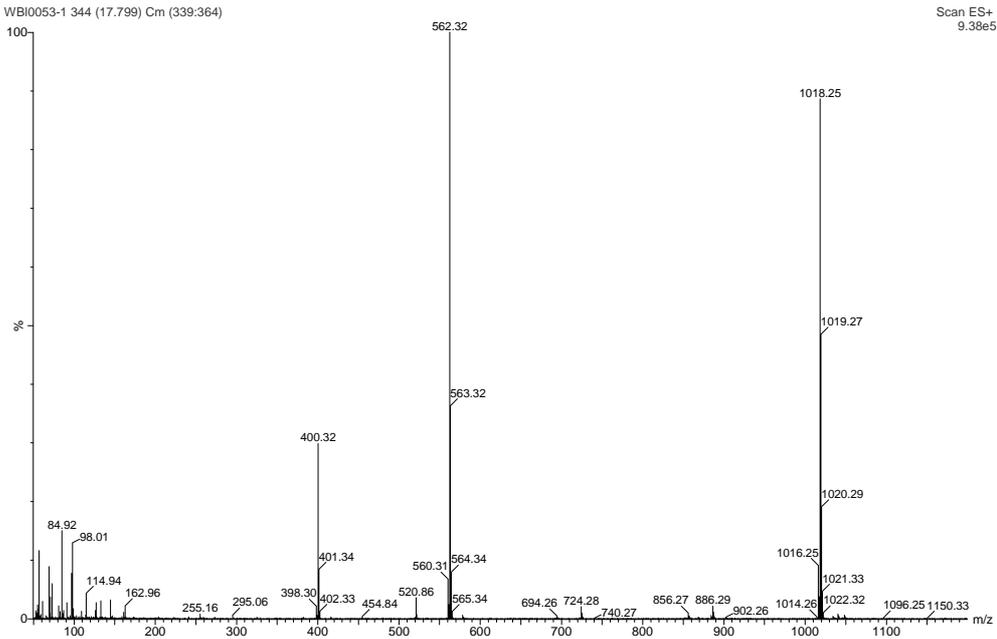


Abb. B.3 Strukturformel, Massenspektrum, Hauptfragmente und Fragmentierungsschema von: a.)  $\alpha$ -Solamarin und b.)  $\beta$ -Solamarin.

4.) Demissin / Dehydrodemissin (*m/z* 1018 / 1016)



Substanz	Aglycon	[M+H] <sup>+</sup>	Fragmentationen [ <i>m/z</i> ]
Demissin	Demissidin	1018	886 / 884
Dehydrodemissin			856 / 854
		1016	724 / 722
			562 / 560
			546 / 544
			400 / 398
			382 / 380

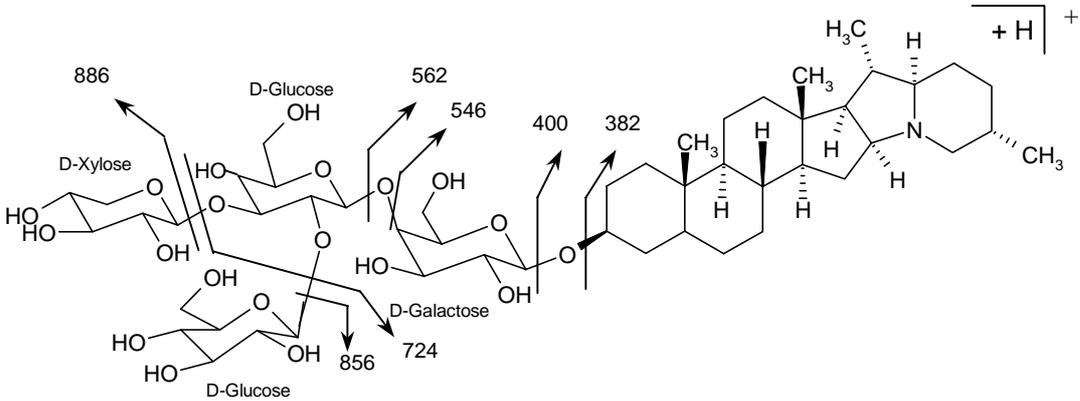
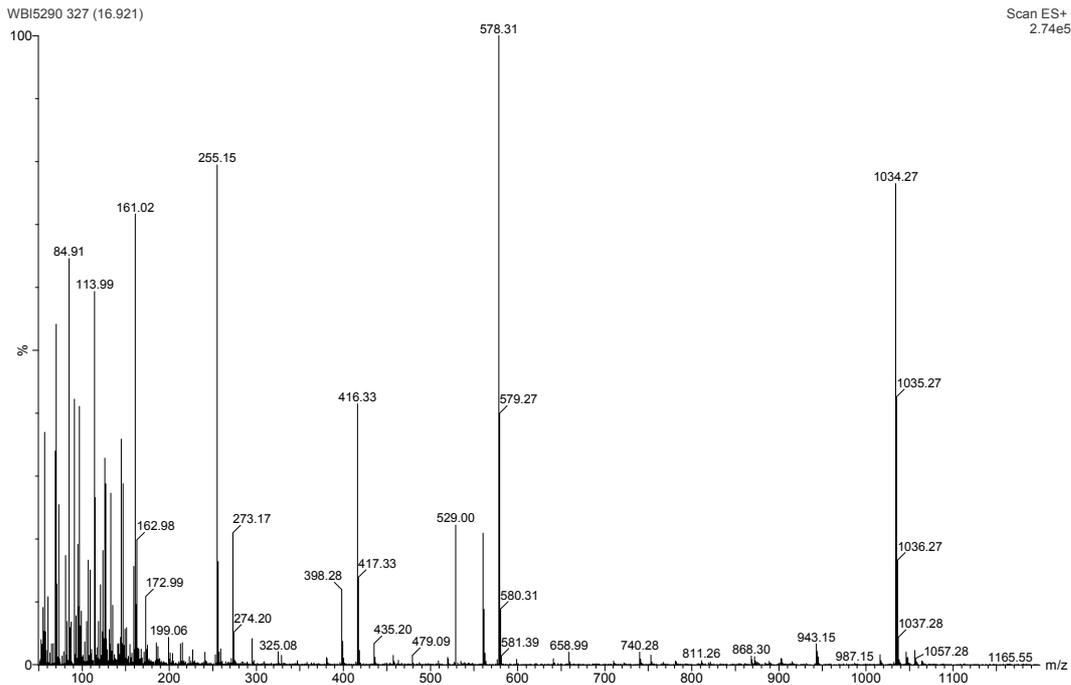
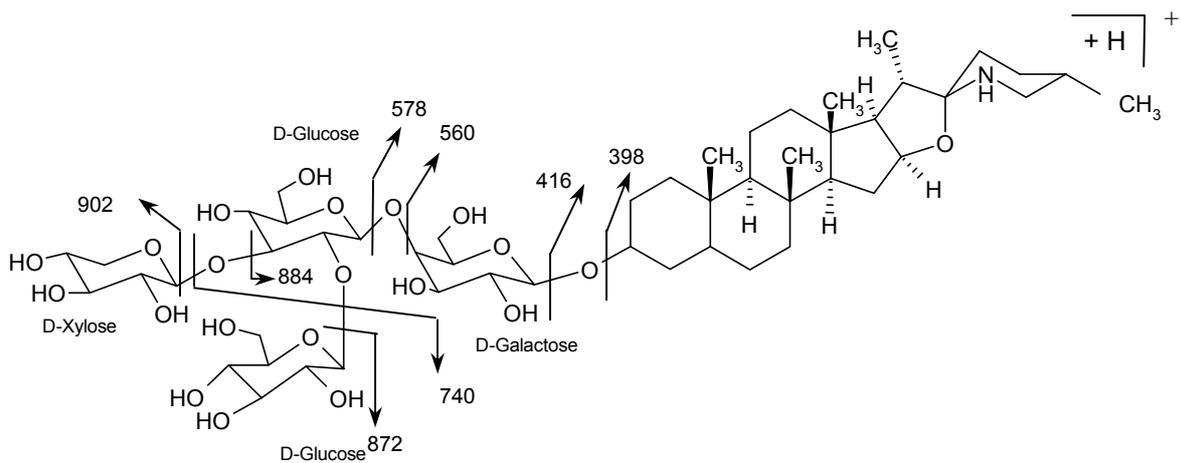


Abb. B.4 Strukturformel, Massenspektrum, Hauptfragmente und Fragmentierungsschema von Demissin und Dehydrodemissin.

5.)  $\alpha$ -Tomatine / Dehydrotomatine ( $m/z$  1034 / 1032)

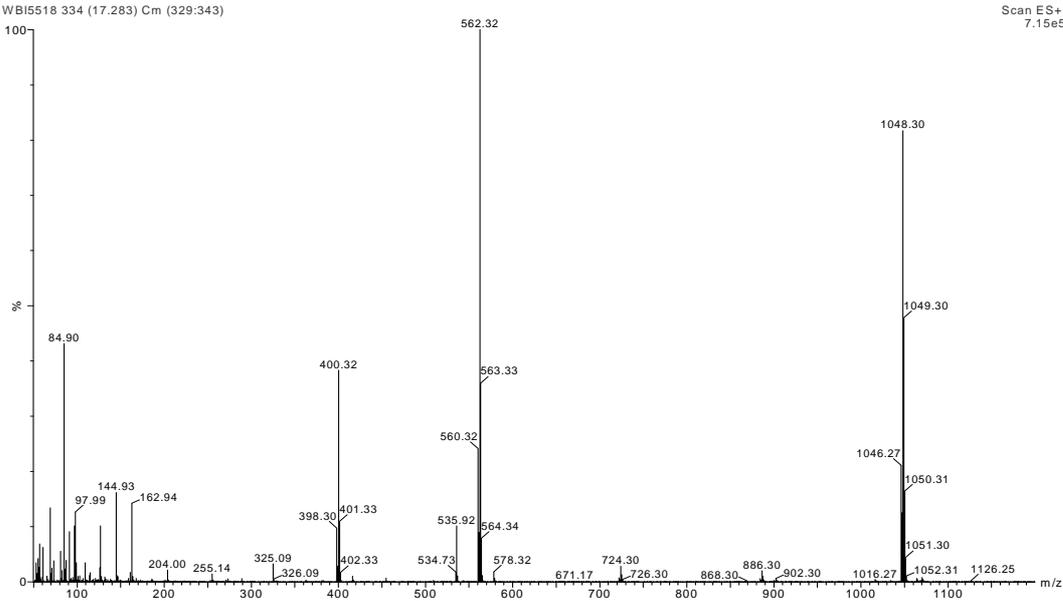


Substanz	Aglycon	[M+H] <sup>+</sup>	Fragmentionen [ $m/z$ ]
$\alpha$ -Tomatin	Tomatidin	1034	1016 / 1014 902 / 900
Dehydrotomatin		1032	884 / 882 872 / 870 854 / 852 740 / 738 578 / 576 560 / 558 416 / 414 398 / 396



**Abb. B.5** Strukturformel, Massenspektrum, Hauptfragmente und Fragmentierungsschema von:  $\alpha$ -Tomatin und Dehydrotomatin.

6.) Commersonin / Dehydrocommersonin (*m/z* 1048 / 1046)



Substanz	Aglycon	[M+H] <sup>+</sup>	Fragmentionen [ <i>m/z</i> ]
Commersonin	Demissidin	1048	886 / 884 868 / 866
Dehydrocommersonin		1046	724 / 722 562 / 560 544 / 542 400 / 398 380 / 378

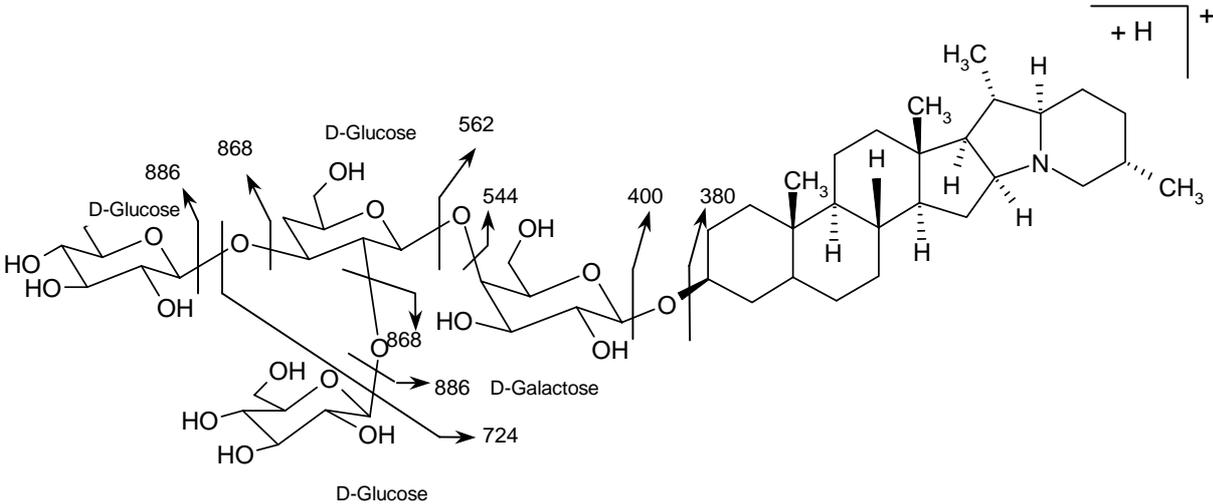
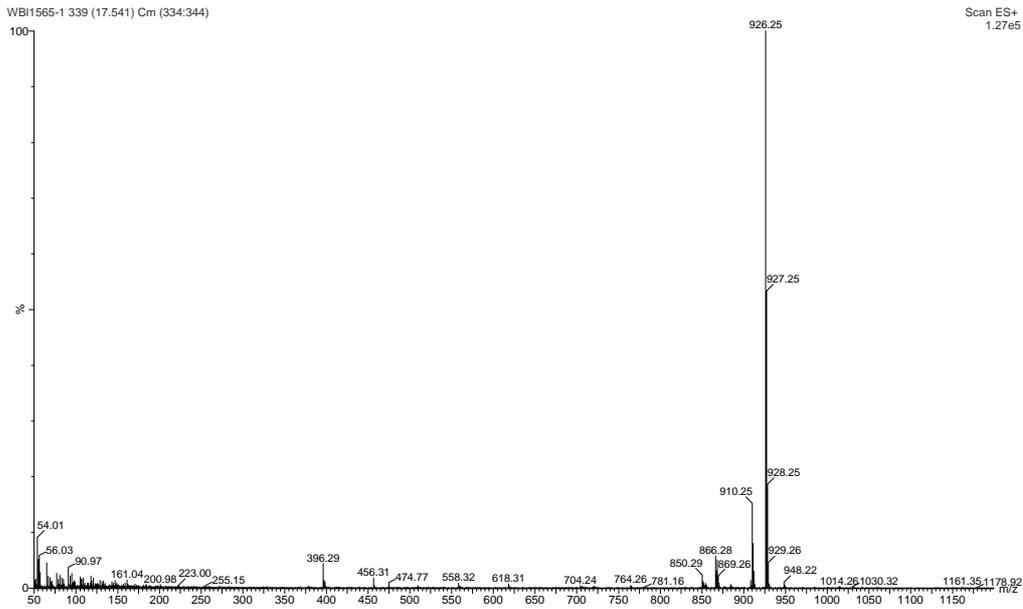


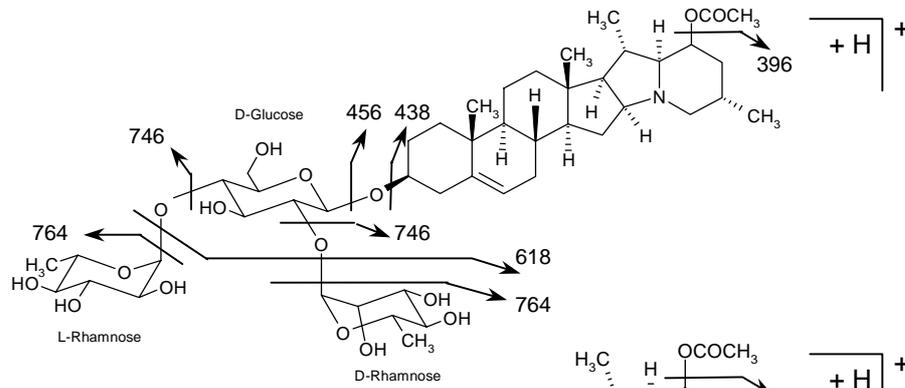
Abb. B.6 Strukturformel, Massenspektrum, Hauptfragmente und Fragmentierungsschema von Commersonin und Dehydrocommersonin.

7.) Leptin II / Leptin I ( $m/z$  910 / 926)



Substanz	Aglycon	[M+H] <sup>+</sup>	Fragmentionen [ $m/z$ ]
Leptin II	Acetyl-leptidin	926	780
Leptin I			764
			746
			618
			456
			438
			396

a.) Leptin I



b.) Leptin II

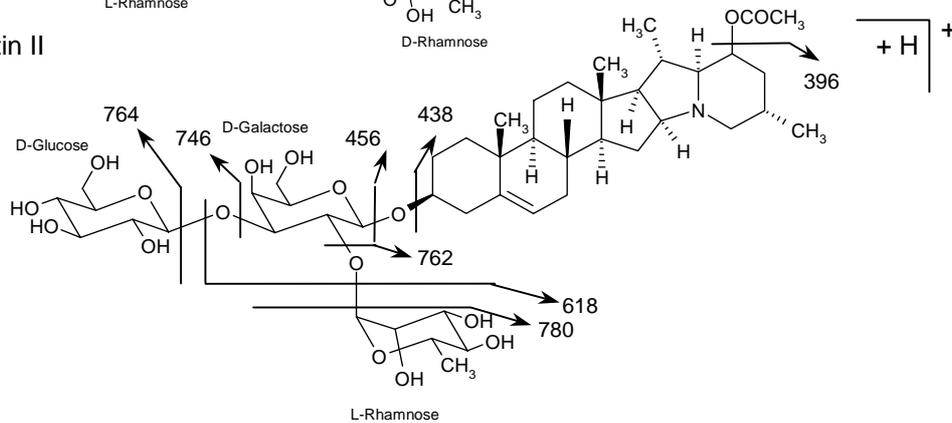


Abb. B.7 Strukturformel, Massenspektrum, Hauptfragmente und Fragmentierungsschema von: a.) Leptin I und b.) Leptin II.

**Anhang C**

**Standardarbeitsanweisungen**

**(SOPs)**

**der entwickelten Nachweisverfahren**

**für Glykoalkaloide**

<b>SOP-1</b>	<b>Standardarbeitsanweisung</b>
Seite 1 von 5	Extraktion und Aufreinigung von Glykoalkaloiden aus Kartoffeln und Verarbeitungsprodukten aus Kartoffeln

<b>SOP-1</b>	<b>Standardarbeitsanweisung</b>
Seite 2 von 5	Extraktion und Aufreinigung von Glykoalkaloiden aus Kartoffeln und Verarbeitungsprodukten aus Kartoffeln

Exemplar – Nummer:

Arbeitsexemplar – unterliegt dem Änderungsdienst

Informationsexemplar – unterliegt nicht dem Änderungsdienst

Inhalt	Seite
1 Zweck	2
2 Geltungsbereich	2
3 Begriffe/Abkürzungen	2
4 Chemikalien	2
4.1 Extraktion	2
4.2 SPE-Aufreinigung	2
5 Geräte	3
5.1 Extraktion	3
5.2 SPE-Aufreinigung	3
6 Herstellung der Lösungen	3
6.1 Extraktion	3
6.2 SPE-Aufreinigung	3
7 Beschreibung	4
7.1 Trocknung des Pflanzenmaterials und der Verarbeitungsprodukte	4
7.2 Homogenisierung	4
7.3 Extraktion	4
7.4 SPE-Aufreinigung	5
8 Weiterführende Unterlagen	5

SOP-1	erstellt:	geprüft:	freigegeben:
Bereich			
Name			
Datum			
Unterschrift			

**1 Zweck**

Diese SOP regelt die Vorgehensweise bei der Extraktion und Aufreinigung der GAe  $\alpha$ -Solamin und  $\alpha$ -Chaconin. Sie dient der Vorbereitung des Probenmaterials für die anschließende Quantifizierung der GAe.

**2 Geltungsbereich**

Dieses Verfahren ist anwendbar für die Extraktion und Aufreinigung der GAe  $\alpha$ -Solamin und  $\alpha$ -Chaconin aus Kartoffeln und Verarbeitungsprodukten aus Kartoffeln für die Quantifizierungsverfahren mittels:

- HPLC
- LC-MS
- Kolorimetrischem Assay
- Hämolyse-Assay

**3 Begriffe / Abkürzungen**

- GA Glykoalkaloid
- HPLC Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (High performance liquid chromatography)
- LC-MS Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie
- MeOH Methanol
- SOP Standardarbeitsanweisung (Standard Operation Procedure)
- SPE Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction)

**4 Chemikalien**

- 4.1 Extraktion
  - Eisessig (99,8%)
  - n-Pentan
- 4.1 SPE-Aufreinigung
  - NaHCO<sub>3</sub>

<b>SOP-1</b>	<b>Standardarbeitsanweisung</b>
Seite 3 von 5	Extraktion und Aufreinigung von Glykoalkaloiden aus Kartoffeln und Verarbeitungsprodukten aus Kartoffeln

<b>SOP-1</b>	<b>Standardarbeitsanweisung</b>
Seite 4 von 5	Extraktion und Aufreinigung von Glykoalkaloiden aus Kartoffeln und Verarbeitungsprodukten aus Kartoffeln

## 5 Geräte

### 5.1 Extraktion

Ultraschallgerät

Zentrifuge: mit Schwingrotor, mindestens 4000 Upm

Reaktionsgefäße: Polypropylen-Tubes (50 ml)

Membranfilter: Spritzensterilfilter (45 µm)

Einalmspritzen: 5 ml

### 5.2 SPE-Aufreinigung

Reaktionsgefäße: Polypropylen-Tubes (2 ml)

SPE-Vakuumblock: Visiprep™ Vacuum Manifold, Supelco, Bellefonte, USA

SPE-Kartuschen: Supelclean™ ENV™-18, 100 mg, 1 ml, Supelco, Bellefonte, USA

Einnalminjektions-

kanülen: 8 x 40 mm

Vakuumpenzentrifuge

## 6 Herstellung der Lösungen

### 6.1 Extraktion

**Extraktionsmittel Variante A: 1% Essigsäure**

Zu 10 ml 99,8%iger Essigsäure werden 990 ml A. bidest. zugesetzt.

**Extraktionsmittel Variante B: 1% Essigsäure-MeOH (70:30, v/v)**

70 ml 1%ige Essigsäure aus Variante A werden mit 30 ml MeOH vermischt.

### 6.2 SPE-Aufreinigung

**Konditionierungslösung: 1% Essigsäure**

Zu 10 ml 99,8%iger Essigsäure werden 990 ml A. bidest. zugesetzt.

**Waschlösung 1: 0,05 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8,4)**

420 mg Natriumhydrogencarbonat werden in 100 ml A. bidest gelöst.

**Waschlösung 2 : MeOH-NaHCO<sub>3</sub> (60:40, v/v)**

60 ml MeOH werden mit 40 ml Waschlösung 1 gemischt.

**Elutionsmittel: MeOH-1% Essigsäure (90:10, v/v)**

90 ml MeOH wurden mit 10 ml 1% Essigsäure vermischt.

## 7 Beschreibung

### 7.1 Trocknung des Pflanzenmaterials und der Verarbeitungserzeugnisse

Wasserhaltiges Frischmaterial wird zunächst bei -20 °C im Gefrierschrank eingefroren. Zur Entfernung des Wassers wird die Probe 48 h an einer Gefriertrocknungsanlage im Ölpumpenvakuum gefriergetrocknet. Trockene Pulverproben können direkt eingesetzt werden.

### 7.2 Homogenisierung

Um eine quantitative Extraktion sicherzustellen wird das Gewebe homogenisiert. Hierzu wird ein handelsüblicher Mörser und Pistill verwendet.

### 7.3 Extraktion

**Variante A: für Pflanzenmaterial**

Es werden für Kartoffelfleisch 4,0 g

Gesamtknolle 3,0 g

Kartoffelschale 0,5 g

des trockenen Pflanzenmaterials in 50 ml Polypropylen-Tubes eingewogen und zweimal mit je 20 ml 1% Essigsäure unter zu Hilfenahme von 1 min Ultraschall extrahiert. Die erste Extraktion erfolgt über Nacht (> 12 h), die zweite 30 min jeweils auf einer Schüttelmaschine. Nach Abzentrifugieren der festen Bestandteile (8 min, 4000 Upm) und Vereinigung der Überstände, erfolgt die Aufreinigung eines definierten Extraktvolumens über Festphasenextraktion (weiter Abschnitt 7.4).

**Variante B: für Verarbeitungserzeugnisse**

Es werden für Kartoffelviertel 3,0 g

Sonstige Kartoffelprodukte 5,0 g

des trockenen Probenmaterials in 50 ml Polypropylen-Tubes eingewogen und zweimal mit je 20 ml 1% Essigsäure-MeOH (70:30, v/v) unter zu Hilfenahme von 1 min Ultraschall extrahiert. Die erste Extraktion erfolgt über Nacht (> 12 h), die zweite 30 min jeweils auf einer Schüttelmaschine. Nach Abzentrifugieren der festen Bestandteile (8 min, 4000 Upm) wird bei stark fetthaltigen Proben eine Entfettung des Extrakts mit n-Pentan durchgeführt. Nach Abnehmen der n-Pentanlösung, wird ein Aliquot der verbleibenden Lösung über sterile Spritzenfilter filtriert. Von diesem Filtrat wird eine definierte Menge über SPE aufgereinigt (weiter Abschnitt 7.4).

<b>SOP-1</b> Seite 5 von 5	<b>Standardarbeitsanweisung</b> Extraktion und Aufreinigung von Glykoalkaloiden aus Kartoffeln und Verarbeitungsprodukten aus Kartoffeln
-------------------------------	---

#### 7.4 SPE-Aufreinigung

Vom vereinigten Überstand aus Abschnitt 7.3 werden folgende Volumina über Supelclean™ ENVITM-18-Kartuschen (100 mg, 1 ml) aufgereinigt:

Kartoffelfleisch	8 ml
Gesamtknolle	6 ml
Kartoffelschale	5 ml
Kartoffelviertel	6 ml
Sonstige Kartoffelprodukte	12 ml

Hierzu diene folgendes Aufreinigungsprotokoll:

Konditionierung:	2 ml MeOH
	2 ml 1% Essigsäure
Probenbeladung:	5-12 ml Extrakt
Washschritte:	2 ml 0,05 M NaHCO <sub>3</sub> (pH 8,4)
	2 ml MeOH-0,05 M NaHCO <sub>3</sub> (60:40, v/v)
	1 ml A. bidest
Elution:	2 ml MeOH-1% Essigsäure (90:10, v/v)

Die Elution der GAe erfolgt in 2 ml Polypropylen-Tubes. Durch Vakuumzentrifugation (5 h) wird das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand je nach verwendetem Quantifizierungsverfahren weiterbehandelt.

#### 8 Weiterführende Unterlagen

- SOP-2: Bestimmung des Glykoalkaloidgehaltes mittels HPLC
- SOP-3: Bestimmung des Glykoalkaloidgehaltes mittels LC-MS
- SOP-4: Bestimmung des Gesamtalkaloidgehaltes durch Kolorimetrie
- SOP-5: Bestimmung des Gesamtalkaloidgehaltes mittels Hämolyse-Assay

<b>SOP-2</b> Seite 1 von 6	<b>Standardarbeitsanweisung</b> Bestimmung des $\alpha$ -Solanin und $\alpha$ -Chaconin-Gehaltes mittels HPLC
-------------------------------	--

Exemplar – Nummer:

Arbeitsexemplar – unterliegt dem Änderungsdienst

Informationsexemplar – unterliegt nicht dem Änderungsdienst

Inhalt

1	Zweck	2
2	Geltungsbereich	2
3	Begriffe/Abkürzungen	2
4	Messprinzip	2
5	Chemikalien	3
5.1	Standardsubstanzen	3
5.2	Mobile Phase	3
6	Geräte	3
7	HPLC-Bedingungen	3
8	Herstellung der Lösungen	4
8.1	Standardlösungen	4
8.2	Eluent A	4
8.3	Arbeitsproben	4
9	Beschreibung	5
9.1	Kalibrierung des HPLC-Systems	5
9.2	Durchführung der HPLC-Analyse	5
9.3	Identifikation der GAe	5
9.4	Quantifizierung der GAe	5
10	Mitgeltende Unterlagen	6

SOP-2	erstellt:	geprüft:	freigegeben:
Bereich			
Name			
Datum			
Unterschrift			

<b>SOP-2</b> Seite 2 von 6	<b>Standardarbeitsanweisung</b> Bestimmung des $\alpha$ -Solanin- und $\alpha$ -Chaconin-Gehaltes mittels HPLC
-------------------------------	---

## 1 Zweck

Diese SOP regelt die Vorgehensweise zur Quantifizierung der GAe  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin mittels HPLC und UV-Detektion.

## 2 Geltungsbereich

Dieses Verfahren ist anwendbar für die HPLC-Quantifizierung der GAe  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin aus Kartoffeln und Verarbeitungsprodukten aus Kartoffeln nach Extraktion und SPE-Aufreinigung gemäß SOP-1.

## 3 Begriffe / Abkürzungen

GA	Glykoalkaloid
HPLC	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (High performance liquid chromatography)
MeOH	Methanol
SOP	Standardarbeitsanweisung (Standard Operation Procedure)
SPE	Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction)
UV	Ultraviolett

## 4 Messprinzip

Die Bestimmung der Analytkonzentrationen in den Arbeitsproben erfolgt nach chromatographischer Auftrennung mittels UV-Detektion. Die gemessene Lichtabsorption der Analyten im Strahlengang einer Flusszelle ist nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz:

$$A = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d$$

$A$  = Absorption  
 $\varepsilon(\lambda)$  = molarer Absorptionskoeffizient [ $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ]  
 $c$  = Konzentration [mol/l]  
 $d$  = Schichtdicke [cm]

proportional zur Analytkonzentration in der Lösung. Aus der graphischen Darstellung des Absorptionssignals in Abhängigkeit von der Zeit, dem HPLC-Chromatogramm, kann die Analytkonzentration, nach Integration der Fläche unter dem Signal ausgedrückt in Flächeneinheiten, mit Hilfe einer Kalibriergeraden quantifiziert werden.

<b>SOP-2</b> Seite 3 von 6	<b>Standardarbeitsanweisung</b> Bestimmung des $\alpha$ -Solanin- und $\alpha$ -Chaconin-Gehaltes mittels HPLC
-------------------------------	---

## 5 Chemikalien

### 5.1 Standardsubstanzen

$\alpha$ -Chaconin (99%)  
 $\alpha$ -Solanin (99%)

### 5.2 Mobile Phase

Acetonitril (HPLC-Qualität)  
Wasser (HPLC-Qualität)  
 $H_3PO_4$  (85%)

## 6 Geräte

HPLC:  
Binäres Pumpensystem  
Diodenarray-Detektor  
Automatischer Probengeber mit 20  $\mu$ l Probenschleife  
Stationäre Phase:  
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland,  
Säule: LiChrospher<sup>®</sup> 100-RP-18 (250 mm x 4 mm),  
Komndurchmesser 5  $\mu$ m,  
Vorsäule: LiChrospher<sup>®</sup> 100-RP-18 (4 mm x 4 mm),  
Komndurchmesser 5  $\mu$ m

HPLC-Vials:  
32 x 11,6 mm

10 ml Messzylinder

## 7 HPLC-Bedingungen

Mobile Phase:  
Eluent A: Wasser (pH 2,5, eingestellt mit 85%  $H_3PO_4$ ),

Eluent B: Acetonitril  
binärer Gradient, Gradientenprogramm siehe Tab. 1

Gradientenprogramm:  
20  $\mu$ l

Injektionsvolumen:  
202 nm, Bandbreite 4 nm

Detektionswellenlänge:

<b>SOP-2</b>	<b>Standardarbeitsanweisung</b>
Seite 4 von 6	Bestimmung des $\alpha$ -Solanin- und $\alpha$ -Chaconin-Gehaltes mittels HPLC

Tab. 1: Gradientenprogramm zur Auftrennung der GAe mittels HPLC auf LiChrospher® RP-18. Eluent A: Wasser (pH 2,5), Eluent B: Acetonitril.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Flussrate [ml/min]	Elutionsprofil
0,0	90	10	1,3	Gradient
10,0	70	30	1,3	Gradient
11,0	40	60	0,9	Isokratisch
19,0	40	60	0,9	Gradient
20,0	0	100	0,9	Isokratisch
22,0	0	100	0,9	Gradient
22,0	90	10	0,9	

## 8 Herstellung der Lösungen

### 8.1 Standardlösungen

Zur Herstellung der Standardlösungen werden jeweils 10 mg  $\alpha$ -Chaconin und  $\alpha$ -Solanin in einen 10 ml Messkolben eingewogen und mit MeOH zur Marke aufgefüllt. Zur Herstellung der Kalibrierungslösungen wird die Stammlösung [1000 ng/ $\mu$ l] mit MeOH auf die Kalibrierkonzentrationen 5, 25, 50, 100, 250, 500 ng/ $\mu$ l verdünnt und in HPLC-Vials gefüllt.

### 8.2 Eluent A: Wasser (pH 2,5)

1 l Wasser (HPLC-Qualität) wird mit 500  $\mu$ l 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> versetzt und anschließend 15 min im Ultraschallbad entgast.

### 8.3 Arbeitsproben

Die trockenen, aufgereinigten Extrakte aus SOP-1 werden in folgenden Volumina MeOH aufgenommen:

Kartoffelfleisch	100 $\mu$ l
Gesamtkartoffel	250 $\mu$ l
Kartoffelschale	250 $\mu$ l
Sonstige Kartoffelprodukte	100 $\mu$ l

Zur Erleichterung des Lösungsvorganges wird 10 sec ultraschallbehandelt. Anschließend wird 1 min bei 4000 Upm zentrifugiert, um feste Bestandteile abzutrennen. Der Überstand wird in HPLC-Vials überführt.

<b>SOP-2</b>	<b>Standardarbeitsanweisung</b>
Seite 5 von 6	Bestimmung des $\alpha$ -Solanin- und $\alpha$ -Chaconin-Gehaltes mittels HPLC

## 9 Beschreibung

### 9.1 Kalibrierung des HPLC-Systems

Die Bestimmung des GA-Gehaltes im Probenmaterial erfolgt auf Basis der Injektion externer Standards und der Aufstellung einer sechs-Punkt-Kalibriergeraden:  $f_{Std}(x) = a \cdot x_{Std} + b$ , wobei für jedes Konzentrationsniveau (5, 25, 50, 100, 500 ng/ $\mu$ l) eine Doppelbestimmung durchzuführen ist und jeweils der Mittelwert in die Berechnung einfließt.

Anhand des Bestimmtheitsmaßes ist zu prüfen, ob eine lineare Abhängigkeit der ermittelten Flächeneinheiten für  $\alpha$ -Chaconin und  $\alpha$ -Solanin von der Konzentration besteht. Bei Abweichung um jeweils mehr als 0,01 ist die Kalibrierung zu wiederholen.

Die Kalibrierung des Systems erfolgt einmal wöchentlich zu Beginn einer Arbeitswoche.

### 9.2 Durchführung der HPLC-Analyse

Die sich in HPLC-Vials befindlichen methanolischen Extrakte aus 8.3 werden in den Probengeber gestellt. Die Analyse erfolgt der Reihe nach, wobei jeweils 20  $\mu$ l automatisch durch den Probengeber in das HPLC-System injiziert werden. Vor und nach jeder Analysenfolge wird ein Standardgemisch aus  $\alpha$ -Chaconin und  $\alpha$ -Solanin (jeweils 25 ng/ $\mu$ l) injiziert und die Retentionszeit bestimmt, um die ordnungsgemäße Arbeitsweise des Systems zu überprüfen.

### 9.3 Identifikation der GAe

Die Identifikation der GAe erfolgt durch Vergleich der Retentionszeiten der Arbeitsprobe mit den Standardsubstanzen:

R <sub>1</sub> $\alpha$ -Solanin:	16,8 min
R <sub>1</sub> $\alpha$ -Chaconin:	17,3 min

<b>SOP-2</b>	<b>Standardarbeitsanweisung</b>
Seite 6 von 6	Bestimmung des $\alpha$ -Solanin- und $\alpha$ -Chaconin-Gehaltes mittels HPLC

#### 9.4 Quantifizierung der GAe

Nach Injektion und Aufstellung der Kalibriergeraden mit der Funktion  $f_{Std}(x) = a \cdot x_{Std} + b$  kann die Konzentration [ng/ $\mu$ l] in den Arbeitsproben nach folgender Gleichung bestimmt werden:

$$(1) \quad \frac{f_{AP}(x) - b}{a} = x_{AP}$$

$x_{AP}$  = Konzentration Arbeitsprobe [ng/ $\mu$ l]  
 $f_{AP}(x)$  = Flächeneinheiten Arbeitsprobe  
 $a$  = Steigung der Kalibriergerade  
 $b$  = Achsenabschnitt der Kalibriergerade

Zur Angabe der Endkonzentration [mg/100 g TG] ist das Ergebnis aus Gleichung (1) unter Berücksichtigung von Einwäge, Kartuschenbeladung und Aufnahmevolumen umzurechnen.

#### 10 Mitgeltende Unterlagen

SOP-1: Extraktion und Aufreinigung von Glykoalkaloiden aus Kartoffeln und Verarbeitungsprodukten aus Kartoffeln

<b>SOP-3</b>	<b>Standardarbeitsanweisung</b>
Seite 1 von 6	Bestimmung des $\alpha$ -Solanin- und $\alpha$ -Chaconin-Gehaltes mittels LC-MS

Exemplar – Nummer:

- Arbeitsexemplar – unterliegt dem Änderungsdienst
- Informationsexemplar – unterliegt nicht dem Änderungsdienst

Inhalt	Seite
1 Zweck	2
2 Geltungsbereich	2
3 Begriffe/Abkürzungen	2
4 Messprinzip	2
5 Chemikalien	3
5.1 Standardsubstanzen	3
5.2 Mobile Phase	3
6 Geräte	3
7 HPLC-Bedingungen	3
8 Herstellung der Lösungen	4
8.1 Standardlösungen	4
8.2 Eluent A	4
8.3 Arbeitsproben	5
9 Beschreibung	5
9.1 Kalibrierung des HPLC-Systems	5
9.2 Durchführung der HPLC-Analyse	5
9.3 Identifikation der GAe	6
9.4 Quantifizierung der GAe	6
10 Mitgeltende Unterlagen	6

SOP-3	erstellt:	geprüft:	freigegeben:
Bereich			
Name			
Datum			
Unterschrift			

<b>SOP-3</b>	<b>Standardarbeitsanweisung</b>
Seite 2 von 6	Bestimmung des $\alpha$ -Solanin- und $\alpha$ -Chaconin-Gehaltes mittels LC-MS

<b>SOP-3</b>	<b>Standardarbeitsanweisung</b>
Seite 3 von 6	Bestimmung des $\alpha$ -Solanin- und $\alpha$ -Chaconin-Gehaltes mittels LC-MS

## 1 Zweck

Diese SOP regelt die Vorgehensweise zur Quantifizierung der GAe  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin mittels LC-MS.

## 2 Geltungsbereich

Dieses Verfahren ist anwendbar für die Quantifizierung der GAe  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin aus Kartoffeln und Kartoffelprodukten mittels LC-MS nach Extraktion und SPE-Aufreinigung gemäß SOP-1.

## 3 Begriffe / Abkürzungen

ESI	Electrospray Ionisation
GA	Glykoalkaloid
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (Liquid chromatography-mass spectrometry)
MeOH	Methanol
$m/z$	Masse/Ladungs-Verhältnis
SIR	Single Ion Recording
SOP	Standardarbeitsanweisung (Standard Operation Procedure)
SPE	Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction)

## 4 Messprinzip

Die Bestimmung der Analytkonzentrationen in den Arbeitsproben erfolgt nach chromatographischer Auftrennung mittels massenspektrometrischem Detektor. Die durch das Electropray-Verfahren in der Ionenquelle erzeugten Ionen werden durch einen Quadrupol-Massenanalysator nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) aufgetrennt, wobei im Single-Ion-Recording-Modus nur die relevanten  $m/z$ -Ionen den Detektor erreichen. Die Anzahl der erzeugten Ionen ist proportional zu deren Konzentration in der Arbeitslösung. Aus der graphischen Darstellung des Ionensignals in Abhängigkeit von der Zeit, dem Ionenchromatogramm, kann die Analytkonzentration nach Integration der Fläche unter dem Signal ausgedrückt in Flächeneinheiten, mit Hilfe einer Kalibriergeraden quantifiziert werden.

## 5 Chemikalien

### 5.1 Standardsubstanzen

$\alpha$ -Chaconin (99%)  
 $\alpha$ -Solanin (99%)

### 5.2 Mobile Phase

Acetonitril (HPLC-Qualität)  
Wasser (HPLC-Qualität)  
Ameisensäure (98%)

## 6 Geräte

LC:  
Binäres Pumpensystem  
Injektionsventil mit 20  $\mu$ l Probenschleife  
Massenspektrometer: Interface: Electrospray-Ionisation (ESI)  
Massenanalysator: Triple-Quadrupol  
Stationäre Phase: Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland,  
Säule: LiChrospher<sup>®</sup> 100-RP-18 (250 mm x 4 mm),  
Korndurchmesser 5  $\mu$ m,  
Vorsäule: LiChrospher<sup>®</sup> 100-RP-18 (4 mm x 4 mm),  
Korndurchmesser 5  $\mu$ m

10 ml Messzylinder

## 7 LC-MS-Bedingungen

Mobile Phase:  
Eluent A: 0,1% Ameisensäure  
Eluent B: 0,1% Ameisensäure in Acetonitril  
Gradientenprogramm: binärer Gradient, Gradientenprogramm siehe Tab. 1  
Injektionsvolumen: 20  $\mu$ l  
Splitverhältnis: 1:10

<b>SOP-3 Standardarbeitsanweisung</b>	
Seite 4 von 6	Bestimmung des $\alpha$ -Solanin- und $\alpha$ -Chaconin-Gehaltes mittels LC-MS

Vereblungsgasdruck: 13 l/h  
Trocknungsgasdruck: 350 l/h  
HV-Lens: 0,5 kV  
Cone Spannung: 90 V  
Quellertemperatur: 120°C  
Quantifizierungsion:  $\alpha$ -Solanin:  $m/z$  868  
 $\alpha$ -Chaconin:  $m/z$  852

Tab. 1 Gradientenprogramm zur Auftrennung der GAE mittels LC-ESI-MS auf LiChrospher<sup>®</sup> RP-18.  
Eluent A: 0,1% Ameisensäure, Eluent B: 0,1% Ameisensäure in Acetonitril.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Flussrate [ml/min]	Elutionsprofil
0,0	90	10	1,0	Isokratisch
0,5	90	10	1,0	Gradient
5,5	40	60	1,0	Isokratisch
10,5	40	60	1,0	Gradient
12,5	0	100	1,0	Isokratisch
13,5	0	100	1,0	Gradient
14,5	90	10	1,0	

## 8 Herstellung der Lösungen

### 8.1 Standardlösungen

Zur Herstellung der Standardlösungen werden jeweils 10 mg  $\alpha$ -Chaconin und  $\alpha$ -Solanin in einen 10 ml Messkolben eingewogen und mit MeOH zur Marke aufgefüllt. Zur Herstellung der Kalibrierungslösungen wird die Stammlösung [1000 ng/ $\mu$ l] mit MeOH auf die Kalibrierkonzentrationen 0,5, 2,5, 5, 10, 25, 50 ng/ $\mu$ l verdünnt und in HPLC-Vials gefüllt.

### 8.2 Eluent A: 0,1% Ameisensäure

1 l Wasser (HPLC-Qualität) wird mit 1 ml Ameisensäure versetzt.

### 8.3 Eluent B: 0,1% Ameisensäure in Acetonitril

1 l Acetonitril (HPLC-Qualität) wird mit 1 ml Ameisensäure versetzt.

<b>SOP-3 Standardarbeitsanweisung</b>	
Seite 5 von 6	Bestimmung des $\alpha$ -Solanin- und $\alpha$ -Chaconin-Gehaltes mittels LC-MS

### 8.3 Arbeitsproben

Die trockenen, aufgereinigten Extrakte aus SOP-1 werden in folgenden Volumina MeOH aufgenommen:

Kartoffelfleisch 1000  $\mu$ l  
Gesamtkartoffel 2500  $\mu$ l  
Kartoffelschale 2500  $\mu$ l  
Sonstige Kartoffelprodukte 1000  $\mu$ l

Zur Erleichterung des Lösungsvorganges wird 10 sec ultraschallbehandelt. Anschließend wird 1 min bei 4000 Upm zentrifugiert, um feste Bestandteile abzutrennen. 20  $\mu$ l des Überstands dienen zur Injektion in das LC-MS-Instrument.

## 9 Beschreibung

### 9.1 Kalibrierung des LC-MS-Systems

Die Bestimmung des GA-Gehaltes im Probenmaterial erfolgt auf Basis der Injektion externer Standards und der Aufstellung einer sechs-Punkt-Kalibriergeraden:  $f_{Std}(x) = a \cdot x_{Std} + b$ , wobei für jedes Konzentrationsniveau (0,5, 2,5, 5, 10, 50 ng/ $\mu$ l) eine Doppelbestimmung durchzuführen ist und jeweils der Mittelwert in die Berechnung einfließt.

Anhand des Bestimmtheitsmaßes ist zu prüfen, ob eine lineare Abhängigkeit der ermittelten Flächeneinheiten für  $\alpha$ -Chaconin und  $\alpha$ -Solanin von der Konzentration besteht. Bei Abweichung um jeweils mehr als 0,01 ist die Kalibrierung zu wiederholen.

Die Kalibrierung des Systems erfolgt einmal wöchentlich zu Beginn einer Arbeitswoche.

### 9.2 Durchführung der LC-MS-Analyse

20  $\mu$ l des methanolischen Extraktes aus 8.4 werden in das System injiziert. Am Anfang und am Ende jeden Arbeitstages wird ein Standardgemisch aus  $\alpha$ -Chaconin und  $\alpha$ -Solanin (jeweils 2,5 ng/ $\mu$ l) injiziert, um die ordnungsgemäße Arbeitsweise des Systems zu überprüfen. Die massenspektrometrische Detektion positiv geladener GAE erfolgt im Single Ion Recording (SIR)-Modus für  $\alpha$ -Solanin bei  $m/z$  868, für  $\alpha$ -Chaconin bei  $m/z$  852.

<b>SOP-3</b>	<b>Standardarbeitsanweisung</b>
Seite 6 von 6	Bestimmung des $\alpha$ -Solanin- und $\alpha$ -Chaconin-Gehaltes mittels LC-MS

<b>SOP-4</b>	<b>Standardarbeitsanweisung</b>
Seite 1 von 8	Bestimmung des $\alpha$ -Solanin und $\alpha$ -Chaconin-Gehaltes mittels XLC-MS

### 9.3 Identifikation der GAe

Die Identifikation der GAe erfolgt durch Vergleich der Retentionszeiten der Arbeitsprobe mit den Standardsubstanzen:

R<sub>t</sub>  $\alpha$ -Solanin: 15,7 min

R<sub>t</sub>  $\alpha$ -Chaconin: 15,9 min

sowie durch Vergleich der für  $\alpha$ -Solanin bei  $m/z$  868 und für  $\alpha$ -Chaconin bei  $m/z$  852 erhaltenen Massenspektren:

	Molekulation	Fragmentationen
$\alpha$ -Solanin	868	722, 706, 560, 398
$\alpha$ -Chaconin	852	706, 560, 398

### 9.4 Quantifizierung der GAe

Die Bestimmung des GA-Gehaltes in den Arbeitsproben erfolgt anhand der Quantifizierungsionen für  $\alpha$ -Solanin  $m/z$  868 und  $\alpha$ -Chaconin  $m/z$  852. Nach Injektion und Aufstellung der Kalibriergeraden mit der Funktion  $f_{S_{GA}}(x) = a \cdot x_{S_{GA}} + b$  kann die Konzentration [ng/ $\mu$ l] in den Arbeitsproben nach folgender Gleichung bestimmt werden:

$$(1) \quad \frac{f_{AP}(x) - b}{a} = x_{AP}$$

$x_{AP}$  = Konzentration Arbeitsprobe [ng/ $\mu$ l]  
 $f_{AP}(x)$  = Flächeneinheiten Arbeitsprobe  
 $a$  = Steigung der Kalibriergerade  
 $b$  = Achsenabschnitt der Kalibriergerade

Zur Angabe der Endkonzentration [mg/100 g TG] ist das Ergebnis aus Gleichung (1) unter Berücksichtigung von Einwaage, Kartuschenbeladung und Aufnahmevolumen umzurechnen.

### 10 Relevante Literatur

Matsuda F, Morino K, Miyazawa H, Miyashita M, Miyagawa H (2004): Determination of potato glycoalkaloids using high-pressure liquid chromatography-electrospray ionisation/mass spectrometry. *Phytochem. Anal.* **15**, 121-124.

Stobiecki M, Matysiak-Mata I, Franski R, Skala J, Szopa J (2003): Monitoring changes in anthocyanin and steroid alkaloid glycoside content in lines of transgenic potato plants using liquid chromatography/mass spectrometry. *Phytochem.* **62**, 959-969.

### 11 Mitgeltende Unterlagen

SOP-1: Extraktion und Aufreinigung von Glykoalkaloiden aus Kartoffeln und Verarbeitungsprodukten aus Kartoffeln

Exemplar – Nummer:

Arbeitsexemplar – unterliegt dem Änderungsdienst

Informationsexemplar – unterliegt nicht dem Änderungsdienst

Inhalt	Seite
1 Zweck	3
2 Geltungsbereich	3
3 Begriffe/Abkürzungen	3
4 Messprinzip	3
5 Chemikalien	4
5.1 Standardsubstanzen	4
5.2 Extraktion	4
5.3 XLC	4
6 Geräte	5
7 XLC-MS-Bedingungen	5
7.1 Autosamplerkonfiguration	5
7.2 SPE	5
7.3 LC	5
7.4 MS	6
8 Herstellung der Lösungen	6
8.1 Standardlösungen	6
8.2 Extraktionsmittel	6
8.3 Konditionierungslösung	6
8.4 Waschlösung	6
8.5 LC-Eluenten	6
8.6 Arbeitsproben	7
9 Beschreibung	7
9.1 Kalibrierung des XLC-Systems	7
9.2 Durchführung der XLC-Analyse	7
9.3 Identifikation der GAe	8
9.4 Quantifizierung der GAe	8
10 Mitgeltende Unterlagen	8

<b>SOP-4</b> Seite 2 von 8	<b>Standardarbeitsanweisung</b> Bestimmung des $\alpha$ -Solanin- und $\alpha$ -Chaconin-Gehaltes mittels XLC-MS
-------------------------------	---

<b>SOP-4</b> Seite 3 von 8	<b>Standardarbeitsanweisung</b> Bestimmung des $\alpha$ -Solanin- und $\alpha$ -Chaconin-Gehaltes mittels XLC-MS
-------------------------------	---

SOP-4	erstellt:	geprüft:	freigegeben:
Bereich			
Name			
Datum			
Unterschrift			

## 1 Zweck

Diese SOP regelt die Vorgehensweise zur Quantifizierung der GAe  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin mittels on-line gekoppelter SPE-LC mit massenspektrometrischer Detektion (XLC-MS).

## 2 Geltungsbereich

Dieses Verfahren ist anwendbar für die Quantifizierung der GAe  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin aus Kartoffeln und Verarbeitungsprodukten aus Kartoffeln.

## 3 Begriffe / Abkürzungen

GA	Glykoalkaloid
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie (High performance liquid chromatography)
LC	Flüssigkeitschromatographie (Liquid chromatography)
MeOH	Methanol
SOP	Standardarbeitsanweisung (Standard Operation Procedure)
SPE	Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction)
XLC	Extraction liquid chromatography

## 4 Messprinzip

Die Bestimmung der Analytkonzentrationen in den Arbeitsproben erfolgt nach on-line gekoppelter SPE-Aufreinigung und chromatographischer Auftrennung mittels massenspektrometrischem Detektor. Die durch das Turbolonspray-Verfahren in der Ionenquelle erzeugten Ionen werden durch einen Quadrupol-Massenanalysator nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) aufgetrennt, wobei im Single-Ion-Recording-Modus nur die relevanten  $m/z$ -Ionen den Detektor erreichen. Die Anzahl der erzeugten Ionen ist proportional zur Konzentration in der Arbeitslösung. Aus der graphischen Darstellung des Ionensignals in Abhängigkeit von der Zeit, dem Ionenchromatogramm, kann die Analytkonzentration nach Integration der Fläche unter dem Signal ausgedrückt in Flächeneinheiten, mit Hilfe einer Kalibriergeraden quantifiziert werden.

<b>SOP-4</b>	<b>Standardarbeitsanweisung</b>
Seite 4 von 8	Bestimmung des $\alpha$ -Solanin- und $\alpha$ -Chaconin-Gehaltes mittels XLC-MS

## 5 Chemikalien

### 5.1 Standardsubstanzen

$\alpha$ -Chaconin (99%)

$\alpha$ -Solanin (99%)

### 5.2 Extraktion

Wasser destilliert

Essigsäure (99,8%)

### 5.3 XLC

Acetonitril (HPLC-Qualität)

Ameisensäure (98%)

Ammoniumhydroxid (25%)

Wasser (HPLC-Qualität)

## 6 Geräte

XLC:

Symbiosis™ Pharma, Spark Holland, Emmen, Niederlande

Binäres Pumpensystem mit Degasser

automatisches Kartuschenaustauschmodul

Hochdruck-Probengeber

Autosampler mit Wellplatten-Halter

Massenspektrometer: Interface: Turboionenspray

Massenanalysator: Triple-Quadrupol

Aufreinigungs-  
kartusche: HySpere C-18HD (10 mm x 1 mm i. D., 20 mg)

Stationäre Phase: Waters, Manchester, Großbritannien,

Säule: Xterra MS C-18 (50 mm x 2 mm i. D.), Korndurchmesser 3  $\mu$ m

HPLC-Vials: 32 x 11,6 mm

10 ml Messzylinder

Spritzenfilter

<b>SOP-4</b>	<b>Standardarbeitsanweisung</b>
Seite 5 von 8	Bestimmung des $\alpha$ -Solanin- und $\alpha$ -Chaconin-Gehaltes mittels XLC-MS

## 7 XLC-MS-Bedingungen

### 7.1 Autosamplerkonfiguration

Injektionsvolumen: 50  $\mu$ l

Reinigungsprotokoll: 700  $\mu$ l ACN-0,1% Ameisensäure (1:1, v/v)

700  $\mu$ l ACN-0,1% Ameisensäure (9:1, v/v)

### 7.2 SPE

Konditionierung: 1 ml ACN

1 ml 5% ACN in 1% NH<sub>4</sub>OH

Waschen: 2 ml 20 % ACN in 1% NH<sub>4</sub>OH

Flussrate: 2 ml/min

Elution: mit mobiler Phase (vgl. Abschnitt 7.3)

Flussrate: 0,5 ml/min

### 7.3 LC

Mobile Phase:

Eluent A: 0,1% Ameisensäure

Eluent B: 0,1% Ameisensäure in MeOH

Gradientenprogramm: binärer Gradient, Gradientenprogramm siehe Tab. 1

programm:

Splitverhältnis: 1:1

Tab. 1 Gradientenprogramm zur Aufreinigung und Trennung der Gae durch XLC-MS auf Xterra MS C-18.  
Eluent A: 0,1% Ameisensäure, Eluent B: 0,1% Ameisensäure in MeOH

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Flussrate [ml/min]	Elutionsprofil
0,0	90	10	1,0	Isokratisch
0,1	90	10	1,0	Gradient
2,1	10	90	1,0	Gradient
2,5	10	90	1,0	Isokratisch
3,0	90	10	1,0	Gradient
5,0	90	10	1,0	Isokratisch

<b>SOP-4</b> Seite 6 von 8	<b>Standardarbeitsanweisung</b> Bestimmung des $\alpha$ -Solanin- und $\alpha$ -Chaconin-Gehaltes mittels XLC-MS
-------------------------------	---

#### 7.4 MS

Verneblungsdruck: 15 l/h

Curtaingasdruck: 10 l/h

Kollisionsgasdruck: 9 l/h

Ionenspray-Spannung: 5,5 kV

Quellentemperatur: 400 °C

Detektmode: MRM (Multiple Reaction Monitoring)

Identifizierung:  $m/z$  98,2

Quantifizierung:  $m/z$   $\alpha$ -Solanin: 868,3

$m/z$   $\alpha$ -Chaconin: 852,4

### 8 Herstellung der Lösungen

#### 8.1 Standardlösungen

Zur Herstellung der Standardlösungen werden jeweils 10 mg  $\alpha$ -Chaconin und  $\alpha$ -Solanin in einen 10 ml Messkolben eingewogen und mit MeOH zur Marke aufgefüllt. Zur Herstellung der Kalibrierungslösungen wird die Stammlösung [1000 ng/ $\mu$ l] mit MeOH auf die Kalibrierkonzentrationen 0,5, 2,5, 5, 10, 25, 50 ng/ $\mu$ l verdünnt und in HPLC-Vials gefüllt.

#### 8.2 Extraktionsmittel: 1% Essigsäure

Zu 10 ml 99,8%iger Essigsäure werden 990 ml A. bidest. zugesetzt.

#### 8.3 Konditionierungslösung: 5% ACN in 1% $\text{NH}_4\text{OH}$

49,5 ml Acetonitril werden mit 940,5 ml A. bidest versetzt. Zu dieser Lösung werden 10 ml  $\text{NH}_4\text{OH}$  gegeben.

#### 8.4 Waschlösung: 20 % ACN in 1% $\text{NH}_4\text{OH}$

198 ml Acetonitril werden mit 792 ml A. bidest versetzt. Zu dieser Lösung werden 10 ml  $\text{NH}_4\text{OH}$  gegeben.

#### 8.5 LC-Eluenten

**Eluent A:** 0,1% Ameisensäure

1 l Wasser (HPLC-Qualität) wird mit 1 ml Ameisensäure versetzt.

**Eluent B:** 0,1% Ameisensäure in MeOH

1 l Acetonitril (HPLC-Qualität) wird mit 1 ml Ameisensäure versetzt.

<b>SOP-4</b> Seite 7 von 8	<b>Standardarbeitsanweisung</b> Bestimmung des $\alpha$ -Solanin- und $\alpha$ -Chaconin-Gehaltes mittels XLC-MS
-------------------------------	---

#### 8.6 Arbeitsproben

Als Arbeitsprobe diente der über Spritzenfilter filtrierte Essigsäureextrakt.

### 9 Beschreibung

#### 9.1 Kalibrierung des XLC-MS-Systems

Die Bestimmung des GA-Gehaltes im Probenmaterial erfolgt auf Basis der Injektion externer Standards und der Aufstellung einer sechs-Punkt-Kalibriergeraden:  $f_{SM}(x) = a \cdot x_{SM} + b$ , wobei für jedes Konzentrationsniveau (1, 5, 10, 100, 500, 1000 ng/ml) eine Doppelbestimmung durchzuführen ist und jeweils der Mittelwert in die Berechnung einfließt. Anhand des Bestimmtheitsmaßes ist zu prüfen, ob eine lineare Abhängigkeit der ermittelten Flächeneinheiten für  $\alpha$ -Chaconin und  $\alpha$ -Solanin von der Konzentration besteht. Bei Abweichung um jeweils mehr als 0,01 ist die Kalibrierung zu wiederholen.

Die Kalibrierung des Systems erfolgt einmal wöchentlich zu Beginn einer Arbeitswoche.

#### 9.2 Durchführung der XLC-MS-Analyse

50  $\mu$ l des essigsäuren Extraktes aus 8.6 werden in das System injiziert. Am Anfang und am Ende jeden Arbeitstages wird ein Standardgemisch aus  $\alpha$ -Chaconin und  $\alpha$ -Solanin (jeweils 100 ng/ml) injiziert, um die ordnungsgemäße Arbeitsweise des Systems zu überprüfen. Die massenspektrometrische Detektion positiv geladener GAe erfolgt im Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Modus.

#### 9.3 Identifikation der GAe

Die Identifikation der GAe erfolgt anhand des Identifikations bei  $m/z$  98,2, das als charakteristisches Ion von  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin nach deren Fragmentierung in der Kollisionszelle auftritt sowie durch Vergleich der Retentionszeiten der Arbeitsprobe mit den Standardsubstanzen:

$\alpha$ -Solanin: 2,6 min  
 $\alpha$ -Chaconin: 2,7 min

<b>SOP-4</b> Seite 8 von 8	<b>Standardarbeitsanweisung</b> Bestimmung des $\alpha$ -Solamin- und $\alpha$ -Chaonin-Gehaltes mittels XLC-MS
-------------------------------	--

#### 9.4 Quantifizierung der GAe

Die Bestimmung des GA-Gehaltes in den Arbeitsproben erfolgt anhand der Quantifizierungsionen für  $\alpha$ -Solamin  $m/z$  868,3 und  $\alpha$ -Chaonin  $m/z$  852,4. Nach Injektion und Aufstellung der Kalibriergeraden mit der Funktion  $f_{SP}(x) = a \cdot x_{SP} + b$  kann die Konzentration [ng/ml] in den Arbeitsproben nach folgender Gleichung bestimmt werden:

$$(1) \quad \frac{f_{SP}(x) - b}{a} = x_{SP}$$

$x_{SP}$  = Konzentration Arbeitsprobe [ng/ml]  
 $f_{SP}(x)$  = Flächeneinheiten Arbeitsprobe  
 $a$  = Steigung der Kalibriergerade  
 $b$  = Achsenabschnitt der Kalibriergerade

Zur Angabe der Endkonzentration [mg/100 g TG] ist das Ergebnis aus Gleichung (1) unter Berücksichtigung von Einwaage, Kartuschenbeladung und Aufnahmevolumen umzurechnen.

#### 10 Mitgeltende Unterlagen

keine

<b>SOP-5</b> Seite 1 von 5	<b>Standardarbeitsanweisung</b> Bestimmung des Gesamtglykoalkaloid-Gehaltes mittels Hämolyse-Assay
-------------------------------	---

Exemplar – Nummer:

- Arbeitsexemplar – unterliegt dem Änderungsdienst
- Informationsexemplar – unterliegt nicht dem Änderungsdienst

Inhalt	Seite
1 Zweck	2
2 Geltungsbereich	2
3 Begriffe/Abkürzungen	2
4 Messprinzip	2
5 Chemikalien	3
5.1 Standardsubstanzen	3
5.2 Reagenzien	3
6 Geräte	3
7 Herstellung der Lösungen	3
7.1 Standardlösungen	3
7.2 10% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	3
7.3 10% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -99% EtOH (1:1, v/v)	3
7.4 Clarkes Reagenz	3
8 Beschreibung	4
8.1 Kalibrierung	4
8.2 Durchführung der photometrischen Bestimmung	4
8.3 Quantifizierung	4
9 Mitgeltende Unterlagen	5

SOP-5	erstellt:	geprüft:	freigegeben:
Bereich			
Name			
Datum			
Unterschrift			

<b>SOP-5</b> Seite 2 von 5	<b>Standardarbeitsanweisung</b> Bestimmung des Gesamtglykoalkaloid-Gehaltes mittels Hämolyse-Assay
-------------------------------	---

<b>SOP-5</b> Seite 3 von 5	<b>Standardarbeitsanweisung</b> Bestimmung des Gesamtglykoalkaloid-Gehaltes mittels Hämolyse-Assay
-------------------------------	---

## 1 Zweck

Diese SOP regelt die Vorgehensweise zur Bestimmung des Gesamt-GA-Gehaltes als Summe der Einzelalkaloide  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin mit Hilfe des Hämolyse-Assays.

## 2 Geltungsbereich

Dieses Verfahren ist anwendbar für die hämolytische Bestimmung des Gesamt-GA-Gehaltes in Kartoffeln und Kartoffelprodukten nach Extraktion und SPE-Aufreinigung der GAe  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin gemäß SOP-1 und deren Inkubation mit Schafbluterythrozyten.

## 3 Begriffe / Abkürzungen

GA Glykoalkaloid  
SOP Standardarbeitsanweisung (Standard Operation Procedure)

## 4 Messprinzip

Die Bestimmung des Gesamt-GA-Gehaltes erfolgt durch photometrische Messung der Absorption des hämoglobinhaltigen Überstandes nach Inkubation der GAe mit Schafbluterythrozyten. Nach der Bildung von Komplexen zwischen den GAen und dem in die Erythrozytenmembran eingelagerten Cholesterol, kommt es zur Zerstörung der Membran und zur Freisetzung des roten Blutfarbstoffs Hämoglobin. Die dadurch bedingte Rotfärbung des Überstandes kann photometrisch bestimmt werden, wobei die Lichtabsorption im Strahlengang des Photometers nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz:

$$A = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d$$

$A$  = Absorption  
 $\varepsilon(\lambda)$  = molarer Absorptionskoeffizient [ $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ]  
 $c$  = Konzentration [mol/l]  
 $d$  = Schichtdicke [cm]

proportional zur Anzahl an zerstörten Erythrozyten und damit zur Menge an GAen im aufgereinigten Extrakt. Mit Hilfe einer Kalibriergeraden kann die Konzentration in den Probelösungen ermittelt werden.

## 5 Chemikalien

### 5.1 Standardsubstanzen

$\alpha$ -Chaconin (99%)

$\alpha$ -Solanin (99%)

Digitonin

### 5.2 Reagenzien

Krebs-Ringer-Puffertabletten

Schafsblood mit Alseverzusatz

## 6 Geräte

Einmalmikrovetten (1 ml)

Photometer

Brutschrank

Vortex

## 7 Herstellung der Lösungen

### 7.1 Standardlösung Hämolyse-Assay ( $\alpha$ -Chaconin: $\alpha$ -Solanin = 30:70, w/w)

7 mg  $\alpha$ -Chaconin und 3 mg  $\alpha$ -Solanin werden in einen 10 ml Messkolben eingewogen und zur Marke mit MeOH aufgefüllt. Zur Herstellung der Kalibrierungslösungen wird von der Hämolyse-Stammmlösung [1 mg Gesamt-GA/ml] jeweils ein Aliquot entnommen, in Eppendorfgläser überführt und das Lösungsmittel unter einem leichten Stickstoffstrom abgeblasen, so dass sich die Konzentrationen 2,5; 5; 10; 15; 20; 25  $\mu$ g Gesamt-GA ergeben.

### 7.2 3/4 konzentrierter Krebs-Ringer-Puffer (isotonisch, pH 7,4)

Eine Krebs-Ringer-Puffer-Tablette wird in 166,7 ml A. bidest. gelöst. Pro Tablette sind 1,125 g NaCl, 0,0525 g KCl, 0,0225 g CaCl<sub>2</sub>, 0,025 g NaHCO<sub>3</sub> enthalten.

### 7.3 Positivkontrolle: 0,98 mM Digitonin in MeOH

12,0 mg Digitonin wurden in 10 ml MeOH gelöst.

## 7.4 Arbeitsproben

Die trockensten, aufgereinigten Extrakte aus SOP-1 werden in 1 ml 3/4 konzentrierter Krebs-Ringer-Pufferlösung gelöst.

<b>SOP-5</b> Seite 4 von 5	<b>Standardarbeitsanweisung</b> Bestimmung des Gesamtglykoalkaloid-Gehaltes mittels Hämolyse-Assay
-------------------------------	---

<b>SOP-5</b> Seite 5 von 5	<b>Standardarbeitsanweisung</b> Bestimmung des Gesamtglykoalkaloid-Gehaltes mittels Hämolyse-Assay
-------------------------------	---

## 8 Beschreibung

### 8.1 Kalibrierung

Die Bestimmung des Gesamt-GA-Gehaltes erfolgt auf Basis der Aufstellung einer sechs-Punkt-Kalibriergeraden:  $f_{SD}(x) = a \cdot x_{SD} + b$ , wobei für jedes Konzentrationsniveau (2,5; 5; 10; 15; 20; 25 µg Gesamt-GA) eine Doppelbestimmung durchzuführen ist und jeweils der Mittelwert in die Berechnung einfließt. Anhand des Bestimmtheitsmaßes ist zu prüfen, ob eine lineare Abhängigkeit der ermittelten Absorptionswerte für das GA-Gemisch von der Konzentration besteht. Bei Abweichung um mehr als 0,05 ist die Kalibrierung zu wiederholen. Die Kalibrierung des Systems erfolgt wöchentlich. Zusätzlich wird bei jeder Analysenserie ein 5 und 20 µg Gesamt-GA-Standard verwendet, um die korrekte Arbeitsweise des Assays zu überprüfen.

### 8.2 Durchführung der photometrischen Bestimmung

Den nach Punkt 7.3 hergestellten Arbeitsproben werden 250 µl Schafsbilblutsuspension zugesetzt. Nach 2 sec durchmischen mit dem Vortex wird 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird zur Abtrennung fester Bestandteile 10 min bei 2000 Upm, 10°C zentrifugiert. Die überstehende Lösung dient der photometrischen Bestimmung des Hämoglobingehaltes bei 540 nm gegen den Blindwert. Bei jedem Ansatz wird als Negativkontrolle reiner Puffer, als Positivkontrolle 5 µg Digitonin in Krebs-Ringer-Puffer und zur Überprüfung der Kalibrierung ein 5 und 20 µg Standardgemisch verwendet.

### 8.3 Quantifizierung

Nach Messung der Absorption der Arbeitsprobe und Aufstellung der Kalibriergeraden mit der Funktion  $f_{SD}(x) = a \cdot x_{SD} + b$  kann der Gesamt-GA-Gehalt [µg] in der Arbeitsprobe nach folgender Gleichung bestimmt werden:

$$(1) \quad \frac{f_{AP}(x) - b}{a} = x_{AP}$$

$x_{AP}$  = Gesamt-GA-Gehalt Arbeitsprobe [µg]  
 $f_{AP}(x)$  = Absorption Arbeitsprobe  
 $a$  = Steigung der Kalibriergerade  
 $b$  = Achsenabschnitt der Kalibriergerade

Zur Angabe der Endkonzentration [mg/100 g TG] ist das Ergebnis aus Gleichung (1) unter Berücksichtigung von Einwaage und Kartuschenbelastung umzurechnen.

## 9 Mitgeltende Unterlagen

SOP-1: Extraktion und Aufreinigung von Glykoalkaloiden aus Kartoffeln und Verarbeitungsprodukten aus Kartoffeln

<b>SOP-6</b> Seite 1 von 6	<b>Standardarbeitsanweisung</b> Bestimmung des Gesamtglykoalkaloid-Gehaltes mittels Photometrie
-------------------------------	---

<b>SOP-6</b> Seite 2 von 6	<b>Standardarbeitsanweisung</b> Bestimmung des Gesamtglykoalkaloid-Gehaltes mittels Photometrie
-------------------------------	---

Exemplar – Nummer:

Arbeitsexemplar – unterliegt dem Änderungsdienst

Informationsexemplar – unterliegt nicht dem Änderungsdienst

<b>Inhalt</b>	<b>Seite</b>
1 Zweck	2
2 Geltungsbereich	2
3 Begriffe/Abkürzungen	2
4 Messprinzip	2
5 Chemikalien	3
5.1 Standardsubstanzen	3
5.2 Reagenzien	3
6 Geräte	3
7 Herstellung der Lösungen	3
7.1 Standardlösungen	3
7.2 10% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	3
7.3 10% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -99% EtOH (1:1, v/v)	3
7.4 Clarkes Reagenz	3
8 Beschreibung	4
8.1 Kalibrierung	4
8.2 Durchführung der photometrischen Bestimmung	4
8.3 Quantifizierung	4
9 Mitgeltende Unterlagen	4

SOP-6	erstellt:	geprüft:	freigegeben:
Bereich			
Name			
Datum			
Unterschrift			

## 1 Zweck

Diese SOP regelt die Vorgehensweise zur Bestimmung des Gesamt-GA-Gehaltes als Summe der Einzelalkaloide  $\alpha$ -Solamin und  $\alpha$ -Chaconin durch Photometrie.

## 2 Geltungsbereich

Dieses Verfahren ist anwendbar für die photometrische Bestimmung des Gesamt-GA-Gehaltes in Kartoffeln und Kartoffelprodukten nach Extraktion und SPE-Aufreinigung der GAe  $\alpha$ -Solamin und  $\alpha$ -Chaconin gemäß SOP-1 und deren Umsetzung mit *para*-Formaldehyd.

## 3 Begriffe / Abkürzungen

EtOH	Ethanol
GA	Glykoalkaloid
MeOH	Methanol
<i>p</i>	<i>para</i>
SOP	Standardarbeitsanweisung (Standard Operation Procedure)

## 4 Messprinzip

Die Bestimmung des Gesamt-GA-Gehaltes erfolgt durch Umsetzung der GAe  $\alpha$ -Solamin und  $\alpha$ -Chaconin in phosphorsaurer Lösung mit *p*-Formaldehyd, wodurch sich eine stahlblaue Färbung ergibt. Die Absorption dieser Lösung kann photometrisch bestimmt werden, wobei die gemessene Lichtabsorption der umgesetzten Analyten im Strahlengang des Photometers nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz:

$$A = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d$$

$A$  = Absorption  
 $\varepsilon(\lambda)$  = molarer Absorptionskoeffizient [ $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ]  
 $c$  = Konzentration [mol/l]  
 $d$  = Schichtdicke [cm]

proportional zur Analytkonzentration in der Lösung ist. Mit Hilfe einer Kalibriergeraden kann die Konzentration in den Probelösungen ermittelt werden.

<b>SOP-6</b>	<b>Standardarbeitsanweisung</b>
Seite 3 von 6	Quantifizierung von Gesamtglykoalkaloid-Gehaltes mittels Photometrie

<b>SOP-6</b>	<b>Standardarbeitsanweisung</b>
Seite 4 von 6	Quantifizierung von Gesamtglykoalkaloid-Gehaltes mittels Photometrie

## 5 Chemikalien

### 5.1 Standardsubstanzen

$\alpha$ -Solarin (99%)

### 5.2 Reagenzien

EtOH absolut

*para*-Formaldehyd

Phosphorsäure (85%)

## 6 Geräte

Einmalmikroküvetten (1 ml)

Photometer

## 7 Herstellung der Lösungen

### 7.1 Standardlösungen

10 mg  $\alpha$ -Solarin werden in einen 10 ml Messkolben eingewogen und mit MeOH zur Marke aufgefüllt. Zur Herstellung der Kalibrierungslösungen wird von der Stammlösung [1 mg/ml] jeweils ein Aliquot entnommen und in Eppendorfgläser überführt, so dass sich die Konzentrationen 25, 50, 100, 150, 200 und 250  $\mu$ g ergeben.

### 7.2 10% $H_3PO_4$

Zu 10 ml konzentrierter Phosphorsäure wurden 75 ml A. bidest. gegeben.

### 7.3 10% $H_3PO_4$ -99% EtOH (1:1, v/v)

50 ml 10% Phosphorsäure wurden mit 50 ml 99% EtOH vermischt.

### 7.4 Clarkes Reagenz

50 mg *para*-Formaldehyd wurden in 100 ml 85%  $H_3PO_4$  gelöst.

### 7.5 Arbeitsproben

Die trockenen, aufgereinigten Extrakte aus SOP-1 werden in 300  $\mu$ l 10%  $H_3PO_4$ -99% EtOH (1:1, v/v) gelöst.

## 8 Beschreibung

### 8.1 Kalibrierung

Die Bestimmung des Gesamt-GA-Gehaltes erfolgt auf Basis der Aufstellung einer sechs-Punkt-Kalibriergeraden:  $f_{Std}(x) = a \cdot x_{Std} + b$ , wobei für jedes Konzentrationsniveau (25, 50, 100, 150, 200, 250  $\mu$ g  $\alpha$ -Solarin) eine Doppelbestimmung durchzuführen ist und jeweils der Mittelwert in die Berechnung einfließt. Anhand des Bestimmtheitsmaßes ist zu prüfen, ob eine lineare Abhängigkeit der ermittelten Flächeneinheiten für  $\alpha$ -Chaconin und  $\alpha$ -Solarin von der Konzentration besteht. Bei Abweichung um jeweils mehr als 0,05 ist die Kalibrierung zu wiederholen. Die Kalibrierung des Systems erfolgt einmal monatlich.

### 8.2 Durchführung der photometrischen Bestimmung

Die nach Punkt 7.4 hergestellten Arbeitsproben werden mit 1,5 ml frisch zubereitetem Clarkes Reagenz versetzt, durchmischt und genau 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Absorption bei 595 nm gegen den Blindwert gemessen.

### 8.3 Quantifizierung

Nach Messung der Absorption der Arbeitsprobe und Aufstellung der Kalibriergeraden mit der Funktion  $f_{Std}(x) = a \cdot x_{Std} + b$  kann der Gesamt-GA-Gehalt [ $\mu$ g] in der Arbeitsprobe nach folgender Gleichung bestimmt werden:

$$(1) \quad \frac{f_{AP}(x) - b}{a} = x_{AP}$$

$x_{AP}$  = Gesamt-GA-Gehalt Arbeitsprobe [ $\mu$ g]  
 $f_{AP}(x)$  = Absorption Arbeitsprobe  
 $a$  = Steigung der Kalibriergerade  
 $b$  = Achsenabschnitt der Kalibriergerade

Zur Angabe der Endkonzentration [mg/100 g TG] ist das Ergebnis aus Gleichung (1) unter Berücksichtigung von Einwaage und Kartuschenbelastung umzurechnen.

## 9 Mitgeltende Unterlagen

SOP-1: Extraktion und Aufreinigung von Glykoalkaloiden aus Kartoffeln und Verarbeitungsprodukten aus Kartoffeln

<b>SOP-7</b>	<b>Standardarbeitsanweisung</b>
Seite 1 von 5	Hydrolyse der Glykoalkaloide aus Kartoffeln und Verarbeitungsprodukten aus Kartoffeln

<b>SOP-7</b>	<b>Standardarbeitsanweisung</b>
Seite 2 von 5	Hydrolyse der Glykoalkaloide aus Kartoffeln und Verarbeitungsprodukten aus Kartoffeln

Exemplar – Nummer:

Arbeitsexemplar – unterliegt dem Änderungsdienst

Informationsexemplar – unterliegt nicht dem Änderungsdienst

<b>Inhalt</b>	<b>Seite</b>
1 Zweck	2
2 Geltungsbereich	2
3 Begriffe/Abkürzungen	2
4 Chemikalien	2
4.1 Extraktion	2
4.2 Isolierung des Solanidins	2
4.3 Interner Standard	2
5 Geräte	3
5.1 Extraktion	3
5.2 Isolierung des Solanidins	3
6 Herstellung der Lösungen	3
6.1 Extraktion	3
6.2 Interner Standard	3
7 Beschreibung	4
7.1 Trocknung des Pflanzenmaterials und der Verarbeitungsprodukte	4
7.2 Homogenisierung	4
7.3 Extraktion der GAe aus Probenmaterial	4
7.4 Hydrolyse der GAe	4
7.5 Isolierung des Solanidins	5
8 Weiterführende Unterlagen	5

SOP-7	erstellt:	geprüft:	freigegeben:
Bereich			
Name			
Datum			
Unterschrift			

## 1 Zweck

Diese SOP regelt die Vorgehensweise zur Extraktion und Hydrolyse der GAe  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin zum Aglykon Solanidin. Sie dient der Vorbereitung des Probenmaterials für die anschließende gaschromatographische Quantifizierung.

## 2 Geltungsbereich

Dieses Verfahren ist anwendbar für die Bestimmung des Gesamtalkaloidgehaltes in Kartoffeln und Verarbeitungsprodukten aus Kartoffeln mittels GLC.

## 3 Begriffe / Abkürzungen

GA	Glykoalkaloid
GLC	Gas-Flüssig-Chromatographie (Gas liquid chromatography)
MeOH	Methanol
SOP	Standardarbeitsanweisung (Standard Operation Procedure)

## 4 Chemikalien

### 4.1 Extraktion und Hydrolyse

MeOH  
n-Pentan  
Salzsäure (37%)

### 4.2 Isolierung des Solanidins

Chloroform  
Ammoniumhydroxid (25%)

### 4.3 Interner Standard

Gelseminhydrochlorid

<b>SOP-7</b>	<b>Standardarbeitsanweisung</b>
Seite 3 von 5	Hydrolyse der Glykoalkaloide aus Kartoffeln und Verarbeitungsprodukten aus Kartoffeln

<b>SOP-7</b>	<b>Standardarbeitsanweisung</b>
Seite 4 von 5	Hydrolyse der Glykoalkaloide aus Kartoffeln und Verarbeitungsprodukten aus Kartoffeln

## 5 Geräte

### 5.1 Extraktion

Extraktionsgefäße: Polypropylen-Tubes (50 ml)

Reaktionsgefäße: Reacti-Vials, gasdicht (15 ml)

Trockenschrank

Ultraschallgerät

Zentrifuge: mit Schwingrotor, mindestens 4000 Upm

### 5.2 Isolierung des Solanidins

Reaktionsgefäße: Polypropylen-Tubes (15 ml)

Polypropylen-Tubes (2 ml)

## 6 Herstellung der Lösungen

### 6.1 Extraktion

**Extraktions- und Hydrolyselösung: 1 N HCl in MeOH-A. bidest (1:1, v/v)**

45 ml A. bidest. werden mit 55 ml MeOH vermischt. Diesem Gemisch werden 10 ml raucherde Salzsäure zugesetzt.

### 6.2 Interner Standard: Gelsemin

Zur Herstellung der Gelsemin-Stammlösung werden 5 mg Gelseminhydrochlorid in 10 ml MeOH gelöst.

## 7 Eieschreibung

### 7.1 Trocknung des Pflanzenmaterials und der Verarbeitungserzeugnisse

Wasserhaltiges Frischmaterial wird zunächst bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Gefrierschrank eingefroren. Zur Entfernung des Wassers wird die Probe 48 h an einer Gefriertrocknungsanlage im Ölpumpenvakuum gefriergetrocknet. Trockene Pulverproben können direkt eingesetzt werden.

### 7.2 Homogenisierung

Um eine quantitative Extraktion sicherzustellen wird das Gewebe homogenisiert. Hierzu wird ein handelsüblicher Mörser und Pistill verwendet.

### 7.3 Extraktion der GAe aus Probenmaterial

#### Variante A: Kartoffeln

Es werden für: Kartoffelfleisch 8,0 g

Gesamtknolle 5,0 g

Kartoffelschale 2,0 g

des trockenen Pflanzenmaterials in 50 ml Polypropylen-Tubes eingewogen und zweimal mit je 20 ml 1 N HCl in MeOH-A. bidest (1:1, v/v) unter zu Hilfenahme von 1 min Ultraschall extrahiert. Die erste Extraktion erfolgt über Nacht ( $> 12\text{ h}$ ), die zweite 30 min jeweils auf einer Schüttelmaschine. Nach Abzentrifugieren der festen Bestandteile (8 min, 4000 Upm) und Vereinigung der Überstände werden für:

Kartoffelfleisch 15 ml

Gesamtknolle 10 ml

Kartoffelschale 10 ml

in gasdichte Reaktionsgefäße überführt.

#### Variante B: Verarbeitungserzeugnisse

Es werden für: Kartoffelviertel 5,0 g

Sonstige Erzeugnisse 8,0 g

des trockenen Probenmaterials in 50 ml Polypropylen-Tubes eingewogen und zweimal mit je 20 ml 1 N HCl in MeOH-A. bidest (1:1, v/v) unter zu Hilfenahme von 1 min Ultraschall extrahiert. Die erste Extraktion erfolgt über Nacht ( $> 12\text{ h}$ ), die zweite 30 min jeweils auf einer Schüttelmaschine. Nach Abzentrifugieren der festen Bestandteile (8 min, 4000 Upm) und Vereinigung der Überstände wird der Extrakt mit n-Pentan entfettet und für:

Kartoffelviertel 10 ml

Sonstige Erzeugnisse 15 ml

in gasdichte Reaktionsgefäße überführt.

### 7.4 Hydrolyse der GAe

Zu dem in gasdichten Reaktionsgefäßen vorliegenden Alkaloidextrakt werden  $50\text{ }\mu\text{l}$  Gelseminstammlösung zugesetzt und die GAe bei  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Trockenschrank 16 h hydrolysiert.

<b>SOP-7</b> Seite 5 von 5	<b>Standardarbeitsanweisung</b> Hydrolyse der Glykoalkaloide aus Kartoffeln und Verarbeitungsprodukten aus Kartoffeln
-------------------------------	---

#### 7.5 Isolierung des Solanidins

Nach Abkühlen des Hydrolysegemischs auf Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch in 15 ml Polypropylen-Tubes überführt und der pH-Wert mit 500 µl 25% NH<sub>4</sub>OH auf pH 10 eingestellt. Die Isolierung des als freie Base vorliegenden Solanidins erfolgt durch zweimaliges Ausschütteln mit je 2 ml Chloroform. Bei Emulsionsbildung kann zur Phasentrennung 1 min bei 4000 Upm zentrifugiert werden. Nach Abnahme der Chloroformphasen und deren Vereinigung erfolgt die Entfernung des Lösungsmittels unter einem leichten Stickstoffstrom.

#### 8 Weiterführende Unterlagen

SOP 8: Bestimmung des Gesamtkaloidgehaltes mittels GLC

<b>SOP-8</b> Seite 1 von 5	<b>Standardarbeitsanweisung</b> Bestimmung des Solanidin-Gehaltes mittels GLC
-------------------------------	--

Exemplar – Nummer:

Arbeitsexemplar – unterliegt dem Änderungsdienst

Informationsexemplar – unterliegt nicht dem Änderungsdienst

<b>Inhalt</b>	<b>Seite</b>
1 Zweck	2
2 Geltungsbereich	2
3 Begriffe/Abkürzungen	2
4 Messprinzip	2
5 Chemikalien	2
5.1 Standardsubstanzen	2
5.2 Mobile Phase	2
5.3 FID	3
6 Geräte	3
7 GLC-Bedingungen	3
8 Herstellung der Lösungen	3
8.1 Standardlösungen	3
8.2 Arbeitsproben	4
9 Beschreibung	4
9.1 Durchführung der GLC-Analyse	4
9.2 Identifikation des Solanidins	4
9.3 Quantifizierung des Solanidins	4
10 Mitteltende Unterlagen	5

SOP-8	erstellt:	geprüft:	freigegeben:
Bereich			
Name			
Datum			
Unterschrift			

<b>SOP-8</b> Seite 2 von 5	<b>Standardarbeitsanweisung</b> Bestimmung des Solanidin-Gehaltes mittels GLC
-------------------------------	--

<b>SOP-8</b> Seite 3 von 5	<b>Standardarbeitsanweisung</b> Bestimmung des Solanidin-Gehaltes mittels GLC
-------------------------------	--

## 1 Zweck

Diese SOP regelt die Vorgehensweise zur Bestimmung des Solanidin-Gehaltes mittels GLC und FID-Detektion.

## 2 Geltungsbereich

Dieses Verfahren ist anwendbar für die gaschromatographische Bestimmung des Gesamtkaloid-Gehaltes in Kartoffeln und Verarbeitungsprodukten aus Kartoffeln nach Hydrolyse der GAe  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin zum Aglykon Solanidin gemäß SOP-7.

## 3 Begriffe / Abkürzungen

FID	Flammenionisationsdetektor
GA	Glykoalkaloid
GLC	Gas-Flüssig-Chromatographie (Gas liquid chromatography)
MeOH	Methanol
SOP	Standardarbeitsanweisung (Standard Operation Procedure)

## 4 Messprinzip

Die Bestimmung der Analytkonzentration in den Arbeitsproben erfolgt nach gaschromatographischer Auftrennung mittels FID. Das Prinzip beruht auf der Messung der Leitfähigkeit einer Knallgasflamme zwischen zwei Elektroden. Passieren kohlenstoffhaltige Substanzen die Brennerflamme werden sie pyrolysiert. Dadurch entstehen Ionen und Elektronen, die die Leitfähigkeit erhöhen, was von einem Schreiber als Signal im GC-Chromatogramm registriert wird. Die Steigerung der Leitfähigkeit ist dabei proportional zum Kohlenstoffgehalt der Probe und damit zu dessen Konzentration.

## 5 Chemikalien

<b>5.1 Standardsubstanzen</b>	
Solanidin (99%)	
Gelseminhydrochlorid (99%)	

## 5.2 Mobile Phase

Trägergas: Helium 4.6

## 5.3 FID

FID-Gas: Synthetische Luft (20,5% O<sub>2</sub> in N<sub>2</sub>)  
Wasserstoff 3.0

## 6 Geräte

GLC: Gaschromatograph mit Flammenionisationsdetektor  
Stationäre Phase: Ohio Valley, Marietta, USA  
Kapillarsäule OV-1, 30 m x 0,25 mm i. D., 0,25 µm Filmdicke  
Gasdichte Mikroliterspritze

## 7 GLC-Bedingungen

Trägergas: Helium, lineare Geschwindigkeit 1 ml/min  
Temperaturprogramm: 150°C, 2 min isotherm,  
linearer Temperaturgradient von 150 mit 8°C/min auf  
300°C, 10 min isotherm  
Injektortemperatur: 270°C  
Detektortemperatur: 270°C  
Splitverhältnis: 1:25

## 8 Herstellung der Lösungen

### 8.1 Standardlösungen

#### Solanidin

10 mg Solanidin werden in einen 10 ml Messkolben eingewogen und mit MeOH zur Marke aufgefüllt.

#### Interner Standard: Gelsemin

Zur Herstellung der Gelsemin-Stammlösung werden 5 mg Gelseminhydrochlorid in 10 ml MeOH gelöst.

#### Kalibrierlösung

Die Herstellung der Kalibrierlösung erfolgt durch Vermischen von 50 µl der Gelseminhydrochloridlösung mit 50 µl der Solanidin-Stammlösung.

<b>SOP-8</b> Seite 4 von 5	<b>Standardarbeitsanweisung</b> Bestimmung des Solanidin-Gehaltes mittels GLC
-------------------------------	--

### 8.2 Arbeitsproben

Der verbleibende feste Rückstand aus SOP-7 wird in 100 µl MeOH aufgenommen und zur Entfernung fester Bestandteile 1 min bei 2000 Upm zentrifugiert. Die überstehende Lösung dient der gaschromatographischen Analyse.

## 9 Beschreibung

### 9.1 Durchführung der GLC-Analyse

2 µl der nach zentrifugieren überstehenden Lösung werden per Mikroliterspritze mit einem Splitverhältnis von 1:25 in das GLC-System injiziert.

### 9.2 Identifikation des Solanidins

Die Identifikation des Gelsemins und Solanidins erfolgt durch Vergleich der Retentionszeiten in der Arbeitsprobe mit den Standardsubstanzen. Da die verwendeten Reaktionsbedingungen zur Bildung eines Solanidin-Derivates führen, muss zur Quantifizierung des Solanidins dessen Fläche mitberücksichtigt werden.

- R<sub>1</sub> Gelsemin: 21,8 min
- R<sub>1</sub> Solanthin: 23,6 min
- R<sub>1</sub> Solanidin: 28,6 min

### 9.3 Quantifizierung des Solanidins

Die Berechnung der Konzentration erfolgt mit Hilfe des internen Standards Gelsemin. Vor jeder Analysenserie werden fünfmal je 2 µl des Standardgemischs aus Gelsemin und Solanidin eingespritzt und der Mittelwert der Gelsemin- und der Solanidin-Fläche gebildet. Aus den Mittelwerten der Standardchromatogramme kann der relative Responsefaktor (RF) nach folgender Gleichung (1) ermittelt werden. Er setzt sich aus den einzelnen Responsefaktoren ( $f_{Solid}$ ,  $f_{Gel}$ ) der Analysensubstanz Solanidin und dem inneren Standard Gelsemin zusammen.

$$(1) \quad RF = \frac{f_{Solid}}{f_{Gel}} = \frac{c_{Solid} / A_{Solid}}{c_{Gel} / A_{Gel}}$$

$RF$  = Relativer Responsefaktor  
 $f_{Solid}$  = Responsefaktor Solanidin  
 $c_{Solid}$  = Konzentration des Solanidin  
 $A_{Solid}$  = Peakfläche des Solanidin  
 $f_{Gel}$  = Responsefaktor Gelsemin  
 $c_{Gel}$  = Konzentration des Gelsemin  
 $A_{Gel}$  = Peakfläche des Gelsemin

<b>SOP-8</b> Seite 5 von 5	<b>Standardarbeitsanweisung</b> Bestimmung des Solanidin-Gehaltes mittels GLC
-------------------------------	--

In der unbekanntesten Probe kann die Konzentration unter zu Hilfenahme des oben berechneten RF nach folgender Gleichung (2) bestimmt werden:

$$(2) \quad c_p = A_p * RF * \frac{c_s}{A_s}$$

$c_p$  = Konzentration des Solanidin in der unbekanntesten Probe  
 $A_p$  = Peakfläche des Solanidin in der unbekanntesten Probe  
 $c_s$  = Konzentration des internen Standards in der unbekanntesten Probe  
 $A_s$  = Peakfläche des internen Standards in der unbekanntesten Probe

Zur Angabe der Endkonzentration [mg/100 g TG] ist das Ergebnis aus Gleichung (2) unter Berücksichtigung von Einwaage, Kartuschenbeladung und Aufnahmehvolumen umzurechnen.

## 10 Mitgeltende Unterlagen

SOP-7: Hydrolyse der Glykoalkaloide aus Kartoffeln und Verarbeitungsprodukten aus Kartoffeln