

**Bioverfügbarkeit von Carotinoiden
und deren Metabolisierung in Serum und Retina:
Anwendung von HPLC-NMR- und
HPLC-APCI-MS-Kopplung**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2001

vorgelegt von
Tobias Glaser

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Dezember 2001

Dekan: Professor Dr. H. Probst

1. Berichterstatter: Professor Dr. K. Albert

2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Häfelinger

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen unter der Anleitung von Herr Professor Dr. Klaus Albert im Zeitraum von Januar 1999 bis Dezember 2001 durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Klaus Albert danke ich sehr herzlich für die interessante Themenstellung, das stetige Interesse, das er meiner Arbeit entgegenbrachte sowie für die optimale Ausstattung und Arbeitsbedingungen zur Durchführung dieser Arbeit. Zudem gab er mir die Gelegenheit, meine Arbeit bei Forschungsaufenthalten im Ausland zu vervollständigen sowie auf zahlreichen internationalen Tagungen zu präsentieren.

Für Nina

und

Nicole

Mein Dank gilt allen Freunden und Kollegen, ohne deren Hilfe und Unterstützung die vorliegende Arbeit so nicht möglich gewesen wäre:

Dr. Konrad Kohler für die unzähligen wissenschaftlichen Diskussionen auf dem Gebiet der Ophthalmologie und der AMD sowie für Deine unermüdliche Arbeit bei der Präparation zahlreicher Retinaprobe.

Annette Lienau, Dr. Tanja Lacker und Dr. Markus Dachtler für die tolle Zusammenarbeit und vielen fruchtbaren Gespräche im Bereich der Carotinoid-Analytik.

Dr. Heidi Händel, Dr. Christine Hellriegel, Christel Wolf, Dr. Stefan Bachmann, Gerd Fischer, Dr. Holger Fischer, Manfred Krucker, Dr. Jürgen Wegmann und Daniel Zeeb. Ihr wart in den letzten Jahren bei allen Fragen und Problemen da. Vielen Dank für Eure stete Hilfsbereitschaft und für Eure Freundschaft.

Sonja Dick, Dr. Elke Gesele, Andrea Haug, Renata Rabelo Schefer, Dr. Li-Hong Tseng, Dr. Ulrich Braumann, Dr. Rainer Brindle, Dr. Arndt Ellwanger, Dr. Martin Raitza, Alexandre Schefer, Paul Schuler, Felix Tritschler, Walter Schaal, sowie den Mitarbeitern der NMR-Abteilung danke ich für die unzähligen Diskussionen, wertvollen Ratschlägen, sowie für das angenehme Arbeitsklima.

Dr. Guangwen Tang, Dr. Norman I. Krinsky, Dr. Robert M. Russell und Dr. Jim Sudmeier für die herzliche Aufnahme und Gastfreundschaft am Human Nutrition Research Center der Tufts University Boston.

Dr. Bernd Görlach für die Bereitstellung des UV-Vis Spektralphotometers.

Dr. Andrea Kiehne (Bruker Daltonik) und Dr. Petra Palloch (Bruker Saxonia) für die Möglichkeit, meine Proben mittels HPLC-APCI-MS-Kopplung zu messen.

Dem *fortune*-Programm der Universitätsklinik Tübingen für die finanzielle Förderung meiner Arbeit.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt meinen Eltern für Ihre uneingeschränkte Unterstützung während meines Studiums.

Schließlich möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie, Nicole und Nina, bedanken. Euer Lachen und Eure Liebe geben mir den nötigen Rückhalt und Kraft.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	PROBLEMSTELLUNG.....	4
3	CAROTINOIDE: AKTIVE WIRKSTOFFE IN NUTRACEUTICALS	6
3.1	Allgemeines	6
3.2	Verwendung	10
3.3	Carotinoide in der Natur	11
3.3.1	Vorkommen	11
3.3.2	Biosynthese.....	12
3.3.3	Funktion.....	14
3.4	Carotinoide in der Prävention.....	17
3.4.1	Carotinoide im Organismus.....	17
3.4.2	Bioverfügbarkeit von Carotinoiden	17
3.4.3	Protektive Eigenschaften von Carotinoiden	18
3.4.4	Carotinoide in der Retina - Lutein und Zeaxanthin	22
4	ANALYTIK VON CAROTINOIDEN IN BIOLOGISCHEN GEWEBEN ..	26
4.1	Schonende Extraktion von instabilen Analyten	26
4.1.1	Flüssig-Flüssig-Extraktion.....	27
4.1.2	SPE-HPLC-Kopplung (on-line SPE).....	28
4.1.3	RAM-HPLC-Kopplung	30
4.1.4	Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD).....	32

4.2	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	34
4.2.1	Grundlagen	34
4.2.2	HPLC-UV-Kopplung von Carotinoiden.....	35
4.3	Grundlagen moderner Kopplungsmethoden	38
4.3.1	HPLC-APCI-MS-Kopplung	38
4.3.2	HPLC-NMR-Kopplung	39
4.3.2.1	Experimenteller Aufbau	39
4.3.2.2	Anforderungen an die HPLC und NMR	41
5	ERGEBNISSE	43
5.1	Trennung und Identifizierung von Carotinoid-Stereoisomeren	43
5.2	Bestimmung von Carotinoid-Stereoisomeren in biologischen Proben	46
5.2.1	Lutein-, Zeaxanthin- sowie β -Carotin-Stereoisomere aus Spinat	46
5.2.2	Lycopin-Stereoisomere aus der Tomate	51
5.2.3	HR-MAS-NMR-Untersuchungen von carotinoidhaltigem Gemüse	54
5.2.4	Carotinoid-Stereoisomere aus humanem Serum	57
5.2.5	ζ -Carotin-Stereoisomere aus molekulargenetischer und enzymologischer Produktion	58
5.3	Anreicherung von Carotinoiden aus humanen Plasma-Proben	62
5.4	Chirale Trennung von optischen Zeaxanthin-Isomeren	64
5.5	Bioverfügbarkeit von Lutein aus in Deuteriumoxid angebauten, partiell gelabelten Gemüsesorten	66
5.5.1	Design der Studie	66
5.5.2	Probenvorbereitung und Analyse	68

5.5.3	Untersuchung zur Anreicherung von Lutein aus Gemüse mittels HPLC-UV-Kopplung.....	70
5.5.3.1	Kohl.....	70
5.5.3.2	Spinat.....	73
5.5.4	Untersuchung zur Anreicherung von Lutein aus partiell deuteriertem Gemüse mittels HPLC-APCI-MS-Kopplung	75
5.5.4.1	Kohl.....	75
5.5.4.2	Spinat.....	78
5.5.5	Vergleich der Ergebnisse zwischen HPLC-UV- und HPLC-APCI-MS-Kopplung	81
5.6	Bestimmung des Carotinoid-Stereoisomerenpatterns in retinalem Gewebe	83
5.6.1	Grundlagen, Vergleich der Tiermodelle	83
5.6.2	Humanretina.....	85
5.6.3	Nicht-humane Primatenretina	89
5.6.4	Hühnerretina	93
5.6.5	Schweineretina.....	96
5.6.6	Rattenretina.....	97
5.7	Metabolismus von Carotinoiden am Tiermodell Huhn mittels Injektion in den Glaskörper	101
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	105
7	EXPERIMENTELLER TEIL	110
7.1	Geräte	110
7.1.1	HPLC-Anlagen	110
7.1.2	Massenspektrometer	110
7.1.3	NMR-Spektrometer	111

7.2	Chemikalien	111
7.3	Probenvorbereitung und Extraktion	112
7.3.1	Carotinoid-Standards	112
7.3.2	Pflanzen und Gemüseproben	112
7.3.3	Serumproben.....	113
7.3.4	Retinen.....	114
7.4	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	114
7.4.1	Trennsäulen	114
7.4.2	Chromatographische Bedingungen	115
7.5	HPLC-MS-Experimente	116
7.6	NMR-Spektroskopie	117
7.6.1	¹ H-HR-MAS-NMR-Experimente.....	117
7.6.2	Kopplungsexperimente.....	117
8	LITERATUR	119

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

δ	Chemische Verschiebung
1D	Eindimensional
2D	Zweidimensional
ACN	Acetonitril
ADS	Alkyl Diol Silica
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization, Chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck
AMD, ARMD	Altersbedingte Makuladegenration, Age-related Macular Degeneration
BMI	Body Mass Index
BPC	Base Peak Chromatogram
BPSU	Bruker Peak Sampling Unit
COSY	Correlated Spectroscopy
CP	Cross Polarization, Kreuzpolarisation
d	Tag
D ₂ O	Deuteriumoxid
DMAPP	Dimethylallyl-Pyrophosphat
DMF	n,n-Dimethylformamid
ESI	Electrospray Ionisierung
FID	Free Induction Decay, freier Induktionsabfall
FT	Fourier Transformation
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HDL	High density lipoprotein
HNRC	Human Nutrition Research Center
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Hochleistungsflüssigchromatographie
HR	High Resolution, Hochauflösung
Inj	Injektion
IPP	Isopentenylpyrophosphat

IR	Infrarot
K	Kelvin
LC	Liquid Chromatography, Flüssigchromatographie
LDL	Low density lipoprotein
LHC	Light Harvesting Complex, Lichtsammelkomplex
Lut	Lutein
m/z	Masse pro Ladung
MAS	Magic Angle Spinning, Rotation um den Magischen Winkel
MeOH	Methanol
M.L.	Makula Lutea (Gelber Fleck)
MS	Mass Spectrometry, Massenspektrometrie
MSPD	Matrix Solid Phase Dispersion
NIH	National Institute of Health
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NP	Normal Phase
P	Post-natales Alter
PE	Polyethylen
ppm	Parts per Million
PS	Photosystem
RAM	Restricted Access Materialien
RCS	Royal College of Surgeons
RP	Reversed Phase
RPE	Retinales Pigmentepithel
SIC	Selected-Ion Chromatogramm
SPE	Solid Phase Extraction, Festphasenextraktion
TBME	<i>tert.</i> Butyl-methylether
THF	Tetrahydrofuran
USDA	United States Department of Agriculture, U.S. Landwirtschaftsministerium
UV	Ultraviolett
Zea	Zeaxanthin

1 Einleitung

Unter den verschiedenen in der Natur auftretenden Substanzklassen der Pigmente kommt den Carotinoiden auf Grund ihrer unterschiedlichsten Eigenschaften und Funktionen, wie beispielsweise ihrer protektiven Wirkung gegen bestimmte Volkskrankheiten, sowie ihrer verbreiteten Anwendung, eine besondere und wichtige Bedeutung zu.

Schon im Jahr 1817 isolierte Braconnot einen rötlichen, lipophilen Farbstoff aus Paprika¹. 1831 isolierte Wackenroder "Carotine" aus der Mohrrübe². 1837 benannte Berzelius die für die Färbung des Herbstlaubes verantwortlichen gelben Pigmente "Xanthophylle" (von gelb, griech. xanthos, und Laub, griech. phyllon)³. Es dauerte dann aber bis 1907, bis Willstätter die korrekte Molekülformel für Carotine und Xanthophylle postulierte⁴. Karrer, der für seine Carotinoidforschung mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde, bestimmte in den zwanziger Jahren die Konstitutionsformeln einer Reihe von Carotinoiden⁵. Nur ein Jahr nach der ersten Veröffentlichung der korrekten Konstitutionsformel für β,β -Carotin konnte auch die Struktur von Vitamin A bestimmt und somit eine Beziehung von Carotinoiden als Provitamin A und Vitamin A hergestellt werden⁶. Diese Entdeckungen stehen für den Anfang der Carotinoidforschung, und seitdem sind kontinuierliche Fortschritte erreicht worden.

Carotinoide sind ein wichtiger Faktor für die Gesundheit. Die bedeutende Rolle von β -Carotin und anderen Carotinoiden als wichtigste diätische Quelle für Vitamin A ist seit längerem bekannt. Seit einigen Jahren werden verschiedenen Carotinoiden zudem protektive Effekte gegen die Entstehung ernsthafter Krankheiten wie Krebs, koronare Herzkrankheiten, und degenerative Augenkrankheiten, wie z.B. gegen die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) zugeschrieben.

So wurden Carotinoide schon 1945 vom Nobelpreisträger George Wald als farbgebende Pigmente der Makula Lutea entdeckt⁷. Anfang 1960 wurden diese Pigmente von Brown und Wald Lutein und Zeaxanthin sowie deren Z-Stereoisomeren zugeschrieben⁸. Diese Annahme konnte aber selbst zwanzig Jahre später noch nicht

verifiziert werden, als Britton die Funktion der Pigmente mit der Absorption von schädlichem langwelligen Licht im blauen Wellenlängenbereich beschrieb⁹. Es dauerte bis in Anfang der 90er Jahre, als mittels Ernährungsstudien eine Korrelation zwischen erhöhter Carotinoiddiät und gesteigerter Makulapigment-Dichte postuliert wurde.

Diese Erkenntnisse einer positiven Korrelation zwischen Carotinoiden und verminderten Krankheitsrisiken führten zu intensiven Studien über die Rolle der Carotinoide als aktive Wirkstoffe in "Nutraceuticals" (von Nahrungsmittel, engl. nutrition, und Arzneimittel, engl. pharmaceutical). Als Nutraceutical wird dabei ein Lebensmittel oder ein Bestandteil eines Lebensmittels definiert, welches einen medizinischen oder gesundheitlichen Nutzen besitzt, z.B. in der Vorbeugung und Behandlung von Krankheiten¹⁰.

Die Carotinoidforschung umfasst dabei interdisziplinäre Zusammenarbeiten zwischen einer Vielzahl von Wissenschaftsbereichen wie z.B. der Pflanzenphysiologie, Biotechnologie, Synthesechemie, Ernährungswissenschaft, Umweltwissenschaft, Taxonomie sowie der klinischen Forschung. Dabei arbeiten Wissenschaftler aus der Chemie, Biochemie, Biologie, Medizin, Physik sowie aus anderen Wissenschaftszweigen mit dem Ziel zusammen, eine mögliche protektive Wirkung dieser natürlichen sekundären Pflanzenstoffe, zu denen neben den Carotinoiden auch z.B. Polyphenole oder Flavonoide zählen, auf verschiedenste Volkskrankheiten aufzuklären.

Diese interdisziplinären Studien verlangen in jedem Teilbereich nach einer reproduzierbaren und artefaktfreien Analytik. Da Carotinoide extrem labil gegenüber Licht, Sauerstoff und Temperatur sind, und daher zu Isomerisierung und Degradation neigen, muss bei der Analytik, und dabei vor allem bei der Extraktion darauf geachtet werden, dass diese sowohl schnell, und dennoch selektiv, quantitativ und zerstörungsfrei verläuft.

Dies gelingt aber nur durch Entwicklung von speziell auf das Problem zugeschnittenen Analysemethoden. Je nach Probenart, ob mit oder ohne proteingebundenen Carotinoiden, oder aus fester oder flüssiger Matrix, werden speziell entwickelte Extraktionsmethoden angewandt. Entweder ist sie dabei auf einer Isolierung direkt aus

der festen Matrix (Matrix Solid Phase Dispersion, MSPD) aufbaut oder auf einer Kopplung zwischen Extraktions- und Trennsystem (on-line Kopplung aus Festphasenextraktion SPE mit der Hochleistungsflüssigchromatographie HPLC).

Die Trennung und Identifizierung der Vielzahl an Carotinoiden sowie deren Z/E-Stereoisomeren gelingt mit gekoppelten analytischen Trenn- und Identifizierungsverfahren. Dabei wird zur Bestimmung von Carotinoiden die HPLC mit der UV-Spektroskopie sowie der Massenspektrometrie gekoppelt. Zur Identifizierung bestimmter Z/E-Stereoisomere wird die Kopplung der HPLC mit der NMR-Spektroskopie durchgeführt, da diese als einzige Methode einen eindeutigen Strukturbeweis liefern kann.

2 Problemstellung

Ziel der durchgeführten Arbeiten war es, die verschiedenen Z/E-Stereoisomere der Carotinoide von der Nahrungsquelle, den Pflanzen, über das Serum, wo die Aufnahme und der Transport im Organismus stattfindet, bis zum Wirkungsort für die AMD, dem retinalen Gewebe quantitativ zu erforschen.

Dabei wurde als Quelle für Carotinoide die Gemüsesorten Spinat und Tomate ausgewählt, da sie hohe Mengen der wichtigsten Carotinoide Lutein und β -Carotin (Spinat) sowie Lycopin (Tomate) enthalten. Die in diesen Gemüsesorten enthaltenen Carotinoid-Stereoisomere sollten identifiziert und quantitativ analysiert werden.

Die Extraktion der Carotinoide sollte dabei schonend und quantitativ erfolgen. Zur Identifizierung sollten die Methoden der HPLC-UV-, HPLC-MS- sowie der HPLC-NMR-Kopplung angewandt werden. Diese Techniken sollten auch zur Identifizierung von ζ -Carotin-Stereoisomeren aus molekulargenetischer und enzymologischer Produktion von *Escherichia coli*-Bakterien eingesetzt werden. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob mit der HR-MAS-NMR-Spektroskopie Carotinoide direkt aus dem Pflanzenmaterial identifiziert werden können.

Die Bioverfügbarkeit von Carotinoiden ist für den Menschen wichtig, da diese zu den sekundären Pflanzenstoffen gehören und demnach nicht vom Organismus produziert werden. Während eines Forschungsaufenthaltes an der Tufts University in Boston, USA wurde die Aufnahme und Anreicherung von Lutein aus hydroponisch, in Deuteriumoxid angebautem, partiell deuteriertem Gemüse (Spinat und Kohl) mittels HPLC-APCI-MS-Kopplung untersucht. Hierbei wurden Serumproben der Probanden vor und nach Applikation von mit Deuterium markiertem Gemüse analysiert. Mit dieser Pilotstudie mit je zwei Probanden sollte erstmalig eine genaue Anreicherung des applizierten partiell deuterierten Luteins nachgewiesen werden, da dieses vom im Organismus gespeicherten Lutein mittels Massenspektrometrie unterschieden werden kann.

Die Analyse von Blutproben erfordert bislang einen enormen Aufwand in der Probenvorbereitung. Seit Einführung der Restricted Access Materialien (RAM-Phase), die auf dem Größenausschlussprinzip aufbauen, können Makromoleküle aus den flüssigen Matrices abgetrennt und Analyten selektiv angereichert werden. Mit Hilfe einer RAM-HPLC-Kopplung sollte eine Methode entwickelt werden, um Carotinoide aus Blutplasma, ohne jegliche Probenvorbereitung direkt zu analysieren.

Die Bestimmung der Carotinoid-Stereoisomere am Wirkungsort der altersbedingten Makuladegeneration (AMD), der Retina, stellte eine weitere Herausforderung dar. Anhand verschiedener Modelle (Mensch, Affe, Huhn, Schwein, Ratte) sollte das Carotinoid-Stereoisomerenpattern verglichen werden, um so eine Aussage zur Metabolisierung der Carotinoide in der Retina treffen zu können. Zu diesem Zweck sollte eine universell anwendbare Extraktionsmethode für alle Spezies entwickelt werden. Die Bestimmung der Carotinoid-Stereoisomere sollte dabei in unterschiedlichen retinalen Gewebeabschnitten erfolgen, so zum Beispiel direkt in der Makula Lutea, in der temporalen und nasalen Hälfte, sowie in Randabschnitten wie dem Choroid oder Pigmentepithel. Zur Untersuchung der Metabolisierung sollten am Tiermodell Huhn Injektionsversuche in den Glaskörper des Auges durchgeführt werden.

Da für Ratten ein Degenerationsmodell besteht, sollte die Analytik von Carotinoid-Stereoisomeren in gesunden sowie degenerierten Rattenretinen etabliert und verglichen werden. Ziel war es dabei, eine Aussage zu treffen, ob Unterschiede zwischen dem gesunden und degenerierten retinalen Carotinidmuster bestehen.

3 Carotinoide in Nutraceuticals: Nahrungsergänzungstoff und präventiver Wirkstoff

3.1 Allgemeines¹¹⁻¹³

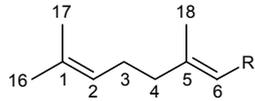
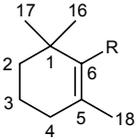
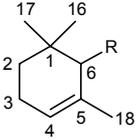
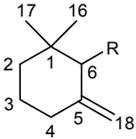
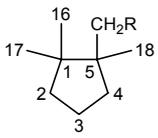
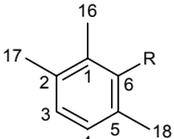
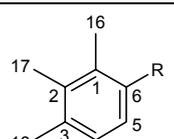
Der Begriff Carotinoide fasst eine große Gruppe von natürlichen Farbstoffen zusammen, die den „sekundären Pflanzenstoffen“ zugerechnet werden. Sekundäre Pflanzenstoffe sind dabei Mikronährstoffe, die in kleinen Mengen in pflanzlichen Nahrungsmitteln vorkommen. Zu ihnen gehören neben den Carotinoiden auch z.B. Polyphenole, Flavonoide, Alkylsulfide oder Isothiocyanate. Sie tragen zu Farbe und Geschmack dieser Nahrungsmittel bei. Zusätzlich haben viele von ihnen eine positive Wirkung auf die menschliche Gesundheit.

Man unterscheidet bei den Carotinoiden (Oberbegriff der Gruppe) zwischen den Carotinen (reine Kohlenwasserstoffe) und den sauerstoffhaltigen Xanthophyllen. Carotinoide sind in der Regel pflanzlichen Ursprungs und im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitet, werden aber auch von einigen Bakterien und Pilzen gebildet.

Carotinoide sind gelbe, orangefarbene, rote oder purpurfarbene lipophile Pigmente. Ihre Farbigkeit beruht auf ihrer Polyen-Struktur, einem System mehrerer konjugierter Doppelbindungen, durch die je nach Anzahl und Lage der Doppelbindungen Licht der Wellenlängen bis über 500 nm absorbiert wird. Es sind durchweg Tetraterpene, also C₄₀-Einheiten, die aus acht Isopren-Einheiten zusammengesetzt sind. Sie lassen sich formal von einer nicht-cyclischen C₄₀H₅₆-Verbindung, dem Lycopin, durch Hydrierung, Dehydrierung, Zyklisierung, Verschiebung von Doppelbindungen und/oder Methylgruppen, Kettenverlängerung oder Kettenverkürzung, sowie durch Einbau von Hydroxyl-, Carbonyl- oder Epoxygruppen herleiten.

Tabelle 1 zeigt das Strukturprinzip der C₄₀-Carotinoide. Alle Carotinoide bestehen aus einer olefinischen Kette der Formel C₂₂H₂₆ (entspricht einem Dimer R-R), an das an beiden Enden je eine Carotinoid-Endgruppe angebaut ist¹⁴. Entsprechen beide

Endgruppen einem acyclischen ψ -Rest, so kommt man zur Struktur des Lycopin. Lutein setzt sich aus je einem β - und ϵ -Iononring zusammen.

Typ	Präfix	Formel	Struktur
Acyclisch	ψ	C_9H_{15}	
Cyclohexen	β	C_9H_{15}	
Cyclohexen	ϵ	C_9H_{15}	
Methylcyclohexan	γ	C_9H_{15}	
Cyclopentan	κ	C_9H_{17}	
Aryl	ϕ	C_9H_{11}	
Aryl	χ	C_9H_{11}	

mit R =

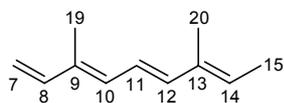


Tabelle 1: Strukturprinzip der Carotinoide, Arten von Carotinoid-Endgruppen

In Abbildung 1 sind die wichtigsten Carotinoide dargestellt. Neben der Unterscheidung in Carotine und Xanthophylle gibt es auch weitere Möglichkeiten zur Klassifizierung. So gibt es symmetrische (z.B. Lycopin, β -Carotin, Zeaxanthin, Astaxanthin) und asymmetrische Carotinoide (z.B. α -Carotin, Lutein, α - und β -Cryptoxanthin).

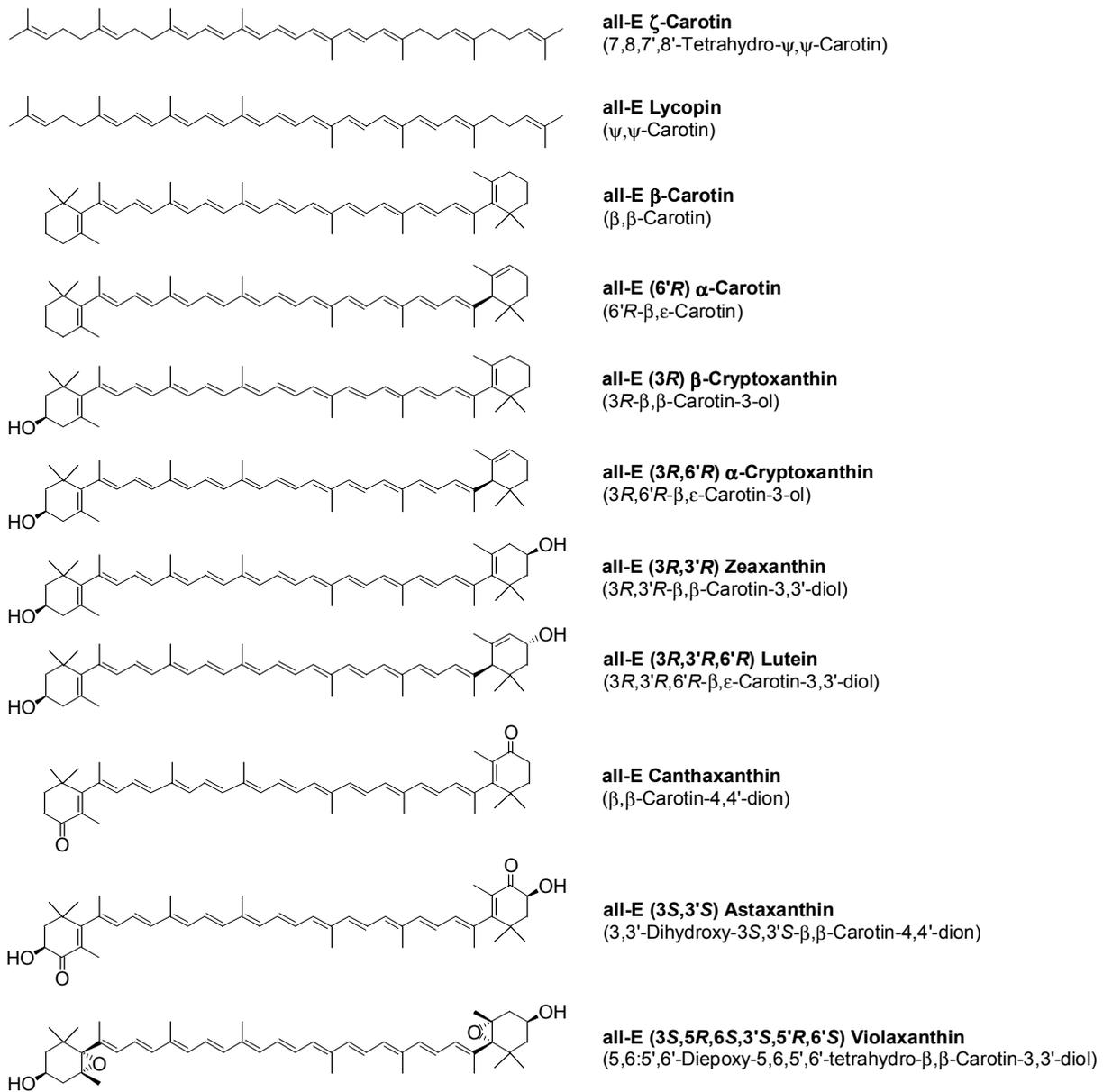


Abbildung 1: Strukturen einiger wichtiger Carotinoide

Bei Carotinoiden mit stereogenen Zentren (z.B. asymmetrische Carotinoide, Carotinoide mit Hydroxyl- oder Epoxygruppen) muss dabei zur zweifelsfreien Benennung die R,S-Nomenklatur nach Cahn, Ingold und Prelog (CIP-System) beachtet werden¹⁵. So ist α-Carotin nur eine ungenaue Bezeichnung, da die absolute Konfiguration am stereogenen Zentrum C₆ nicht eindeutig bestimmt ist.

Auf Grund ihrer Polyenstruktur mit konjugierten Doppelbindungen können Carotinoide gut als Antioxidans und Radikalfänger wirken. Dadurch lässt sich auch die große Empfindlichkeit der Carotinoide gegenüber Licht, Wärme und Sauerstoff

begründen. Die Carotinoide sind demnach äußerst instabile Substanzen, die leicht zu Oxidation (z.B. zu Epoxiden) oder Isomerisierung neigen. Selbst in ihrer natürlichen Umgebung, beispielsweise in den Zellen der Pflanzen, treten Carotinoide meist in mehreren *Z/E*- bzw. *cis/trans*-Stereoisomeren auf, wobei die all-*E* Anordnung der natürlichen entspricht¹⁶. Deshalb muss zur eindeutigen Bezeichnung der Carotinoide zusätzlich zur *R,S*-Nomenklatur auch die *Z/E*-Nomenklatur gemäß dem CIP-System angewandt werden. Das in der Natur vorherrschende α -Carotin wird folglich zur eindeutigen Benennung als all-*E* (*6'R*) α -Carotin bezeichnet.

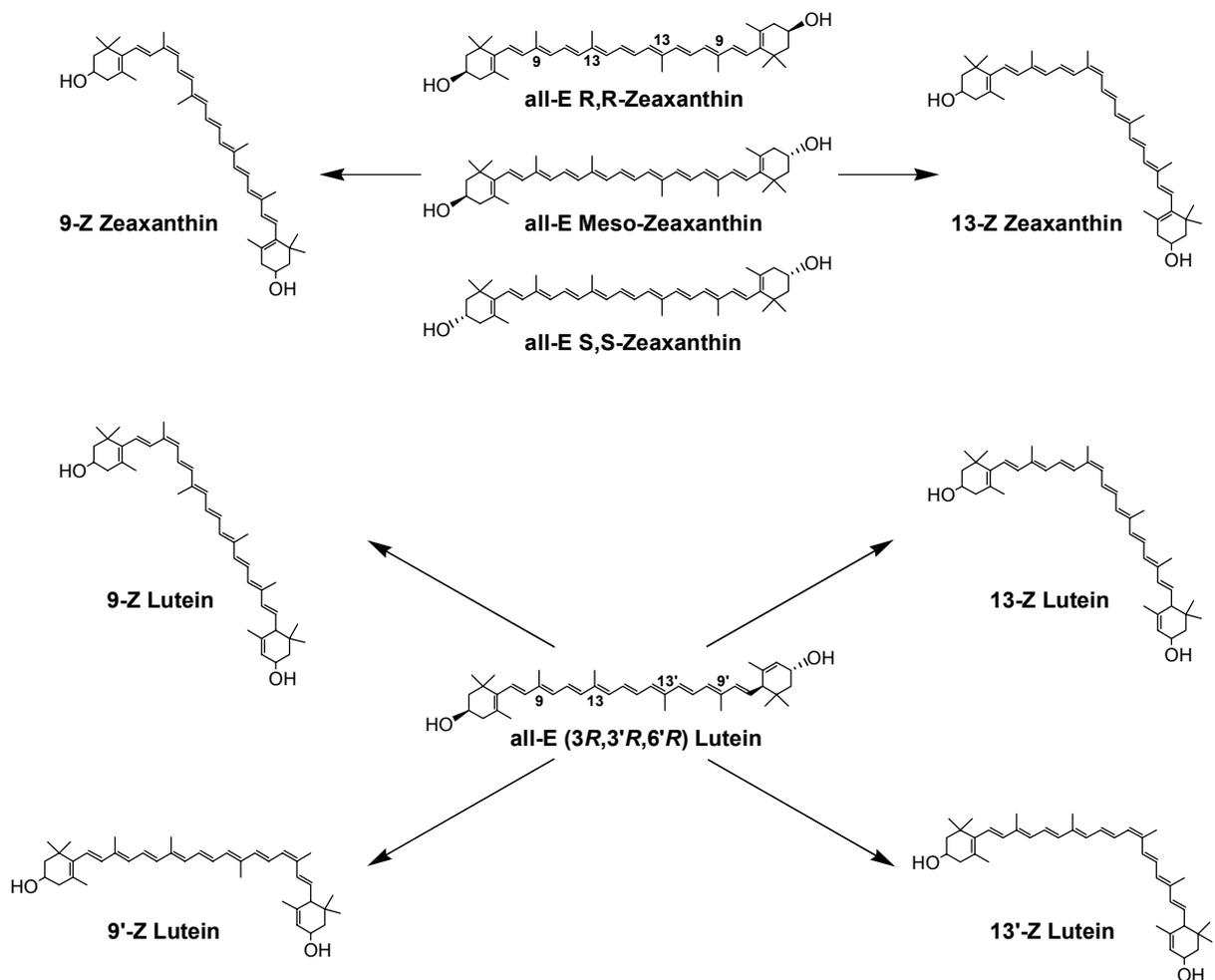


Abbildung 2: geometrische (*Z/E*-) sowie optische (*R,S*-) Isomere von Zeaxanthin (oben), sowie *Z/E*-Isomere von Lutein (unten)

In Abbildung 2 ist diese Unterscheidung optischer *R,S*- und geometrischer *Z/E*-Isomere am Beispiel für das symmetrische Zeaxanthin (oben) und das asymmetrische Lutein (unten) nochmals erläutert. Zeaxanthin hat zwei stereogene Zentren und somit,

auf Grund der Symmetrie, drei optische Isomere (3R,3'R; Meso und 3S,3'S) für die natürliche all-E Anordnung. In Pflanzen sowie in Gewebeproben kann man auch verschiedene Z/E-Stereoisomere identifizieren, am häufigsten die sterisch bevorzugten Z-Isomere in 9- und 13-Stellung.

Lutein besitzt eine asymmetrische Struktur mit drei stereogenen Zentren und hat somit acht optische Isomere. Das natürliche Isomer ist das all-E (3R,3'R,6'R) Lutein. Mit der nicht vorhandenen Symmetrie ergeben sich auch die doppelte Anzahl Möglichkeiten für Z-Isomere. So kann man in Pflanzen bzw. in Gewebeproben vier Z-Isomere identifizieren, das 9-Z, 13-Z, 13'-Z sowie 9'-Z-Lutein.

3.2 Verwendung^{11,12}

Carotinoide werden auf Grund ihrer vielfältigen Eigenschaften kommerziell vertrieben

- als direkter Farbstoff, z.B. in Lebensmitteln,
- als indirekter Farbstoff, z.B. in der Tierfütterung,
- als lipophiles Antioxidans, z.B. in sog. Antioxidantiencocktails zusammen mit den Vitaminen C und E, sowie
- als Zusatz in Lebensmitteln und Tabletten in ihrer Eigenschaft als Provitamin A.

Verschiedene Carotinoide sind als Lebensmittel-Farbstoffe zugelassen. Als oxidationsempfindliche und wasserunlösliche Stoffe werden sie v.a. in fetthaltigen Produkten (z.B. Butter) eingesetzt. Diese Eigenschaften sind aber hinderlich für eine kommerzielle Anwendung als Nahrungsergänzungsmittel („Nutraceutical“) für Lebensmittel bzw. als naturidentischer Farbstoff. Synthetisch hergestellte Carotinoide können so nicht direkt Lebensmitteln, Tierfutter oder Tabletten beigemischt werden, da sie in ihrer grobkristallinen Form weder Stabilität noch Färbekraft besitzen. Auch ist die Bioverfügbarkeit meist nicht ausreichend gewährleistet. Durch spezielle Formulierungsverfahren werden deshalb sog. Carotinoid-Mikronisate hergestellt, die

wasserlöslich und gegen Sauerstoff geschützt sind und somit in der Färbung wasserlöslicher Produkte, wie z.B. Fruchtsäfte oder Eis, eingesetzt werden können.

Zugelassene Carotinoid-Farbstoffe sind: β -Carotin (E160a; z.B. in Butter, Teigwaren, Limonaden), Annatto oder Bixin (E160b), Capsanthin oder Capsorubin (E160c), Lycopin (E160d), Lutein (E161b), Canthaxanthin (E161g)¹⁷. Die Farbpalette der Carotinoide reicht von gelb über orange bis zu einem dunklen rot.

Neben dem Einsatz als direkter Lebensmittelfarbstoff werden Carotinoide auch zur indirekten Lebensmittelfärbung über das Tierfutter (s. Kap. 5.6.4) eingesetzt¹⁸. Den Hühnern werden beispielsweise Carotinoide im Futter zugemischt, um dem Eigelb die charakteristische gelbe Farbe zu geben. Ebenso wird in der Aquakultur sowohl Astaxanthin in der kommerziellen Lachs- und Shrimpszucht als auch Canthaxanthin für den Hummer zur Pigmentierung eingesetzt.

Ein weiteres Einsatzgebiet, speziell von β -Carotin, ist die Supplementierung als Provitamin A in Lebensmitteln und Tabletten, sowohl in der kosmetischen als auch medizinischen Anwendung. Als einziges lipophiles Antioxidans neben den Tocopherolen (Vitamin E) werden Carotinoide zudem in formulierter Form in verschiedensten Antioxidantiencocktails beigemischt, z.B. in den sog. ACE-Fruchtsäften, welche die Antioxidantien und Vitamine A (meist als β -Carotin), C und E enthalten.

3.3 Carotinoide in der Natur

3.3.1 Vorkommen¹⁹

In der Natur sind über 600 verschiedene Carotinoide bekannt. Die gesamte Carotinoid-Produktion durch die Natur wird auf etwa 100 Millionen Tonnen pro Jahr geschätzt.

Carotinoide treten dabei in allen drei ursprünglichen Formen von Lebewesen auf, den Eubakterien, Archaeobakterien und Eukaryoten. Eine große Quelle für mehr als 100 Carotinoide sind Algen und Pilze. Pflanzen stellen die wichtigste Quelle an

Carotinoiden für den Menschen dar, da der humane wie auch der tierische Organismus Carotinoide selbst nicht synthetisieren kann (essentieller Pflanzenstoff).

Die carotinoid-typische Farbe wird bei Pflanzen häufig vom Grün der Chlorophylle überdeckt. In Laubblättern sind die Carotinoide in den Pigmentsystemen (Lichtfallen) der Chloroplasten enthalten, die unter dem Einfluss von UV-Licht wachsen und Chlorophyll unter photosynthetischen Bedingungen bilden. Sie wirken am Prozess der primären Lichtabsorption und Photonenkanalisation der Photosynthese mit und besitzen darüber hinaus oftmals eine wichtige chemische bzw. biomedizinische Relevanz (s. Kap. 3.3.3 und 3.4).

Auch in vielen Früchten, Pollen und Samen von Obst und Gemüse sind Carotinoide enthalten und für die Farbe verantwortlich. So beruht die rote Farbe der reifen Tomate (*Lycopersicon esculentum*) auf Anwesenheit des Carotins Lycopin. β -Carotin ist u.a. der Farbstoff der Möhrenwurzeln (*Daucus carota*). Es liegt in der Zelle zu einem großen Teil kristallin vor. Das weitverbreitete Xanthophyll der Blätter grüner Pflanzen, das Lutein, tritt in hohen Mengen in dunkelgrünem Blattgemüse, wie z.B. in Spinat oder Kohlsorten, auf. Zeaxanthin ist meist in geringer Konzentration neben Lutein enthalten, aber z.B. für die gelbe Farbe der Maiskörner (*Zea mays convar. saccharata*) verantwortlich.

Neben der Färbung einer Vielzahl von Früchten sind die Carotinoide zudem für die Farben von Blumen (Narzisse, Eschscholtzia), Vögeln (Flamingo, Kanarienvogel), Insekten (Marienkäfer) und Meerestieren (Lachs, Krebs) verantwortlich.

3.3.2 Biosynthese²⁰⁻²²

Die Biosynthese der Carotinoide ist in Abbildung 3 wiedergegeben. Sie findet zunächst analog der Synthese anderer Isoprenoide statt. In Pilzen werden die Carotinoide über den Mevalonat Weg aus Acetyl-CoA gebildet. In höheren Pflanzen dagegen findet die Biosynthese in den Chloroplasten bzw. Chromoplasten über den 1-Deoxyxylulose-5-phosphat-Weg zu Isopentenylpyrophosphat (IPP, aktives Isopren) statt.

Durch sukzessive Addition dreier Moleküle IPP an einem Molekül des Isomeren Dimethylallyl-Pyrophosphat DMAPP entsteht Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP), die Vorstufe für die Carotinoidsynthese. GGPP ist darüber hinaus auch die Vorstufe für die Synthese von Chlorophyllen, Gibberellinen und Tocopherolen.

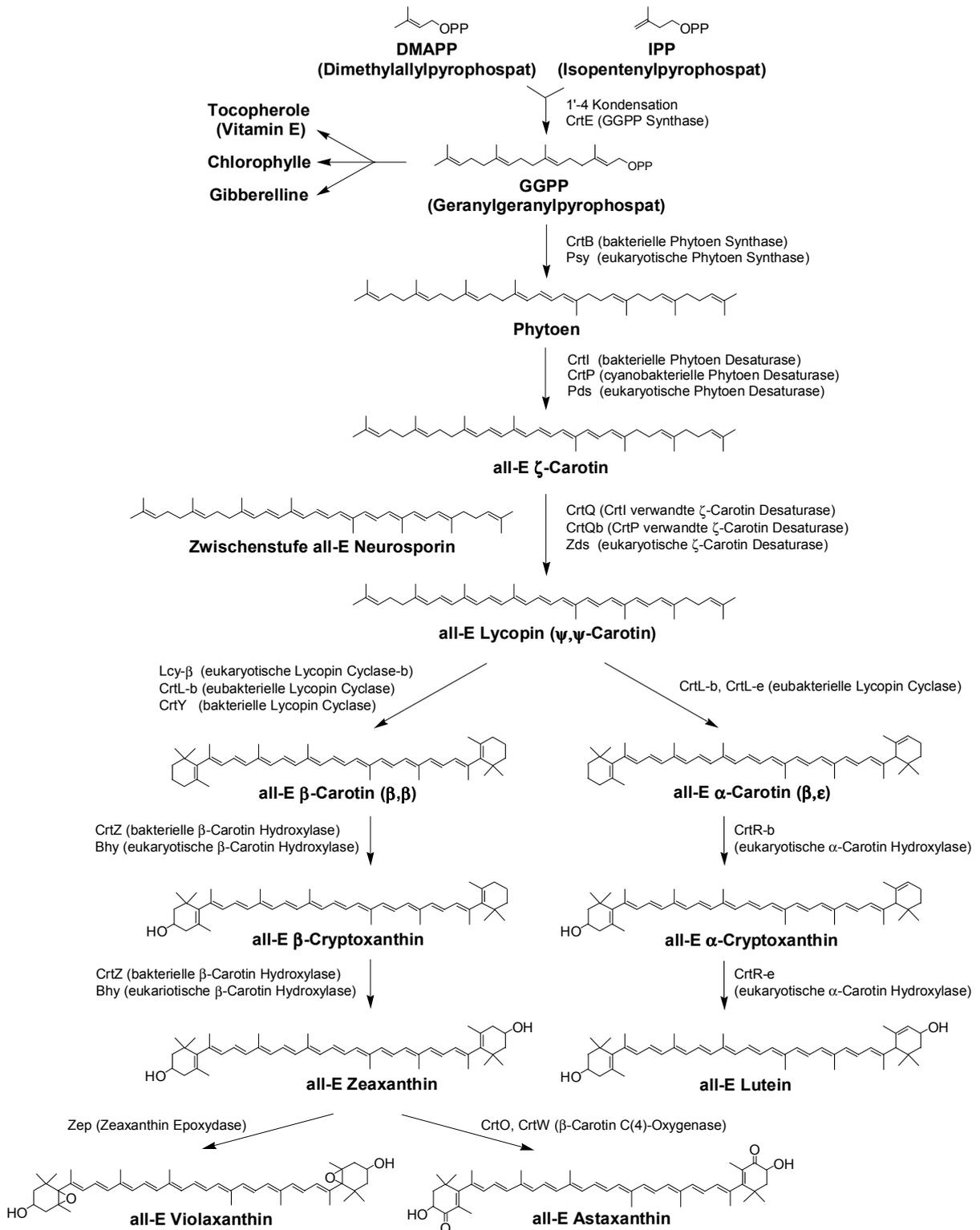


Abbildung 3: Schema der Carotinoid-Biosynthese

Durch eine vom Enzym Phytoen-Synthase katalysierte Schwanz-Schwanz-Addition zweier Moleküle GGPP wird die C₄₀-Verbindung Phytoen erhalten. Interessant hierbei ist, dass bei dieser und den folgenden Reaktionen nicht nur all-E Isomere gebildet werden, bei der Phytoen Synthase entsteht beispielsweise als Hauptisomer 15-Z Phytoen. Durch Desaturasen werden nun im Phytoengerüst sukzessive Doppelbindungen eingebaut. Dabei entsteht ζ-Carotin als Zwischenstufe, dessen Stereoisomere aus der Biosynthese von *Escherichia coli* in Kapitel 5.2.5 mittels HPLC-NMR Kopplung untersucht werden. Über weitere Zwischenstufen (Neurosporin) entsteht dann das rote Lycopin (ψ,ψ-Carotin) mit 13 Doppelbindungen, wovon 11 konjugiert sind. Lycopin ist Ausgangsstoff für die Synthese weiterer Carotinoide. So wird durch Zyklisierungsreaktionen Lycopin u.a. in α-Carotin (β,ε-Carotin) bzw. β-Carotin (β,β-Carotin) umgewandelt, aus denen dann durch zweifache Hydroxylierung Lutein bzw. Zeaxanthin gebildet wird.

3.3.3 Funktion

Carotinoide nehmen in der Pflanze die Funktion von Lichtrezeptoren bei einer Reihe lichtinduzierter Prozesse wahr. Die photosynthetischen Vorgänge laufen dabei in membrangebundenen hochorganisierten Proteinkomplexen ab. Man unterscheidet drei Arten von Komplexen: die Lichtsammelkomplexe (LHC), die in unterschiedlichen Formen auftreten und auch als Antennensystem bezeichnet werden, sowie die beiden Reaktionszentren von Photosystem I (PS I) und II (PS II). Die Carotinoide nehmen dabei innerhalb des Photosynthese geschehens mehrere Aufgaben wahr^{23,24}.

- Als Lichtsammelpigmente in den LHCs erhöhen sie die Energieausbeute bei der Photosynthese. Die Struktur des LHC-II in Chloroplasten ist nachfolgend in Abbildung 4 dargestellt²⁵. Jedes LHC enthält ein Polypeptid aus 232 Aminosäuren mit drei Transmembran-α-Helices. Am Peptid sind zwei Luteinmoleküle und 12 Chlorophyllmoleküle (sieben Chlorophyll a, fünf Chlorophyll b) gebunden. Der Energietransfer des durch Licht angeregten Carotinoids zu anderen Pigmenten, wie
-

Chlorophyll, ist der Initialprozess der Photosynthese und verläuft über einen Singulett-Singulett-Transfer.

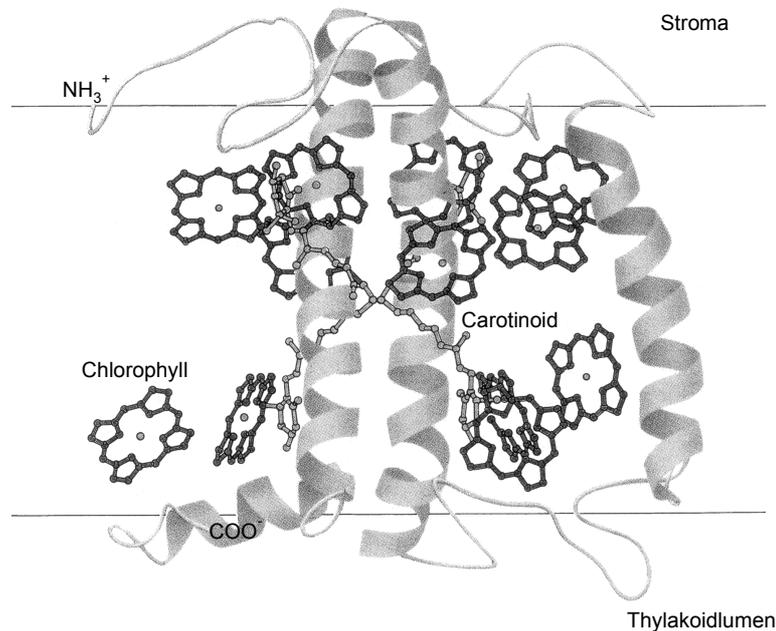


Abbildung 4: Struktur des Lichtsammelkomplexes LHC-II

- Bei hoher Lichtintensität kann besonders das Chlorophyll dimer im PS II aus dem angeregten Singulettzustand in den Triplettzustand übergehen. Carotinoide haben photoprotektive Wirkung, indem sie den Triplettzustand des Chlorophylls quenchen, wobei die übernommene Energie als Wärme frei wird. Carotinoide sind dafür bekannt, dass sie Anregungsenergie schnell als Wärme verlieren und dabei in den Grundzustand zurückkehren.
- Triplett-Chlorophyll reagiert mit Sauerstoff, dabei entsteht Singulett-Sauerstoff, der das Reaktionszentrum schädigen kann. Carotinoide, die in jedem Reaktionszentrum vorkommen, reagieren als Radikalfänger mit Singulett-Sauerstoff und führen ihn in den Triplettzustand zurück.
- Überschüssige Energie kann durch Carotinoide von angeregtem Chlorophyll im Singulettzustand übernommen und wieder als Wärme freigesetzt werden. Diese Photoprotektion der Zellen ist thermodynamisch aber nur möglich, wenn das Carotinoid zehn oder mehr konjugierte Doppelbindungen enthält. Zeaxanthin mit elf konjugierten Doppelbindungen ist das wirkungsvollste photoprotektive Caro-

tinoid in höheren Pflanzen. Pflanzen besitzen die Möglichkeit, ihre photoprotektive Wirkung mit Hilfe des Xanthophyllzyklus (s. Abbildung 5) zu regulieren²⁶. Zeaxanthin ist unter Normalbedingungen nur in geringer Konzentration in Chloroplasten enthalten. Bei starker Beleuchtung wird das Thylakoidlumen stärker angesäuert, was zur Aktivierung einer im Lumen löslichen Violaxanthin-Deepoxydase führt, die über Antheraxanthin Zeaxanthin bildet. Bei Schwachlicht sorgt eine Epoxidase für die Rückreaktion. In vollem Sonnenlicht werden bis zu 50% der Energie absorbierter Photonen durch Zeaxanthin unschädlich gemacht.

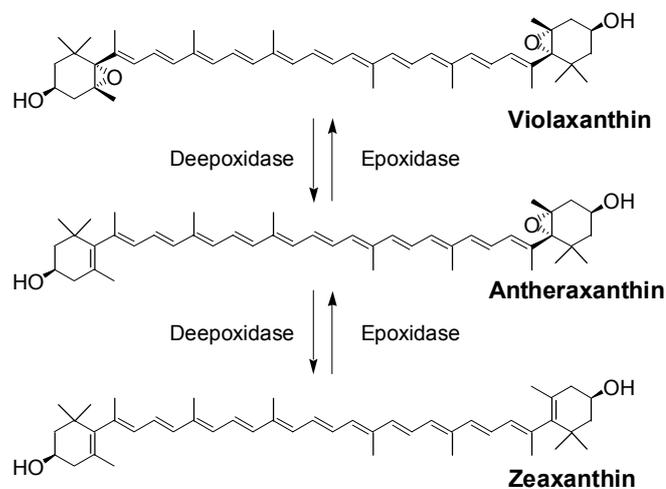


Abbildung 5: Xanthophyllzyklus zur Regulierung der photoprotektiven Wirkung

- Die Thylakoidmembran in Chloroplasten grüner Laubblätter enthält stets die vier Carotinoide β -Carotin, Lutein, Violaxanthin und Neoxanthin. Ihre Farbe tritt im Herbstlaub hervor (Herbstfärbung), wenn im Verlauf der Seneszenz der Laubblätter das Chlorophyll abgebaut wird und die Chloroplasten in Chromoplasten umgewandelt werden. Ähnliches geschieht bei der Fruchtreifung, bei der die Umwandlung von Chloroplasten mit einer Synthese und Akkumulation von Carotinoiden einher geht. Die Carotinoide der Chromoplasten können membrangebunden, in Lipidtropfen oder als Kristalle vorliegen, wobei letztere schließlich als Kristalle ins Cytoplasma ausgestoßen werden (z.B. die Carotin-Kristalle im Speichergewebe der Karotte).

In Blütenblättern und Früchten haben Carotinoide zusätzlich eine wichtige Bedeutung als Lockfarben für Tiere.

3.4 Carotinoide in der Prävention

3.4.1 Carotinoide im Organismus

Tierische Organismen können Carotinoide selbst nicht synthetisieren, daher stammen deren Carotinoide vollständig aus pflanzlicher Nahrung. Sie können die aufgenommenen Carotinoide jedoch umwandeln, beispielsweise Zeaxanthin in Astaxanthin. In der Nahrungskette können 50 Carotinoide nachgewiesen werden, die im Organismus absorbiert und metabolisiert werden.

Carotinoide finden sich im Organismus u.a. in der Haut bzw. im Panzer, in Schnabel und Gefieder von Vögeln, in der Muttermilch, im Blutplasma, in den Keimdrüsen (z.B. Gelbkörper), in vielen Organen, sowie in den Augenpigmenten. Im menschlichen Serum sind bislang 15 Carotinoide sowie weitere 8 Metaboliten identifiziert.

3.4.2 Bioverfügbarkeit von Carotinoiden²⁷

Für Menschen und Tiere, die Vitamin A zum normalen Wachstum und zur Entwicklung des Körpers benötigen, ist die ausreichende Aufnahme und Metabolisierung von Carotinoiden von entscheidender Bedeutung. Das weit verbreitete Vorkommen von Carotinoiden in Obst und Gemüse in Verbindung mit ihrer protektiven Wirkung im Organismus unterstreicht zusätzlich die Notwendigkeit der Untersuchung von Aufnahme, Transport und Metabolismus der Carotinoide im menschlichen Körper (s. Kap. 5.5). Besonders im Hinblick auf die selektive Wirkung einzelner Carotinoide an bestimmten Zielorganen muss eine differenzierte Betrachtung der Bioverfügbarkeit von Carotinoiden für den Menschen in Betracht gezogen werden.

Die Bioverfügbarkeit der Carotinoide ist sehr eng an die Fettresorption gekoppelt. Daraus ergibt sich, dass die Anwesenheit von Fett die Bioverfügbarkeit von Carotinoiden entscheidend verbessert. Auch andere Faktoren spielen eine entscheidende Rolle. So beeinflusst die Art der Zubereitung, die mechanische

Zerkleinerung im oberen Verdauungstrakt, sowie der pH-Wert im Magen die Freisetzung von Carotinoiden aus ihrer pflanzlichen Zellmatrix^{28,29}. Verarbeitete Carotinoide, wie z.B. pürierte oder gekochte Karotten sind mit einer deutlich gesteigerten Carotinoid-Aufnahme im Körper korrelierbar^{30,31}.

Die Bioverfügbarkeit verschiedener Carotinoide oder sogar Stereoisomere ist nicht zwingend gleich^{32,33}. Für Lycopin konnte bei Frettchen festgestellt werden, dass die Z-Isomere in Serum (52%), Leber (58%) und besonders Lymphe (77,4%) im Vergleich zum natürlichen all-E Lycopin stark angereichert wurden³⁴.

Die Aufnahme der Carotinoide im Dünndarm findet dabei wie folgt statt. Die in Fettemulsion vorliegenden Carotinoide werden mit Gallensäuremizellen als Transportstoff durch die Membran der Dünndarmzellen passiv aufgenommen, was die Aufnahme von Carotinoiden limitiert. In den Enterozyten werde sie dann in Chylomikronen verpackt und gelangen über die Lymphbahnen ins Blut und schließlich zur Leber. Carotinoide werden ausschließlich in den Fett-Transportpartikeln, den Lipoproteinen VLDL (very low density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein) und HDL (high density lipoprotein) transportiert, die von der Leber sezerniert werden³⁵. Dabei sind in den VLDL und LDL hauptsächlich Carotine vorhanden, während Xanthophylle in LDL und HDL gleichermaßen vorkommen. Die Carotinoide verweilen nach einmaliger Gabe etwa 1-2 Wochen im Körper.

3.4.3 Protektive Eigenschaften von Carotinoiden

Wie anderen sekundären Pflanzenstoffen wird auch den Carotinoiden eine gesundheitsfördernde Wirkung zugesprochen³⁶. Sie beeinflussen die menschliche Gesundheit in verschiedenen Bereichen. So können sie einen Beitrag dazu leisten,

- einen ausreichenden Vitamin A-Spiegel im Körper zu gewährleisten,
 - in ihrer Funktion als Antioxidantien den Organismus vor Schädigungen durch freie Radikale zu schützen und so oxidativen Stress verhindern,
-

- das Risiko, an bestimmten Krebsarten zu erkranken, zu minimieren,
- das Auftreten von Herzkrankheitskrankheiten zu verringern, sowie
- die Entstehung von Katarakten zu vermeiden.

Etwa 50 Carotinoide besitzen Provitamin A-Aktivität, d.h. sie sind zur Bildung von Retinol (Vitamin A) fähig³⁷. Dabei ist die Struktur der Carotinoide von entscheidender Bedeutung. Voraussetzung ist ein unsubstituierter β -Iononring, weshalb β -Carotin die größte Vitamin A-Aktivität zugesprochen wird. Etwa ein Drittel der durch Nahrung aufgenommenen Carotinoide wird im Dünndarm resorbiert und zu Retinol umgewandelt. Wichtig dabei ist, dass die Carotinoide, die in der Leber und überwiegend im Fettgewebe gespeichert werden, unverändert resorbiert und bei Bedarf zu Vitamin A gespalten werden kann, entweder an ihrer zentralen Doppelbindung oder aber an einer oder mehreren exzentrischen Doppelbindungen³⁸. Vitamin A-Mangel kann ernährungsbedingt auftreten, v.a. in Ländern der dritten Welt. Die Weltgesundheitsorganisation WHO schätzt, dass bis zu 500.000 Kinder der dritten Welt pro Jahr an den Folgen einer Hypovitaminose A erblinden³⁹.

Schließlich belegen zahlreiche medizinische Studien die Wirkung zahlreicher Carotinoide als Radikalfänger^{40,41}. Als Antioxidantien hemmen oder verzögern sie natürliche Oxidationsprozesse. Derartige Oxidationen werden durch Sauerstoff oder „freie Radikale“ ausgelöst, die durch das Einwirken der UV-Strahlen des Sonnenlichts entstehen. Inzwischen gibt es Hinweise dafür, dass freie Radikale an der Progression der wichtigsten Volkskrankheiten, wie z.B. koronare Herzkrankheiten, Arteriosklerose oder Krebs beteiligt sind. Carotinoide quenchen, chemisch und physikalisch, Singulett-sauerstoff und fangen freie Radikale ab und verhindern so oxidativen Stress. Deshalb wird ihnen eine protektive Wirkung gegen diese Krankheiten zugeschrieben.

Für die protektive Wirkung von Carotinoiden gegen z.B. Herzkrankheiten, Arteriosklerose, verschiedene Arten von Krebs oder bestimmte Augenkrankheiten, sowie als Hautschutz, wird meist eine inverse Korrelation zwischen Carotinoid-Serumkonzentration und einem bestimmten Marker als epidemiologischen Beweis angeführt. Um die Zusammenhänge zwischen Ernährung und Krankheiten zu

erforschen, werden verschiedene epidemiologische Studientypen angewandt⁴²:

- Bei sogenannten Fall-Kontroll-Studien werden Daten von Patienten mit denen gesunder Menschen verglichen.
- Bei prospektiven Kohortenstudien begleitet man verschiedenste Menschen über Jahre hinweg und vergleicht dann ihren etwaigen Krankheitsverlauf mit z.B. Lebens- oder Essgewohnheiten.
- In Interventionsstudien werden mögliche protektive oder therapeutische Substanzen direkt am Menschen, mit gezielter kontrollierter Supplementierung getestet.

Bei über 200 Carotinoid-Studien weltweit zu verschiedensten Krankheiten sind positive Korrelationen zwischen Plasmaspiegel und vermindertem Krankheitsrisiko gegeben. Sie sind jedoch oft nicht statistisch signifikant und daher wissenschaftlich nicht eindeutig. Anfang der 90er Jahre erschütterten drei Interventionsstudien die euphorische Stimmung für Carotinoide als protektiver Wirkstoff gegen Krebs.

- In der sogenannten ATBC- oder Finnlandstudie⁴³ stieg die Lungenkrebsrate sowie die Sterblichkeit bei 30.000 untersuchten Rauchern, die eine tägliche Dosis von 20 mg β -Carotin einnahmen, signifikant an.
- Die CARET-Studie⁴⁴ wurde vorzeitig abgebrochen, als die Lungenkrebsrate sowie die Sterblichkeit bei 18.000 untersuchten Rauchern sowie Asbestarbeitern signifikant anstieg. Die verabreichte Dosis betrug hier 30 mg β -Carotin täglich.
- Die auf 12 Jahre angelegte Physicians Health Study (PHS)⁴⁵ erbrachte bei 22.000 Ärzten (davon 11% Raucher) und einer Dosis von 50 mg β -Carotin bitäglich keine Korrelation, weder positiv noch negativ.

Die Interventionsstudien zeigten deutlich, dass eine Supplementierung mit β -Carotin bei Risikogruppen schadet und sogar einen procarcinogenen Effekt bewirkt. Diese Ergebnisse an vorbelasteten Probanden dürfen aber keinesfalls als grundsätzliches Argument gegen die präventiven Eigenschaften der Carotinoide verallgemeinert werden, da sie wissenschaftlich begründet sind, u.a. auf die extrem hohen Dosen, weit über dem physiologischen Wert⁴⁶.

Als Fazit kann man sagen, dass bei der Erforschung einer möglichen protektiven Wirkung von Carotinoiden gegen bestimmte Krankheiten Studien mit jedem möglichen Ergebnis bekannt sind. Infolge der Interventionsstudien von 1994 und dem zusätzlichen Fortschritt in der Analytik von Carotinoiden sind die Studien der letzten fünf Jahre weitaus verlässlicher. Sie sind besser konzipiert und betrachten die Korrelationen mit einem kritischen Hintergrund. Außerdem wird nun auch zunehmend die Wirkung einzelner Carotinoide untersucht, nicht nur β -Carotin, sondern z.B. auch Lycopin oder Lutein. Eine positive Korrelation von Carotinoiden gilt für nachfolgende Krankheiten, aufgelistet in Tabelle 2, als gesichert. Als Basis liegen weit über 100 Studien der letzten 10 Jahre zugrunde.

Krankheit	Effekt
Arteriosklerose ⁴⁷ und koronare Herzkrankheiten (KHK) ^{48,49}	präventive Wirkung von β -Carotin, sowie vermehrt auch Lycopin, gilt als sicher
Herz-, Kreislauferkrankungen (CVD) ⁵⁰	Infolge der antioxidativen Wirkung der Carotinoide gegen oxidativen Stress unbestritten
Krebserkrankungen ^{48,51,52} , v. a. Prostata- ^{53,54} , Haut- ⁵⁵ , Kolon- ⁵⁶ , aber auch Brust- ^{57,58} und Lungenkrebs ^{43-45,59}	Neben meist nicht signifikanten Korrelationen von Carotinoiden im Allgemeinen zeigen β -Carotin (Haut), Lycopin (Prostata) und Lutein (Kolon) vermehrt signifikante Korrelationen
Katarakt ⁶⁰⁻⁶³	Lutein und Zeaxanthin zeigen in mehreren Studien eine signifikante Korrelation
altersbedingte Makuladegeneration (AMD) ^{48,54,64-66}	Supplementierung von Lutein und Zeaxanthin bewirkt eine Erhöhung der Makulapigment-Dichte

Tabelle 2: Effekte von Carotinoiden auf bestimmte Krankheitsverläufe

Weiterhin ist aber nicht geklärt, wie Carotinoide oder Antioxidantien, die über die Nahrung oder Lebensmittel mit aufgenommen werden, interagieren und die protektiven Wirkungen beeinflussen. Außerdem ist bei keiner Studie bisher geklärt worden, welche Konfiguration, d.h. welches geometrische oder optische Isomer für die Protektion verantwortlich ist.

3.4.4 Carotinoide in der Retina - Lutein und Zeaxanthin

Vor mehr als fünfzig Jahren wurden Carotinoide als farbgebende Pigmente in der menschlichen Retina (Netzhaut) identifiziert⁷. Die höchste Konzentration an Carotinoiden wurde in dem Bereich der Retina detektiert, wo die Sehachse auf die Retina fällt (s. Abbildung 6). Dieser Bereich des schärfsten Sehens wird als Makula Lutea bzw. auf Grund ihrer gelben Pigmentierung als gelber Fleck bezeichnet.

Das Makulapigment setzt sich dabei aus den Xanthophyllen Lutein und Zeaxanthin zusammen. Die Verteilung von Lutein und Zeaxanthin über die gesamte Retina korreliert nicht miteinander und variiert beträchtlich (s. Kap. 5.6.2).

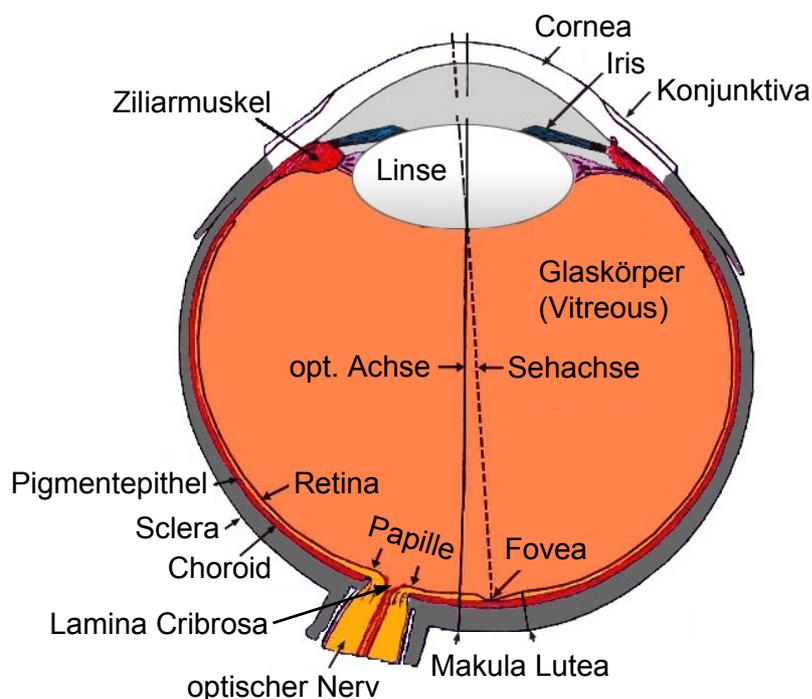


Abbildung 6: Schnitt durch das menschliche Auge (schematisch)

Über die gesamte menschliche Retina sind ungefähr 126 Millionen Photorezeptoren zur Reizaufnahme auf einer Fläche von ca. $1,1 \text{ cm}^2$ verteilt, davon etwa 120 Millionen hell-dunkel-empfindliche Stäbchenrezeptoren und sechs Millionen farbempfindliche Zapfenrezeptoren⁶⁷. Die langen und schlanken Stäbchen sind vorwiegend in der Peripherie der Netzhaut angesiedelt und verantwortlich zur Wahrnehmung von Hell-Dunkel-Kontrasten. Die für das Farbsehen und die scharfe Bildwahrnehmung verantwortlichen kurzen und dickbäuchigen Zapfen haben ihre größte Konzentration in der Fovea. Die Fovea, die nur bei Primaten bekannt ist, ist eine grubenartige Vertiefung von etwa 1,1 mm Länge an der Stelle der Retina, wo die Sehachse auf die Retina fällt. Sie ist etwa $11,8^\circ$ oder 3,4 mm temporal vom Blinden Fleck entfernt⁶⁸. Die Fovea enthält keine Stäbchen, sondern ausnahmslos Zapfen, und auf Grund ihrer Vertiefung ist die Retina dort stark verdünnt. Dadurch kann einfallendes Licht unmittelbar die Sinneszellen erreichen.

Die Region um die Fovea, mit der höchsten Konzentration an Zapfen, wird als Makula Lutea bezeichnet. Sie hat einen Durchmesser von etwa 2-3 mm und in ihr sind auch die Makulapigmente Lutein und Zeaxanthin am stärksten angereichert, wie in Abbildung 7 (links) am Beispiel einer gesunden Humanretina aufgezeigt.

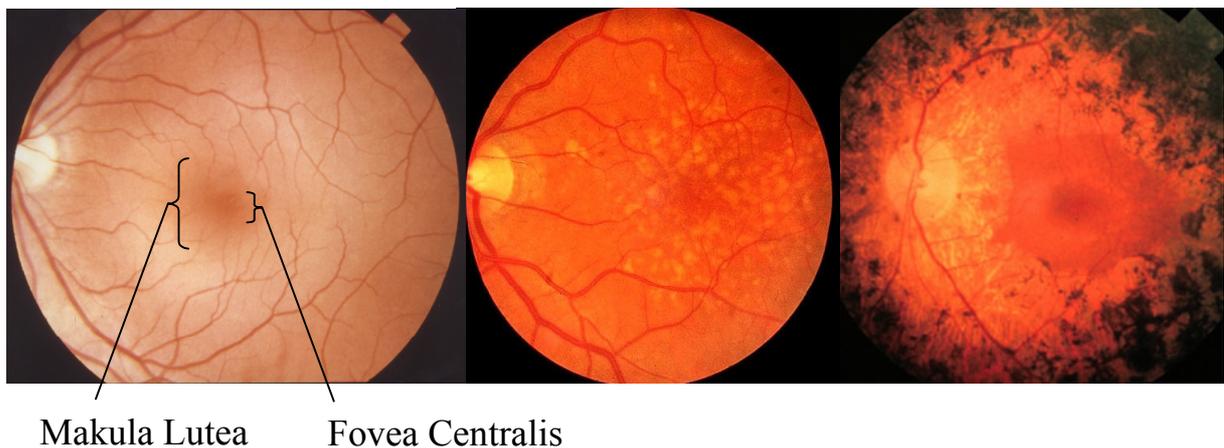


Abbildung 7: Aufsicht auf eine gesunde Humanretina (links), eine Humanretina mit AMD (mitte), sowie eine vollständig degenerierte Humanretina (rechts)

Das wissenschaftliche Interesse an den Makulapigmenten Lutein und Zeaxanthin beruht auf ihrer postulierten protektiven Wirkung gegen bestimmten Formen von retinalen Degenerationen, und hier insbesondere gegen die altersbedingte

Makuladegeneration (AMD, bzw. ARMD, engl. für age-related macular degeneration).

Die AMD gilt in den industrialisierten Ländern als eine der häufigsten Ursachen für Erblindung. Die fortschreitende Zerstörung der Netzhautmitte führt bei den Betroffenen zu einer Abnahme der zentralen Sehschärfe mit verzerrtem Sehen, Verlust des Lesevermögens und schließlich einem ausgedehnten Ausfall im zentralen Gesichtsfeld. Die Degenerationen finden vorwiegend in den Randbezirken der Retina statt (s. auch Abbildung 7 mitte und rechts), da dort die Pigmentierung wesentlich schwächer ist als in der Makula Lutea⁶⁹. In Deutschland leiden 25 Prozent aller Menschen über 65 Jahren an einer Makuladegeneration. Bei etwa sieben Prozent der über 75-Jährigen ist der Verlust der zentralen Sehschärfe gegeben. Von der AMD sind aber nicht nur ältere Menschen betroffen. Es gibt auch die sog. juvenile AMD, bei der die selben Symptome schon im Kindesalter auftreten können.

Als Ursache für die AMD werden Sonnenlichtexposition, Autoimmunreaktionen sowie insbesondere Stoffwechselstörungen diskutiert. Charakteristisch ist die vermehrte Ablagerung von verbrauchtem Material aus dem physiologischen Abbau (Phagozytierung) von Photorezeptoren in der Retina, die mit einer Unterversorgung der Sinneszellen mit Sauerstoff und Nährstoffen einher geht⁶⁹. Die AMD ist aber auch erheblich von Ernährungs- und Umweltfaktoren abhängig und kann auch eine genetische Disposition besitzen. Eine wirksame Therapie zur kausalen Behandlung der Degeneration existiert bisher nicht.

Die schützende Wirkung von Lutein und Zeaxanthin in der Retina beruht auf folgenden Effekten. Die Pigmentierung dient einerseits der Protektion des Gewebes vor lichtinduzierter Bildung von Lipidperoxiden. Andererseits können Carotinoide freie Radikale quenchen, und damit den oxidativen Stress vermindern. Zudem absorbieren sie energiereiche Wellenlängen im blauen Spektralbereich und bieten somit Schutz vor phototoxischen Schäden. Da die Aktivität der endogenen antioxidativen Mechanismen im Alter sukzessive abnimmt, kommt der ausreichenden Konzentration an absorbierenden und antioxidativen Pigmenten in der Makula eine vermehrte protektive Bedeutung zu.

Die enge Beziehung zwischen den Makulapigmenten Lutein und Zeaxanthin und wahrscheinlich lichtinduzierten oxidativen und photochemischen Vorgängen in der Retina kann dadurch verdeutlicht werden, dass nicht nur die natürlichen all-E Konfigurationen in der Retina identifizierbar sind, sondern auch verschiedene Z-Stereoisomere sowie oxidative Metaboliten (s. Kap. 5.6)⁷⁰.

Erste epidemiologische Studien zu diesem Thema zeigten eine Korrelation zwischen hohem Antioxidationsstatus, dargereicht als Cocktail bestehend aus den Vitaminen C und E, Selen sowie β -Carotin, und signifikant verringertem Risiko einer Entwicklung der AMD⁷¹.

Den Beweis einer Korrelation zwischen dem erhöhten Konsum von carotinoidreicher Nahrung und vermindertem Auftreten der AMD erbrachte 1993 eine Fall-Kontroll-Studie^{72,73}. Hier hatten Personen, die eine carotinoidreiche, aus Früchten und Gemüse bestehende Nahrung aufnahmen, ein um 57% geringeres Risiko, an AMD zu erkranken, als Vergleichspersonen ohne carotinoidreiche Nahrung. Die Korrelation war dabei bei denjenigen Personen signifikant am stärksten, die dunkelgrünes Blattgemüse mit einem hohen Anteil an Lutein und Zeaxanthin zu sich nahmen.

Andere Ernährungsstudien mit einer an Lutein⁷⁴⁻⁷⁶ oder Zeaxanthin⁷⁷ reichen Diät führte bei Probanden nach einigen Wochen zu einer erhöhten Dichte des Makulapigments. Dieser Effekt war auch noch mehrere Monate nach Beendigung der Diät detektierbar. Wie bei den meisten Ernährungsstudien, und v.a. wie bei den meisten Carotinoidstudien gibt es aber auch Untersuchungen, bei denen keine Korrelation festgestellt wurde, was aber auch an der bei weitem geringeren Anzahl Probanden liegen könnte⁷⁸.

Auch bei anderen Degenerationen können die Makulapigmente in ihrer Eigenschaft als Provitamin A protektiv wirken. So verlangsamt das als Antioxidans wirkende Vitamin A den progressiven Verlauf der genetisch bedingten retinalen Degeneration vom Retinitis pigmentosa (RP)-Typ⁷⁹.

4 Analytik von Carotinoiden in biologischen Geweben

4.1 Schonende Extraktion von instabilen Analyten

In der Analytik von komplexen Proben haben sich die Chromatographie, die Elektrophorese sowie die Spektroskopie einen festen Platz gesichert. Für die Bestimmung von Analyten, die in komplexen Matrices gebunden sind, wie z.B. in Plasma, Serum, Urin oder Gewebe, benötigt man aber auch eine genau auf den Analyten und die Matrix zugeschnittene Probenvorbereitung. Die Probenvorbereitung umfasst dabei die Schritte der

- Probenvorbehandlung,
- Extraktion,
- Aufreinigung, sowie
- Aufkonzentrierung

des Analyten. Dabei ist für die quantitative Bestimmung des Analyten eine vollständige, reproduzierbare und artefaktfreie Extraktion unabdingbar. Gerade die schonende Extraktion von instabilen Analyten, wie beispielsweise von Carotinoiden, stellt eine fortwährende Herausforderung für den Analytiker dar. Da es auf Grund dieser Voraussetzungen keine universelle Methode zur Extraktion von Analyten aus unterschiedlichsten biologischen Proben gibt, ist die Probenaufbereitung oft der zeitaufwendigste und arbeitsintensivste Arbeitsschritt einer Analyse, sowie die Hauptursache für Ungenauigkeiten und Fehler.

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden große Fortschritte in den Extraktionsmethoden erzielt. Neben der Flüssig-Flüssig-Extraktion werden zunehmend verschiedene schonende Festphasenextraktionsmethoden für die Isolierung von biomedizinischen Substanzen eingesetzt. Die Entwicklung der Kopplungsverfahren von Extraktionsmethoden mit der HPLC und diversen Spektroskopiearten erleichtert zudem die simultane Isolierung, Aufkonzentrierung, Trennung sowie eindeutige

Identifizierung von licht- und sauerstoffempfindlichen Verbindungen aus biologischen Geweben. Darüber hinaus ist die Anwendung von Kopplungstechniken mit einer drastischen Reduzierung der Analysenzeit verbunden, was für ein effizientes Screening von pharmakologischen Proben essentiell ist.

4.1.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Das Prinzip der Flüssig-Flüssig-Extraktion beruht auf der Verteilung der Analytmoleküle zwischen einer flüssigen Phase und einem damit nicht mischbaren Lösungsmittel. Der Stoffaustausch zwischen den beiden Phasen erfolgt bis zur Gleichgewichtseinstellung. Die Flüssig-Flüssig-Extraktion hat einige gravierende Nachteile:

- Der Verbrauch an organischen Lösungsmitteln ist sehr hoch,
- sie ist limitiert auf miteinander nicht mischbare Lösungsmittel,
- schwer automatisierbar,
- sehr zeitaufwendig, sowie
- mit vielen potentiellen Fehlerquellen behaftet.

Infolge der schlechten Aufkonzentrierung ist ein Einengen der hohen Lösungsmittelmenge unter erhöhter Temperatur erforderlich. Deswegen und durch die lange Zeitdauer werden instabile Analytmoleküle, wie z.B. Carotinoide über einen langen Zeitraum Licht, Luftsauerstoff und Hitze ausgesetzt und neigen somit zu Isomerisierung und Zerstörung.

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion ist also nicht die Methode der Wahl zur schonenden Anreicherung. Dennoch kann sie unter gewissen Bedingungen schonend verlaufen, wie die Analyse von Carotinoiden aus humanen Serumproben zeigt (s. Kap. 5.2.4). Dieses vom U.S. Landwirtschaftsministerium (USDA) geprüfte Verfahren der Tufts University Boston setzt u.a. die Arbeit unter Ausschluss von Sonnenlicht sowie das Einengen der Lösungsmittel im Stickstoffstrom bei Raumtemperatur voraus⁸⁰.

4.1.2 SPE-HPLC-Kopplung (on-line SPE)

Die Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) hat sich im Verlauf der letzten 20 Jahre zur leistungsstärksten Methode der selektiven Anreicherung von Analyten mit einer großen Anwendungsbreite entwickelt⁸¹.

Das Prinzip der SPE beruht auf der Abtrennung eines oder mehrerer Analyten aus einer flüssigen Probe durch selektive Verteilung zwischen einer festen Phase (Sorbens) und einer flüssigen Phase, genau wie bei der Flüssigchromatographie. Zur Durchführung der SPE muss die Probe flüssig sein oder gelöst vorliegen. Zwischen den verschiedenen Komponenten der Probe muss ein Polaritätsunterschied bestehen, ansonsten kann keine (Ab-) Trennung erfolgen.

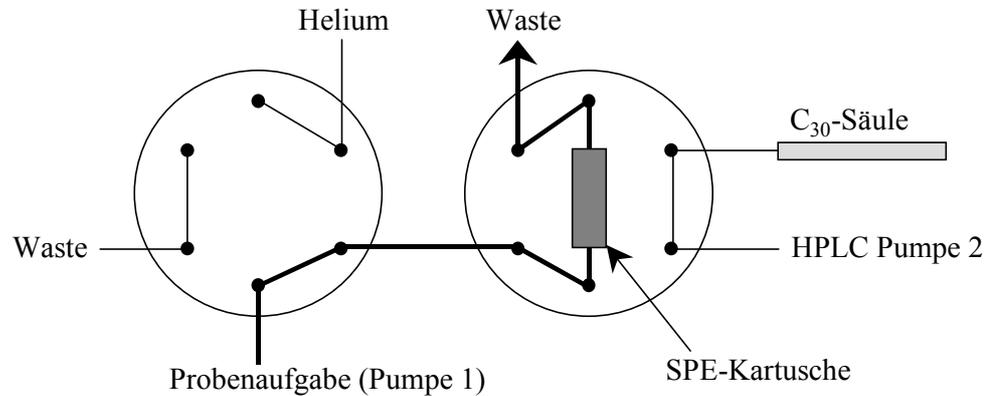
Die zunehmende Probenanzahl und die erhöhten Anforderungen an deren Analyse erfordern die Entwicklung vollständig automatisierter Analyseverfahren mit hohem Probendurchsatz. Bei der HPLC-Analyse von komplexen biologischen Proben, speziell Flüssigkeiten, kann dieses Ziel dadurch erreicht werden, dass die selektive und extraktive Probenaufarbeitung in das konventionelle HPLC-System integriert wird, wobei eine Säulenschaltung verwendet wird. Damit ist die SPE-HPLC-Kopplung eine ideale Methode zur Anreicherung von licht- und sauerstoffempfindlichen Substanzen⁸². Ihre Vorteile sind

- eine einfache Automation,
- eine vollständige Probeninjektion auf die SPE-Kartusche,
- ein direkter Transfer auf die HPLC-Trennsäule unter Lichtausschluss,
- eine Minimierung des Probenhandlings und des Lösungsmittelverbrauchs,
- eine hohe Ausbeute rate,
- eine gute Reproduzierbarkeit, sowie
- eine hohe Aufkonzentrierung und Aufreinigung.

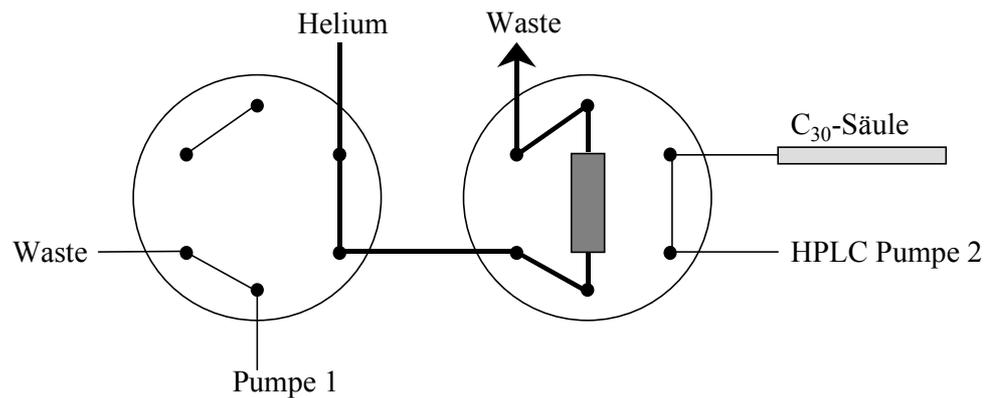
Als Sorbentien werden meist reversed-phase (RP-) Materialien eingesetzt. So sind viele oberflächenmodifizierte Kieselgele (u.a. mit Alkyl-, Hydroxyl-, Amino- oder

Phenylresten) applizierbar. Außerdem stehen verschiedene nichtquellbare Polymere als Sorbentien zur Verfügung. Infolge dieser hohen Bandbreite an Sorbentien kann die SPE auf fast alle Analyten angewandt werden⁸³.

a) Anreicherung des Analyten



b) Trocknungsschritt



b) Transfer in die HPLC

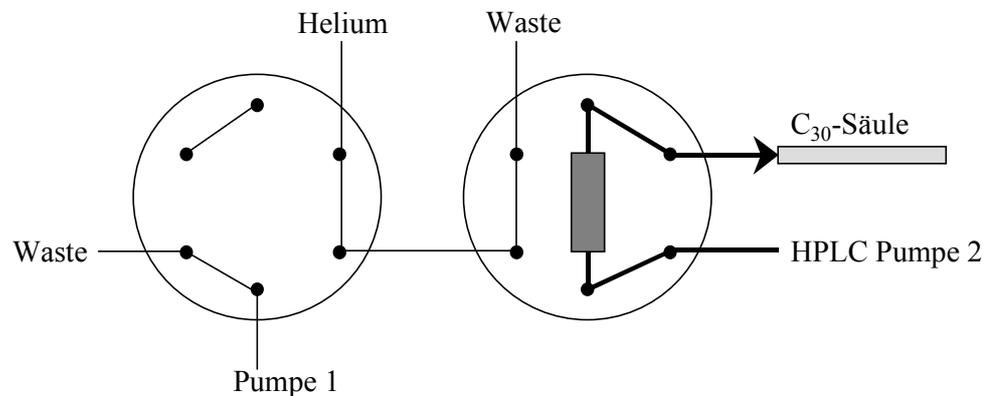


Abbildung 8: Durchführung der SPE-HPLC-Kopplung

Die Durchführung der SPE-HPLC-Kopplung ist in Abbildung 8 schematisch dargestellt. Die SPE-Kartusche ist dabei in die Injektionsschleife (Loop) der HPLC-Anlage eingebaut und kann, je nach Ventilschaltung, in zwei voneinander unabhängige Kreisläufe geschaltet werden.

Während die HPLC-Anlage konditioniert wird, ist die SPE-Kartusche an eine externe Pumpe 1 geschaltet (Abb. 8a). Zuerst wird dabei das Sorbensmaterial mit einem geeigneten Lösungsmittel benetzt (solvatisiert), um eine reproduzierbare Wechselwirkung zwischen Sorbens und Probe zu gewährleisten. Danach wird die SPE-Kartusche mit einem der Probenmatrix ähnlichen Lösungsmittel äquilibriert. Erst im Anschluss folgt die Probenaufgabe. Danach kann die SPE-Kartusche sofort mit einem Lösungsmittel gewaschen werden, in dem sich der Analyt nur schlecht oder gar nicht löst. Die Analytmoleküle retardieren vollständig, während etwaige Interferenzen eluiert werden. Im Anschluss wird durch einfaches Drehen des Ventils Helium durch die Kartusche geleitet. (Abb. 8b) Dadurch werden Lösungsmittelmoleküle zwischen den Partikeln und Poren des Sorbens entfernt, die die Trennung in der HPLC stören könnten, sowie das SPE-Sorbens mitsamt Analyt getrocknet. Eine weitere Ventilschaltung bringt die SPE-Kartusche zwischen die HPLC-Pumpe und die Trennsäule (Abb. 8c). Durch die in der HPLC verwendete mobile Phase anderer Polarität kann der Analyt nun von der SPE-Kartusche eluiert und auf der HPLC-Säule getrennt werden.

4.1.3 RAM-HPLC-Kopplung

Als RAM-SPE-Kopplung wird eine der SPE-HPLC-Kopplung verwandte Methode der Extraktion und Anreicherung von Analyten aus biologischen Flüssigkeiten bezeichnet, bei der eine Fraktionierung der Probe in Analyt und Matrix während der Probenaufbereitung im Vordergrund steht. Dies geschieht durch Verwendung neuartiger, maßgeschneiderter Adsorbentien, die in die SPE-Kartusche gepackt sind⁸⁴.

Die Aufbereitung (Fraktionierung) der Probe in Analyt und Matrix mit Hilfe dieser poröser Adsorbentien beruht auf der simultanen Durchführung zweier

unterschiedlicher chromatographischer Trennprinzipien. Einerseits werden niedermolekulare Analytmoleküle selektiv mittels Adsorptions- oder Affinitätschromatographie von den Sorbenmaterialien zurückgehalten. Andererseits erfolgt eine sterische Ausschlusschromatographie von makromolekularen Probenkomponenten.

Diese sogenannten „Restricted Access“ Materialien (RAM) bestehen aus sphärischen Partikeln mit einer Größe von 25 μm , was eine hohe Flussrate ermöglicht. Sie besitzen unterschiedliche Eigenschaften auf ihrer Oberfläche und in ihren Poren, welche eine genau definierte Zugänglichkeit durch die Porengröße von etwa 6 nm aufweisen⁸⁵. Die Zugänglichkeit beschreibt eine physikalische oder chemische Ausschlussbarriere. Die Struktur eines RAM-Partikels einer LiChrospher[®] RP-C18 ADS-Säule (von alkyl diol silica) der Firma Merck KGaA ist in Abbildung 9 schematisch dargestellt.

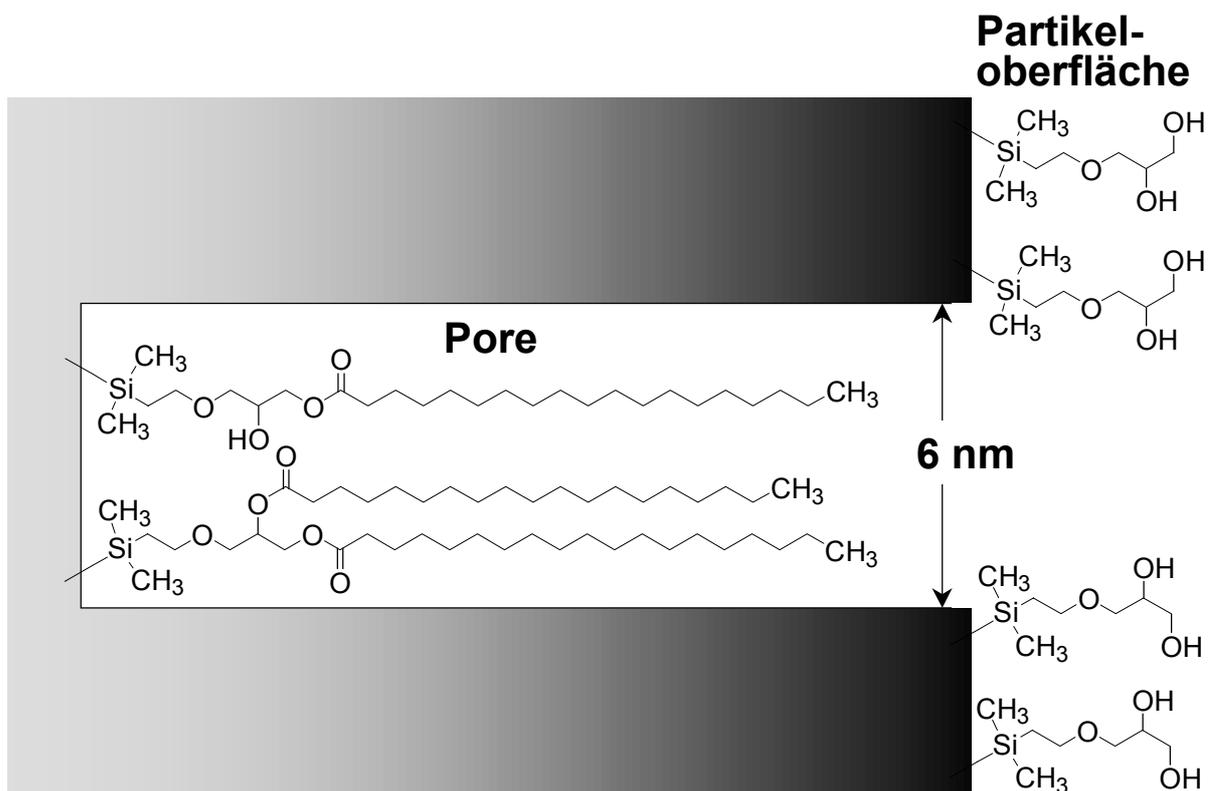


Abbildung 9: Schematische Darstellung eines RAM-Partikels einer LiChrospher[®] RP-C18 ADS-Säule

Die spezielle Außenoberfläche der RAMs ist biokompatibel, d.h. sie ist hydrophil und elektroneutral und besteht aus oberflächengebundenen Diolgruppen. Dadurch werden Wechselwirkungen der Sorbentien mit Makromolekülen (z.B. Proteine)

ausgeschlossen. Makromoleküle ab einer ungefähren Größe von 15000 Dalton werden sofort und effizient abgetrennt. Die innere Oberfläche der 6 nm großen Poren ist dagegen mit Adsorptionszentren belegt (z.B. C₁₈-Alkylgruppen bei RP-C18 ADS). Nur niedermolekulare Komponenten können in die Poren hinein diffundieren und mit den Adsorptionszentren wechselwirken. Es findet eine selektive Anreicherung der Analytmoleküle statt.

Proteinhaltige Flüssigkeiten, wie z.B. Plasma oder Zellkulturen, können daher im nativen Zustand, d.h. ohne Vorbehandlung, analysiert werden⁸⁶. In Kap. 5.3 wird die Anreicherung von Carotinoiden aus Humanplasma mittels RAM-HPLC dargestellt. Die auf der RAM-Vorsäule retardierten Analytmoleküle werden dabei durch Säulenschaltung (s. Kap. 4.1.2) auf eine HPLC-Trennsäule transferiert. Vorteile gegenüber der konventionellen SPE-HPLC-Kopplung mit Einmal-Kartuschen sind die hohe Lebensdauer dieser speziellen Vorsäulen, das kontaminationsfreie Verfahren an sich, sowie die erhöhte Präzision, Wiederfindung und Zuverlässigkeit⁸⁷.

4.1.4 Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD)

Die Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) ist eine Extraktionsmethode, die 1989 von Barker speziell für die Aufarbeitung von tierischem und pflanzlichen Gewebe entwickelt wurde⁸⁸. Ihr entscheidender Vorteil gegenüber anderen Methoden ist die direkte Anwendbarkeit auf feste oder viskose Proben ohne vorheriges Herauslösen des Analyts⁸⁹. Auf Grund ihrer einfachen Handhabung und des geringen Zeitaufwands hat sich diese Technik seit ihrer Entwicklung besonders auf dem Gebiet der Lebensmittel-, Naturstoff- und klinischen Analytik etabliert und findet dort vermehrt Applikationen⁹⁰.

Die MSPD beinhaltet die mechanische Homogenisierung der Probe mit einem abrasiven Unterstützungsmaterial, z.B. einem alkylierten Kieselgel, zu einem rieselfähigen Pulver. Dadurch wird die Struktur der Probenmatrix zerstört und die Probe homogen über die Oberfläche des Unterstützungsmaterials verteilt. Es entstehen chemische Matrix-Sorbens-Analyt Wechselwirkungen.

Die rieselfähige Probe wird so für eine SPE zugänglich, deshalb kann nun durch entsprechende Wahl der Lösungsmittel der Analyt selektiv extrahiert werden. Die Durchführung der MSPD ist in Abbildung 10 skizziert.

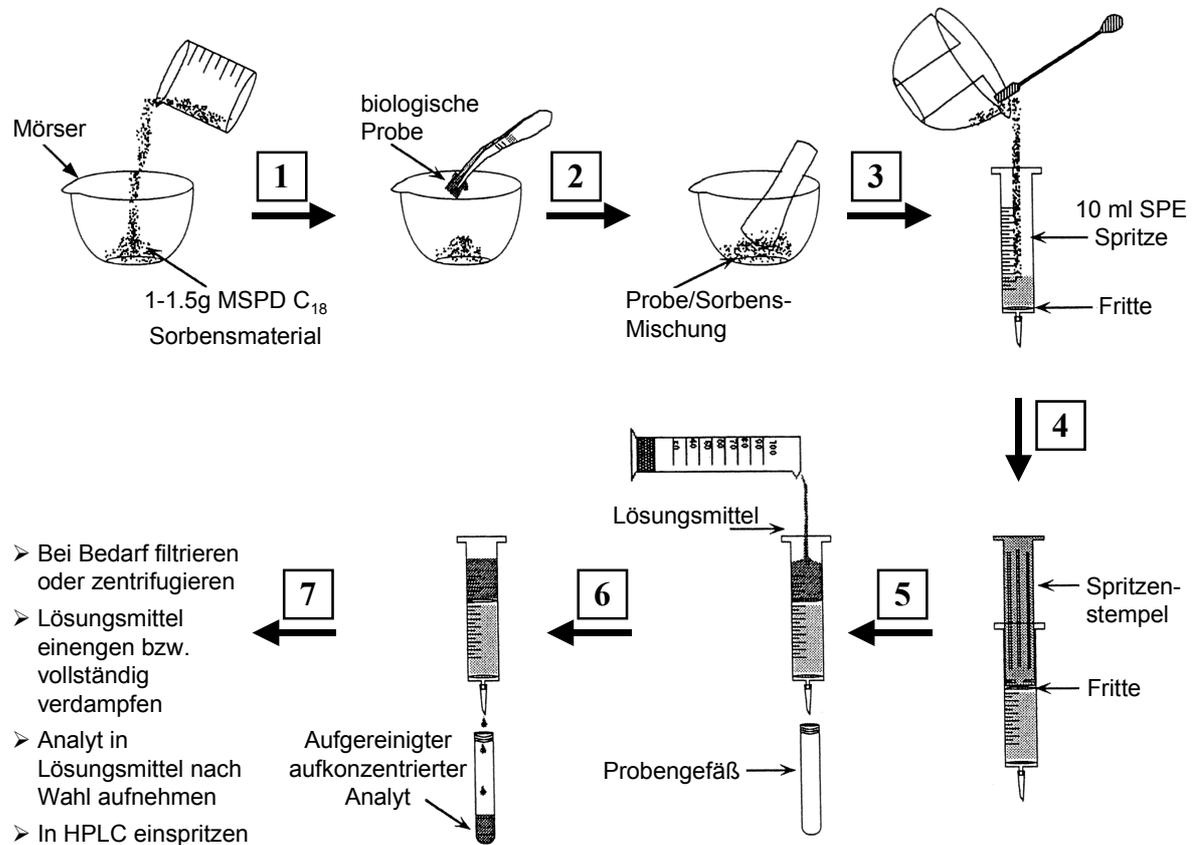


Abbildung 10: Durchführung der MSPD

Sie beinhaltet folgende Arbeitsschritte:

1. Zugabe der biologischen Probe zum Sorbensmaterial. Eventuelle Zugabe einer definierten Menge eines internen Standards
2. Verreiben der Mischung zu einem homogenen und rieselfähigen Pulver
3. Füllen des Homogenisats in eine SPE-Säule, auflegen einer PE-Fritte
4. Zusammenpressen des Homogenisats zu einem kompakten Säulenbett
5. Konditionieren der Säule
6. Elution des Analyts
7. Eventuelles Einengen des Lösungsmittels, Injektion in die HPLC

Die MSPD bietet den Vorteil, dass man feste Proben direkt extrahieren kann, auf diese Weise sind die Analyten vor Oxidationen geschützt. Selbst extrem instabile Analyten aus schwer zugänglichen Proben, wie Pflanzen oder tierischem Gewebe, werden reproduzierbar und quantifizierbar extrahiert, ohne Bildung von Artefakten. Zudem ist die MSPD sehr schnell durchzuführen und sie liefert konzentrierte Analytmengen, die meist ohne weitere Aufarbeitung in die HPLC injiziert werden können. Ein entscheidender Nachteil für die industrielle Anwendung dieser Methode ist aber, dass sie nur schwer automatisierbar ist.

4.2 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

4.2.1 Grundlagen⁹¹

Die HPLC beruht auf einem physikalisch-chemischen Trennprozess. Dabei wird das zu trennende Probengemisch in der mobilen Phase gelöst und unter hohem Druck bei konstanter Fließgeschwindigkeit durch eine mit der stationären Phase gefüllte Trennsäule gepumpt. Durch unterschiedlich starke Wechselwirkungen der Probenmoleküle mit der stationären Phase ergeben sich verschieden lange Verweilzeiten an der stationären Phase, wodurch ihre Auftrennung ermöglicht wird. Man unterscheidet die sogenannte Normal Phase (NP)-Chromatographie und die Reversed Phase (RP)-Chromatographie. Bei der NP-Chromatographie ist die stationäre Phase, z.B. Kieselgel oder Aluminiumoxid, im Vergleich zur mobilen Phase polarer, während bei der RP-Chromatographie die stationäre Phase aus mit organischen Molekülen, z.B. mit Alkylketten, modifiziertem Kieselgel besteht und somit unpolarer ist als die mobile Phase.

Zur Trennung von geometrischen Carotinoid-Stereoisomeren wurden früher, auf Grund ihrer besseren Selektivität, Normalphasen^{92,93} eingesetzt, sowie Nitrilphasen⁹⁴. Da herkömmliche RP-Trennsäulen wie polymere C₁₈-Phasen⁹⁵ die Carotinoid-

Stereoisomeren nur unzureichend zu trennen vermögen, wurde 1994 von Sander und Albert eine C₃₀-Trennphase entwickelt und optimiert, die für Carotinoid-Stereoisomere eine erhöhte Selektivität aufweist⁹⁶. Eine Variation der Alkylkettenlänge, von C₁₈ bis C₃₄ erbrachte für die C₃₀-Phase die beste Selektivität zur Trennung von Carotinoiden⁹⁷. Seither wird fast ausschließlich diese Phase zur Trennung von Carotinoiden und deren Stereoisomeren in der HPLC und Kapillartrenntechniken eingesetzt.⁹⁸⁻¹⁰⁰ Die besondere Formerkennung beruht auf dem Auftreten von geordneten starren n-Alkylkettenbereichen mit *trans*-Anordnung neben weiteren ungeordneten mobilen Domänen mit *gauche*-Konformation^{101,102}. Die Temperaturabhängigkeit dieser Formerkennung konnte mittels Festkörper- und Suspensions-NMR-Messungen erforscht^{103,104} und mit den chromatographischen Ergebnissen korreliert werden^{105,106}.

Die Wahl des Lösungsmittels ist für die instabilen Carotinoide sehr wichtig. So ergibt das in der HPLC gebräuchliche Acetonitril beispielsweise sehr schlechte Wiederfindungsraten. Als Lösungsmittelgemische werden deshalb meist ternäre Gemische aus Methanol, tert.-Butylmethylether und Wasser sowie binäre Aceton/Wasser-Gemische zur Trennung von Carotinoid-Stereoisomeren eingesetzt.

Zur Trennung von Enantiomeren müssen in der HPLC spezielle Trennsäulen eingesetzt werden¹⁰⁷. Die erste Trennung von optischen Zeaxanthin-Isomeren aus biologischen Proben auf speziellen chiralen Trennsäulen wurde 1986 von Maoka beschrieben¹⁰⁸, wobei eine chemische Derivatisierung der Carotinoide als Dibenzoate erfolgte. Seither werden verschiedenste Carotinoide meist als Benzoate¹⁰⁹ oder Carbamate^{110,111} chiral getrennt.

4.2.2 HPLC-UV-Kopplung von Carotinoiden^{16,112}

Die UV-Spektroskopie ist eine einfache, aber selektive und vor allem empfindliche Methode zur Detektion von in der HPLC getrennten Carotinoiden aus biologischen Matrices. In der Kopplung mit der HPLC werden meist Dioden Array Detektoren (DAD) zur Aufnahme von UV-Spektren verwendet.

Durch die besondere Struktur von bis zu elf konjugierten Doppelbindungen zeigen die Carotinoide charakteristische Absorptionsbanden im nah-UV bis visuellen Bereich (300-500 nm). Dieser spezifische Absorptionsbereich verdeutlicht den Vorteil der UV-Spektroskopie gegenüber anderen Detektoren bei der Analyse von Carotinoiden, da fast alle in der Probenmatrix vorhandenen störenden Bestandteile in diesem Bereich nicht absorbieren.

Die charakteristische Hauptabsorptionsbande von Carotinoiden zeigt ein sogenanntes 3-Finger-Spektrum, d.h. eine Bande mit aufgelöster Feinstruktur, wie für all-E Lycopin in Abbildung 11 dargestellt. Sie besteht aus einem Hauptmaximum (Bande II) sowie aus je einem Nebenmaximum bei höherer (Bande III) und kleinerer Wellenlänge (Bande I), welches auch nur als Schulter auftreten kann. Die spektrale Feinstruktur gibt Aufschluss über die Struktur des Carotinoids und wird als Verhältnis der Peakhöhen III/II in Prozent angegeben.

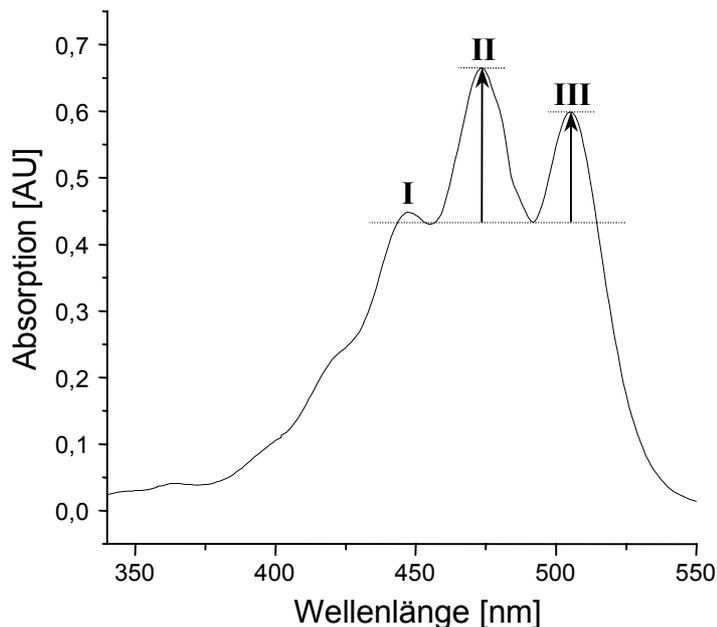


Abbildung 11: UV-Spektrum von all-E Lycopin in Aceton

Für die Lage der Absorptionsbanden und die Feinstruktur gibt es folgende Regelungen:

- Je mehr konjugierte Doppelbindungen ein Carotinoid enthält, desto mehr verschiebt sich die Hauptabsorptionsbande hin zu höheren Wellenlängen (Phytoen: 286 nm, 3 konjugierte Doppelbindungen; ζ -Carotin: 400 nm, 7; Lycopin: 470 nm, 11).

- Cyclische Carotinoide haben eine reduzierte Feinstruktur im Vergleich zu acyclischen Carotinoiden. Zusätzlich zeigen β -Iononringe eine hypsochrome Verschiebung von etwa 10 nm im Gegensatz zu ψ -, ϵ - oder γ -Endgruppen.
 - Z-Stereoisomere ergeben eine schwach hypsochrome Verschiebung von 2-6 nm sowie einen stark hypochromen Effekt. Die Feinstruktur wird reduziert und eine neue, sogenannte *cis*-Bande tritt auf mit $\lambda_{\max,cis} \approx \lambda_{\max,III} - 140 \text{ nm}^{94}$. Diese Bande entsteht durch die Änderung der Molekülsymmetrie von E nach Z. Auf Grund des symmetrischen Grundzustands des all-E-Isomers ist der Übergang in einen g-Zustand verboten. Z-Isomere haben keine Symmetrie, deshalb ist der Übergang in einen angeregten g-Zustand symmetrieeerlaubt.
 - Die *cis*-Bande ist um so intensiver, je näher die Z-Bindung in die Mitte des Moleküls rückt. Symmetrische Di-Z-Carotinoide zeigen keine *cis*-Bande. Eine Doppel-*cis*-Bande deutet auf acyclische oder monocyclische Carotinoide.
 - Eine Hydroxylgruppe hat keinen Einfluss auf das Chromophor, deshalb sind die Spektren z.B. von Zeaxanthin und β -Carotin nahezu identisch.
 - Die Energie des $1^1A_g \rightarrow 1^1B_u$ -Überganges (Hauptabsorptionsbande bei β -Carotin) ist abhängig vom Brechungsindex des Lösungsmittels. Dabei ist die Polarisierbarkeit wichtiger als die Polarität. Während sich die UV-Spektren von Carotinoiden in Hexan, Acetonitril, Methanol oder Diethylether nur im Absorptionskoeffizienten unterscheiden, dort aber zum Teil stark, ist für Aceton (2-6 nm) oder Dichlormethan (10-20 nm) eine bathochrome Verschiebung erkennbar¹¹³.
 - Bei hohen Wassermengen in der HPLC (größer 30%, wie z.B. bei Verwendung von 1,5 μm Partikeln in der HPLC nötig) kann die Hauptabsorptionsbande in ihrer Intensität abnehmen oder sogar verschwinden. Sie wird ersetzt durch eine scharfe Absorption ohne Feinstruktur im Nah-UV-Bereich (Lutein 370 nm, Lycopin 354 nm) sowie einer schwachen Bande oder Schulter bei etwa 520 nm (Lutein). Dieser Effekt ist auf Aggregationen der Carotinoide zurückzuführen, sowie auf Exciton-Wechselwirkungen angrenzender Chromophore.
-

Der Einfluss des Lösungsmittels auf die Lage und Form der Absorptionsbanden ist demnach gravierend. Der Einsatz von Gradiententrennungen in der HPLC macht einen Vergleich der UV-Spektren noch schwieriger. Daher ist eine Identifizierung unbekannter Carotinoid-Isomere allein mittels UV-Spektroskopie nicht sinnvoll.

4.3 Grundlagen moderner Kopplungsmethoden

4.3.1 HPLC-APCI-MS-Kopplung

Die HPLC-APCI-MS-Kopplung verbindet die leistungsstarke, selektive Trennmethode der HPLC mit der hoch empfindlichen, massenspezifischen Detektionsmethode der Massenspektrometrie (MS)^{114,115}. Die Schwierigkeit bei der Analyse von Carotinoiden besteht in ihrer Labilität, ihrer geringen Polarität und Flüchtigkeit und damit in ihrer schlechten Ionisierbarkeit. Deshalb mussten geeignete Ionisierungstechniken entwickelt werden, die einerseits die hohe Menge an Eluat (Flussraten von bis zu 1 ml/min) verdampfen und andererseits die unpolaren Analyten ohne große Fragmentierung schonend ionisieren können.

Die Charakterisierung von Carotinoiden mittels HPLC-MS wird daher entweder mit der Electrospray Ionisierung (ESI) oder mit der Chemischen Ionisierung bei Atmosphärendruck (APCI) durchgeführt^{116,117}. Beide Methoden benötigen aber dabei polare Moleküle zur Ionisierung der Carotinoide. Die ESI-Technik, die bevorzugt für eher polare Analyten, wie Tocopherole¹¹⁸, Catechine¹¹⁹ oder Flavonoide¹²⁰, angewandt wird, ist für die Analytik von Carotinoiden nur beschränkt anwendbar. Sie erfordert den Zusatz von polaren Additiven wie halogenhaltige Lösungsmittel¹²¹ oder Silbersalze¹²². Die APCI benötigt keine Hilfsreagenzien. Bei der HPLC-APCI-MS-Kopplung reicht die polare mobile Phase der HPLC mit Wasser oder Methanol im Eluat aus, ein gutes Spray und damit eine Ionisierung zu erhalten¹²³⁻¹²⁵.

Sowohl das ESI- als auch das APCI-Verfahren ist im positiven und negativen Ionenmodus einsetzbar. Durch die schonende Ionisierung entsteht meist ein protoniertes oder deprotoniertes Molekül-Ion, sowie schwache Fragmentierungen. Unter Verwendung von Ionenfallen kann mit Hilfe von MS⁽ⁿ⁾-Detektion aber eine exakte und sukzessive Fragmentierung durchgeführt und damit Rückschlüsse auf die Struktur gewonnen werden.

Die HPLC-APCI-MS-Kopplung besitzt eine hohe Empfindlichkeit, für Carotinoide liegt sie im Picogramm-Bereich^{126,127}. Innerhalb eines chromatographischen Laufes kann eine schnelle und eindeutige Strukturaufklärung aller Peaks mit unterschiedlichen Molekülmassen und Fragmentierungsmustern erfolgen¹²⁸. Ihre Grenze liegt in der Unterscheidung von massengleichen Carotinoiden. Hier kann manchmal, wie z.B. bei Lutein und Zeaxanthin, über die unterschiedliche Fragmentierung eine Unterscheidung getroffen werden¹²⁶. Die verschiedenen Z/E-Stereoisomere eines Carotinoids verhalten sich aber so ähnlich, dass sie mit der MS nicht unterschieden werden können.

4.3.2 HPLC-NMR-Kopplung

Mehr als 30 Jahre nach Veröffentlichung der ersten NMR-Experimente^{129,130}, und zwölf Jahre nach der Entwicklung der Puls-Fourier-Transform-(PFT)-Methode¹³¹ wurde die NMR-Spektroskopie erstmals mit der HPLC gekoppelt¹³²⁻¹³⁴. Weiterentwicklungen im Setup sowie die Einführung von Kryomagneten führten dazu, dass die on-line HPLC-NMR-Kopplung heute eine der wichtigsten Routinemethoden in der Naturstoff-¹³⁵⁻¹³⁹, Wirkstoff-^{140,141}, und Umweltanalytik¹⁴² sowie in der Metabolismusforschung^{143,144} geworden ist.

Die NMR-Spektroskopie ist zwar eine relativ unempfindliche Technik, jedoch liefert sie, im Gegensatz zu allen anderen Detektionsmethoden, als einzige eine detaillierte Strukturinformation der untersuchten Analytmoleküle^{145,146}. Sie kann demnach zur Unterscheidung und eindeutigen Strukturbestimmung von Carotinoid Z/E-Stereoisomeren verwendet werden^{126,147,148}.

4.3.2.1 Experimenteller Aufbau¹⁴⁹

Für die Kopplung wird ein im wesentlichen unverändertes chromatographisches System zur Trennung der Analyten verwendet. Die Trennung wird mittels eines geeigneten Detektors (z.B. UV) überprüft. Dies erleichtert die genaue Positionierung eines Peaks in der NMR-Messzelle, z.B. bei stopped-flow Experimenten. Zur Kopplung benötigt man ein Interface, ein Schaltventil-Modul, die sogenannte Bruker Peak Sampling Unit (BPSU). Die computergesteuerte BPSU steuert sowohl die HPLC als auch die NMR, und dient darüber hinaus zur Speicherung von Peaks.

Die HPLC-Anlage und die BPSU stehen etwa 1.5 m vom NMR-Magneten entfernt, um einerseits fehlerfrei funktionieren zu können und andererseits um die Magnetfeldhomogenität des NMR-Magneten nicht zu beeinträchtigen. Der NMR-Magnet beinhaltet einen Durchflussprobenkopf mit einem Zellvolumen von 120 μl . Die Durchflusszelle ist dabei fest installiert, eine Rotation ist nicht mehr möglich. Das Setup ist in Abbildung 12 dargestellt:

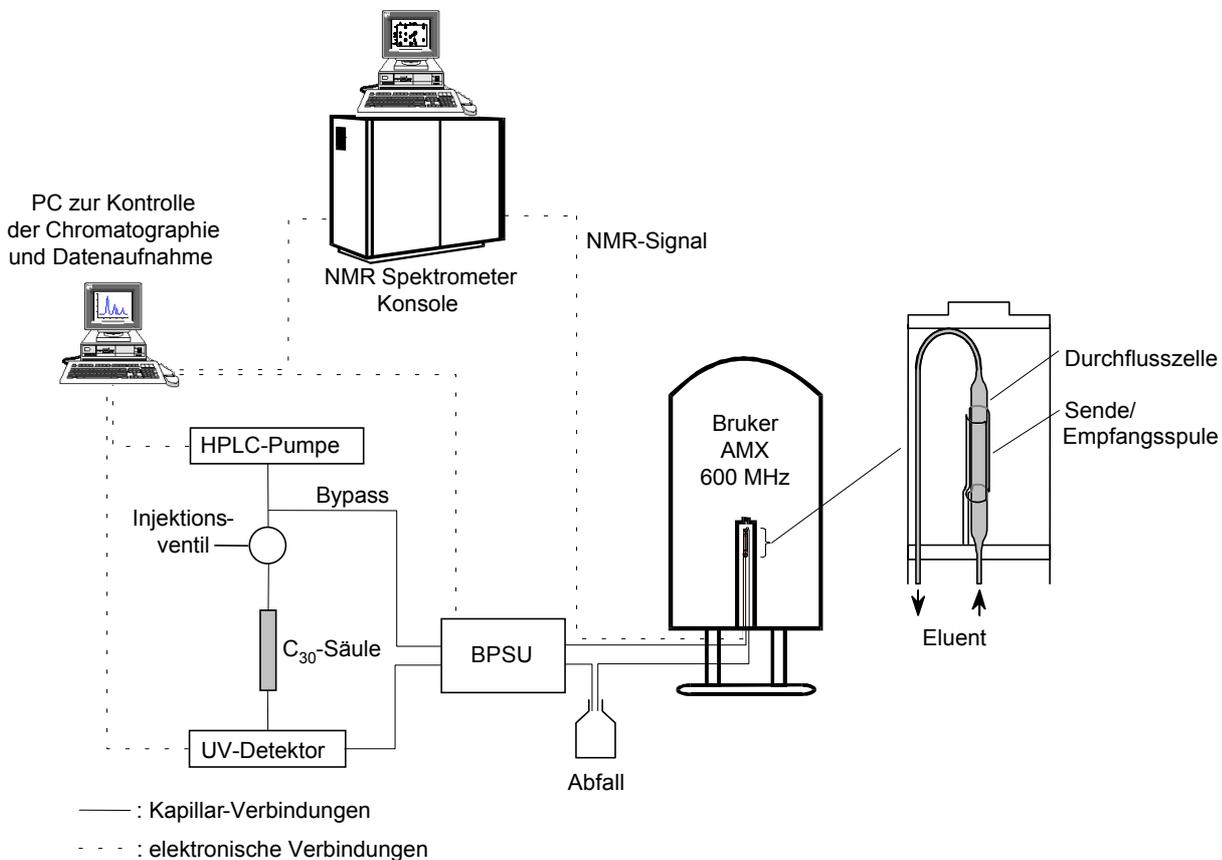


Abbildung 12: Experimentelles Setup der HPLC-NMR-Kopplung

Bei einer Flussrate von 1 ml/min ergibt sich eine Aufenthaltsdauer τ der Kerne in der NMR-Zelle von etwa 7 s. Die Aufenthaltsdauer hat einen Effekt auf die effektive Lebensdauer der Spinzustände in der Zelle und kann so als Relaxationsphänomen beschrieben werden. Nach Heisenberg führt eine verringerte Aufenthaltsdauer zu einer Linienverbreiterung.

4.3.2.2 Anforderungen an die HPLC und NMR

Die Chromatographie muss im Hinblick auf die on-line HPLC-NMR-Kopplung in mehrerer Hinsicht an die Bedingungen der NMR angepasst werden. Zum Einen ist der Gebrauch von voll deuterierten Lösungsmitteln aus wirtschaftlichen Gesichtspunkten praktisch nicht möglich. Nur das im Vergleich zu sämtlichen deuterierten organischen Lösungsmitteln billige D₂O wird an Stelle von H₂O verwendet.

Zudem ist die Wahl der mobilen Phase beschränkt auf wenige Lösungsmittelgemische. Jedes protonierte Lösungsmittel zeigt entsprechende Resonanzsignale im NMR-Spektrum, die einen gewissen Resonanzbereich überdecken und für eine Detektion der Analytmoleküle unbrauchbar machen. Bei der Wahl der mobilen Phase muss also der Resonanzbereich der zu analysierenden Analytmoleküle mit einbezogen werden. Ein Beispiel dafür ist die Analyse von Steroiden, welche normalerweise mit Acetonitril/Wasser in der HPLC getrennt werden. Da Acetonitril im NMR-Spektrum einen Teil des Steroid-Grundgerüsts überdeckt, musste die Trennung für eine HPLC-NMR-Kopplung auf ein Methanol/Deuteriumoxid-Gemisch geändert werden¹⁵⁰.

Die mobile Phase sollte demnach aus einem binären Gemisch bestehen, mit möglichst ein bis zwei nicht aufgespaltenen Resonanzsignalen im NMR-Spektrum. Beispiele dafür sind Mischungen von Deuteriumoxid mit Aceton, Acetonitril oder Methanol. Isokratische Trennungen sind Gradientenelutionen zu bevorzugen, da die chemische Verschiebung δ von der Zusammensetzung des Lösungsmittels abhängt.

Die NMR-Spektroskopie ist im Vergleich zur HPLC eine relativ unempfindliche Methode. Die Nachweisgrenze liegt ungefähr bei 500 ng Substanzmenge. Damit diese

große Analytmenge in der NMR-Zelle zugänglich wird, muss die Chromatographie auf Trennsäulen mit einer hohen Kapazität durchgeführt werden. Die zur Analytik von Carotinoiden entwickelten C₃₀-Trennsäulen zeigen eine hohe Beladbarkeit und Selektivität, so dass selbst bei einer extremen Überladung der Säule noch eine gute Trennleistung vorhanden ist. Sie wird deshalb vermehrt auch bei der HPLC-NMR-Analytik von anderen Naturstoffen^{151,152} oder Substanzklassen^{153,154} eingesetzt.

Die größte Schwierigkeit im praktischen Umgang bei der HPLC-NMR-Kopplung sind die störenden Resonanzsignale der protonierten Lösungsmittel, die zu Dynamikproblemen im D-A-Wandler des NMR-Spektrometers führen. Diese Signale müssen mittels einer Lösungsmittelunterdrückung auf etwa die Höhe der ¹³C-Satelliten verringert werden¹⁴⁹. Nur wenn der dynamische Bereich des Empfängers an die Intensität des Analytsignals angepasst wird, kann eine Digitalisierung dieser Signale erfolgen und somit eine Detektion. Die Lösungsmittelunterdrückung kann auf mehrere Arten erfolgen. Wegen ihrer einfachen Handhabung, ihrer leichten Implementierung in verschiedenste Pulsprogramme sowie ihrer großen Effizienz selbst zur Unterdrückung mehrerer NMR-Signale wird meist eine Vorsättigungsmethode mit Shaped-Pulsen eingesetzt. Dabei wird während des Relaxationsdelays etwa 1 s mit einem selektiven low-power Shaped-Puls, meist in Rechtecksform, auf die Resonanzfrequenzen der Lösungsmittel eingestrahlt.

Die HPLC-NMR-Kopplung kann hauptsächlich in drei verschiedenen Betriebsarten durchgeführt werden¹⁵⁵. Bei continuous-flow Messungen wird das NMR-Spektrometer als Detektor der chromatographischen Trennung verwendet. Durch die begrenzte Aufenthaltsdauer der Kerne ist die Aufnahmezeit pro Transienten begrenzt und damit die Empfindlichkeit herabgesetzt. Die Flussrate wird deshalb auf etwa 0.3 ml/min vermindert. Das NMR-Chromatogramm wird in einem Konturplot dargestellt. Bei stopped-flow-Experimenten wird die Chromatographie gestoppt, wenn das Peakmaximum eines Analyts in der NMR-Zelle ist. Damit können für eine unbegrenzte Zeitdauer sowohl 1D- als auch 2D-NMR-Experimente durchgeführt werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Speicherung aller chromatographischer Peaks in sogenannten Loops mit nachfolgender sukzessiver Messung aller Peaks.

5 Ergebnisse

5.1 Trennung und Identifizierung von Carotinoid-Stereoisomeren

Seit der Einführung der C₃₀-Phase speziell zur Trennung von Carotinoiden wird diese Trennsäule vermehrt zur Analytik von unpolaren, strukturell ähnlichen Substanzen angewandt. Sie eignet sich dabei nicht nur Unterscheidung verschiedener Carotinoide, sie vermag auch geometrische Isomere einzelner Carotinoide aufzutrennen. Auf Grund der Labilität der Carotinoide gibt es in allen biologischen Proben unzählige unbekannte Carotinoid-Stereoisomere, deren Trennung und Identifizierung nur mit Hilfe dieser Trennphasen in Verbindung mit gekoppelten Identifizierungsmethoden möglich ist.

Die Identifizierung der Stereoisomere erfolgt in der Regel zuerst in Standardgemischen. Dabei wird ein reines all-E Isomer eines Carotinoids mittels Iod-Katalysation und UV-Licht isomerisiert¹⁵⁶. Es entstehen verschiedene Z/E-Stereoisomere in hoher Konzentration, welche mittels HPLC-NMR-Kopplung eindeutig identifiziert werden können. Eine Identifizierung aller Stereoisomere direkt aus den biologischen Proben ist mittels HPLC-NMR-Kopplung meist nicht möglich, da die Konzentrationen einiger Stereoisomere oft zu niedrig ist. Daher muss auf eine Identifizierung mittels UV und Retentionszeit, im Vergleich zum bekannten Standardgemisch, zurückgegriffen werden. Hierbei ist es von Vorteil, wenn mehrere Trennsäulen mit unterschiedlichen Retentionseigenschaften eingesetzt werden können.

Abbildung 13 zeigt die HPLC-Trennung eines Gemisches aus Lutein- und Zeaxanthin-Stereoisomeren auf zwei unterschiedlichen C₃₀-Säulen. Die Trennung auf einer nicht endgecappten Säule (Abb. oben, mit Rest-Hydroxylgruppen auf der Kieselgeloberfläche) ergibt eine Basislinientrennung fast aller Stereoisomere. Nur 13-Z Zeaxanthin wird von all-E Lutein überlagert. Beim Endcapping der C₃₀-Säule (unten) sind die Rest-Hydroxylgruppen auf der Kieselgeloberfläche durch Methylgruppen abgesättigt.

Auf Grund der durch das Endcapping erniedrigten Oberflächenbeladung an C₃₀-Alkylketten ergibt sich eine Retentionsumkehr. Die all-E Isomere von Lutein (4) und Zeaxanthin (5) können nicht mehr so gut mit den C₃₀-Alkylketten wechselwirken, sie werden nicht mehr getrennt und co-eluieren zuerst.

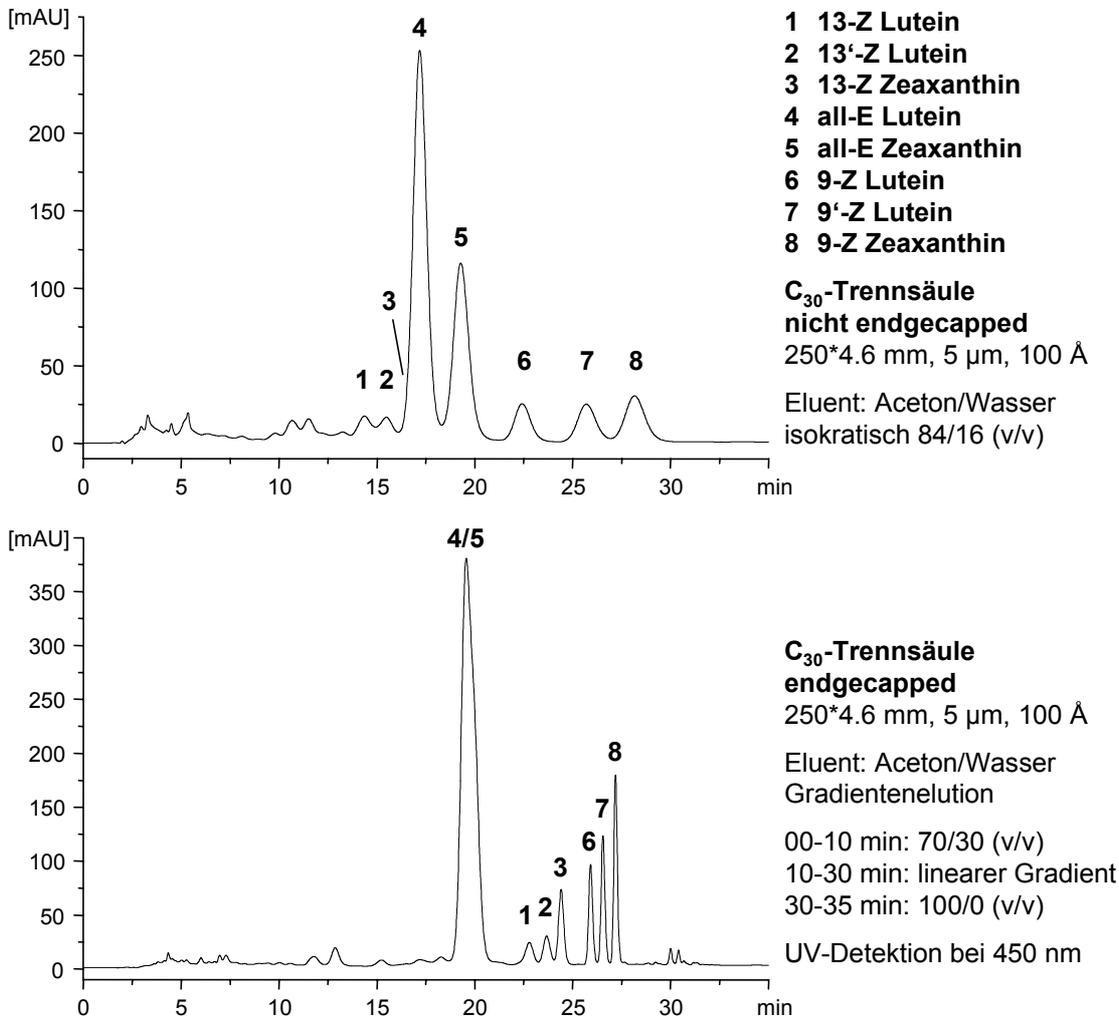


Abbildung 13: Trennung von Lutein und Zeaxanthin-Stereoisomeren auf einer endg cappedten (unten) und nicht endg cappedten (oben) C₃₀-Trennsäule

Trotzdem ist die endg cappedte Trennsäule nützlich, da sie für eine Trennung der verschiedenen Z-Stereoisomere eine erhöhte Selektivität zeigt. Mit Hilfe der Retentionszeiten sowie der UV-Spektren aus den Trennläufen (wie in Abbildung 14 dargestellt), können die verschiedenen Stereoisomere auch aus unterschiedlichsten Geweben (Pflanze, Serum, Retina) eindeutig identifiziert werden.

Alle Zeaxanthin-Isomere unterscheiden sich im UV-Spektrum von denen von Lutein durch ihr im Vergleich niedrigeres Verhältnis der Banden III/II. Dies ist auf die

symmetrische Grundstruktur mit zwei β -Iononringen zurückzuführen. Die Einführung einer Z-Bindung ergibt einen hypsochromen Shift der Hauptbande II von 3-7 nm. Die Lutein-Stereoisomerenpaare, wie 13-Z und 13'-Z, können nur über das Verhältnis III/II unterschieden werden, nicht über die nahezu identischen Absorptionsmaxima.

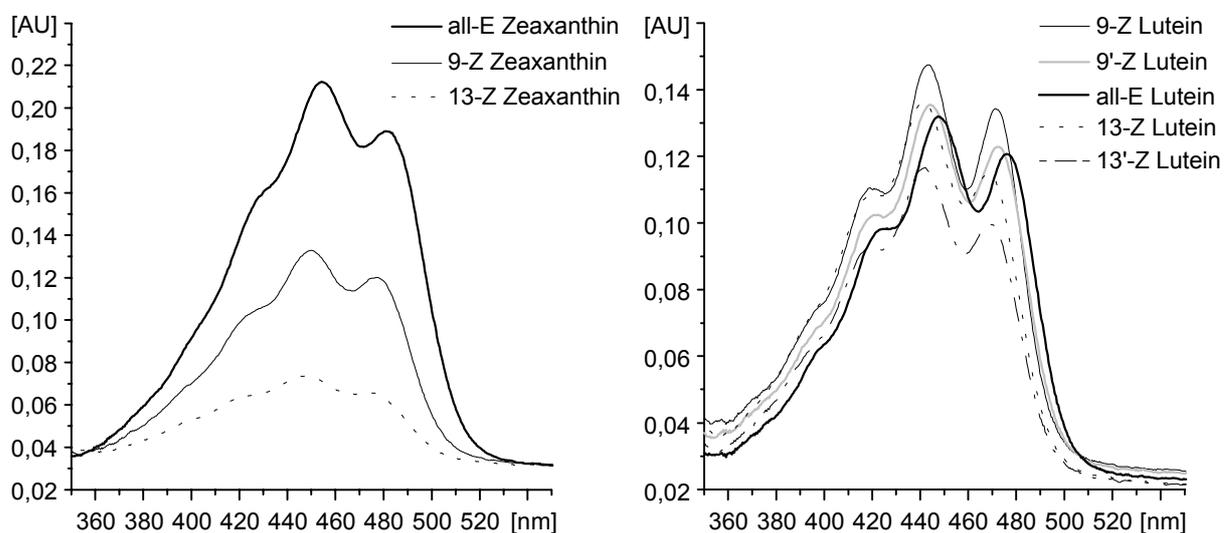


Abbildung 14: UV-Spektren der identifizierten Stereoisomere von Zeaxanthin (links) und Lutein (rechts)

Stereoisomer	Absorptionsmaxima [nm]			Verhältnis III/II [%]
	Bande I	Bande II	Bande III	
13-Z Zeaxanthin	426	447	474	12,4
9-Z Zeaxanthin	427	450	477	33,3
all-E Zeaxanthin	430	454	481	23,9
13-Z Lutein	422	441	468	30,2
13'-Z Lutein	422	442	469	34,8
9-Z Lutein	421	443	471	65,1
9'-Z Lutein	421	444	472	56,9
all-E Lutein	426	447	476	60,6

Tabelle 3: UV-Absorptionsmaxima sowie Bandenverhältnisse der Lutein- und Zeaxanthin-Stereoisomere

5.2 Bestimmung von Carotinoid-Stereoisomeren in biologischen Proben

5.2.1 Lutein-, Zeaxanthin- sowie β -Carotin-Stereoisomere aus Spinat

Abbildung 15 zeigt Carotinoid-Stereoisomeren-Trennungen von verschiedenen Spinat-extrakten auf einer C_{30} -Säule (nicht endgecappt). Die Extraktion mittels MSPD erweist sich hierbei als quantitativ, reproduzierbar und schonend, da die Carotinoide in ihrer gewohnten Zellmatrix gebunden sind, bis sie in konzentrierter Form eluiert werden. Da Spinat Xanthophylle und Carotine enthält, wurde eine Gradientenelution entwickelt.

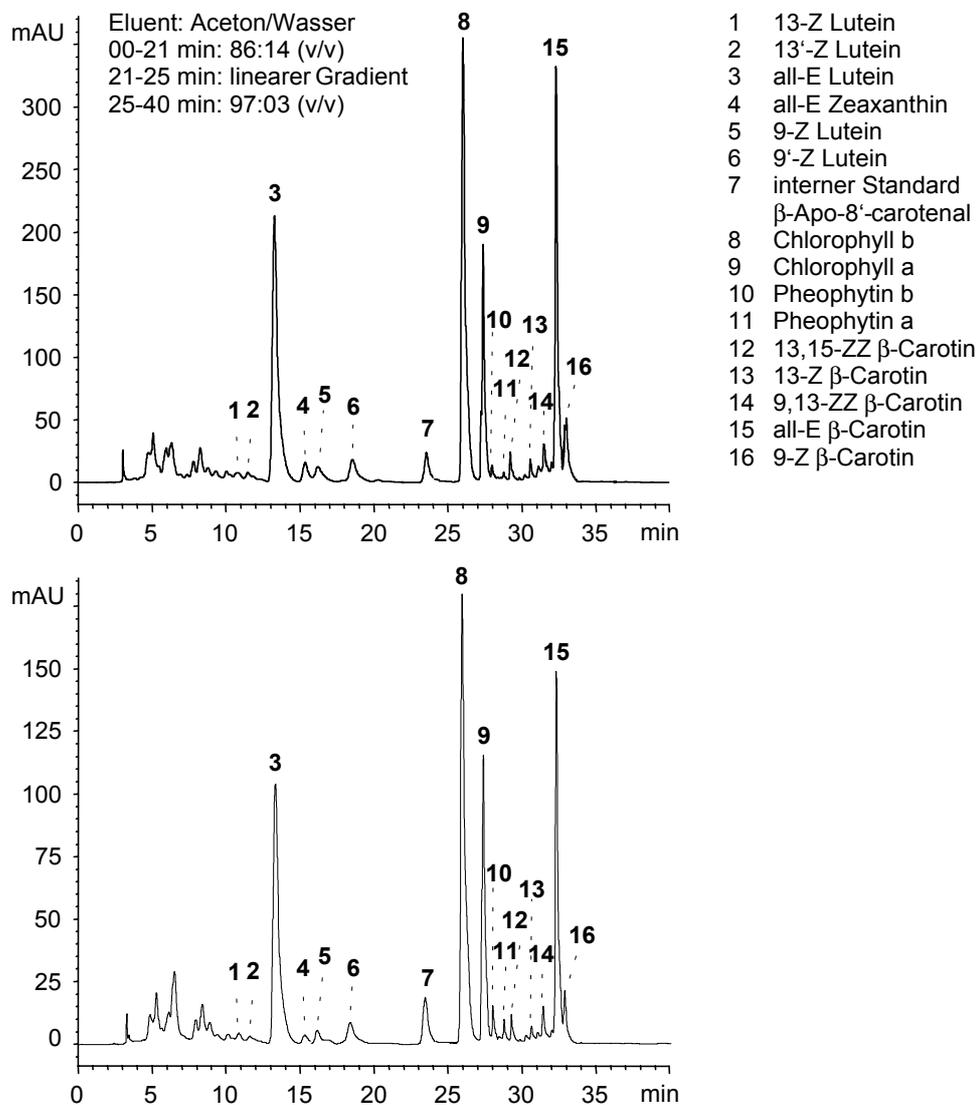


Abbildung 15: HPLC-Trennung eines Anbauspinats (8 Wochen alt, gekocht; oben) und kommerziellen Spinatprodukts (gekocht; unten) auf einer C_{30} -Säule

Die Identifizierung der einzelnen Carotinoide erfolgte mit Hilfe der HPLC-APCI-MS-Kopplung. Dabei können sogar alle Lutein-Stereoisomere von denen von Zeaxanthin unterschieden werden, trotz ihrer gleichen Masse (siehe Abbildung 16). Im positiven Ionenmodus wird Zeaxanthin, wie auch β -Carotin, als ein protoniertes Molekülion und ohne größere Fragmente detektiert. Im Gegensatz dazu spaltet sich für Lutein ein Molekül Wasser am ϵ -Iononring ab. Mit Hilfe von Selected-Ion Chromatogrammen (SIC), wie für m/z 537, 551 und 569 dargestellt, können alle Stereoisomere den einzelnen Carotinoiden zugeordnet werden¹²⁶.

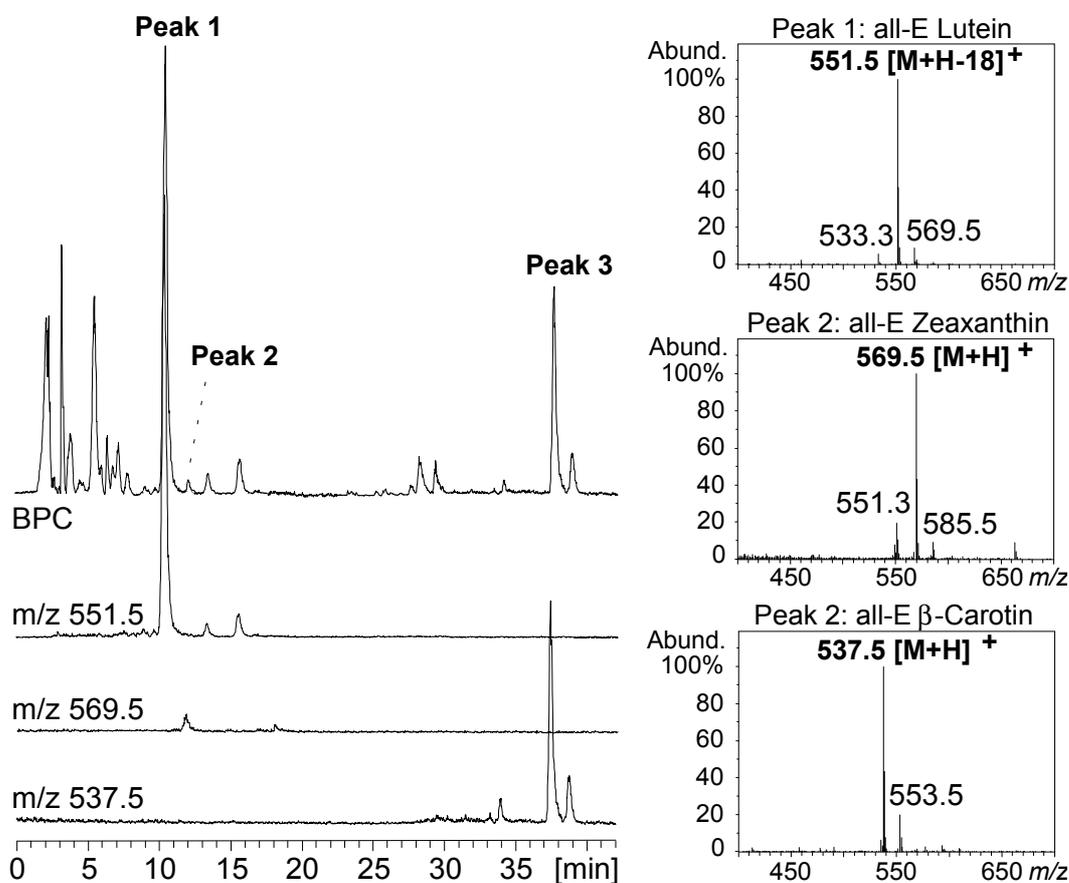


Abbildung 16: HPLC-APCI-MS-Untersuchung eines Spinatextraktes. Links: Base Peak Chromatogramm (BPC) sowie extrahierte Selected-Ion Chromatogramme (SIC); rechts: extrahierte Massenspektren der Peaks 1-3

Eine eindeutige Strukturzuordnung ist aber nur mittels NMR-Spektroskopie möglich. Das stopped-flow COSY-NMR-Spektrum von Abbildung 17 identifiziert den untersuchten Analyten aus einem Spinatextrakt als all-E Lutein¹⁵⁷. Am ϵ -Iononring sind zwei olefinische Protonen H-4' und H-7', die auf Grund ihrer aliphatischen

Nachbarschaft im NMR-Spektrum hochfeldverschoben sind. Die Kopplung eines dieser Protonen (H-7', $\delta = 5.43$ ppm) mit dem benachbarten olefinischen Proton H-8' ($\delta = 6.13$ ppm) ist ein Marker für alle Lutein-Isomere. Die Einfachheit des Spektrums im olefinischen Bereich mit nur wenigen Korrelationen kann nur mit einer all-E-Struktur erklärt werden. Die gestrichelten und ungestrichelten Protonenpaare fallen im NMR-Spektrum mit Ausnahme von Proton H-7 und H-7' zusammen.

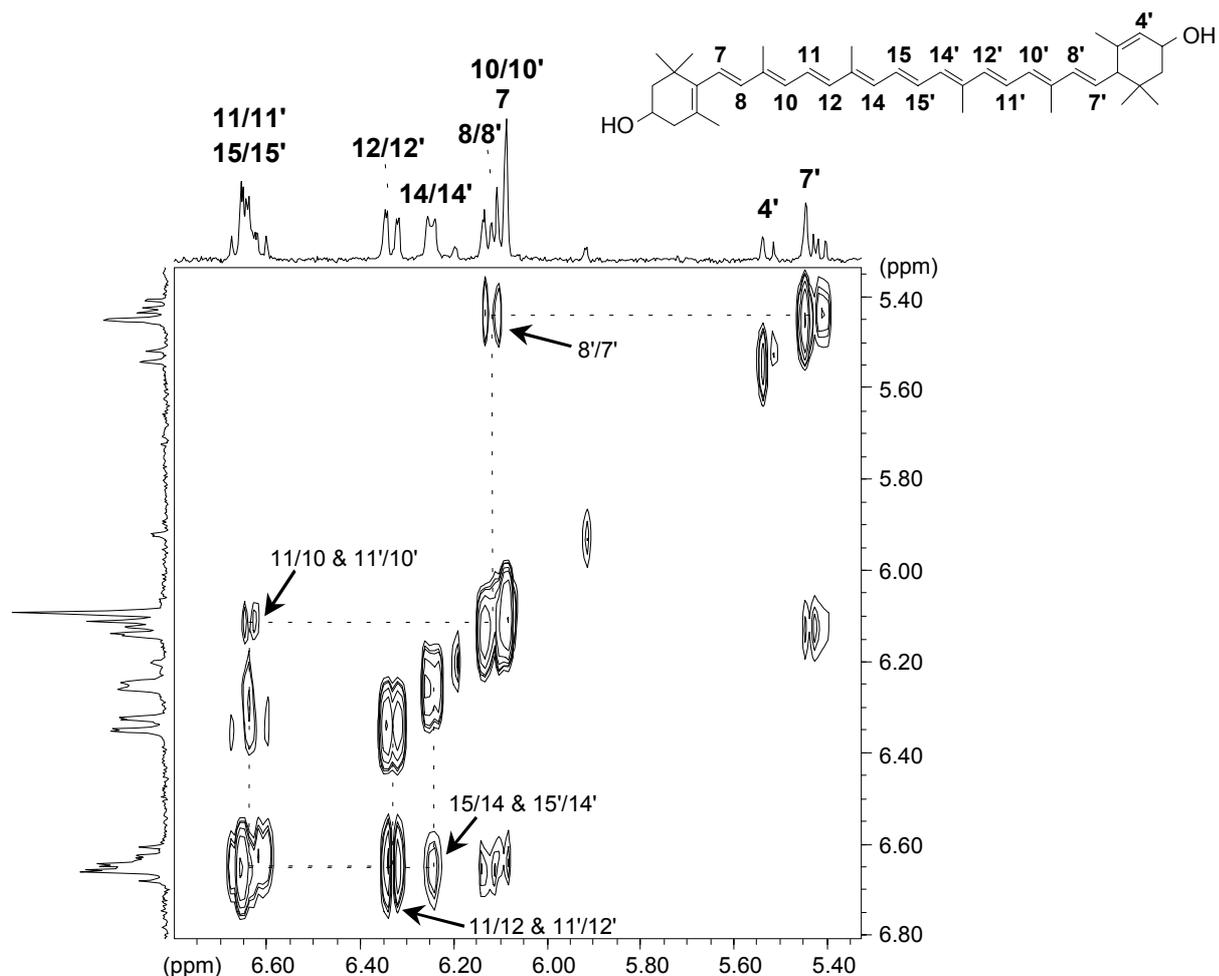


Abbildung 17: Stopped-flow COSY-NMR-Spektrum (olefinischer Bereich) von all-E Lutein aus Spinat

Es wurden unterschiedliche Spinatproben (*Spinacia oleracea* L.) auf ihren Gehalt an Carotinoid-Stereoisomeren untersucht. Zum Einen wurde ein selbst angebauter Spinat nach 5 Wochen ("junger Spinat") sowie nach 8 Wochen ("alter Spinat") geerntet. Andererseits wurde ein tiefgefrorenes Spinatprodukt aus einem Supermarkt analysiert. Alle drei Spinatsorten wurden in rohem und gekochten Zustand untersucht und verglichen¹⁵⁸.

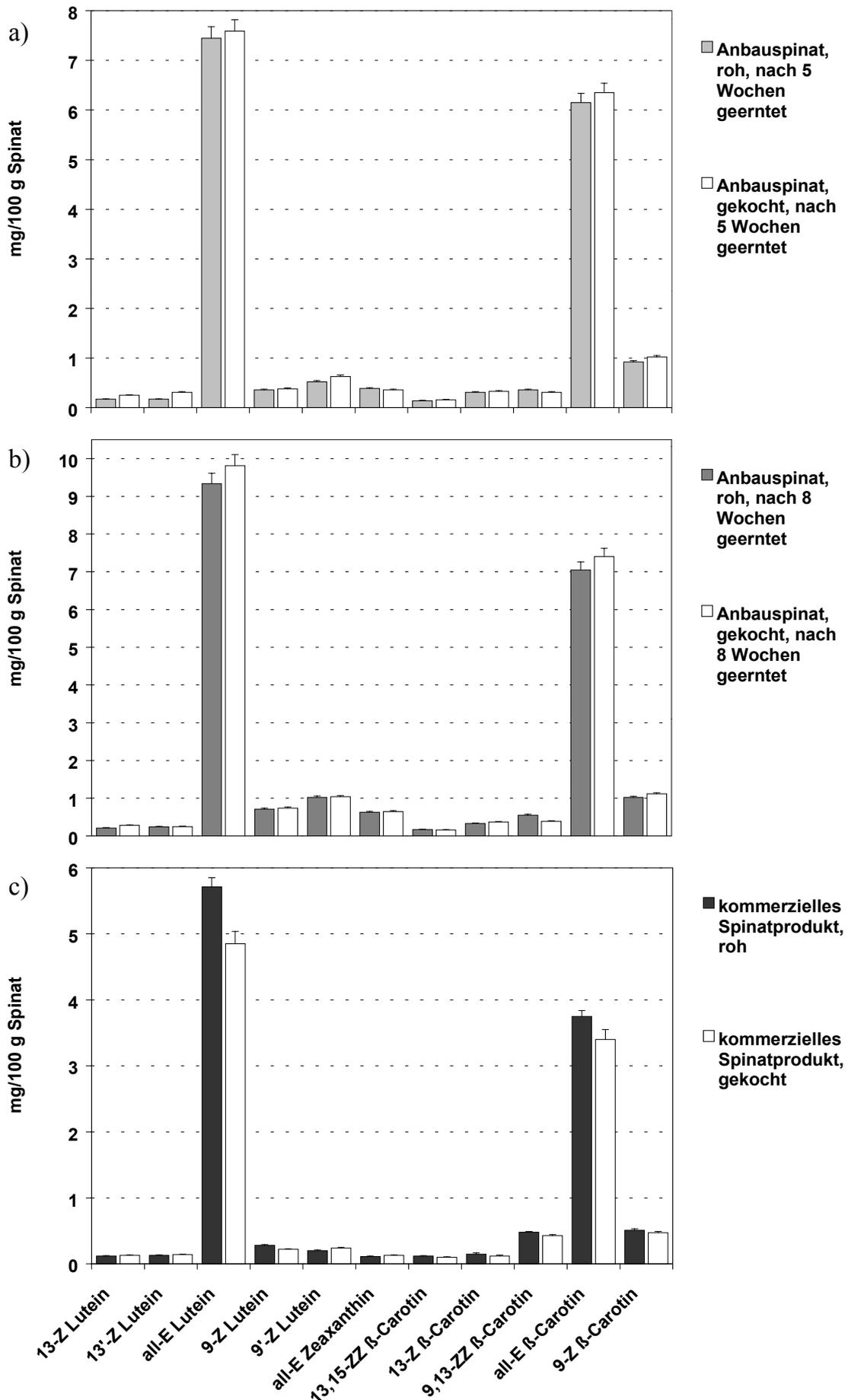


Abbildung 18: Quantitative Auswertung der untersuchten Spinatprodukte

Carotinoid-Stereoisomer	Anbauspinat 5 Wochen		Anbauspinat 8 Wochen		kommerzielles Spinatprodukt	
	roh*	gar*	roh*	gar*	roh*	gar*
13-Z Lutein	0.17	0.25	0.21	0.28	0.12	0.13
13'-Z Lutein	0.17	0.31	0.24	0.25	0.13	0.14
all-E Lutein	7.45	7.59	9.33	9.81	5.71	4.85
9-Z Lutein	0.36	0.38	0.71	0.74	0.28	0.22
9'-Z Lutein	0.52	0.63	1.02	1.04	0.20	0.24
Lutein (gesamt)	8.67	9.16	11.51	12.12	6.44	5.71
all-E Zeaxanthin	0.39	0.36	0.63	0.65	0.11	0.13
13,15-ZZ β -Carotin	0.14	0.16	0.17	0.16	0.12	0.10
13-Z β -Carotin	0.31	0.33	0.33	0.37	0.15	0.12
9,13-ZZ β -Carotin	0.36	0.31	0.55	0.39	0.48	0.43
all-E β -Carotin	6.15	6.35	7.05	7.40	3.75	3.40
9-Z β -Carotin	0.92	1.02	1.02	1.12	0.51	0.47
β-Carotin (gesamt)	7.88	8.17	9.17	9.44	5.01	4.52
Carotinoide (gesamt)	16.94	17.69	21.31	22.21	11.56	10.36

Tabelle 4: Gehalt an Carotinoid-Stereoisomeren in verschiedenen Spinatproben in rohem und gekochten Zustand (* in mg/100 g Spinat; n = 5)

Die quantitative Auswertung ist in Abbildung 18 sowie Tabelle 4 wiedergegeben¹⁵⁹. Dabei steigt mit der Anbauzeit des aus eigenem Anbau geernteten Spinats auch der Gehalt an Carotinoiden. So enthält der nach 8 Wochen geerntete rohe Spinat etwa 24 % mehr Carotinoide als der nach 5 Wochen geerntete rohe Spinat. Beim Kochen des Anbauspinales (5-minütige Garung in der Mikrowelle) tritt kein nennenswerter Effekt auf. Die leicht höheren Werte ergeben sich infolge der besseren Zugänglichkeit der Carotinoide. Die harte Zellstruktur der Pflanze wird durch den Kochvorgang aufgebrochen. Dagegen enthält das kommerzielle Spinatprodukt im rohen Zustand nur etwa 54 % im Vergleich zum Carotinoidgehalt des nach 8 Wochen geernteten Anbauspinales. Durch den Kochprozess werden zudem weitere 10 % an Carotinoiden des zur besseren Haltbarkeit mehrfach vorbehandelten Spinatprodukts zerstört¹⁶⁰.

5.2.2 Lycopin-Stereoisomere aus der Tomate

Das vorherrschende Carotinoid in der Tomate ist Lycopin (*Lycopersicon esculentum*). Der größte Gehalt an Lycopin findet sich in der Schale der Tomate wieder, wo es als Lichtschutz dient. Das HPLC-Chromatogramm von Tomatenschalen nach Extraktion mit MSPD ist in Abbildung 19 wiedergegeben. Neben all-E Lycopin, das über 85 % des Carotinoidgehalts ausmacht, werden auch geringe Mengen an all-E Lutein und all-E β -Carotin in der Tomate identifiziert. Anhand der UV-Spektren sowie der HPLC-NMR-Kopplung konnten neben all-E Lycopin weitere vier Z-Lycopin-Stereoisomere, darunter sogar zwei di-Z-Isomere identifiziert werden.

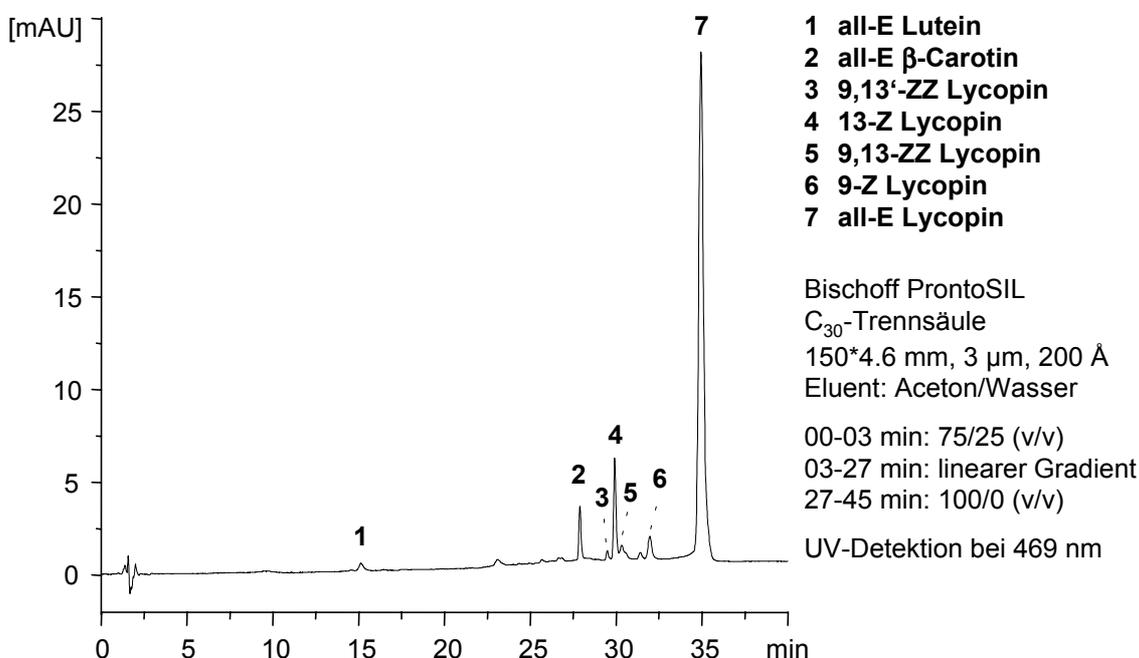


Abbildung 19: HPLC-Trennung eines Tomatenextrakts (Schale) auf einer C₃₀-Säule

Die UV-Spektren in Abbildung 20 untermauern die Annahme von je zwei Z- und ZZ-Isomeren. Im Vergleich zu all-E Lycopin mit einem Hauptabsorptionsmaximum von 473 nm zeigen zwei Isomere (Peak 4 und 6) einem hypsochromen Shift von 5-6 nm und zwei weitere einen von 10 nm (Peak 3) respektive 13 nm (Peak 5). Das größere Bandenverhältnis *cis*/II von Peak 4 gegenüber Peak 6 (s. Tabelle 5) deutet auf eine Z-Bindung weiter in der Mitte des Moleküls hin, was mittels HPLC-NMR-Kopplung belegt werden konnte. Der olefinische Bereich der ¹H-NMR-Spektren aller identifizierten Lycopin-Stereoisomere ist in Abbildung 21 dargestellt¹⁶¹.

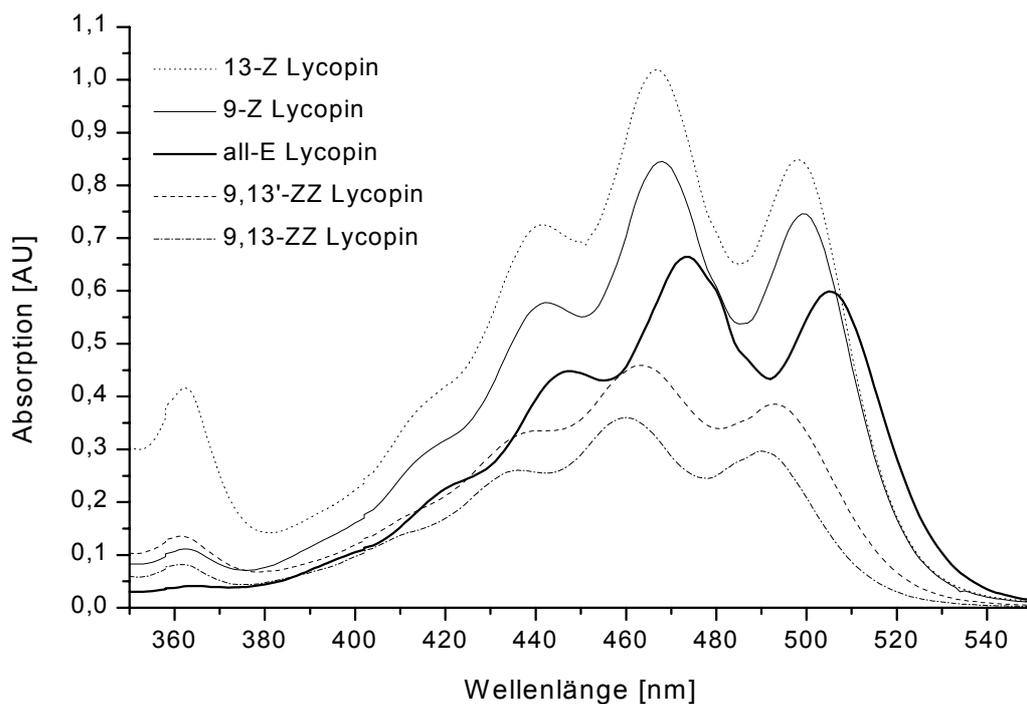


Abbildung 20: UV-Spektren der im Tomatenextrakt enthaltenen Lycopin-Stereoisomere

Peak	Stereoisomer	Absorptionsmaxima [nm]				Bandenverhältnis	
		<i>cis</i> -Bande	Bande I	Bande II	Bande III	<i>cis</i> /II	III/II [%]
7	all-E Lycopin	364	447	473	505	6,2	71,7
6	9-Z Lycopin	362	442	468	499	13,2	67,8
4	13-Z Lycopin	362	441	467	498	40,8	53,8
3	9,13'-ZZ Lycopin	361	441	463	493	29,5	38,6
5	9,13-ZZ Lycopin	361	436	460	490	22,7	45,0

Tabelle 5: UV-Absorptionsmaxima sowie Bandenverhältnisse der in Tomatenschalen identifizierten Lycopin-Stereoisomere

Die totalsymmetrische Struktur von all-E Lycopin lässt sich sehr leicht identifizieren. Das COSY-NMR-Spektrum in Abbildung 22 zeigt alle Korrelationen benachbarter Protonen. Mit der Einführung einer Z-Bindung wird die Symmetrie aufgehoben. Die "inneren" Protonen der Z-Bindung verschieben sich zu tieferem Feld, die "äußeren" zu höherem Feld. So ergeben sich für 9-Z Lycopin (Abbildung 21b) Tieffeldshifts für die Protonen H-6, H-8 und H-11, beziehungsweise bei 13-Z Lycopin für die Protonen

H-10, H-12 und H-15. Betrachtet man das Spektrum d) genauer, so sieht man, dass es wie die Summe der Spektren b) und c) aussieht. Es zeigt das Spektrum von 9,13'-ZZ Lycopin. Die beiden Z-Bindungen sind so weit entfernt, dass die Shifts der Protonen nicht interferieren. Bei 9,13-ZZ Lycopin in Spektrum e) sind die beiden Z-Bindungen dagegen nah beieinander. Hier erfährt z.B. Proton H-12 einen Tieffeldshift auf Grund der Z-Bindung in 13-Stellung, es wird aber auch zu höheren Feld hin verschoben wegen der Z-Bindung in 9-Stellung.

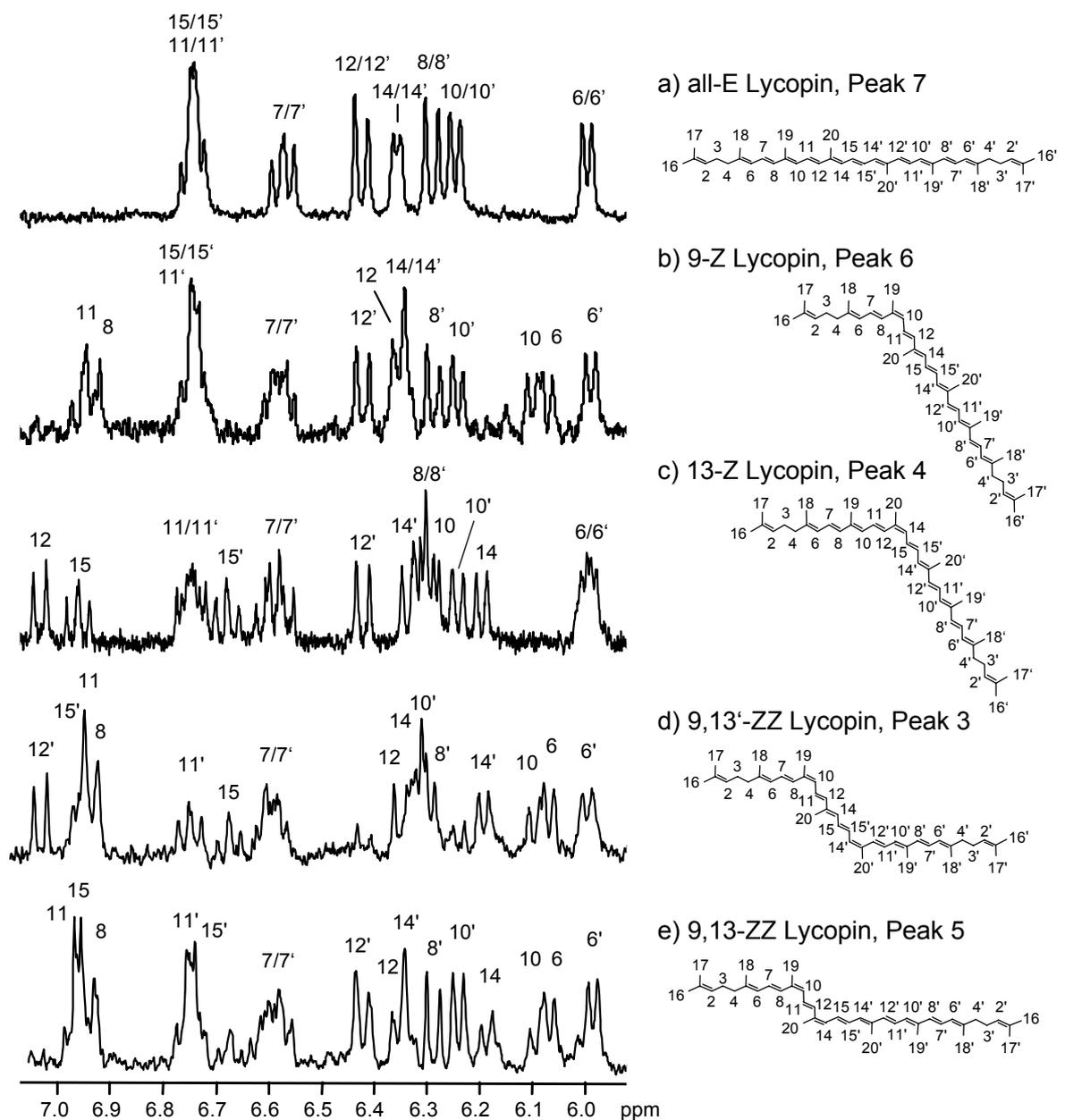


Abbildung 21: Stacked-Plot (olefinischer Bereich) der stopped-flow ^1H -NMR-Spektren der im Tomatenextrakt identifizierten Lycopin-Stereoisomeren

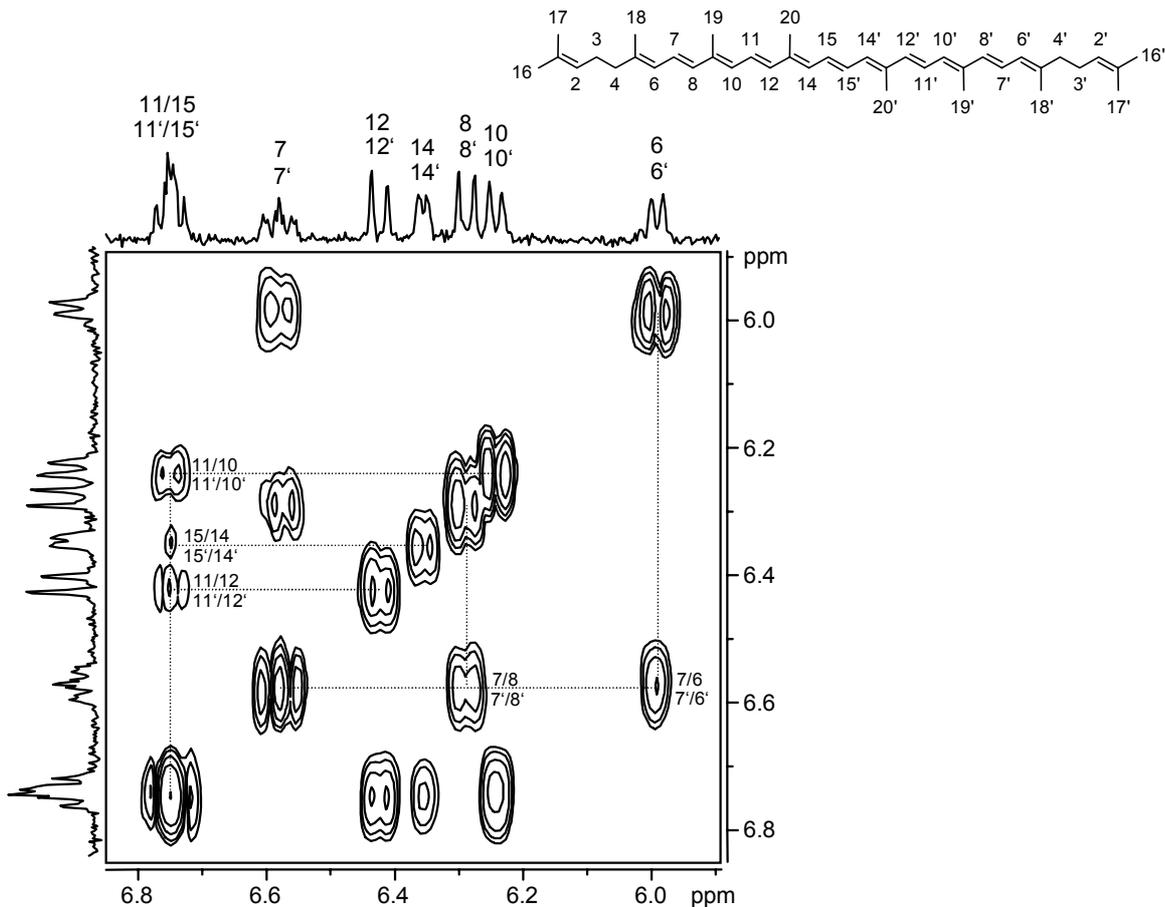


Abbildung 22: Olefinischer Bereich des COSY-Spektrums von all-E Lycopin aus einem Tomatenextrakt

5.2.3 HR-MAS-NMR-Untersuchungen von carotinoidhaltigem Gemüse

Es sollte untersucht werden, ob mit Hilfe der Suspensions-NMR-Spektroskopie Carotinoide direkt aus der Zellmatrix identifiziert werden können. Deshalb wurde eine Tomate geschält und getrocknet, um den hohen Wassergehalt von über 92 % in Tomaten zu reduzieren. Nach Zugabe weniger Tropfen Chloroform wurde ein ^1H -HR-MAS-NMR-Spektrum in Suspension aufgenommen, welches in Abbildung 23 dargestellt ist.

Das Gesamtspektrum zeigt große Resonanzsignale im aliphatischen Bereich, aber auch gut aufgelöste Signale im olefinischen Bereich, die Carotinoiden zugeordnet werden können. Vergleicht man den vergrößerten Ausschnitt der HR-MAS-NMR-Spektrens mit den Spektren aus der HPLC-NMR-Kopplung, so wird deutlich, dass das HR-MAS-NMR-Spektrum ausschließlich das Hauptisomer in der Tomate, all-E Lycopin, zeigt.

man erkennen, dass die Carotinoid-Signale dennoch deutlich sichtbar und gut aufgelöst sind, und aus Vergleichen können sie all-E β -Carotin zugeordnet werden¹⁴⁷.

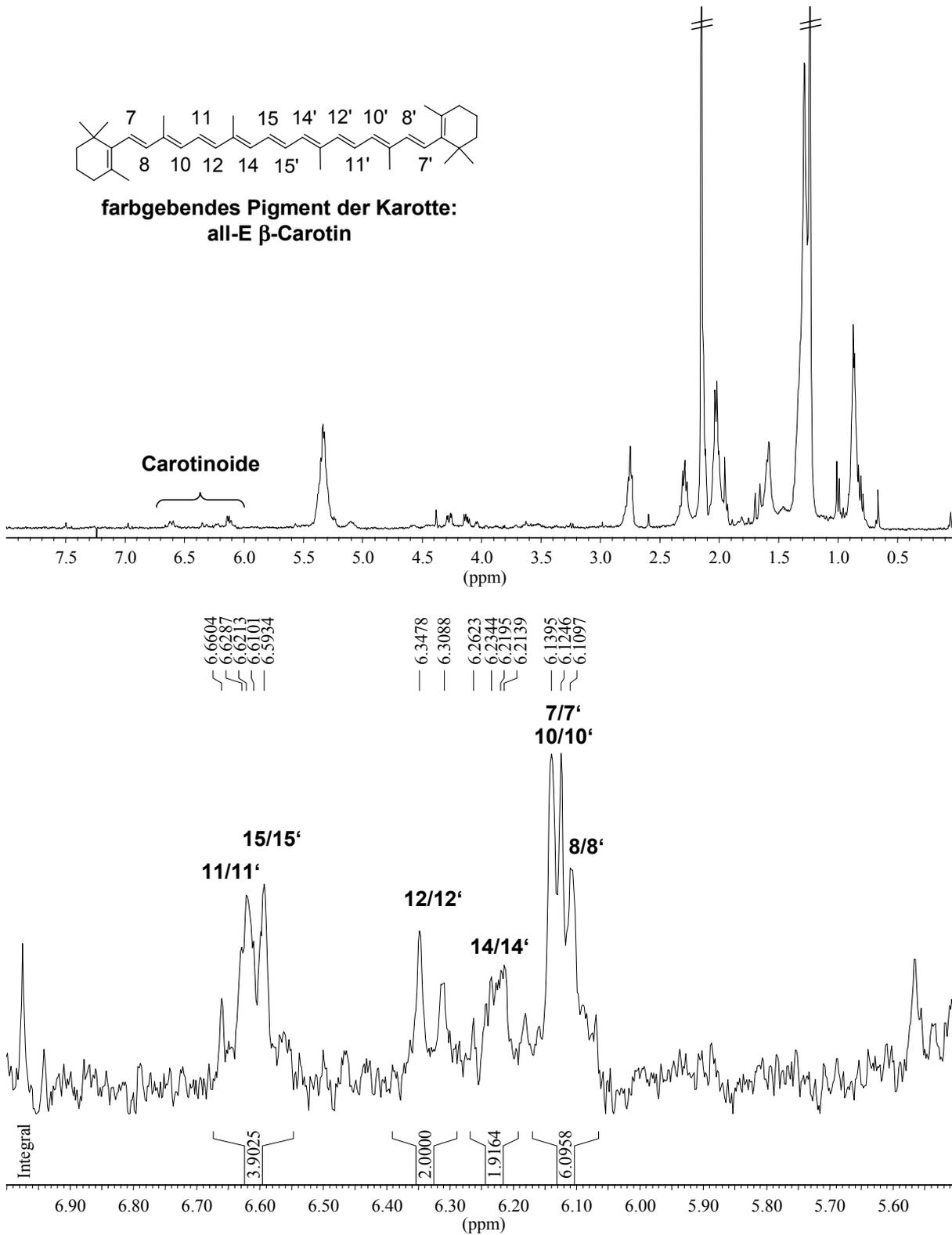


Abbildung 24: ^1H -HR-MAS-NMR-Spektren einer getrockneten Karotte.

Oben: Gesamtspektrum; unten: olefinischer Bereich

5.2.4 Carotinoid-Stereoisomere aus humanem Serum

Die Carotinoide, welche aus der Nahrung aufgenommen werden, werden im Körper über die Blutbahn transportiert und dann in den verschiedenen Organen angereichert und gespeichert. In der Blutbahn sind etwa 15 verschiedene Carotinoide identifiziert, die meisten davon ausschließlich in ihrer all-E-Form. Besonders die Carotine Lycopin und β -Carotin metabolisieren aber bereits in der Blutbahn zu mehreren Z-Isomeren. Damit alle Carotinoide, von den Dihydroxy- über die Monohydroxycarotinoide bis hin zu den verschiedenen Carotinen, in einem chromatographischen Lauf getrennt werden können, muss ein mehrstufiger Gradient gefahren werden. Die Serumanalysen wurden während eines Auslandsaufenthaltes am Human Nutrition Research Center (HNRC) on Aging der Tufts University in Boston, MA, USA gemacht. Sie stellten die Grundlage für die Pilotstudie zur Bioverfügbarkeit von Lutein in Kap. 5.5 dar.

Abbildung 25 zeigt eine humane Serumprobe (Gemisch aus Seren mehrerer Probanden), um einen Überblick über die Anzahl und relative Konzentration der einzelnen Carotinoide zu geben. Als interner Standard zur Quantifizierung wurde Echinenon zugegeben; ein Carotinoid, welches nicht vom Körper aufgenommen wird. Die Extraktion der Carotinoide aus den Serumproben wurde mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion unter Lichtausschluss (Rotlicht) mit einem standardisierten Prüfverfahren des U.S. Landwirtschaftsministeriums (USDA) durchgeführt¹⁶².

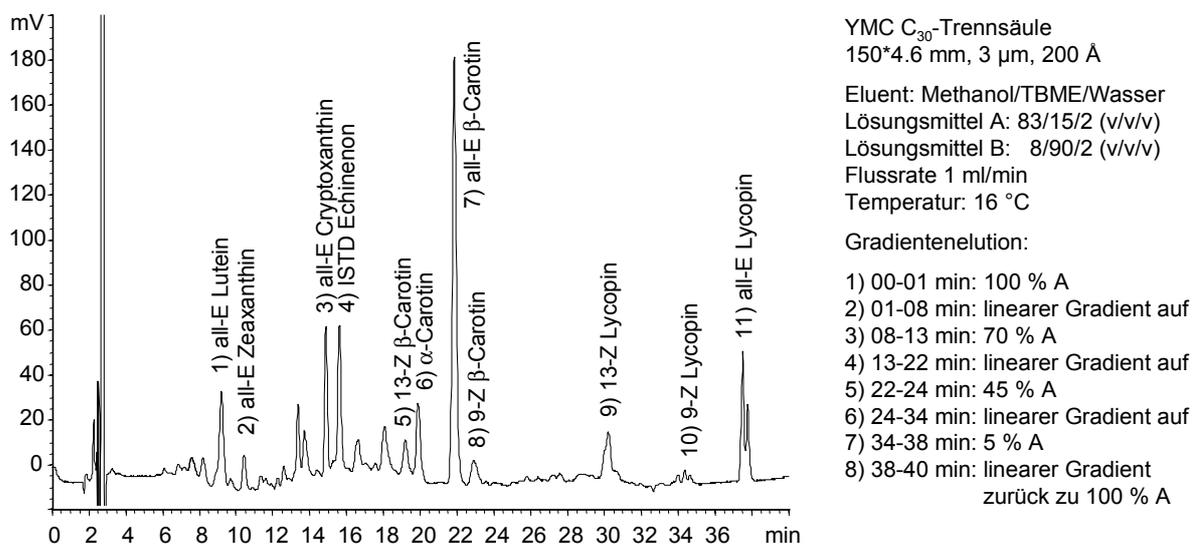


Abbildung 25: HPLC-Trennung von Humanserum auf einer C₃₀-Trennsäule

Die Trennung zeigt, dass Lycopin und β -Carotin die beiden Carotine mit der höchsten Konzentration im Serum darstellen. Zudem sind sie die Einzigsten, die im Serum bereits metabolisiert sind, und deshalb neben der all-E-Form auch in der 9-Z und 13-Z-Form auftreten. Das Serum enthält weiter größere Mengen an α -Carotin und Lutein sowie etwas weniger Zeaxanthin. Diese insgesamt fünf Carotinoide sind auch die in den meisten Lebensmitteln am häufigsten enthaltenen Carotinoide. Etwas überraschend ist die hohe Konzentration an Cryptoxanthin, welches in der Nahrung eher eine unbedeutende Rolle spielt.

5.2.5 ζ -Carotin-Stereoisomere aus molekulargenetischer und enzymologischer Produktion

ζ -Carotin spielt eine wesentliche Rolle bei der Biosynthese der Carotinoide. Es stellt eine Zwischenstufe bei der Umwandlung von Phytoen zu Lycopin dar, aus dem die meisten C_{40} -Carotinoide abgeleitet werden¹⁶³. In das Phytoengerüst werden dabei durch Desaturasen sukzessive Doppelbindungen eingebaut. Interessant hierbei ist, dass bei der enzymologischen Produktion schon auf der Stufe des Phytoens verschiedene Z/E-Stereoisomere entstehen¹⁶⁴. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Sandmann in Frankfurt sollte ein ζ -Carotin Reaktionsgemisch aus der enzymologischen Produktion von *Escherichia coli* mittels HPLC-NMR-Kopplung untersucht werden.

Die Trennung der Isomere wurde auf einer C_{30} -Säule mit einem ternären Eluentengemisch bei 28 °C durchgeführt und ist in Abbildung 26 (links) dargestellt. Das ternäre Gemisch, die Temperatur sowie die breiten Banden im Chromatogramm machen eine HPLC-NMR-Kopplung unmöglich. Deshalb wurde die Trennung modifiziert. Mit einer isokratischen Trennung unter Verwendung von Aceton/Wasser als Eluent konnten bei Raumtemperatur alle sechs ζ -Carotin-Stereoisomere innerhalb 20 Minuten und damit in der Hälfte der Zeit basisliniengetrennt werden, mit einer höheren Selektivität (s. Abbildung 26 rechts). Die UV-Spektren (Abbildung 27) geben erste Aufschlüsse über die Art der Isomere.

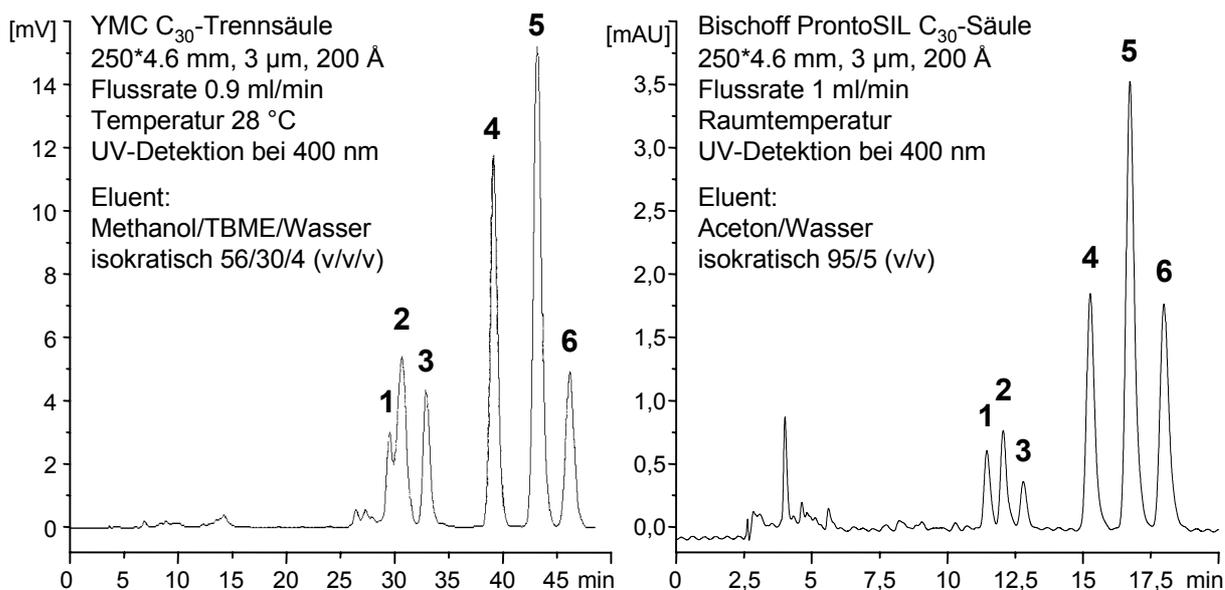


Abbildung 26: Vergleich der HPLC-Trennungen von ζ -Carotin-Stereoisomeren aus enzymologischer Produktion mit Methanol/TBME (links) und Aceton/Wasser (rechts) als Eluent für die HPLC-NMR-Kopplung

Die sechs Isomere lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Peak 1-3 entsprechen Z-Isomeren mit mindestens einer Z-Bindung im konjugierten System. Dies kann aus den intensiven Doppel-cis-Banden bei 290 nm geschlossen werden (siehe Tabelle 6).

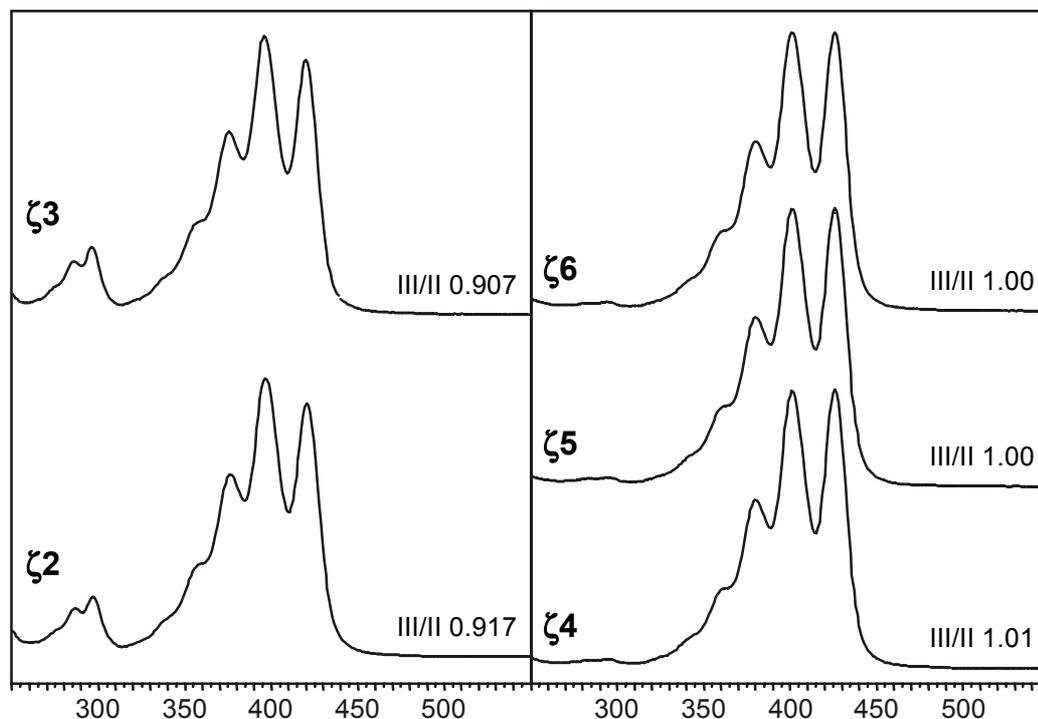


Abbildung 27: UV-Spektren der ζ -Carotin-Stereoisomeren aus der HPLC-Trennung

Peak Nr.	Absorptionsmaxima [nm] I, II, III, cis	Verhältnis III/II [%]	Verhältnis cis/II [%]
1	377,399,424,287+296	87	24
2	375,395,420,285+295	92	19
3	375,395,420,285+295	91	23
4	380,401,426,295	101	3,5
5	380,401,426,295	100	3,5
6	380,401,426,295	100	3,5

Tabelle 6: UV-Absorptionsmaxima und Bandenverhältnisse der ζ -Carotin-Isomere

Im Gegensatz dazu haben die intensiveren Peaks 4-6 keine nennenswerte *cis*-Bande. Alle drei Isomere zeigen ein nahezu identisches UV-Spektrum. Das Verhältnis der Banden III/II von über 100 % deutet für alle drei Isomere auf eine all-E-Struktur hin. Die Strukturen der Peaks 4-6 konnten mittels HPLC-NMR-Kopplung eindeutig bestimmt werden. Die stopped-flow ^1H -NMR-Spektren sind in Abbildung 28 als Stacked-plot wiedergegeben.

Der Bereich der konjugierten Doppelbindungen im NMR-Spektrum sieht für alle drei Isomere identisch aus. Es existieren vier verschiedene Resonanzsignal-Gruppen, die jeweils Paaren von Protonen zugeordnet werden können. Das Dublett bei 6.64 ppm ($J = 10$ Hz) gehört zu den Protonen H-15 und H-15'. Diese koppeln mit dem Multiplett bei 6.21 ppm. Das Multiplett erscheint auf Grund der Überlagerung der Protonen H-14 und H-14' mit zwei weiteren Protonen H-12 und H-12'. Diese koppeln wiederum mit dem Signal bei 6.53 ppm ($J = 15$ Hz), das den Protonen H-11 und H-11' zuzuordnen ist. Die Aufspaltung zum Dublett von Dublett begründet sich in einer weiteren Kopplung mit den Protonen H-10 und H-10' bei 5.93 ppm ($J = 11$ Hz).

Die Unterschiede in den drei Spektren beziehen sich einzig auf die Lage der vier Protonen an den beiden isolierten Doppelbindungen, die zu Triplettsignalen aufspalten. Im Spektrum von Peak 4, welches als all-E ζ -Carotin identifiziert wurde, erscheinen zwei Triplets bei 5.15 ppm (H-6 und H-6') und 5.05 ppm (H-2 und H-2'). Die Aufspaltung in drei Triplets für Peak 5 kann nur durch eine Einführung einer Z-Bindung in Position 5 erklärt werden. Daraus ergibt sich auch eine Änderung der

chemischen Verschiebung δ für bestimmte Triplettssignale. Für 5-Z ζ -Carotin ergibt sich ein Hochfeldshift für H-6, sowie ein etwas schwächerer Tieffeldshift für H-2. Dies ist bei Peak 5 der Fall. Proton H-6 überlagert sich mit dem unveränderten Proton H-2', während sich Proton H-2 leicht, um 0.04 ppm, zu tieferem Feld hin verschiebt.

Bei Peak 6 tritt nun der Fall ein, dass wiederum nur zwei Triplettssignale zu sehen sind. Dies kann dadurch erklärt werden, dass mit Einführung einer zweiten Z-Bindung in Position 5 ein symmetrisches 5,5'-ZZ ζ -Carotin entsteht. Die Protonen H-6 und H-6' erfahren identische Hochfeldshifts, wie auch H-2 und H-2' gleich stark zu tieferem Feld hin verchoben werden, im Vergleich zum all-E Isomer (Peak 4).

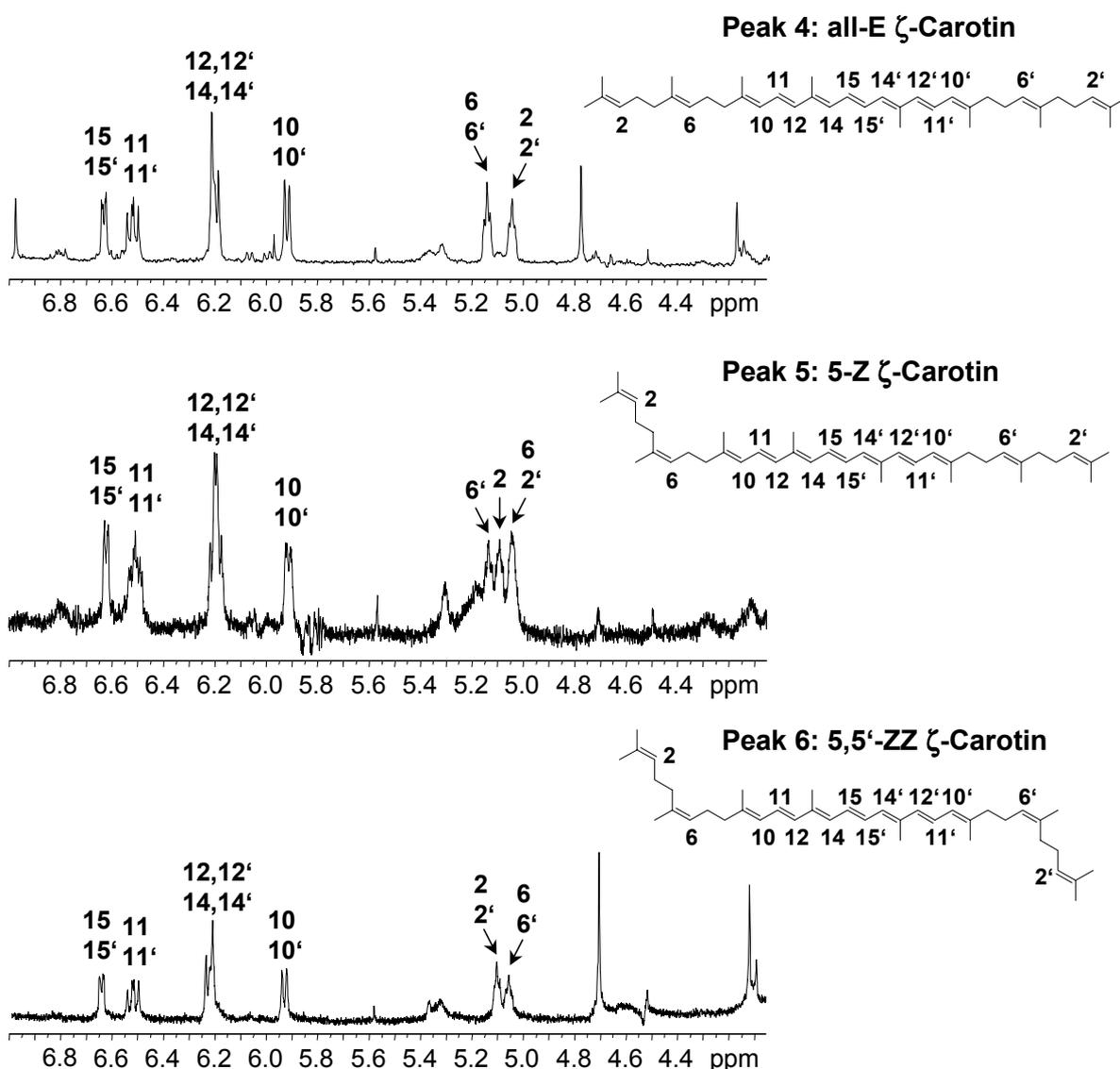


Abbildung 28: Stacked-Plot (olefinischer Bereich) der stopped-flow $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Hauptstereoisomere 4-6 von ζ -Carotin

5.3 Anreicherung von Carotinoiden aus humanen Plasma- Proben

Die Aufarbeitung von Blutproben zur Analyse von labilen Substanzen stellt den Analytiker vor immer neue Herausforderungen. Besonders bei licht- und sauerstoffempfindlichen Analyten wie Carotinoiden ist es besonders schwer einzuordnen, ob eine Detektion eines Z-Stereoisomers Ergebnis der realen Zusammensetzung der Probe ist oder das Artefakt einer mangelhaften Extraktion. Die Entwicklung der sogenannten Restricted Access Materialien (RAM-Phasen, LiChrospher[®] RP-C18 ADS-Säule, Fa. Merck KGaA) zur selektiven Anreicherung bietet eine effiziente Möglichkeit, schnelle und reproduzierbare Analysen ohne große Probenvorbereitung zu gewährleisten.

Es sollte versucht werden, eine Methode zu entwickeln, die die Aufkonzentrierung von Carotinoiden direkt aus dem Blutplasma mit diesen RAM-Materialien ermöglicht, ohne vorherige zusätzliche Aufarbeitung. Eine Säulenschaltung, wie für die SPE-HPLC-Kopplung gezeigt, bietet dabei die Möglichkeit des vollständigen Proben-transfers über die Anreicherungskartusche zum HPLC-System. Die Chromatogramme zur Anreicherung sind in Abbildung 29 dargestellt.

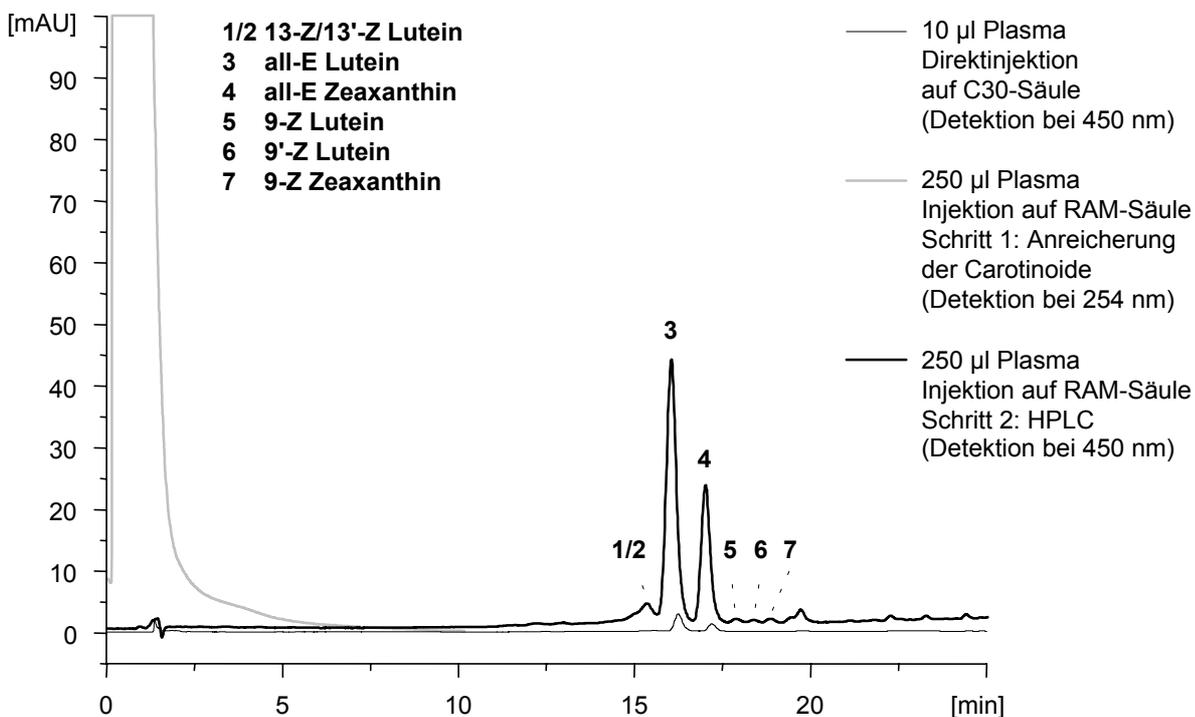


Abbildung 29: Anreicherung von Carotinoiden mittels RAM-HPLC-Kopplung

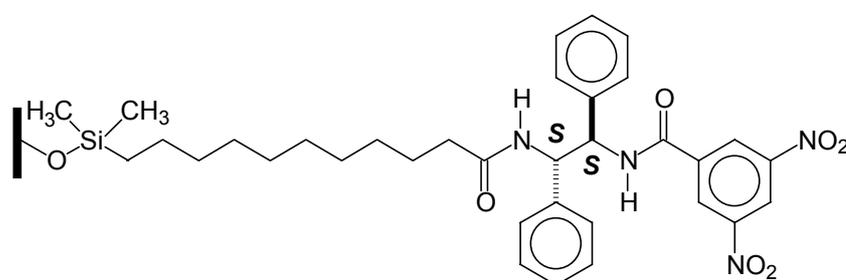
Die Plasma-Probe kann auch ohne RAM-HPLC-Kopplung direkt auf die HPLC-Säule injiziert werden. Das Chromatogramm ist gestrichelt dargestellt, all-E Lutein und all-E Zeaxanthin werden voneinander getrennt. Die im Plasma enthaltenen Proteine werden dabei jedoch von der HPLC-Säule nicht eluiert, sondern sie verkleben sukzessive die Trennsäule. Dies führt zu irreproduzierbaren Ergebnissen sowie zu kurzen Lebensdauern der Trennsäulen, da der Rückdruck mit jeder Injektion steigt.

Der wichtigste Schritt bei der Verwendung von Anreicherungskartuschen ist der Äquilibrierungsschritt der Kartusche. Erst nach Konditionierung der Kartusche mit geeigneten Lösungsmitteln (Isopropanol, Methanol) kann auf eine der Probe ähnliche, wässrige Lösung umgestellt werden. Auf die RAM-Säule konnten so bis zu 250 µl Plasma injiziert werden. Mit einem Wasser/Acetonitril-Gemisch von 97/3 (v/v) wurde die Plasmalösung 10 Minuten bei einer Flussrate von 1 ml/min durch die Kartusche gepumpt und die UV-Absorption bei 254 nm gemessen. Es zeigt sich dabei, dass nach etwa sieben Minuten die Makromoleküle von der Kartusche fast völlig eluiert sind. Nach 10 Minuten wird die Kartusche durch Drehen eines Schaltventils in das HPLC-System geschaltet. Jetzt können die Carotinoide von der Anreicherungskartusche auf die HPLC-Säule transferiert und dort aufgetrennt werden.

Auf Grund des komplizierten Aufbaus konnte nur eine isokratische Elution mit Aceton/Wasser 84/16 (v/v) erfolgen. Diese Zusammensetzung wurde für eine Trennung der Lutein- und Zeaxanthin-Stereoisomere ausgewählt. Das durchgezogene Chromatogramm in Abbildung 29 zeigt deutlich die erfolgreiche Anreicherung der Carotinoide mit der RAM-Säule. Nun können sogar die Z-Stereoisomere von Lutein und Zeaxanthin, wenn auch in niedriger Konzentration, im Plasma identifiziert werden. Damit die RAM-Säule zur quantitativen Analyse von Plasmaproben eingesetzt werden kann, muss die Anreicherung aber noch etwas optimiert werden, da im Vergleich zur direkt injizierten Menge die Anreicherung nur eine ca. 20-fache Aufkonzentrierung ergab. Wahrscheinlich wird im Anreicherungs-schritt mit den Makromolekülen auch eine gewisse Menge an Carotinoiden eluiert. Eine Reduzierung des Anreicherungs-schritts von 10 auf 8 Minuten könnte schon deutlich verbesserte Ergebnisse bewirken.

5.4 Chirale Trennung von optischen Zeaxanthin-Isomeren

In der Retina werden nicht nur geometrische Stereoisomere der Carotinoide Lutein und Zeaxanthin postuliert, sondern auch optische Isomere von Zeaxanthin. Um neben den Stereoisomeren künftig auch optische Isomere in den verschiedenen biologischen Geweben identifizieren zu können, wurde eine chirale Trennmethode zur Trennung der drei optischen Zeaxanthin-Isomere entwickelt. Als geeignete Trennphase erwies sich die sogenannte (*S,S*)-ULMO-Säule, die 1994 von Uray, Lindner und Maier zur Trennung von Racematen entwickelt wurde und deren Struktur in Abbildung 30 skizziert ist^{165,166}.



CSP: (*S,S*)-Ulmo
250*4.6 mm

Abbildung 30: Struktur der (*S,S*)-ULMO-Trennphase

Die BASF AG stellte die drei Enantiomere *R,R*-Zeaxanthin, Meso-Zeaxanthin sowie *S,S*-Zeaxanthin zur Verfügung. Die drei Enantiomere wurden zuerst einzeln getrennt, und danach als Gemisch aller drei Enantiomere zusammen.

Die besten Ergebnisse erzielte ein Lösungsmittelgemisch aus *n*-Heptan und Isopropanol. Hier konnte mit einer isokratischen Trennung bei 95 % *n*-Heptan alle drei Enantiomere innerhalb 45 Minuten eluiert werden (Abbildung 31). Die Mischung aller drei Enantiomere ergab eine Bestätigung, dass die Trennung funktioniert.

Bei den Untersuchungen stellte sich dabei heraus, dass das *S,S*-Zeaxanthin im Gegensatz zu den beiden anderen Isomeren nur zu etwa 65 % enantiomerenrein war. Wie aus den Chromatogrammen zu erkennen ist, ist das *S,S*-Zeaxanthin besonders durch Meso-Zeaxanthin verunreinigt.

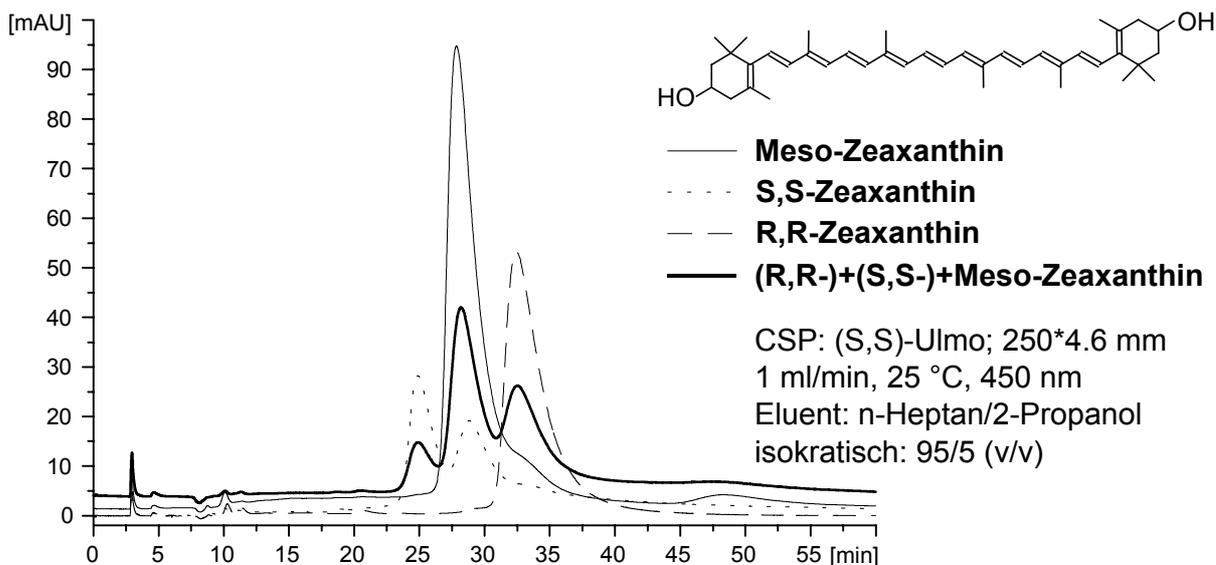


Abbildung 31: Enantioselektive HPLC-Trennung von optischen Zeaxanthin-Isomeren auf einer (S,S)-ULMO-Trennsäule

Auf dieser Grundlage wurde die Enantiomerentrennung für einen effizienten Einsatz optimiert. Mit einem isokratischen System mit 90 % n-Heptan konnte die Trennung auf unter 25 Minuten verkürzt werden, ohne einen nennenswerten Verlust an Selektivität zu verzeichnen (s. Abbildung 32).

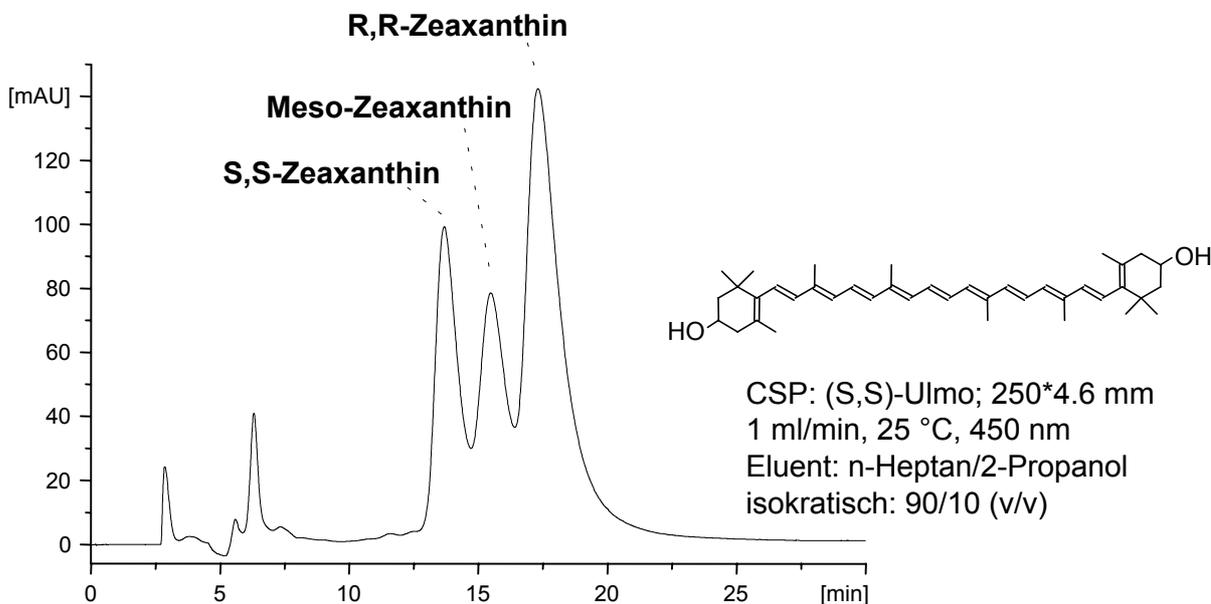


Abbildung 32: Optimierte enantioselektive HPLC-Trennung eines Gemisches von optischen Zeaxanthin-Isomeren auf einer (S,S)-ULMO-Säule

5.5 Bioverfügbarkeit von Lutein aus in Deuteriumoxid angebauten, partiell gelabelten Gemüsesorten

5.5.1 Design der Studie

Die Bioverfügbarkeitstudie wurde am USDA HNRC on Aging der Tufts University in Boston unter der Anleitung von Dr. R. M. Russell durchgeführt. Sie ist Teil einer Untersuchung zur Umwandlung von Carotinoiden zu Vitamin A im Organismus, wobei das Labeling der Carotinoide durch die Spaltung an der zentralen Doppelbindung auf das "produzierte" Vitamin A übergeht. In einer früheren Studie wurde mehreren Probanden eine definierte Menge an synthetisiertem gelabeltem β -Carotin zugeführt¹²⁵. Diese Studie ist aber nur wenig aussagekräftig und nicht auf die Nahrungsaufnahme von Carotinoiden übertragbar, da die Resorption und Anreicherung der synthetisierten Carotinoide deutlich vermindert ist.

Diese Studie, mit in Deuteriumoxid hydroponisch angepflanzten Gemüsesorten, wurde deshalb als Pilotstudie entworfen, um eine genaue Anreicherung und Bioverfügbarkeit von Carotinoiden direkt aus den Gemüsesorten bestimmen zu können. Mit dieser Studie kann im Gegensatz zu anderen Studien^{30-32,167,168} nicht nur der Gesamt-Carotinoidspiegel im Serum verfolgt, sondern erstmals zwischen Carotinoidspiegel und den applizierten, gelabelten Carotinoiden unterschieden werden. Zu diesem Zweck wurden zwei verschiedene Gemüsesorten, ein Spinat sowie eine Kohlsorte (Collard Green), in einer speziellen Gewächskammer hydroponisch, in D₂O angebaut.

Studie	Name	Geschlecht	Alter	Größe [m]	Gewicht [kg]	BMI [kg/m ²]
Spinat	L.B.	w	53	1.67	77.5	25.1
Spinat	A.B.	m	47	1.58	80.0	29.3
Kohl	N.G.	w	59	1.70	67.5	21.2
Kohl	J.H.	w	66	1.63	75.7	28.7

Tabelle 7: Probanden der Pilotstudie zur Bioverfügbarkeit von Lutein aus gelabeltem Gemüse

Für die Pilotstudie standen je zwei Probanden für jede Gemüsesorte zur Verfügung. Die Daten der Probanden sind in Tabelle 7 wiedergegeben. Aus den Daten ist zu entnehmen, dass für eine statistische Auswertung einerseits zu wenige Probanden zur Verfügung standen, andererseits zu große Differenzen zwischen den einzelnen Probanden bestanden. Dies gilt besonders für die Probanden der Kohlstudie. Das Alter der vier Probanden, drei Frauen und ein Mann, betrug zwischen 47 und 66 Jahren.

Die Probanden wurden zwei Wochen vor und in den ersten beiden Wochen nach Beginn der Studie einer Carotinoid-freien Diät unterworfen, da zugeführte Carotinoide etwa 14 Tage in der Blutbahn zirkulieren. Am Tag 0 wurden die Probanden an der Tufts Medical School einquartiert und sie bekamen eine carotinoidreiche Mahlzeit verabreicht. Die Mahlzeit bestand aus dem jeweiligen gedämpften und pürierten Gemüse sowie einem fetthaltigen Getränk, um die Aufnahme der lipophilen Carotinoide im Organismus zu verbessern.

Tag [d]	Art und Dosis der Nahrung	Zeitpunkt der Entnahme von Blutproben
-14 bis -1	Carotinoid-freie Diät	keine
0	püriertes Carotinoid-Gemüse, fetthaltiges Getränk	0, 1, 1.5, 3, 5, 7, 9, 11, 13 h
0 bis 13	Carotinoid-freie Diät	täglich
14 bis 35	frei wählbar	jeden zweiten Tag

Tabelle 8: Design der Pilotstudie. Diätplan sowie Auswahl der Blutentnahmen

Um die Carotinoideaufnahme im Körper zu registrieren, wurden Serumproben entnommen. Am Tag der Carotinoideaufnahme ($d = 0$) wurden mindestens neun Proben mit einem anfänglichen Intervall von unter zwei Stunden entnommen (s. Tabelle 8). An den nächsten Tagen wurde jeweils täglich eine Probe gezogen. Nach 14 Tagen konnten die Probanden die Klinik wieder verlassen und ihre gewohnte Nahrung fortsetzen, wobei zusätzlich jede Woche eine Serumprobe entnommen wurde.

Die Serumproben wurden mittels HPLC-UV quantitativ auf ihren Gesamt-Luteingehalt hin untersucht, und zusätzlich mittels HPLC-APCI-MS-Kopplung. Hier kann speziell die Anreicherung des applizierten, gelabelten Luteins bestimmt werden.

5.5.2 Probenvorbereitung und Analyse

Der kontrollierte Anbau von gelabelten Pflanzen erfordert eine speziell entwickelte Gewächskammer sowie eine über die gesamte Wachstumszeit (etwa 5 Wochen) stabile Konzentration an Deuteriumoxid. Das Deuteriumlabeling der Spinat- und Kohlsorte wurde am USDA HNRC on Childrens in Houston, Texas von Prof. M.A. Grusak entwickelt¹⁶⁹. Die beiden Gemüsesorten wurden in speziellen Gewächskammern (s. Abbildung 33 oben) hydroponisch angepflanzt, genauer in partiell deuteriertem Wasser. Der Gehalt an Deuteriumoxid im Nährmedium wurde variiert und mittels HPLC-APCI-MS-Messung kontrolliert. Als optimale Bedingung stellte sich ein Nährmedium mit 25 Atom-% Deuteriumoxid heraus. Die Pflanzen entwickelten sich im Vergleich zu im Boden gezüchteten Pflanzen normal, die Blätter wie auch die Wurzeln zeigen keine Unterentwicklung (s. Abbildung 33 unten).

Der Kohl sowie der Spinat wurde nach etwa 5 Wochen geerntet. Beide Sorten wurden vor der Applikation gewaschen und in heißem Wasserdampf fünf Minuten lang gedämpft. Die gedämpften Gemüsesorten wurden dann püriert und portioniert. Tabelle 9 zeigt die Zusammensetzung der verabreichten pürierten Gemüsesorten mit Angabe des Gehalts an Lutein sowie an β -Carotin, bestimmt mittels HPLC auf einer C₃₀-Trennsäule.

Studie	Name	Art und Menge der Mahlzeit	applizierte Menge all-E Lutein	applizierte Menge all-E β -Carotin
Spinat	L.B.	200 g gedämpfter und pürierter Spinat	18.80 mg	11.55 mg
Spinat	A.B.	200 g gedämpfter und pürierter Spinat	18.80 mg	11.55 mg
Kohl	N.G.	193 g gedämpfter und pürierter Kohl (Grand-simpson Collard Green)	9.76 mg	8.96 mg
Kohl	J.H.	213.5 g gedämpfter und pürierter Kohl (Bluemax Collard Green)	15.35 mg	13.02 mg

Tabelle 9: Gehalt an Carotinoiden in den verabreichten pürierten Gemüsesorten



Abbildung 33: Design der Gewächskammer zum kontrollierten Anbau von partiell deuteriertem Spinat (oben), sowie Wurzeln und Blätter der in Deuteriumoxid angebauten Spinatpflanzen (unten)

5.5.3 Untersuchung zur Anreicherung von Lutein aus Gemüse mittels HPLC-UV-Kopplung

5.5.3.1 Kohl

Wie aus Tabelle 9 entnommen werden kann, wurden beiden Probanden der Pilotstudie zur Bioverfügbarkeit von Lutein aus Kohl unterschiedliche Collard Green Sorten verabreicht (N.G. 193 g Grandsimpson, J.H. 213.5 g Bluemax). Beide Kohlsorten zeigen qualitativ ein identisches HPLC-Chromatogramm, sie beinhalten die selben Carotinoide. Unterschiede sind aber in der Quantität und damit in der verabreichten Menge an Carotinoiden zwischen den beiden Kohlsorten gegeben. So wurde N.G. nur 9.76 mg Lutein appliziert, während J.H. 15.35 mg Lutein zu sich nahmen.

In Abbildung 34 ist das Chromatogramm des gelabelten Bluemax Collard Green gezeigt. Die Kohlsorte enthält Lutein als Hauptbestandteil, sowie größere Mengen an β -Carotin. Zeaxanthin sowie Chlorophyll sind nur in geringer Menge vorhanden.

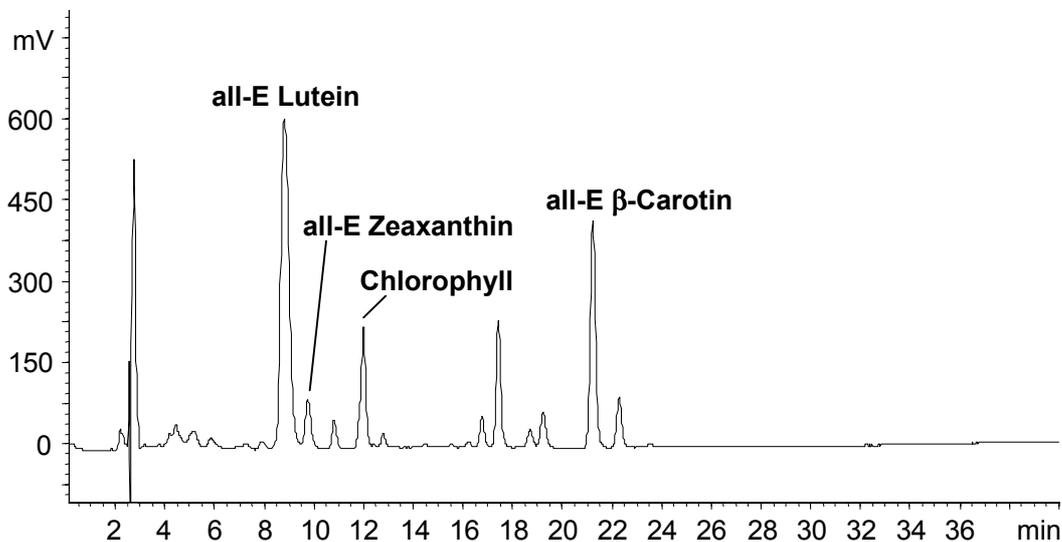


Abbildung 34: HPLC-Chromatogramm von gelabeltem Kohl (Bluemax Collard Green)

Die Bestimmung des Gesamtcarotinoidgehalts im Serum (im Organismus gespeicherte Carotinoide + zugeführte, gelabelte Carotinoide) wurde mit einer Gradientenelution auf einer C_{30} -Trennsäule durchgeführt. Beispielhaft für ein Chromatogramm ist die Trennung der Serumprobe von J.H. sieben Tage nach Verzehr des pürierten Bluemax Collard Greens in Abbildung 35 dargestellt.

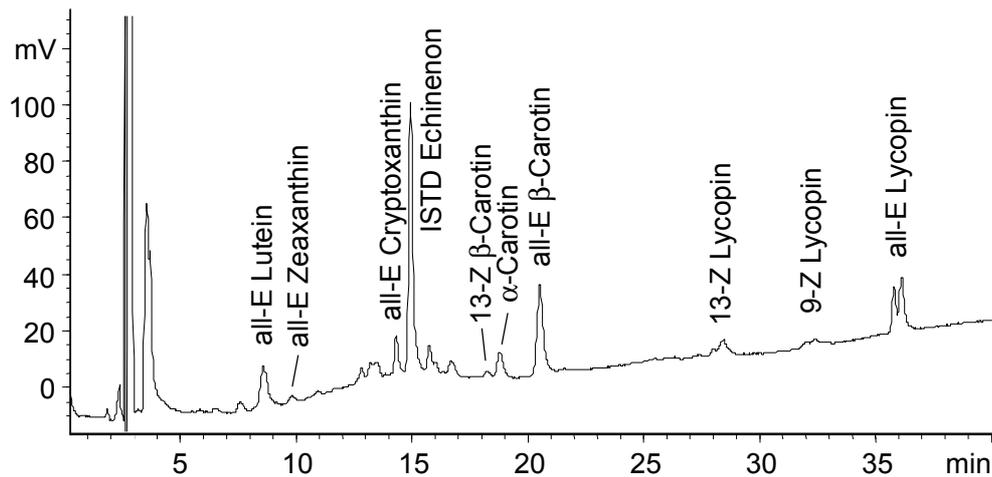


Abbildung 35: HPLC-Chromatogramm von humanem Serum (J.H.) 7 Tage nach einmaliger Applikation von in D_2O angebauten Collard Green

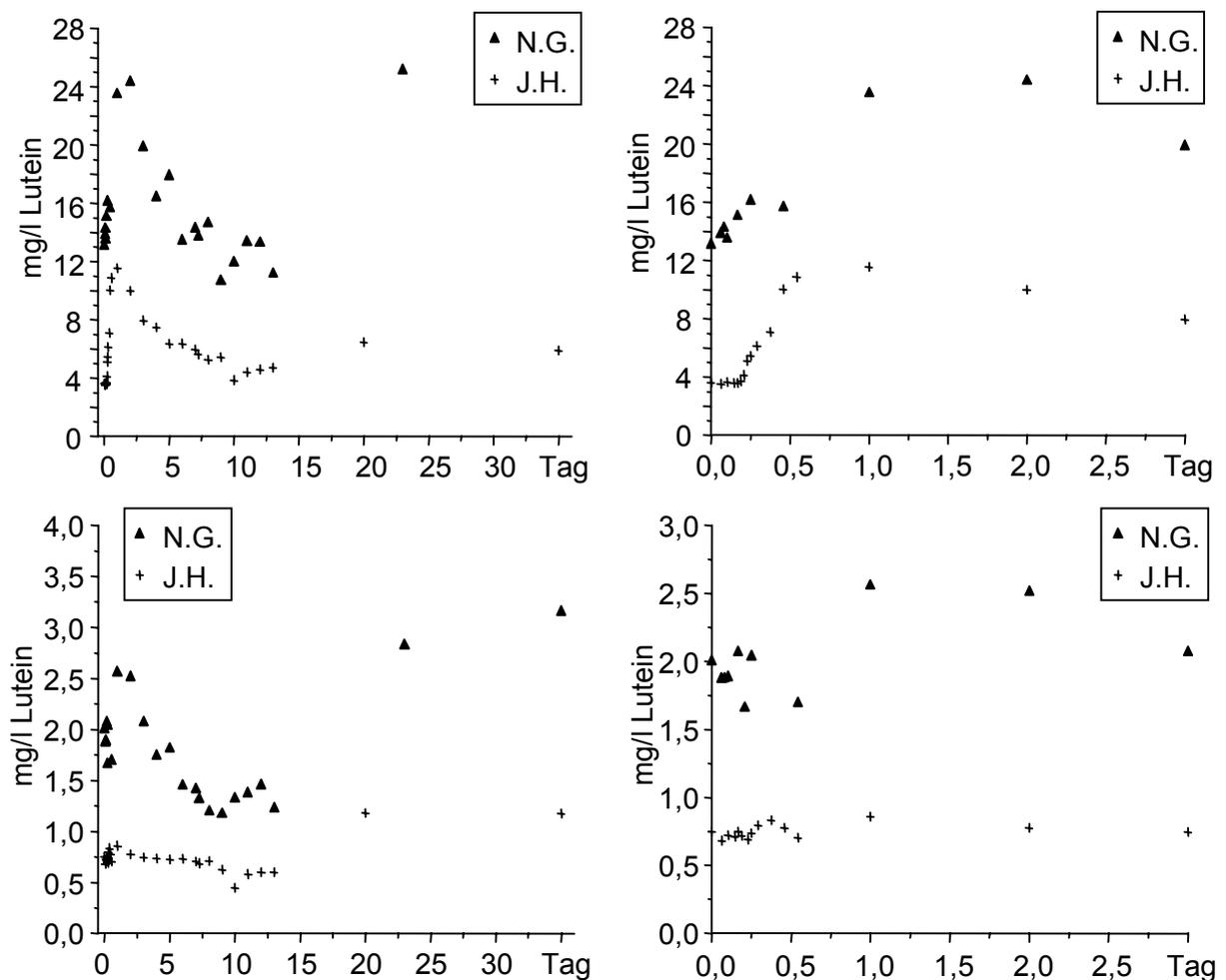


Abbildung 36: Anreicherung von Lutein (oben) und Zeaxanthin (unten) im Serum nach einmaliger Applikation von in D_2O angebautem Kohl mittels HPLC. Links: gesamter Zeitraum der Studie; rechts: Ausschnitt Tag 0 bis 3

Die Serumproben wurden auf den Lutein- sowie den Zeaxanthingehalt untersucht. Die quantitative Auswertung ist sowohl graphisch (Abbildung 36) als auch tabellarisch (Tabelle 10) aufgezeigt. Der Gehalt an Lutein korreliert dabei mit dem von Zeaxanthin, sowohl für N.G. als auch für J.H.

Zeit [Tag]	Spinat A.B.		Spinat L.B.		Kohl N.G.		Kohl J.H.	
	Lut. [mg/l]	Zea. [mg/l]						
0	8,988	1,436	9,510	1,527	13,070	1,999	3,628	0,750
0d 1.5h					13,816	1,870	3,529	0,682
0d 2h					14,232	1,873		
0d 2.5h	10,224	1,464	8,785	1,522	13,475	1,882	3,652	0,723
0d 3.5h							3,592	0,712
0d 4h					15,035	2,066	3,580	0,750
0d 4.5h							3,720	0,719
0d 5h	11,152	1,344	12,575	1,738		1,657	4,138	
0d 5.5h							5,132	0,690
0d 6h					16,083	2,033	5,473	0,737
0d 7h	14,082	1,654	14,232	1,671			6,129	0,794
0d 9h	14,119	1,528	16,510	1,823			7,096	0,833
0d 11h	18,287	1,919	22,173	2,342	15,647		10,031	0,774
0d 13h			17,822	2,042		1,691	10,863	0,703
1	18,188	1,733	16,790	1,411	23,456	2,556	11,548	0,859
2	15,955	1,544	14,478	1,359	24,305	2,511	9,994	0,776
3	13,381	1,212	13,927	1,357	19,825	2,067	7,955	0,745
3d 6h	14,040	1,242	13,027	1,251				
3d 12h	13,735	1,198	13,994	1,262				
4	12,794	1,136	12,420	1,274	16,405	1,739	7,468	0,735
5	12,200	1,107	12,437	0,963	17,854	1,810	6,345	0,724
6	12,475	1,188	12,913	1,038	13,423	1,446	6,371	0,730
7	12,326	1,221	11,627	1,101	14,239	1,411	5,967	0,703
7d 6h					13,696	1,314	5,628	0,687
8	11,151	0,873	11,980	1,056	14,619	1,192	5,252	0,708
9	10,130	0,898	12,287	1,015	10,654	1,168	5,439	0,625
10					11,928	1,318	3,851	0,448
11					13,319	1,372	4,419	0,581
12					13,262	1,448	4,597	0,600
13					11,143	1,224	4,725	0,599
16	13,931	2,136	15,900	1,615				
20							6,452	1,180
23	19,956	3,734	17,671	2,321	25,114	2,824		
30	17,220	3,550	19,879	2,703				
35					25,670	3,151	5,889	1,177

Tabelle 10: Quantitative Auswertung der Serumproben. Gehalt an Lutein und Zeaxanthin im Serum nach einmaliger Applikation zur Zeit $t = 0$

Da die Zeaxanthin-Level im Blut generell niedrig sind, und auch wenig Zeaxanthin appliziert wurde, ist die Anreicherung von Zeaxanthin weniger stark ausgeprägt als für Lutein. Zeaxanthin durchläuft sein Maximum für beide Probanden nach 24 Stunden. Lutein zeigt bei J.H. ebenso nach 24 Stunden eine maximale Anreicherung, während es bei N.G. nach 48 Stunden maximal ist.

N.G. hat einen etwa 3-fach höheren Carotinoid-Grundlevel als J.H. (Luteinlevel zum Zeitpunkt $t = 0d\ 0h$: N.G. 13.1 mg/l; J.H. 3.6 mg/l Serum). Der höchste Anreicherungsfaktor für Lutein bei N.G. ist nach 48 Stunden mit 1.9 gegeben. Zeaxanthin ist an seinem Maximum nach 24 Stunden 1.3-fach im Vergleich zum Anfangspunkt erhöht. Da J.H. zum niedrigeren Carotinoid-Grundspiegel zudem eine höhere Dosis an Carotinoiden als N.G. appliziert bekam, ist auch der höhere Anreicherungsfaktor für J.H. erklärbar. Bei J.H. beträgt der Faktor 3.2 nach 24 Stunden für die maximale Anreicherung von Lutein sowie 1.2 für Zeaxanthin.

5.5.3.2 Spinat

Der gelabelte Spinat enthält wie auch der Anbauspinat aus eigener Züchtung (s. Kap. 5.2.1) Lutein als Hauptcarotinoid, wie im HPLC-Chromatogramm des gelabelten Spinats in Abbildung 37 verdeutlicht wird.

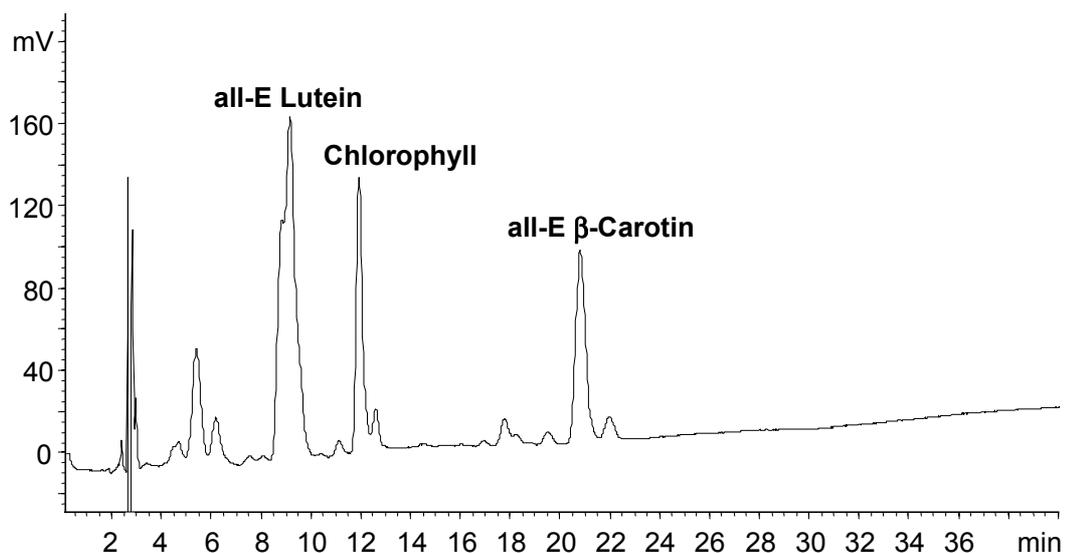


Abbildung 37: HPLC-Chromatogramm von in D_2O angebauten, gelabeltem Spinat

Im quantitativen Vergleich enthält der gelabelte, prozessierte Spinat ungefähr die selbe Menge an Lutein (9.4 mg/100 g) wie der 5 Wochen alte eigene Anbauspinat (9.2 mg Lutein gesamt/100 g Spinat, s. Tabelle 4), aber nur etwa 70 % an β -Carotin (5.8 zu 8.2 mg/100g). Beiden Probanden wurde die gleiche Menge an gelabeltem Spinat appliziert. Da auch beide Probanden nahezu identische Carotinoid-Grundlevel besitzen sowie ähnliche physische Eigenschaften (Alter, BMI), sollte die Anreicherung von Lutein im Serum ähnliche Ergebnisse erbringen.

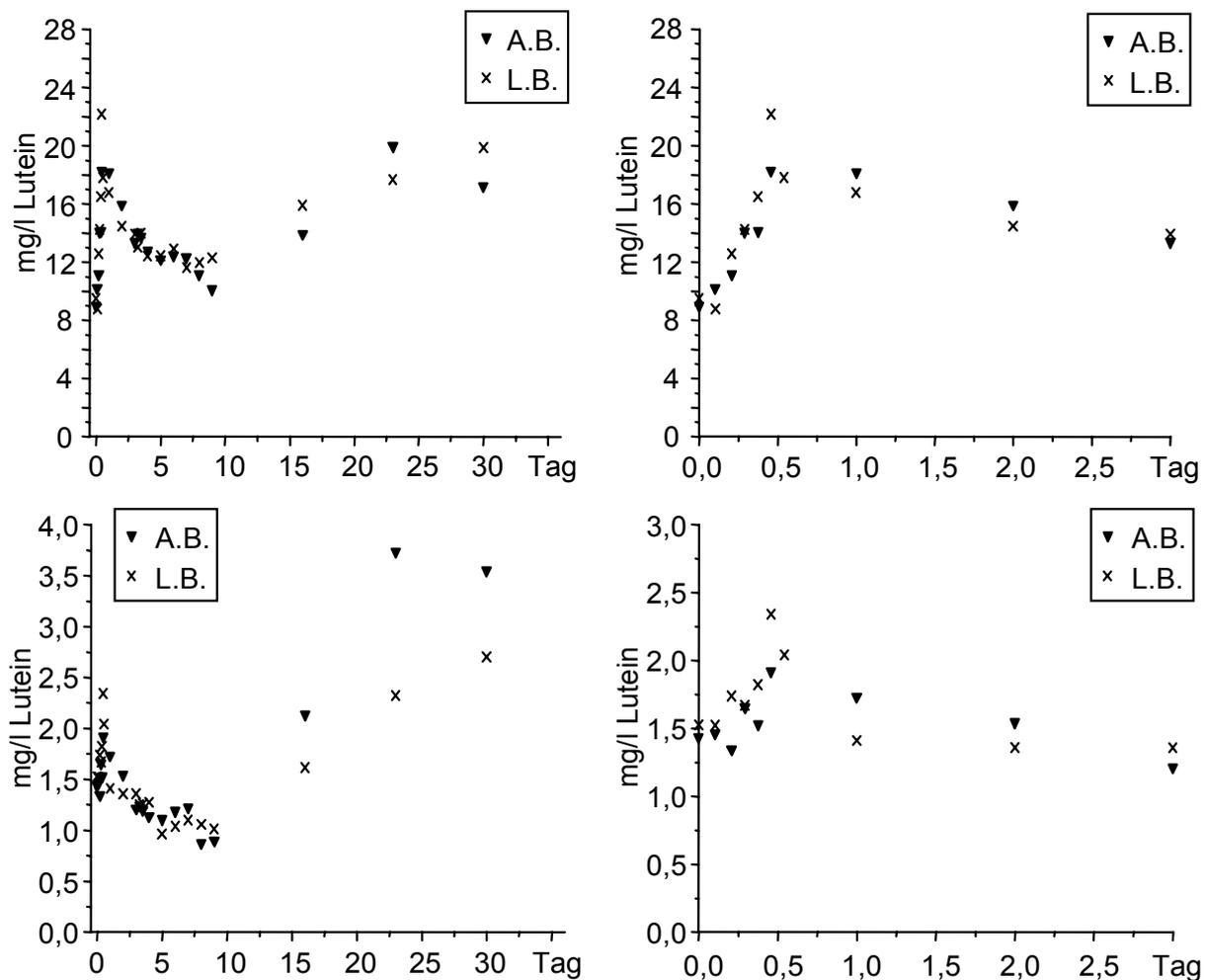


Abbildung 38: Anreicherung von Lutein (oben) und Zeaxanthin (unten) im Serum nach einmaliger Applikation von in D_2O angebautem Spinat mittels HPLC.

Links: gesamter Zeitraum der Studie; rechts: Ausschnitt Tag 0 bis 3

Die graphische Auswertung ist in Abbildung 38 dargestellt. Die maximale Anreicherung ist bei beiden Probanden für Lutein wie auch für Zeaxanthin nach 11 Stunden gegeben. Für die Studie mit Lutein ergeben sich damit Anreicherungsfaktoren

von 2.1 (A.B.) und 2.3 (L.B.), für Zeaxanthin von 1.3 (A.B.) und 1.5 (L.B.). Sowohl die Anreicherungsfaktoren als auch die Anreicherungskurven korrelieren demnach für beide Probanden gut miteinander.

Generell ist zu sagen, dass die Levels für Lutein nach 14 Tagen für alle Probanden noch über den Anfangswerten liegen, während die Zeaxanthinwerte meist nach drei Tagen schon unter die Anfangswerte fallen. Dies zeigt, dass die leicht erhöhten Zeaxanthinwerte nicht mit der Lutein-Anreicherung aus dem gelabelten Gemüse zu vergleichen sind, sondern als statistisch nicht signifikant betrachtet werden können. Nach 14 Tagen steigt der Luteinlevel im Serum wieder deutlich an, da die Probanden wieder eine carotinoidhaltige Nahrung zu sich nehmen konnten.

5.5.4 Untersuchung zur Anreicherung von Lutein aus partiell deuteriertem Gemüse mittels HPLC-APCI-MS-Kopplung

5.5.4.1 Kohl

Die Luteinpeaks beider gelabelten Kohlsorten zeigen ein ähnliches Massenspektrum. Das im positiven APCI-Modus aufgenommene Spektrum von Bluemax Collard Green (Abbildung 39) zeigt eine Gauss-förmige Verteilung mit einem Maximum bei m/z 557, welches einem im Durchschnitt 6-fach deuterierten Luteinmolekül entspricht.

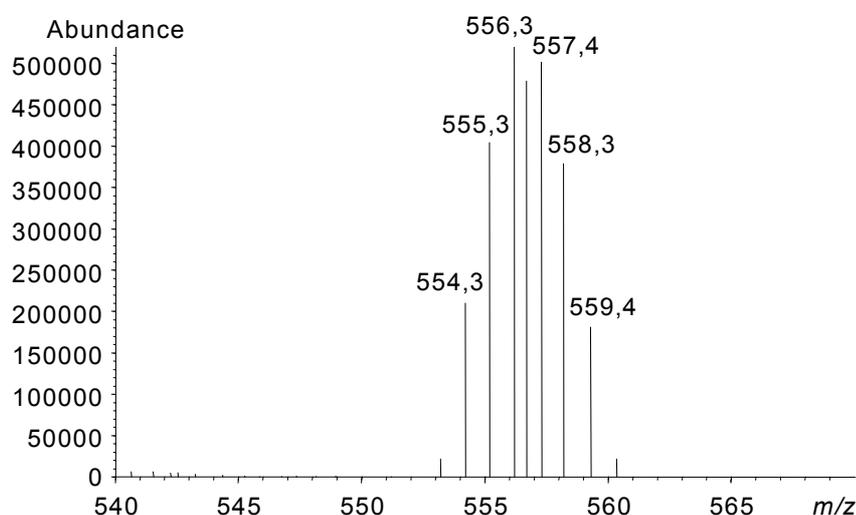


Abbildung 39: Massenspektrum von gelabeltem Kohl (Bluemax Collard Green)

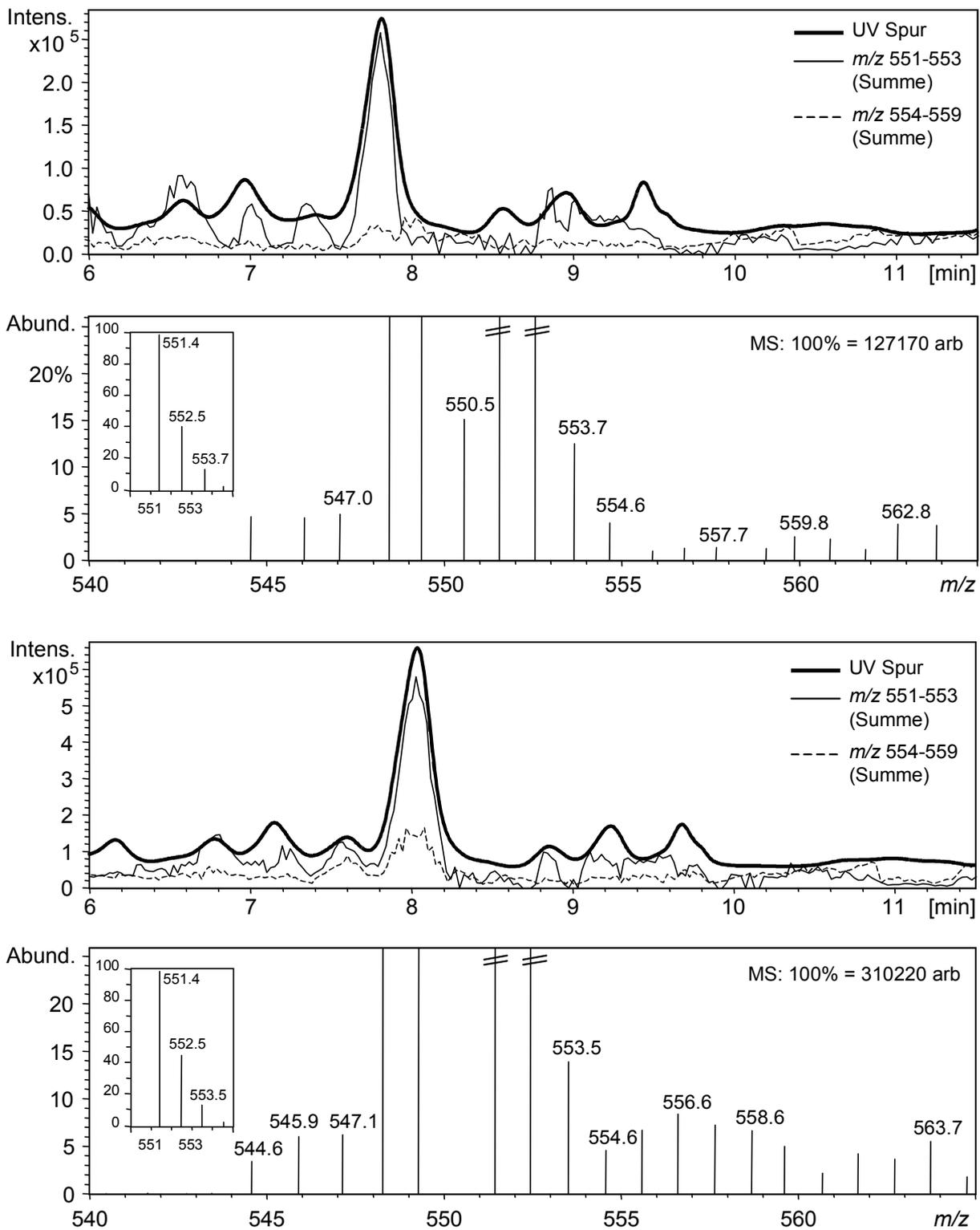


Abbildung 40: HPLC-APCI-MS-Untersuchung von humanem Serum (N.G.) zum Zeitpunkt der Applikation von gelabeltem Kohl ($t = 0$ d, 0 h; oben) sowie elf Stunden später ($t = 0$ d, 11 h; unten). Dargestellt ist jeweils sowohl der HPLC-MS-Lauf mit UV-Spur, den SIC m/z 551-553 und m/z 554-559 sowie das Massenspektrum des Lutein-Peaks bei 8 Minuten

Bei der Untersuchung der Serumproben mittels HPLC-APCI-MS-Kopplung wurde das gleiche Eluentengemisch wie bei der HPLC-UV-Analytik verwendet. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Die Ionisierung sowie das Spray wurde vorab mit einem in der mobilen Phase gelösten Standard aus all-E Lutein optimiert.

Die Durchführung der quantitativen Auswertung mittels Massenspektrometrie zeigt Abbildung 40. Der obere Teilabschnitt zeigt die Serumprobe zum Startpunkt der Studie für N.G., dem Zeitpunkt der Applikation von Grandsimpson Kohl. Dargestellt ist neben dem UV-Lauf auch die summierten SIC's des nicht gelabelten Luteins (m/z 551-553) sowie des gelabelten Luteins (m/z 554-559). Unter dem HPLC-MS-Chromatogramm ist das Massenspektrum des Lutein-Peaks bei acht Minuten dargestellt. Der untere Teilabschnitt der Abbildung stellt die Serumprobe von N.G. elf Stunden nach der Applikation von Kohl dar.

Aus dem Spektrum zur Zeit der Applikation kann man ersehen, dass kein Gauss-Profil im Serum detektierbar ist, welches dem partiell deuterierten Lutein zuzuordnen wäre. Nach elf Stunden ist dieses Gauss-förmige Profil für m/z 554-559 deutlich vorhanden.

Zur quantitativen Auswertung der Anreicherung des applizierten, gelabelten Luteins ist eine saubere Matrix von höchster Wichtigkeit. Bei etwaigen störenden Matrixeffekten wurde deshalb in den Analysen eine Basislinienkorrektur mittels Subtraktion durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte dann durch Summation der Massensignale für das gelabelte Lutein und anschließende prozentuale Umrechnung auf den Gesamt-Luteingehalt. Dabei gilt:

$$\% \text{ Anreicherung} = (S_{\text{gelabelt}} * 100) / (S_{\text{gelabelt}} + S_{\text{nicht gelabelt}})$$

mit S_{gelabelt} = Summe der Massensignale m/z 554-559

und $S_{\text{nicht gelabelt}}$ = Summe der Massensignale m/z 551-553

Die graphische Auswertung der HPLC-MS-Untersuchung der Studie mit gelabeltem Collard Green zeigt Abbildung 41. Die Anreicherung von gelabeltem Lutein (in %) zum Gesamt-Luteingehalt ist dabei gegen die Zeitachse aufgetragen.

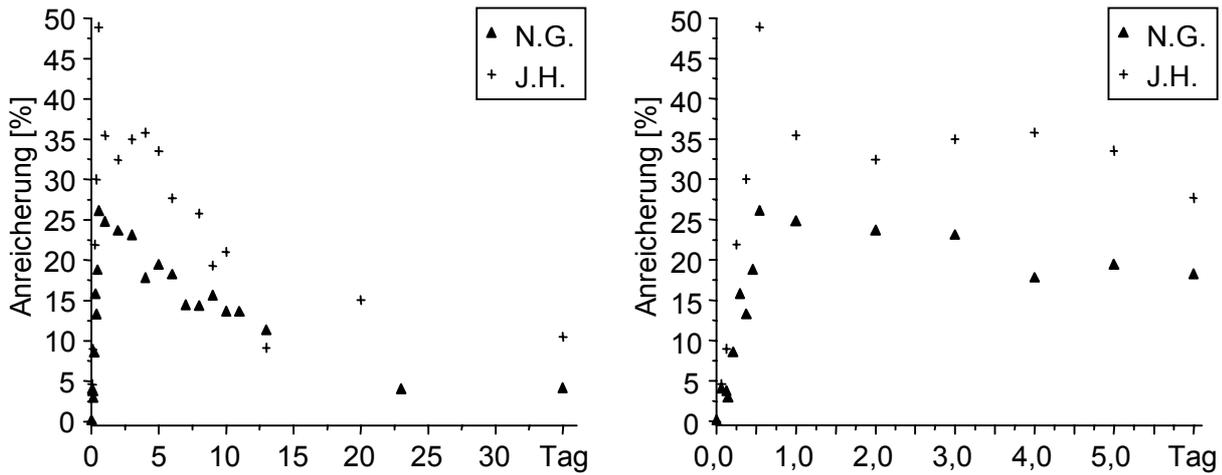


Abbildung 41: Anreicherung von gelabeltem Lutein im Serum nach einmaliger Applikation von in D_2O angebauten Kohl mittels HPLC-APCI-MS-Kopplung

Proband J.H. zeigt eine deutlich höhere Anreicherung als Proband N.G., was mit der HPLC-UV-Auswertung korreliert. Das Maximum der Anreicherung ist bei beiden Personen 13 Stunden nach Verabreichung des pürierten Kohls gegeben. Die Anreicherung des applizierten Luteins zum Gesamtgehalt beträgt für J.H. 48 %, was mit dem niedrigen Grund-Luteinspiegel sowie der hohen verabreichten Dosis erklärt werden kann. Für N.G. ergibt sich auf Grund der niedrigeren applizierten Luteindosis eine Anreicherung von 26 %.

Die Werte für die Anreicherung sind nach dem maximalen Wert noch etwa bis zum fünften Tag weitgehendst stabil. Danach fallen sie stärker ab. Dennoch kann man selbst nach 14 Tagen noch deuteriertes Lutein mit Anreicherungsdaten von über 10 % nachweisen.

5.5.4.2 Spinat

Das Massenspektrum des mit 25 Atom-% D_2O gezüchteten Spinates ist in Abbildung 42 dargestellt und zeigt ein schöneres Gauss-Profil als das vergleichbare Spektrum der Kohlsorte (Abbildung 39). Es können alle Massen vom undeuterierten $[M+H-18]^+$ -Peak bei m/z 551.5 bis hin zum 18-fach deuterierten Lutein (m/z 569.5) detektiert werden. Das Maximum der Gauss-förmigen Verteilung liegt bei Lutein-D8 mit m/z 559.5.

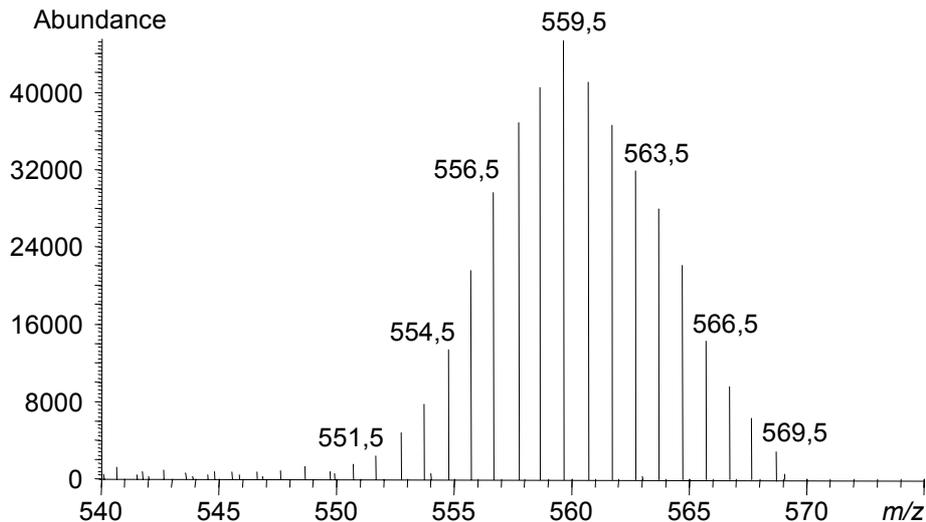


Abbildung 42: Massenspektrum von gelabeltem Spinat aus hydroponischem Anbau

Diese Gaussverteilung ist wie erwartet nicht bei der Serumprobe zu detektieren, die zum Zeitpunkt der Applikation des pürierten Spinats von L.B. entnommen wurde (Abbildung 43). Dagegen zeigt die Serumprobe von L.B. 48 Stunden nach der Applikation in Abbildung 44 ein deutliches Gaussprofil für das verabreichte deuterierte Lutein im Bereich von m/z 555.5 bis m/z 563.5 mit einem Maximum bei m/z 559.6.

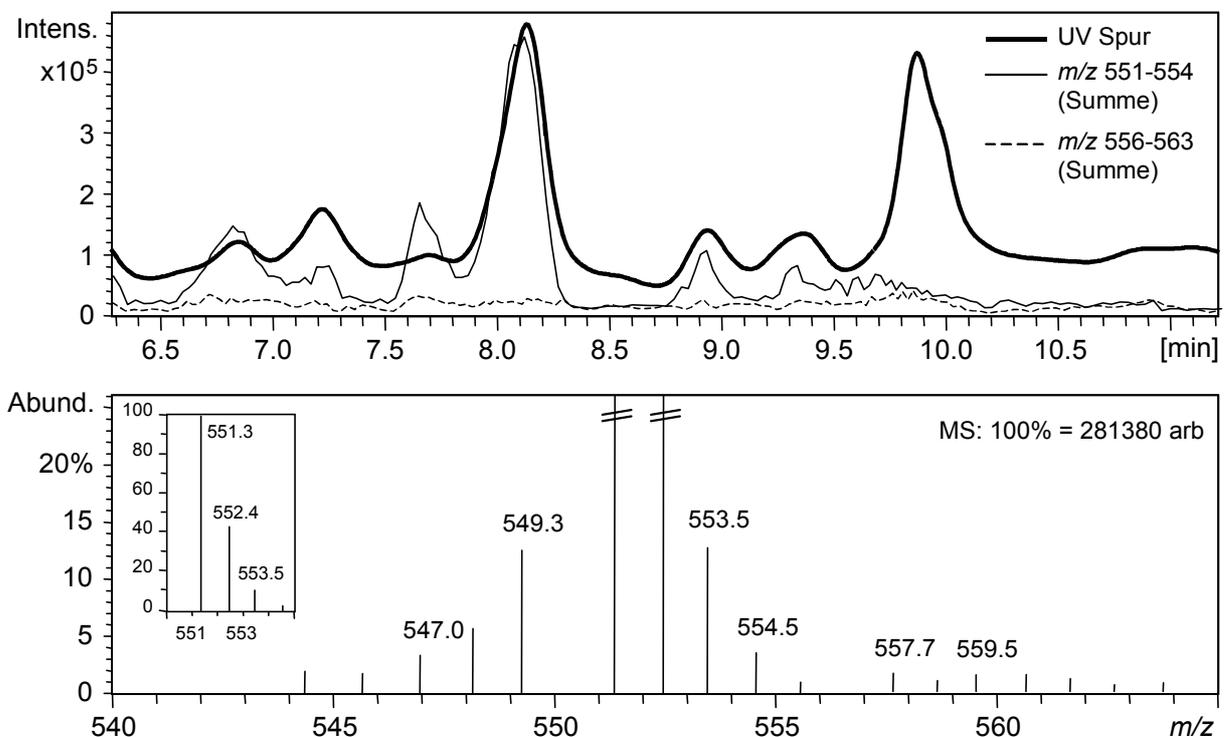


Abbildung 43: HPLC-APCI-MS-Untersuchung von humanem Serum (L.B.) zum Zeitpunkt der einmaligen Applikation von gelabeltem Spinat ($t = 0$ d, 0 h)

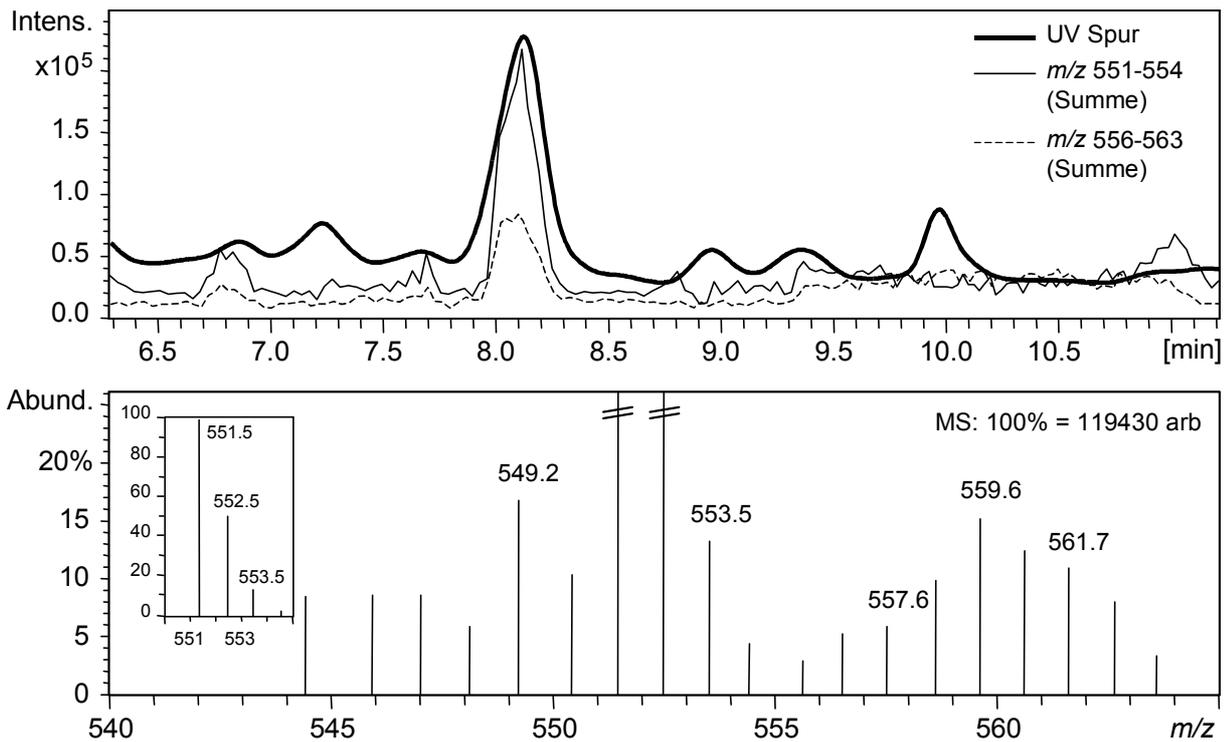


Abbildung 44: HPLC-APCI-MS-Untersuchung von humanem Serum (L.B.) 48 Stunden nach Applikation von gelabeltem Spinat ($t = 2 \text{ d}, 0 \text{ h}$). Dargestellt ist der HPLC-MS-Lauf mit UV-Spur, den SIC m/z 551-554 und m/z 555.5-563.5 sowie das Massenspektrum des Lutein-Peaks bei 8 Minuten

Die Quantifizierung erfolgte nach der bekannten Formel mit leicht veränderten Werten, auf Grund der Unterschiede aus dem Spektrum des gelabelten Spinats.

$$\% \text{ Anreicherung} = (S_{\text{gelabelt}} * 100) / (S_{\text{gelabelt}} + S_{\text{nicht gelabelt}})$$

mit S_{gelabelt} = Summe der Massensignale m/z 555.5-563.5

und $S_{\text{nicht gelabelt}}$ = Summe der Massensignale m/z 551-554

Wiederum sollten für die beide Probanden ähnliche Ergebnisse zu erwarten sein. Die graphische Auswertung in Abbildung 45 zeigt Unterschiede im Zeitpunkt für die maximale Anreicherung von gelabeltem Lutein. Während L.B. einen maximalen Wert nach 13 Stunden aufweist, ist das Maximum der Anreicherung für A.B. erst nach 24 Stunden gegeben. Die maximale Anreicherung des applizierten deuterierten Luteins zum Lutein-Gesamtgehalt ist bei beiden Probanden nahezu identisch. Sie beträgt für A.B. 31 %, sowie für L.B. 27.5 %.

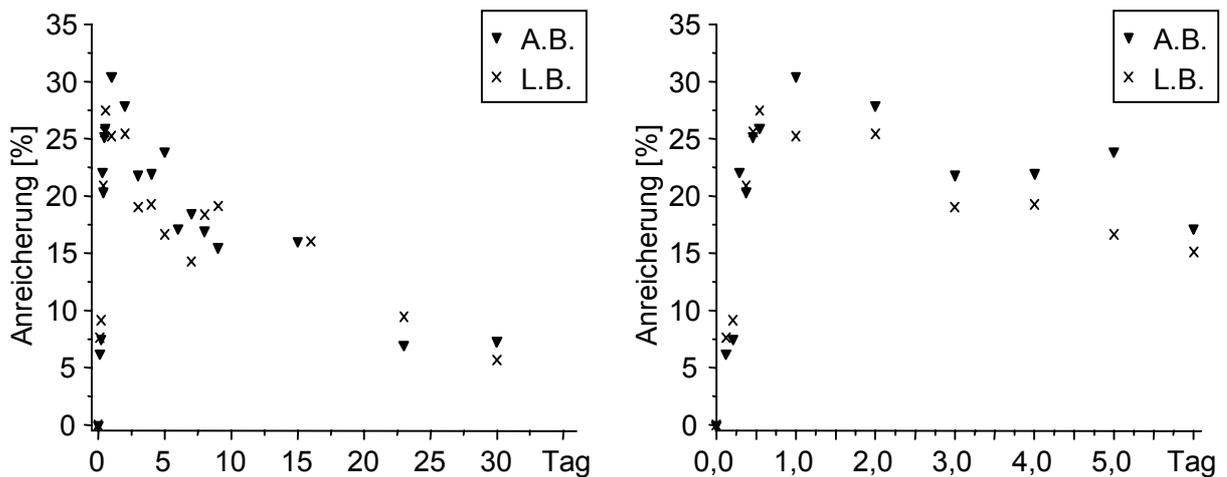


Abbildung 45: Anreicherung von gelabeltem Lutein im Serum nach Applikation von in D_2O angebauten Spinat mittels HPLC-APCI-MS-Kopplung

Während in den ersten Tagen nach der Applikation die Werte für die Anreicherung von partiell deuteriertem Lutein im Serum nur leicht fallen, ist ab dem sechsten Tag ein stärkerer Abfall zu beobachten. Es kann aber über die gesamte Dauer der Probenentnahme deuteriertes Lutein im Serum nachgewiesen werden. Beide Probanden zeigen selbst nach 30 Tagen noch einen Anreicherungswert von über 7 % an deuteriertem Lutein.

5.5.5 Vergleich der Ergebnisse zwischen HPLC-UV- und HPLC-APCI-MS-Kopplung

Die Pilotstudie zur Bioverfügbarkeit von Lutein aus in Deuteriumoxid angebauten, partiell gelabelten Gemüsesorten konnte folgende Ergebnisse erbringen.

Anhand der Quantifizierung der Serumproben mittels HPLC-UV konnte der Lutein-Gehalt über den Zeitraum der Studie hinweg verfolgt werden. Dabei konnte bestimmt werden, wieviel Lutein im Blutkreislauf aufgenommen wird und wann es sein Maximum erreicht. Ob die Zunahme des Luteinlevels allein auf die einmalige Applikation von Carotinoiden zurückzuführen ist, oder ob dieser Anstieg zusätzlich in einer Freisetzung von Lutein aus Gewebe (Organen) oder in einer Metabolisierung begründet ist, kann nicht mit HPLC-UV bestimmt werden.

Mittels HPLC-APCI-MS-Kopplung im positiven Ionen-Modus kann erstmals exakt bestimmt werden, wieviel des applizierten, partiell deuterierten Luteins wirklich im Serum aufgenommen wird, und wann es wieder abgebaut wird.

Die Ergebnisse der Pilotstudie aus partiell gelabeltem Spinat und Kohl (Collard Green) sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Aus den Studien mit partiell deuteriertem Kohl sowie Spinat können zudem folgende Rückschlüsse gezogen werden.

	Spinat A.B.	Spinat L.B.	Kohl N.G.	Kohl J.H.
Lutein-Grundlevel zum Zeitpunkt t = 0d, 0h [in mg/l Serum]	8.99	9.51	13.07	3.63
verabreichte Menge an Lutein [in mg]	18.80	18.80	9.76	15.35
maximale Anreicherung von Lutein mittels HPLC; Anreicherungsfaktor	2.1	2.3	1.9	3.2
Zeitpunkt der maximalen Anreicherung von Lutein mittels HPLC	11 h	11 h	48 h	24 h
maximale Anreicherung von gelabeltem Lutein aus HPLC-MS; Anreicherung in %	31	27.5	26	48
Zeitpunkt der maximalen Anreicherung von gelabeltem Lutein mittels HPLC-MS	24 h	13 h	13 h	13 h

Tabelle 11: Vergleich der Ergebnisse zur Pilotstudie zur Bioverfügbarkeit von Lutein aus in Deuteriumoxid angebauten, partiell gelabeltem Gemüse

- Das in den Gemüsesorten enthaltene deuterierte Lutein wird im Serum angereichert und zeigt dort nach 11 bis 24 Stunden einen maximalen Anreicherungswert. Dies korreliert bei beiden Detektionsmethoden und Studien, denn bei der MS-Detektion sind alle vier Werte innerhalb dieser Zeitspanne, bei der HPLC-Detektion sind es drei von vier.
- Während die HPLC-Detektion schon ab dem dritten Tag einen deutlichen Abfall des Luteinlevels aufzeigt, kann mittels MS-Detektion gezeigt werden, dass das applizierte deuterierte Lutein erst nach etwa sechs Tagen stärker abfällt. Dies deutet darauf hin, dass zuerst schon vorhandenes Lutein metabolisiert wird.

- Anhand der HPLC-Detektion wurde festgestellt, dass der Gehalt an Lutein nach etwa 10-14 Tagen wieder unter den Anfangswert der Studie fällt. Die MS-Detektion, besonders bei der Spinatstudie, zeigt aber, dass selbst nach über vier Wochen noch deuteriertes Lutein im Serum nachgewiesen werden kann.
- Die Anreicherungsdaten stimmen v.a. bei der Spinatstudie gut überein. Hier wurden beiden Probanden von einer Spinatsorte die selbe Menge an Lutein appliziert. Im Serum wird maximal ein 2.1- respektive 2.3-facher Lutein-Gesamtwert nachgewiesen. Die Anreicherung von deuteriertem Lutein beträgt 27.5 % respektive 31 %. Mit diesen Werten stimmen auch die Werte von N.G. aus der Kohlstudie gut überein. Im Gegensatz zu J.H. hat N.G. auch einen vergleichbaren Grund-Carotinoidspiegel im Serum. Für N.G. ergibt sich ein maximal 1.9-facher Luteinwert im Serum sowie eine Anreicherung von deuteriertem Lutein von 26 %.

5.6 Bestimmung des Carotinoid-Stereoisomerenpatterns in retinalem Gewebe

5.6.1 Grundlagen, Vergleich der Tiermodelle

Seit etwa zehn Jahren sind Veröffentlichungen über den Carotinoidgehalt in retinalem Gewebe publiziert. Dabei sind drei unterschiedliche Detektionsverfahren gebräuchlich. Einerseits kann mittels der optischen Flickertechnik der Gesamt-Carotinoidgehalt *in vivo* untersucht werden^{170,171}. Der Nachteil dieser Methode ist, dass sie nicht zwischen den Carotinoiden unterscheiden kann, im Gegensatz z.B. zur Raman-Spektroskopie¹⁷². Dagegen vermag die HPLC-UV-Kopplung¹⁷³⁻¹⁷⁵ sowohl geometrische als auch optische Stereoisomere einzelner Carotinoide zu unterscheiden.

Das Carotinoid-Pattern in retinalem Gewebe ist bisher in Menschen¹⁷⁶⁻¹⁸⁰, Rhesusaffen⁷⁰ sowie in Rindern¹⁸¹ untersucht worden. Die Auswahl des Tiermodells hat dabei folgende Bewandnis.

Die wertvollsten Aussagen können aus dem humanen Gewebe entnommen werden, da hier alle wesentlichen Faktoren (Gesundheitszustand, Ernährung) geklärt werden können. Außerdem ist in der Retina eine große Menge an Carotinoiden vorhanden. Humanretinen sind aber schwierig und daher auch nur selten zu bekommen. Nachteilig wirkt sich auch die meist lange Postmortemzeit auf die Zuverlässigkeit der Ergebnisse aus. Es kann oft nicht mit Sicherheit gesagt werden, dass während der Zeit vor der Analyse keine Metabolisierung oder Isomerisierung stattgefunden hat.

Außer dem Menschen besitzen nur noch nicht-humane Primaten eine Makula Lutea. Diese Primatenretinen sind der des Menschen sehr ähnlich. Deshalb werden Primaten in der ophthalmologischen Forschung gern als Modell eingesetzt, auch wenn kein Degenerationsmodell bekannt ist.

Die Hühnerretina ist ein ophthalmologisches Standardmodell in der Myopieforschung. Die einfache Tierhaltung sowie leichte Zugänglichkeit des Auges, u.a. für Injektionen in den Glaskörper, sind Vorteile zur Verwendung dieses Tiermodells. Außerdem ist ein Modell mit Photorezeptordegeneration (rd Hühner) bekannt. Zudem ist eine Anreicherung von Carotinoiden im Auge von Vögeln bewiesen, da diese in ihren Photorezeptor-Innensegmenten Öltröpfchen besitzen, die durch Carotinoide gelb angefärbt sind und als Lichtfilter dienen. Ein Nachteil ist, dass Hühner keine Makula Lutea besitzen. Zudem wird die Analytik erschwert, da die in vielfach höherer Konzentration vorhandenen Öltröpfchen mit analysiert werden müssen.

Schweineaugen sind ein Standardmodell in der Augenheilkunde, da sie in Physiologie und Größe den Menschen am ähnlichsten sind. Schweine haben keine Makula Lutea und es gibt kein Degenerationsmodell.

Das Problem bei der Analyse von Rattenretinen ist die geringe Menge der Retina und damit auch der Carotinoide. Es müssen mehrere Retinen gepoolt werden, was aber auf Grund der einfachen Tierhaltung von Ratten möglich ist. Ratten haben keine Makula Lutea, es gibt aber ein Degenerationsmodell, die sogenannte RCS- (Royal College of Surgeons-) Ratte, dessen zeitlicher Verlauf erforscht ist. Mit der Etablierung der Analyseverfahrens in Rattenretinen kann somit eine direkte Korrelation zwischen Degenerationsverlauf und Carotinoidmuster in der Retina bestimmt werden.

5.6.2 Humanretina

Die Aufsicht auf die menschliche Retina ist in Abbildung 46 skizziert. In der temporalen Hälfte befindet sich die Makula Lutea, mit einem Durchmesser von ca. drei mm. Der Sehnerv befindet sich in der nasalen Hälfte. Die untersuchten Proben der Humanretina sind aus verschiedenen retinalen Bereichen entnommen. Zum Einen wurde der gesamte Bereich der Makula Lutea mit einer 6 mm Stanze entnommen. Des weiteren wurden die temporale Hälfte mit und ohne Makula Lutea, sowie der Abschnitt nasal superior untersucht. Dazu wurden Gewebeproben des vascularen Choroids mitsamt Pigmentepithel (RPE) sowie des Glaskörpers (Vitreus) entnommen.

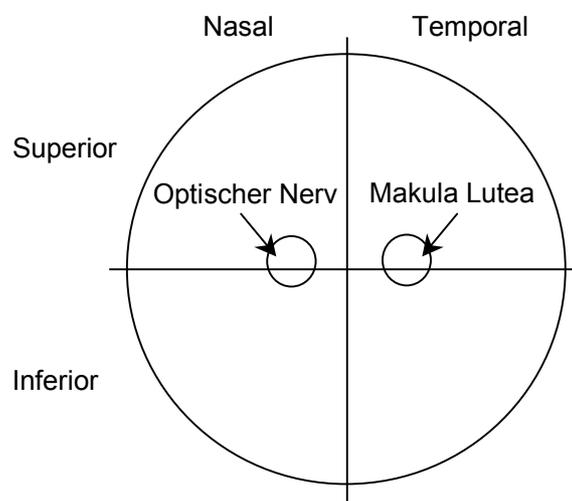


Abbildung 46: Aufsicht auf die Retina: Unterteilung der verschiedenen Abschnitte

Zur Untersuchung des Carotinoid-Stereoisomeren-Patterns in den retinalen Geweben wurde eine nicht endgecappte C₃₀-Trennsäule (3 µm Partikeldurchmesser, 200 Å Porengröße) mit einer Säulendimension von 150*4.6 mm verwendet. Die Carotinoid-Stereoisomere wurden dabei mit einem mehrstufigen Lösungsmittelgradienten aus dem binären Eluentengemisch Aceton/Wasser getrennt. Vom Start der Trennung wurde drei Minuten lang isokratisch mit 75 % Aceton gefahren, danach folgte ein 17-minütiger linearer Gradient auf 90 % Aceton, sowie anschließend ein 7-minütiger linearer Gradient auf 100 % Aceton. Von diesem Zeitpunkt an (nach 27 Minuten) wurde isokratisch mit 100 % Aceton eluiert.

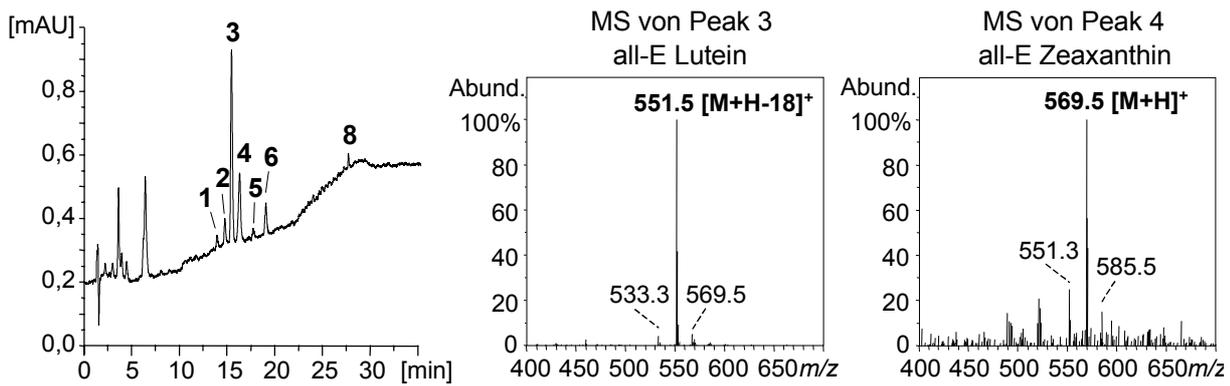
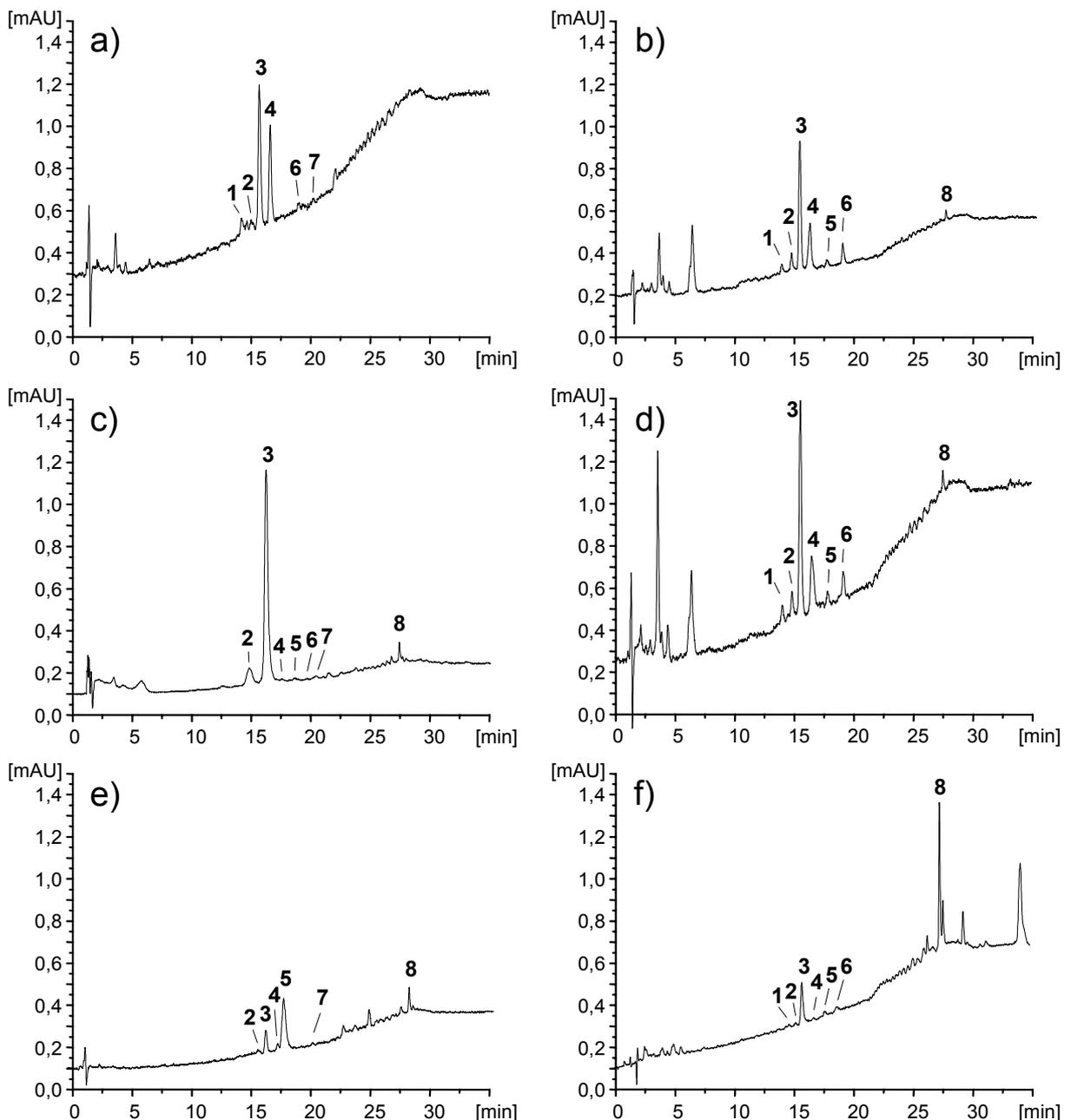


Abbildung 47: HPLC-APCI-MS-Untersuchung einer Humanretina (temporale Hälfte)

In Abbildung 47 ist die Identifizierung der Carotinoide mittels HPLC-APCI-MS-Kopplung exemplarisch für all-E Lutein und all-E Zeaxanthin gezeigt. Anhand des SIC mit m/z 551.5 können alle Lutein-Isomere detektiert werden. Das in der temporalen Retina vorherrschende all-E Lutein (Peak 3) zeigt keine weiteren nennenswerten Fragmente. Die Zeaxanthin-Isomere zeigen einen Basepeak bei m/z 569.5, wie für all-E Zeaxanthin demonstriert. Die Zuordnung und Beschriftung der Carotinoid-Stereoisomere ist in allen Chromatogrammen der Kapitel 5.6 und 5.7 wie folgt:

1 13-Z Lutein	4 all-E Zeaxanthin	8 all-E β -Carotin
2 13'-Z Lutein	5 9-Z Lutein	8a 13-Z β -Carotin
3 all-E Lutein	6 9'-Z Lutein	8b 9,13-ZZ β -Carotin
	7 9-Z Zeaxanthin	8c 9-Z β -Carotin

Die folgende Abbildung 48 zeigt Chromatogramme aus unterschiedlichen humanen, retinalen Gewebeproben auf einer C_{30} -Säule. Die Stanze über der Makula Lutea ergibt ein Chromatogramm (a), bei dem all-E Lutein gegenüber all-E Zeaxanthin etwas stärker ausgeprägt ist. Das Verhältnis der beiden Peaks beträgt ca. 1.5:1. Die Stanze mit 6 mm Durchmesser ist für die Makula, die einen Durchmesser von ca. 3 mm hat, etwas groß. Würde die Makula mit einer kleineren Stanze ausgestanzt werden, wäre all-E Zeaxanthin das vorherrschende Carotinoid. In der nur etwa 28 mm² großen Fläche der Retina sind etwa 93 ng an Carotinoiden detektierbar.



*Abbildung 48: Chromatogramme der HPLC-Trennungen von Carotinoid-Stereoisomeren aus verschiedenen Bereichen der humanen Retina auf einer C₃₀-Säule (150*4.6 mm). Postmortemzeit 22 h. a) 6 mm Stanze zentriert über Makula Lutea; b) 1/2 Retina temporal ohne M.L.; c) RPE/Choroid (durchblutet); d) 1/4 Retina superior nasal; e) Vitreus; f) Standard*

Geht man vom zentralen Gewebe zur Peripherie, kann man zwischen temporaler (b) und nasaler (c) Retina unterscheiden. In beiden Gewebeproben ist das Verhältnis von all-E Lutein zu all-E Zeaxanthin mit etwa 2.7:1 ähnlich und viel größer als in der Makula Lutea (s. Tabelle 12). Dieses Phänomen ist bekannt und mehrfach

beschrieben¹⁷⁶⁻¹⁷⁸. All-E Zeaxanthin ist in der Fovea das dominierende Carotinoid und wird mit zunehmendem Abstand von der Fovea schwächer. Die Z-Stereoisomere von Lutein und Zeaxanthin sind in der Makula nur schwach erkennbar. Sie machen in der Stanze, d.h. in der Makula Lutea, nur etwa 10 % aus. In der Peripherie sind sie schon mit etwa 20 % vertreten. Im Vitreus (e) ist dann nicht mehr all-E Lutein vorherrschend, sondern 9-Z Lutein, mit über 63 % am Gesamtgehalt. Das Chromatogramm des RPE/Choroids muss gesondert betrachtet werden. Da es stark durchblutet wird, wird oft ein dem Serum ähnliches Pattern enthalten.

	6 mm Stanze über M.L. (17 mg)	½ temporal ohne M.L. (145 mg)	¼ superior nasal (88 mg)	Vitreus
13-Z Lutein (1)	3.5 ± 2.5 [3.7 %]	3.0 ± 0.8 [3.5 %]	2.1 ± 0.8 [3.4 %]	n.d.
13'-Z Lutein (2)	4.5 ± 0.8 [4.7 %]	6.2 ± 1.1 [7.2 %]	3.9 ± 0.4 [6.2 %]	0.5 ± 0.3 [2.7 %]
all-E Lutein (3)	50.3 ± 9.0 [52.7 %]	50.1 ± 7.4 [58.0 %]	35.5 ± 4.5 [55.9 %]	3.2 ± 0.8 [17.0 %]
all-E Zeaxanthin (4)	34.2 ± 4.6 [35.8 %]	18.5 ± 9.0 [21.4 %]	13.8 ± 5.0 [22.0 %]	1.0 ± 0.7 [5.3 %]
9-Z Lutein (5)	0.6 ± 0.4 [0.6 %]	2.6 ± 0.8 [3.0 %]	2.7 ± 0.3 [4.3 %]	11.9 ± 3.5 [63.3 %]
9'-Z Lutein (6)	1.8 ± 1.0 [1.9 %]	4.8 ± 2.4 [5.6 %]	3.3 ± 2.5 [5.3 %]	0.3 ± 0.2 [1.5 %]
9-Z Zeaxanthin (7)	0.5 ± 0.4 [0.5 %]	n.d.	n.d.	0.4 ± 0.2 [2.1 %]
all-E β-Carotin (8)	n.d.	1.2 ± 0.2 [1.4 %]	1.3 ± 0.3 [2.1 %]	1.5 ± 0.9 [7.9 %]
Gesamtmenge Carotinoide	95.4 ± 18.7	86.4 ± 10.0	62.6 ± 12.0	18.8 ± 4.8
all-E Lutein/all-E Zeaxanthin	59.5 / 40.5 %	73.0 / 27.0 %	71.8 / 28.2 %	76.2 / 23.8 %
Lutein (ges.)/ Zeaxanthin (ges.)	63.7 / 36.3 %	78.3 / 21.7 %	77.5 / 22.5 %	92.0 / 08.0 %
all-E Isomere (ges.)/ Z-Isomere (ges.)	88.6 / 11.4 %	80.8 / 19.2 %	80.0 / 20.0 %	30.2 / 69.8 %

Tabelle 12: Quantitative Auswertung der retinalen Gewebeschnitte beim Menschen.
n.d. = nicht detektierbar; Angaben der Werte in ng/Gewebe sowie als Prozentwert zum Carotinoid-Gesamtlevel; n = 4

5.6.3 Nicht-humane Primatenretina

Es wurde retinales Gewebe von zwei nicht-humanen Primaten untersucht (*Calytrix jacchus*, *Macaca mulatta*). Die Trennung der Carotinoid-Stereoisomere erfolgte auf einer 250*4.6 mm C₃₀-Säule mit einem zur Untersuchung der Humanretinen leicht abgewandelten Gradienten. Vom Start der Trennung wurde drei Minuten lang isokratisch mit 78 % Aceton eluiert, danach folgte ein 22-minütiger linearer Gradient auf 98 % Aceton. Diese Eluentenzusammensetzung wurde bis zum Ende der Trennung beibehalten. Abbildung 49 zeigt Chromatogramme von verschiedenen Abschnitten der im Durchschnitt ca. 1.2 cm großen Retina des Primaten *Calytrix jacchus*.

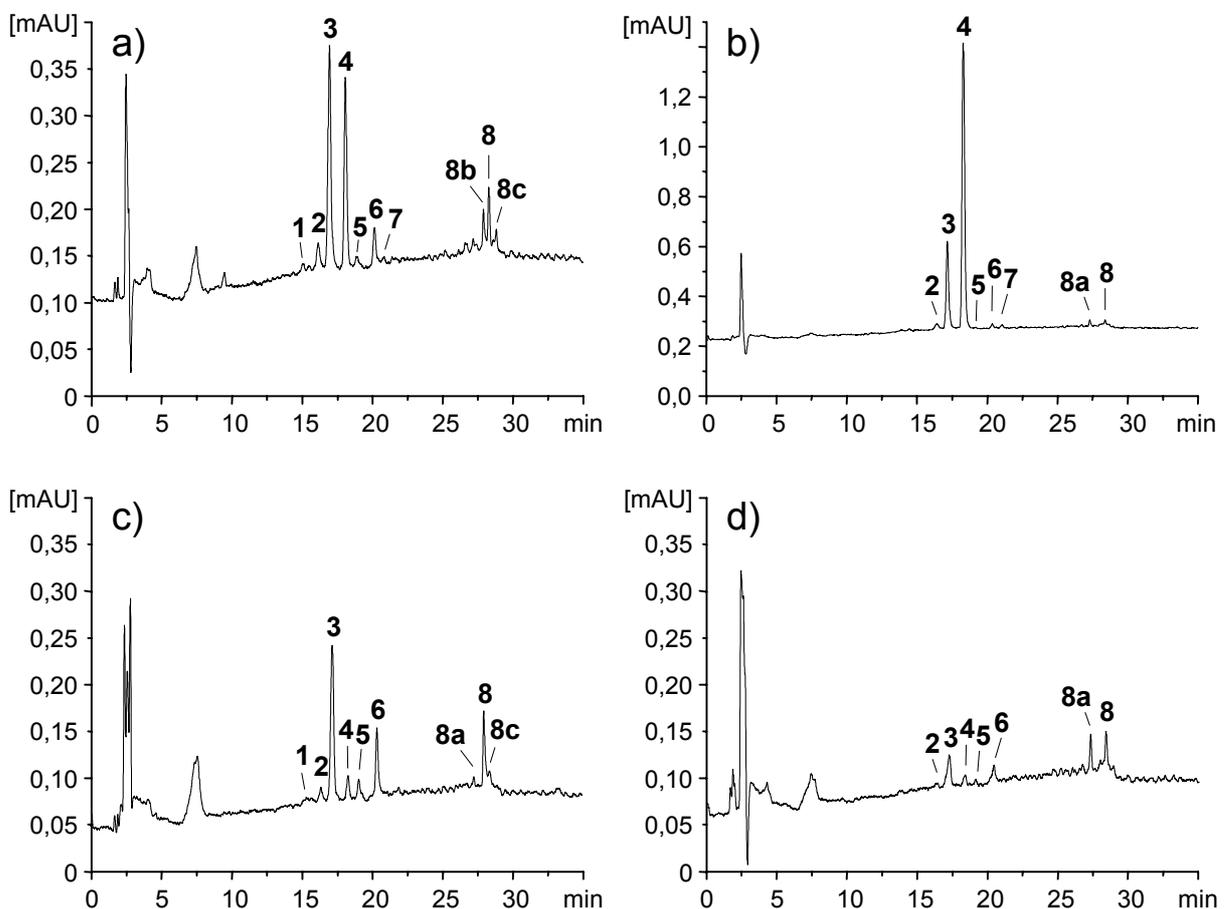


Abbildung 49: HPLC-Trennungen von Carotinoid-Stereoisomeren aus einer nicht humanen Primatennetzhaut (*Calytrix jacchus*) auf einer C₃₀-Säule (250*4.6 mm). a) 1/2 Retina temporal mit M.L.; b) RPE/Choroid (mit Blut); c) 1/2 Retina nasal ohne M.L.; d) RPE/Choroid (ohne Blut). Beschriftung s. Kap. 5.6.2

Die Retinen wurden, wie auch beim anderen Primaten *Macaca mulatta*, in eine temporale Hälfte mit Makula Lutea (a) sowie eine nasale Hälfte ohne Makula Lutea (c) unterteilt. Dazu wurden zusätzlich Proben des Choroids mitsamt RPE untersucht (b und d). Bei diesen Proben ist bei der Analyse darauf zu achten, ob die Gewebeprobe viel, wie bei Abbildung b), oder wenig Blut, wie bei Abbildung d), enthält, da dies auf das Chromatogramm einen großen Einfluss hat.

Aus dem Vergleich wird deutlich, dass das Carotinoid-Pattern von *Calytrix jacchus* gut mit dem des Menschen in den jeweiligen Sektoren korreliert. Auffallend ist aber das markante Auftreten des Peaks bei 28 min. bei allen Chromatogrammen des *Calytrix jacchus*, der keinem Lutein- oder Zeaxanthin-Isomer zugeordnet werden kann. Bei diesem Peak 8 handelt es sich um all-E β -Carotin, das bisher in keiner Retina identifiziert wurde. Da es sich bei β -Carotin um das wichtigste Carotinoid der Nahrungskette handelt, ist es wahrscheinlich, dass man es vor allen in den Sektoren der Retina detektieren kann, die gut durchblutet werden. Dennoch kann β -Carotin, sowohl in der all-E-Form wie auch in den drei Z-Isomeren 8a-8c, in allen Geweben detektiert werden, auch in den weniger stark durchbluteten Abschnitten der nasalen (mit 19.4 %) und temporalen Retina (mit 12.8 %).

Die temporale Retina mit Makula Lutea zeigt wie erwartet ein Verhältnis von all-E Lutein zu all-E Zeaxanthin von 1.3:1. Während in der Peripherie beziehungsweise in der nasalen Hälfte all-E Lutein das dominierende Carotinoid ist (Verhältnis hier 7.4:1), ist in der Makula Lutea all-E Zeaxanthin stärker angereichert. Der Anteil an Z-Isomeren in der temporalen Retina mit M.L. entspricht etwa 24 %, während er in der nasalen Retina auf 36 % weiter zunimmt. Das am stärksten hervorgehobene Z-Stereoisomer ist dabei das 9'-Z Lutein, das auch bei der nasalen und temporalen Humanretina eines der intensivsten Z-Stereoisomere entspricht.

Die Probe des stark durchbluteten Choroids/RPE zeigt ein Chromatogramm wie bei den analysierten Serumproben. Beide all-E Carotinoide machen über 92 % des Carotinoid-Gehalts aus. In der wenig durchbluteten Probe sind die Carotinoide nur schwach ausgeprägt. Hier gibt es vier fast gleich intensive Isomere, all-E Lutein, 9'-Z Lutein, all-E β -Carotin sowie 13-Z β -Carotin.

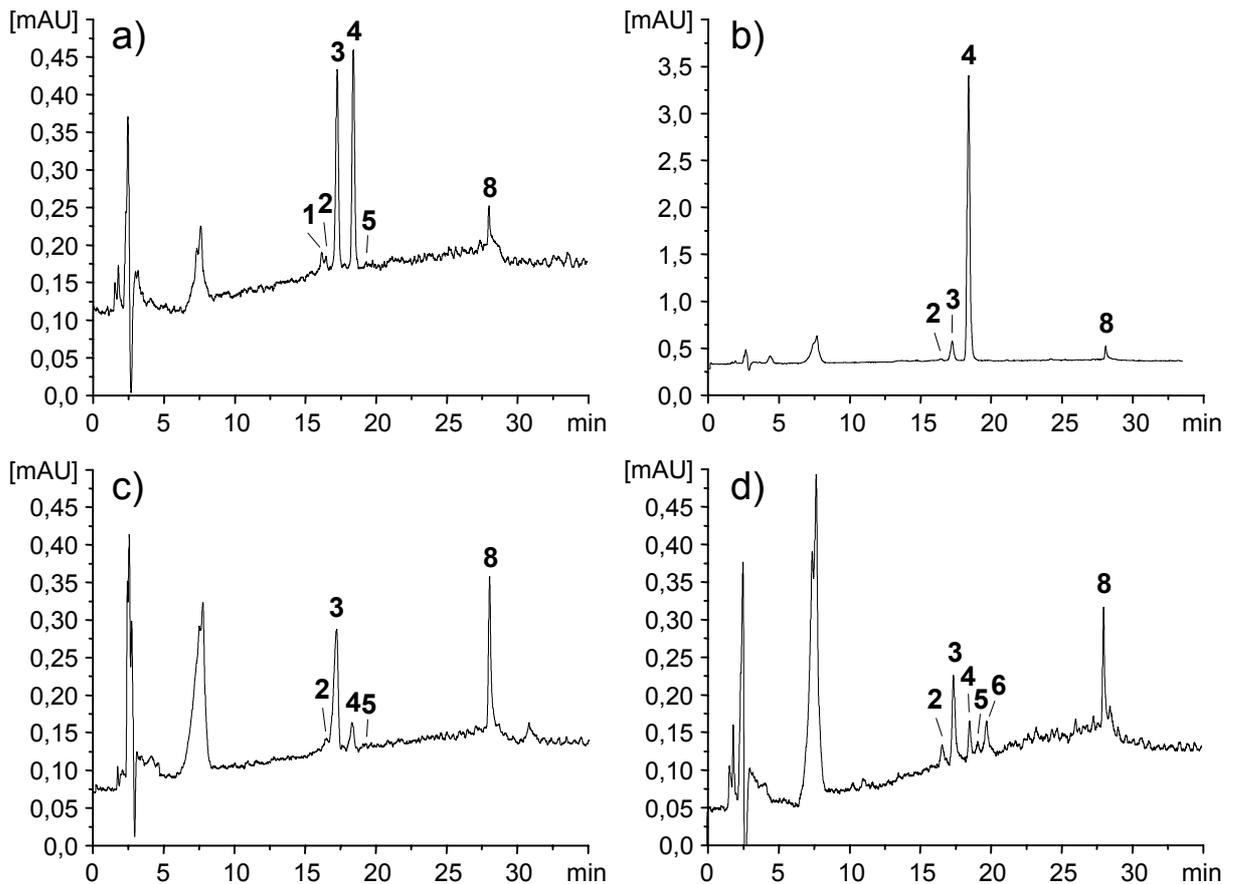


Abbildung 50: HPLC-Trennungen von Carotinoid-Stereoisomeren aus einer nicht humanen Primatennetzhaut (*Macaca mulatta*) auf einer C_{30} -Säule (250*4.6 mm). a) $\frac{1}{2}$ Retina temporal mit M.L.; b) RPE/Choroid (mit Blut); c) $\frac{1}{2}$ Retina nasal ohne M.L.; d) RPE/Choroid (ohne Blut). Beschriftung s. Kap. 5.6.2

Die Retina des Primaten *Macaca mulatta* ist mit 2.1 cm Durchmesser größer als die des *Calytrix jacchus*. Trotzdem sind die Carotinoidwerte etwas kleiner im Vergleich. Der *Calytrix jacchus* ist also der bessere Carotinoid-Absorber. Die temporale Retina mit der Makula Lutea (Teilabb. a) zeigt ein all-E Lutein zu all-E Zeaxanthin Verhältnis von 49:51. In der nasalen Hälfte (c) ist dieses Verhältnis dann aber 4.5:1. Der Anteil an Z-Isomeren ist in beiden Retinahälften gering (temporal 6.8 %, nasal 4.3 %). Beim *Macaca mulatta* kann β -Carotin auch in allen Gewebeproben detektiert werden, jedoch meist nur all-E β -Carotin. Die Choroids/RPE-Gewebeproben ähneln denen von *Calytrix jacchus*. Die quantitative Auswertung aller Gewebeschnitte für beide nicht-humanen Primaten ist in Tabelle 13 dargestellt.

	½ temporal mit M.L. (C.j. 18 mg M.m. 25 mg)	½ nasal ohne M.L. (C.j. 21 mg M.m. 47 mg)	RPE/Choroid durchblutet (C.j. 9 mg M.m. 74 mg)	RPE/Choroid, wenig Blut (C.j. 9 mg M.m. 91 mg)
(1) 13-Z Lutein	0.3 <i>0.7</i>	0.5 <i>n.d.</i>	n.d. <i>n.d.</i>	n.d. <i>n.d.</i>
(2) 13'-Z Lutein	1.9 <i>0.4</i>	0.4 <i>0.4</i>	1.9 <i>0.7</i>	0.2 <i>0.6</i>
(3) all-E Lutein	13.2 <i>7.6</i>	4.6 <i>4.0</i>	17.6 <i>11.9</i>	1.1 <i>2.5</i>
(4) all-E Zeaxanthin	10.0 <i>7.9</i>	0.6 <i>0.9</i>	52.2 <i>145.8</i>	0.3 <i>0.9</i>
(5) 9-Z Lutein	1.0 <i>n.d.</i>	0.6 <i>n.d.</i>	0.3 <i>n.d.</i>	0.2 <i>0.5</i>
(6) 9'-Z Lutein	2.2 <i>n.d.</i>	1.7 <i>n.d.</i>	1.0 <i>n.d.</i>	0.6 <i>1.3</i>
(7) 9-Z Zeaxanthin	0.4 <i>n.d.</i>	n.d. <i>n.d.</i>	0.9 <i>0.5</i>	n.d. <i>n.d.</i>
(8) all-E β-Carotin	2.4 <i>1.0</i>	1.6 <i>2.7</i>	1.0 <i>6.1</i>	0.9 <i>2.4</i>
(8a) 13-Z β-Carotin	0.6 <i>n.d.</i>	0.2 <i>n.d.</i>	0.8 <i>n.d.</i>	0.8 <i>n.d.</i>
(8b) 9,13-ZZ β-Carotin	0.8 <i>n.d.</i>	n.d. <i>n.d.</i>	n.d. <i>n.d.</i>	n.d. <i>n.d.</i>
(8c) 9-Z β-Carotin	1.1 <i>n.d.</i>	0.3 <i>n.d.</i>	n.d. <i>n.d.</i>	n.d. <i>n.d.</i>
Carotinoide (Gesamt)	33.9 <i>17.6</i>	10.4 <i>8.0</i>	75.7 <i>165.0</i>	4.1 <i>8.2</i>
all-E Lut/all-E Zea	56.9 / 43.1 <i>49.1 / 50.9</i>	88.1 / 11.9 <i>81.9 / 18.3</i>	25.2 / 74.8 <i>07.5 / 92.5</i>	78.7 / 21.3 <i>72.5 / 27.5</i>
Lut (ges.)/Zea (ges.)	64.1 / 35.9 <i>52.6 / 47.4</i>	92.7 / 07.3 <i>83.1 / 16.9</i>	28.1 / 71.9 <i>07.9 / 92.1</i>	87.5 / 12.5 <i>83.8 / 16.2</i>
all-E (ges.)/Z (ges.)	75.5 / 24.5 <i>93.2 / 06.8</i>	63.8 / 36.2 <i>95.7 / 04.3</i>	93.5 / 06.5 <i>99.3 / 00.7</i>	57.0 / 43.0 <i>70.7 / 29.3</i>

Tabelle 13: Quantitative Auswertung der nicht humanen Primatenretina. Weiß unterlegt: *Calytrix jacchus*; kursiv sowie grau unterlegt: *Macaca mulatta*; n.d. = nicht detektierbar; Werte in ng/Gewebe; Verhältnis in %; n = 5

5.6.4 Hühnerretina

Die Hühnerretina ist ein gutes Modell für den Ophthalmologen, da sie über einen gut zugänglichen Glaskörper verfügt. So können Substanzen direkt in das Auge injiziert werden, um zum Beispiel eine Anreicherung oder einen Metabolismus in Geweben des Hühnerauges nachzuweisen, wie in Kap. 5.7 mit reinen all-E Carotinoiden dargestellt. Darüber hinaus ist die Retina avaskular, d.h. sie enthält keine Blutgefäße. Damit kann eine Kontamination durch Serum-Carotinoide aus intraretinalen Gefäßen ausgeschlossen werden. Außerdem gilt das Huhn als guter Carotinoid-Absorber, da es in seinen Photorezeptor-Innensegmenten Öltröpfchen besitzt, die als Lichtfilter dienen und durch Carotinoide gelb angefärbt sind. Diese Analyse der Lutein- und Zeaxanthin-Isomere wird dadurch aber erschwert, da die in den Öltröpfchen gebundenen Carotinoide in weitaus größerer Konzentration enthalten sind und direkt im Anschluss an die Lutein und Zeaxanthin-Isomere eluieren.

Das Auge des Huhnes (s. Abbildung 51) hat, wie alle Vögel, gegenüber den anderen untersuchten Tiermodellen eine Besonderheit. Sie enthält im Glaskörper den sogenannten Pekten, der wegen seines Aussehens auch als Kamm bezeichnet wird.

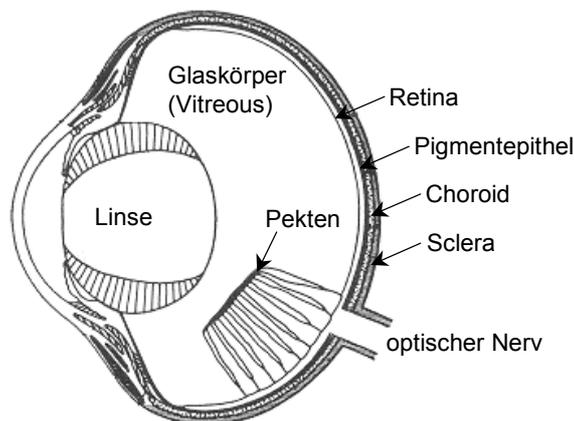


Abbildung 51: Schnitt durch das Auge eines Huhn (schematisch)¹⁸²

Die Chromatogramme aus den retinalen Geweben Retina (komplett), Pekten, Vitreus und Choroid sind zusammen mit den Chromatogrammen des Serums sowie der Standard-Futtermischung für Hühner in Abbildung 52 dargestellt.

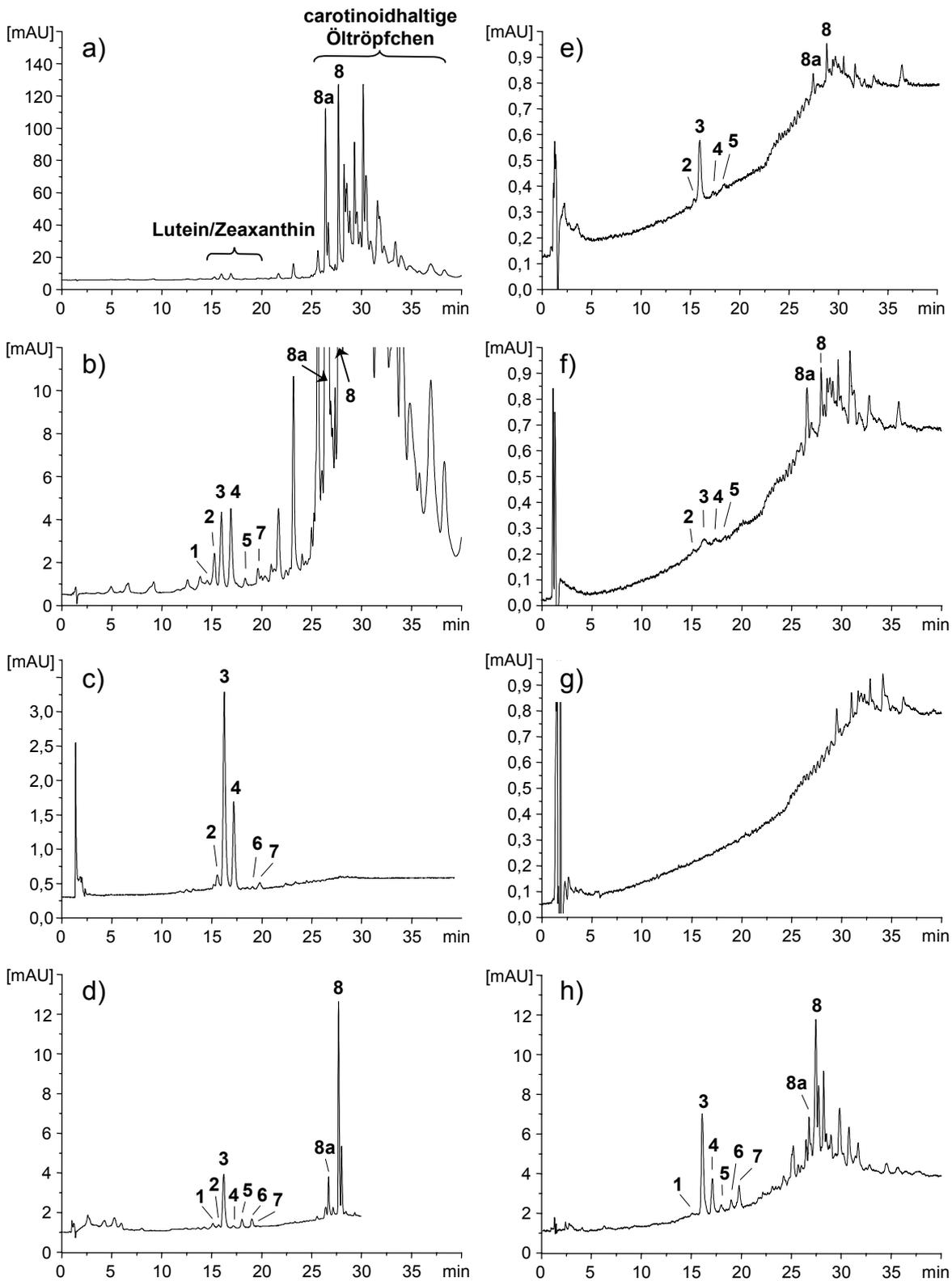


Abbildung 52: Chromatogramme der Carotinoid-Stereoisomeren-Trennungen von verschiedenen Geweben eines Huhnes auf einer C_{30} -Säule (150*4.6 mm).
 a) ganze Retina; b) Vergrößerung von a); c) Serum; d) Standard;
 e) Pekten; f) Choroid; g) Vitreus; h) Hühner-Futtermischung.
 Beschriftung s. Kap. 5.6.2, Postnatales Alter $P = 24 d$

Das Hühnerfutter (h) zeigt hohe Mengen an Lutein, β -Carotin, sowie kleinere Mengen Zeaxanthin. Die Lebensmittelindustrie setzt diese Carotinoide zur Färbung des Eidotters ein. Die Hühner erhalten also geregelt hohe Dosen an Carotinoiden.

Die Retina zeigt eine extrem hohe Konzentration an carotinoidhaltigen Öltröpfchen (a). Inmitten dieser Absorptionen können die β -Carotin-Isomere nur schwer identifiziert werden. Dennoch können die Lutein- und Zeaxanthin-Isomere sauber abgetrennt und identifiziert werden (b). Die Konzentration an Lutein und Zeaxanthin variiert stark, ist aber mit über 200 ng pro Retina sogar höher als beim Menschen.

Die beiden all-E Isomere sind in der Retina etwa im Verhältnis 1:1 enthalten. Neben diesen beiden Isomeren finden sich aber auch alle 9-Z und 13-Z-Isomere in zum Teil hohen Konzentrationen (zusammen etwa 30 % am Gesamtanteil) in der Retina wieder. Das Serum zeigt fast keine Z-Isomere (nur etwa 10 %). Das Verhältnis all-E Lutein zu all-E Zeaxanthin beträgt ca. 2:1. Im Pekten und im Choroid sind nur wenig, im Glaskörper keine Carotinoide vorhanden. Sowohl im Pekten als auch im Choroid ist all-E Lutein vorherrschend. Der Anteil an Z-Isomeren ist bei beiden Geweben mit ca. 20 % ähnlich. Die genauen Carotinoidwerte der untersuchten Gewebeschnitte sind in nachfolgender Tabelle 14 zusammengefasst.

	Retina [ng/Retina]	Serum 25 μ l Inj. [%]	Pekten [ng/Gewebe]	Choroid [ng/Gewebe]
(1) 13-Z Lutein	10.7 \pm 5.2	1.0 \pm 0.3	n.d.	n.d.
(2) 13'-Z Lutein	33.3 \pm 15.5	5.2 \pm 1.5	0.3 \pm 0.1	0.4 \pm 0.2
(3) all-E Lutein	70.4 \pm 35.9	63.1 \pm 11.8	3.9 \pm 1.4	1.5 \pm 0.5
(4) all-E Zeaxanthin	77.5 \pm 36.6	30.3 \pm 6.7	0.4 \pm 0.2	0.5 \pm 0.2
(5) 9-Z Lutein	0.4 \pm 0.2	0.8 \pm 0.3	0.6 \pm 0.2	0.1 \pm 0.1
(6) 9'-Z Lutein	6.3 \pm 3.3	0.6 \pm 0.2	n.d.	n.d.
(7) 9-Z Zeaxanthin	11.9 \pm 9.3	2.6 \pm 1.1	n.d.	n.d.
Lut + Zea (Gesamt)	210.0 \pm 120.0	103.6 \pm 20.5	5.2 \pm 2.0	2.5 \pm 0.6
all-E Lut/all-E Zea	47.6 / 52.4 %	67.6 / 32.4 %	90.6 / 09.4 %	75.6 / 24.4 %
Lut (ges.)/Zea (ges.)	58.4 / 41.6 %	68.2 / 31.8 %	92.3 / 07.7 %	80.3 / 19.7 %
all-E (ges.)/Z (ges.)	70.4 / 29.6 %	89.4 / 10.6 %	82.7 / 17.3 %	78.3 / 21.7 %

Tabelle 14: *Quantitative Auswertung der retinalen Gewebeschnitte beim Huhn.*

n.d. = nicht detektierbar; *n* = 10

5.6.5 Schweineretina

Die untersuchten Schweine wurden mit einer Futtermischung ernährt, die an Carotinoiden fast ausnahmslos Carotine enthält, dabei hauptsächlich β -Carotin-Isomere. Lutein und Zeaxanthin sind nur in geringer Konzentration im Futter vorhanden (s. Abbildung 53 d). Vielleicht enthält die Retina eines Schweines auch deshalb all-E β -Carotin als Hauptcarotinoid neben all-E Lutein (a). Beide Carotinoide machen jeweils etwa 40 % der Gesamtmenge aus. Darüber hinaus sind die vier identifizierbaren Z-Lutein-Isomere in z.T. höheren Konzentrationen als all-E Zeaxanthin in der Retina enthalten (s. auch Tabelle 15). Im Pigmentepithel und Choroid ist all-E β -Carotin mit 80 % vorherrschend (b). Lutein und Zeaxanthin-Isomere sind dort nur in geringen Mengen detektierbar.

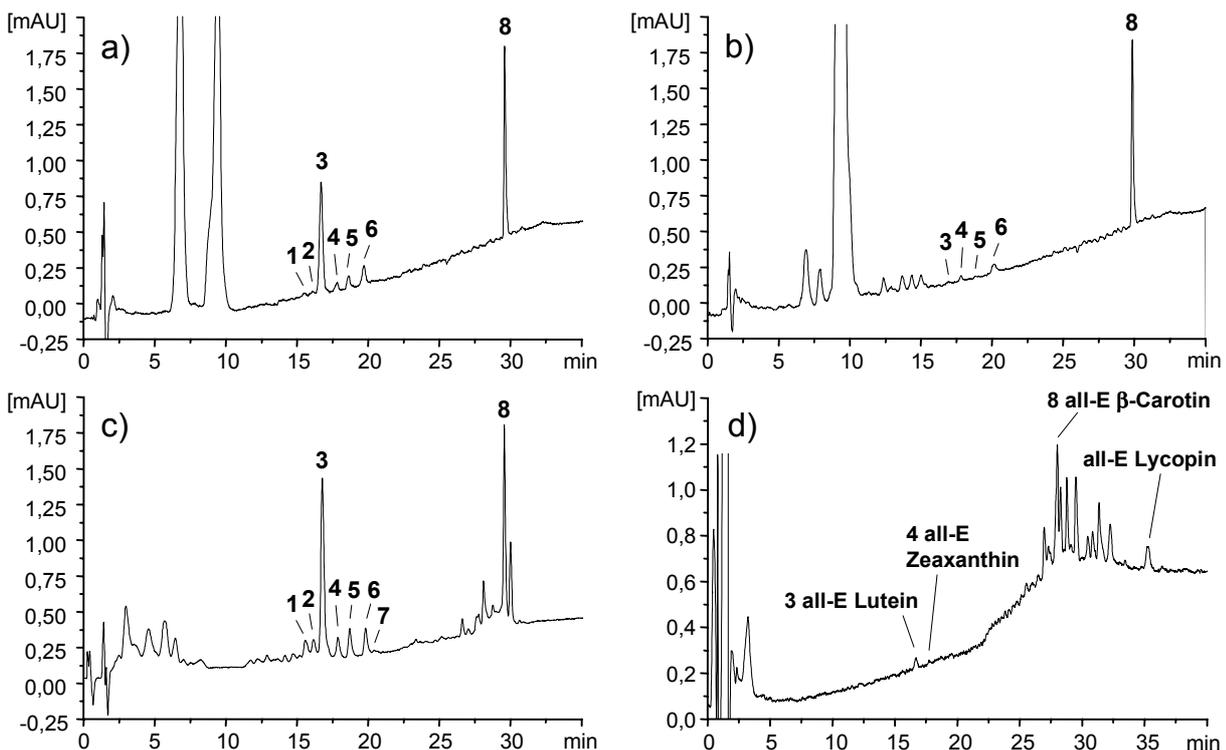


Abbildung 53: Carotinoid-Stereoisomeren-Trennungen aus retinalen Geweben von Schweinen auf einer C_{30} -Säule (150*4.6 mm). a) ganze Retina; b) RPE/Choroid; c) Standard; d) Schweinefutter. Beschriftung s. Kap. 5.6.2

Die Schweineretina ist zwar ein vasculares Gewebe. Dies kann aber nicht allein die Ursache für die hohen Mengen an β -Carotin in der Retina darstellen.

Vielmehr deutet die hohe Futterdosis darauf hin, dass die Schweine das β -Carotin aus dem Futter aufnehmen und in der Retina akkumulieren.

	Retina	RPE/Choroid
(1) 13-Z Lutein	0.6 ± 0.2	0.2 ± 0.1
(2) 13'-Z Lutein	0.7 ± 0.2	0.2 ± 0.1
(3) all-E Lutein	15.9 ± 4.9	2.4 ± 0.9
(4) all-E Zeaxanthin	1.4 ± 0.7	1.0 ± 0.4
(5) 9-Z Lutein	1.7 ± 0.8	0.6 ± 0.2
(6) 9'-Z Lutein	2.3 ± 0.8	1.1 ± 0.6
(7) 9-Z Zeaxanthin	n.d.	n.d.
(8) all-E β -Carotin	14.9 ± 4.5	20.8 ± 4.0
Carotinoide (Gesamt)	37.5 ± 4.2	26.3 ± 5.2
all-E Lutein / all-E Zeaxanthin	92.0 / 08.0 %	69.9 / 30.1 %
Lutein (ges.) / Zeaxanthin (ges.)	98.2 / 01.8 %	81.8 / 18.2 %
all-E Isomere (ges.) / Z-Isomere (ges.)	85.9 / 14.1 %	92.0 / 08.0 %

Tabelle 15: Quantitative Auswertung der Schweineretinen. n.d. = nicht detektierbar; Angaben der Werte in ng/Retina; n = 5

5.6.6 Rattenretina

Eine genaue Korrelation zwischen Carotinoiden in der Retina und dem Verlauf von Augenkrankheiten mit retinaler Degeneration, wie z.B. AMD, kann nur mit Hilfe von Studien an degenerierten Tieren durchgeführt werden. Zu diesem Zweck sollte die Bestimmung des Carotinoid-Stereoisomerenpatterns von RCS-Ratten etabliert werden. Ziel war es dabei festzustellen, ob in gesunden und degenerierten Rattenretinen das gleiche Carotinoid-Muster auftritt oder sich Unterschiede ergeben.

RCS-Ratten sind Albinoratten und wurden 1938 erstmals vom Royal College of Surgeons (RCS) als natürliches, d.h. kein genetisch manipuliertes Modell beschrieben. Die Degeneration bezieht sich auf die Photorezeptorschicht. Dabei wird die Phagozytose der verbrauchten Photorezeptoren durch Zellen des Pigmentepithel gestört, weshalb sich Membranfragmente im subretinalen Raum anhäufen, was zu einer irreversiblen Degeneration der gesamten Photorezeptorschicht führt.

Ein Gewebeschnitt durch die Retinen zweier RCS-Ratten zeigt Abbildung 54. Knapp drei Wochen nach der Geburt ist die Retina noch ohne histopathologischen Befund (a). Beinahe die Hälfte der Retina wird von der Schicht der Photorezeptoren gebildet, und alle Teilsegmente sind normal entwickelt. Nach etwa einem Jahr ist die gesamte Photorezeptorenschicht degeneriert und vollständig verschwunden (b). An die innere Zellkernschicht schließt sich nun unmittelbar das Pigmentepithel an. Da RCS-Ratten ein Albinostamm sind, ist das Pigmentepithel frei von Pigmentgranula.

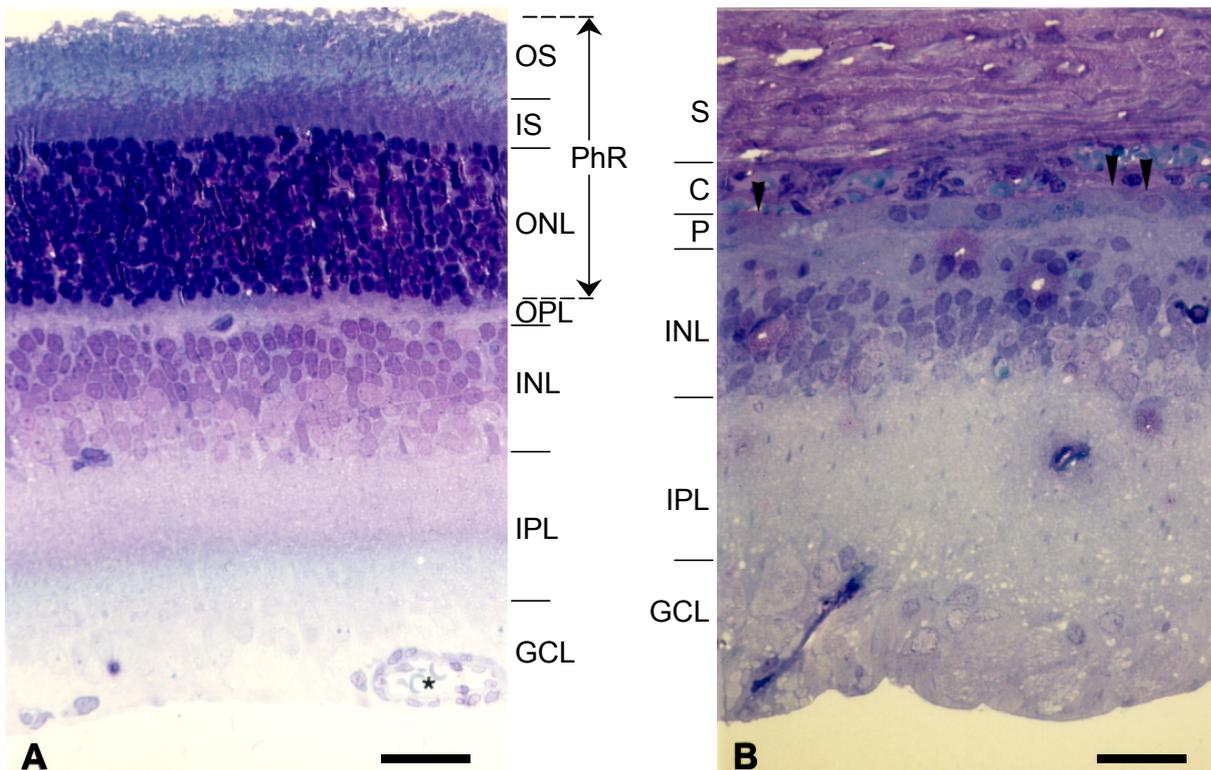


Abbildung 54: Degeneration der Photorezeptoren bei RCS-Ratten; Querschnitt durch die Retina im Alter von 20 (A) und 330 (B) Tagen¹⁸³. Beschriftung: PhR: Photorezeptorenschicht; OS: Außensegmente; IS: Innensegmente; ONL: äußere Zellkernschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; INL: innere Zellkernschicht; IPL: innere plexiforme Schicht; GCL: Ganglienzellschicht; S: Sclera; C: Choroid; P: Pigmentepithel. Ein Stern markiert ein epiretinales Gefäß, Pfeilspitzen die Bruchsche Membran; Balken 50 µm

Der Zeitverlauf der Degeneration bei RCS-Ratten ist vollständig erforscht. Nach 16 Tagen öffnen die Ratten als Nesthocker erstmals die Augen. Nach 28 Tagen ist der

Sehapparat und die Retina vollständig entwickelt. Die Degeneration wird ab dem 40. Tag registriert, nach etwa 60 Tagen ist die Blindheit der Tiere stark fortgeschritten. Nach 180 Tagen degenerieren auch die inneren Schichten der Photorezeptormembran.

Die Analyse von Carotinoiden aus Rattenretinen, mit oder ohne Degeneration, konnte bisher noch nicht durchgeführt werden. Das Problem hierfür bestand in der zu geringen Konzentration von Carotinoiden in Rattenretinen für eine Analyse. Durch Optimierung der Extraktion und Analyse konnten nun erste stichprobenhafte Versuche mit degenerierten Rattenretinen durchgeführt werden. Bei diesen Untersuchungen wurden allerdings zehn Retinen gepoolt, was mit einem immens großen Aufwand in der Tierhaltung sowie in der Präparation der Retinen verbunden war.

Die ersten HPLC-Trennungen von RCS-Ratten mit und ohne Degeneration zeigt Abbildung 55. Dabei bezeichnet P das postnatale Alter in Tagen. Aus den Chromatogrammen der Rattenretinen ist folgendes zu entnehmen. Alle Ratten besitzen die gleichen Carotinoid-Isomere. Auffallend gegenüber den Primatenretinen, aber korrelierend mit den Schweine- und Hühnerretinen, sind zwei signifikant hohe Peaks in allen Rattenproben, die all-E β -Carotin sowie seinem Isomer 13-Z β -Carotin (Peak 8a) zugeordnet werden können.

Es gibt klare Unterschiede im Carotinoidmuster der Retina zwischen den Kontrollratten und den RCS-Ratten mit Degeneration. Die Kontrollratten haben einen deutlich höheren Gehalt an β -Carotin als die degenerierten Ratten, beide β -Carotin Isomere sind die dominanten Peaks der Kontrollratten. Dagegen haben sie einen niedrigeren Lutein- und Zeaxanthin-Gehalt als die degenerierten Ratten. Die degenerierten Retinen zeigen neben β -Carotin die höchsten Werte für beide all-E Formen von Lutein und Zeaxanthin. Aber auch verschiedene Z-Isomere von Lutein, v.a. 9'-Z und 13'-Z können in den Retinen identifiziert werden.

Auf Grund der qualitativen Ähnlichkeit zu den Chromatogrammen der Schweineretinen wurde auch das Rattenfutter untersucht. Abbildung 56 zeigt, dass auch die Ratten eine große Menge an Lutein und β -Carotin, aber auch Zeaxanthin über die Nahrung zugeführt bekommen.

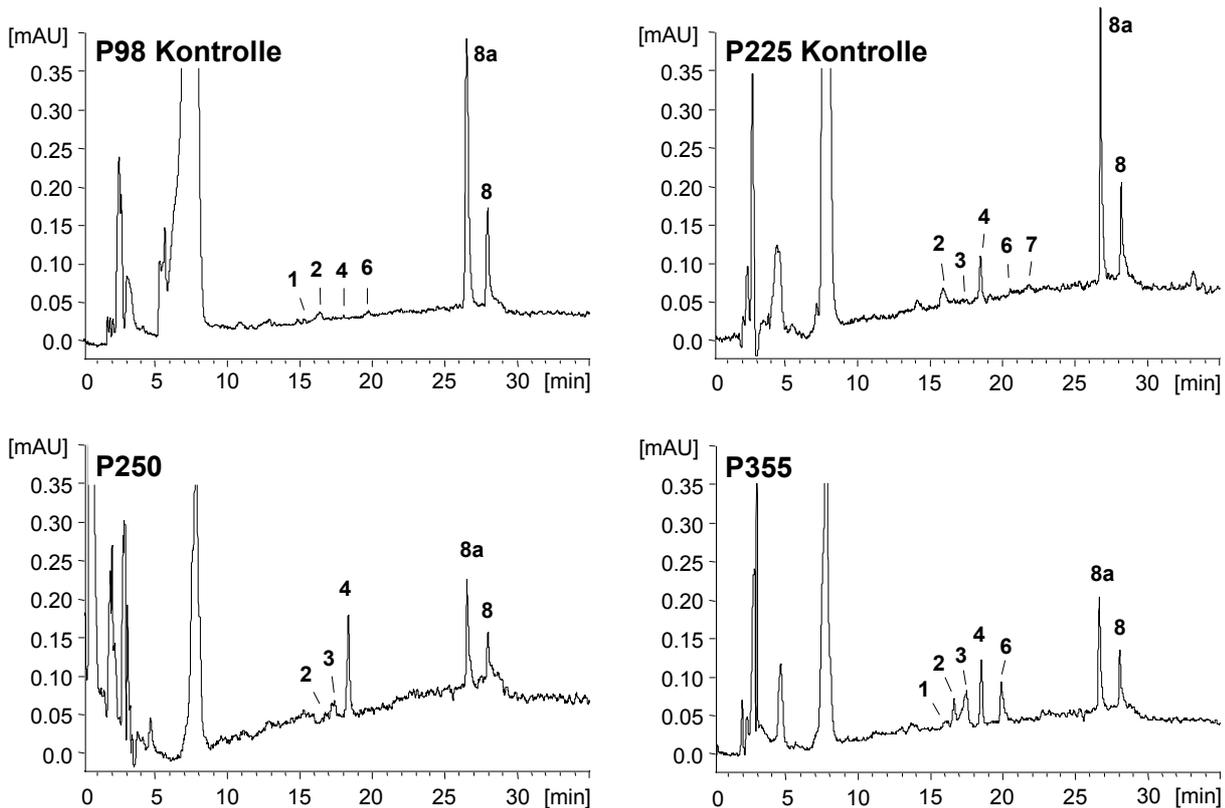


Abbildung 55: Carotinoid-Trennungen von RCS-Rattenretinen auf einer C_{30} -Säule (250*4.6 mm). a) und b) Kontroll-Ratten (ohne Degeneration); c) und d) RCS-Ratten (mit Degeneration). Beschriftung s. Kap. 5.6.2.

	P98 Kontrolle	P225 Kontrolle	P250	P355
(1) 13-Z Lutein	0.1	n.d.	n.d.	0.3
(2) 13'-Z Lutein	0.5	0.8	0.2	0.8
(3) all-E Lutein	n.d.	0.1	1.0	1.9
(4) all-E Zeaxanthin	0.1	1.6	3.7	1.9
(5) 9-Z Lutein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
(6) 9'-Z Lutein	0.3	<0.1	n.d.	1.5
(7) 9-Z Zeaxanthin	n.d.	0.2	n.d.	n.d.
(8) all-E β -Carotin	2.7	2.7	1.5	1.3
(8a) 13-Z β -Carotin	8.6	7.2	3.6	2.6
Carotinoide (Gesamt)	12.3	12.6	10.0	10.3
all-E Lut/all-E Zea	0 / 100 %	5.5 / 94.5 %	21.2 / 78.8 %	50.0 / 50.0 %
Lut (ges.)/Zea (ges.)	87.6 / 12.4 %	35.7 / 64.3 %	25.3 / 74.7 %	70.3 / 29.7 %
all-E (ges.)/Z (ges.)	23.0 / 77.0 %	38.0 / 62.0 %	61.3 / 38.7 %	49.5 / 50.5 %

Tabelle 16: Quantitative Auswertung der Rattenretinen, jeweils wurden 10 Retinen gepoolt. n.d. = nicht detektierbar; Angaben der Werte in ng/10 Retinen

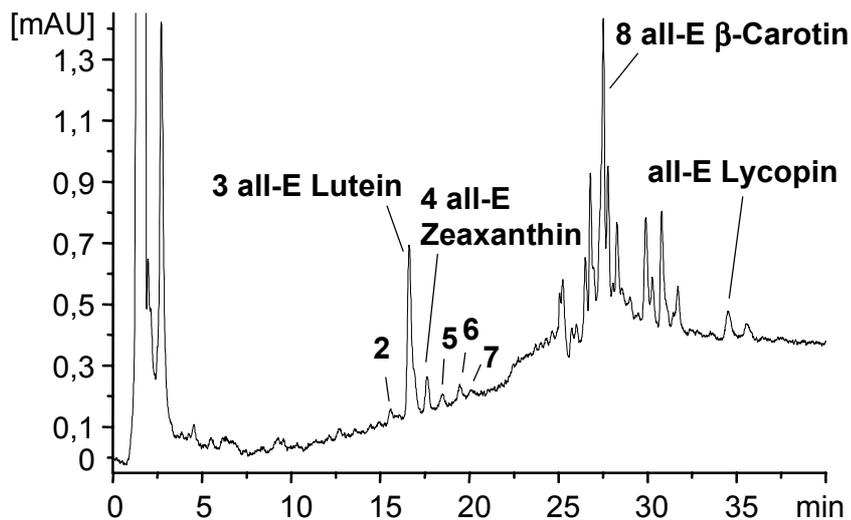


Abbildung 56: Trennung von Carotinoid-Stereoisomeren aus der Standard-Futtermischung von RCS-Ratten. Beschriftung s. Kap. 5.6.2

Dass die degenerierten Retinen generell höhere Werte an Lutein und Zeaxanthin aufweisen, war so nicht zu erwarten. Es wird in der Literatur eher eine Abnahme der Carotinoid-Werte mit zunehmender Degeneration (z.B. bei AMD) postuliert^{173,184}. Da alle untersuchten Ratten bereits in einem weit fortgeschrittenen Degenerationsstadium waren, müssen demnach weitere Erwägungen, wie z.B. der Zeitverlauf der Degeneration, mit in Betracht gezogen werden. Eine Erklärung für die hohen Lutein- und Zeaxanthinwerte bei den vollständig degenerierten Retinen könnte so in der Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke infolge der Degeneration begründet sein.

5.7 Metabolismus von Carotinoiden am Tiermodell Huhn mittels Injektion in den Glaskörper

Die Untersuchungen zur Bestimmung des Carotinoid-Stereoisomerenpatterns in Retinen verschiedener Spezies zeigten, dass bei allen untersuchten Futtermischungen hohe Konzentrationen aller retinalen Carotinoide detektierbar sind. Dies bestärkt die Vermutung, dass sich die Carotinoide gezielt in der Retina anreichern lassen. Anhand des Tiermodells Huhn sollte mittels Injektion von reinen Carotinoid-Stereoisomeren in den Glaskörper untersucht werden, in wie weit eine Anreicherung beziehungsweise ein Metabolismus von Carotinoiden in der Retina nachgewiesen werden kann.

Es wurde eine Injektionsstudie mit all-E Lutein durchgeführt sowie eine mit all-E Zeaxanthin. Die Untersuchung war dabei so strukturiert, dass 250 µl einer 0.1 %-igen reinen Carotinoidlösung in DMF in den Glaskörper von Hühnern gespritzt wurde. Die Retinen wurden nach einer halben Stunde, nach einer Stunde sowie nach zwei Stunden analysiert. Zusätzlich wurde eine Retina nach 16 Stunden analysiert, bei der nach acht Stunden eine zweite Injektion der gleichen Menge Carotinoid erfolgte.

Die Chromatogramme der Retinen sind in Abbildung 57 dargestellt. Die obere Reihe (a-c) zeigt die Injektion von all-E Zeaxanthin, die untere Reihe (d-f) die Injektion von all-E Lutein. Zur Erleichterung des Vergleichs wurden Hilfslinien in die Chromatogramme eingefügt. Anhand der Hilfslinien kann bei beiden Studien festgestellt werden, dass eine Anreicherung stattfindet. Dies wird auch durch die Gesamtwerte an Lutein und Zeaxanthin bestätigt (s. Tabelle 17). Generell lässt sich auch sagen, dass nicht nur der Peak der jeweiligen injizierten Substanz ansteigt, sondern eher das gesamte Carotinoid-Stereoisomerenpattern.

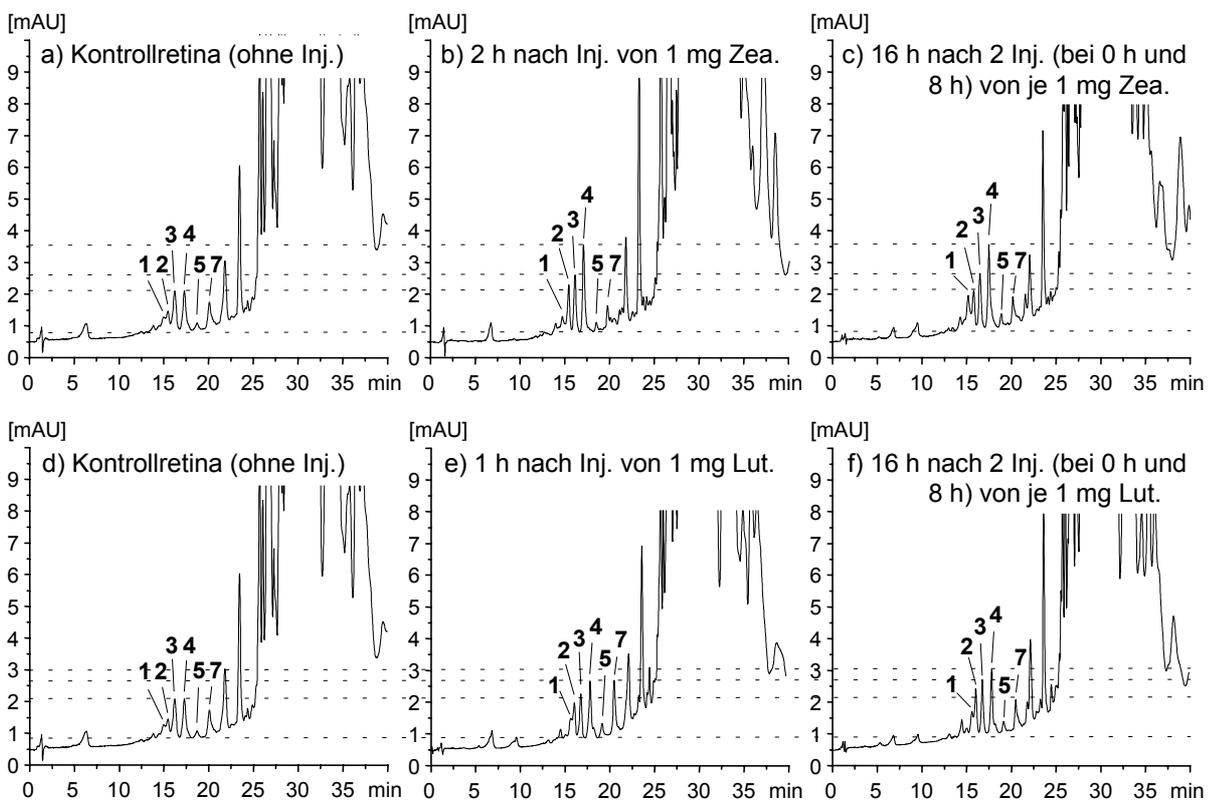


Abbildung 57: Metabolismus von Carotinoiden in Retinen von Hühnern. a), d) Retina Kontrolle (ohne Injektion); b), c) nach Injektion von all-E Zeaxanthin; e), f) nach Injektion von all-E Lutein. Beschriftung s. Kap. 5.6.2

	ohne Inj. t = 0h	Injektion von all-E Lutein		Injektion von all-E Zeaxanthin	
		t = 1h	t = 16h	t = 2h	t = 16h
(1) 13-Z Lutein	8.5	8.1	8.6	9.4	12.6
(2) 13'-Z Lutein	14.1	14.6	18.6	20.1	14.3
(3) all-E Lutein	27.1	21.0	25.3	23.1	22.4
(4) all-E Zeaxanthin	27.5	25.8	29.3	35.5	37.0
(5) 9-Z Lutein	4.2	6.5	4.4	3.4	3.7
(6) 9'-Z Lutein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
(7) 9-Z Zeaxanthin	18.6	24.0	13.8	8.5	10.0
all-E Lut/all-E Zea	49.6/50.4 %	44.9/55.1 %	46.3/53.7 %	39.4/60.6 %	37.7/62.3 %
Lut (ges.)/Zea (ges.)	53.9/46.1 %	50.2/49.8 %	56.9/43.1 %	56.0/44.0 %	53.0/47.0 %
all-E (ges.)/Z (ges.)	54.6/45.4 %	46.8/53.2 %	54.6/45.4 %	58.5/41.4 %	59.4/40.6 %
Lut+Zea (ges.) in ng	171.7	206.2	211.2	235.6	261.1

Tabelle 17: Metabolisierung von Carotinoiden in der Retina von Hühnern durch Injektion reiner all-E Isomere in den Glaskörper. Angaben in Prozent

Zeaxanthin ist gegenüber Lutein das stabilere Carotinoid. Lutein neigt eher zu Isomerisierung und es wird auch leichter in Zeaxanthin umgewandelt als umgekehrt. Dies zeigt sich auch bei diesen Studien. Nach Injektion von all-E Zeaxanthin ist dieses schon nach zwei Stunden signifikant angereichert. Anders sieht es bei der Injektion von all-E Lutein aus. Hier ändert sich das Verhältnis von Lutein zu Zeaxanthin nicht signifikant. All-E Lutein scheint schon innerhalb einer Stunde in der Retina zu isomerisieren (erhöhte Level von z.B. 13'-Z Lutein) und sich in Zeaxanthin umzuwandeln. Der Transfer muss dabei durch die Blut-Hirnschranke stattfinden.

Ähnliche Ergebnisse liefern auch die Serumanalysen, die in Abbildung 58 abgebildet sind. Nach Injektion von all-E Zeaxanthin (a-d) steigt dieses im Verhältnis zu all-E Lutein signifikant an, von anfangs 32:68 über 37:63 nach einer halben Stunde auf 49:51 nach 16 Stunden (s. Tabelle 18). Wird dagegen all-E Lutein injiziert (e-h), ändert sich das Verhältnis nur minimal. So ist nach zwei und vier Stunden das Verhältnis all-E Lutein zu all-E Zeaxanthin 69:31 und damit nur um etwa ein Prozentpunkt gegenüber dem Anfangswert erhöht. Nach 16 Stunden und zweimaliger Injektion ist das Verhältnis bei 71:29. Auch dieses Ergebnis spricht dafür, dass ein Transfer durch die Blut-Hirnschranke stattfindet und Lutein sich in Zeaxanthin umwandelt.

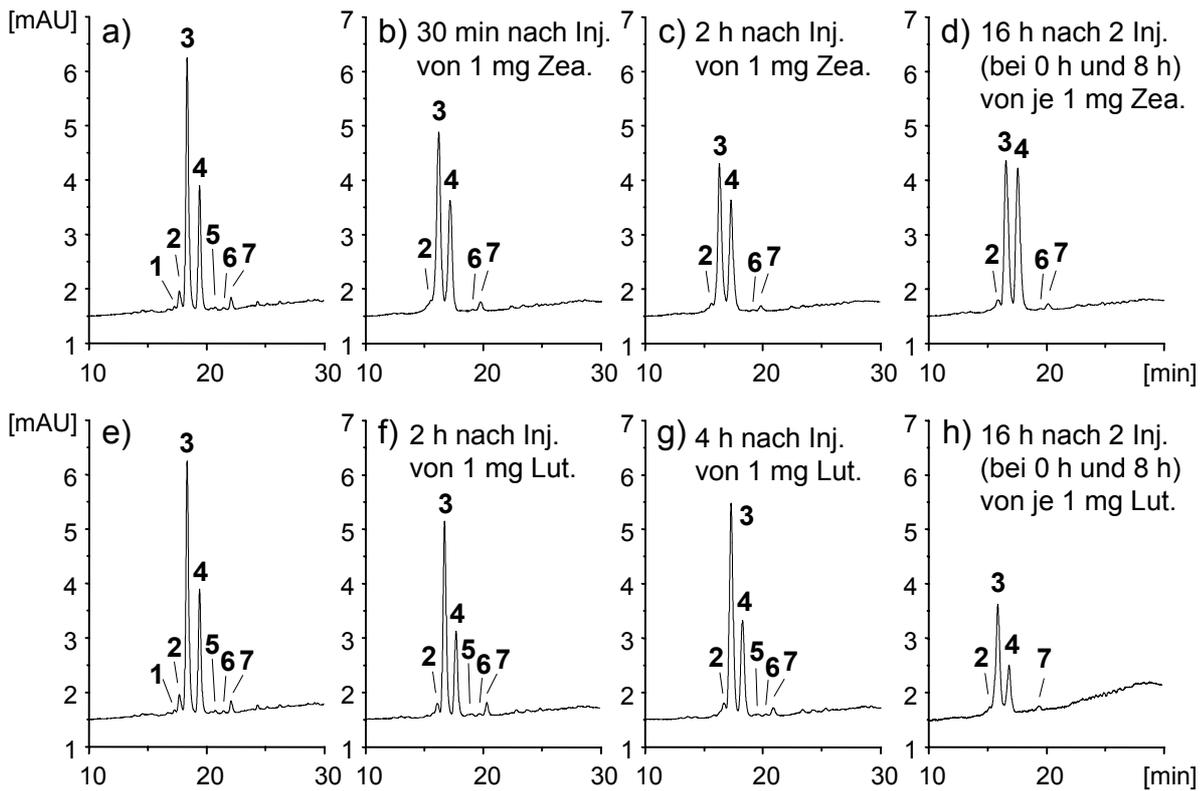


Abbildung 58: Metabolismus von Carotinoiden bei Hühnern, Analyse der Seren.

a), e) Kontrolle (ohne Injektion); b)-d) nach Injektion von all-E Zeaxanthin; f)-h) nach Injektion von all-E Lutein. Beschriftung s. Kap. 5.6.2

	ohne Inj.	Injektion von all-E Lutein			Injektion von all-E Zeaxanthin		
	t = 0h	t = 2h	t = 4h	t = 16h	t = 0.5h	t = 2h	t = 16h
(1) 13-Z Lutein	1.0	1.0	0.6	0.4	0.3	0.2	0.5
(2) 13'-Z Lutein	5.1	4.4	4.7	2.8	4.0	3.7	4.7
(3) all-E Lutein	60.8	62.3	63.2	66.7	58.2	53.4	47.0
(4) all-E Zeaxanthin	29.2	27.2	28.1	26.8	34.6	40.6	45.5
(5) 9-Z Lutein	0.8	0.8	0.6	0.2	0.2	0.1	0.1
(6) 9'-Z Lutein	0.6	0.6	0.4	0.5	0.3	0.4	0.4
(7) 9-Z Zeaxanthin	2.5	3.7	2.2	2.6	2.4	1.6	1.8
all-E Lut / all-E Zea	67.6 / 32.4	69.6 / 30.4	69.2 / 30.8	71.3 / 28.7	62.6 / 37.4	56.8 / 43.2	50.9 / 49.1
Lut (ges.) / Zea (ges.)	68.3 / 31.7	69.1 / 30.9	69.7 / 30.3	70.6 / 29.4	63.0 / 37.0	57.8 / 42.2	52.7 / 47.3
all-E (ges.) / Z (ges.)	89.4 / 10.6	89.5 / 10.5	91.3 / 08.7	93.5 / 06.5	92.8 / 07.2	94.0 / 06.0	92.5 / 07.5
Lut+Zea (Ges.) in ng	104.5	115.3	108.1	102.5	113.0	105.0	120.0

Tabelle 18: Metabolisierung von Carotinoiden im Serum von Hühnern durch Injektion reiner all-E Isomere in den Glaskörper. Angaben in Prozent

6 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Dissertation wurde gezeigt, dass die C₃₀-Trennsäule zur Auftrennung von Carotinoid-Stereoisomeren in allen biologischen Matrices geeignet ist. Zudem kann dieses Phasenmaterial in der Extraktion von Carotinoiden aus festem biologischen Gewebe mittels MSPD eingesetzt werden, so zum Beispiel sowohl in der Analytik von Pflanzengewebe als auch von retinalem Gewebe.

Die MSPD ist zur Extraktion von festen Proben den anderen Extraktionstechniken vorzuziehen, da sie die Analyten direkt aus dem festen Material isoliert. Zusätzlich sind instabile Analyten, wie die Carotinoide, in ihrer natürlichen Matrix bis zum Elutionsschritt eingebunden und damit vor Isomerisierung und Degradation geschützt. Die MSPD erfolgt dabei quantitativ und äußerst reproduzierbar.

Bei der Extraktion von Carotinoiden aus Blutproben wurde eine Methode entwickelt, die zusätzlich zum Prinzip der Umkehrphase auch auf dem Größenausschlussprinzip basiert. Mit Hilfe dieser sogenannten RAM-Phase als Vorsäule können Plasmaproben direkt ohne Vorbehandlung auf das Extraktions-Trennungs-System injiziert werden. Die Proteine werden dabei von den Carotinoiden abgetrennt, welche selektiv mit den in den Poren enthaltenen C₁₈-Alkylketten wechselwirken und so angereichert werden.

Die Trennung der verschiedenen Z/E-Stereoisomere erfolgt auf C₃₀-Trennphasen. Einerseits wurden die Z/E-Stereoisomere qualitativ in der Tomatenschale analysiert. Andererseits wurde das Carotinoid-Stereoisomerenmuster quantitativ sowohl im Pflanzengewebe (Spinat) als auch am Wirkungsort der altersbedingten Makuladegeneration (AMD), der Retina, anhand verschiedener Spezies untersucht.

Die quantitativen Untersuchungen der verschiedenen Spinatproben zeigten, dass die Art und Zubereitung einen Effekt auf die Zusammensetzung der Carotinoide im Spinat haben kann. Der Spinat aus eigenem Anbau zeigte nach dem Kochvorgang eine bessere Zugänglichkeit der Carotinoide, da die harte Zellstruktur durch das Kochen aufgebrochen wurde. Eine nennenswerte Isomerisierung durch den Kochvorgang konnte nicht analysiert werden. Eine längere Anbauzeit korreliert hingegen mit

höheren Werten aller Carotinoid-Stereoisomere. Das Fertigspinatprodukt enthält nur etwa halb so viel Carotinoide wie der Anbauspinat. Der Kochprozess zerstört zusätzlich weitere 10 % an Carotinoiden.

Die Identifizierung der Z/E-Stereoisomere aus den untersuchten Proben (Tomate, Spinat, enzymologische Biosynthese, retinales Gewebe) gelang mittels gekoppelter Trenn-Analyse-Methoden. Einerseits kann mit Hilfe der HPLC-UV-Kopplung Rückschlüsse auf die Art des Carotinoids sowie die Anzahl und Position einer etwaigen Z-Bande geschlossen werden. Hierfür ist neben der Lage der Absorptionsmaxima besonders das Verhältnis der Absorptionsbanden III/II sowie *cis*/II relevant.

Die HPLC-APCI-MS-Kopplung ermöglicht auch eine Unterscheidung verschiedener Carotinoide, so z.B. der massengleichen Carotinoide Lutein und Zeaxanthin. Anhand der selected-ion Chromatogramme (SIC) können alle den einzelnen Carotinoiden zugeordneten Stereoisomere graphisch identifiziert werden.

Die HPLC-NMR-Kopplung ist aber die einzige Methode, die eine zweifelsfreie Strukturidentifizierung der einzelnen Stereoisomere ermöglicht. Dies ist zum Einen an den aus der Tomatenschale identifizierbaren Lycopin-Stereoisomere gezeigt, zum Anderen an den ζ -Carotin-Stereoisomeren aus enzymologischer Produktion von *E. coli*. Die HPLC-NMR-Kopplung erbrachte hier den Beweis, dass bei der durchgeführten Biosynthese neben dem all-E Isomer hauptsächlich die beiden Stereoisomere 5-Z sowie 5,5'-ZZ ζ -Carotin entstehen.

Eine Methode zur Identifizierung von Carotinoiden direkt aus dem biologischen Gewebe ist die HR-MAS-NMR-Spektroskopie in Suspension. Die farbgebenden Hauptpigmente (all-E Lycopin in der Tomate, all-E β -Carotin in der Karotte) konnten direkt aus dem getrockneten Pflanzenmaterial, und damit ohne jegliche Extraktion, NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden. Dabei gelang es nicht nur, Carotinoide aus einer leicht zugänglichen Matrix (Tomatenschale) sondern auch aus einer komplexen Matrix (Karotte) zu identifizieren.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zur chiralen Trennung von optischen Carotinoid-Isomeren zu entwickeln. Mit Hilfe der sogenannten (*S,S*)-ULMO-Trennphase konnte ein Gemisch der drei optischen Zeaxanthinisomere innerhalb von 20 Minuten getrennt werden. Diese Trennsäule soll nun in zukünftigen Studien auch auf einen Einsatz in biologischen Systemen angewandt werden. So soll untersucht werden, ob in retinalen Geweben neben geometrischen auch optische Isomere auftreten.

Neben den rein analytischen Aufgabestellungen zur Trennung und Identifizierung von Stereoisomeren wurden auch zwei Studien zur Bioverfügbarkeit und Metabolisierung von Carotinoiden im Organismus durchgeführt.

Die Bioverfügbarkeitsstudie von Lutein aus partiell deuterierten Gemüsesorten (Kohl, Spinat) stellte dabei eine Pilotstudie dar, da erstmals eine Methode angewandt wurde, bei der zwischen vorhandenem Carotinoidspiegel im Serum und appliziertem gelabeltem Lutein exakt unterschieden werden konnte. Die gelabelten Gemüsesorten wurden in einem mit 25 Atom-% Deuteriumoxid angereicherten Nährmedium in einer speziellen Gewächskammer hydroponisch angebaut und mittels HPLC-APCI-MS-Kopplung analysiert.

Die Studie wurde mit je zwei Probanden für Kohl und Spinat durchgeführt. Die Serenanalysen in Folge einmaliger Applikation von gelabeltem Lutein erbrachte nahezu identische Ergebnisse für die Spinatstudie. Beide Probanden hatten nach elf Stunden ihren höchsten Anreicherungsgrad an Carotinoiden im Serum mit einer 2,2-fachen Anreicherung. Das applizierte, mit Deuterium markierte, Lutein konnte vom im Serum vorhandenen nicht gelabelten Lutein mittels APCI-MS-Analyse unterschieden werden und zeigte zwischen 13 und 24 Stunden bei beiden Probanden einen Wert von etwa 30 % im Vergleich zum Gesamt-Luteinwert. Die Ergebnisse der Kohlstudie waren auf Grund der unterschiedlichen Carotinoid-Grundlevel der beiden Probanden nicht identisch. Der Proband (N.G.), der einen ähnlichen Grundlevel im Vergleich zu den Probanden der Spinatstudie aufwies, zeigte auch ähnliche Werte für die Anreicherung. Der andere Proband (J.H.) zeigte, v.a. wegen seinem extrem niedrigen Carotinoidspiegel, eine Anreicherung von gelabeltem Lutein von über 50 %.

Die Pilotstudie zeigte, dass die APCI-MS-Analyse geeignet ist, das Isomerenprofil im Serum zu detektieren, sowie um sie quantitativ auszuwerten. Die nahezu identischen Ergebnisse der Spinatstudie nähren die Hoffnung, dass sich diese Methode für Bioverfügbarkeitsstudien durchsetzt. So wurde im Laufe dieses Jahres auch eine weiterführende Studie vom National Institute of Health (NIH) genehmigt, bei der eine größere Anzahl von Probanden mit Deuterium markierten Spinat appliziert bekommen, um die Anreicherung und Bioverfügbarkeit auch statistisch auswerten zu können.

Eine weitere Aufgabe bestand in der methodischen Entwicklung einer Standard-Extraktionsmethode zur artefaktfreien Identifizierung von Carotinoid-Stereoisomeren aus retinalem Gewebe. Dabei konnte eine universell anwendbare MSPD-Methode entwickelt werden, die zur artefaktfreien Carotinoidanalytik aller retinalen Gewebeproben (Retina, Choroid, Vitreus) von Mensch, nicht-humanen Primaten (*Calytrix jacchus*, *Macaca mulatta*), Ratte, Schwein und Huhn angewandt werden kann.

Die Carotinoid-Stereoisomeren-Patterns in den verschiedenen Spezies wurden analysiert und verglichen. Am Beispiel der Humanretina sowie eines nicht-humanen Primaten (*Calytrix jacchus*) wurde dabei die Retina in verschiedene Sektoren untergliedert. In der Retina von Primaten werden die selben Lutein- und Zeaxanthin-Stereoisomere identifiziert. Der Anteil der Z-Stereoisomere beträgt dabei in der Peripherie Retina zwischen 20 % beim Menschen und über 40 % beim *Calytrix jacchus*.

In den Retinen aller Spezies außer den Menschen konnten zudem zum Teil beträchtliche Konzentrationen an β -Carotin-Stereoisomeren identifiziert werden. Es ist das erste Mal, dass β -Carotin als retinales Carotinoid identifiziert wird. Vor allem beim Schwein (als all-E-Form) und bei der Ratte (in der 13-Z-Form) ist β -Carotin das vorherrschende Carotinoid. Es muss demnach eine Aufnahme sowie eine Metabolisierung im Organismus stattfinden. Die Identifizierung hoher Mengen an Carotinoiden, und insbesondere von β -Carotin in den jeweiligen Standard-Futtergemischen der Tiere belegen diese Annahme.

Die Anreicherung von Carotinoid-Stereoisomeren in der Retina sowie die Metabolisierung konnte durch Injektionsversuche am Tiermodell Huhn belegt werden. Es scheint einen Transfer durch die Blut-Hirnschranke stattzufinden. Injiziertes all-E Zeaxanthin wird dabei in der Retina auch als all-E Zeaxanthin signifikant angereichert und nur wenig metabolisiert. All-E Lutein ist viel instabiler und metabolisiert demnach leichter. Nach Injektion finden sich so erhöhte Werte sowohl von allen Luteinisomeren als auch von Zeaxanthin in der Retina wieder. In Zukunft sollten Ernährungsstudien mit speziellen Futtermischungen aus nur einzelnen Carotinoiden diese Aufnahme sowie Metabolisierung von Carotinoiden in der Retina belegen.

Die Erfahrungen aus den anderen Tiermodellen wurden auf die Analytik der Rattenretinen angewandt. Hier ist ein gut erforschtes Degenerationsmodell (RCS-Ratten) vorhanden. Durch die Optimierung der Methodik sowie Standardisierung der Extraktion und Analyse konnte der Bedarf an Retinen auf ca. sechs Retinen pro Analyse minimiert werden. Zwischen gesunden und degenerierten Retinen von RCS-Ratten konnten deutliche Unterschiede im Carotinoid-Stereoisomeren-Muster festgestellt werden. Die unerwartet hohen Werte an Lutein- und Zeaxanthin-Isomeren bei den vollständig degenerierten Retinen im Vergleich zu den gesunden Ratten könnten infolge der Zerstörung der Blut-Hirnschranke zustande kommen.

Diese Unterschiede müssen nun in einer genau definierten Zeitstudie analysiert und verifiziert werden. Danach soll mittels Fütterungsexperimenten an den Ratten eine Anreicherung der Carotinoide in der Retina nachgewiesen werden. Hiermit könnte eine direkte Korrelation zwischen Nahrungsaufnahme von Carotinoiden, Anreicherung und Metabolisierung in der Retina sowie Auswirkung auf die retinale Degeneration bestimmt werden.

7 Experimenteller Teil

7.1 Geräte

7.1.1 HPLC-Anlagen

Zwei Agilent HPLC-Systeme der Serie HP 1100 mit der Binären Pumpe G 1312A (Agilent Technologies, Waldbronn).

Als UV-Detektoren wurden eingesetzt:

Agilent UV-Detektor G1314A der Serie HP 1100 (Agilent Technology, Waldbronn),
UV-Detektor Lambda 1010 (Bischoff Analysentechnik und -geräte GmbH, Leonberg),
Waters 990 Photodiode Array Detector (Waters GmbH, Eschborn)
Shimadzu UV-2102 PC UV-Vis Spektralphotometer (Shimadzu GmbH, Duisburg)

Steuersoftware: HyStar NT 2.0 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen)

Für die HPLC-NMR-Kopplungsexperimente wurde eine Bruker Peak Sampling Unit BPSU-12 (Bruker Analytik GmbH, Rheinstetten) als Interface verwendet.

7.1.2 Massenspektrometer

- Bruker Esquire-LC Ion Trap LC/MS⁽ⁿ⁾-System G1980AA (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) mit APCI Interface.
- Bruker Esquire3000 Ion Trap LC/MS⁽ⁿ⁾-System (Bruker Daltonik, Bremen) mit APCI Interface.

Die HPLC-APCI-MS-Kopplung erfolgte mit einem Agilent HPLC-System der Serie HP 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn) unter Verwendung der Bruker Daltonics Esquire NT 4.0 Steuersoftware und Data Analysis 2.0 Software (Bruker Daltonik, Bremen).

7.1.3 NMR-Spektrometer

Die HPLC-NMR-Kopplungsexperimente wurden an einem Bruker AMX600 Spektrometer (Magnetfeldstärke 13.1 Tesla, Protonenresonanzfrequenz 600.13 MHz) mit einem inversen 120 μ l-Durchflussprobenkopf (Bruker Analytik GmbH, Rheinstetten) durchgeführt.

Die ^1H -HR-MAS-NMR-Experimente wurden an einem Bruker ARX400 Spektrometer (Magnetfeldstärke 9.4 Tesla, Protonenresonanzfrequenz 400.13 MHz) durchgeführt.

Die Geräte wurden über eine O2-Workstation (Silicon Graphics) mit XWINNMR-Software (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) gesteuert. Die Datenauswertung erfolgte sowohl an einer INDY-Workstation (Silicon Graphics) mit XWINNMR-Software als auch am PC mit 1D und 2D WINNMR-Software (Bruker Daltonik GmbH, Bremen).

7.2 Chemikalien

Extraktion und Chromatographie:

HPLC-reine Lösungsmittel: Aceton, Chloroform, Dichlormethan, Diethylether, N,N-Dimethylformamid, Ethanol, n-Heptan, n-Hexan, Isopropanol, Methanol, t.-Butylmethylether, Tetrahydrofuran (alle LiChrosolv, Fa. Merck KGaA, Darmstadt)

Carotinoid-Standards: all-E β -Carotin, all-E Lycopin, all-E Meso-Zeaxanthin, all-E (R,R)-Zeaxanthin, all-E (S,S)-Zeaxanthin, Echichenon (alle BASF AG), all-E Lutein (Hoffmann LaRoche AG, Basel sowie Kemin Ind., Des Moines, IA, USA), β -Apo-8'-carotenal (Fa. Fluka, Neu-Ulm).

Als Stabilisator: BHT (2,6-Di-t.-butyl-p-kresol; Fa. Sigma-Aldich GmbH, Steinheim)

Als MSPD-Sorbensmaterial: Isolute MSPD C18 sowie Isolute MSPD C18(EC) (Separtis GmbH, Grenzach-Wyhlen)

HPLC-NMR-Kopplung:

Deuteriumoxid (Deutero GmbH, Kastellaun)

7.3 Probenvorbereitung und Extraktion

7.3.1 Carotinoid-Standards

1 mg der reinen all-E Carotinoid-Standards wurde in 1 ml Aceton gelöst. Nach Zugabe eines Tropfens einer Iodlösung (in n-Hexan) wurde die Carotinoid-Standardlösung eine Stunde unter UV-Licht isomerisiert¹⁵⁶.

7.3.2 Pflanzen und Gemüseproben

Analyse von Tomatenschalen und Karotten mittels HR-MAS-NMR-Spektroskopie:

Die Tomaten wurden geschält und in kleine Stücke geschnitten. Die Karotte wurde in kleine Stücke gerieben und diese weiter zerkleinert. Die Proben wurden jeweils in einen Mörser gegeben, mit flüssigem Stickstoff übergossen und fein gemörsert und danach lyophilisiert.

Quantitative Analyse von Spinatproben:

Nach der Ernte wurden die Spinatblätter gewaschen, danach mit flüssigem Stickstoff kurz abgeschreckt und im Mörser fein zerkleinert. Für die Untersuchung von gekochtem Spinat wurde dieser wie vorgeschrieben mit Wasser versetzt und in einer Mikrowelle bei 600 W sechs Minuten erhitzt. Die MSPD-Analyse wurde mit je 0.5 g an Spinatprobe durchgeführt. Hierbei wurde die Probe zusammen mit 1.5g Sorbensmaterial, 8.0 µg an internem Standard (β -Apo-8'-carotenal) sowie einigen Körnchen BHT als Stabilisator in einem Mörser vermischt und zu einem homogenen Pulver verrieben. Das resultierende glatte, trockene Pulver wurde in ein Leerreservoir mit eingelegter Fritte eingefüllt. Nach Auflegen einer zweiten Fritte wurde das Sorbensbett so dicht wie möglich zusammengepresst. Polare Verunreinigungen konnten mit 15 ml bidestilliertem Wasser eluiert werden, bevor die Carotinoide in reiner und aufkonzentrierter Form mit etwa 400 µl Aceton eluiert werden konnte.

Die Analyse der Tomatenprobe (Schale) wurde ohne Zusatz des internen Standards auf die selbe Weise durchgeführt.

Präparation und Zubereitung von gelabeltem Gemüse für die Bioverfügbarkeitsstudie:

Die beiden Gemüsesorten (Spinat sowie Collard Green Kohl) wurden am USDA HNRC on Childrens in Houston, Texas von Prof. M.A. Grusak in einer Nährlösung mit 25 Atom-% Deuteriumoxid hydroponisch angebaut. Die spezielle Gewächskammer wurde einem möglichst naturgetreuen Anbau nachempfunden, also mit künstlich erzeugtem Tagesablauf mit Sonnenaufgang und -untergang. Nach etwa fünf Wochen wurde das gelabelte Gemüse gerntet und bei -80 °C tiefgefroren. In Boston am USDA HNRC on Aging der Tufts University wurden die Gemüsesorten zur Nahrung präpariert und portioniert. Dabei wurden die Gemüsesorten gewogen, klein geschnitten, und anschließend fünf Minuten gedämpft. Danach wurden die Pflanzen in püriert und portioniert.

7.3.3 Serumproben

Die gesamte Analyse von Serumproben fand unter Rotlicht statt und damit unter Ausschluss von Sonnenlicht. Die Blutplasmaproben wurden mit einem Serum-Plasma-Separator Sure-Sep[®] II in Serum umgewandelt. Dabei wurde die Proben mit dem Sure-Sep[®] II-Deckel für zehn Minuten bei 6 °C und 3000 rpm zentrifugiert (Sorvall RT6000 kühlbare Zentrifuge, Kendro Laboratory Products, Newtown, CT, USA). Und dann das Serum abdekantiert.

0.5 ml Serum wurde mit 5 ml Chloroform/Methanol (2:1, v/v), 375 µl des internen Standards Echichenon sowie 1.25 ml einer 0.85 % Kochalzlösung versetzt und die Mischung zehn Minuten bei 6 °C und 3000 rpm zentrifugiert. Die Chloroformphase wurde abgetrennt. Dann wurde 5 ml n-Hexan zugegeben und nochmals 10 Minuten zentrifugiert. Die Hexanphase wurde zur Chloroformphase zugegeben und im Stickstoffstrom bei 25 °C zur Trockne eingengt. Die extrahierten Carotinoide wurden in 300 µl Ethanol aufgenommen.

7.3.4 Retinen

Alle Retinen wurden am Institut für Experimentelle Ophthalmologie der Universitäts-Augenklinik Tübingen von Prof. Dr. K. Kohler präpariert.

Die Hühner und RCS-Ratten stammten dabei aus Instituseigener Tierhaltung. Die Humanretinen wurden von der Universitätsklinik Tübingen von Organspendern erhalten. Die nicht-humanen Primatenretinen wurden vom Deutschen Primatenzentrum in Göttingen in tiefgefrorenen Zustand (bei -80 °C mit Trockeneis) zur Verfügung gestellt. Die Augen der Schweine wurden an der Universität Hohenheim im Labor von Prof. Dr. Carle seziiert und vor Ort präpariert.

Die gekühlten Augen wurden den getöteten Tieren in der Dunkelheit entnommen und unter Eiskühlung vorsichtig aufgeschnitten. Der Füllkörper wurde entfernt, danach wurde das Auge kurzfristig in einen Phosphatpuffer getaucht. Dadurch lässt sich die Netzhaut leicht vom Rest des Auges abtrennen und in die verschiedenen Teilabschnitte aufteilen. Die weiteren retinalen Gewebe (Choroid, Vitreus, Pektin) wurden auf diese Weise auch vom Auge abgetrennt. Bis zur Analyse wurden die Retinen bei -40 °C tiefgefroren gelagert. Die Extraktion der Carotinoide aus retinalem Gewebe erfolgte mit der gleichen MSPD-Methode wie zur Analyse von Spinat. Die Extraktion dauert nur etwa 20 Minuten.

7.4 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

7.4.1 Trennsäulen

- LiChrospher[®] RP-18 ADS-Säule (25*4 mm, 25 μm Partikelgröße) zur Anreicherung von Carotinoiden aus humanen Plasmaproben (Fa. Merck KGaA, Darmstadt)
 - Bischoff ProntoSIL 200-3-C30-Säulen mit 3 μm Partikelgröße, 200 Å Porenweite (150*4.6 mm sowie 250*4.6 mm, Bischoff Analysentechnik und -geräte GmbH, Leonberg) zur Trennung, HPLC-MS- sowie HPLC-NMR-Kopplung von Carotinioid-Steeroisomeren aus biologischen Geweben
-

- Stability C30-Säule (nicht endgecappt) sowie Stability C30-PG-Säule (endgecappt) mit 5 µm Partikelgröße, 100 Å Porenweite (250*4.6 mm, Dr. A. Maisch, Ammerbuch) zur Carotinoid-Stereoisomerentrennung
- YMC C30-Säule mit 3 µm Partikelgröße, 200 Å Porenweite (150*4.6 mm, YMC Inc., Milford, MA, USA) zur Trennung von Carotinoiden aus humanem Serum

7.4.2 Chromatographische Bedingungen

Die Trennungen wurden mit 1 ml/min Flussrate bei Raumtemperatur aufgenommen und die Carotinoide bei 450 nm detektiert, soweit nicht anders beschrieben.

a) Identifizierung von Carotinoid-Stereoisomeren mittels C₃₀-Säulen unterschiedlicher Retentionseigenschaften: Injektion von 10 µl eines isomerisierten Carotinoidstandards (Lutein und Zeaxanthin); binäres Eluentengemisch aus Aceton und Wasser

Stability C30-Säule: isokratische Trennung mit Aceton/Wasser 84/16 (v/v)

Stability C30-PG-Säule: Gradientenelution mit Aceton/Wasser: 0-10 min. 70/30 (v/v); 10-30 min. linearer Gradient auf; 30-35 min. 100/0 (v/v)

b) Carotinoid-Stereoisomere aus Spinat: Injektionen von je 25 µl

Bischoff ProntoSIL 200-3-C30-Säule (250*4.6 mm): Gradientenelution mit Aceton/Wasser: 0-21 min. 86/14 (v/v); 21-25 min. linearer Gradient auf; 25-40 min. 97/3 (v/v)

c) Trennung von Carotinoid-Stereoisomeren aus retinalem Gewebe:

Auf die Trennsäulen wurden zwischen 10 und 50 µl der Extrakte injiziert.

Retinales Gewebe von Mensch, Huhn, und Schwein: ProntoSIL C30-Säule (150*4.6 mm): Gradientenelution mit Aceton/ Wasser: 0-3 min. 75/25 (v/v); 3-20 min. linearer Gradient auf 75/25 (v/v); 20-27 min. linearer Gradient auf; 27-40 min. 100/0 (v/v)

Retinales Gewebe von Primaten und Ratten: ProntoSIL C30-Säule (250*4.6 mm): Gradientenelution mit Aceton/ Wasser: 0-3 min. 78/22 (v/v); 3-25 min. linearer Gradient auf; 25-40 min. 98/2 (v/v)

d) Carotinoid-Stereoisomere aus der Tomatenschale: UV-Detektion bei 469 nm

Bischoff ProntoSIL 200-3-C30-Säule (150*4.6 mm): Injektion von 20 µl des Extrakts. Gradientenelution mit Aceton/Wasser: 0-3 min. 75/25 (v/v); 3-27 min. linearer Gradient; 27-45 min. 100/0 (v/v)

e) Carotinoide aus humanem Serum: Trennung bei 16 °C, Injektion von je 50 µl

YMC C30-Säule: Gradientenelution mit zwei Gemischen aus Methanol/TBME/Wasser: A mit 83/15/2 (v/v/v) und B mit 8/90/2 (v/v/v). 0-1 min. 100 % A; 1-8 min. lin. Gradient; 8-13 min. 70 % A; 13-22 min. lin. Gradient; 22-24 min. 45 % A; 24-34 min. lin. Gradient; 34-38 min. 5 % A; 38-40 min. lin. Gradient; 40-50 min. 100 % A.

f) Trennung von ζ-Carotin-Stereoisomeren: UV-Detektion bei 400 nm

YMC C30-Säule: isokratische Trennung mit Methanol/TBME/Wasser 56/30/4 (v/v/v) bei 28 °C und 0.9 ml/min Flussrate

Optimierte Methode auf Bischoff ProntoSIL C30-Säule (250*4.6 mm): isokratische Trennung mit Aceton/Wasser 95/5 (v/v) bei 1 ml/min Flussrate und Raumtemperatur

g) Anreicherung von Carotinoiden aus humanem Plasma:

Konditionieren mit Isopropanol, Methanol und Wasser; Injektion von 250 µl Plasma; Isokratische Anreicherung mit Acetonitril/Wasser 3/97 (v/v) für 10 Minuten und UV-Detektion bei 254 nm; isokratische Trennung der Carotinoide mit Aceton/Wasser 84/16 (v/v) und UV-Detektion bei 450 nm.

7.5 HPLC-MS-Experimente

Die Massenspektren der Carotinoide aus Spinatproben und retinalem Gewebe wurden in einem Massenbereich von m/z 200 - 800 aufgenommen. Die Corona-Spannung wurde auf 3 kV optimiert, so dass der resultierende Strom 8 - 10 µA betrug. Stickstoff wurde sowohl als Trocknungsgas und Trägergas bei 300 °C verwendet. Die Ionisierungskammer war auf 300 °C thermostatisiert. Die Spektren wurden im positiven Ionenmodus durchgeführt mit Injektionen von 10 und 20 µl.

Die Massenspektren der Carotinoide aus Serumproben für die Bioverfügbarkeitsstudie wurden in einem Massenbereich von m/z 540 - 570 aufgenommen. Die Corona-Spannung wurde auf 2.5 kV optimiert, der daraus resultierende Strom betrug zwischen 4 und 8 μA . Stickstoff wurde sowohl als Trocknungsgas und Trägergas (4 l/min bei 250 °C) verwendet. Die APCI-Ionisierungskammer war auf 300 °C thermostatisiert. Es wurden generell 50 μl der Serenextrakte auf die Trennsäule injiziert und im positiven Ionenmodus aufgenommen.

7.6 NMR-Spektroskopie

7.6.1 ^1H -HR-MAS-NMR-Experimente

Die Spektren wurden bei 300 K in 4 mm Rotoren durchgeführt. Die Spektren wurden mit 32 k Datenpunkten in einem spektralen Bereich von 8064.5 Hz aufgenommen. 4 k Scans wurden mit einer Delayzeit von 1.6 s akkumuliert. Vor der Fourier-Transformation wurde der FID mit einer Exponentialfunktion mit einer Linienverbreiterung von 1 Hz multipliziert.

7.6.2 Kopplungsexperimente

Die 1D-Experimente der ζ -Carotin-Stereoisomere wurden mit je 4 k Transienten bei 32 k Datenpunkten in einem spektralen Fenster von 12195 Hz aufgenommen. Die Lycopin-Stereoisomere wurden mit 2 - 6 k Transienten bei 16 k Datenpunkten in einem spektralen Fenster von 8400 Hz aufgenommen. Die Temperatur betrug generell 300 K. Die Injektionsvolumina betrugen zwischen 25 und 50 μl .

Das Lösungsmittelsignal von Aceton bei 2.04 ppm sowie das Restsignal von Wasser bei 4.7 ppm wurde dabei mittels einer Vorsättigungsmethode unterdrückt. Die Vorsättigung wurde dabei während der 1.6 s Delayzeit mit Shaped-Pulsen (Rechteckpulse mit 100 ms Länge) durchgeführt.

Vor der Fourier-Transformation wurden die FIDs jeweils mit einer Exponentialfunktion mit einer Linienverbreiterung von 0.3 Hz multipliziert sowie ein Zero-Filling auf 32 k Datenpunkte durchgeführt.

Die 2D-Experimente wurden mit einer COSY Pulssequenz durchgeführt. Für das Lutein Spektrum wurde 40 μ l auf die Trennsäule injiziert, für Lycopin 30 μ l. Beide Spektren wurden mit 2 k Datenpunkten in einem spektralen Bereich von 13513 Hz bei 300 K aufgenommen. Die Anzahl der Experimente in F1-Dimension lag bei 280, die Anzahl der akkumulierten Transienten bei 256. Vor der Fourier-Transformation mit 2 k Datenpunkten in beiden Dimensionen wurden die Spektren mit einer Sinusfunktion multipliziert und basislinienkorrigiert.

8 Literatur

- 1 H. Braconnot; *Ann. Chim. Phys.*; **1817**; 6; 122.
- 2 H. Wackenroder; *Mag Pharm.*; **1831**; 33; 144.
- 3 J.J. Berzelius; Über die gelbe Farbe der Blätter im Herbst; *Ann. Pharm.*; **1837**; 21; 257-262.
- 4 R. Willstätter, W. Mieg; Über die gelben Begleiter des Chlorophylls; *Liebig's Ann. Chem.*; **1907**; 355; 1-28.
- 5 P. Karrer, A. Helfenstein, H. Wehrli, A. Wettstein; Pflanzenfarbstoffe XXV: Über die Konstitution des Lycopins und Carotins; *Helv. Chim. Acta*; **1930**; 13; 1084-1099.
- 6 P. Karrer, R. Morf, K. Schöpp; Zur Kenntnis des Vitamins-A aus Fischtranen I und II; *Helv. Chim. Acta*; **1931**; 14; 1036-1040,1431-1436.
- 7 G. Wald; Human vision and the spectrum; *Nature (London)*; **1945**, 101; 653-658.
- 8 P.K. Brown, G. Wald; Visual pigments in human and monkey retinas; *Nature (London)*; **1963**, 200; 37-43.
- 9 G. Britton; in *The biochemistry of natural pigments*, Cambridge University Press, Cambridge; **1983**; 258,278.
- 10 S.L. DeFelice; Nutraceuticals: opportunities in an emerging market; *Scrip. Mag.*; **1992**; 9.
- 11 G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, in: *Carotenoids, Volume 1a: Isolation and Analysis*, Birkhäuser Verlag Basel, Boston, Berlin, **1995**.
- 12 C. Franzke; in: *Allgemeines Lehrbuch der Lebensmittelchemie*; B. Behr's Verlag, Hamburg; 3. Aufl.; **1996**; 155-158,209-213.
- 13 O. Isler; History and industrial application of carotenoids and vitamin A; *Pure Appl. Chem.*; **1979**; 51; 447-461.
- 14 International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) and International Union of Biochemistry (IUP) Commission on Nomenclature; Nomenclature of Carotenoids; *Pure Appl. Chem.*; **1975**, 41, 405-431.
- 15 S. Liaaen-Jensen; Stereochemical aspects of carotenoids; *Pure Appl. Chem.*; **1997**; 69 (10); 2027-2038.
- 16 L. Zechmeister; in: *Cis-trans isomeric Carotenoids, Vitamin A and Arylpolyenes*, Springer Verlag, Wien; **1962**.
- 17 E. Lück, P. Kuhnert; in: *Lexikon Lebensmittelzusatzstoffe*; B. Behr's Verlag, Hamburg; 2. Aufl.; **1998**; 42-43,268.
- 18 G.A. Burdock; in: *Encyclopedia of food and color additives*; CRC Press, Boca Raton; **1997**; Vol. 1; 497-500.
- 19 J. Falbe, M. Regitz; in: *Römpf Chemie Lexikon*; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York; 9. Aufl.; **1995**; 596-598.
- 20 G. Sandmann; Carotenoid biosynthesis and biotechnological application; *Arch. Biochem. Biophys.*; **2001**; 385 (1); 4-12.
- 21 J.W. Porter, S.L. Spurgeon; Enzymatic synthesis of carotenes; *Pure Appl. Chem.*; **1979**; 51; 609-622.
- 22 X. Ye, S. Al-Babili, A. Klöti, J. Zhang, P. Lucca, P. Beyer, I. Potrykus; Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm; *Science*; **2000**; 287; 303-305.
- 23 H. Kleinig; in: *Zellbiologie*, H. Kleinig, P. Sitte, U. Maier, Eds.; Gustav Fischer Verlag, Stuttgart; 4. Aufl., **1999**; Kap. 11.4; 305-315.
- 24 C.A. Tracewell, J.S. Vrettos, J.A. Bautista, H.A. Frank, G.W. Brudvig; Carotenoid photooxidation in photosystem II; *Arch. Biochem. Biophys.*; **2001**; 385 (1); 61-69.
- 25 H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira, J. Darnell; in: *Molekulare Zellbiologie*, Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York; 2. Aufl.; **1996**; Kap. 18.2; 811-814.
- 26 A.J Young, D. Phillip, A.V. Ruban, P. Horton, H.A. Frank; The xanthophyll cycle and carotenoid-mediated dissipation of excess excitation energy in photosynthesis; *Pure Appl. Chem.*; **1997**; 69; 2125-2130.
- 27 J.J.M. Castenmiller, C.E. West; Bioavailability and bioconversion of carotenoids; *Annu. Rev. Nutr.*; **1998**; 18; 19-38.
- 28 K.H. van het Hof, C.E. West, J.A. Weststrate, J.G.A.J. Hautvast; Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids; *J. Nutr.*; **2000**; 130; 503-506.

- 29 J.J.M. Castenmiller, C.E. West, J.P.H. Linssen, K.H. van het Hof, A.G.J. Voragen; The food matrix of spinach is a limiting factor in determining the bioavailability of β -carotene and to a lesser extent of lutein in humans; *J. Nutr.*; **1999**; *129*; 349-355.
- 30 C.L. Rock, J.L. Lovalvo, C. Emenhiser, M.T. Ruffin, S.W. Flatt, S.J. Schwartz; Bioavailability of β -carotene is lower in raw than in processed carrots and spinach in women; *J. Nutr.*; **1998**; *128*; 913-916.
- 31 K.H. van het Hof, B.C.J. de Boer, L.B.M. Tijburg, B.R.H.M. Lucius, I. Zijp, C.E. West, J.G.A.J. Hautvast, J.A. Weststrate; Carotenoid bioavailability in humans from tomatoes processed in different ways determined from the carotenoid response in the triglyceride-rich lipoprotein fraction of plasma after a single consumption and in plasma after four days of consumption; *J. Nutr.*; **2000**; *130*; 1189-1196.
- 32 K.H. van het Hof, I.A. Brouwer, C.E. West, E. Haddeman, R.P.M. Steegers-Theunissen, M. van Dusseldorp, J.A. Weststrate, T.K.A.B. Eskes, J.G.A.J. Hautvast; Bioavailability of lutein from vegetables is 5 times higher than that of β -carotene; *Am. J. Clin. Nutr.*; **1999**; *70*; 261-268.
- 33 M. Osterlie, B. Bjerkgeng, S. Liaaen-Jensen; Accumulation of astaxanthin all-*E*, 9*Z* and 13*Z* geometrical isomers and 3 and 3' *RS* optical isomers in rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*); *J. Nutr.*; **1999**; *129*; 391-398.
- 34 A.C. Boileau, N.R. Merchen, K. Wasson, C.A. Atkinson, J.W. Erdman, Jr.; *Cis*-lycopene is more bioavailable than *trans*-lycopene in vitro and in vivo in lymph-cannulated ferrets; *J. Nutr.*; **1999**; *129*; 1176-1181.
- 35 A. Bub, B. Watzl, L. Abrahamse, H. Delincée, S. Adam, J. Wever, H. Müller, G. Rechkemmer; Moderate intervention with carotenoid-rich vegetable products reduces lipid peroxidation in men; *J. Nutr.*; **2000**; *130*; 2200-2206.
- 36 N.I. Krinsky; Actions of carotenoids in biological systems; *Annu. Rev. Nutr.*; **1993**; *13*; 561-587-
- 37 N.I. Krinsky, X.D. Wang, G. Tang, R.M. Russell; Conversion of carotenoids to retinoids; in: *Retinoids: progress in research and clinical applications*, M.A. Livrea, L. Packer, Eds.; Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, Hongkong; **1993**; 1-16.
- 38 G. Tang, N.I. Krinsky; Differentiation between central and excentric cleavage of β -carotene; in: *Methods in Enzymology*, L. Packer, Ed.; **1993**; *214*; 69-74.
- 39 H.K. Biesalski, J. Schrezenmeir, P. Weber, H.E. Weiß; in: *Vitamine*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1997**.
- 40 C.A. Rice-Evans, J. Sampson, P.M. Bramley, D.E. Holloway; Why do we expect carotenoids to be antioxidants *in vivo*?; *Free Rad. Res.*; **1997**; *26*; 381-398.
- 41 R. Edge, D.J. McGarvey, T.G. Truscott; The carotenoids as anti-oxidants - a review; *J. Photochem. Photobiol. B*; **1997**; *41*; 189-200.
- 42 U. Gonder; Ernährung und Krebs; *EU.L.E.n-Spiegel*; **1998**; *9*; 1-16.
- 43 O.P. Heinonen, D. Albanes - the α -tocopherol, β -carotene (ATBC) cancer prevention study group; The effect of vitamin E and β -carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers; *N. Engl. J. Med.*; **1994**; *330 (15)*; 1029-1035.
- 44 G.S. Omenn, G.E. Goodman, M.D. Thornquist, J. Balmes, M.R. Cullen, A. Glass, J.P. Keogh, F.L. Meyskens, Jr., B. Valanis, J.H. Williams, S. Barnhart, S. Hammar; Effects of a combination of β -carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease - the CARET study; *N. Engl. J. Med.*; **1996**; *334*; 1150-1155.
- 45 C.H. Hennekens, J.E. Buring, J.E. Manson, M.J. Stampfer, B. Rosner, N.R. Cook, C. Belanger, F. LaMotte, J.M. Gaziano, P.M. Ridker, W.C. Willett, R. Peto; Lack of effect of long-term supplementation with β -carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease; *N. Engl. J. Med.*; **1996**; *334 (18)*; 1145-1149.
- 46 R.M. Russell; The vitamin A spectrum: from deficiency to toxicity; *Am. J. Clin. Nutr.*; **2000**; *71*; 878-884.
- 47 K. Klipstein-Grobusch, L.J. Launer, J.M. Geleijnse, H. Boeing, A. Hofman, J.C.M. Witteman; Serum carotenoids and atherosclerosis - The Rotterdam study; *Atherosclerosis*; **2000**; *148*; 49-56.
- 48 D.A. Cooper, A.L. Eldridge, J.C. Peters; Dietary carotenoids and certain cancers, heart disease, and age-related macular degeneration: a review of recent research; *Nutr. Rev.*; **1999**; *57 (7)*; 201-214.
- 49 S.B. Kritchevsky; β -Carotene, carotenoids and the prevention of coronary heart disease; *J. Nutr.*; **1999**; *129*; 5-8.
- 50 L. Arab, S. Stock; Lycopene and cardiovascular disease; *Am. J. Clin. Nutr.*; **2000**; *71*; 1691-1695.
- 51 K.N. Prasad, W. Cole, P. Hovland; Cancer prevention studies: past, present, and future directions; *Nutrition*; **1998**; *14 (2)*; 197-210.

- 52 H. Nishino, H. Tokuda, Y. Satomi, M. Masuda, P. Bu, M. Onozuka, S. Yamaguchi, Y. Okuda, J. Takayasu, J. Tsuruta, M. Okuda, E. Ichiishi, M. Murakoshi, T. Kato, N. Misawa, T. Narisawa, N. Takasuka, M. Yano; Cancer prevention by carotenoids; *Pure Appl. Chem.*; **1999**; *71*; 2273-2278.
- 53 J.H. Cohen, A.R. Kristal, J.L. Stanford; Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk; *J. Natl. Cancer Inst.*; **2000**; *92*; 61-68.
- 54 R.M. Russell; Lycopene and lutein: the next steps to the mixed carotenoids; in: *Nutraceuticals in health and disease prevention*, K. Krämer, P.P. Hoppe, L. Packer, Eds.; Marcel Dekker, Inc. New York, Basel; **2001**; Kap. 6; 91-102.
- 55 G. Metz; Vom Lebensmittelfarbstoff zum Pharmakon: β -Carotin; *PZ*; **1995**; *140* (6); 459-471.
- 56 M.L. Slattery, J. Benson, K. Curtin, K.-N. Ma, D. Schaeffer, J.D. Potter; Carotenoids and colon cancer; *Am. J. Clin. Nutr.*; **2000**; *71*; 575-582.
- 57 A.J. McEligot, C.L. Rock, S.W. Flatt, V. Newman, S. Faerber, J.P. Pierce; Plasma carotenoids are biomarkers of long-term high vegetable intake in women with breast cancer; *J. Nutr.*; **1999**; *129*; 2258-2263.
- 58 S. Zhang, D.J. Hunter, M.R. Forman, B.A. Rosner, F.E. Speizer, G.A. Colditz, J.E. Manson, S.E. Hankinson, W.C. Willett; Dietary carotenoids and vitamins A, C and E and risk of breast cancer; *J. Natl. Cancer Inst.*; **1999**; *91*; 547-556.
- 59 D.A. Cooper, A.L. Eldridge, J.C. Peters; Dietary carotenoids and lung cancer: a review of recent research; *Nutr. Rev.*; **1999**; *57* (5); 133-135.
- 60 B.J. Lyle, J.A. Mares-Perlman, B.E.K. Klein, R. Klein, J.L. Greger; Antioxidant intake and risk of incident age-related nuclear cataracts in the Beaver Dam eye study; *Am. J. Epidemiol.*; **1999**; *149* (9); 801-809.
- 61 B.J. Lyle, J.A. Mares-Perlman, B.E.K. Klein, R. Klein, M. Palta, P.E. Bowen, J.L. Greger; Serum carotenoids and tocopherols and incidence of age-related nuclear cataract; *Am. J. Clin. Nutr.*; **1999**; *69*; 272-277.
- 62 L. Chaban-Taber, W.C. Willett, J.M. Seddon, M.J. Stampfer, B. Rosner, G.A. Colditz, F.E. Speizer, S.E. Hankinson; A prospective study of carotenoid and vitamin A intakes and risk of cataract extraction in US women; *Am. J. Clin. Nutr.*; **1999**; *70*; 509-516.
- 63 L. Brown, E.B. Rimm, J.M. Seddon, E.L. Giovannucci, L. Chaban-Taber, D. Spiegelman, W.C. Willett, S.E. Hankinson; A prospective study of carotenoid intake and risk of cataract extraction in US men; *Am. J. Clin. Nutr.*; **1999**; *70*; 517-524.
- 64 S. Beatty, M. Boulton, D.B. Henson, H.-H. Koh, I.J. Murray; Macular pigment and age related macular degeneration; *Br. J. Ophthalmol.*; **1999**; *83*; 867-877.
- 65 S. Beatty, I.J. Murray, D.B. Henson, D. Carden, H.-H. Koh, M.E. Boulton; Macular pigment and risk for age related macular degeneration in subjects from a northern european population; *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*; **2001**; *42*; 439-446.
- 66 B.R. Hammond, Jr., B.R. Wooten, J. Curran-Celentano; Carotenoids in the retina and lens: possible acute and chronic effects on human visual performance; *Arch. Biochem. Biophys.*; **2001**; *385* (1); 41-46.
- 67 G. Osterberg; Topography of the layer of rods and cones in the human retina; *Acta Ophthalmol.*; **1935**; *Suppl. 6*; 1-103.
- 68 S.L. Polyak; in: *The Retina*, University of Chicago Press, Chicago, **1941**.
- 69 W. Schalch; Carotenoids in the retina - a review of their possible role in preventing or limiting damage caused by light and oxygen; in: *Free radicals and aging*; I. Emerit, B. Chance, Eds.; Birkhäuser Verlag Basel, Boston, Berlin; **1992**; 280-298.
- 70 F. Khachik, P.S. Bernstein, D.L. Garland; Identification of lutein and zeaxanthin oxidation products in human and monkey retinas; *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*; **1997**; *38*; 1802-1811.
- 71 R.D. Sperduto, F.L. Ferris, N. Kurinij; Do we have a nutritional treatment for age-related cataract or macular degeneration?; *Arch. Ophthalmol.*; **1990**; *108*; 1403-1405.
- 72 The Eye Disease Case-Control Study Group; Antioxidant status and neovascular age-related macular degeneration; *Arch. Ophthalmol.*; **1993**; *111*; 104-109.
- 73 J.M. Seddon, U.A. Ajani, R.D. Sperduto, R. Hiller, N. Blair, T.C. Burton, M.D. Farber, E.S. Gragoudas, J. Haller, D.T. Miller, L.A. Yannuzzi, W.C. Willett; Dietary carotenoids, vitamins A, C and E and advanced age-related macular degeneration - The Eye Disease Case-Control Study Group; *JAMA*; **1994**; *272* (18); 1413-1420.
-

- 74 J.T. Landrum, R.A. Bone, H. Joa, M.D. Kilburn, L.L. Moore, K.E. Sprague; A one year study of the macular pigment: effect of 140 days of a lutein supplement; *Exp. Eye Res.*; **1997**; *65*; 57-62.
- 75 B.R. Hammond, Jr., E.J. Johnson, R.M. Russell, N.I. Krinsky, K.-J. Yeum, R.B. Edwards, D.M. Snodderly; Dietary modification of human macular pigment density; *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*; **1997**; *38*; 1795-1801.
- 76 E.J. Johnson, B.R. Hammond, Jr., K.-J. Yeum, J. Qin, X.D. Wang, C. Castaneda, D.M. Snodderly, R.M. Russell; Relation among serum and tissue concentrations of lutein and zeaxanthin and macular pigment density; *Am. J. Clin. Nutr.*; **2000**; *71*; 1555-1562.
- 77 I.Y.F. Leung, M.O.M. Tso, W.W.Y. Li, T.T. Lam; Absorption and tissue distribution of zeaxanthin and lutein in rhesus monkeys after taking *Fructus lycii* (Gou Qi Zi) extract; *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*; **2001**; *42*; 466-471.
- 78 J.A. Mares-Perlman, W.E. Brady, R. Klein, G.M. van den Langenberg, B.E. Klein, M. Palta; Dietary fat and age-related maculopathy; *Arch. Ophthalmol.*; **1995**; *113*; 743-748.
- 79 W. Stahl, S. Nicolai, K. Briviba, M. Hanusch, G. Broszeit, M. Petres, H.-D. Martin, H. Sies; Biological activities of natural and synthetic carotenoids: induction of gap junctional communication and singlet oxygen quenching; *Carcinogenesis*; **1997**; *18*; 89-92.
- 80 E.J. Johnson, J. Qin, N.I. Krinsky, R.M. Russell; β -Carotene isomers in human serum, breast milk and buccal mucosa cells after continuous oral dose of all-trans and 9-cis β -carotene; *J. Nutr.*; **1997**; *127*; 1993-1999.
- 81 M. Gilar, E.S.P. Bouvier, B.J. Compton; Advances in sample preparation in electromigration, chromatographic and mass spectrometric separation methods; *J. Chromatogr. A*; **2001**; *909*; 111-135.
- 82 P. Hubert, A. Ceccato, P. Chiap, B. Toussaint, J. Crommen; Sample preparation of biological matrix for chromatographic methods; *Stp. Pharma Sciences*; **1999**, *2*, 160-180.
- 83 M.C. Hennion; Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography; *J. Chromatogr. A*; **1999**; *856*; 3-54.
- 84 K.S. Boos, C.H. Grimm; High-performance liquid chromatography integrated solid-phase extraction in bioanalysis using restricted access precolumn packings; *TRAC-Trends Anal. Chem.*; **1999**; *18* (3); 175-180.
- 85 C. Schäfer, D. Lubda; Alkyl diol silica: restricted access pre-column packings for fast liquid chromatography-integrated sample preparation of biological fluids; *J. Chromatogr. A*; **2001**; *909*; 73-78.
- 86 W.R.G. Baeyens, G. van der Weken, J. Haustraete, H.Y. Aboul-Enein, S. Corveleyn, J.P. Remon, A.M. Garcia-Campana, P. Deprez; Application of the restricted-access precolumn packing material alkyl-diol silica in a column-switching system for the determination of ketoprofen enantiomers in horse plasma; *J. Chromatogr. A*; **2000**; *871*; 153-161.
- 87 K.S. Boos; Tailormade adsorbents to minimize sample clean up in bioanalysis; *J. High Resol. Chromatogr.*; **2000**; *23*; 272-274.
- 88 S.A. Barker, A.R. Long, C.R. Short; Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion; *J. Chromatogr.*; **1989**; *475*; 353-361.
- 89 S.A. Barker; Matrix solid-phase dispersion; *J. Chromatogr. A*; **2000**; *885*; 115-127.
- 90 S.A. Barker; Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis; *J. Chromatogr. A*; **2000**; *880*; 63-68.
- 91 V.R. Meyer; in: *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*, Salle und Sauerländer Verlag, Frankfurt am Main, *8. Aufl.*, **1999**.
- 92 M. Vecchi, G. Englert, R. Maurer, V. Meduna; Separation and characterization of β -carotene isomers; *Helv. Chim. Acta*; **1981**; *281*; 2746-2758.
- 93 U. Hengartner, K. Bernhard, K. Meyer, G. Englert, E. Glinz; Synthesis, isolation, and NMR-spectroscopic characterization of fourteen (Z)-isomers of lycopene and of some acetylenic didehydro- and tetrahydrolycopenes; *Helv. Chim. Acta*; **1992**; *75*; 1848-1865.
- 94 F. Khachik, G. Englert, C.E. Daitch, G.R. Beecher, L.H. Tonucci, W.R. Lusby; Isolation and structural elucidation of the geometrical isomers of lutein and zeaxanthin in extracts from human plasma; *J. Chromatogr.*; **1992**; *582*; 153-166.
- 95 F. Khachik, G. Englert, G.R. Beecher, J.C. Smith, Jr.; Isolation, structural elucidation, and partial synthesis of lutein dehydration products in extracts from human plasma; *J. Chromatogr. B*; **1995**; *670*; 219-233.

- 96 L.C. Sander, K. Epler Sharpless, N.E. Craft, S.A. Wise; Development of engineered stationary phases for the separation of carotenoid isomers; *Anal. Chem.*; **1994**; *66*; 1667-1674.
- 97 M. Pursch, R. Brindle, A. Ellwanger, L.C. Sander, C.M. Bell, H. Händel, K. Albert; Stationary interphases with extended alkyl chains: a comparative study on chain order by solid-state NMR spectroscopy; *Solid State Nucl. Magn. Reson.*; **1997**; *9*; 191-201
- 98 C. Emenhiser, N. Simunovic, L.C. Sander, S.J. Schwartz; Separation of geometrical carotenoid isomers in biological extracts using a polymeric C30 column in reversed-phase liquid chromatography; *J. Agric. Food Chem.*; **1996**; *44*; 3887-3893.
- 99 C. Emenhiser, L.C. Sander, S.J. Schwartz; Capability of a polymeric C30 stationary phase to resolve *cis-trans* isomers in reversed-phase liquid chromatography; *J. Chromatogr. A*; **1995**; *707*; 205-216
- 100 L.C. Sander, M. Pursch, B. Märker, S.A. Wise; Separation of carotenoid isomers by capillary electrochromatography with C30 stationary phases; *Anal. Chem.*; **1999**; *71*; 3477-3483.
- 101 M. Raitza, J. Wegmann, S. Bachmann, K. Albert; Bestimmung der Oberflächenmorphologie von Triacetyl-Trennphasen über Spindiffusions-Festkörper-NMR-Untersuchungen; *Angew. Chem.*; **2000**; *112*; 3629-3632.
- 102 M. Raitza, M. Herold, G. Gauglitz, K. Albert; Solid-state NMR and ellipsometric investigation of C₃₀ chains bonded to SiO₂ surfaces; *Macromol. Chem. Phys.*; **2000**; *201*; 825-829.
- 103 K. Albert, T. Lacker, M. Raitza, M. Pursch, H.-J. Egelhaaf, D. Oelkrug; Untersuchungen zur Selektivität von Triacetylinterphasen; *Angew. Chem.*; **1998**; *110*; 809-812.
- 104 K. Albert; Correlation between chromatographic and physicochemical properties of stationary phases in HPLC: C₃₀ bonded reversed phase silica; *TRAC - Trends Anal. Chem.*; **1998**; *17*, 648-658.
- 105 M. Pursch, L.C. Sander, K. Albert; Understanding reversed-phase LC with solid-state NMR; *Anal. Chem.*; **1999**; *71*; 733-741.
- 106 S. Strohschein, M. Pursch, D. Lubda, K. Albert; Shape selectivity of C₃₀ phases for RP-HPLC separation of tocopherol isomers and correlation with MAS NMR data from suspended stationary phases; *Anal. Chem.*; **1998**; *70*; 13-18.
- 107 S. Allenmark, V. Schurig; Chromatography on chiral stationary phases; *J. Mater. Chem.*; **1997**; *7*; 1955-1963.
- 108 T. Maoka, A. Arai, M. Shimizu, T. Matsuno; The first isolation of enantiomeric and *meso*-zeaxanthin in nature; *Comp. Biochem. Physiol.*; **1986**; *83B*; 121-124.
- 109 R.A. Bone, J.T. Landrum, L.M. Friedes, C.M. Gomez, M.D. Kilburn, E. Menendez, I. Vidal, W. Wang; Distribution of lutein and zeaxanthin stereoisomers in the human retina; *Exp. Eye Res.*; **1997**; *64*; 211-218.
- 110 A. Rüttimann, K. Schiedt, M. Vecchi; Separation of (3*R*,3*R'*)-, (3*R*,3'*S*; *meso*)-, (3*S*,3'*S*)-zeaxanthin, (3*R*,3'*R*,6'*R*)-, (3*R*,3'*S*,6'*S*)- and (3*S*,3'*S*,6'*S*)-lutein via the dicarbamates of (*S*)-(+)- α -(1-naphthyl) ethyl isocyanate; *J. High Resol. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*; **1983**; *6*; 612-616.
- 111 B.F. Lutnaes, O.R. Gautun, S. Liaaen-Jensen; Is (9*Z*)-, *meso*-zeaxanthin optically active?; *Chirality*; **2001**; *13*; 224-229.
- 112 G. Britton; UV/visible spectroscopy; in: *Carotenoids Vol. 1b, Spectroscopy*, G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, Eds.; Birkhäuser Verlag Basel, Boston, Berlin; **1995**; Chapter 2; 13-62.
- 113 L.-Y. Zang, O. Sommerburg, F.J.G.M. van Kuijk; Absorbance changes of carotenoids in different solvents; *Free Radical Biol. Med.*; **1997**; *23*; 1086-1089.
- 114 W.D. Lehmann; in: *Massenspektrometrie in der Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag Berlin; *1. Aufl.*; **1996**.
- 115 H. Budzikiewicz; in: *Massenspektrometrie*, VCH Verlag; *3. Aufl.*; **1992**.
- 116 R.B. van Breemen; Liquid Chromatography/Mass Spectrometry of carotenoids; *Pure Appl. Chem.*; **1997**; *69* (10); 2061-2066.
- 117 M. Careri, A. Mangia, M. Musci; Overview of the applications of liquid chromatography-mass spectrometry interfacing systems in food analysis: naturally occurring substances in food; *J. Chromatogr. A*; **1998**; *794*; 263-297.
- 118 S. Strohschein, C. Rentel, T. Lacker, E. Bayer, K. Albert; Separation and identification of tocotrienol isomers by HPLC-MS and HPLC-NMR coupling; *Anal. Chem.*; **71**; 1999; 1780-1785.
- 119 D. Zeeb, B. Nelson, K. Albert, J. Dalluge; Separation and identification of 12 catechins in tea using liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization - mass spectrometry; *Anal. Chem.*; **2000**; *72*; 5020-5026.

- 120 F.D.P. Andrade, M. Dachtler, T. Glaser, L.C. Santos, K. Albert, W. Vilegas; A quick identification of glycosylated flavonoids from *Sorocea Bomplandii* Baill. (Moraceae) by HPLC-MS coupling and HPLC-NMR coupling; *Phytochem.*; zur Veröffentlichung eingereicht.
- 121 R.B. van Breemen; Electrospray Liquid Chromatography - Mass Spectrometry of carotenoids; *Anal. Chem.*; **1995**; *67*; 2004-2009.
- 122 C. Rentel, S. Strohschein, K. Albert, E. Bayer; Silver-plated vitamins: a method of detecting tocopherols and carotenoids in LC/ESI-MS coupling; *Anal. Chem.*; **70**; *1998*; 4394-4440.
- 123 R.B. van Breemen, C.-R. Huang, Y. Tan, L.C. Sander, A.B. Schilling; Liquid Chromatography/Mass Spectrometry of carotenoids using Atmospheric Pressure Chemical Ionization; *J. Mass Spectrom.*; **1996**; *31*; 975-981.
- 124 T. Glaser; Diplomarbeit; Universität Tübingen; **1999**.
- 125 G. Tang, B.A. Andrien, G.G. Dolnikowski, R.M. Russell; Atmospheric pressure chemical ionization and electron capture negative chemical ionization mass spectrometry in studying β -carotene conversion to retinol in humans; in: *Methods in Enzymology, Vitamines and Coenzymes, Part L*; **1997**; *282*; 140-154.
- 126 M. Dachtler, T. Glaser, K. Kohler, K. Albert; Combined HPLC-MS and HPLC-NMR on-line coupling for the separation and determination of lutein and zeaxanthin stereoisomers in spinach and in retina; *Anal. Chem.*; **2001**; *73*; 667-674.
- 127 T. Lacker, S. Strohschein, K. Albert; Separation and identification of various carotenoids by C_{30} reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with UV and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection; *J. Chromatogr. A*; **1999**; *854*; 37-44.
- 128 T. Hagiwara, T. Yasuno, K. Funayama, S. Suzuki; Determination of lycopene, α -carotene and β -carotene in serum by liquid chromatography - atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry with selected-ion monitoring; *J. Chromatogr. B*; **1998**; *708 (1,2)*; 67-73.
- 129 E.M. Purcell, H.C. Torrey, R.V. Pound; *Phys. Rev.*; **1946**; *69*; 37.
- 130 F. Bloch, W.W. Hansen, M. Packard; *Phys. Rev.*; **1946**; *69*; 127.
- 131 R.R. Ernst, W.A. Anderson; Application of fourier transform spectroscopy to magnetic resonance; *Rev. Sci. Instr.*; **1966**; *37*; 93-102.
- 132 E. Bayer, K. Albert, M. Nieder, E. Grom, T. Keller; On-line coupling of high-performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance; *J. Chromatogr. A*; **1979**; *186*; 497-507.
- 133 N. Watanabe, E. Niki; Direct-coupling of FT-NMR to high performance liquid chromatography; *Proc. Jpn. Acad. Ser. B*; **1978**; *54*; 194-199.
- 134 J.F. Haw, T.E. Glass, D.W. Hausler, E. Motell, H.C. Dorn; Direct coupling of a liquid chromatograph to a continuous flow hydrogen nuclear magnetic resonance detector for analysis of petroleum and synthetic fuels; *Anal. Chem.*; **1980**; *52*; 1135-1140.
- 135 J.-L. Wolfender, K. Ndjoko, K. Hostettmann; The potential of LC-NMR in phytochemical analysis; *Phytochem. Anal.*; **2001**; *12*; 2-22.
- 136 G. Bringmann, C. Guenther, J. Schlauer, M. Rueckert; HPLC-NMR online coupling including the ROESY technique: direct characterization of naphthylisoquinoline alkaloids in crude plant extracts; *Anal. Chem.*; **1998**; *70*; 2805-2811.
- 137 J.A. de Koning, A.C. Hogenboom, T. Lacker, S. Strohschein, K. Albert, U.A.T. Brinkman; On-line trace enrichment in hyphenated liquid chromatography - nuclear magnetic resonance spectroscopy; *J. Chromatogr. A*; **1998**; *813*; 55-61.
- 138 K. Albert, G. Schlotterbeck, U. Braumann, H. Händel, M. Spraul, G. Krack; Strukturbestimmung von Vitamin A-Acetat-Isomeren mit HPLC- ^1H -NMR-Kopplung; *Angew. Chem.*; **1995**; *107*; 1102-1104.
- 139 K. Albert, M. Dachtler, T. Glaser, H. Händel, T. Lacker, G. Schlotterbeck, S. Strohschein, L.-H. Tseng, U. Braumann; On-line coupling of separation techniques to NMR; *J. High Resol. Chromatogr.*; **1999**; *22*; 135-143.
- 140 J.C. Lindon, J.K. Nicolson, I.D. Wilson; Directly coupled HPLC-NMR and HPLC-NMR-MS in pharmaceutical research and development; *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*; **2000**; *748*; 233-258.
- 141 J.C. Lindon, J.K. Nicolson, J.R. Everett; NMR spectroscopy of biofluids; *Annu. Rep. NMR Spectrosc.*; **1999**; *38*; 1-88.
- 142 K. Levsen, A. Preiss, M. Godejohann; Application of high-performance liquid chromatography coupled to nuclear magnetic resonance and high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry to

- complex environmental samples; *TrAC Trends Anal. Chem.*; **2000**; *19*; 27-48.
- 143 J.C. Lindon, J.K. Nicholson, U.G. Sidelmann; I.D. Wilson; Directly coupled HPLC-NMR and its application to drug metabolism; *Drug Metabol. Rev.*; **1997**; *29*; 705-746.
- 144 U.G. Sidelmann, I. Bjornsdottir, J.P. Shockcor, S.H. Hansen, J.C. Lindon, J.K. Nicholson; Directly coupled HPLC-NMR and HPLC-MS approaches for the rapid characterisation of drug metabolites in urine: application to the human metabolism of naproxen; *J. Pharm. Biomed. Anal.*; **2001**; *24*; 569-579.
- 145 K. Albert; Liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy; *J. Chromatogr. A*; **1999**; *856*; 199-211.
- 146 J.C. Lindon, J.K. Nicholson, I.D. Wilson; The development and application of coupled HPLC-NMR spectroscopy; *Adv. Chromatogr.*; **1996**; *36*; 315-382.
- 147 S. Strohschein, M. Pursch, K. Albert; Hyphenation of high performance liquid chromatography with nuclear magnetic resonance spectroscopy for the characterization of β -carotene isomers employing a C₃₀ phase; *J. Pharm. Biomed. Anal.*; **1999**; *21*; 669-677.
- 148 S. Strohschein, M. Pursch, H. Händel, K. Albert; Structure elucidation of β -carotene isomers by HPLC-NMR coupling using a C₃₀ bonded phase; *Fresenius J. Anal. Chem.*; **1997**; *357*; 498-502.
- 149 K. Albert; LC-NMR-Kopplung; in: *Analytiker-Taschenbuch Vol. 20*, H. Günzler, Ed., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York; **1998**; 107-139.
- 150 T. Glaser, K. Albert; Unequivocal structural assignment of steroids in galenic emulsions employing HPLC-NMR coupling; *J. Sep. Science*; im Druck.
- 151 W. Vilegas, J.H.Y. Vilegas, M. Dachtler, T. Glaser, K. Albert; Application of on-line C₃₀ RP-HPLC-NMR for the analysis of flavonoids from leaf extract of maytenus aquifolium; *Phytochem. Anal.*; **2000**; *11(5)*; 317-321.
- 152 K. Pusecker, K. Albert, E. Bayer; Investigation of hop and beer bitter acids by coupling of high-performance liquid chromatography to nuclear magnetic resonance spectroscopy; *J. Chromatogr. A*; **1999**; *836*; 245-252.
- 153 M. Dachtler, H. Händel, T. Glaser, D. Lindquist, R.M. Hawk, C.N. Karson, R.A. Komoroski, K. Albert; Identification of trifluoperazine metabolites using HPLC-NMR of test mixtures; *Magn. Reson. Chem.*; **2000**; *38(11)*; 951-956.
- 154 B. Görlach, M. Dachtler, T. Glaser, K. Albert, M. Hanack; Synthesis and separation of structural isomers of 2(3),9(10),16(17),23(24)-tetrasubstituted phthalocyanines; *Chem. Eur. J.*; **2001**; *7(11)*; 2459-2465.
- 155 M. Dachtler, T. Glaser, H. Händel, T. Lacker, L.-H. Tseng, K. Albert; Nuclear magnetic resonance detectors; in: *Encyclopedia of Separation Science*, I.D. Wilson, E.R. Adlard, M. Cooke, C.F. Poole, Eds.; Academic Press Ltd., London; **2000**; *Level II*; 747-760.
- 156 P. Molnar, J. Szabolcs; (Z/E)-Photoisomerization of C40-carotenoids by iodine; *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.*; **1993**; *2*; 261-266.
- 157 T. Glaser, M. Dachtler, K. Albert; Untersuchung von Carotinoid-Stereoisomeren in Spinat und in der Retina mittels HPLC-NMR und HPLC-MS-Kopplung; *GIT Labor-Fachz.*; **1999**; *43(9)*; 904-909.
- 158 USDA-NCC carotenoid database for U.S. foods; **1998**; aus:
<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/car98/car98.html>
- 159 T. Glaser, M. Dachtler, K. Kohler, K. Albert; Artifact-free analysis of carotenoid stereoisomers in spinach employing MSPD coupled to on-line HPLC-APCI-MS and HPLC-NMR; *Eur. J. Nutr.*, zur Veröffentlichung eingereicht.
- 160 M. Dachtler, T. Glaser, K. Kohler, K. Albert; Was gibt es neues vom Spinat? Qualitative und Quantitative Untersuchung von Lutein und Zeaxanthin Stereoisomeren; in: *Pro Retina Info-Serie Nr. 14: Forschungsbericht 2000*, E. Gusseck, R. von Gizycki, Eds.; Pro Retina e.V., Aachen; **2000**; *14*; 88-93.
- 161 T. Glaser, K. Albert; Hyphenation of modern extraction techniques to LC-NMR for the analysis of geometrical carotenoid isomers in functional food and biological tissues; in: *On-line LC-NMR and related techniques*, K. Albert, Ed.; John Wiley & Sons Inc., Chichester; *Kap. 5.3*; im Druck.
- 162 K.-J. Yeum, S.L. Booth, J.A. Sadowski, C. Liu, G. Tang, N.I. Krinsky, R.M. Russell; Human plasma carotenoid response to the ingestion of controlled diets high in fruits and vegetables; *Am. J. Clin. Nutr.*; **1996**; *64*; 594-602.
- 163 G. Sandmann, M. Albrecht, G. Schnurr, O. Knorzer, P. Boger; The biotechnological potential and design of novel carotenoids by gene combination in *Escherichia coli*; *Trends Biotechnol.*; **1999**; *17*; 233-237.
- 164 J. Breitenbach, M. Kuntz, S. Takaichi, G. Sandmann; Catalytic properties of an expressed and purified

- higher plant type ζ -carotene desaturase from *Capsicum annuum*; *Eur. J. Biochem.*; **1999**; 265; 376-383.
- 165 N.M. Maier, G. Uray, O.P. Kleidernigg, W. Lindner; Diphenylethanediamine (DPEDA) derivatives as chiral selectors: IV. A comparison of 3,5-dinitrobenzoylated (S,S)- and (S,R)-DPEDA-derived chiral stationary phases with Pirkle's standard (R)-phenylglycine-derived phase in normal phase HPLC; *Chirality*; **1994**; 6; 116-28.
- 166 M. Lammerhofer, W. Lindner; Recent developments in liquid chromatographic enantioseparation; in: *Handb. Anal. Sep.*, Vol. 1: Separation Methods in Drug Synthesis and Purification; **2000**; 337-437.
- 167 H. Müller, A. Bub, B. Watzl, G. Rechkemmer; Plasma concentrations of carotenoids in healthy volunteers after intervention with carotenoid-rich foods; *Eur. J. Nutr.*; **1999**; 38; 35-44.
- 168 G.J. Handelman Z.D. Nightingale, A.H. Lichtenstein, J.B. Blumberg; Lutein and zeaxanthin concentrations in plasma after dietary supplementation with egg yolk; *Am. J. Clin. Nutr.*; **1999**; 70; 247-251.
- 169 M.A. Grusak; Intrinsic stable isotope labeling of plants for nutritional investigations in humans; *Nutr. Biochem.*; **1997**; 8; 164-171.
- 170 R.A. Bone, J.T. Landrum, Z. Dixon, Y. Chen, C.M. Llerena; Lutein and zeaxanthin in the eyes, serum and diet of human suspects; *Exp. Eye Res.*; **2000**; 71; 239-245.
- 171 T.T.J.M. Berendschot, R.A. Goldbohm, W.A.A. Klöpping, J. van de Kraats, J. van Norel, D. van Norren; Influence of lutein supplementation on macular pigment, assessed with two objective techniques; *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*; **2000**; 41; 3322-3326.
- 172 P.S. Bernstein, M.D. Yoshida, N.B. Katz, R.W. McClane, W. Gellermann; Raman detection of macular carotenoid pigments in intact human retina; *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*; **1998**; 39; 2003-2011.
- 173 W. Schalch, P. Dayhaw-Barker, F. M. Barker, II; The carotenoids of the human retina; in: *Nutritional and environmental Influences on Vision*, A. Taylor, Ed.; CRC Press Boca Raton; **1999**; Kap. 20.
- 174 J.T. Landrum, R.A. Bone; Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment; *Arch. Biochem. Biophys.*; **2001**; 385 (1); 28-40.
- 175 D.M. Snodderly B.R. Hammond, Jr.; *In vivo* psychophysical assessment of nutritional and environmental influences on human ocular tissues: lens and macular pigment; in: *Nutritional and environmental Influences on Vision*, A. Taylor, Ed.; CRC Press Boca Raton; **1999**; Kap. 13.
- 176 P.S. Bernstein, F. Khachik, L.S. Carvalho, G.J. Muir, D.Y. Zhao, N.B. Katz; Identification and quantitation of carotenoids and their metabolites in the tissues of the human eye; *Exp. Eye Res.*; **2001**; 72; 215-223.
- 177 L.M. Rapp, S.S. Maple, J.H. Choi; Lutein and zeaxanthin concentrations in rod outer segment membranes from perifoveal and peripheral human retina; *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*; **2000**; 41; 1200-1209.
- 178 O. Sommerburg, W. Siems, J.S. Hurst, J.W. Lewis, D.S. Kliger, F.J.G.M. van Kuijk; Lutein and zeaxanthin are associated with photoreceptors in the human retina; *Curr. Eye Res.*; **1999**; 19; 491-495.
- 179 R.A. Bone, J.T. Landrum, S.T. Mayne, C.M. Gomez, S.E. Tibor, E.E. Twarowska; Macular pigment in donor eyes with and without AMD: a case-control study; *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*; **2001**; 42; 235-240.
- 180 J.T. Landrum, R.A. Bone, Y. Chen, C. Herrero, C.M. Llerena, E. Twarowska; Carotenoids in the human retina; *Pure Appl. Chem.*; **1999**; 71; 2237-2244.
- 181 M. Dachtler, K. Kohler, K. Albert; Reversed-phase high-performance liquid chromatographic identification of lutein and zeaxanthin stereoisomers in bovine retina using a C₃₀ bonded phase; *J. Chromatogr. B*; **1998**; 720; 211-216.
- 182 S. Duke-Elder; The eye in evolution; in: *System of Ophthalmology, Vol. I*, Henry Kimpton Publishers London; 3. Aufl.; **1976**; 400.
- 183 K. Kohler, E. Guenther, E. Zrenner; Tiermodelle in der Retinitis-pigmentosa-Forschung; *Klin. Monatsb. Augenheilkd.*; **1997**; 211; 84-93.
- 184 R.A. Bone, J.T. Landrum, S.T. Mayne, C.M. Gomez, S.E. Tibor, E.E. Twarowska; Macular pigment in donor eyes with and without AMD: a case-control study; *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*; **2001**; 42; 235-240.

Meine akademischen Lehrer waren:

K. Albert, E. Bayer, D. Christen, H. Eckstein, G. Gauglitz, W. Göpel, G. Häfelinger, H. Hagenmaier, M. Hanack, D. Hoffmann, V. Hoffmann, W. Jäger, G. Jung, S. Kemmler-Sack, W. Koch, K. Kohler, D. Krug, N. Kuhn, E. Lindner, M. E. Maier, H. A. Mayer, H. J. Meyer, U. Nagel, H. Oberhammer, D. Oelkrug, G. Pausewang, H. Pommer, V. Schurig, E. Schweda, F. F. Seelig, B. Speiser, H. Stegmann, J. Strähle, W. Voelter, K.-P. Zeller, C. Ziegler

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Tobias Glaser
Geburtsdatum, -ort 15. April 1972, Tübingen
Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung

1978 - 1982 Grundschulen in Kilchberg und Weilheim
1982 - 1991 Carlo-Schmid-Gymnasium, Tübingen
11.06.1991 Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/1991 - 12/1998 Studium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen,
Fachrichtung Chemie, Diplom
22.03.1994 Vordiplom in Chemie
06/1998 - 01/1999 Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie der Eberhard-
Karls-Universität Tübingen unter der Anleitung von Prof. Dr.
Klaus Albert zum Thema „Qualitative und quantitative
Untersuchungen zur Anreicherung und Strukturbestimmung
von Carotinoid-Stereoisomeren aus biologischen Proben“
04.01.1999 Diplom in Chemie
01/1999 - 12/2001 Promotion am Institut für Organische Chemie der Eberhard-
Karls-Universität Tübingen unter der Anleitung von Prof. Dr.
Klaus Albert zum Thema „Bioverfügbarkeit von Carotinoiden
und deren Metabolisierung in Serum und Retina: Anwendung
von HPLC-NMR- und HPLC-APCI-MS-Kopplung“
10/1999 - 09/2000 Stipendiat des *fortune*-Programmes (**F**orschungsprogramm der
Tübinger Medizinischen Fakultät)
07/2000 - 09/2000 Forschungsaufenthalt in der Arbeitsgruppe Dr. R.M. Russell am
Jean Mayer USDA Human Nutrition Research Center on Aging
(HNRCA) at Tufts University, Boston, MA, USA