

**Untersuchungen zur
Anreicherung und Bioverfügbarkeit
von biologisch aktiven Substanzen unter Anwendung
der HPLC-NMR- und der HPLC-MS-Kopplung**

DISSERTATION

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

2003

vorgelegt von
Annette Lienau

Tag der mündlichen Prüfung: 17. April 2003

Dekan: Professor Dr. H. Probst

1. Berichterstatter: Professor Dr. K. Albert
2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Ziegler
3. Berichterstatter: Professor Dr. S. Berger

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. Klaus Albert im Zeitraum von Januar 2001 bis März 2003 durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Klaus Albert danke ich sehr herzlich für die spannende Themenstellung, für sein Interesse an meiner Arbeit sowie für die Bereitstellung der optimalen Ausstattung zur Durchführung dieser Arbeit. Darüber hinaus ermöglichte er die Vertiefung meines Wissens durch einen Forschungsaufenthalt in den USA und die Teilnahme an zahlreichen nationalen und internationalen Tagungen.

Mein Dank gilt allen Freunden, Kollegen und Kooperationspartnern, die durch ihre ständige Unterstützung erst die erfolgreiche Fertigstellung der vorliegenden Arbeit ermöglicht haben. Besonders bedanke ich mich bei:

Manfred Krucker für die tolle Zusammenarbeit, die unzähligen wissenschaftlichen und außeruniversitären Diskussionen sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Dr. Tobias Glaser für das Einarbeiten in die Thematik der Analytik bioaktiver Substanzen und seine stetigen fachlichen Anregungen, die dankbar aufgenommen wurden.

Meinen Kollegen Karsten Putzbach, Daniel Zeeb, Gerd Fischer, Dr. Heidi Händel, Dr. Urban Skogsberg und Christoph Meyer für die große Hilfsbereitschaft bei allen Fragen und Problemen, sowohl fachlicher als auch organisatorischer Natur, und das freundschaftliche Arbeitsklima.

Dr. Elke Gesele, Norbert Welsch und Prof. Hong-Bin Xiao für die Zusammenarbeit und das kollegiale Arbeitsklima.

Den ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Albert, Dr. Markus Dachtler, Dr. Christine Hellriegel, Dr. Holger Fischer, Dr. Stefan Bachmann, Dr. Jürgen Wegmann, Alexandre Schefer und Christel Wolf, die mich geduldig und hilfsbereit eingearbeitet haben.

Den Mitarbeitern der NMR-Abteilung, allen voran Paul Schuler, für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung von NMR-Experimenten.

Prof. Konrad Kohler für die Präparation unzähliger Retinen, die Durchführung der Fütterungsexperimente und den unermüdlichen Wissenstransfer.

Dr. Guangwen Tang, Dr. Norman Krinsky, Dr. Robert Russell und Jian Qin vom Human Nutrition Research Center der Tufts University, Boston, USA, für die Gastfreundschaft, die hervorragende Betreuung und die Bereitstellung der Serumproben im Rahmen der Bioverfügbarkeitsstudie.

Dr. Ulrich Braumann und Dr. Li-Hong Tseng von Bruker Biospin für die vertiefende Einarbeitung in die LC-NMR-Kopplung, sowie Dr. Petra Palloch von Bruker Saxonica für die Bereitstellung eines Esquire LC-MS-Systems.

Den Mitarbeitern des Instituts für Parodontologie und Zahnerhaltung der Universitätsklinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheit in Homburg für die Durchführung des klinischen Teils der Studie zur Anreicherung von Tocopherolen im Zahnfleisch.

Der Pro Retina Deutschland e.V. für die finanzielle Förderung meiner Doktorarbeit durch ein Stipendium.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder Frank für ihre uneingeschränkte Unterstützung während meines gesamten Studiums.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Problemstellung.....	5
3	Biologisch aktive Inhaltsstoffe in der Prävention.....	7
3.1	Tocopherole.....	7
3.1.1	Strukturen.....	7
3.1.2	Vorkommen und Synthese.....	9
3.1.3	Tocopherole in der Prävention.....	10
3.1.3.1	<i>Antioxidative Wirkung</i>	10
3.1.3.2	<i>Rolle der Tocopherole bei der Prävention von Krankheiten</i>	11
3.1.3.3	<i>Biologische Wirksamkeit</i>	12
	Exkurs: Zähne und Zahnpflege.....	14
3.2	Carotinoide.....	16
3.2.1	Strukturen.....	16
3.2.2	Vorkommen und Synthese.....	19
3.2.3	Carotinoide in der Prävention.....	21
3.2.3.1	<i>Allgemeines</i>	21
3.2.3.2	<i>Protektive Wirkung von Carotinoiden in der Retina</i>	23
3.2.4	Bioverfügbarkeit von Carotinoiden.....	26
4	Analytik von biologisch aktiven Inhaltsstoffen.....	29
4.1	Extraktion.....	29
4.1.1	Flüssig-Flüssig-Extraktion.....	29
4.1.2	Matrix Solid Phase Dispersion.....	30
4.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	32
4.2.1	Grundlagen.....	32
4.2.2	HPLC-UV-Kopplung von Carotinoiden und Tocopherolen.....	32
4.3	Kopplungsmethoden.....	34
4.3.1	HPLC-MS-Kopplung.....	34
4.3.2	HPLC-NMR-Kopplung.....	36
4.3.2.1	<i>Experimenteller Aufbau</i>	37

4.3.2.2 Anforderungen an die Chromatographie.....	39
4.4 Kapillarmethoden.....	42
4.4.1 Kapillar-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (μ HPLC).....	42
4.4.2 Miniaturisierte Kopplungsmethoden.....	43
5 Ergebnisse.....	45
5.1 Untersuchung von Tocopherolen in Zahncreme und Zahnfleisch.....	45
5.1.1 Design der Studie.....	45
5.1.2 Chromatographische Trennung der Tocopherole.....	46
5.1.3 Identifizierung der Tocopherol-Homologen mittels HPLC-NMR- Kopplung.....	47
5.1.4 Extraktion von Tocopherolen aus Zahncreme.....	51
5.1.5 Extraktion von Tocopherolen aus Zahnfleisch.....	53
5.1.6 Massenspektrometrische Untersuchungen von mit Tocopherol-haltiger Zahncreme behandeltem Zahnfleisch.....	57
5.2 Bioverfügbarkeit von Carotinoiden aus intrinsisch gelabeltem Gemüse. 60	60
5.2.1 Design der Studie.....	60
5.2.2 Aufzucht, Vorbereitung und Analyse des intrinsisch gelabelten Spinats. 62	62
5.2.3 Untersuchung der Anreicherung von Lutein aus partiell deuteriertem Spinat mittels HPLC-UV- und HPLC-APCI-MS-Kopplung.....	65
5.2.4 Berechnung der Anreicherung.....	68
5.2.5 Berechnung der absoluten Bioverfügbarkeit.....	70
5.3 Bestimmung der Anreicherung von Carotinoid-Isomeren in retinalem Gewebe durch Fütterungsexperimente.....	77
5.3.1 Design der Studie.....	77
5.3.2 Vergleich des Isomerpatterns in Hühnerretinen nach Fütterung mit Standardfutter oder Maisschrot.....	79
5.4 Miniaturisierung der analytischen Methoden.....	86
5.4.1 μ HPLC-Trennungen von Tocopherolen und Carotinoiden.....	86
5.4.2 Identifizierung der Tocopherol-Homologen mittels on-line μ HPLC- NMR-Kopplung.....	88

6 Experimenteller Teil.....	93
6.1 Geräte.....	93
6.1.1 HPLC-Anlagen.....	93
6.1.2 Massenspektrometer.....	93
6.1.3 NMR-Spektrometer.....	94
6.2 Chemikalien.....	94
6.3 Probenvorbereitung und Extraktion.....	95
6.3.1 Tocopherole.....	95
6.3.1.1 <i>Tocopherol-Standards</i>	95
6.3.1.2 <i>Extraktion von Tocopherolen aus Zahncreme</i>	95
6.3.1.3 <i>Extraktion von Tocopherolen aus Zahnfleisch</i>	96
6.3.2 Carotinoide.....	96
6.3.2.1 <i>Carotinoid-Standards</i>	96
6.3.2.2 <i>Zucht von intrinsisch gelabeltem Spinat und Extraktion der Carotinoide</i>	96
6.3.2.3 <i>Extraktion von Carotinoiden aus Serumproben</i>	97
6.3.2.4 <i>Extraktion von Carotinoiden aus retinalem Gewebe</i>	98
6.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.....	99
6.4.1 Säulen und Kapillaren.....	99
6.4.2 Chromatographische Bedingungen.....	99
6.4.2.1 <i>Bedingungen für die HPLC</i>	99
6.4.2.2 <i>Bedingungen für die μHPLC</i>	100
6.5 HPLC-MS-Experimente.....	101
6.6 HPLC-NMR-Experimente.....	101
6.6.1 HPLC-NMR-Kopplung.....	101
6.6.2 Hochauflösungs-NMR-Spektroskopie.....	101
6.6.3 μ HPLC-NMR-Kopplung.....	102
7 Zusammenfassung und Ausblick.....	103
8 Literatur.....	107

Abkürzungsverzeichnis

δ	chemische Verschiebung
1D	eindimensional
2D	zweidimensional
Å	Ångström
ACN	Acetonitril
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization (Chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck)
BMI	Body Mass Index
BPC	Base Peak Chromatogram
BPSU	Bruker Peak Sampling Unit
CI	chemische Ionisation
COSY	Correlated Spectroscopy
d	Tag
D ₃ COD	Methanol-d ₄
D ₂ O	Deuteriumoxid
ESI	Electrospray-Ionisierung
FID	Free Induction Decay (Freier Induktionsabfall)
FT	Fourier-Transformation
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HNRC	Human Nutrition Research Center
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
Hz	Hertz
K	Kelvin
LLE	Liquid Liquid Extraction (Flüssig-Flüssig-Extraktion)
m	Masse
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
MHz	Megahertz

min	Minuten
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
MSPD	Matrix Solid Phase Dispersion
μHPLC	Kapillar-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (magnetische Kernresonanzspektroskopie)
NP	Normal Phase
ppm	parts per million
RCS	Royal College of Surgeons
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
SIC	Selected Ion Chromatogram
T	Temperatur
TBME	tert. Butyl-methyl-ether
Toco	Tocopherol
USDA	Unites States Department of Agriculture (U.S. Landwirtschaftsministerium)
UV	Ultraviolett

1 Einleitung

In den letzten Jahren wurde die Aufmerksamkeit von Medizinern und Ernährungswissenschaftlern auf die sekundären Pflanzenwirkstoffe gelenkt. Der Grund hierfür liegt in der Tatsache, dass in vielen Fällen Korrelationen zwischen der vermehrten Aufnahme dieser Substanzen und einem geringeren Risiko, Volkskrankheiten wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen, degenerative Augenkrankheiten und verschiedene Arten von Krebs zu entwickeln, auftraten. Dabei rückten nicht nur die allgemein bekannten Vitamine in den Vordergrund, sondern auch weitere Substanzgruppen wie beispielsweise die Flavonoide und Carotinoide^[1-5].

Die gesundheitsfördernde Wirkung dieser Substanzen ist durch deren antioxidative Fähigkeiten bedingt. Dies bedeutet, dass sie die Zellen im menschlichen Körper vor oxidativem Stress schützen können, vom dem mittlerweile bekannt ist, dass er an der Progression von vielen Krankheiten beteiligt ist. Ausgelöst wird dieser durch freie Radikale, die durch Einwirkung der UV-Strahlung des Sonnenlichts entstehen. Antioxidantien sind nun in der Lage, als Radikalfänger zu fungieren und die freien Radikale zu binden und somit unschädlich zu machen. Darüber hinaus können sie durch Quenching schädlichen, sehr reaktiven Singulett-Sauerstoff deaktivieren^[6,7].

In zahlreichen klinischen und epidemiologischen Studien sind seither die antioxidativen Wirkungen der verschiedenen sekundären Pflanzenwirkstoffe *in vitro* und *in vivo* untersucht worden. Gleichzeitig wurde in Tierversuchen, durch Supplementierungsstudien oder lediglich die normalen Ernährungsgewohnheiten beobachtend ihre Rolle in der Prävention von diversen Krankheiten untersucht.

Die stärkste antioxidative Wirkung *in vitro* wurde für die Substanzklasse der Tocopherole gefunden, die zusammengefasst als Vitamin E bezeichnet werden. Vitamin E wurde 1922 als der Nahrungsfaktor, der bei Ratten die Trächtigkeit aufrecht erhält, entdeckt. In den letzten Jahren gewannen die Tocopherole vor allem durch ihre für den menschlichen Organismus günstigen Eigenschaften an Bedeutung. Insbesondere die protektiven Wirkungen bezüglich der Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Krebs und dem Altersprozeß im Allgemeinen spielen bei der Durchführung aktueller klinischer Studien eine entscheidende Rolle^[8].

Eine weitere Gruppe von sekundären Pflanzenwirkstoffen, die in der letzten Zeit in das Licht der Öffentlichkeit gerückt sind, sind die Carotinoide. Bis vor wenigen Jahren wurden sie, insbesondere ihr bekanntester Vertreter, das schon 1826 entdeckte β -Carotin, nur bezüglich ihrer Fähigkeit, durch Spaltung Vitamin A zu liefern, betrachtet. Es zeigte sich jedoch, dass auch die Carotinoide, die keinen Provitamin A-Charakter besitzen, aufgrund ihrer antioxidativen Fähigkeiten zur Prävention von Krankheiten beitragen können, welches zu einer Ausweitung der bestehenden Carotinoidforschung führte. Zur Zeit werden besonders die Wirkungen der Carotinoide gegen die Pathogenese von Krebs, koronaren Herzkrankheiten und degenerativen Augenerkrankungen untersucht^[9-11].

Die gewonnenen Erkenntnisse über die gesundheitsfördernden Wirkungen der sekundären Pflanzenwirkstoffe haben zu einer Diskussion geführt, welche Mengen an diesen Substanzen für eine optimale Versorgung täglich aufgenommen werden sollten. Dabei werden sowohl Supplementierungen mit Nahrungsergänzungsmitteln als auch die gezielte Ernährung mit sogenannten „Nutraceuticals“ (zusammengesetzt aus Nahrungsmittel, eng. nutrition, und Arzneimittel, eng. pharmaceutical), also Lebensmitteln, deren Bestandteile einen weiterführenden medizinischen oder gesundheitlichen Nutzen besitzen, in Betracht gezogen^[12]. Bevor aber für alle sekundären Pflanzenwirkstoffe Werte für den Tagesbedarf eines Menschen angegeben werden können, wie es bei den Vitaminen schon der Fall ist, ist es notwendig, zu bestimmen, in welchem Maße die aufgenommenen Substanzen überhaupt vom Körper absorbiert und am Wirkungsort angereichert werden^[13]. Neben dieser sogenannten Bioverfügbarkeit sind auch durch die Molekülstruktur bedingte Unterschiede in der biologischen Wirksamkeit zu bestimmen. Tocopherole treten beispielsweise als mehrere Homologe mit optischen Isomeren auf, während von den Carotinoiden neben optischen auch diverse geometrische (Z-/E-) Isomere existieren^[14,15].

Um die unterschiedlichen Strukturen und Isomere der jeweiligen Substanzklassen zu identifizieren und diese quantitativ zu bestimmen, ist eine moderne, maßgeschneiderte Analytik notwendig. Diese umfasst neben der sorgfältigen und schonenden Extraktion der zu untersuchenden Substanzen aus ihrer Matrix, beispielsweise Serum oder Gewebeproben, die Trennung und Strukturbestimmung aller Komponenten. Für

die Analytik von instabilen Substanzen wie den Tocopherolen und Carotinoiden, die aufgrund ihrer antioxidativen Wirkung licht- und luftempfindlich sind, hat sich die Kopplung der chromatographischen Trennmethode Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit einer spektroskopischen Technik zur Strukturaufklärung als Methode der Wahl entwickelt. Dabei findet die Kopplung mit der Massenspektrometrie (LC-MS-Kopplung) aufgrund ihrer hohen Sensitivität vor allem Anwendung bei limitierten Probenmengen^[16,17], während die HPLC-NMR-Kopplung bei der Strukturaufklärung unbekannter Substanzen viele wertvolle Informationen, auch bezüglich geometrischer Isomere, liefert^[18,19].

Der in biologischen Proben häufig geringen Analytmenge wird durch die Miniaturisierung der klassischen HPLC-NMR-Kopplung Rechnung getragen. Die Trennung erfolgt nun unter Verwendung einer Kapillar-Pumpe und gepackten Fused Silica-Säulen, während auf der Seite der NMR-Spektroskopie ein spezieller Kapillar-Probenkopf zum Einsatz kommt^[20,21].

2 Problemstellung

Das Ziel dieser Arbeit war es, mit analytischen Methoden die Anreicherung und Bioverfügbarkeit von sekundären Pflanzenwirkstoffen, insbesondere Tocopherolen und Carotinoiden, in biologischen Matrices zu bestimmen. Dabei galt es, die Analyten sowohl in der Nahrungsquelle bzw. dem Kosmetikum als auch am Wirkungsort nachzuweisen und eine Quantifizierung durchzuführen. Als Untersuchungsmethode wurde hierfür die chromatographische Trennmethode HPLC, zur Strukturaufklärung der Analyten in Kopplung mit der NMR-Spektroskopie und der Massenspektrometrie, verwendet.

Seit kurzem ist in Deutschland eine Zahncreme auf dem Markt, die Vitamin E (Tocopherole) enthält. Diese Tocopherole sollen durch ihre antioxidativen Fähigkeiten das Zahnfleisch vor Angriffen durch Endotoxine schützen und präventiv oder kurativ gegen Zahnfleischartzündungen wirken. Voraussetzung für die Entfaltung dieser Wirkung ist jedoch, dass die Tocopherole im Zahnfleisch angereichert werden. Um dies nachzuweisen, wurde in Zusammenarbeit mit der Zahnklinik der Universität des Saarlandes eine Studie durchgeführt, in der Zahnfleischproben von Probanden, welche die Tocopherol-haltige Zahncreme verwendet hatten, auf die Anreicherung mit Tocopherolen hin untersucht wurden. Die Identifizierung der verschiedenen Tocopherol-Homologen erfolgte dann mit Hilfe der HPLC-NMR-Kopplung.

Das Ziel einer zweiten Studie galt der Bestimmung der absoluten Bioverfügbarkeit von Carotinoiden, in diesem Fall Lutein. Bisher konnte nur die Höhe der Anreicherung der zu untersuchenden Carotinoide im menschlichen Serum nach einer Langzeit-Supplementierung nachgewiesen werden^[22]. In Kooperation mit dem Human Nutrition Research Center (HNRC) der Tufts University in Boston, USA, sollte nun die neuartige Methode der intrinsischen Markierung von Gemüse zur Bestimmung der absoluten Bioverfügbarkeit eingeführt werden. Dabei wurde ein Carotinoid-haltiges Gemüse, hier Spinat zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit von Lutein, in teildeutertem Wasser hydroponisch gezüchtet. Anschließend wurde der gelabelte Spinat einmalig von Probanden verzehrt, denen vor und in regelmäßigen Zeitabständen nach der Supplementierung Serumproben entnommen wurden. Unter

Verwendung der HPLC-MS-Kopplung sollte es dann möglich werden, das deuterierte Lutein aus dem gelabelten Spinat von dem endogenen Serum-Lutein zu differenzieren, welches schließlich die Berechnung der Bioverfügbarkeit von Lutein erlaubt.

Ein wichtiger Wirkungsort der Carotinoide Lutein und Zeaxanthin ist die Retina des menschlichen Auges. Dort verhindern sie aufgrund ihrer antioxidativen Fähigkeiten Schäden, die durch die eindringende UV-Strahlung resultieren können, und sind dabei insbesondere an der Prävention von altersbedingter Makuladegeneration (AMD) beteiligt. Nachdem erste klinische Studien eine inverse Korrelation zwischen der erhöhten Aufnahme an Lutein und Zeaxanthin und der Entstehung von AMD gezeigt haben, ist es nun interessant, die Anreicherung der beiden Carotinoide in der Retina über Fütterungsversuche zu verfolgen^[23].

Dabei ist jedoch zu beachten, dass Lutein und Zeaxanthin sowohl in der Nahrung als auch an ihrem Wirkungsort als mehrere geometrische Isomere vorliegen, die möglicherweise unterschiedlich stark angereichert werden. Diese Vermutung soll nun in einem Fütterungsexperiment genauer untersucht werden. Dazu wurden in der experimentellen Ophthalmologie der Universitäts-Augenklinik in Tübingen Hühner entweder mit Standardfutter oder mit Maisschrot gefüttert und die Isomerenpattern in den Retinen im Anschluß an die Supplementierung miteinander verglichen.

Da sich bei der Analytik von Proben biologischen Ursprungs oft das Problem ergibt, dass die zu untersuchenden Proben- und Analytmengen sehr gering sind, muß auch eine methodische Weiterentwicklung betrieben werden. Diese umfasst die Implementierung der für die analytischen Fragestellungen verwendeten HPLC-Trennungen auf einen miniaturisierten Maßstab. Darüber hinaus gilt es auch, die somit ermöglichte Trennmethode μ HPLC für die Strukturaufklärung von instabilen Substanzen mit der NMR-Spektroskopie zu koppeln. Zu diesem Zweck sollen erste Experimente der μ HPLC-NMR-Kopplung unter Verwendung eines neuen selenoiden Kapillar-Durchflußprobenkopfes durchgeführt werden.

3 Biologisch aktive Inhaltsstoffe in der Prävention

3.1 Tocopherole

3.1.1 Strukturen

Die Tocopherole, auch als Vitamin E bezeichnet, wurden 1922 durch Evans und Bishop entdeckt. Eine erste Isolierung und Strukturbestimmung von α -Tocopherol wurde 1938 von Fernholz durchgeführt^[24,25].

Tocopherole sind Derivate von 6-Chromanol mit einer gesättigten Phytylseitengruppe. Es existieren mehrere Homologe, die sich in der Anzahl und Position der Methylgruppen am aromatischen Ring unterscheiden. Das wichtigste Tocopherol ist das α -Tocopherol, welches am aromatischen Ring in 5-, 7- und 8-Stellung Methylgruppen besitzt. Darüber hinaus existieren β - und γ -Tocopherol, die jeweils zweifach methyliert sind, ersteres in 5- und 8- Position, letzteres in 7- und 8-Stellung. δ -Tocopherol trägt nur einen Methylsubstituenten in 8-Position^[26].

Neben den klassischen Tocopherol-Homologen sind noch zwei weitere Tocopherol-Derivate von Bedeutung. Dies ist zum Einen das am aromatischen Ring vollkommen unsubstituierte Tocol, das in der Chromatographie häufig als interner Standard Verwendung findet. Auf der anderen Seite ist α -Tocopherolacetat als ein weiteres wichtiges Derivat zu beachten. Aufgrund der Veresterung der Hydroxylgruppe ist die Oxidationsanfälligkeit vermindert, welches die Stabilität des Moleküls erhöht und dazu führt, dass α -Tocopherolacetat bevorzugt in der Industrie Verwendung findet. Im Körper wird das α -Tocopherolacetat dann durch Hydrolyse zu α -Tocopherol umgewandelt. Alle wichtigen Tocopherol-Homologen und deren Derivate sind zusammenfassend in Abbildung 1 dargestellt.

Die Tocopherole besitzen jeweils drei stereogene Zentren an den Kohlenstoffatomen C2, C4' und C8', woraus sich acht mögliche Stereoisomere ergeben. In der Natur kommen dabei nur Isomere mit der Konfiguration 2R, 4'R, 8'R vor, während der Synthese (vgl. Kapitel 3.1.2) werden jedoch auch 2-epi-Tocopherole gebildet, die die Konfiguration 2S, 4'R, 8'R haben^[2].

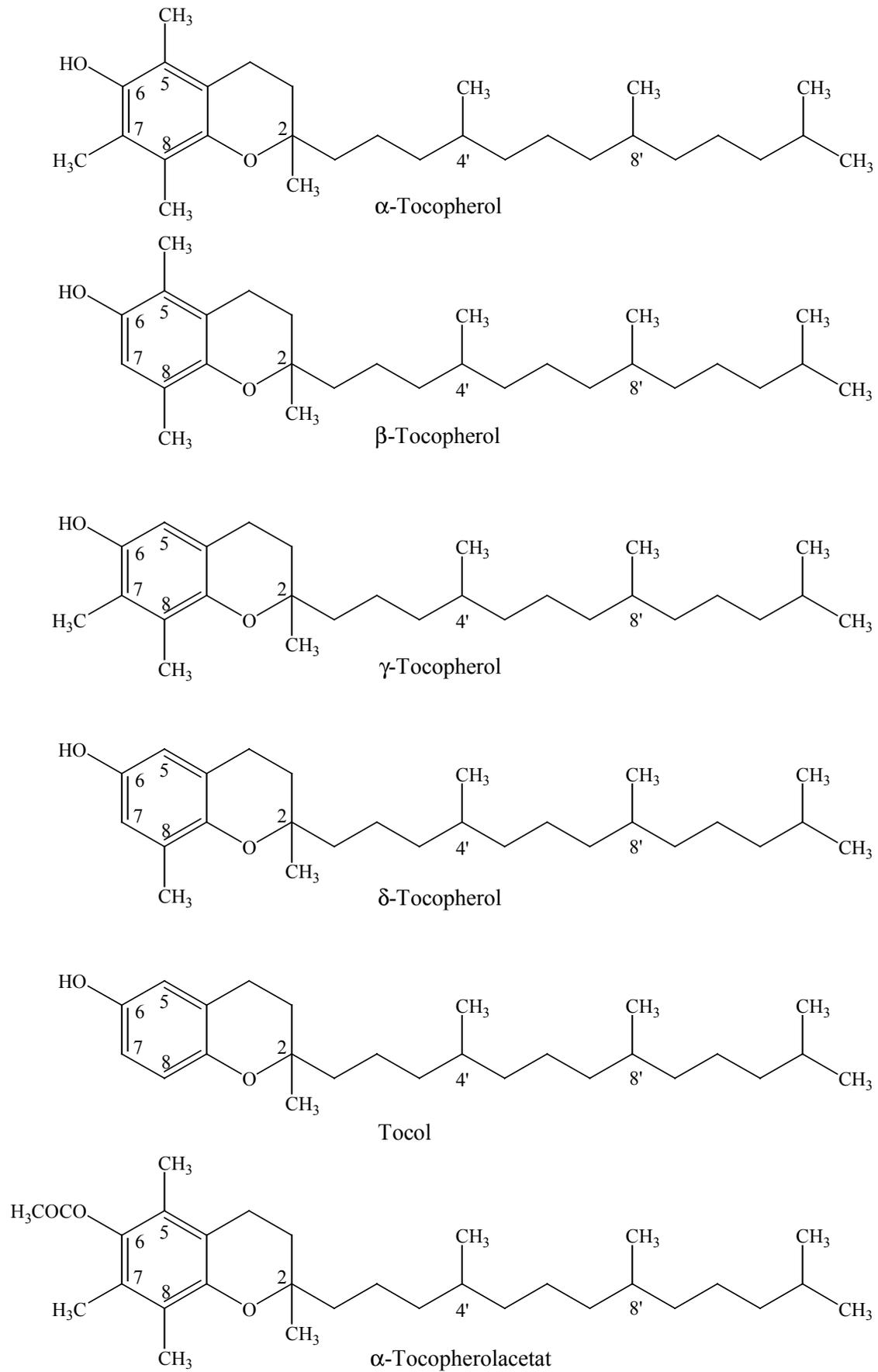


Abbildung 1: Strukturen der Tocopherole

3.1.2 Vorkommen und Synthese

Natürliche Quellen für Tocopherole sind vor allem pflanzliche Öle wie Baumwollsaatöl, Maiskeimöl, Weizenkeimöl und Erdnussöl. Die Anteile an den verschiedenen Tocopherol-Homologen sind dabei unterschiedlich, Weizenkeimöl enthält beispielsweise fast ausschließlich α -Tocopherol, während Maiskeimöl einen hohen Anteil an γ -Tocopherol besitzt.

Desweiteren sind größere Mengen an Tocopherolen in Erdnüssen, getrockneten Sojabohnen, Weizenkeimlingen und Margarine zu finden, die meisten Obst- und Gemüsesorten sowie Fleischprodukte sind relativ arm an Tocopherolen. Im menschlichen Körper sind Tocopherole überwiegend in Fettgewebe, Leber und Muskeln vorhanden, wo sie nach Aufnahme und Resorption gespeichert werden^[27,28].

Die Biosynthese von Tocopherolen ist in Abbildung 2 dargestellt. Sie erfolgt in den Chloroplasten höherer Pflanzen und Algen über 4-Hydroxyphenyl-pyruvatsäure und Homogentisinsäure, wobei zunächst δ -Tocopherol entsteht. Durch zusätzliche Methylierungen werden daraus die α -, β - und γ -Homologen gebildet^[29].

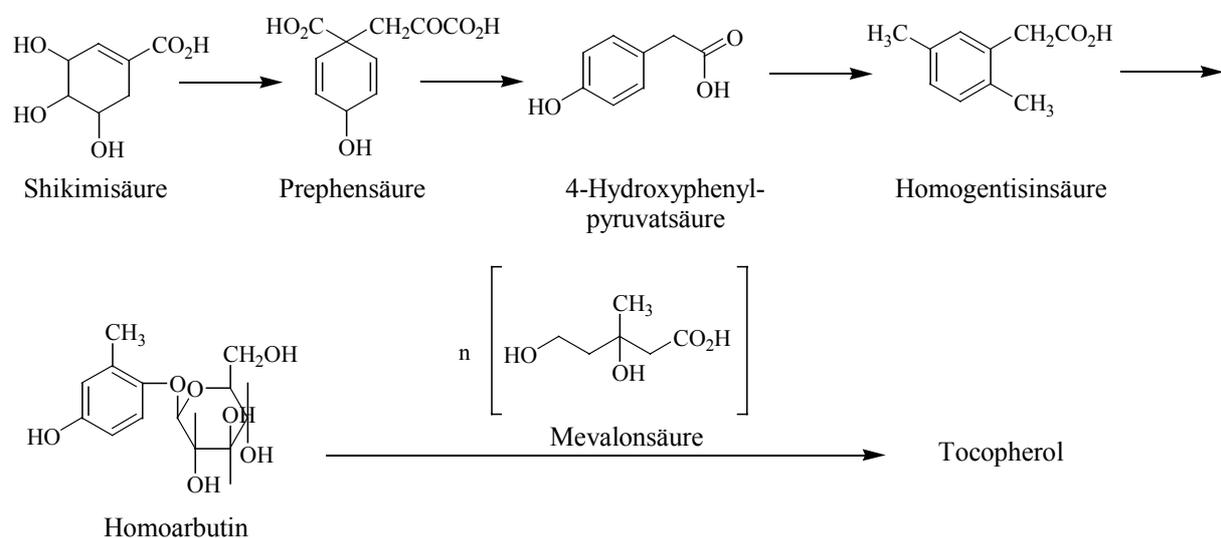


Abbildung 2: Vereinfachtes Schema der Tocopherol-Biosynthese

Die erste Tocopherol-Synthese wurde 1938 von Karrer vorgestellt, der eine Kondensation von Trimethylhydrochinon mit dem Isoprenoid-Rest eines natürlichen Phytols durchführte. Dabei entstand ein Gemisch aus RRR- α -Tocopherol und seinem

Diastereomer 2-epi- α -Tocopherol, genannt 2-ambo- α -Tocopherol. Bei der Total-synthese durch Kopplung von Trimethylhydrochinon mit synthetischem Isophytol dagegen entsteht all-rac- α -Tocopherol, da in diesem Fall auch die Konfigurationen der Seitenkette nicht festgelegt sind^[30,31].

3.1.3 Tocopherole in der Prävention

3.1.3.1 Antioxidative Wirkung^[7,32-34]

Tocopherole können als wichtige Antioxidantien im menschlichen und tierischen Organismus gefunden werden. Dort kommen sie vor allem in den fettreichen Teilen der Zellen, wie Zellmembranen und Fettspeichern vor, wo sie die mehrfach ungesättigten Fettsäuren (poly unsaturated fatty acid, PUFA) vor Lipid-Oxidation schützen. Der Mechanismus ist in Abbildung 3 dargestellt.

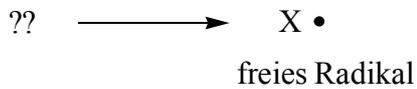
Bei Anwesenheit von freien Radikalen, die durch Bestrahlung, bei der anaeroben Glycolyse oder als natürliches Abwehrsystem gegen Pathogene gebildet werden, kann einem Lipidmolekül ein Proton abstrahiert werden. Das entstehende Alkylradikal ist sehr reaktiv und reagiert sofort mit einem Sauerstoffmolekül zu einem Peroxyradikal weiter. Dieses kann nun im Sinne einer Kettenreaktion einem weiteren Lipidmolekül ein Proton entfernen oder eine Kettenabbruchreaktion unter Dimerisierung mit einem anderen Peroxyradikal eingehen.

Tocopherole sind nun in der Lage, die Lipid-Oxidation in Lebensmitteln und biologischen Systemen zu hemmen, indem sie ihr phenolisches Proton an entstandene Lipidradikale abgeben. Es bildet sich ein Chromanoxyl-Radikal, welches in einem zweiten Schritt mit einem weiteren Lipidradikal zu einem nicht-radikalischen Addukt reagiert. Ein Tocopherol-Molekül ist somit in der Lage, zwei Lipidradikale zu vernichten.

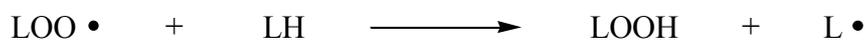
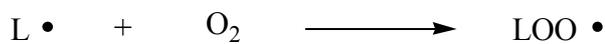
In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass synergistische Effekte beim Zusammenwirken verschiedener Antioxidantien auftreten, das bedeutet, dass die antioxidative Wirkung der kombinierten Antioxidantien größer ist als die Summe der Einzeleffekte. Hervorzuheben ist insbesondere die Kombination von Tocopherolen mit

Vitamin C, Glutathionen oder Coenzym Q, da diese Stoffe in der Lage sind „verbrauchtes“ Tocopherol zu regenerieren.

Kettenstart



Kettenfortpflanzung



Kettenabbruch



Abbildung 3: Mechanismus der Lipid-Oxidation

3.1.3.2 Rolle der Tocopherole bei der Prävention von Krankheiten

In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass die Lipid-Oxidation eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung von Volkskrankheiten wie Krebs, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und dem Alterungsprozess im Allgemeinen spielt. Aus diesem Grund sollte die Anwesenheit von Antioxidantien wie den Tocopherolen zur Inhibition der Lipid-Oxidation für die Prävention oder sogar die Heilung von Krankheiten von großer Wichtigkeit sein^[35].

Diese Schlussfolgerung war in der letzten Zeit Subjekt zahlreicher klinischer und epidemiologischer Studien. Dabei zeigte sich, dass eine höhere Aufnahme oder sogar Supplementierung (z.B. gezeigt in der Cambridge Heart Antioxidant Study) mit Tocopherolen mit einem geringeren Risiko, Herzkranzgefäßerkrankungen zu

entwickeln oder einen Herzinfarkt zu bekommen, einhergeht. Darüber hinaus wurde herausgefunden, dass entzündliche Prozesse, beispielsweise hervorgerufen durch Ablagerungen bei Arthosklerose, durch Tocopherole eingedämmt werden^[36,37].

Der Alpha-Tocopherol Beta-Carotene Cancer Prevention Trial (ATBC) konnte bei der Supplementierung mit Tocopherolen im Gegensatz zur Verwendung von anderen Antioxidantien auch positive Effekte für Raucher entdecken. Deren Risiko, an Herzkrankgefäßerkrankungen oder Tumoren, wie Lungen- oder Prostata-Krebs, zu erkranken, wird bei Supplementierung mit Tocopherolen gesenkt^[9,38-40].

Auch bei einer vorliegenden moderat ausgeprägten Alzheimer-Erkrankung hat die erhöhte Gabe von Tocopherolen positive Wirkung, da das Fortschreiten der Krankheit deutlich verlangsamt wird^[41].

3.1.3.3 *Biologische Wirksamkeit*^[1,2,8,42]

Obwohl bisher von den positiven antioxidativen Eigenschaften der Tocopherole im Allgemeinen gesprochen wurde, ist es dennoch wichtig, eine Differenzierung zwischen den verschiedenen Homologen und optischen Isomeren zu treffen. Der Grund hierfür liegt in den unterschiedlich stark ausgeprägten biologischen Wirksamkeiten, die bei Versuchen *in vitro* bestimmt wurden.

Dabei zeigte sich, dass RRR- α -Tocopherol die größte biologische Wirksamkeit besitzt, während die anderen Homologen gemäß ihrer sinkenden Anzahl von Methylgruppen am aromatischen Ring abnehmende biologische Aktivitäten innehaben. Aber auch die Esterfunktion an der Hydroxylgruppe des aromatischen Rings wie auch die optischen Isomere des RRR- α -Tocopherols besitzen geringere biologische Wirksamkeiten. Eine Zusammenstellung der wichtigsten biologischen Wirksamkeiten ist in Tabelle 1 zu finden.

Als Erklärung für die verschiedenen biologischen Wirksamkeiten sind neben möglichen Variabilitäten in der biologischen Aktivität Unterschiede in der Aufnahme der Tocopherole im Körper, der Kinetik des Transports durch den Körper sowie der Aufenthaltsdauer in den Zellmembranen anzuführen. Dort ist das Tocopherol-bindende Protein in der Lage, sowohl den Methylierungsgrad des aromatischen

Ringes, die auch die Lipophilie des Moleküls entscheidend beeinflusst, als auch die Konfiguration der Methylverzweigungen an der Phytyl-Seitenkette zu erkennen.

Name	Aktivität relativ zu RRR- α -Tocopherol [%]
RRR- α -Tocopherol	100
RRR- β -Tocopherol	50
RRR- γ -Tocopherol	10
RRR- δ -Tocopherol	3
RRR- α -Tocopherolacetat	91
2-epi- α -Tocopherol	31
all-rac- α -Tocopherol	74

Tabelle 1: Biologische Wirksamkeiten ausgewählter Tocopherole

Exkurs: Zähne und Zahnpflege

Das Dauergebiß eines Menschen besteht aus 32 Zähnen, die sich aus der Krone, dem Hals und der Wurzel, die im Kieferknochen verankert ist, aufbauen. Die detaillierte Struktur eines Zahnes ist in Abbildung 4 dargestellt^[43].

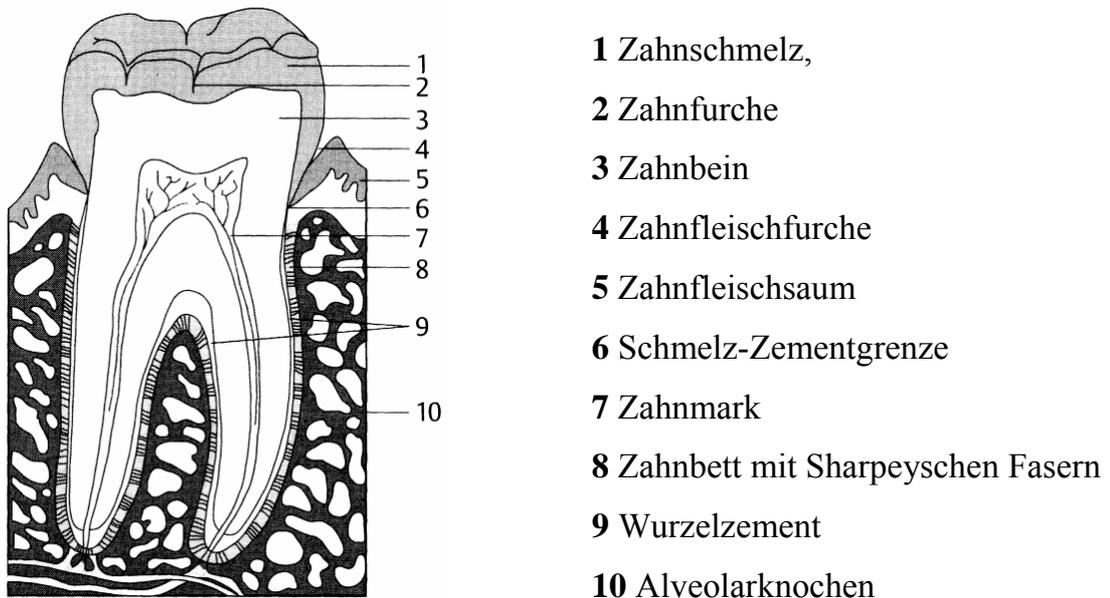


Abbildung 4: Aufbau eines Zahnes

Die Ursache von Zahn- und Zahnbetterkrankungen liegt in der Anwesenheit von etwa 300 verschiedenen Bakterienarten in der Mundhöhle. Diese ernähren sich primär durch die Glykoproteine im Speichel, der sich als ein dünner Film, Pellicle genannt, auf den Zahnoberflächen und den Schleimhäuten abgesetzt hat. Es bildet sich bakterieller Zahnbelag, der als Plaque bezeichnet wird. Bei einer ungenügenden Reinigung kommt es zu einer starken Vermehrung der Bakterien, die nun auch in Zahnfleischfurchen eindringen. Nach wenigen Tagen können sich so 200 bis 300 Schichten an Bakterien auf und zwischen den Zähnen abgesetzt haben.

Zu Beginn ist der bakterielle Zahnbelag noch weich und abputzbar. Nach 10 bis 20 Tagen führt die Übersättigung des Zahnbelags mit anorganischen Mineralien wie Calciumphosphat zu einer Mineralisation. Es bildet sich Zahnstein (Calculus), der gleichzeitig auch als Träger für die aktive Plaque fungiert, so dass der Zyklus fortgesetzt wird.

Die Entstehung von Karies basiert auf der Metabolisierung von Zucker zu organischen Säuren durch die vorhandenen Bakterien. Diese Säuren senken den pH-Wert des Zahnbelags und lösen den Zahnschmelz auf.

Andere Stoffwechselprodukte, die Endotoxine, dringen in das Zahnfleisch ein und lösen dort Abwehrreaktionen aus. Diese äußern sich in Zahnfleischartzündung, genannt Gingivitis. Im Anfangsstadium ist die Gingivitis schmerzlos und nur durch gerötetes, geschwollenes Zahnfleisch indiziert. Bei Nicht-Behandlung verschlimmert sich das Krankheitsbild und äußert sich schmerzhaft mit Entzündungen, Blutungen und Zahnfleischartschwund. Im Endstadium, der Parodontitis, kommt es zum Abbau des knöchernen Zahnbettes und Zahnausfall^[44].

Die beste Prophylaxe zum Schutz gegen Karies und Zahnfleischartzündungen liegt in einer sorgfältigen Entfernung des bakteriellen Plaques durch Zähneputzen. Zum Schutz gegen Karies werden Zahncremes mit Putzkörpern, die mechanisch den Zahnbelag entfernen sollen, versetzt. Als wichtigster Bestandteil von modernen Zahncremes sind jedoch fluorid-haltige Wirkstoffe zu nennen. Die vorhandenen Fluorid-Ionen reduzieren die Säurelöslichkeit des Zahnschmelzes, fördern die Remineralisation von angegriffenem Zahnschmelz und lagern sich in den Zahnschmelz ein^[45-47].

Zum Schutz des Zahnfleisches gegen Entzündungen werden die Zahncremes mit entzündungshemmenden, pflanzlichen Extrakten aus Kamille, Aloe, Arnika, Calendula, Hamamelis, Myrrhe, Rosmarin und Salbei versetzt. Seit kurzem wird einer neuartigen Zahncreme auch Vitamin E zugegeben. Bei einer Anreicherung der Tocopherole im Zahnfleisch könnten diese nun aufgrund ihrer antioxidativen Wirkung die Zellen des Zahnfleisches vor Angriffen durch Bakterien und Zellgifte schützen. Dadurch wäre es möglich, die Entstehung von Zahnfleischartzündungen zu verhindern bzw. vorhandene Gingivitis zu heilen.

3.2 Carotinoide

3.2.1 Strukturen

Als Carotinoide wird eine Gruppe von natürlichen Pflanzeninhaltsstoffen bezeichnet, die aus acht Isopren-Einheiten bestehen und somit zur Substanzklasse der Tetraterpene gehören. Unterschieden werden die Carotinoide in die Carotine, die ausschließlich aus Kohlenwasserstoffen bestehen, sowie deren sauerstoffhaltige Derivate, die Xanthophylle^[48].

Als erstes Carotinoid wurde β -Carotin im Jahr 1826 von Wackenroder aus Möhren extrahiert. Die Summenformel wurde 1907 von Willstätter ermittelt, während die Konstitutionsformel von Karrer um 1930 aufgeklärt wurde. Synthetisch wurde β -Carotin erstmals um 1950 hergestellt^[49].

Formal leiten sich alle Carotinoide von einer acyclischen Verbindung der Summenformel $C_{40}H_{56}$, dem Lycopin, ab. Durch Hydrierung, Dehydrierung, Cyclisierung oder Einbau von funktionellen Gruppen, wie Hydroxyl-, Carbonyl- oder Epoxygruppen, entstehen nun zahlreiche weitere Carotinoide. Die beiden wichtigsten cyclischen Carotinoide sind β - und α -Carotin. Beide besitzen endständig zwei Ionon-Ringe, die durch eine olefinische Kette der Formel $C_{26}H_{34}$ verbunden sind. Dabei ist β -Carotin ein zentrosymmetrisches Molekül, das zwei β -Ionon-Ringe als Endgruppen hat, während α -Carotin aus einem β - und einem ϵ -Ionon-Ring besteht. Die Strukturen der wichtigsten Carotinoide sind in Abbildung 4 dargestellt^[50].

Neben den in Abbildung 5 gezeigten Carotinoid-Strukturen mit all-trans- (all-E-) Konfiguration der olefinischen Kette existieren auch mehrere geometrische Isomere mit einer oder mehreren Z- (cis-) Anordnungen. Diese Z-Isomere werden unter dem Einfluß von Licht, Wärme und Sauerstoff gebildet^[51].

Als Beispiel für die möglichen Z-Isomere von Carotinoiden sind in Abbildung 6 die geometrischen Isomere von Zeaxanthin und Lutein dargestellt. Dabei besitzt das zentrosymmetrisch aufgebaute Zeaxanthin zwei sterisch bevorzugte Isomere in 9- und 13-Position. Lutein dagegen ist aufgrund der verschiedenen endständigen Ionon-Ringe unsymmetrisch, daher ergibt sich die doppelte Anzahl an Z-Isomeren. Diese werden als 9-Z, 13-Z, 9'-Z, 13'-Z-Lutein bezeichnet. Bei anderen Carotinoiden, die eine noch

höhere Tendenz zur Isomerisierung besitzen, beispielsweise Lycopin, sind auch Z-Isomere in anderen Positionen möglich. Darüber hinaus existieren beim Lycopin auch diverse ZZ- bzw. ZZZ-Isomere^[52,53].

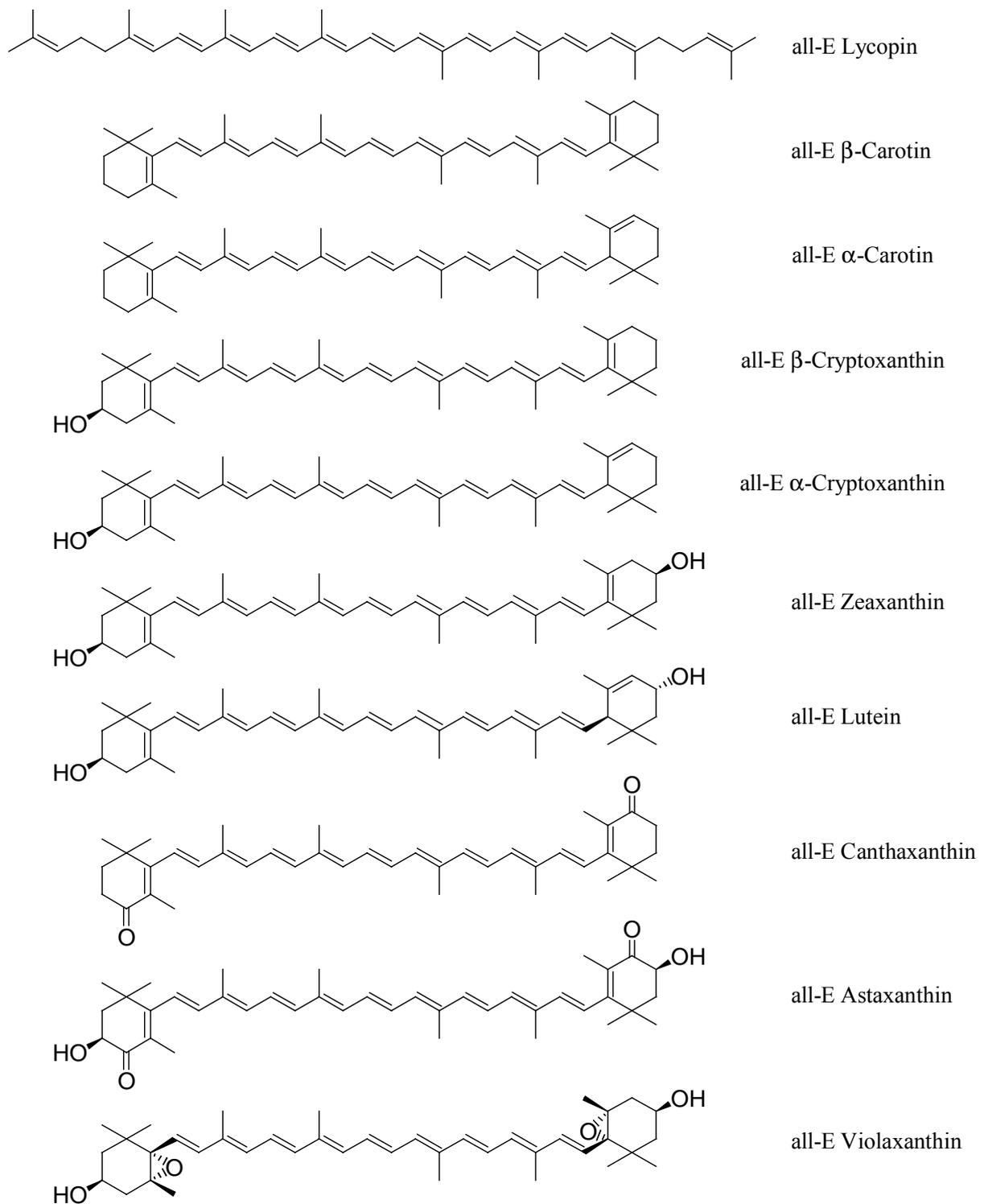


Abbildung 5: Strukturen der wichtigsten Carotinoide

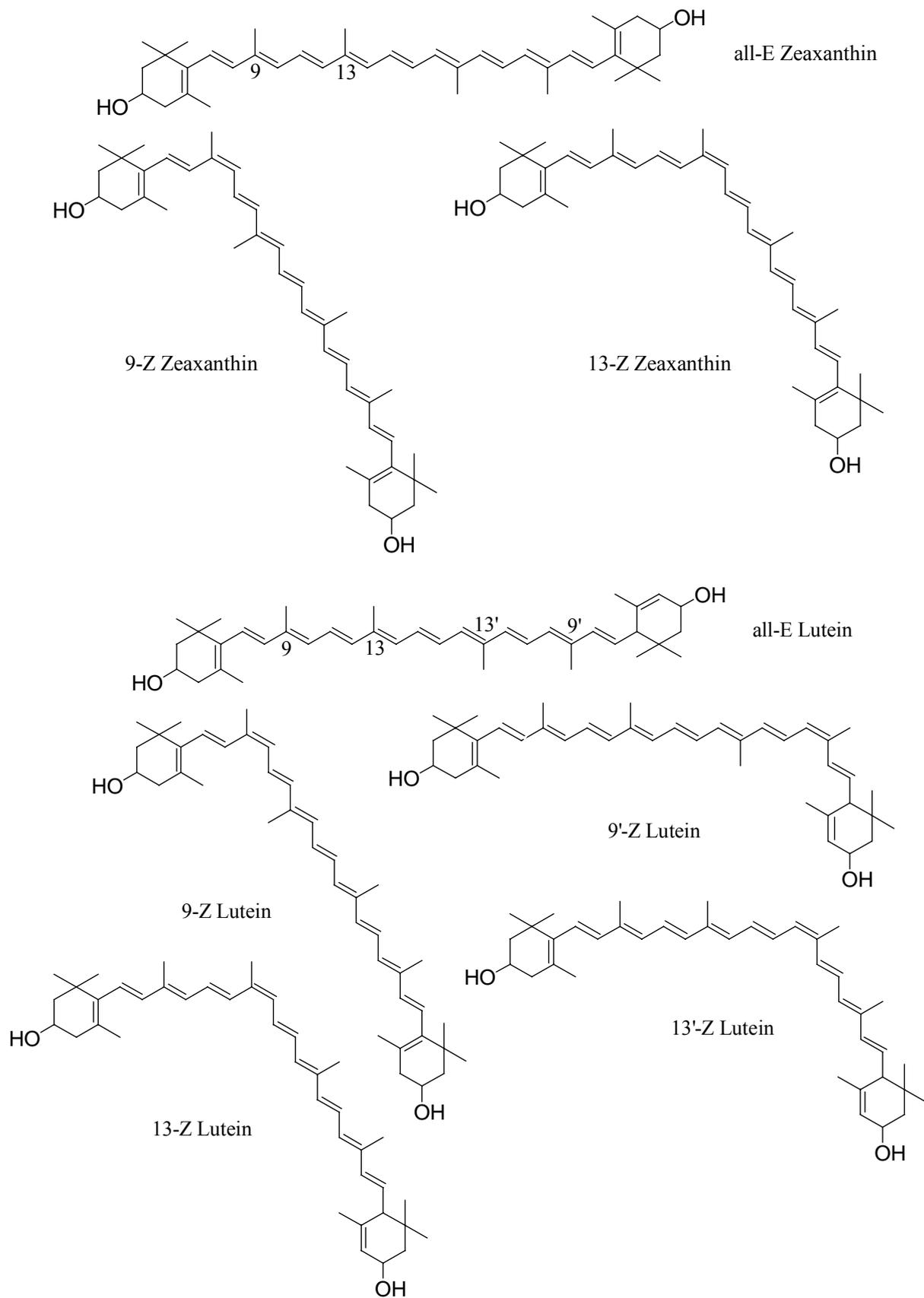


Abbildung 6: Geometrische (Z/E-) Isomere von Zeaxanthin und Lutein

Neben den verschiedenen geometrischen Isomeren kommen bei den Carotinoiden auch optische Isomere vor. Der Grund hierfür liegt in der Tatsache, dass die meisten Carotinoide ein oder mehrere stereogene Zentren besitzen. Zeaxanthin beispielsweise hat, bedingt durch die beiden Hydroxylgruppen an den Iononringen, zwei asymmetrische Kohlenstoffatome. Daraus ergeben sich aufgrund der zentrosymmetrischen Anordnung des Moleküls drei optische Isomere (3R, 3'R; Meso und 3S, 3'S). Lutein mit seiner unsymmetrischen Struktur dagegen besitzt drei stereogene Zentren und somit acht optische Isomere. Das natürlich vorkommende Isomer ist dabei das 3R, 3'R, 6'R-Lutein^[54].

3.2.2 Vorkommen und Synthese

Mehr als 600 Carotinoide kommen in der Natur vor. Dabei werden sie vor allem in den Blättern von Pflanzen gefunden, wo sie in den Chloroplasten am Prozeß der primären Lichtabsorption und der Photonenkanalisation in der Photosynthese mitwirken. Die typische orange-rote Farbe der Carotinoide wird dort jedoch meist von der grünen Farbe der Chlorophylle überdeckt^[55].

Darüber hinaus sind Carotinoide in vielen Früchten, Pollen und Samen von Obst und Gemüse zu finden, wo sie auch oft farbgebend sind. So sind Möhren gute Quellen von β -Carotin, während die rote Farbe der Tomate durch das vorhandene Lycopin zu erklären ist. Häufig vorkommende Xanthophylle sind Lutein und Zexanthin, die vor allem in dunkelgrünem Blattgemüse und Mais vorkommen^[56].

Die Biosynthese von Carotinoiden ist in Abbildung 7 mit einem vereinfachten Schema dargestellt. Zunächst werden analog zur Synthese anderer Isoprenoide zwei Einheiten Isopentylpyrophosphat (IPP) an ein Molekül Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) addiert. Es entsteht Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP). Nun werden zwei Moleküle GGPP unter Bildung von Phytoen Schwanz-Schwanz verknüpft. Durch anschließende Dehydrierung werden nun sukzessive Doppelbindungen in das Molekül eingeführt, so dass nacheinander all-E ζ -Carotin, die instabile Zwischenstufe all-E Neurosporin und schließlich all-E Lycopin entstehen. Dieses bildet nun den

nächsten Schritt zu einem C_{15} -Phosphoniumsalz umgesetzt. In der nun folgenden Wittig-Reaktion werden dann zwei Moleküle des C_{15} -Phosphoniumsalzes mit einem C_{10} -Dialdehyd zu β -Carotin verknüpft. Beide alternativen Synthesewege sind in Abbildung 8 vereinfacht zusammengefasst^[60-62].

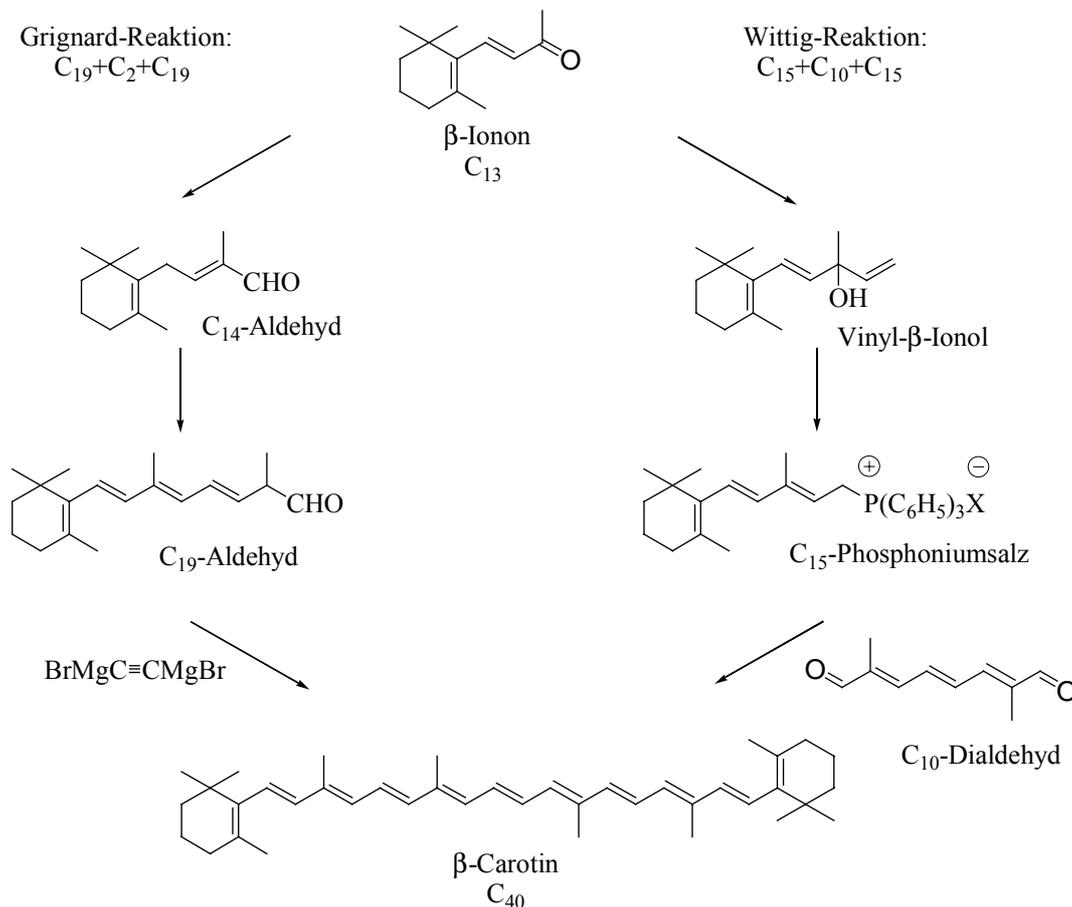


Abbildung 8: Synthesewege zur Darstellung von Carotinoiden

3.2.3 Carotinoide in der Prävention

3.2.3.1 Allgemeines

Der menschliche Organismus ist nicht in der Lage, Carotinoide zu synthetisieren, daher müssen sie mit der Nahrung zugeführt werden. In der Nahrungskette sind dabei 50 Carotinoide nachgewiesen, davon werden allerdings nur 15 Carotinoide (sowie 8 Metabolite) im Körper des Menschen gefunden. Die wichtigsten Speicherorte sind Leber, Fettgewebe, Serum und, im Falle der Xanthophylle Lutein und Zeaxanthin, das Auge^[63-64].

Den Carotinoiden werden vielfältige, sich positiv auf die Gesundheit auswirkende Eigenschaften zugesprochen, die in den letzten Jahren in zahlreichen klinischen und epidemiologischen Studien untersucht wurden. Dabei wird unterschieden in Fähigkeiten, die auf der möglichen Bildung von Vitamin A aus Carotinoiden beruhen, sowie in Wirkungen aufgrund der antioxidativen Eigenschaften der Carotinoide^[1].

Allgemein bekannt ist die Tatsache, dass etwa 50 Carotinoide Provitamin A-Aktivität besitzen. Das bedeutet, dass sie in der Lage sind, Vitamin A (Retinol) zu bilden, welches bekanntermaßen große Bedeutung für den Sehprozeß sowie für das Wachstum und die normale Entwicklung des Menschen hat. Die Voraussetzung für diese Fähigkeit ist das Vorhandensein eines unsubstituierten β -Ionon-Ringes, weshalb β -Carotin mit zwei β -Ionon-Ringen die größte Provitamin A-Aktivität besitzt. Aber auch andere Carotinoide, wie beispielsweise α -Carotin und α -Cryptoxanthin, besitzen die Fähigkeit zur Bildung von Vitamin A^[65-66].

Ein weiterer Punkt, der die gesundheitsfördernde Wirkung untermauert, ist die antioxidative Eigenschaft der Carotinoide. Dabei können sie zum einen als Radikalfänger wirken und die Zellen des Organismus gegen Angriffe durch freie Radikale schützen. Zum anderen sind die Carotinoide in der Lage, reaktiven Singulett-Sauerstoff physikalisch und chemisch zu quenchen, was zur Verminderung von oxidativem Streß führt^[67-70].

Da es inzwischen Hinweise gibt, dass oxidativer Streß an der Entstehung von Volkskrankheiten wie Krebs, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und dem Altersprozeß im Allgemeinen beteiligt ist, war die mögliche protektive oder kurative Wirkung von Carotinoiden in den letzten Jahren Gegenstand vieler medizinischer Studien.

Dabei wurden inverse Korrelationen zwischen der Aufnahme von β -Carotin bzw. Lycopin und der Entwicklung von Arteriosklerose gefunden, gleiches gilt für Herz-Kreislaufkrankungen bei erhöhter Einnahme von β -Carotin^[4,71-75]. Darüber hinaus konnte ein vermindertes Risiko, an verschiedenen Krebsarten zu erkranken, nachgewiesen werden. Dabei hat Lycopin besonders günstige Effekte auf die Verhinderung von Prostatakrebs^[76,77], während β -Carotin Wirkung gegen die Entwicklung von Hautkrebs^[78] und Lutein gegen die von Darmkrebs^[79] besitzt.

Darüber hinaus wird durch Carotinoide auch die Entstehung von Brust- und Lungenkrebs gehemmt^[80-84]. Lutein und Zeaxanthin besitzen zusätzlich auch protektive Wirkungen im menschlichen Auge, wo sie die Pathogenese von Katarakt und altersbedingter Makuladegeneration beeinflussen. Dies wird im folgenden Abschnitt vertiefend thematisiert.

Neben den positiven Implikationen auf die menschliche Gesundheit stellte sich in einigen Studien jedoch heraus, dass Carotinoide auch schädliche Wirkungen besitzen können. Im Alpha-Tocopherol Beta-Carotene Cancer Prevention Trial (ATBC) sowie im Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial (CARET) zeigte sich, dass das Lungenkrebsrisiko bzw. die allgemeine Sterblichkeit bei Rauchern und Asbest-Arbeitern, die eine Supplementierung mit β -Carotin erfahren hatten, signifikant höher war als in den Kontrollgruppen^[38,85].

Als Grund für diese gesundheitsschädlichen Wirkungen wird eine mögliche pro-oxidative Wirkung von Carotinoiden angeführt, die bei Verabreichung von sehr hohen Dosen und in speziellen Risikogruppen entsteht. Daher wurden auch bisher durch die World Health Organisation (WHO) oder andere Institutionen keine Empfehlungen für die Supplementierung mit Carotinoiden ausgesprochen, bis konkretere Ergebnisse bezüglich der gesundheitsfördernden oder -schädigenden Wirkungen bei den verschiedenen Dosierungen vorliegen^[86,87].

3.2.3.2 *Protektive Wirkung von Carotinoiden in der Retina*

Die Anwesenheit von Carotinoiden als die gelben Pigmente in der menschlichen Retina ist seit über fünfzig Jahren bekannt, später konnten sie dann als die Xanthophylle Lutein und Zeaxanthin identifiziert werden^[88,89]. Sie kommen über die ganze Retina verteilt vor, die größte Dichte liegt im Bereich des schärfsten Sehens, der Makula Lutea. Dieser 2 mm² große Bereich befindet sich dort, wo die Sehachse und die Retina zusammentreffen und die Retina nur mit Zapfen bedeckt ist. Aufgrund ihrer gelblichen Farbe wird die Makula Lutea auch als gelber Fleck bezeichnet. Eine schematische Skizze des menschlichen Auges mit der Position der Makula Lutea ist in Abbildung 9 dargestellt^[90,91].

Die Carotinoide Lutein und Zeaxanthin haben in der Retina die Aufgabe, die Lipid-Oxidation und somit den oxidativen Streß durch die Desaktivierung freier Radikale zu mindern. Darüber hinaus verhindern sie photochemische Schäden, indem sie energiereiche Wellenlängen im blauen Spektralbereich absorbieren^[92]. Dabei ist allerdings noch unbekannt, welche der verschiedenen geometrischen und optischen Isomere der Carotinoide an den antioxidativen Effekten in welchem Ausmaß beteiligt sind. Das veränderte Isomerpattern in der Retina im Vergleich zum menschlichen Serum, vor allem die verstärkte Anwesenheit von 9-Z-Isomeren, deutet jedoch unterschiedliche Involvierungen an^[93-96].

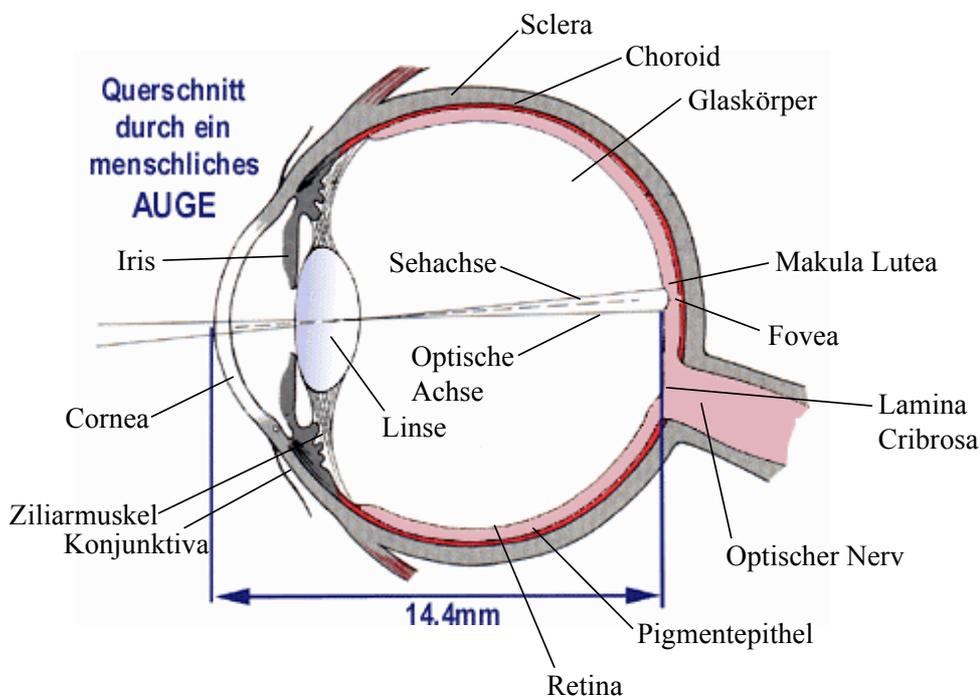


Abbildung 9: Schnitt durch das menschliche Auge

Die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) ist in den westlichen Ländern die Hauptursache für Erblindung. In Deutschland leiden 25 Prozent aller Menschen über 65 Jahren an AMD. Dabei führt die progressive Zerstörung des Netzhautzentrums zu einer irreversiblen Abnahme und schließlich zum Verlust der zentralen Sehschärfe. Als Ursachen für die AMD werden neben genetischen Dispositionen auch Ernährungs- und Umweltfaktoren vermutet^[97].

In Abbildung 10 sind eine gesunde Humanretina und eine Retina einer Person, die an AMD erkrankt war, vergleichend abgebildet. Dabei können bei der Retina mit AMD neben der weniger stark ausgeprägten Makula Lutea auch die Ablagerungen aus dem fortschreitenden Abbau von Photorezeptoren, vor allem in den Randbezirken der Retina, beobachtet werden^[98].

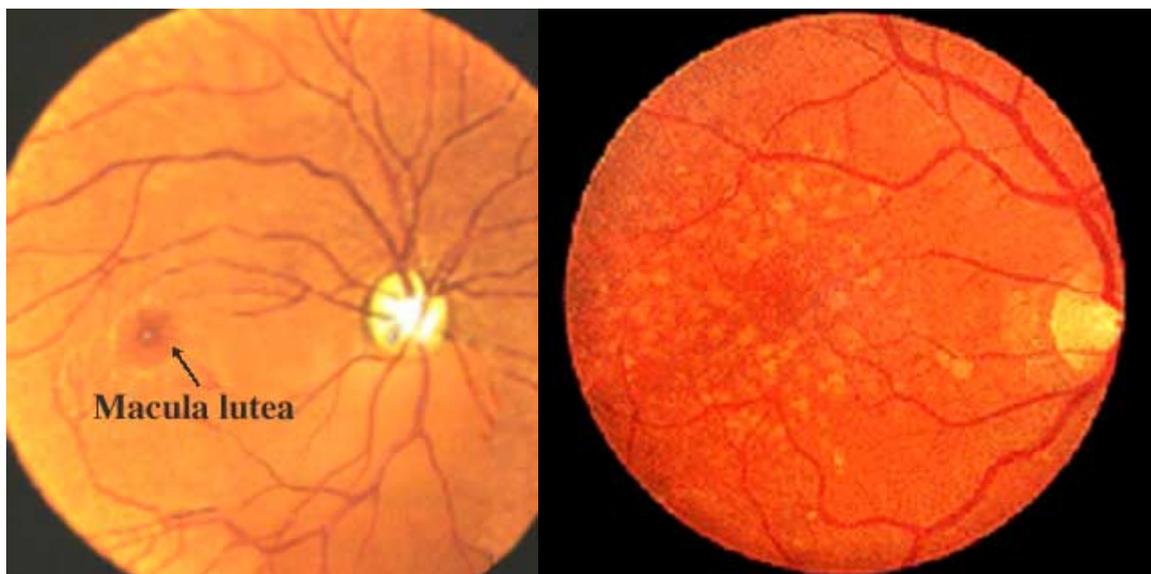


Abbildung 10: Aufsicht auf eine gesunde Humanretina (links) und auf eine Retina mit AMD (rechts)

Bisher existiert keine wirksame Therapie zur Behandlung von AMD, daher konzentriert sich die Aufmerksamkeit zur Zeit auf die Verhinderung von AMD. Diesbezüglich zeigen epidemiologische Studien, dass zwischen der Aufnahme von Nahrung reich an den Carotinoiden Lutein und Zeaxanthin, vor allem dunkelgrünen Blattgemüsen, und dem verminderten Risiko, an AMD zu erkranken, eine deutliche Korrelation besteht. Darüber hinaus konnte auch gezeigt werden, dass eine Diät mit Lutein- und Zeaxanthin-haltigen Lebensmitteln, in diesem Falle Spinat und Mais, die Dichte an Makulapigmenten erhöht^[99-111].

Neben den protektiven Effekten der Retina-Carotinoide bezüglich AMD konnte auch eine inverse Korrelation zwischen dem erhöhten Konsum von Lutein und dem Risiko, an Katarakt zu erkranken, gefunden werden^[112-113]. Dabei reichert sich Lutein nicht nur in der Retina sondern auch in der Linse an, wo es durch seine antioxidativen Fähigkeiten die Oxidation von Proteinen, die vermutlich die Trübung der Linse

verursachen, verhindert. Darüber hinaus existieren auch Hinweise, dass die Progression von Retinitis Pigmentosa (RP)-Typ, einer genetisch bedingten retinalen Degeneration, durch eine gesteigerte Aufnahme an Lutein-reichen Nahrungsmitteln verlangsamt werden kann^[111].

3.2.4 Bioverfügbarkeit von Carotinoiden

Da Menschen und Tiere nicht in der Lage sind Carotinoide selbst herzustellen, ist es notwendig, dass sie eine ausreichende Menge von außen zu sich führen. Doch die Bestimmung des täglichen Bedarfs ist nicht einfach zu erreichen. Zum einen stellt sich die Frage, welches der tatsächliche Bedarf an Carotinoiden für eine optimale Gesundheit ist, und zum anderen ist es notwendig, die Bioverfügbarkeit der Carotinoide zu bestimmen. Dabei ist die Bioverfügbarkeit der Anteil der mit der Nahrung aufgenommenen Carotinoide, der nach Absorption und Transport tatsächlich seine Wirkungen im Körper entfalten kann^[114,115].

Nach der Aufnahme der Carotinoid-haltigen Lebensmittel werden die Carotinoide aus ihrer Matrix herausgelöst und zunächst in Micellen, die aus Gallensäuren, freien Fettsäuren, Monoglyceriden und Phospholipiden bestehen, gelöst. Die Carotinoide werden nun im Duodenum über passive Diffusion von der Darmschleimhaut absorbiert und in Chylomicrons eingelagert, in denen sie über die Lymphe in den Blutkreislauf gelangen. Dort werden die Chylomicrons schnell durch die Lipoprotein-Lipase zersetzt und die Überreste zusammen mit den angebotenen Carotinoiden in der Leber aufgenommen, wo sie an verschiedene Lipoproteine angelagert werden und anschließend zurück in den Blutkreislauf gelangen. Über den Blutkreislauf können sie nun an ihre Wirkungsorte gelangen^[116].

Die Bioverfügbarkeit von Carotinoiden wird durch zahlreiche Faktoren beeinflusst. Dabei sind vor allem die Art des Carotinoids, die räumliche Struktur (beispielsweise Z- und E-Isomerie) und die Matrix des Lebensmittels zu berücksichtigen. Aber auch die Anwesenheit von Fetten und Ballaststoffen beeinflusst die Bioverfügbarkeit, ebenso wie der allgemeine Ernährungsstatus und das Alter der

Person. Darüber hinaus existieren auch Wechselwirkungen der Carotinoide und anderer bioaktiver Substanzen untereinander^[117-121].

Im Falle der fettlöslichen Carotinoide ist es nicht einfach, die Bioverfügbarkeit zu bestimmen. Laut der pharmakologischen Definition ist die Bioverfügbarkeit der Quotient der Plasmakonzentration einer Substanz nach einer oral verabreichten Dosis und der Plasmakonzentration der Substanz nach einer gleich hohen intravenösen Dosis. Aufgrund der mangelnden Wasserlöslichkeit ist es jedoch nicht möglich, Carotinoide intravenös zu verabreichen. Aus diesem Grund wurde bisher üblicherweise nur die relative Bioverfügbarkeit, also die relative Veränderung der Plasmakonzentration nach einer Supplementierung, bestimmt. Damit aber eine ausreichende Veränderung der Plasmakonzentration, im Vergleich zum vorher bestimmten endogenen Plasmalevel, zu beobachten ist, sind im Regelfall Langzeit-Supplementierungen (mindestens 2 Wochen) notwendig^[122-127].

4 Analytik von biologisch aktiven Inhaltsstoffen

4.1 Extraktion

Für die Analytik von komplexen biologischen Proben ist eine speziell auf die zu untersuchenden Substanzen zugeschnittene Probenvorbereitung unabdingbar. Diese besteht aus vier Schritten, der Probenvorbehandlung, der Extraktion, der Aufreinigung sowie der Aufkonzentrierung. Im Rahmen dieser Schritte gilt es, eine möglichst vollständige, reproduzierbare und artefaktfreie Isolierung der Analyten aus ihrer Matrix zu erreichen, um bei der darauf folgenden chromatographischen bzw. spektroskopischen Analytik auch eine quantitative Bestimmung zu ermöglichen.

Besonders die Extraktion von instabilen Analyten stellt eine große Herausforderung dar. Substanzgruppen wie die Tocopherole und Carotinoide werden beispielsweise aufgrund ihrer antioxidativen Fähigkeiten an Licht und Luft leicht selbst oxidiert, so dass eine nicht sorgfältige Analyse leicht zu einer Verfälschung der tatsächlichen Ergebnisse führen kann.

Aus diesem Grund wurden in den letzten zwei Jahrzehnten neben der klassischen Flüssig-Flüssig-Extraktion auch verschiedene schonende Festphasenextraktionsmethoden für die Isolierung von biomedizinischen Substanzen entwickelt. Darüber hinaus ermöglichen neuartige Kopplungstechniken die simultane Trennung und Identifizierung, in manchen Fällen sogar mit vorangestellter Extraktion, von empfindlichen Substanzen.

4.1.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Die klassische Methode der Probenvorbereitung ist die Flüssig-Flüssig-Extraktion (liquid liquid extraction, LLE). Diese beruht auf der Verteilung von Analytmolekülen zwischen zwei miteinander nicht mischbaren flüssigen Phasen, bis sich ein Gleichgewicht einstellt.

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion ist noch heute eine geeignete Methode zur Extraktion von Substanzen aus biologischen Flüssigkeiten wie Serum und Urin. Im Falle der Analytik von licht- und luftempfindlichen Substanzen wie den Carotinoiden

und Tocopherolen muß allerdings darauf geachtet werden, dass die Extraktion zügig und möglichst unter Rotlicht durchgeführt wird, um eine Isomerisierung oder Zerstörung der Analyten zu verhindern^[128].

Neben dem hohen Zeitaufwand besitzt die Flüssig-Flüssig-Extraktion noch weitere Nachteile in der mangelnden Automatisierbarkeit und dem hohen Verbrauch an Lösungsmitteln, die zudem noch auf miteinander nicht mischbare Flüssigkeiten begrenzt sind. Aus diesen Gründen wird die Flüssig-Flüssig-Extraktion zunehmend von Festphasenextraktionsmethoden abgelöst, insofern diese für die Extraktions-Problematik einsetzbar sind^[129].

4.1.2 Matrix Solid Phase Dispersion

Die Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) wurde 1989 von Barker eingeführt. Sie ermöglicht die simultane Zerkleinerung und Extraktion von hochviskosen und festen Proben, weshalb sie vor allem bei Untersuchungen von pflanzlichem und tierischem Gewebe, beispielsweise in der Lebensmittel-, Naturstoff- oder klinischen Analytik, Anwendung findet^[130-132].

Vorteile der MSPD liegen im geringen Zeitaufwand und niedrigen Lösemittelverbrauch sowie in der einfachen Handhabung. Auch für instabile Substanzen ist sie geeignet, da die Analytmoleküle durch die schnelle und direkte Extraktion vor Oxidation geschützt werden. Die erzielten Ergebnisse sind reproduzierbar und quantitativ. Ein Nachteil der MSPD für industrielle Anwendungen besteht jedoch in der schwierigen Automatisierbarkeit.

In Abbildung 11 ist die Durchführung der MSPD skizziert. Zunächst wird die Probe mit einem abrasiven Sorbensmaterial, wie einem alkylierten Kieselgel (z.B. C₁₈-Material), verrieben (Schritt 1 bis 3). Dabei kommt es zu einer Zerstörung der Probenmatrix und einer homogenen Verteilung der Probe über die Oberfläche des Sorbensmaterials. Das entstandene Pulver wird nun in ein leeres SPE-Säulchen gefüllt und unter Druck zu einem stabilen Säulenbett komprimiert (Schritt 4 und 5). Nun wird die entstandene Säule mit einem polaren Lösungsmittel konditioniert, wobei auch eventuell vorhandene polare Verunreinigungen entfernt werden (Schritt 6 und 7). Die

Elution der aufkonzentrierten und gereinigten Analyten wird anschließend durch ein unpolares Lösungsmittel ermöglicht (Schritt 8 und 9). Bei Bedarf kann der Extrakt nun noch weiter eingengt oder gegebenenfalls in einem anderen Lösungsmittel aufgenommen werden, bevor er den durchzuführenden chromatographischen bzw. spektroskopischen Untersuchungen unterworfen wird.

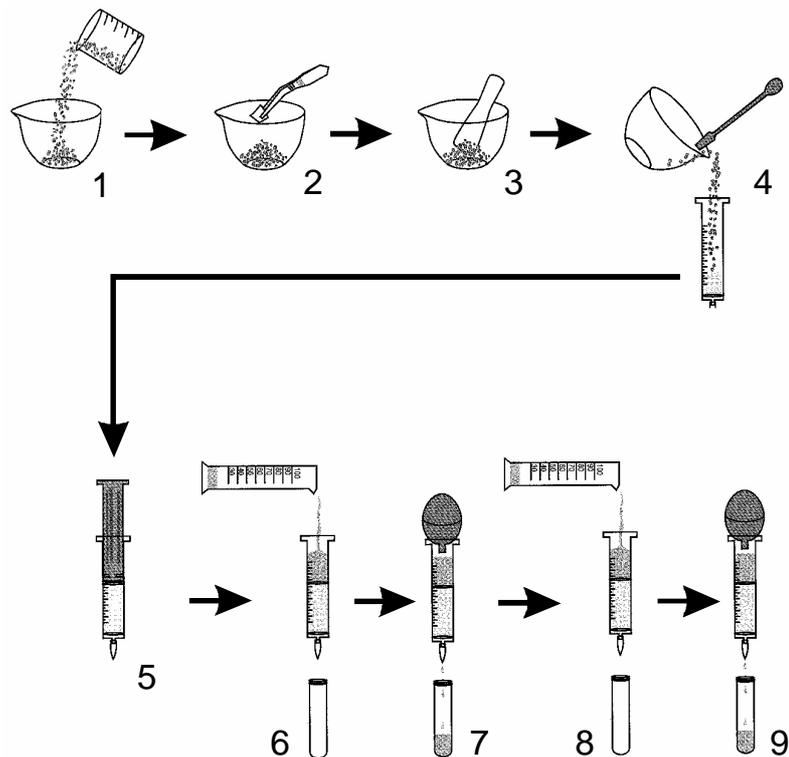


Abbildung 11: Durchführung der Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD): 1 Einfüllen von 1,5 g Sorbensmaterial, 2 Zugabe von 0,5 g fester/hochviskoser Probe, 3 Homogenisieren im Mörser, 4 Einfüllen in SPE-Säulchen, 5 Pressen zu stabilem Säulenbett, 6-7 Konditionieren mit polarem Lösungsmittel, 8-9 Elution der Analyten

4.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

4.2.1 Grundlagen^[133]

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography, HPLC) beruht auf einem physikalisch-chemischen Trennprozeß. Dabei verteilt sich ein Probengemisch zwischen einer flüssigen mobilen und einer festen stationären Phase und trennt sich durch variierende Verweilzeiten, die durch unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit der stationären Phase bedingt sind, in seine einzelnen Bestandteile auf. Dabei wird die mobile Phase unter erhöhtem Druck durch eine gepackte Trennsäule gepumpt.

Als stationäre Trennphasen können neben Kieselgel oder Aluminiumoxid, den sogenannten Normalphasen (normal phase, NP), auch mit organischen Molekülen modifizierte oder ummantelte Kieselgele, die Umkehrphasen (reversed phase, RP), verwendet werden. Diese unterscheiden sich in der Polarität und somit in den zu bearbeitenden Trennproblemen. Als mobile Phase finden die meisten gebräuchlichen Lösungsmittel oder auch Gemische derselbigen Verwendung. Zusätzlich können Lösungsmittel-Gradienten konstruiert werden, um die chromatographische Trennung zu beschleunigen. Abhängig von der Art der stationären Phase ist für die zu verwendende mobile Phase ein polares (im Falle von RP-Trennphasen) oder unpolares (bei NP-Phasen) Lösungsmittel zu wählen.

Die klassische Detektionsmethode nach der chromatographischen Trennung ist die UV-Spektroskopie, die in den letzten Jahren zunehmend durch den Einsatz von Dioden Array Detektoren (DAD) zur Aufnahme ganzer UV-Spektren ergänzt wurde. Darüber hinaus kommen seit einiger Zeit zur Strukturaufklärung von unbekanntem Substanzen auch on-line Kopplungen mit der Massenspektrometrie und der NMR-Spektroskopie zum Einsatz.

4.2.2 HPLC-UV-Kopplung von Carotinoiden und Tocopherolen

Die Trennung der geometrischen Isomere von Carotinoiden wurde früher auf Normalphasen und Nitrilphasen durchgeführt, da die klassischen Umkehrphasen, die mit C₈- oder C₁₈-Alkylketten modifiziert waren, die Carotinoid-Isomere nur

unzureichend auftrennen konnten^[134-136]. Aufgrund der besseren Reproduzierbarkeit von RP-Trennungen sowie der größeren Langzeitstabilität der Umkehrphasen gab es dennoch Bestrebungen, eine Umkehrphase mit großer Selektivität für Carotinoid-Trennungen zu entwickeln^[137-144]. Dies konnte 1994 von Sander und Albert mit einer C₃₀-Trennphase erreicht werden. Die Formerkennung (shape selectivity) der C₃₀-Phase beruht hierbei auf dem kombinierten Auftreten von geordneten starren (trans-Konfiguration) und ungeordneten mobilen (gauche-Konfiguration) Bereichen an n-Alkylketten, den sogenannten Domänen. Als mobile Phasen werden für Carotinoid-Trennungen tertiäre oder binäre Lösungsmittelgemische aus Methanol, tert.-Butylmethylether und Wasser oder Aceton und Wasser verwendet.

Auch die Tocopherol-Homologen wurden zunächst auf Normalphasen getrennt, die eine Differenzierung aller vier Homologen erlauben, während die kurzkettigeren RP-Materialien, wie C₈- und C₁₈-Phasen, keine Auftrennung der konstitutionsisomeren β - und γ -Tocopherole ermöglichten. Doch auch in diesem Fall konnte die Entwicklung der hochselektiven C₃₀-Trennphasen eine ausreichende Trennung aller Homologen erreichen und gleichzeitig die oben genannten Vorteile der RP-Phasen einbringen. Die klassische mobile Phase für die Trennung besteht aus einem Lösungsmittelgemisch von Methanol und Wasser^[145-147].

Aufgrund der Anwesenheit von elf konjugierten Doppelbindungen in der Struktur zeigen die Carotinoide charakteristische Absorptionsbanden im visuellen bis nahen UV-Bereich (300 bis 500 nm). Die Hauptabsorptionsbande besitzt hierbei eine Feinstruktur mit drei Absorptionsmaxima, von denen das zweite bei etwa 450 nm die größte Intensität hat. Die genaue Lage der Absorptionsmaxima wird neben der bekannten Abhängigkeit von der Art des Lösungsmittels zusätzlich von der Struktur der Carotinoide bestimmt. So zeigen beispielsweise β -Iononringe einen hypsochromen Shift von etwa 10 nm im Vergleich zu anderen Endgruppen^[148-150].

Auch Z-Isomere besitzen ein leicht modifiziertes UV-Spektrum. Dieses unterscheidet sich von der entsprechenden all-E-Verbindung durch einen hypsochromen Shift von 2-6 nm, einen starken hypochromen Effekt, eine Reduktion der Feinstruktur sowie das Entstehen einer cis-Bande durch die Aufhebung der Molekülsymmetrie. Diese tritt, verglichen mit dem dritten Absorptionsmaximum der

Hauptabsorptionsbande, um 140 nm zu niedrigeren Wellenlängen verschoben auf. Die Intensität der cis-Bande erhöht sich mit zunehmender Nähe zum Zentrum des Moleküls.

Die Detektion der Tocopherol-Homologen mittels UV-Spektroskopie wird durch die Anwesenheit des aromatischen Rings ermöglicht. Dabei besitzt das am Aromaten vollkommen methylierte α -Tocopherol ein Absorptionsmaximum bei 290 nm. Durch die Abnahme der Methylgruppen am aromatischen Ring verschiebt sich das Absorptionsmaximum zu größeren Wellenlängen. So absorbieren die übrigen Homologen bei etwa 295 nm. Das Absorptionsmaximum von α -Tocopherolacetat liegt bei 283 nm^[151].

4.3 Kopplungsmethoden

4.3.1 HPLC-MS-Kopplung

Die on-line HPLC-MS-Kopplung verbindet die leistungsstarke Trenntechnik der HPLC mit der hochempfindlichen Detektionsmethode der Massenspektrometrie. Letztere ist eine massenselektive Analysenmethode, die eine Strukturermittlung selbst von komplizierten Naturstoffen ermöglicht. Die zu untersuchende Substanz wird dabei nach Injektion in einer Ionenquelle ionisiert und teilweise fragmentiert. Die geladenen Bruchstücke werden nun beschleunigt und in einem magnetischen und/oder elektrischen Feld ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) entsprechend getrennt und detektiert^[152-154].

Im Falle der HPLC-MS-Kopplung wird das Eluat der HPLC unmittelbar nach Durchqueren der UV-Detektors über Kapillaren direkt in das Einlasssystem des Massenspektrometers überführt. Aus diesem Grund ist diese Kopplungsmethode insbesondere für die Untersuchung von licht- und luftempfindlichen Substanzen geeignet.

Die Problematik der Kopplung besteht in dem Übergang der Probenmoleküle aus der flüssigen mobilen Phase in die Gasphase und darauf folgend den Vakuumbereich des Massenspektrometers. Zu diesem Zweck wurde die Atmospheric Pressure Ionization (API) als eine spezielle Ionisierungsmethode entwickelt. Sie ermöglicht sowohl die Überführung der Analytmoleküle in die Gasphase als auch die

Ionenerzeugung bei Atmosphärendruck. Erst im Anschluß an die Ionisation werden die Fragmentationen durch die spezielle Anordnung einer Kapillare und diverser Skimmer in den Vakuumbereich des Massenspektrometers geleitet. Im Rahmen der API sind zwei Arten der Ionisation möglich, die Electrospray Ionization (ESI) und die Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI).

Bei Verwendung der ESI strömt das Eluat der HPLC aus einer geladenen Kapillare in einen Gasstrom, wobei ein Aerosol aus geladenen Tropfen entsteht. Bei erhöhter Temperatur verdampfen die vorhandenen Lösungsmittelmoleküle sukzessive, so dass die geladenen Analytmoleküle auf einer sich ständig verkleinernden Oberfläche Platz finden müssen. Zu dem Zeitpunkt, an dem die abstoßenden Coulombkräfte größer als die Oberflächenspannung werden, explodiert der Tropfen und es bilden sich kleinere, neue Tröpfchen. Sobald die Coulombkräfte die Größenordnung der Solvatationsenergie erreichen, werden die geladenen Analytmoleküle in die Gasphase überführt.

Die Ionisation mittels ESI wird bevorzugt für polare Analyten wie Flavonoide angewendet und ist für die Strukturaufklärung von unpolaren Substanzen wie Carotinoiden und Tocopherolen nur wenig geeignet. In diesem Fall ist der Zusatz von polaren Hilfsreagenzien wie halogenhaltigen Lösungsmitteln oder Silbersalzen erforderlich, um eine schonende Ionisierung zu erreichen^[155,156].

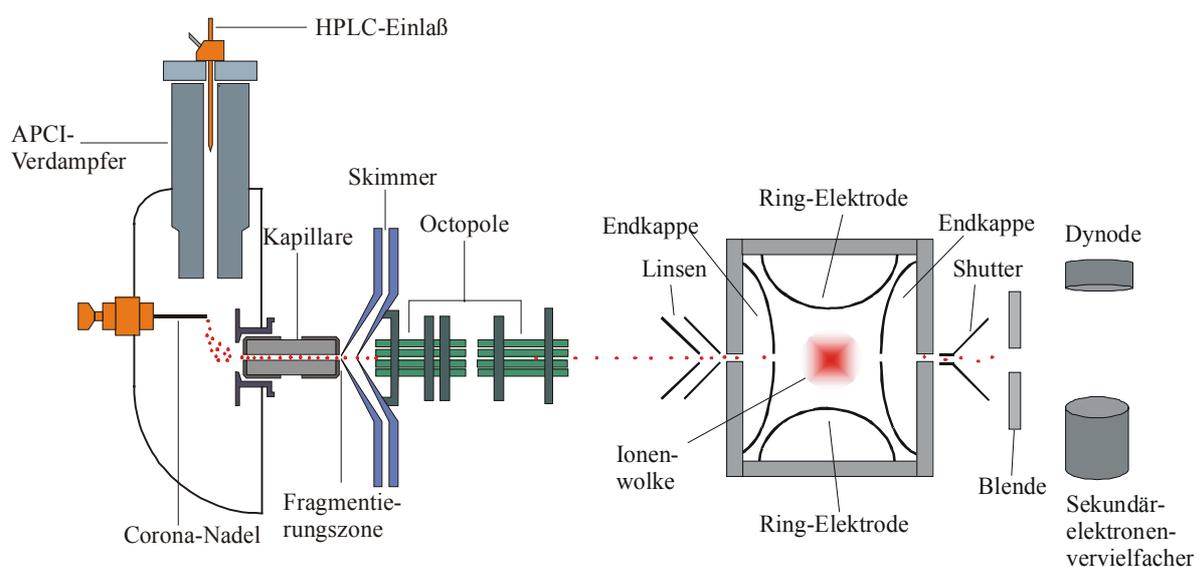


Abbildung 12: Aufbau der APCI-Ionisationskammer (links) und der Ionenfalle (rechts)

Bei der APCI werden die Ionen in der Gasphase gebildet. Das Eluat der HPLC wird in einen Heizblock pneumatisch vernebelt, anschließend erfolgt die Erzeugung der Analytionen indirekt nach Übertragung der Ladung durch Lösungsmittelionen. Diese werden mit einer geladenen Coronanadel gebildet. Der Aufbau der APCI-Ionisationskammer ist in Abbildung 12 links schematisch dargestellt.

Für die Charakterisierung von unpolaren Substanzen wie den Carotinoiden und Tocopherolen ist die Ionisierung mittels APCI die Methode der Wahl. Es werden keinerlei Hilfsreagenzien benötigt, da die Polarität des Wassers oder Methanols, das in der mobilen Phase eingesetzt wird, bereits ausreicht, um eine ausreichende und schonende Ionisierung zu erhalten^[157,17].

Beide Ionisationsverfahren, die ESI und die APCI, können im positiven und negativen Ionenmodus verwendet werden. Dies bedeutet, dass durch die schonende Ionisierung entweder protonierte oder deprotonierte Analytionen entstehen, zusätzlich werden einige Fragmentionen gebildet.

Im Anschluß an die Ionisation werden die Analytionen über eine Kapillare und mehrere Skimmer in den Massenanalysator überführt. Vorher können die Ionen jedoch auch in einer Ionenfalle (vgl. Abbildung 12, rechts) festgehalten werden. Von dort aus können die festgehaltenen Ionen massenselektiv herausgeschleudert und anschließend detektiert werden. Darüber hinaus ermöglicht die Ionenfalle im MS⁽ⁿ⁾-Modus eine weitergehende Fragmentierung der Molekülionen, welche die Strukturbestimmung erleichtert.

4.3.2 HPLC-NMR-Kopplung

Die Kopplung der chromatographischen Trennmethode HPLC mit der NMR-Spektroskopie (HPLC-NMR-Kopplung) stellt eine weitere, sehr wertvolle Methode zur Strukturaufklärung von Substanzen dar. Aufgrund der Möglichkeit, detaillierte Strukturinformationen auch stereogenen Inhalts zu liefern, findet sie ihren Einsatz vor allem in der Analytik von Naturstoffen, Wirkstoffen und Metaboliten^[158-164]. Der Nachteil der relativen Unempfindlichkeit der NMR-Spektroskopie wird zunehmend durch instrumentelle Weiterentwicklungen, beispielsweise die Einführung von

Kryomagneten und die Entwicklung von Kapillarprobenköpfen zur Kopplung mit Kapillartrennmethode, minimiert.

Im Falle der Strukturaufklärung von Carotinoiden ist die HPLC-NMR-Kopplung die Methode der Wahl, da nur sie, im Gegensatz zur HPLC-MS-Kopplung, eine eindeutige Unterscheidung der geometrischen Isomere ermöglicht. Darüber hinaus wird die Isomerisierung bzw. oxidative Zersetzung der licht- und luftempfindlichen Carotinoide durch die direkte Verbindung der Trenn- und Detektionssysteme über Stahlkapillaren verhindert^[19,165-167].

4.3.2.1 Experimenteller Aufbau^[18,168]

Die konventionelle NMR-Spektroskopie unter Verwendung von Probenröhrchen ist für licht- und luftempfindliche Substanzen nur schlecht geeignet, da sich die Analyten bei den vorher durchzuführenden Schritten wie Isolierung, Reinigung und Aufkonzentrierung zersetzen können. Aus diesem Grund wurde die HPLC-NMR-Kopplung unter Verwendung einer speziellen Durchflusszelle entwickelt. Ihr Design ist in Abbildung 13 im Vergleich mit einem konventionellen Röhrchenprobenkopf dargestellt.

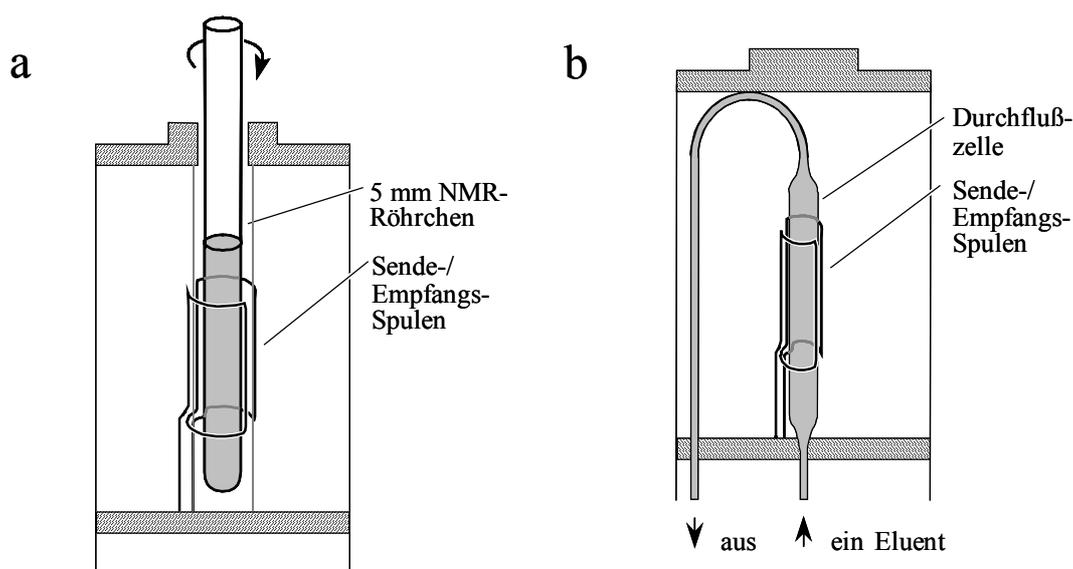


Abbildung 13: Design eines a) konventionellen und eines b) Durchfluß-Probenkopfes

Durch die feste Installation der Detektionszelle im Probenkopf ist es zwar nicht mehr möglich, die Probe zu rotieren, dafür kann die Aufbringung der Sende- und Empfangsspulen unmittelbar auf der Zelle einen besseren Füllfaktor und somit eine höhere Empfindlichkeit erreichen. Die Durchflusszelle besitzt dabei ein Detektionsvolumen von 30 bis 200 μl .

Der Aufbau der HPLC-NMR-Kopplung ist in Abbildung 14 schematisch zusammengestellt, hierbei bleibt das Setup des HPLC-Systems unverändert. Zwischen den UV-Detektor der HPLC-Anlage und die NMR-Meßzelle wird nun über Transferkapillaren ein computergesteuertes Interface, die Bruker Peak Sampling Unit (BPSU), geschaltet. Die BPSU ist für die Regelung der verschiedenen Messtechniken zuständig, mit denen HPLC-NMR-Messungen durchgeführt werden können. Klassische Modi sind hierbei die continuous-flow oder stopped-flow Verfahren bzw. die Verwendung von Loops^[169].

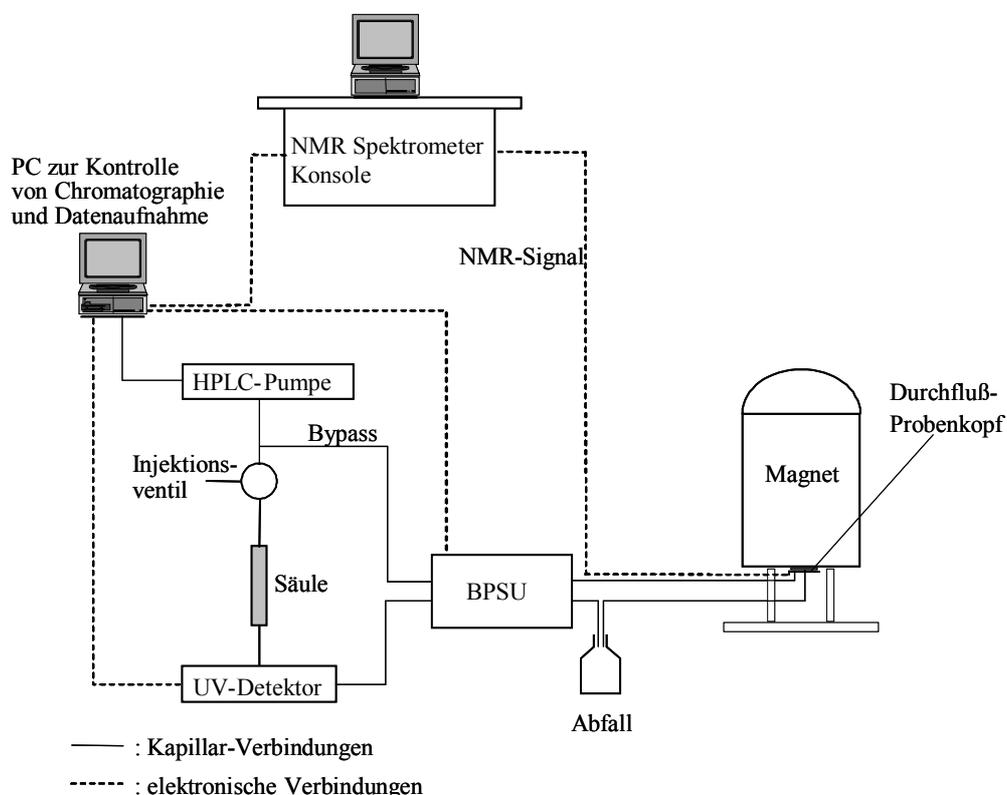


Abbildung 14: Experimenteller Aufbau der HPLC-NMR-Kopplung

Unter Verwendung der Loops der BPSU können die verschiedenen mittels HPLC aufgetrennten Probenkomponenten während des chromatographischen Laufes separat aufgefangen und gespeichert werden. Nach Beendigung der Chromatographie werden dann alle Komponenten über eine Flow-Injektion nacheinander in das NMR-Spektrometer überführt und identifiziert.

Die simultane Trennung und Detektion der Probenkomponenten kann mit dem continuous-flow Verfahren erzielt werden. Dabei erfolgt die Datenaufnahme dieser on-line-Messung mittels eines Pseudo-2D-Experimentes, bei dem in F2-Dimension die chemische Verschiebung und in F1-Richtung die Elutionszeit dargestellt werden. Diese Methode ist aufgrund der begrenzten Aufnahmezeit, die für jedes NMR-Spektrum pro Elutionszeitpunkt zur Verfügung steht, jedoch nur für relativ konzentrierte Probenmengen möglich.

Bei geringeren Mengen an Analyten ist das stopped-flow Verfahren besser geeignet. Die chromatographische Trennung wird in diesem Fall genau zu dem Zeitpunkt angehalten, an dem sich das Peakmaximum der zu identifizierenden Probe in der Durchflusszelle befindet. Dann ist es möglich, die gesamte Bandbreite an NMR-Experimenten, auch ^{13}C - und 2D-Messungen, zur Strukturaufklärung des Analyten durchzuführen.

4.3.2.2 Anforderungen an die Chromatographie und die NMR-Spektroskopie

Für eine erfolgreiche Strukturaufklärung mittels HPLC-NMR-Kopplung ist es notwendig, dass die Anforderungen und Restriktionen der beiden Methoden berücksichtigt werden und eine Anpassung der Systeme erfolgt. Vor allem die Wahl der Lösungsmittel muß sowohl den Anforderungen der chromatographischen Trennung als auch der Detektion mittels NMR-Spektroskopie gerecht werden. Da es aus Kostengründen unmöglich ist (abgesehen von der Verwendung von deuteriertem Wasser), die HPLC-Trennung mit volldeuterierten Lösungsmitteln durchzuführen, gibt es mehrere Punkte, die für die HPLC-NMR-Kopplung zu beachten sind.

Zunächst einmal sollte die Anzahl der Lösungsmittelsignale möglichst gering gehalten werden. Dies ist notwendig, um eine gute Qualität der Unterdrückung der

Lösungsmittelsignale, welche die Empfindlichkeit der Detektion der Analytsignale entscheidend beeinflusst, zu erzielen. In den meisten Problemstellungen ist mit einer binären Mischung von Acetonitril, Aceton oder Methanol mit D₂O eine ausreichende RP-Trennung erreichbar.

Die Lage der Lösungsmittelsignale sollte darüber hinaus möglichst keine Überschneidungen mit den erwarteten Resonanzen der untersuchten Substanz besitzen, da die informationstragenden Probensignale von den in weitaus höherer Konzentration vorliegenden Lösungsmittelpeaks überdeckt werden.

Als problematisch sind auch Gradiententrennungen einzustufen. Die chemische Verschiebung der Signale im NMR-Spektrum ist abhängig von der Zusammensetzung der mobilen Phase. Dies bedeutet zum einen eine schlechtere Vergleichbarkeit der Resonanzsignale von Probenkomponenten aus einem Lauf. Zum anderen tritt jedoch im Falle von continuous-flow-Messungen zusätzlich die Problematik auf, dass eine Lösungsmittelunterdrückung über den ganzen chromatographischen Lauf unmöglich wird, was wiederum die Messempfindlichkeit erheblich verschlechtert.

Eine weitere Schwierigkeit bei der Durchführung der HPLC-NMR-Kopplung ist durch die relativ niedrige Empfindlichkeit der NMR-Spektroskopie gegeben. Die Nachweisgrenze liegt bei Substanzmengen von etwa 500 ng. Um diese Analytmenge für die NMR bereitzustellen, müssen Trennsäulen mit einer hohen Beladbarkeit und Selektivität verwendet werden, damit selbst bei einer extremen Überladung der Säule noch eine ausreichend gute Trennleistung erzielt werden kann.

Auf der Seite der NMR-Spektroskopie müssen ebenfalls einige Punkte berücksichtigt werden. Da aufgrund des hohen Lösungsmittelverbrauchs durch die HPLC aus Kostengründen außer deuteriertem Wasser keine volldeuterierten Lösungsmittel verwendet werden können, ist es notwendig, die Lösungsmittelsignale zu unterdrücken. Dies erhöht die Empfindlichkeit der Meßmethode, und ermöglicht so bei gleicher Anzahl von Transienten ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Ein Beispiel hierzu ist in Abbildung 15 zusammengestellt.

Zur Unterdrückung der Lösungsmittelsignale stehen mehrere Pulssequenzen zur Verfügung. Sie lassen sich in Vorsättigungs-Methoden (im Folgenden verwendet

mittels Shaped Pulsen), Relaxations-Methoden, sowie in Methoden unter Verwendung von selektiver Nichtanregung oder B_0 -Feld-Gradienten einteilen.

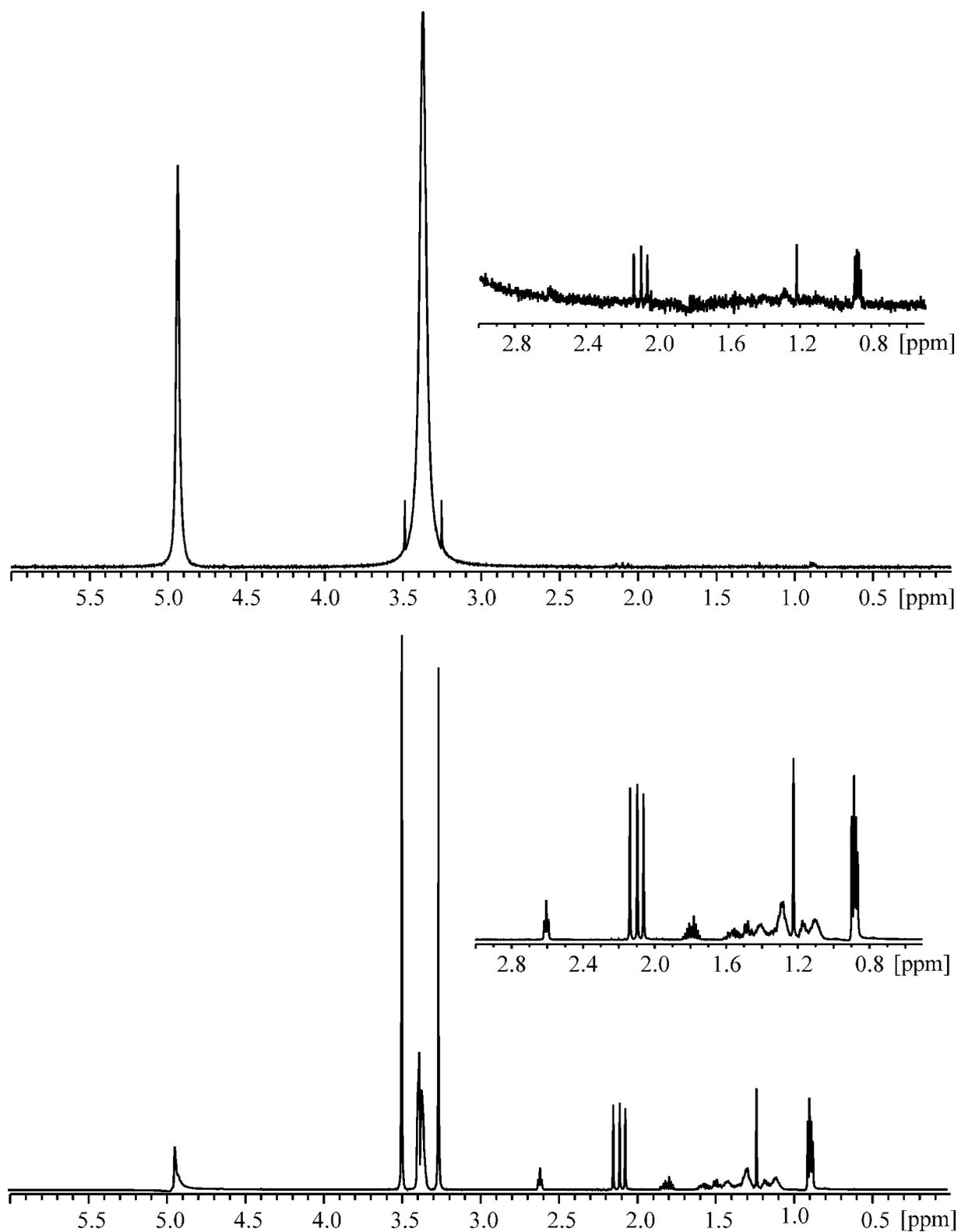


Abbildung 15: Protonenspektrum von α -Tocopherol in Methanol a) ohne und b) mit Lösungsmittelunterdrückung

Im Falle der continuous-flow Experimente ist noch ein weiteres Phänomen zu berücksichtigen. Aufgrund der begrenzten Aufenthaltsdauer des Eluenten in der Detektionszelle, die durch den stetigen Lösungsmittelfluß bedingt ist, ergibt sich eine Verkürzung der Lebensdauer der angeregten Spinzustände in der Durchflusszelle und somit der Spin-Spin-Relaxationszeit im Fluß. Dies resultiert in einer Verbreiterung der NMR-Signale. Gleichzeitig wird jedoch auch der Gleichgewichtszustand durch den ständigen Zufluß neuer, nicht angeregter Kerne schneller erreicht, was eine schnellere Wiederholungsrate der Spektrenaufnahme und somit einen Empfindlichkeitsgewinn ermöglicht.

4.4 Kapillarmethoden

4.4.1 Kapillar-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (μ HPLC)

Die Miniaturisierung der etablierten, hochselektiven Trennmethode HPLC ist begründet in der häufig stark limitierten Analytmenge in Proben biologischen und klinischen Ursprungs, die jedoch aufgrund mangelnder Ladung nicht mit den elektrokinetischen Trenn- und Analysetechniken, wie CE und CEC, identifiziert werden können.

Die ersten Entwicklungen bezüglich des Packens von Kapillaren und der Miniaturisierung von HPLC-Anlagen wurden von Scott, Kucera und Ishii durchgeführt^[170]. Daraus entwickelte sich die Kapillar-HPLC (μ HPLC), welche die Prinzipien der HPLC mit den reduzierten Dimensionen der gepackten Trennkapillaren aus Fused Silica auf eine Größe von 50 bis 250 μm verbindet. Zur Zeit ermöglichen splitlose Kapillar-HPLC-Pumpen und eine limitierte Auswahl an kommerziell erwerblichen Trennkapillaren Routineuntersuchungen. Gleichzeitig finden jedoch laufend Weiterentwicklungen im Bereich der Erstellung neuer Trennkapillaren sowie bei der Optimierung der Pack- und Trennvorgänge statt.

Das Packen der Fused Silica-Kapillarsäulen erfolgt hauptsächlich analog zum Packvorgang von regulären HPLC-Säulen aus dem Slurry. Dies bedeutet, dass die zu packende stationäre Phase in einem organischen Lösungsmittel suspendiert wird, bevor sie unter Druck mit Hilfe einer pneumatischen Pumpe in die Kapillare gepresst

wird, in der die Partikel durch eine Fritte am Ende zurückgehalten werden. Die Technik der besten und störungsfreisten Art der Fixierung der Teilchen in der Kapillare wird zur Zeit intensiv diskutiert. Dabei werden Methoden wie das Sintern von Fritten, die Verwendung von Filtern und die Wirkung des Keystone-Effekts bei Verwendung von verzögerten Kapillaren optimiert und miteinander verglichen^[171-174].

4.4.2 Miniaturisierte Kopplungsmethoden

Die μ HPLC kann ebenso wie die klassische HPLC on-line mit Methoden zur Strukturbestimmung gekoppelt werden. So ist es beispielsweise möglich, eine μ HPLC-MS-Kopplung zu etablieren, dabei ist die Ionisation der Probenmoleküle im Moment jedoch lediglich über die ESI verfügbar.

Eine vielversprechende Kopplungsmethode stellt auch die μ HPLC-NMR-Kopplung dar, da ihre Ergebnisse einen großen Informationsgehalt, auch stereogener Art, für die Strukturaufklärung unbekannter Substanzen besitzen. Der experimentelle Aufbau der μ HPLC-NMR-Kopplung ist dabei prinzipiell analog zur klassischen Kopplung, allerdings wird statt des BPSU-Interfaces lediglich ein einfaches Schaltventil zwischen den UV-Detektor und das NMR-Spektrometer eingebaut. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 16 zusammengestellt^[20,175-180].

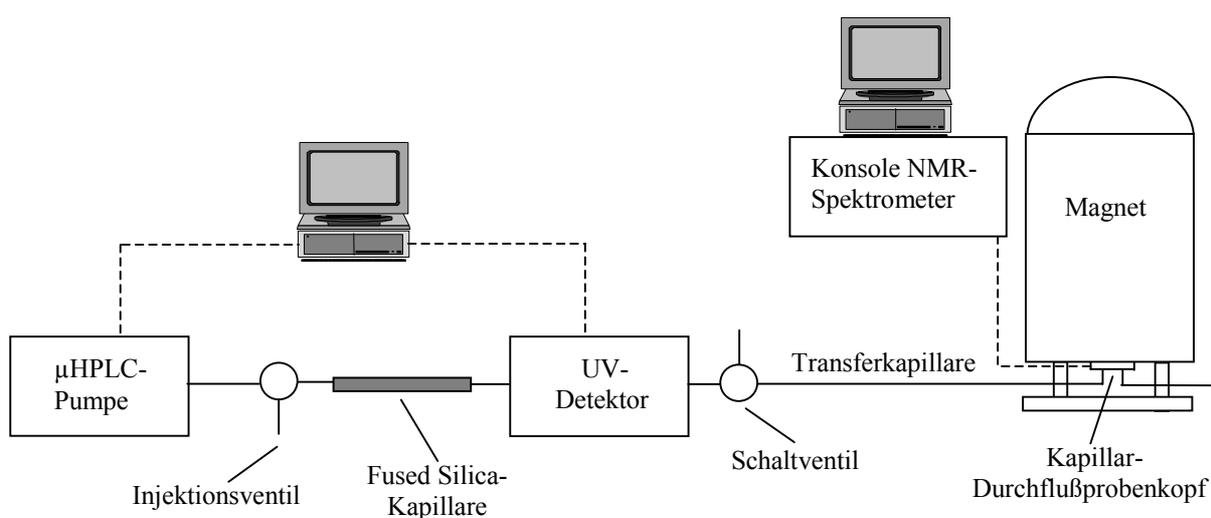


Abbildung 16: Experimenteller Aufbau der μ HPLC-NMR-Kopplung

Ein weiterer Unterschied zur klassischen HPLC-NMR-Kopplung liegt im Probenkopfdesign, da für die Kopplung mit der Kapillartechnik ein spezieller Kapillar-Durchflußprobenkopf entwickelt werden mußte. Neben dem klassischen Aufbau mit dem Doppelsattel-Helmholtz-Design (vgl. Abbildung 17 a)), der auch im regulären Durchflussprobenkopf Anwendung findet, hat sich in jüngster Zeit vor allem die solenoide Anordnung (Abbildung 17 b)) durchgesetzt. Hierbei ist die Durchflußzelle mit einem Detektionsvolumen von etwa $1,5\ \mu\text{l}$ nicht parallel zum B_0 -Feld, sondern mit Ausrichtung entlang der x-Achse angeordnet. Die Sende- und Empfangsspulen sind, wie auch bei der klassischen Durchflusszelle, direkt um die Detektionszelle gewickelt. Um die bei diesen kleinen Dimensionen auftretenden Suszeptibilitäts-Inhomogenitäten zu minimieren, ist die Spule von einem Container mit einem die Suszeptibilität ausgleichenden Fluorkohlenwasserstoff (FC-43) umgeben.

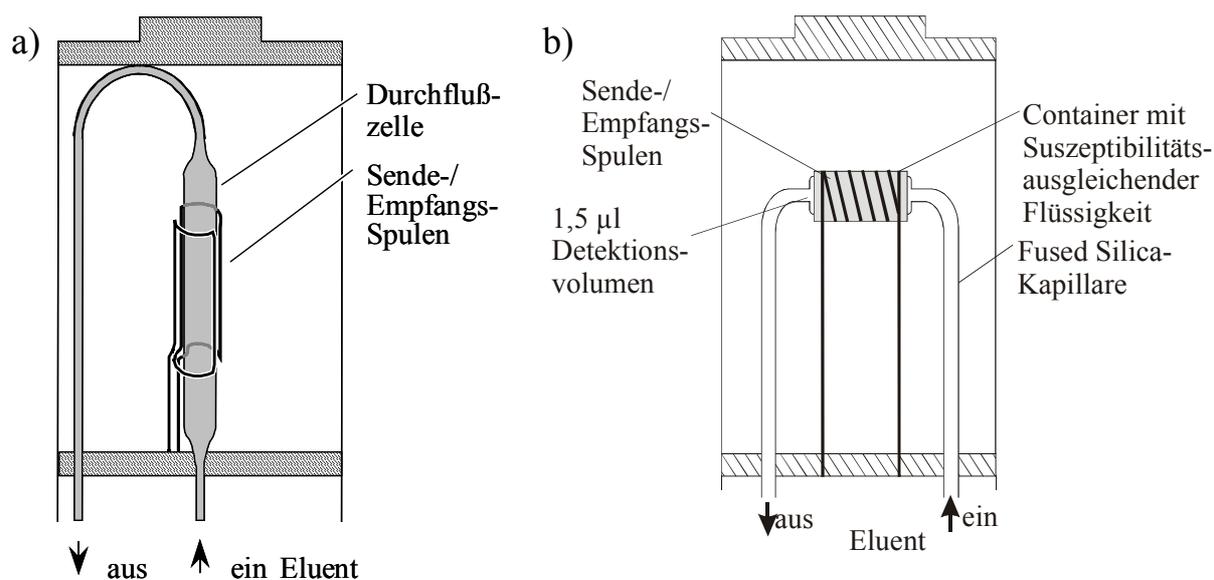


Abbildung 17: Design eines a) klassischen Durchflussprobenkopfes mit Doppelsattel-Helmholtz-Design und b) eines Kapillar-Durchflußprobenkopfes mit solenoider Anordnung

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchung von Tocopherolen in Zahncreme und Zahnfleisch

5.1.1 Design der Studie

Epidemiologische Studien ergaben, daß 95 % aller Menschen an Gingivitis, einer im fortgeschrittenen Stadium schmerzhaften Entzündung des Zahnfleisches, leiden^[181]. Daher ist der Bedarf an schützenden und entzündungshemmenden Substanzen groß. Vitamin E scheint durch seine antioxidativen Fähigkeiten, wie die Wirkung als Radikalfänger zur Verminderung von oxidativem Streß und die Desaktivierung von reaktivem Singulett-Sauerstoff, dazu gut geeignet. Aus diesem Grund wurde vor kurzem eine Zahncreme auf den Markt gebracht, die Tocopherole enthält.

Das Ziel der durchgeführten Untersuchungen war nachzuweisen, ob bei der regelmäßigen Verwendung der Vitamin E-haltigen Zahncreme die Tocopherole im Zahnfleisch akkumuliert werden. Diese Anreicherung ist notwendig, damit das Vitamin E einen positiven Effekt auf die orale Hygiene, insbesondere des Zahnfleisches, entwickeln kann. Dabei sind sowohl präventive, also vor Erkrankung schützende, als auch heilende Wirkungen möglich.

Zur Untersuchung der Anreicherung der Tocopherole im Zahnfleisch wurde eine Doppel-Blindstudie durchgeführt. Dazu wurden zunächst Zahnfleischproben von freiwilligen Probanden untersucht, die keine spezielle Vorbehandlung durchgeführt hatten. Unterteilt war diese Kontrollgruppe in zwei Untergruppen aus gesunden und an Gingivitis erkrankten Testpersonen. Neben den Kontrollgruppen existierten drei Gruppen von an Gingivitis erkrankten Probanden. Diese führten vor der Entnahme der Zahnfleischproben eine Vorbehandlung ihrer Zähne mit Tocopherol-haltigen Zahncremes durch. Dabei gab es drei Arten von Vorbehandlungen: Die erste Gruppe von Testpersonen putzte ihre Zähne zwei Wochen lang vor der Biopsie (das letzte Mal 30 min vor Entnahme der Probe) zweimal täglich für 60 bis 90 Sekunden mit 2 bis 3 cm einer Zahncreme, die 0,2 % Tocopherole enthält, während die zweite Gruppe die Zähne zwei Wochen lang mit einer Zahncreme, die 1,0 % Tocopherole enthält, putzte. Die dritte Gruppe von Probanden putzte analog zur zweiten Gruppe ihre Zähne mit 1,0

%iger Zahncreme und benutze zusätzlich jeden Abend 3 min lang eine Schiene, die sie mit der 1,0 %igen Zahncreme gefüllt hatten.

5.1.2 Chromatographische Trennung der Tocopherole

Vor der Durchführung der Untersuchungen an Zahncreme und Zahnfleisch war es zunächst einmal notwendig, eine an das chromatographische System angepasste Trennung der Tocopherol-Homologen zu erzielen. Dazu wurde ein Standard bestehend aus α -, β -, γ - und δ -Tocopherol sowie α -Tocopherolacetat hergestellt und chromatographisch auf einer hochselektiven C_{30} -Trennsäule aufgetrennt. Abbildung 18 zeigt ein exemplarisches Chromatogramm.

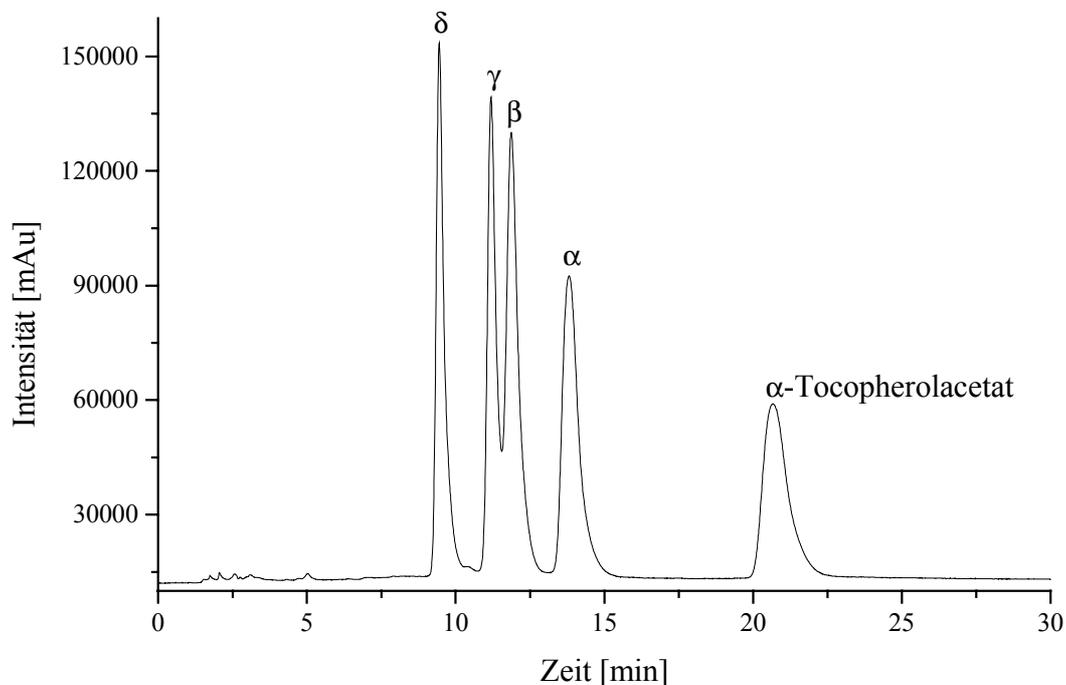


Abbildung 18: Chromatogramm eines Standards aus α -, β -, γ - und δ -Tocopherol sowie α -Tocopherolacetat in Methanol (entsprechend 1000 ng/Tocopherol)

Da im Folgenden die Tocopherole mit der Methode des externen Standards quantifiziert werden sollten, galt es nun, eine Kalibriergerade für jedes Tocopherol-Homologe zu erstellen. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe des Tocopherol-Standards hergestellt und die verschiedenen Peakflächen der jeweiligen Tocopherole mittels HPLC-UV quantifiziert.

Die Peakflächen jedes Tocopherols wurden nun gegen die eingesetzte Menge aufgetragen und die Kalibriergeraden mittels linearer Regression berechnet. Jedes Tocopherol besitzt dabei eine individuelle Kalibriergerade, da die UV-Absorptionen der verschiedenen Tocopherole bei einer gegebenen Wellenlänge (hier 280 nm) und somit auch die Peakflächen variieren. Tabelle 2 zeigt die erhaltenen Kalibriergeraden der verschiedenen Tocopherole und deren Standardabweichungen.

Substanz	Kalibriergerade	Standardabweichung
α -Tocopherol	$y = 0,3117 x$	$\pm 0,0021$ (0,7 %)
β -Tocopherol	$y = 0,3500 x$	$\pm 0,0038$ (1,1 %)
γ -Tocopherol	$y = 0,2606 x$	$\pm 0,0012$ (0,5 %)
δ -Tocopherol	$y = 0,2783 x$	$\pm 0,0024$ (0,9 %)
α -Tocopherolacetat	$y = 0,2760 x$	$\pm 0,0019$ (0,7 %)

Tabelle 2: Kalibriergeraden und deren Standardabweichungen, berechnet aus der Verdünnungsreihe des Tocopherol-Standards

5.1.3 Identifizierung der Tocopherol-Homologen mittels HPLC-NMR-Kopplung

Nachdem eine ausreichende chromatographische Trennung von α -, β -, γ - und δ -Tocopherol sowie α -Tocopherolacetat unter Verwendung einer C_{30} -Trennphase bei isokratischen Bedingungen mit reinem Methanol als mobiler Phase erreicht werden konnte, galt es nun, die Zuordnung der einzelnen Peaks mittels HPLC-NMR-Spektroskopie zu validieren. Dies konnte mit Hilfe des continuous-flow Verfahrens, bei dem das NMR-Spektrometer als simultaner Detektor für die Chromatographie dient, erreicht werden. Um die Durchführung dieses Kopplungsexperimentes zu ermöglichen, musste die Flussrate der HPLC-Trennung auf 0,4 ml/min erniedrigt werden, um eine längere Aufenthaltszeit der Analyten in der NMR-Meßzelle zu gewährleisten. Darüber hinaus wurde auch ein höher konzentrierter Tocopherol-Standard (entsprechend Absolutmengen von 266,8 μ g je Tocopherol) injiziert, damit die geringere Selektivität der NMR-Spektroskopie verglichen mit der UV-Detektion kompensiert werden kann.

Der Konturplot des continuous-flow HPLC-NMR-Kopplungsexperimentes, der mit dem Chromatogramm der HPLC-Trennung des Tocopherol-Gemisches (vgl. Abbildung 18) korreliert werden kann, ist in Abbildung 19 dargestellt. Dabei ist in F2-Richtung die chemische Verschiebung aufgetragen, während die F1-Achse dem zeitlichen Verlauf der Trennung entspricht.

Hierin ist entlang der F1-Richtung ein Chromatogramm aufgetragen, das durch die Aufsummierung über die Intensitäten der Protonensignale erhalten wurde. Die Auflösung dieses Chromatogramms ist aufgrund der zeitlichen Auflösung von ca. 38 s pro Reihe im continuous-flow Experiment selbstverständlich viel schlechter als die eines entsprechenden Chromatogramms mit UV-Detektion (Auflösung 0,5 s).

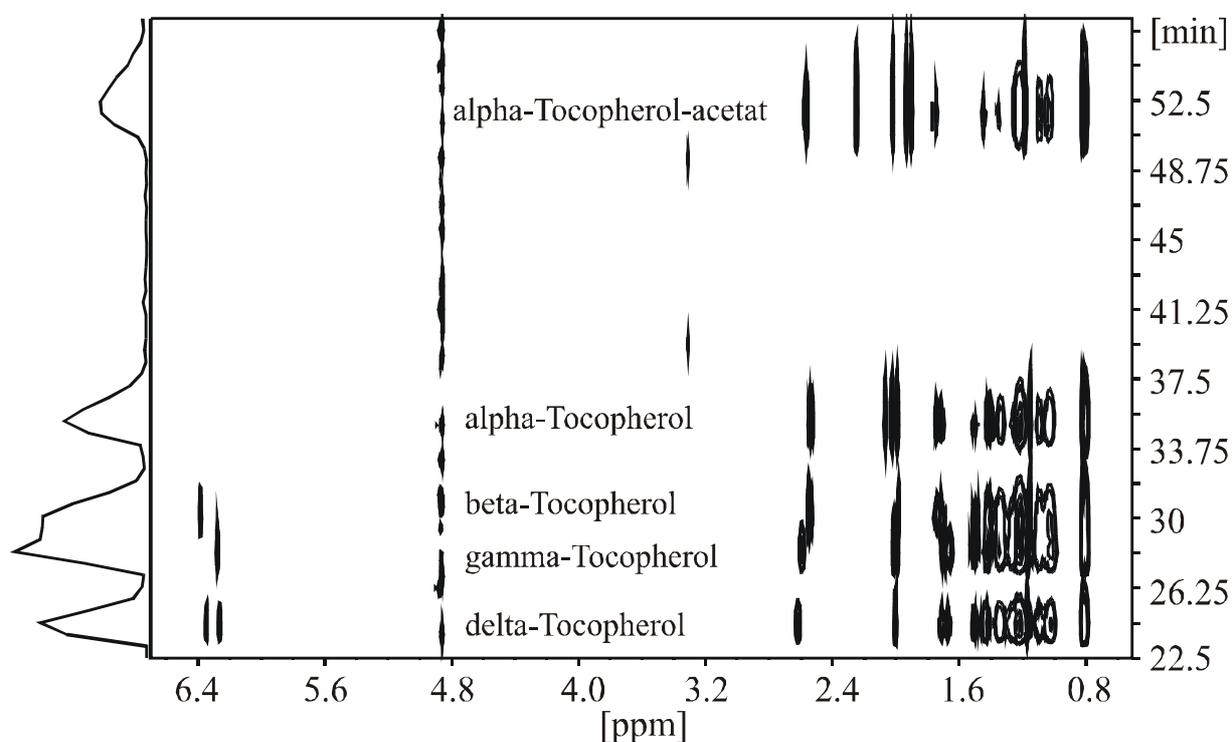


Abbildung 19: Konturplot der continuous-flow HPLC-NMR-Trennung eines Gemisches aus Tocopherolen

Für die Interpretation der Protonenspektren ist die Darstellung der continuous-flow Messung als Konturplot leider nicht gut geeignet. Deshalb werden zu diesem Zweck jeweils einzelne Reihen am Peakmaximum jedes Tocopherols entnommen und weitergehend analysiert. In Abbildung 20 sind die an den Peakmaxima extrahierten ^1H -Spektren vergleichend untereinander aufgetragen.

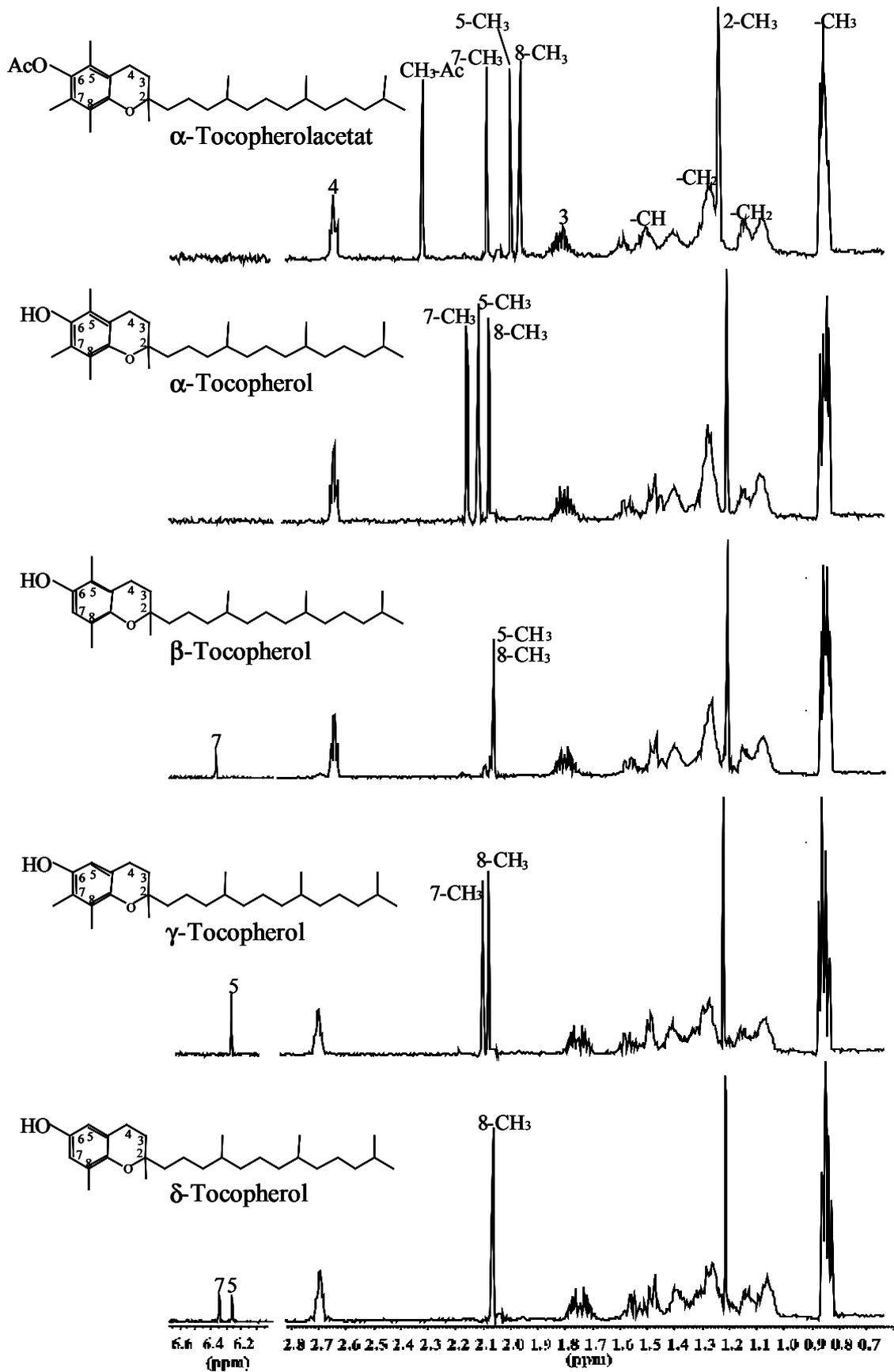


Abbildung 20: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Tocopherole, extrahiert aus dem Konturplot der continuous-flow Messungen (Abb. 19) am jeweiligen Peakmaximum

Die Zuordnung der Protonenspektren zu den zugehörigen Tocopherol-Homologen kann über die Auswertung der Signale der aromatischen Protonen (zwischen 6,2 und 6,3 ppm) und über die Auswertung der Protonen der an dem aromatischen Ring substituierten Methylgruppen (zwischen 2,0 und 2,2 ppm) vorgenommen werden. Die zusätzliche acetatische Methylgruppe des α -Tocopherolacetats kann bei etwa 2,3 ppm gut erkannt werden.

Für die exakte Interpretation der Protonensignale werden aufgrund der Komplexität des Spektrums weitere NMR-Experimente benötigt. Mit zusätzlichen Aufnahmen eines ^{13}C -Spektrums, eines DEPT-135 sowie eines HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy) von α -Tocopherol gelöst in deuteriertem Methanol ist nun eine vollständige Zuordnung der Signale möglich. Die erhaltenen Spektren samt ihrer Interpretation sind in den Abbildungen 21 und 22 dargestellt^[182].

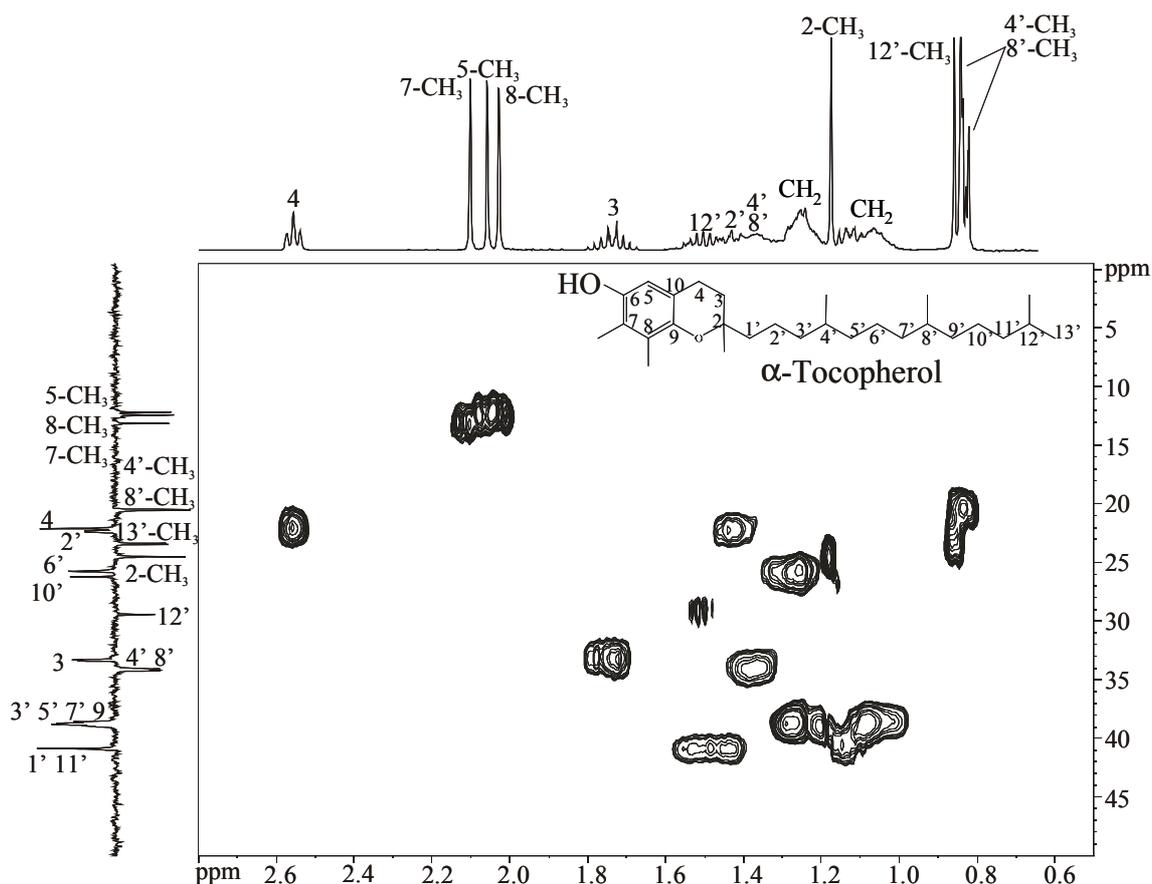


Abbildung 21: Aliphatischer Bereich des HSQC von α -Tocopherol

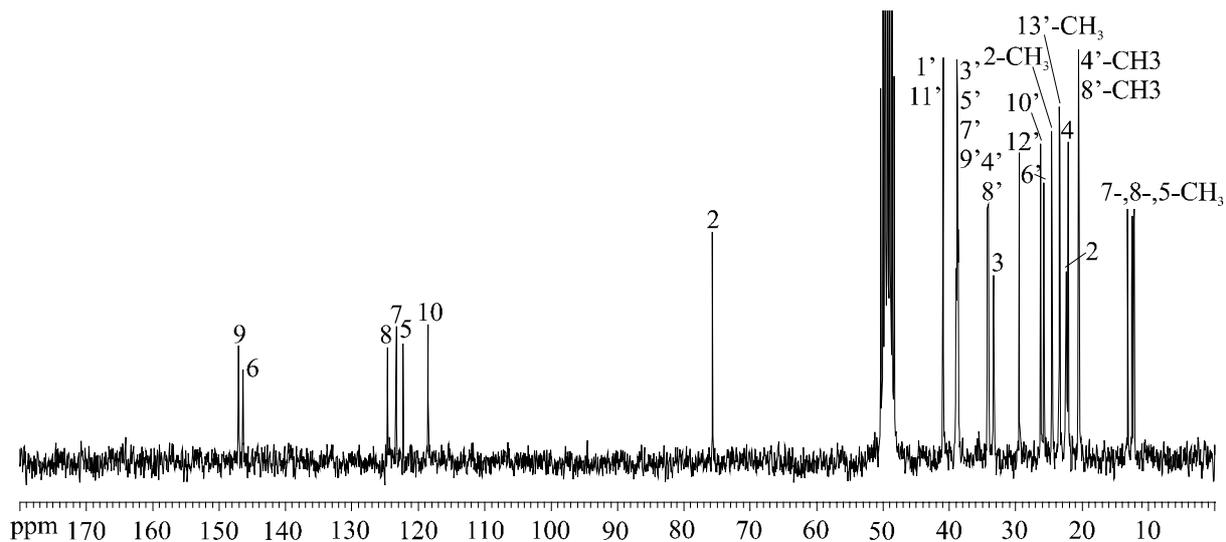


Abbildung 22: ^{13}C -NMR-Spektrum von α -Tocopherol

5.1.4 Extraktion von Tocopherolen aus Zahncreme

Im Rahmen der Studie wurden zwei Tocopherol-haltige Zahncremes untersucht, die sich in den Konzentrationen an Tocopherolen unterschieden. Dabei enthielt die eine Zahncreme laut Herstellerangaben 0,2 % Tocopherole, während die andere 1,0 % enthalten sollte. Im Folgenden wird exemplarisch die 0,2 %ige Zahncreme untersucht.

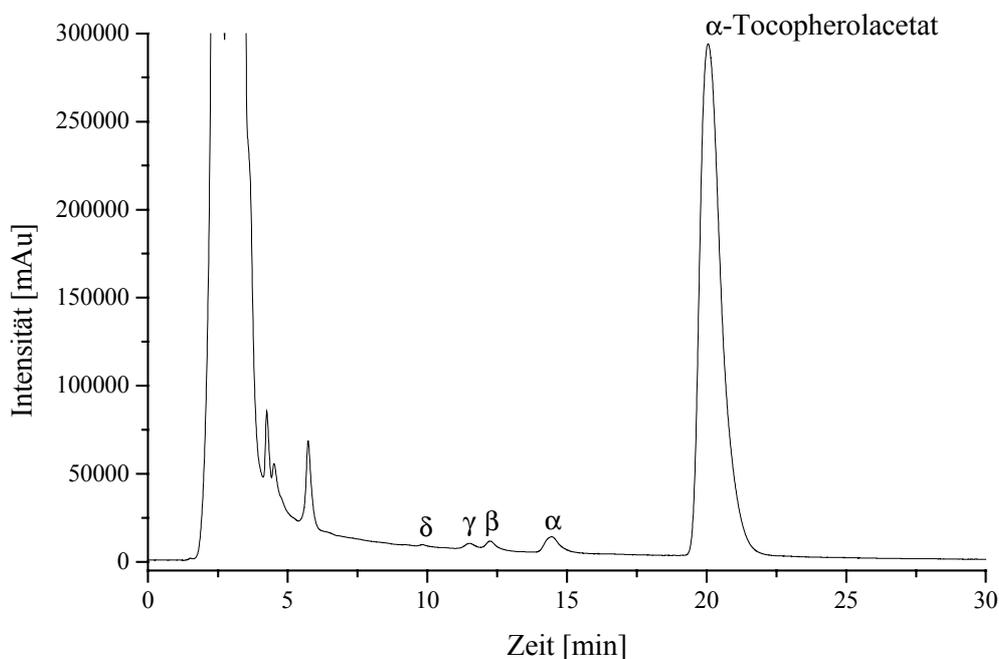


Abbildung 23: Chromatogramm eines Extraktes aus Zahncreme mit 0,2 % Tocopherolen in Methanol

Zunächst einmal war es wichtig, die Tocopherole möglichst quantitativ und schonend aus der Zahncreme zu extrahieren. Dazu wurde die Zahncreme mit Methanol vermischt, bis das Bindemittel ausflockte. Nun wurde das Gemisch 15 min lang mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurden die ungelösten Stoffe mit einem 45 μm -Filter abgetrennt, um ein Verstopfen der Trennsäule zu vermeiden. Eine 20 μl -Portion des Filtrats wurde nun auf eine C_{30} -Trennsäule injiziert und mit einer mobilen Phase bestehend aus reinem Methanol aufgetrennt. Das erhaltene Chromatogramm ist in Abbildung 23 dargestellt.

Die Integration der Peaks der verschiedenen Tocopherol-Homologen erlaubt nun eine Berechnung der prozentualen Zusammensetzung der Zahncreme. Tabelle 3 zeigt die dabei erhaltenen Ergebnisse. Laut Herstellerangaben wurde nur α -Tocopherolacetat der Zahncreme zugegeben, da dieses weniger anfällig gegen Oxidation ist als die übrigen Tocopherole. Tatsächlich konnten jedoch auch α -, β -, γ -, und δ -Tocopherol in geringen Mengen gefunden werden. Der Grund dafür liegt in Verunreinigungen im α -Tocopherolacetat, welches laut Herstellerangaben nur eine 98 %ige Reinheit besitzt.

Name	Anteil in Zahncreme
	[%]
α -Tocopherol	1,8
β -Tocopherol	0,7
γ -Tocopherol	0,7
δ -Tocopherol	0,1
α -Tocopherolacetat	96,7

Tabelle 3: Prozentuale Zusammensetzung der Tocopherole in der 0,2 %igen Zahncreme

5.1.5 Extraktion von Tocopherolen aus Zahnfleisch

Der Schwerpunkt der Studie lag auf der Untersuchung der Zahnfleischproben von Probanden, die ihre Zähne im Vorfeld der Studie mit Tocopherol-haltiger Zahncreme geputzt hatten, um nachzuweisen, ob sich die Tocopherole in dem Zahnfleisch anreichern. Diese Anreicherung ist notwendig, damit die Tocopherole aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften eine protektive oder kurative Wirkung auf das Zahnfleisch entwickeln können.

Zunächst einmal wurden Zahnfleischproben von Probanden, die keine Vorbehandlung mit Tocopherol-haltiger Zahncreme durchgeführt hatten, untersucht. Diese Kontrollgruppe unterteilte sich in zwei Untergruppen, den gesunden Testpersonen und den Probanden, die an Gingivitis leiden.

Bei der Untersuchung der beiden Kontrollgruppen ging es darum nachzuweisen, dass nur sehr geringe Mengen an Tocopherolen im Zahnfleisch vorliegen. Die Tocopherole wurden dazu mit Hilfe der MSPD aus den Zahnfleischproben extrahiert. Anschließend wurden sie nach der in Abschnitt 5.1.2 beschriebenen Methode auf einer hochselektiven C₃₀-Trennsäule mit Methanol als mobiler Phase chromatographisch analysiert. Ein beispielhaftes Chromatogramm ist in Abbildung 24 dargestellt.

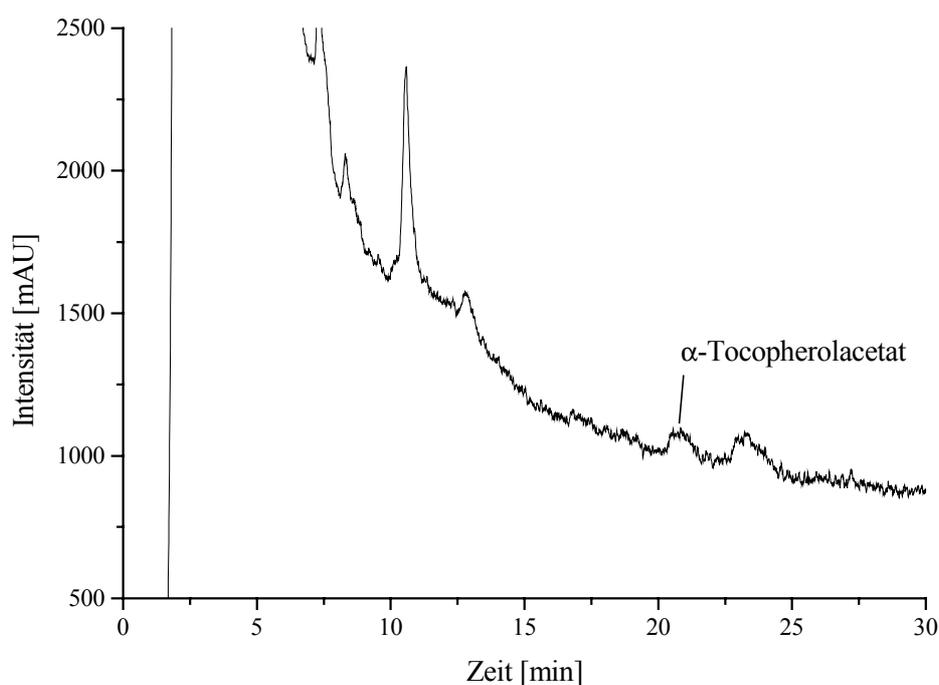


Abbildung 24: Chromatogramm eines Extraktes aus unbehandeltem Zahnfleisch nach MSPD (gesunder Proband, keine Vorbehandlung)

Es ist zu beobachten, dass bei den Retentionszeiten, die für die verschiedenen Tocopherol-Homologe zu erwarten wären, keine bzw. nur minimale Peaks auftreten. Vor allem interessant sind die nur in vereinzelt Proben zu findenden Peaks von α -Tocopherolacetat bei ca. 21 min, da es das in der Zahncreme hauptsächlich vorkommende Tocopherol-Derivat ist, auf dem der Schwerpunkt der Untersuchungen zur Anreicherung liegen wird.

Proband Nr., gesund	Menge von α -Toco- acetat im Zahnfleisch [ng/mg]	Proband Nr., Gingivitis	Menge von α -Toco- acetat im Zahnfleisch [ng/mg]
271	3,1	460	8,2
276	8,1	462	-*
281	28,0	464	-*
287	1,2	467	-*
Durchschnitt	10,1 (4,1 ohne 281)	469	-*
		475	-*
		477	-*
		478	1,1
		482	-*
		Durchschnitt	1,0

*: nicht nachweisbar

Tabelle 4: Ergebnisse der Untersuchung der Zahnfleischproben der Kontrollgruppen auf α -Tocopherolacetat; links gesund, rechts an Gingivitis leidend

Die Ergebnisse der Untersuchungen der Zahnfleischproben der beiden Kontrollgruppen bezüglich der Anwesenheit von α -Tocopherolacetat sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Bei allen Testpersonen konnten nur sehr geringe Mengen oder kein α -Tocopherolacetat nachgewiesen werden. Dabei ist auffallend, dass der Durchschnitt von α -Tocopherolacetat bei an Gingivitis erkrankten Probanden mit 1 ng/mg Zahnfleisch niedriger liegt als der von gesunden Testpersonen (10,1 ng/mg, ohne Proband Nr. 281 4,1 ng/mg Zahnfleisch).

Zusätzlich zu den beiden Kontrollgruppen wurden jetzt Zahnfleischproben der drei Probandengruppen mit Gingivitis untersucht, die ihre Zähne vor der Biopsie mit Tocopherol-haltiger Zahncreme vorbehandelt hatten. Dabei putzte die erste Gruppe von Testpersonen ihre Zähne mit der Zahncreme, die 0,2 % Tocopherole enthält, während die zweite Gruppe von Probanden ihre Zähne analog mit der 1,0 %igen Zahncreme behandelte. Die dritte Gruppe putzte sich ebenfalls die Zähne mit der Zahncreme mit 1,0 % Tocopherolen, zusätzlich benutzte sie jeden Abend eine Schiene, die sie mit der 1,0 %igen Zahncreme gefüllt hatten.

Die Extraktion der Tocopherole aus den vorbehandelten Zahnfleischproben erfolgte analog zu denen der Kontrollgruppe mittels MSPD, gefolgt von der chromatographischen Analyse auf einer C₃₀-Trennsäule und Methanol als mobiler Phase. Abbildung 25 zeigt ein exemplarisches Chromatogramm nach Behandlung mit 0,2 %iger Zahncreme.

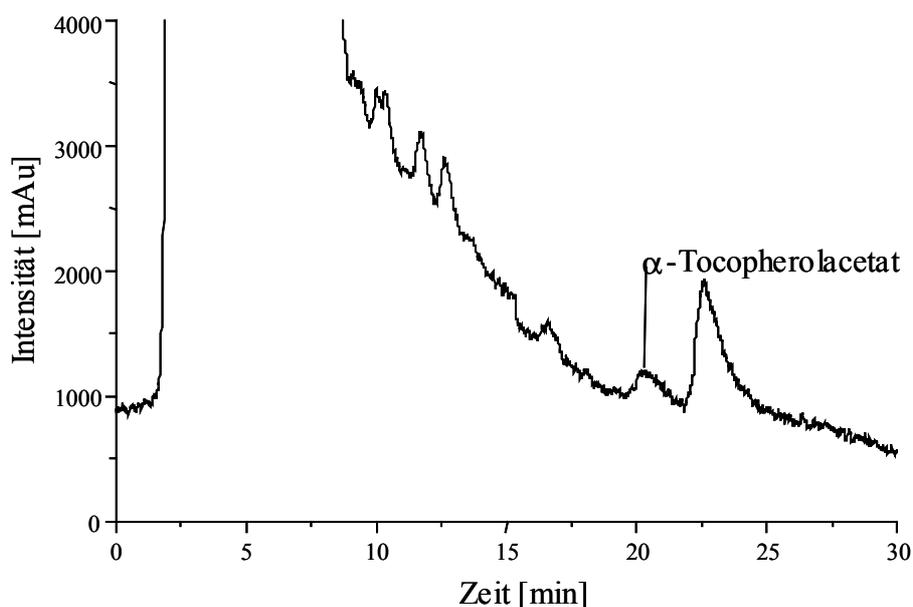


Abbildung 25: Chromatogramm eines Extraktes aus vorbehandeltem Zahnfleisch nach MSPD (Proband mit Gingivitis, Vorbehandlung mit 0,2 %iger Zahncreme)

Im Chromatogramm kann nun bei ca. 21 min ein deutlicher Peak erkannt werden, der mittels HPLC-APCI-MS-Kopplung (vgl. Abschnitt 5.1.6) als α -Tocopherolacetat identifiziert werden kann. Somit ist nachgewiesen, dass tatsächlich α -Tocopherol-

acetat im Zahnfleisch angereichert wird, welches dann einen positiven Effekt auf die orale Hygiene entfalten kann.

Proband Nr., 0,2 %	Menge von α -Toco- acetat im Zahnfleisch
	[ng/mg]
455	50,7
459	4,0
465	25,4
470	9,1
476	27,2
Durchschnitt	23,3

Proband Nr., 1,0 %	Menge von α -Toco- acetat im Zahnfleisch
	[ng/mg]
453	58,0
461	-*
468	70,7
471	339,7
479	14,5
483	9,1
Durchschnitt	82,0 (30,5 ohne 471)

Proband Nr., 1,0 %, Schiene	Menge von α -Toco- acetat im Zahnfleisch
	[ng/mg]
454	52,2
463	12,7
466	1,5
481	1,9
Durchschnitt	17,1

*: nicht nachweisbar

Tabelle 5: Ergebnisse der Untersuchung der Zahnfleischproben nach Behandlung mit Tocopherol-haltiger Zahncreme (0,2 und 1,0 %, bzw. 1,0 % und Schiene)

Vergleicht man die gefundenen Mengen an α -Tocopherolacetat aus den verschiedenen Arten von Vorbehandlung miteinander (vgl. Tabelle 5), so kann keine erhöhte Anreicherung bei Verwendung der höher konzentrierten Zahncreme gefunden

werden. Das bedeutet, dass eine Konzentration von 0,2 % Tocopherolen in der Zahncreme schon ein Maximum an Anreicherung hervorruft und die Verwendung einer höheren Menge an Tocopherolen keine weiteren Vorteile mit sich bringt.

5.1.6 Massenspektrometrische Untersuchungen von mit Tocopherol-haltiger Zahncreme behandeltem Zahnfleisch

Nachdem bei der chromatographischen Trennung eines Extrakts aus mit Tocopherol-haltiger Zahncreme behandeltem Zahnfleisch ein Peak bei 21 min auftrat, der aufgrund der Retentionszeit auf α -Tocopherolacetat hinweist, ist es nun notwendig, diese Vermutung durch eine massenspektrometrische Untersuchung zu validieren. Dazu wurde die Kopplung der HPLC mit der Massenspektrometrie eingesetzt. Als Ionisierungsmethode dient, aufgrund der Unpolarität der Tocopherole, die APCI im positiven Ionen-Modus.

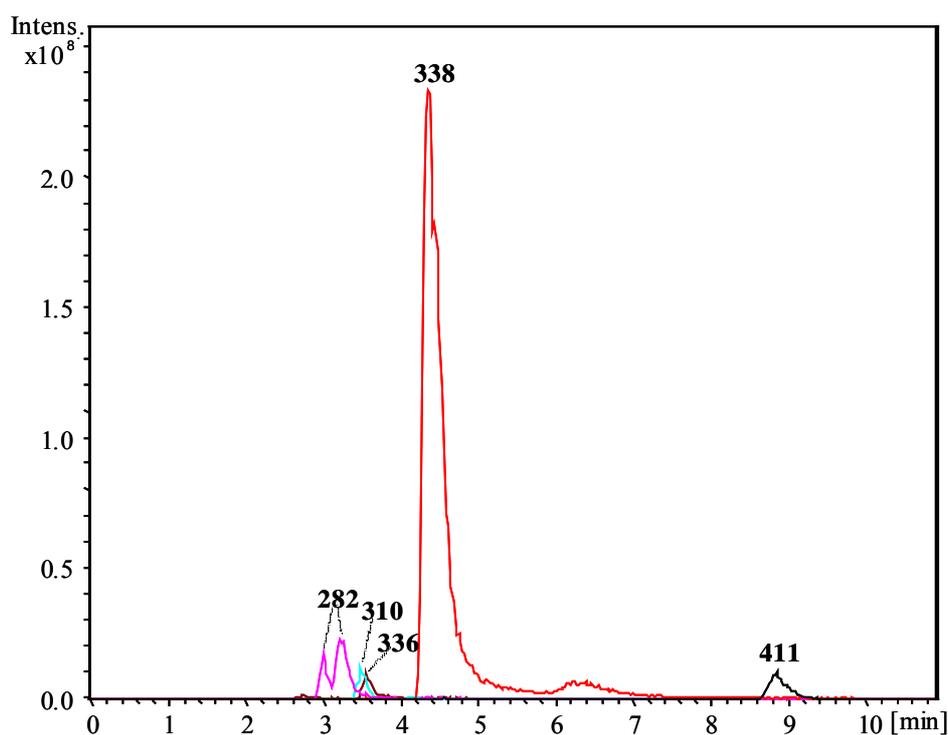


Abbildung 26: Base Peak Chromatogramme (BPC) der Matrixkomponenten eines Zahnfleischextraktes mit m/z 282, 310, 336, 338 und 411

Zunächst war es notwendig, die Chromatographie an die Massenspektrometrie anzupassen. Dies wurde durch den Einsatz einer dünneren Trennsäule (2 mm anstatt 4,6 mm) erreicht, wobei gleichzeitig die Retentionszeiten etwas verkürzt wurden.

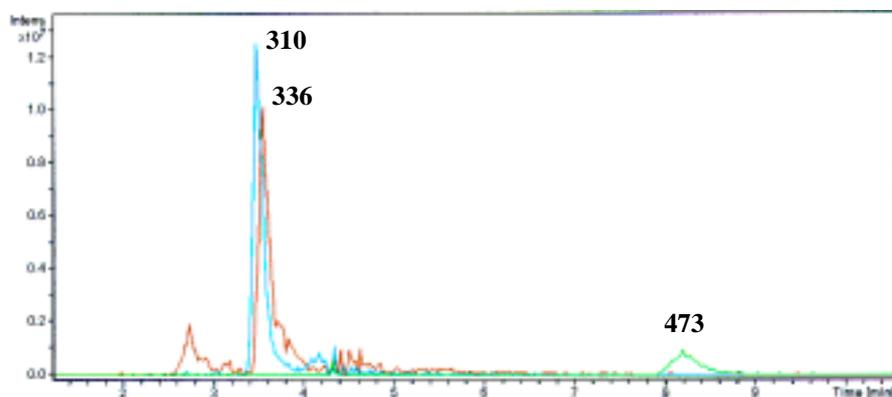


Abbildung 27: Vergrößerung von Abbildung 26 mit BPC von m/z 310, 336 und 473 (α -Tocopherolacetat)

Das Spektrum des Zahnfleischextraktes wird durch die Base Peak Chromatogramme (BPC) der Matrixkomponenten (beispielsweise BPC von m/z 338) dominiert, wie es in Abbildung 26 gezeigt wird. Dennoch kann man bei ca. 8,2 min einen deutlichen Peak im BPC von 473 erkennen (Abbildung 27). Das Masse-zu-Ladungsverhältnis 473 ist dabei der protonierten Molekülmasse von α -Tocopherolacetat zuzuordnen.

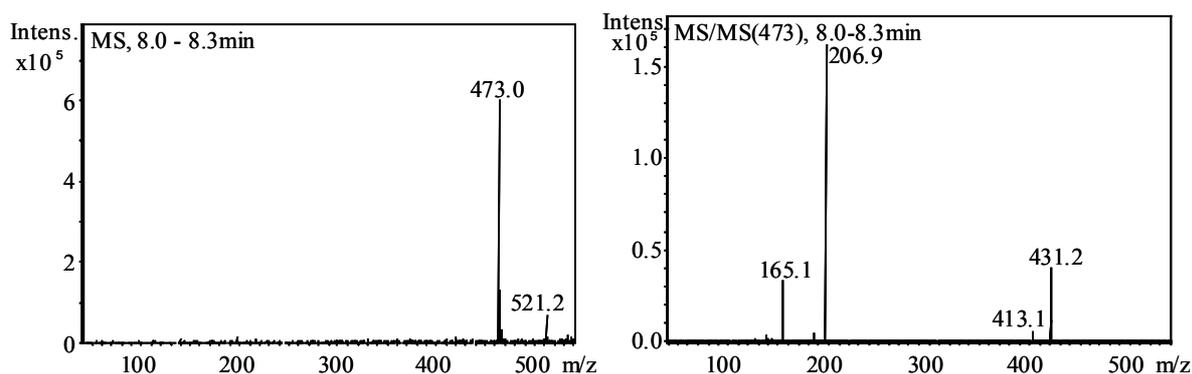


Abbildung 28: Massenspektrum (links) und MS/MS-Spektrum (rechts) von α -Tocopherolacetat eines Extraktes aus mit Tocopherol-haltiger Zahncreme behandeltem Zahnfleisch

Abbildung 28 zeigt vergleichend das Massenspektrum und das MS/MS-Spektrum des α -Tocopherolacetat-Peaks bei 8,2 min. Dabei liegt im Massenspektrum aufgrund der schonenden Ionisierungsmethode APCI vorwiegend der Peak der protonierten Molekülmasse vor. Im MS/MS-Spektrum dagegen kann das für Tocopherole charakteristische Fragmentierungsmuster beobachtet werden.

Das MS/MS-Spektrum von α -Tocopherolacetat enthält als Hauptkomponente einen Peak mit m/z 207. Dieses Fragment ergibt sich aus einer Retro-Diels-Alder-Reaktion, die in Abbildung 29 schematisch dargestellt ist.

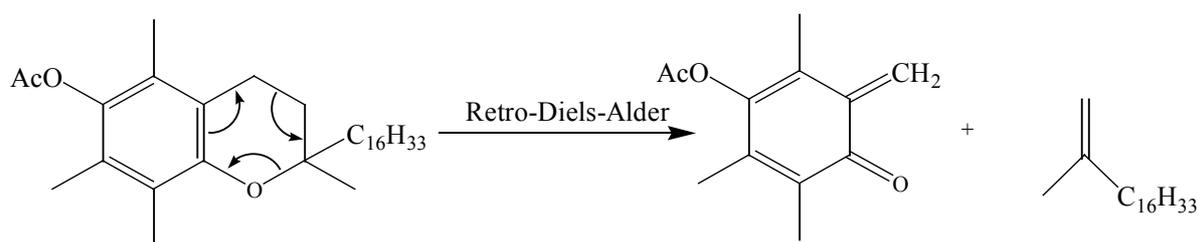


Abbildung 29: Retro-Diels-Alder-Reaktion bei der Fragmentierung von α -Tocopherolacetat

Darüber hinaus ist α -Tocopherolacetat in der Lage, seine Acetatgruppe abzuspalten, was in der Entstehung von α -Tocopherol mit m/z 431 resultiert. Zusätzlich ist die Abspaltung der Acetatgruppe auch im Anschluß an die Retro-Diels-Alder-Reaktion möglich, dadurch ergibt sich das Fragment mit m/z 165.

5.2 Bioverfügbarkeit von Carotinoiden aus intrinsisch gelabeltem Gemüse

5.2.1 Design der Studie

Während der letzten Jahre haben klinische und epidemiologische Studien gezeigt, dass die erhöhte Einnahme des Carotinoids Lutein positive Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit haben kann. Dabei ist Lutein aufgrund seiner antioxidativen Fähigkeiten in der Lage, Zellen und Organismen gegen photooxidative Schäden zu schützen. Vor allem die inverse Korrelation zwischen der Lutein-Einnahme und dem Gefahr, an altersbedingter Makular-Degeneration und Katarakt zu erkranken, ist hierbei hervorzuheben. Darüber hinaus deuten epidemiologische Studien verminderte Risiken bezüglich der Pathogenese von koronaren Herzkrankheiten, Apoplexie, sowie der Entwicklung von bösartigen Tumoren in Brust, Lunge, Darm und Prostata an^[1].

Leider war es bisher nicht möglich, die absolute Bioverfügbarkeit von Carotinoiden, weder aus natürlichen Quellen noch aus Supplementen, zu bestimmen. Dadurch ist es auch noch zu früh, um eine Supplementierung mit Lutein zu empfehlen, da die Carotinoide bei einer Überdosierung aufgrund ihrer dann prooxidativen Effekte sogar schädliche Auswirkungen auf die Gesundheit haben können^[87].

Im Rahmen der in Kooperation mit dem USDA Human Nutrition Research Center (HNRC) on Aging der Tufts University in Boston, USA, durchgeführten Studie wurde ein neuartiger Weg zur Bestimmung der Anreicherung von Carotinoiden, in diesem Fall Lutein, begangen, mit dem es auch möglich wird, die absolute Bioverfügbarkeit zu bestimmen.

Dabei wurde Spinat in speziellen Gewächskammern hydroponisch in 25 Atom-% deuteriertem Wasser gezüchtet. Dies führt dazu, dass alle Pflanzeninhaltsstoffe, also auch das im Spinat vorhandene Lutein, teilweise deuteriert vorliegen. Zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit wurde dieser intrinsisch gelabelte Spinat nun Probanden verabreicht.

Die Probanden für diese Studie waren gesunde, nicht-rauchende Männer zwischen 51 und 72 Jahren mit Body Mass Indices (BMI) zwischen 22,9 und 27,3 kg/m². Die

Testpersonen durften innerhalb des letzten Monats vor dem Versuch keine Vitamin-Supplemente zu sich nehmen und wurden aufgefordert, während der zwei Wochen vor dem Versuch größere Mengen an dunkelgrünem Blattgemüse, Möhren und Leber zu vermeiden. Die detaillierten Charakteristiken der Probanden sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Proband	Alter	Gewicht	BMI	Menge Spinat-Suppl. / Charge	Menge an deut. Lutein suppl.
		[kg]	[kg/m ²]	[g]	[mg]
1	51	79,4	26,7	400	43,68
2	59	86,2	27,3	400	43,68
3	53	79,4	26,7	300	34,05
4	56	81,7	25,2	300	34,05
5	72	68,0	22,9	300	34,05
6	53	74,8	24,4	300	34,05
7	67	87,5	27,0	300	34,05

Tabelle 6: Charakteristische Daten der Probanden der Bioverfügbarkeitsstudie mit intrinsisch gelabeltem Spinat

Den Probanden wurde nun am ersten Tag des Experiments eine Portion von 300 bzw. 400 g gekochtem, püriertem Spinat zusammen mit einem flüssigen Frühstück, das 35 % der Kalorien aus Fett beinhaltete, verabreicht. Im Anschluß an diese Supplementierung lebten die Testpersonen zwei Wochen lang mit einer Carotinoid-freien Diät am HNRC, bis sie dann zu ihrer üblichen Lebensweise nach Hause entlassen wurden.

Zur Verfolgung der Aufnahme der Carotinoide wurden den Probanden vor und in regelmäßigen Zeitabständen nach der Supplementierung Blutproben abgenommen. Dabei erfolgte die Entnahme zunächst in zweistündigen Intervallen, später wurden die Blutproben täglich entnommen. Die wichtigsten Daten bezüglich der Lebensweise und Entnahme der Blutproben sind zur Veranschaulichung in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Tag	Art der Nahrung	Zeitpunkte der Entnahme der Blutproben
2 Wochen vor Supplementierung	Carotinoid-arme Ernährung	-
0. Tag	Supplementierung mit deuteriertem Spinat	vorher und nach 3, 5, 7, 9, 11 und 13 Stunden
0. bis 13. Tag	Carotinoid-freie Ernährung	täglich
14. bis 35. Tag	frei wählbar	jeden zweiten Tag

Tabelle 7: Zeitliche Planung der Bioverfügbarkeitsstudie

5.2.2 Aufzucht, Vorbereitung und Analyse des intrinsisch gelabelten Spinats

Der intrinsisch gelabelte Spinat wurde am USDA Children’s Nutrition Research Center in Houston, USA, von Prof. M. A. Grusak gezüchtet. Dabei wurden die Pflanzen in einer speziellen Nährlösung, die mit 25 Atom-% deuteriertem Wasser versetzt war, hydroponisch angebaut. Der Spinat wurde auf diese Weise 4 Wochen lang in einer speziellen Gewachskammer gehalten, bis er geerntet wurde. Der Aufbau der Gewachskammer ist in Abbildung 30 dargestellt.

Die Spinatblätter wurden dann am HNRC der Tufts University in Boston, USA, gewogen, zerkleinert und blanchiert. Anschließend wurde das Gemüse püriert, portioniert und bis zur Analyse bzw. Verwendung in der Bioverfügbarkeitsstudie bei -80 °C tiefgekühlt gelagert.

Vor der Durchführung der Supplementierungsstudie war es zunächst notwendig, eine quantitative Analyse des im Spinat vorhandenen Luteins durchzuführen. Zu diesem Zweck wurden die Carotinoide aus 500 mg des Spinats mit Methanol und THF extrahiert und der Carotinoid-Extrakt auf einer hochselektiven C₃₀-Trennphase unter Verwendung eines Gradienten bestehend aus Methanol, TBME und Wasser aufgetrennt. Das erhaltene Chromatogramm ist in Abbildung 31 a) gezeigt.

Die Quantifizierung ergibt, dass in den zwei nacheinander gezüchteten Chargen an gelabeltem Spinat 11,35 bzw. 10,24 mg an deuteriertem Lutein pro 100 g Spinat vorlagen.



Abbildung 30: Gewächskammer zum Anbau des intrinsisch gelabelten Spinates

Anhand des Massenspektrums des gelabelten Luteins kann erkannt werden, dass nur eine teilweise Deuterierung vorliegt, die in der Verwendung von lediglich 25 Atom-% deuteriertem Wasser begründet ist. Eine Verwendung von volldeuteriertem Wasser ist nicht möglich, da die Pflanzen sonst eingehen. Die am häufigsten vorkommende Markierung besteht aus acht Deuteriumatomen, was im Massenspektrum (vgl. Abbildung 31 b)) in einem Molekülionenpeak von m/z 559 resultiert. Dieser entspricht der protonierten Masse des achtfach deuterierten Luteins abzüglich eines Wassermoleküls. Aber auch andere Mengen von Deuteriumatomen können im gelabeltem Lutein vorliegen, diese sind im Massenspektrum in einem gaussförmigen Isotopomerenprofil um den häufigsten Deuterierungsgrad angeordnet.

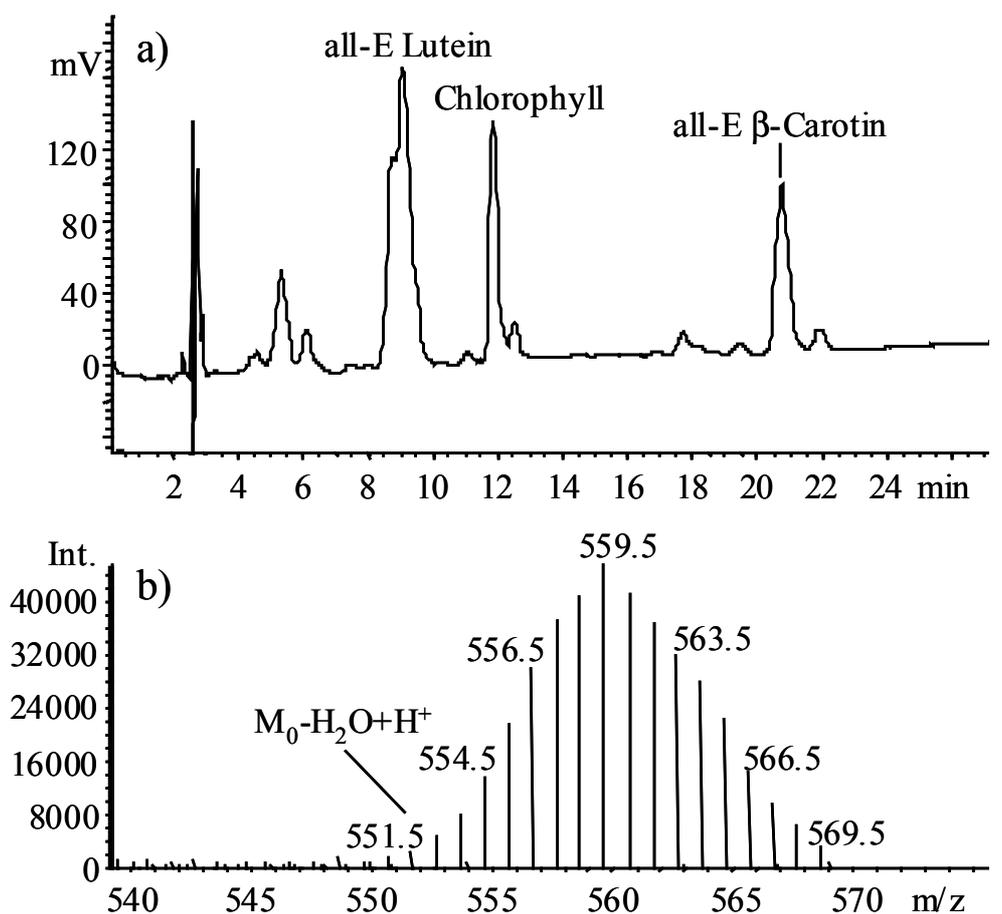


Abbildung 31: a) HPLC-Chromatogramm der Carotinoide in intrinsisch gelabeltem Spinat und b) gaussförmige Isotopomer-Verteilung des deuterierten Luteins

5.2.3 Untersuchung der Anreicherung von Lutein aus partiell deuteriertem Spinat mittels HPLC-UV- und HPLC-APCI-MS-Kopplung

Die den Probanden vor und in regelmäßigen Zeitabständen nach der Supplementierung mit gelabeltem Spinat entnommenen Blutproben wurden nun auf ihren Carotinoidgehalt hin untersucht. Dazu wurden die Carotinoide unter Rotlicht mit Hilfe von Methanol, Chloroform und Hexan aus dem Serum extrahiert. Anschließend wurde der Carotinoid-Extrakt auf einer C_{30} -Trennphase mit einem Gradienten bestehend aus Methanol, TBME und Wasser chromatographisch getrennt. Abbildung 32 zeigt beispielhaft eines der erhaltenen Chromatogramme.

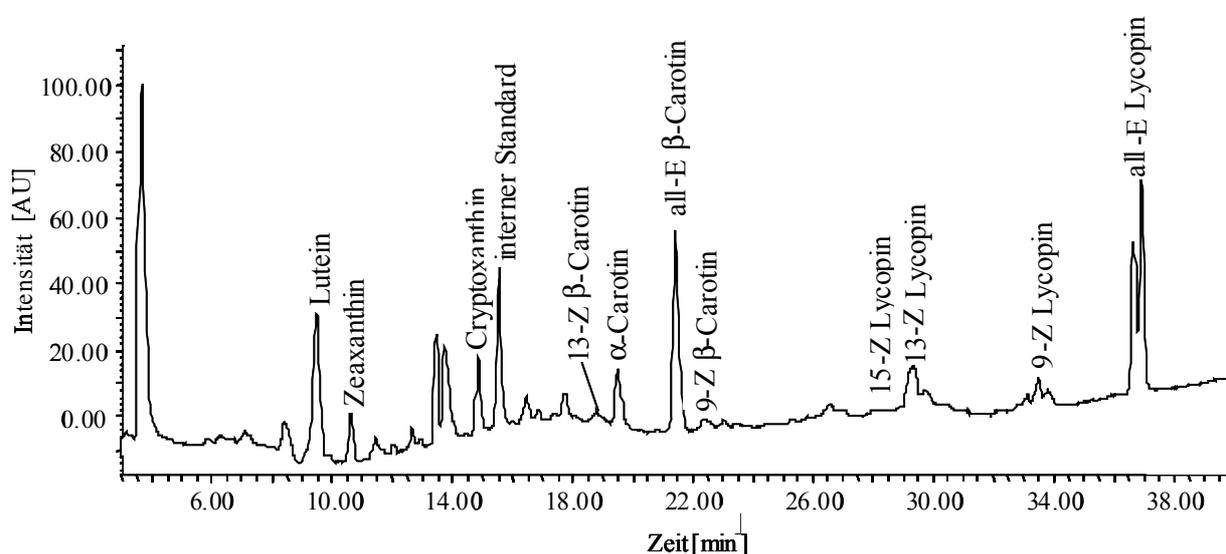


Abbildung 32: Chromatographische Trennung eines Carotinoid-Extraktes aus menschlichem Serum

Das im Rahmen dieser Studie betrachtete Carotinoid Lutein eluiert nach etwa 9,5 min. Die Quantifizierung der Lutein-Peaks über den internen Standard Echinenon ergibt für die verschiedenen Probanden die in Tabelle 8 zusammengestellten Werte der Grundlevel vor der Supplementierung und der maximalen Anreicherungsweite am Zeitpunkt der maximalen Anreicherung.

Dabei ist auffällig, dass die Anfangsniveaus an Lutein, die vor der Supplementierung gemessen wurden, mit Werten zwischen 3,85 und 15,62 μg pro 100 ml Serum sehr unterschiedlich sind. Diese Unterschiede dürften vor allem Dingen

die Ernährungsgewohnheiten der Probanden widerspiegeln. Die Anreicherungsfaktoren bezogen auf das Luteinlevel bei maximaler Anreicherung schwanken zwischen 1,55 und 2,83. Dabei haben die Testpersonen mit niedrigen Ausgangswerten eine Tendenz zu höheren Anreicherungsfaktoren, da die gegebene Dosis an gelabeltem Spinat eine größere Änderung des Luteinspiegels bewirkt.

Proband	Lutein-Grundlevel	Level Lutein bei max. Anreicherung	Zeitpunkt max. Anreicherung
	[$\mu\text{g}/100 \text{ ml Serum}$]	[$\mu\text{g}/100 \text{ ml Serum}$]	
1	4,64	13,12	11 h
2	8,93	16,83	11 h
3	7,45	21,11	1 d
4	9,63	26,63	13 h
5	15,62	29,21	13 h
6	3,85	10,41	1 d
7	7,90	12,25	2 d

Tabelle 8: Zusammenstellung der Luteinlevels der Probanden vor und nach Supplementierung mit gelabeltem Spinat nach Auswertung der HPLC-Chromatogramme

Die Kopplung der chromatographischen Trennung mit der Detektionsmethode Massenspektrometrie (Ionisierung via Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI) ermöglicht die Unterscheidung zwischen dem gelabelten Lutein aus der Supplementierung und dem ungelabelten Lutein, das im Körper gespeichert ist. Dazu werden die Ionenspuren (Selected Ion Chromatograms, SIC) des Masse-zu-Ladungsverhältnis-Bereichs von m/z 551 bis 554 bzw. 556-563 betrachtet. Der Bereich von m/z 551-554 ist dem undeutierten Lutein zugeordnet, er entspricht dem Molekülion von Lutein abzüglich eines Moleküls Wasser ($\text{Lutein} + \text{H}^+ - \text{H}_2\text{O}$). Die Region mit m/z 556-563 (aufgrund von Verunreinigungen wird kein größerer Bereich gewählt) ergibt sich für das deuterierte Lutein mit dem häufigsten Anreicherungsgrad von acht Deuteriumatomen und der gaussförmigen Isotopomer-Verteilung um dieses Maximum.

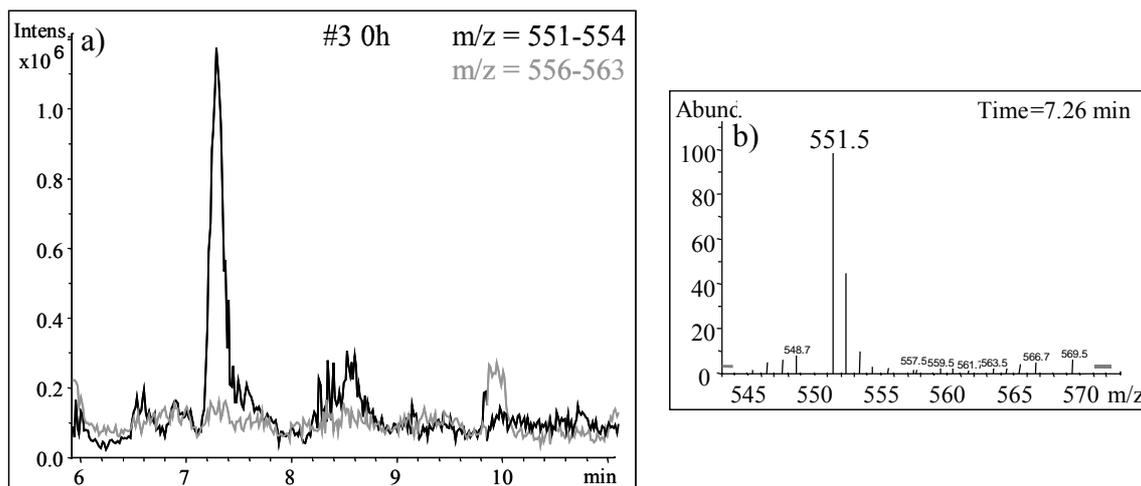


Abbildung 33: a) SICs von undeutertem (m/z 551-554) und deuteriertem (m/z 556-563) Lutein vor der Supplementierung mit gelabeltem Spinat (Proband #3) und b) Massenspektrum am Peakmaximum

In Abbildung 33 a) sind beispielhaft die SICs von deuteriertem und undeutertem Lutein eines Carotinoid-Extraktes (Proband #3) vor der Supplementierung mit gelabeltem Lutein dargestellt. Es kann beobachtet werden, dass nur der SIC des undeuterten Luteins mit m/z 551-554 einen Peak bei einer Retentionszeit von 7,2 min (zeitliche Verschiebung aufgrund einer Optimierung der chromatographischen Bedingung auf die Detektion von Lutein) zeigt. Auch das Massenspektrum am Peakmaximum (Abbildung 33 b)) zeigt einen Hauptpeak bei m/z 551.

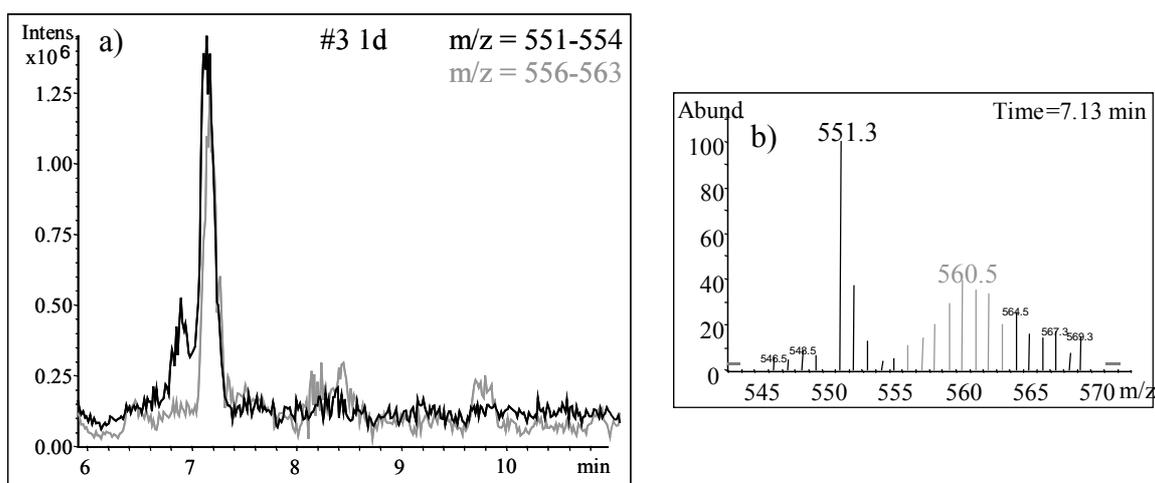


Abbildung 34: a) SICs von undeutertem (m/z 551-554) und deuteriertem (m/z 556-563) Lutein 1 Tag nach der Supplementierung mit gelabeltem Spinat (Proband #3) und b) Massenspektrum am Peakmaximum

Im Gegensatz dazu kann in dem SIC von deuteriertem Lutein mit m/z 556-563 aus einem Serum-Extrakt, der einen Tag nach der Supplementierung mit gelabeltem Spinat entnommen wurde (Proband #3), ein deutlicher Peak bei 7,1 min beobachtet werden. Das entsprechende Chromatogramm ist in Abbildung 34 a) gezeigt. Im Massenspektrum am Peakmaximum (Abbildung 34 b)) ist nun neben dem Hauptpeak von undeuteriertem Lutein bei m/z 551 auch die gaussförmige Isotopomer-Verteilung des deuterierten Luteins zu erkennen.

5.2.4 Berechnung der Anreicherung

Zur Berechnung der relativen Bioverfügbarkeit, wie die Anreicherung in der Literatur häufig auch bezeichnet wird, ist zunächst eine Quantifizierung der Peaks des deuterierten und undeuterierten Luteins aus den LC-MS-Messungen notwendig. Nachdem die Peaks aus den SICs von m/z 551-554, die dem undeuterierten Lutein zugeordnet wurden, und m/z 556-563 des deuterierten Luteins integriert wurden, kann die Anreicherung des supplementierten Luteins im Serum durch die Formel

$$\text{Anreicherung} [\%] = \frac{S_{\text{deuteriert}} \cdot 100}{S_{\text{deuteriert}} + S_{\text{undeuteriert}}}$$

berechnet werden. Dabei sind $S_{\text{undeuteriert}}$ und $S_{\text{deuteriert}}$ die Integrale der Peaks in den beiden SICs.

Die Berechnung der Anreicherung wird für jeden Zeitpunkt, an dem dem Probanden Blut entnommen wurde, durchgeführt. Werden nun die berechneten Werte gegen die Zeit aufgetragen, so ergibt sich für jeden Probanden eine individuelle Absorptions-Desorptions-Kurve. Die im Rahmen der Supplementierung mit deuteriertem Lutein erhaltenen Kurven sind in Abbildung 35 zusammengestellt.

Die größten Anreicherungsraten werden ein bzw. zwei Tage nach der Aufnahme des gelabelten Spinats gefunden. Die maximale Anreicherung beträgt dabei zwischen 28 und 54 %. Hierbei sind die Unterschiede in den Anreicherungsraten durch die verschiedenen Grundlevels an Lutein im Serum zu erklären, da ein niedriges Serumlevel eine stärkere Veränderung ermöglicht.

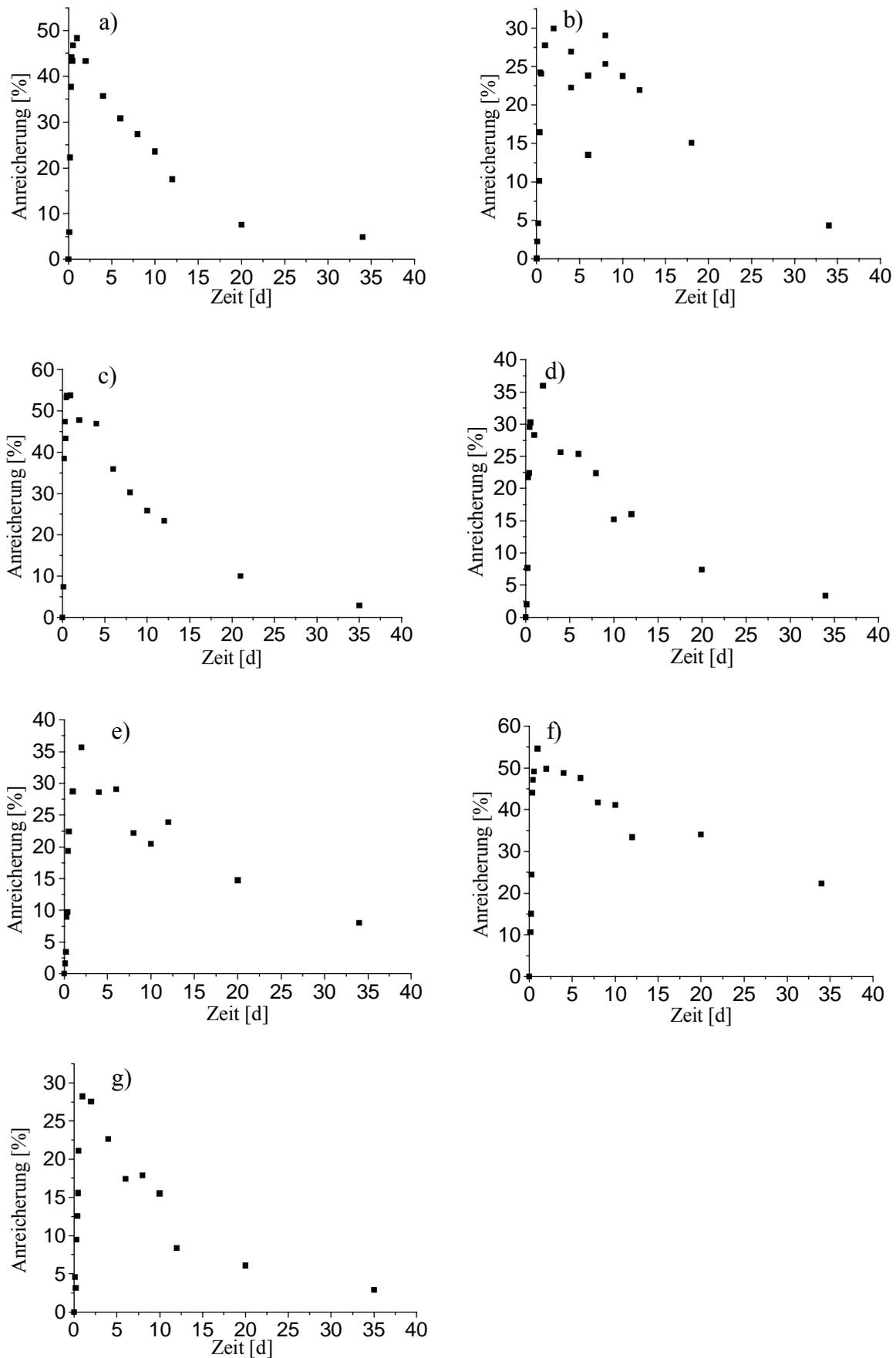


Abbildung 35: Anreicherungskurven aller Probanden, a) - g) entspricht Proband 1-7

Um die Absolutmenge an absorbiertem Lutein zu bestimmen, wird die Anreicherung jetzt mit der Gesamtmenge an Lutein in der Serumprobe ($c_{\text{Lutein total}}$), die durch die Quantifizierung der HPLC-Chromatogramme bestimmt wurde, und das geschätzte Volumen an Blut in dem Probanden (V) multipliziert. Das Volumen an Blut in einem Menschen wird dabei mit der Formel

$$V = 927[\text{ml}] + (31.47[\text{ml} / \text{kg}] \cdot m[\text{kg}])$$

angenähert. Die Absolutmenge an absorbiertem Lutein pro Meßpunkt ergibt sich nun zu

$$c_{\text{deut. Lutein}} = \text{Anreicherung} \cdot c_{\text{Lutein total}} \cdot V$$

In Tabelle 9 sind die maximale Anreicherungsrate und die sich zum Zeitpunkt der maximalen Anreicherung ergebenden Absolutmengen an absorbiertem, deuteriertem Lutein der sieben Probanden zusammengestellt.

Proband	maximale Anreicherungsrate	Zeitpunkt max. Anreicherung	Menge an absorb. deut. Lutein bei max. Anreich.
	[%]	[d]	[μg]
1	48,4	1	194,9
2	30,0	2	169,6
3	53,8	1	388,5
4	36,0	2	281,4
5	35,7	2	276,5
6	54,7	1	186,6
7	28,2	1	124,2

Tabelle 9: Maximale Anreicherungsraten und Absolutmengen an absorbiertem Lutein

5.2.5 Berechnung der absoluten Bioverfügbarkeit

Die absolute Bioverfügbarkeit wird nun nach der pharmakologischen Definition

$$\text{Bioverfügbarkeit} [\%] = \frac{AUC_{\text{absorb. orale Dosis}}}{AUC_{\text{absorb. intraven. Dosis}}} \cdot 100 [\%]$$

berechnet. Das bedeutet, dass der Quotient der Integrale (area under curves, AUC) einer absorbierten, oralen Dosis und einer absorbierten, intravenösen Dosis bestimmt werden muß^[183].

Im Falle der Carotinoide kann das Integral der oralen Dosis leicht aus den Absorptions-Desorptions-Kurven, die aus den Anreicherungsraten bestimmt wurden, bzw. den Absolutmengen an absorbiertem Lutein berechnet werden. Leider ist es jedoch nicht möglich, Carotinoide intravenös zu verabreichen, da diese in einer wässrigen Umgebung unlöslich sind. Aus diesem Grund muß eine theoretische intravenöse Dosis extrapoliert werden. Zur Veranschaulichung ist eine graphische Darstellung der Berechnung der absoluten Bioverfügbarkeit in Abbildung 36 zusammengestellt.

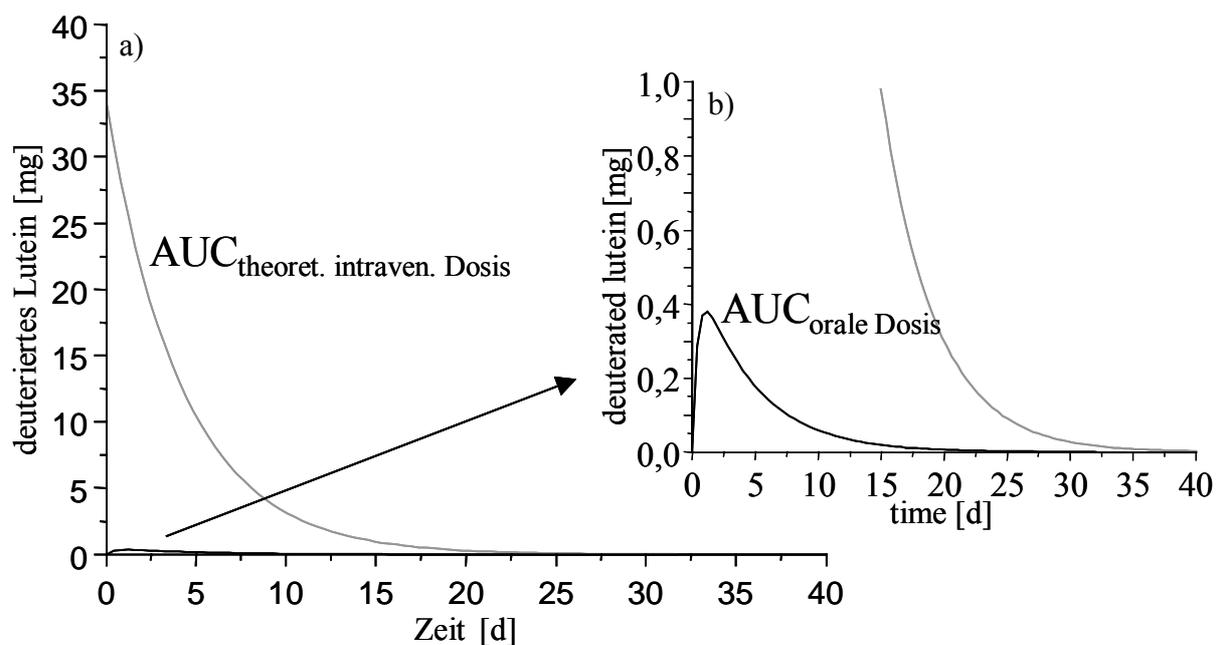


Abbildung 36: Graphik zur Berechnung der absoluten Bioverfügbarkeit

Zur Berechnung des Integrals der oralen Dosis muß die Absorptions-Desorptions-Kurve durch eine oder mehrere Funktionen angenähert werden. Da es nicht einfach ist, eine einzige passende Funktion zu finden, wird die Kurve in zwei Abschnitte, einen Absorptions- und einen Desorptionsbereich, unterteilt. Diese werden nun unabhängig voneinander durch Funktionen angenähert^[184-187].

Für den Anreicherungsprozeß wird hierzu eine lineare Zeitabhängigkeit angenommen, dementsprechend wird dieser Teil der Kurve durch die Gerade

$$y = m \cdot x$$

angenähert. Der Prozeß der Desorption folgt näherungsweise einem exponentiellen Zerfall, dieser ist durch die Funktion

$$y = a + b \cdot e^{-\frac{x}{t_1}}$$

beschrieben. Die Absorptions-Desorptions-Kurven aller Probanden mit den jeweils gefundenen linearen bzw. exponentiellen Funktionen zur Annäherung sind in Abbildung 37 zusammengefasst.

Das Integral der oralen Dosis wird schließlich als Summe der Integrale der beiden angenäherten Funktionen berechnet. Diese kreuzen sich am Schnittpunkt x_1 , der nach

$$m \cdot x = a + b \cdot e^{-\frac{x}{t_1}}$$

berechnet wird.

Das Integral der oralen Dosis ergibt sich nun zu

$$\begin{aligned} AUC_{orale\ Dosis} &= F_1 + F_2 \\ &= \int_0^{x_1} m \cdot x \, dx + \int_{x_1}^{x_2} a + b \cdot e^{-\frac{x}{t_1}} \, dx \\ &= \left. \frac{1}{2} \cdot m \cdot x^2 \right|_0^{x_1} + \left. a \cdot x - b \cdot t_1 \cdot e^{-\frac{x}{t_1}} \right|_{x_1}^{x_2} \end{aligned}$$

Die nächste Aufgabe ist die Extrapolation einer theoretischen intravenösen Dosis von Lutein. Um dies zu erreichen, wird angenommen, dass in dem Moment der Injektion ($x = 0$) die komplette Menge an injiziertem Lutein im Serum zur Verfügung steht. Von diesem Moment an unterliegt das Lutein ausschließlich einem Desorptionsprozeß, der annahmegemäß mit der gleichen Geschwindigkeit geschieht wie die Desorption der oralen Dosis. Die exponentielle Zerfallsfunktion kann daher als

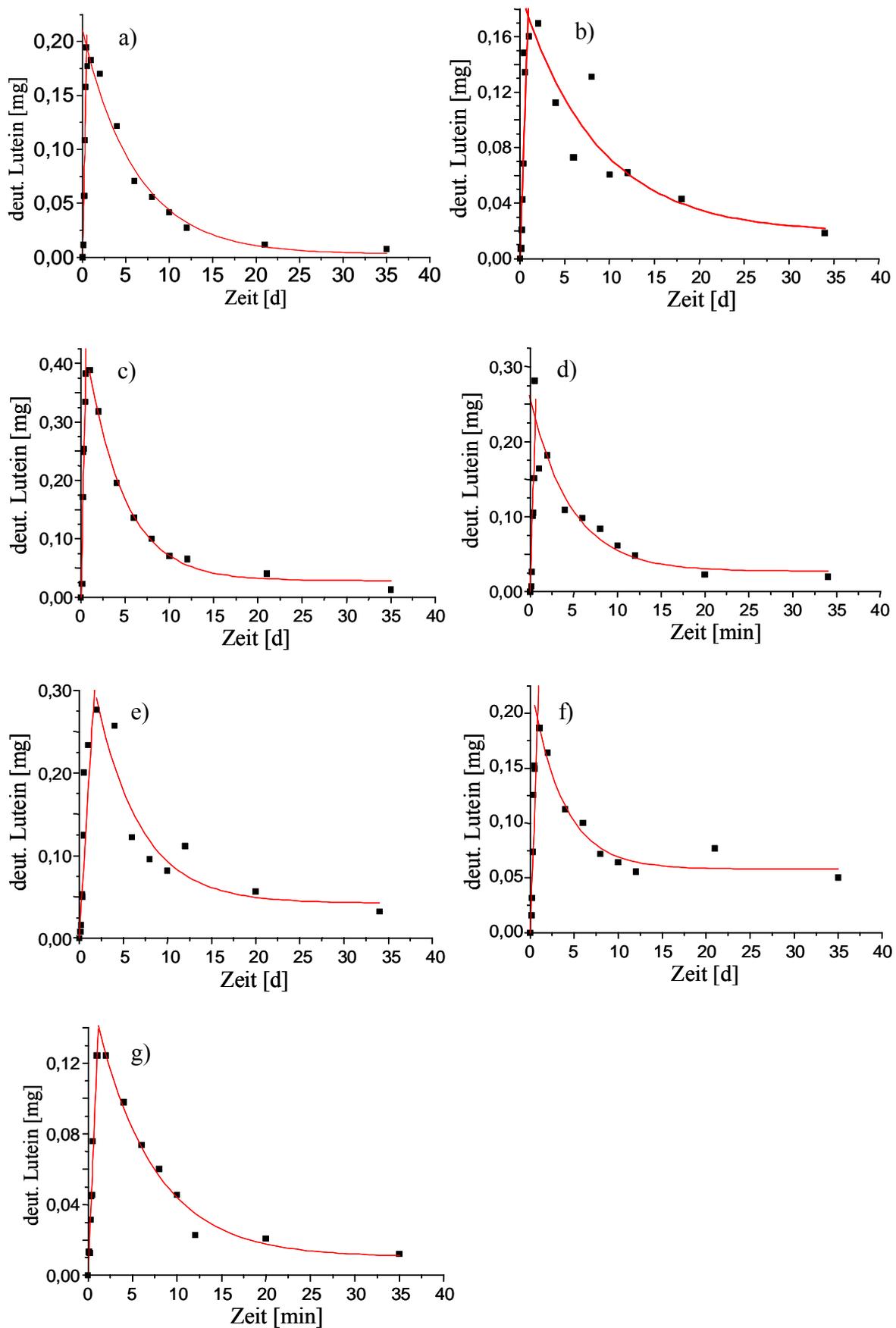


Abbildung 37: Absorptions-Desorptionskurven aller Probanden mit den zugehörigen Kurvenfittings, a) - g) entspricht Proband 1-7

$$y = a + (m_{Lutein, total} - a) \cdot e^{-\frac{x}{t_1}}$$

dargestellt werden.

Unter Anwendung dieser Zerfallsfunktion ergibt sich das Integral einer theoretischen intravenösen Dosis mit

$$\begin{aligned} AUC_{theoret. intraven. Dosis} &= \int_0^{x_2} a + (m_{Lutein, total} - a) \cdot e^{-\frac{x}{t_1}} dx \\ &= \left| a \cdot x - (m_{Lutein, total} - a) \cdot t_1 \cdot e^{-\frac{x}{t_1}} \right|_0^{x_2} \end{aligned}$$

Aus dem Quotient der beiden Integrale der oralen und theoretischen intravenösen Dosis kann schließlich die absolute Bioverfügbarkeit des deuterierten Luteins aus intrinsisch gelabeltem Spinat berechnet werden. Die sich ergebenden Werte der sieben Probanden sind zusammen mit den maximalen Anreicherungsraten und den Integralen der oralen und theoretischen intravenösen Dosis in Tabelle 10 zusammengefaßt.

Proband	maximale Anreicherungsrate	AUC _{orale Dosis}	AUC _{theor. intrav. Dosis}	Bioverfügbarkeit
	[%]	[mg·d]	[mg·d]	[%]
1	48,4 (nach 1d)	1,33	251,01	0,53
2	30,0 (2d)	2,00	342,74	0,58
3	53,8 (1d)	3,03	144,56	2,10
4	36,0 (2d)	1,94	158,13	1,23
5	35,7 (2d)	2,94	172,05	1,71
6	54,7 (1d)	2,56	124,40	2,06
7	28,2 (1d)	1,19	215,94	0,55

Tabelle 10: Absolute Bioverfügbarkeit, maximale Anreicherungsraten und Integrale der oralen und theoretischen intravenösen Dosis der sieben Probanden

Es ergeben sich absolute Bioverfügbarkeiten zwischen 0,53 und 2,10 %. Diese können jedoch noch nicht mit Werten aus anderen Studien oder anderer Carotinoide verglichen werden, da die verwendete Methode der Supplementierung mit intrinisch gelabeltem Gemüse noch vollkommen neuartig ist. Zur Zeit erst finden weitere Studien mit anderen deuterierten Carotinoiden aus gelabeltem Gemüse, beispielweise β -Carotin aus Karotten und Lycopin aus Tomaten, statt.

Auffällig an den gefundenen absoluten Bioverfügbarkeiten ist, dass bei drei Probanden relativ niedrige Werte von etwa 0,55 % auftreten, während bei den weiteren Testpersonen wesentlich höhere Bioverfügbarkeiten bis zu 2,10 % vorliegen. Dies könnte darauf hindeuten, dass möglicherweise von Mensch zu Mensch Unterschiede in der Carotinoidaufnahme existieren. Zur Untermauerung dieser Ergebnisse ist es jedoch unabdingbar, dass weitere Probanden an dieser Studie teilnehmen.

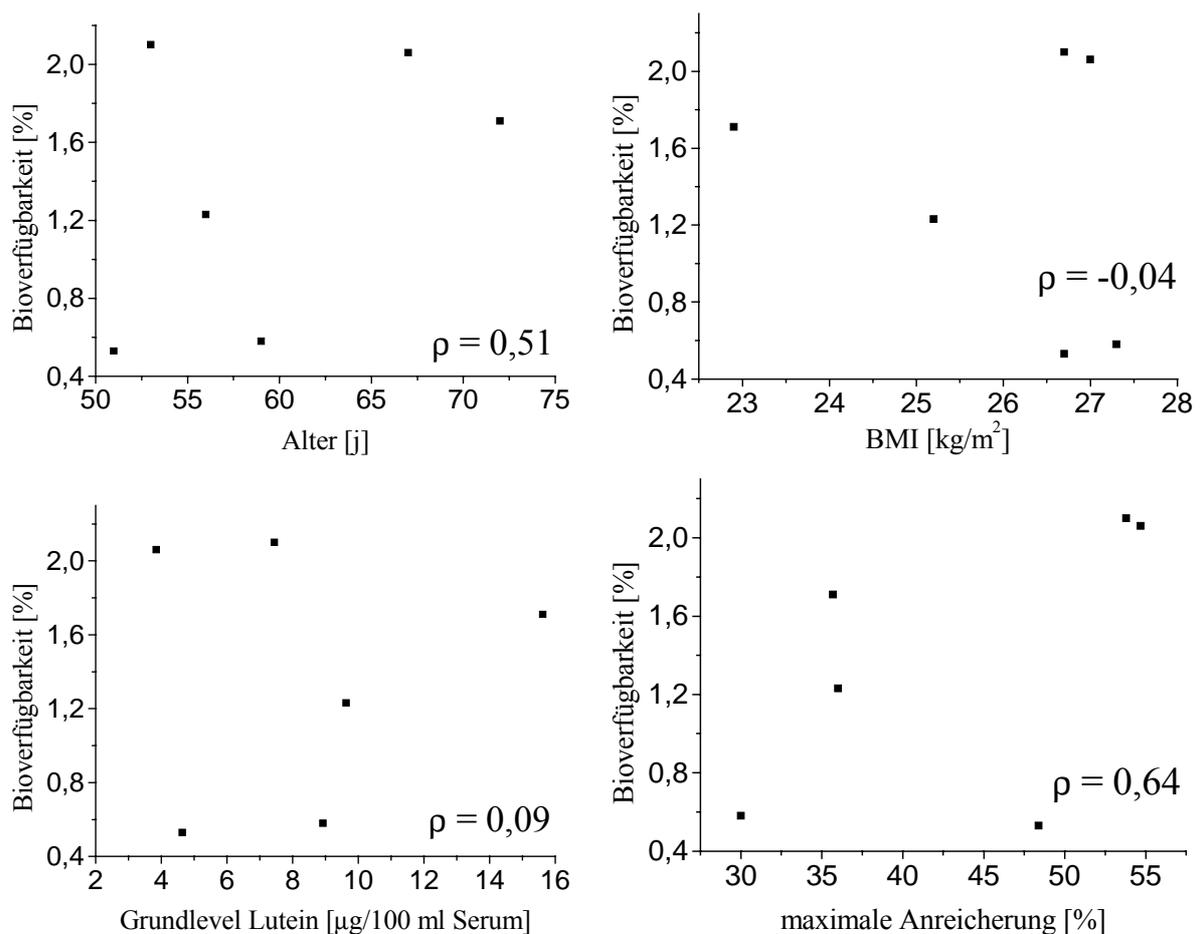


Abbildung 38: Korrelationen zwischen der absoluten Bioverfügbarkeit und dem Alter, dem BMI, dem Grundlevel an Lutein und der maximalen Anreicherung an deuteriertem Lutein der Probanden

Schließlich war es notwendig, mögliche Korrelationen zwischen den gefundenen Werten der absoluten Bioverfügbarkeit und den charakteristischen Werten der Probanden, wie Alter, BMI, Lutein-Grundlevel und der maximalen Anreicherungsrate an deuteriertem Lutein, zu identifizieren. Dabei wurden keine Korrelationen zwischen der Bioverfügbarkeit und dem BMI bzw. dem Grundlevel an Lutein im Serum gefunden. Eine mäßig starke Korrelation von $\rho = 0,51$ ergab sich interessanterweise zwischen Alter und Bioverfügbarkeit. Ob dies ein, aufgrund der geringen Anzahl an Probanden, zufälliger Wert ist, ist ebenfalls in weiteren Studien zu bestätigen. Weniger überraschend ist die Korrelation der maximalen Anreicherung und der Bioverfügbarkeit ($\rho = 0,64$), da die Anreicherung auch in modifizierter Form in die Berechnung der Bioverfügbarkeit eingeht.

5.3 Bestimmung der Anreicherung von Carotinoid-Isomeren in retinalem Gewebe durch Fütterungsexperimente

5.3.1 Design der Studie

In klinischen und epidemiologischen Studien konnte in den letzten Jahren eine inverse Korrelation zwischen dem erhöhten Konsum von Lebensmitteln mit einem hohen Gehalt an Lutein und Zeaxanthin und der Pathogenese von Augenerkrankungen wie altersbedingter Makuladegeneration (AMD) und Katarakt gefunden werden^[111]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die gesteigerte Aufnahme der beiden Carotinoide die Pigmentdichte der Retina erhöht. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass eine ausreichende Ernährung oder mögliche Supplementierung mit Lutein und Zeaxanthin die Entstehung von AMD und Katarakt verhindern oder sogar eine bestehende Erkrankung heilen kann.

Bevor allerdings eine allgemeine Supplementierung mit den Carotinoiden Lutein und Zeaxanthin empfohlen werden kann, ist es zunächst notwendig, die Anreicherung und Aktivitäten der Carotinoide am Wirkungsort, der Retina, genauer zu untersuchen. Außerdem ist zu beachten, dass die beiden Carotinoide nicht nur in der am häufigsten berücksichtigten all-E-Konfiguration vorkommen, sondern auch als verschiedene geometrische und optische Isomere. Diese können nun aufgrund ihrer abgewinkelten Form nicht nur vollkommen unterschiedliche Bioverfügbarkeiten sondern auch veränderte biologische Wirksamkeiten besitzen.

Zu diesem Zweck ist es daher sinnvoll, das Isomerenpattern von gesunden und erkrankten Personen in Serum und Retina zu bestimmen und die relevanten Unterschiede herauszuarbeiten. In einem nächsten Schritt sollten dann die Veränderungen der Isomerenzusammensetzung nach einer Supplementierung mit Lutein und Zeaxanthin betrachtet werden.

Da es in Deutschland sehr schwierig und ethisch bedenklich ist, Humanretinen, insbesondere mit AMD, zu Untersuchungszwecken zur Verfügung gestellt zu bekommen, ist es notwendig, geeignete Tiermodelle zu verwenden. Dabei gilt es, einen Kompromiss zwischen einer möglichst großen Ähnlichkeit mit dem Menschen und einer einfachen Tierhaltung zu finden^[188-189].

Die Retinen, die denen des Menschen am ähnlichsten sind, stammen von nicht-humanen Primaten, die als einziges Tiermodell ebenfalls eine Makula Lutea besitzen. Aus diesem Grund werden sie in der Augenheilkunde, trotz eines Mangels an natürlich vorkommenden Degenerationen, häufig als Modell eingesetzt.

Ein Standardmodell in der ophthalmologischen Forschung sind Schweineaugen, da sie in Größe und Physiologie denen des Menschen stark gleichen. Schweineretinen haben jedoch keine Makula Lutea, außerdem existieren ebenfalls keine Degenerationsmodelle.

Der AMD ähnliche Degenerationen können dagegen in Ratten mit genetischen Defekten, den RCS-Ratten (Royal College of Surgeons) auftreten. Daher ist die Untersuchung von Rattenretinen sehr vielversprechend. Problematisch sind jedoch die kleinen Dimensionen und somit auch sehr niedrigen Probenmengen, die eine exakte Analytik zur Zeit noch sehr schwierig machen. Erste Versuche mit gepoolten Retinen wurden jedoch erfolgreich durchgeführt.

Ein weiteres gut verwendbares Tiermodell ist das Huhn. Die Augen und somit auch die Retinen sind groß genug für die Analyse einer einzelnen Retina, gleichzeitig sind die Augen für Injektionen in den Glaskörper leicht zugänglich. Sogar ein Modell einer Degeneration der Photorezeptoren ist verfügbar. Ein Nachteil besteht jedoch in der Abwesenheit einer Makula Lutea und in den im Auge vorkommenden Öltröpfchen, die die Analytik erschweren.

Im Rahmen des Fütterungsexperiments wurde aufgrund der einfachen Haltung und Ernährung das Huhn als Tiermodell ausgewählt. Dazu wurden Hühnerretinen von Tieren untersucht, die von Geburt an 14 Tage lang entweder mit Standardfutter oder aber mit Maisschrot ernährt worden waren. Dabei galt es, die Unterschiede des Patterns der geometrischen Isomere von Lutein und Zeaxanthin in der Retina herauszuarbeiten. Außerdem sollte diese Isomerzusammensetzung mit derjenigen in den jeweiligen Futtersorten verglichen werden, um eine möglicherweise unterschiedliche Anreicherung an den verschiedenen geometrischen Isomeren nachzuweisen.

5.3.2 Vergleich des Isomerpatterns in Hühnerretinen nach Fütterung mit Standardfutter oder Maisschrot

Nachdem jeweils sechs Hühner 14 Tage lang entweder mit Standardfutter und mit Maisschrot ernährt worden waren, wurden ihnen in der experimentellen Ophthalmologie der Universitäts-Augenklinik in Tübingen in Dunkelheit und unter Eiskühlung die Retinen entnommen. Die Carotinoide wurden aus den Retinen unter Verwendung der MSPD extrahiert, anschließend wurden sie auf einer C_{30} -Trennsäule mit einem Gradienten aus Aceton und Wasser chromatographisch aufgetrennt. Die Zuordnung geschah anhand eines isomerisierten Standards aus Lutein und Zeaxanthin (vgl. Abbildung 39).

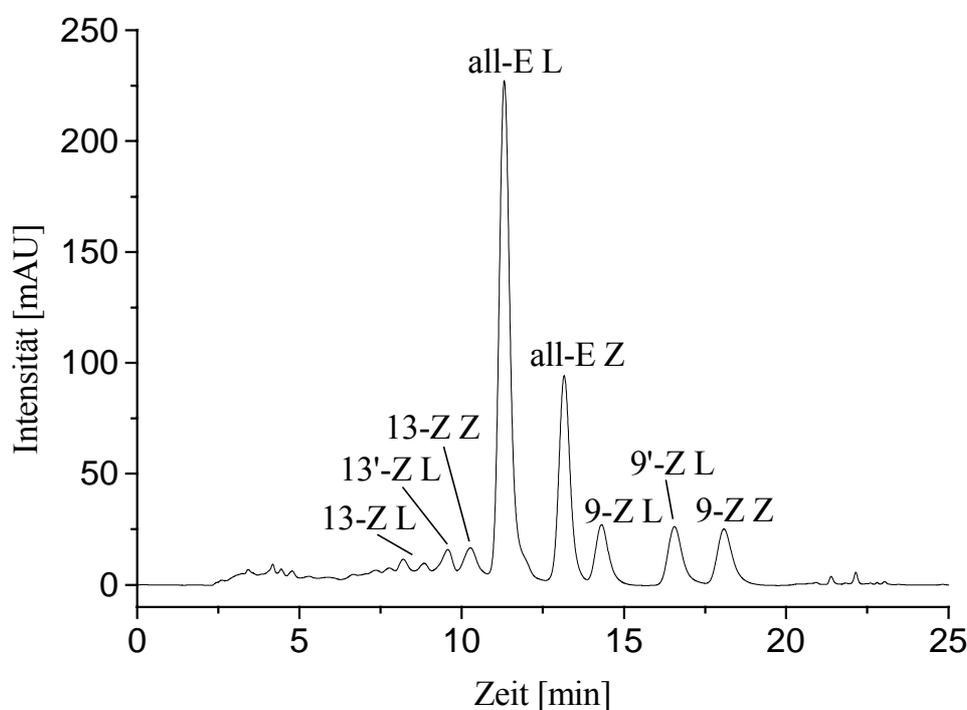


Abbildung 39: Chromatogramm eines isomerisierten Standards der Carotinoide Lutein (L) und Zeaxanthin (Z)

In den HPLC-Chromatogrammen der Carotinoideextrakte aus den Hühner-Retinen sind zunächst einmal andere Carotinoide in weitaus höheren Konzentrationen auffällig. Dies ist in Abbildung 40 a) exemplarisch dargestellt. Dabei handelt es sich um verschiedenste Carotinoide, welche sich in den Öltröpfchen, die in den Hühneraugen vorhanden sind, anreichern. Wird jedoch der vordere Bereich der Trennung, in dem die

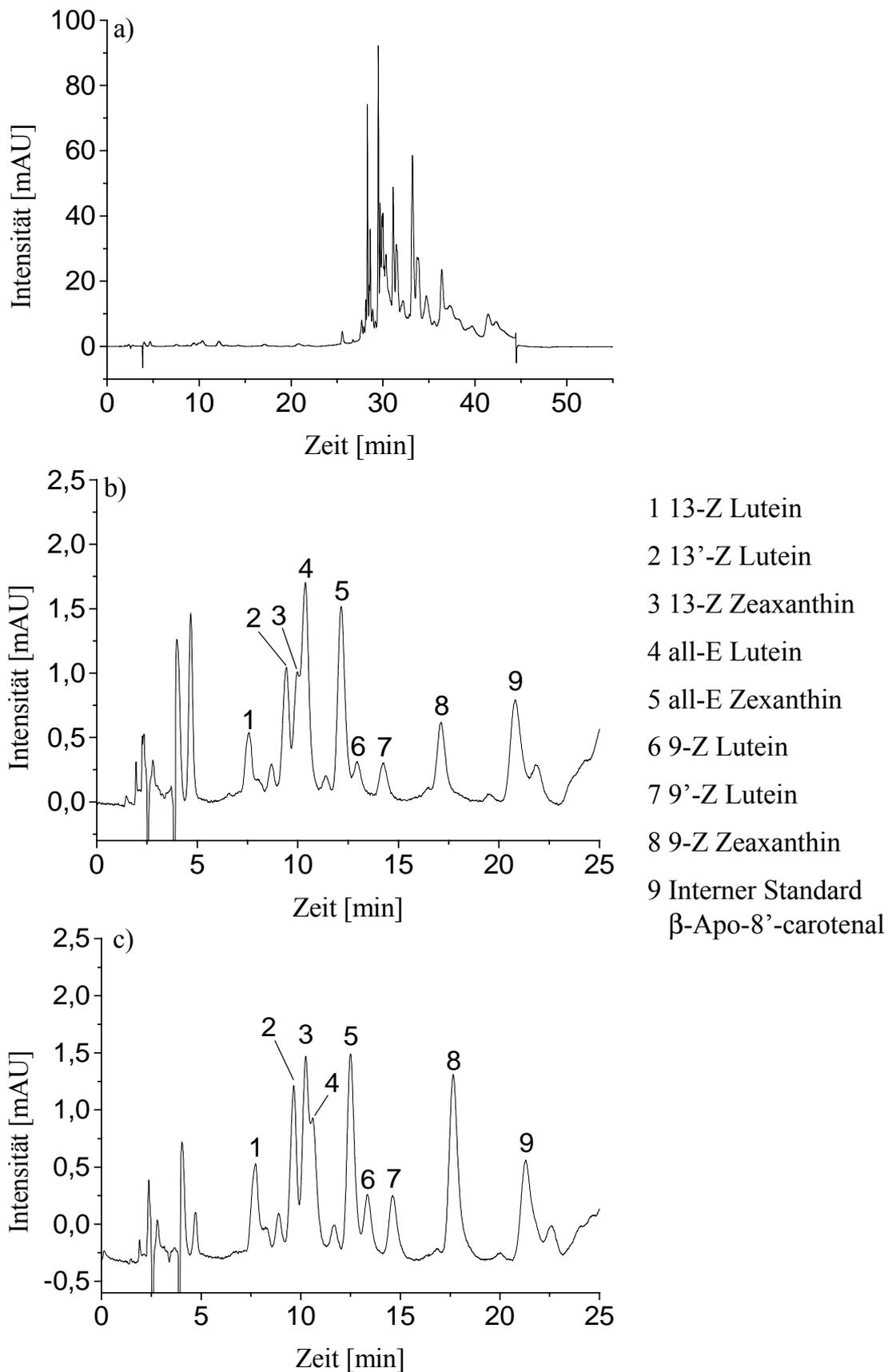


Abbildung 40: Pattern der geometrischen Isomere von Lutein und Zeaxanthin in einer Hühnerretina nach Fütterung von a) Standardfutter [b) Vergrößerung von a)] bzw. c) Maisschrot

relativ polaren Xanthophylle extrahieren, vergrößert, so können auch die klassischen retinalen Carotinoide, Lutein und Zeaxanthin, beobachtet werden.

Werden nun die Carotinoid-Pattern in den Retinen der Hühner, die mit Standardfutter ernährt wurden, mit denen der Tiere, die mit Maisschrot gefüttert wurden, verglichen, so können schon bei oberflächlicher Betrachtung deutliche Unterschiede ausgemacht werden. Beispielhafte Chromatogramme sind hierfür in Abbildung 40 b) und c) zusammengestellt. Auffällig sind bei den mit Maisschrot gefütterten Tieren vor allem die erhöhten Intensitäten der Isomere von 13-Z und 9-Z Zeaxanthin sowie die verminderte Intensität des Peaks von all-E Lutein.

Die quantitative Analyse der Spektren ergibt, dass die Gesamtmenge an Lutein und Zeaxanthin in den Retinen der Tiere nach Maisfütterung mit 257,8 ng pro Retina deutlich höher ist als in den normal gefütterten Tieren (181,9 ng / Retina). Gleichzeitig werden die qualitativ beobachteten Unterschiede bestätigt, wie der prozentuale Vergleich der Anteile an den diversen geometrischen Isomeren zeigt. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 41 graphisch dargestellt. Dabei zeigt sich auch, dass der prozentuale Anteil von Zeaxanthin in den Retinen nach Maisfütterung mit 60,2 % deutlich höher liegt als in den Kontrollretinen, die nur 46,7 % Zeaxanthin enthalten. Darüber hinaus ist auch der Anteil an Z-Isomeren nach Fütterung mit Maisschrot erhöht, er liegt dann bei 69,4 % im Vergleich zu den 57,6 % bei Fütterung mit Standardfutter.

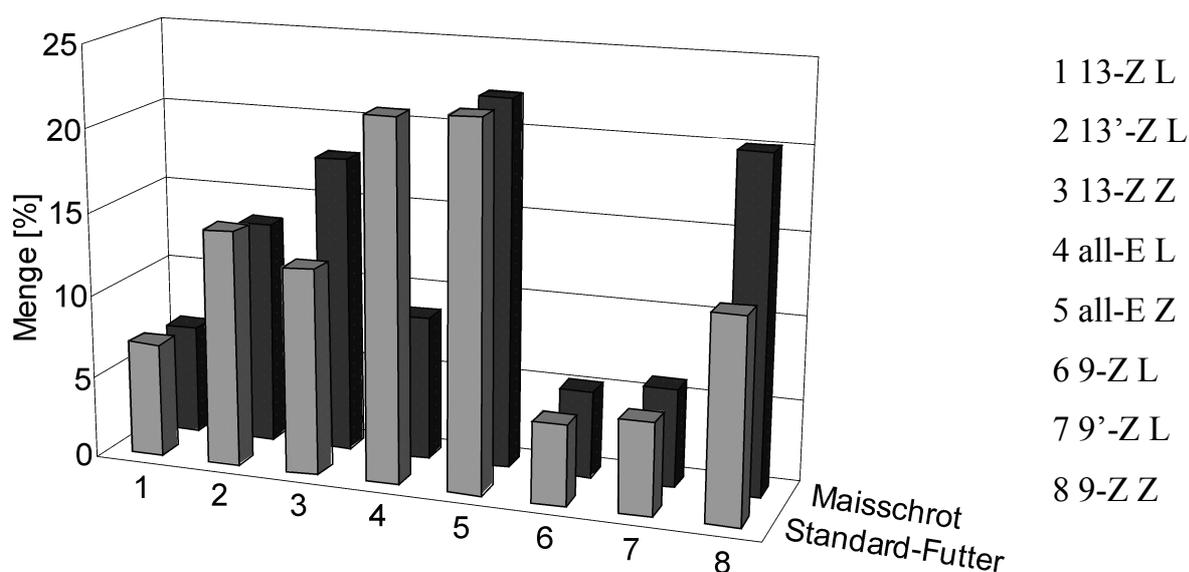


Abbildung 41: prozentualer Vergleich der Lutein- und Zeaxanthin-Isomere in Hühnerretinen nach Fütterung mit Maisschrot oder Standardfutter

	Huhn, Standard-Futter	Huhn, Maisschrot	Standard- Futter	Maisschrot
	[ng/Retina]	[ng/Retina]	[µg/100 g]	[µg/100 g]
13-Z Lutein	12,2	16,9	82,3	67,7
13'-Z Lutein	25,4	34,6	24,5	47,0
13-Z Zeaxanthin	23,1	45,7	191,3	222,7
all-E Lutein	39,2	22,2	4682,3	1487,0
all-E Zeaxanthin	37,7	56,8	2596,7	1347,8
9-Z Lutein	9,2	13,5	207,1	68,2
9'-Z Lutein	10,8	15,4	199,0	60,7
9-Z Zeaxanthin	23,9	52,7	242,8	144,5
Caro gesamt	181,9	257,8	8226,0	3445,6
Lut/Zea	53,3%/46,7%	39,8%/60,2%	63,2%/36,8%	50,2%/49,8%
Z-Iso/all-E	57,6%/42,4%	69,4%/30,6%	11,5%/88,5%	17,7%/82,3%

Tabelle 11: Quantitative Auswertung des Fütterungsexperimentes von Hühnern mit Maisschrot und Standardfutter zum Vergleich der retinalen Isomere

Die Ergebnisse der quantitativen Analyse der Carotinoid-Extrakte aus den Hühnerretinen sind zusammenfassend noch einmal in Tabelle 11 gezeigt. Zusätzlich sind darin die Mengen an Lutein und Zeaxanthin, die in dem verwendeten Maisschrot bzw. Standardfutter gefunden wurden, zusammengestellt. Die Carotinoide wurden analog zur Extraktion der Carotinoide aus den Retinen mittels MSPD aus der Matrix isoliert, anschließend wurden sie mit der identischen Trennmethode auf einer C₃₀-Säule chromatographisch untersucht. Die beiden erhaltenen Chromatogramme sind in Abbildung 42 dargestellt.

Es zeigt sich, dass das Standardfutter eine wesentlich größere Menge (Faktor 2,4) an Lutein und Zeaxanthin enthält als der Maisschrot. Dies ist insoweit interessant, als dass diese Aussage einen scheinbaren Widerspruch zu der Tatsache, dass in den Retinen der mit Standardfutter ernährten Hühner geringere Mengen an Carotinoiden gefunden wurden, darstellt. Eine denkbare Begründung für dieses Phänomen kann

jedoch darin liegen, dass die Carotinoide, die im Mais vorkommen und dort von einer natürlichen Matrix umgeben sind, eine bessere Bioverfügbarkeit besitzen als die dem Standardfutter künstlich zugesetzten Carotinoide.

Darüber hinaus zeigt sich, dass dem Standardfutter prozentual weniger Zeaxanthin zugesetzt ist, als der Maisschrot enthält (36,8 % im Vergleich zu 49,8 %). Bei letzterem ist auffällig, dass er Lutein und Zeaxanthin in fast gleichen Mengen enthält, was nur für einige speziell gezüchtete Arten von Mais typisch ist^[190].

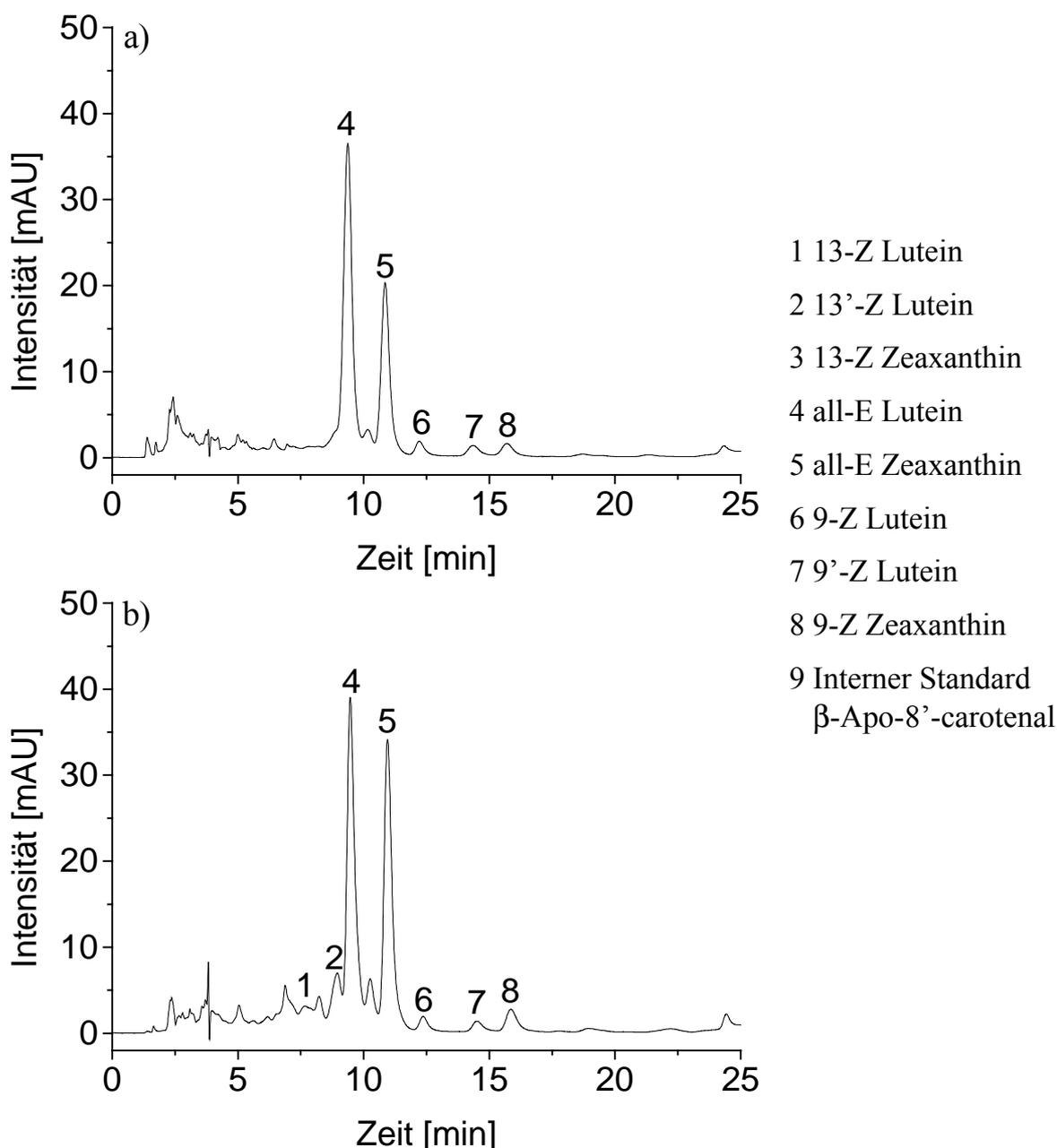


Abbildung 42: Isomerpattern von Lutein und Zeaxanthin in a) Standardfutter und b) Maisschrot

Beim Vergleich der Mengen und Zusammensetzungen der Z-Isomere in den beiden Futtersorten kann beobachtet werden, dass im Standardfutter mit einem Anteil von 11,5 % weniger Z-Isomere vorliegen als im Maisschrot (17,7 %). Der erhöhte Prozentsatz im Maisschrot kann dabei in einer längeren Lagerzeit begründet sein, die bei einem käuflich zu erwerbenden Produkt nicht nachzuvollziehen ist. Einen Vergleich der Isomeren-Zusammensetzungen der beiden Futtersorten zeigt Abbildung 43 in graphischer Form.

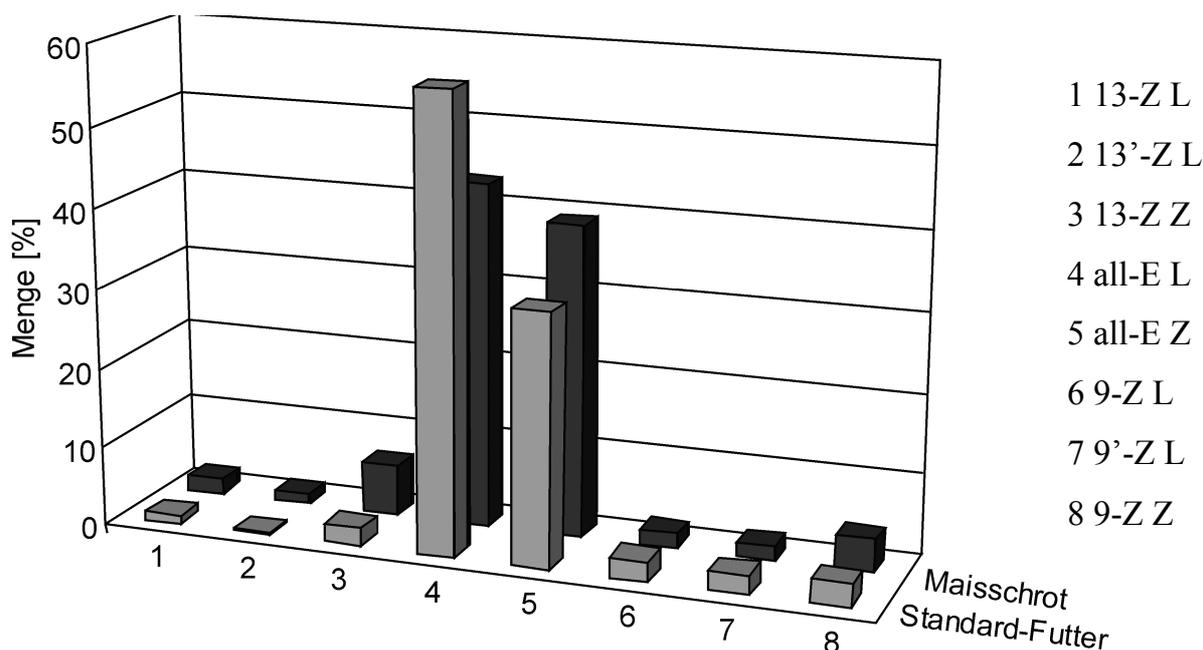


Abbildung 43: prozentualer Vergleich der Lutein- und Zeaxanthin-Isomere in Maisschrot und Standardfutter

Auch im Maisschrot ist, analog zu den Beobachtungen in den Hühnerretinen mit Maisfütterung, festzustellen, dass die Mengen an 13-Z und 9-Z Zeaxanthin verglichen mit dem Standardfutter deutlich erhöht sind. Gleichzeitig ist der Gehalt an all-E Lutein vermindert. Nun könnte vermutet werden, dass die verstärkte Anreicherung dieser Isomere in den Retinen nur in den schon im Futter vorliegenden Unterschieden in der Carotinoid-Zusammensetzung begründet ist. Diesem Verdacht kann jedoch zumindest teilweise widersprochen werden, da die entsprechenden Isomere nur zu einem geringeren Maß angereichert werden als die anderen Isomere. Einen Maßstab für diese verminderte Anreicherung stellt der Vergleich der prozentualen Verhältnisse der

jeweiligen Isomere zwischen den Futtersorten und zwischen den unterschiedlichen Hühnerretinen dar. So ergibt sich beispielsweise für 13-Z Zeaxanthin ein Faktor von 2,8 bei Betrachtung des prozentualen Verhältnisses von 13-Z Zeaxanthin in den Futtermitteln Maisschrot und Standardfutter (6,5 %/ 2,3 %). Der Vergleich der prozentualen Verhältnisse an 13-Z Zeaxanthin in den beiden Arten von Retinen resultiert jedoch nur in einem Faktor von 1,4 (Huhn-Mais/Huhn-Standard: 17,8 %/ 12,4 %).

Eine Begründung für geringere Anreicherung ist, dass die Aufnahme, die Absorption und der Transport der Carotinoide in die Retina aktive Prozesse darstellen. Dies bedeutet, dass es aufgrund der Unterschiede in der geometrischen Form der Isomere zur einer besseren oder schlechteren Anbindung an die entsprechenden Carotinoidrezeptoren oder zu einem veränderten Einbau in Lipoproteine mit Transportfunktionen kommt. Dies führt dann zur Entstehung von verschiedenen Bioverfügbarkeiten für die jeweiligen Isomere und somit zu einer unterschiedlich hohen Anreicherung am Wirkungsort.

5.4 Miniaturisierung der analytischen Methoden

5.4.1 μ HPLC-Trennungen von Tocopherolen und Carotinoiden

Die Miniaturisierung der klassischen Trennmethode HPLC stellt für den Bereich der Analytik von biologischen Proben, der häufig durch sehr geringe Probenmengen charakterisiert und limitiert ist, die Aussicht dar, die Nachweisgrenzen noch weiter zu verringern und somit auch bisher unlösbare Trenn- und Detektionsprobleme erfolgreich zu bearbeiten.

Der erste Schritt bei der Implementierung einer neuen Methode ist, die bestehende Trennung von Standards auf die neuen Gegebenheiten zu übertragen. In diesem Fall gilt es also, ein geeignetes System aus stationärer und mobiler Phase im miniaturisierten Maßstab der μ HPLC zu entwickeln und dies anhand von Standardprobengemischen zu testen.

Da es bisher noch keine kommerziell erwerblichen C_{30} -Kapillartrennsäulen gibt, ist es für die bestehenden Problematiken der Carotinoid- und Tocopheroltrennungen zunächst notwendig, geeignete Fused Silica-Kapillaren zu packen. Dies wurde unter Verwendung eines Slurrys des modifizierten Kieselgels, das mit Hilfe einer pneumatischen Pumpe in die Kapillare gepresst wurde, erreicht. Zur Fixierung der stationären Phase in der Säule dienten feine Metallsiebchen, die mit Totvolumenfreien Verbindungen mit der Kapillare verbunden wurden.

Die mobile Phase wurde nun mittels einer splitlosen μ HPLC-Pumpe, die speziell für die in der μ HPLC geringen Flussraten von 1 bis 100 μ l/min ausgelegt ist, durch die Kapillarsäule gepumpt. Auch das Injektionsventil ist mit einer Probenschleife von nur 333 nl auf die miniaturisierte Technik angepasst, ebenso der Detektor, der mit einer speziellen UV-Zelle eine on column-Detektion der Analyten ermöglicht. Allgemein ist bei allen Verbindungen zwischen Pumpe und Detektor darauf zu achten, dass sie mit einem möglichst geringen Totvolumen gewählt werden.

An Abbildung 44 ist nun das Chromatogramm einer μ HPLC-Trennung von Tocopherol-Homologen dargestellt. Dabei wurden 333 nl eines Standards aus α -, β -, γ - und δ -Tocopherol sowie α -Tocopherolacetat (je 80 μ g/ml) injiziert, welches einer Gesamtmenge von 26,6 ng pro Tocopherol entspricht. Die mobile Phase bestand,

analog zur klassischen HPLC-Trennung der Tocopherole, aus reinem Methanol und wurde mit einer Flussrate von 4 $\mu\text{l}/\text{min}$ fortbewegt.

Die erzielte Trennung selbst ist bezüglich der Trennqualität mit der analytischen HPLC-Trennung der Tocopherole vergleichbar (vgl. Abbildung 18). Auch die beiden schwierig zu trennenden Konstitutionsisomeren β - und γ -Tocopherol sind hier zumindestens angetrennt, welches für eine gute Qualität der gepackten C_{30} -Kapillarsäule spricht. Auffällig ist auch, dass diese Trennung in nur 12 Minuten erzielt wurde, somit erscheint die Entwicklung der μHPLC auch mit dem Bestreben, immer schnellere Trennungen zu erreichen, zu korrelieren.

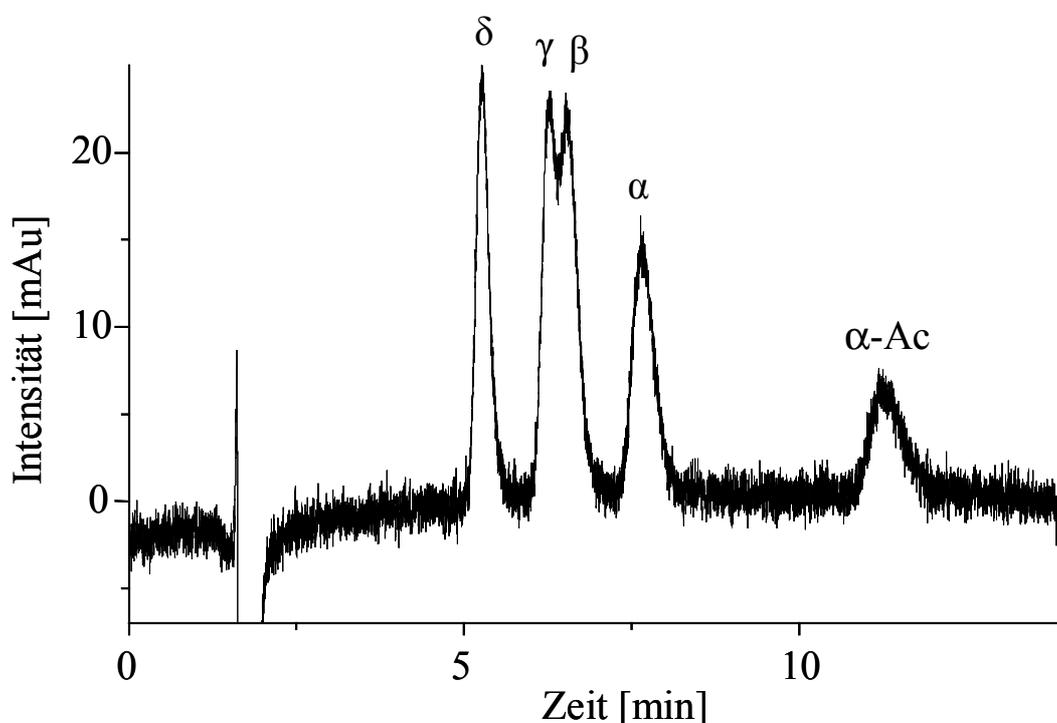


Abbildung 44: Chromatogramm der μHPLC -Trennung von Tocopherol-Homologen (je 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Injektionsmenge 333 nl, entspricht 26,6 ng je Analyt)

Auch die Trennung der geometrischen Isomere von Lutein und Zeaxanthin ist unter Anwendung der μHPLC möglich, wie Abbildung 45 zeigt. Das Chromatogramm zeigt die Trennung eines isomerisierten Standards (80 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Injektionsmenge 200 nl) der beiden Carotinoide. Dabei wurde eine mobile Phase aus Aceton und Wasser (85:15, v/v) mit 4 $\mu\text{l}/\text{min}$ verwendet. Auch dieses Chromatogramm zeigt eine

vergleichbare Qualität wie das Analogon mit der klassischen HPLC (vgl. Abbildung 39) und ermöglicht trotz der geringen Konzentration sogar die Identifizierung aller wichtigen Z-Isomere.

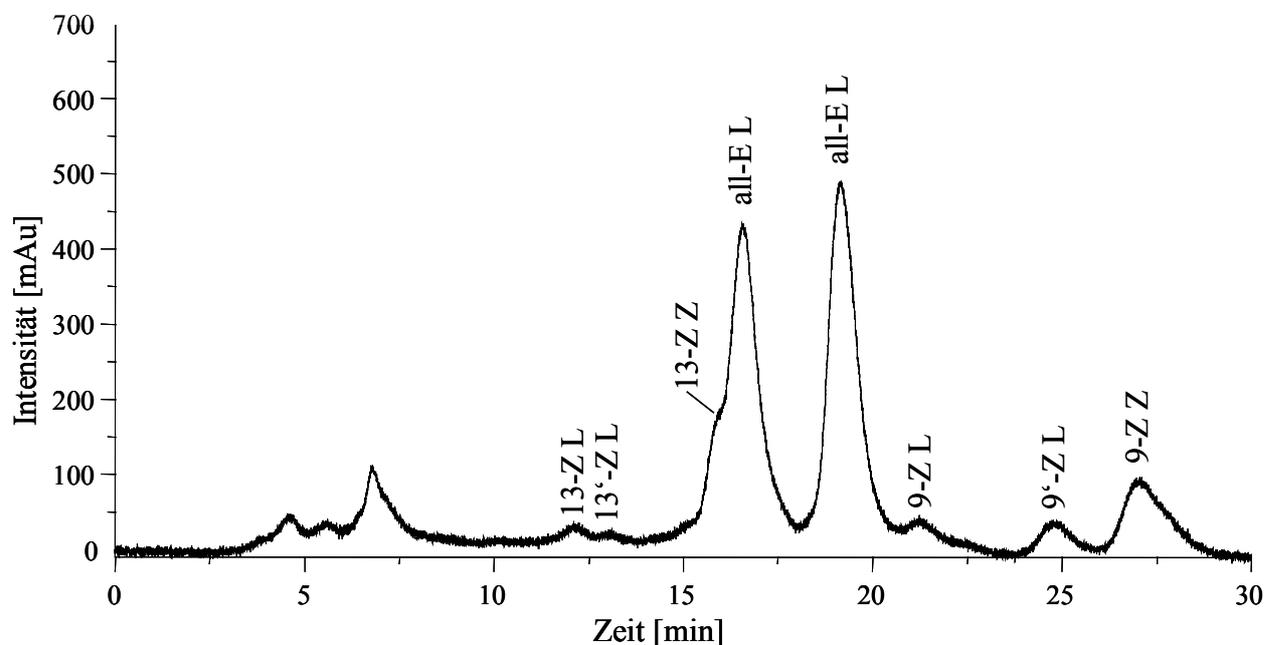


Abbildung 45: Chromatogramm der μ HPLC-Trennung der geometrischen Isomeren von Lutein und Zeaxanthin (Injektionsmenge 200 nl)

5.4.2 Identifizierung der Tocopherol-Homologen mittels on-line μ HPLC-NMR-Kopplung

Um die Kopplung der miniaturisierten Trenntechnik μ HPLC mit der NMR-Spektroskopie als Detektionsmethode zu ermöglichen, ist es notwendig, einen speziellen Kapillarprobenkopf zu verwenden. Neben den auch für die HPLC-NMR-Kopplung verwendeten klassischen Durchflussprobenköpfen mit Doppelsattel-Helmholtz-Design hat sich hierbei in der letzten Zeit vor allem ein Kapillardurchflußprobenkopf mit solenoider Anordnung der Durchflusszelle, also entlang der x-Achse im Gegensatz zur klassischen Ausrichtung entlang des Hauptmagnetfeldes, durchgesetzt. Zum Ausgleich von Inhomogenitäten der Suszeptibilität ist bei diesem Probenkopf der Detektionsbereich aus Durchflusszelle und Spulen von einer Suszeptibilitäts-ausgleichenden Flüssigkeit (FC-43) umgeben. Die Linienbreite der

hiermit erhaltenen Spektren ist hervorragend, wie auch der in Abbildung 46 dargestellte Humptest (5% Chloroform in Aceton- d_6) beweist.

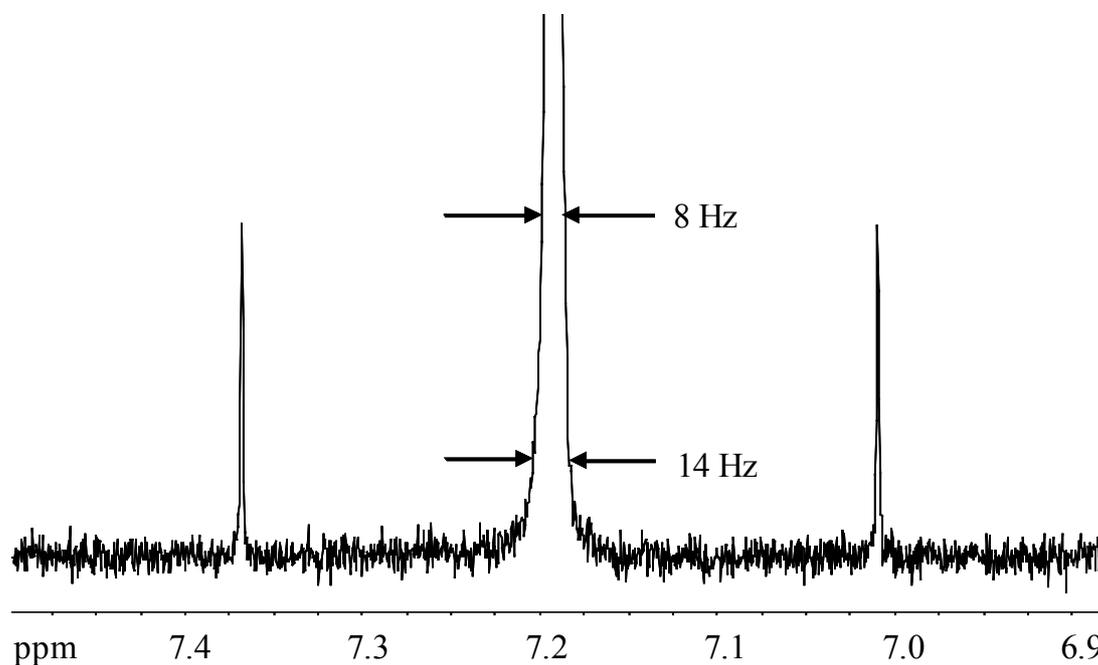


Abbildung 46: Spektrum und Linienbreiten eines Humptests (5 %ig) des Kapillar-Durchflußprobenkopfes mit solenoider Anordnung

Auch die Empfindlichkeit des Probenkopfes, die mittels 1 mmolarer Succrose in einem Gemisch aus deuteriertem Wasser und Acetonitril- d_3 (90:10, v/v) bestimmt wurde, ist sehr gut. Abbildung 47 zeigt diesbezüglich die erhaltenen Spektren ohne und mit Lösungsmittelunterdrückung, letzteres unter Verwendung von Shaped Pulsen.

Um die Anwendung der μ HPLC-NMR-Kopplung zukünftig problemlos in die bestehenden analytischen Fragestellungen implementieren zu können, ist es notwendig, auch die diversen Kopplungsexperimente mit bereits gelösten Trenn- und Detektionsproblemen zu testen. Zu diesem Zweck wurde auf die Identifizierung der Tocopherol-Homologen mittels HPLC-NMR-Kopplung zurückgegriffen (vgl. Abschnitt 5.1.3).

Zunächst einmal ist es auch bei der μ HPLC-NMR-Kopplung notwendig, die bestehende μ HPLC-Trennung auf die Gegebenheiten der NMR-Spektroskopie anzu-

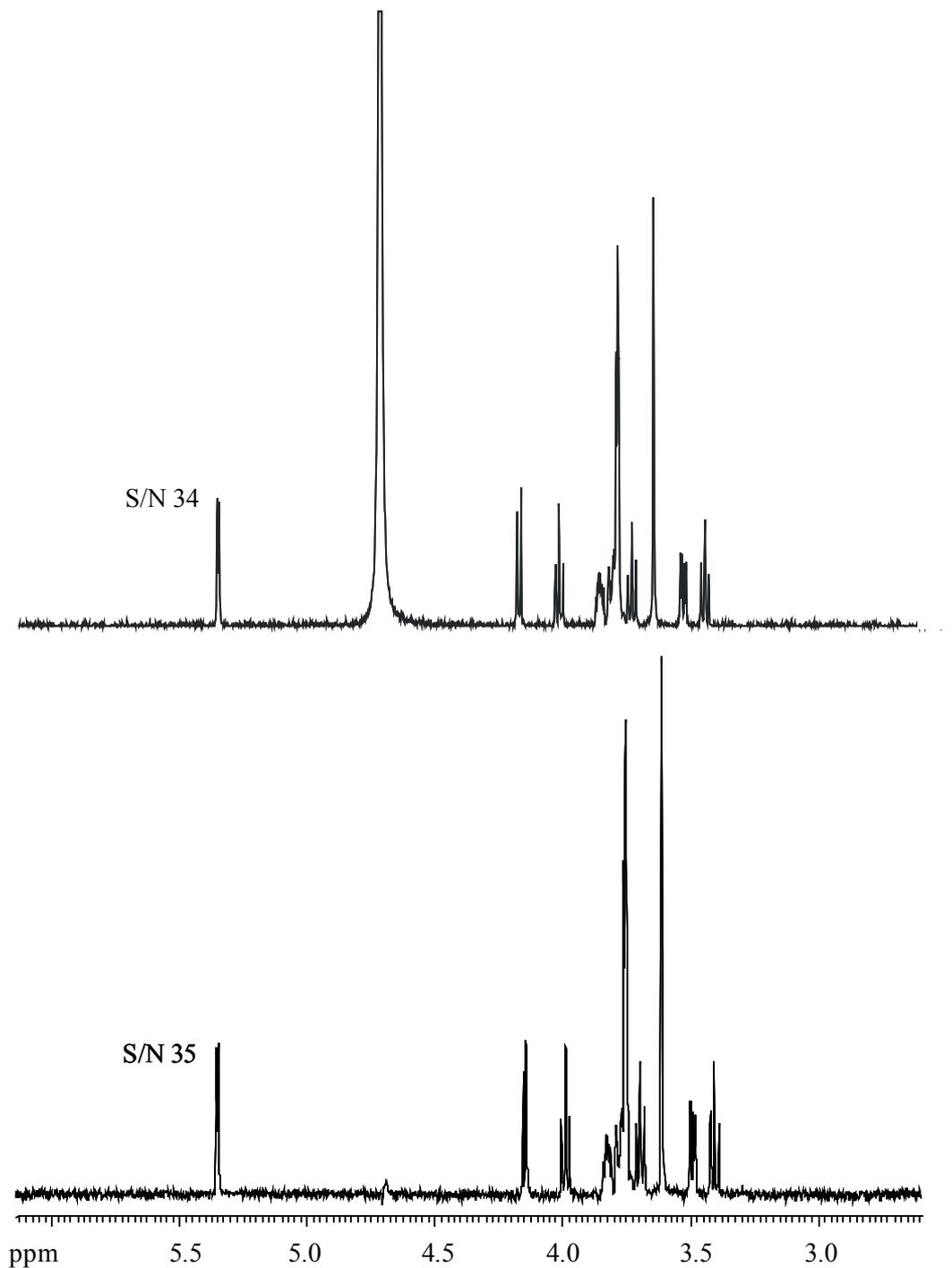


Abbildung 47: Bestimmung der Sensitivität des Kapillar-Durchflußprobenkopfes mittels 1 mmolarer Succrose, oben ohne und unten mit Lösungsmittelunterdrückung via Shaped Pulsen

passen. Das bedeutet im Falle von continuous-flow Messungen, dass die Dauer der Trennung verlängert werden muß, um die verringerte zeitlichen Auflösung aufgrund der notwendigen Spektrenakkumulation auszugleichen. Aus diesem Grund wurde

die μ HPLC-Trennung unter Verwendung eines Lösungsmittelgemisches aus Methanol- d_4 und deuteriertem Wasser (90:10, v/v) bei einer Flussrate von 5 μ l/min auf eine Gesamtdauer von etwa 90 min ausgedehnt. Zusätzlich wurde der verringerten Sensitivität der NMR-Spektroskopie durch die Erhöhung der Konzentration der Tocopherol-Homologen auf 6.67 mg/ml, entsprechend einer injizierten Absolutmenge von 1.33 μ g (200 nl Injektionsvolumen), Rechnung getragen.

Der erhaltene Konturplot der on-line μ HPLC-NMR-Trennung ist in Abbildung 48 dargestellt. Dabei wurden die Restlösungsmittelsignale des deuterierten Methanols und des deuterierten Wassers mit Hilfe von Shaped Pulsen unterdrückt. Trotz der geringen Probenmengen können die verschiedenen Homologen eindeutig voneinander differenziert werden, sogar das kritische Paar β - und γ -Tocopherol.

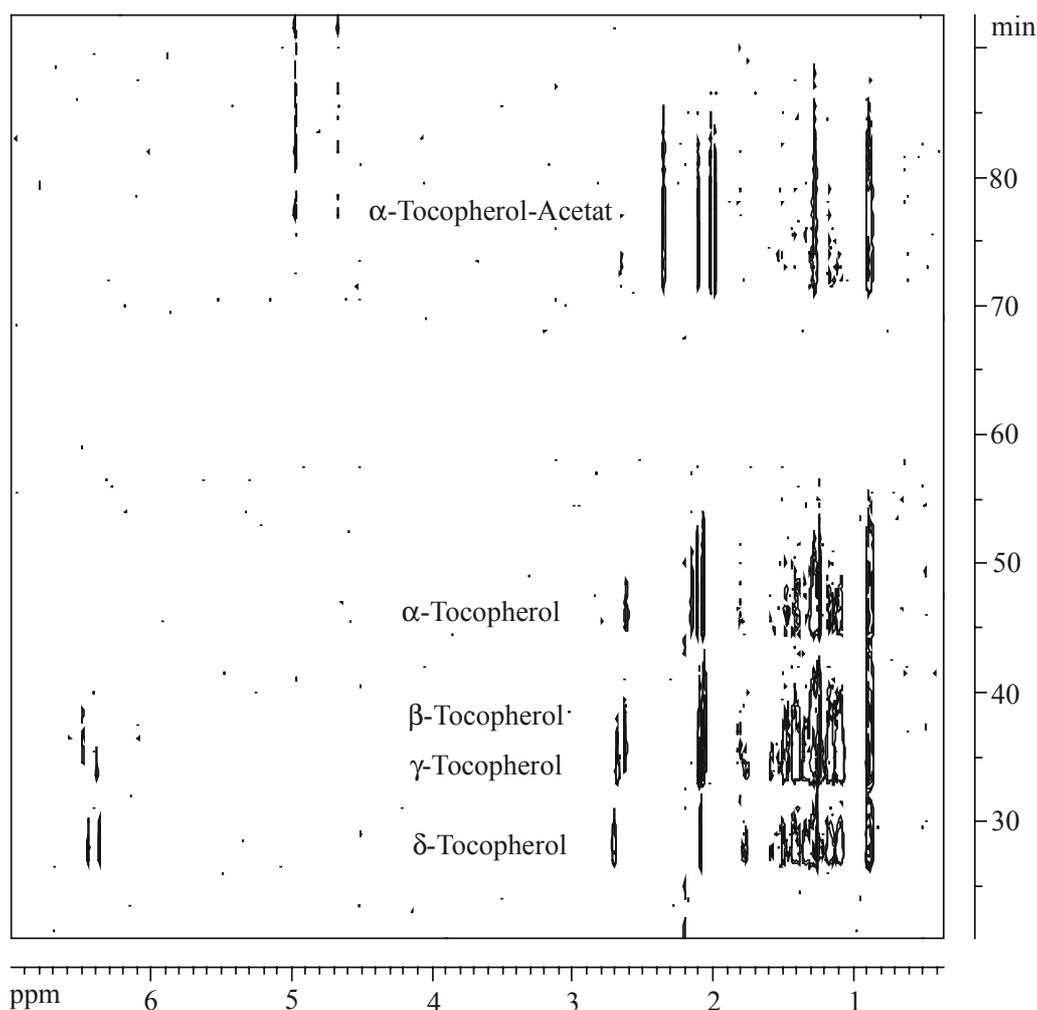


Abbildung 48: Konturplot der continuous-flow μ HPLC-NMR-Trennung eines Gemisches aus Tocopherolen

Die an den jeweiligen Peakmaxima extrahierten Protonenspektren der einzelnen Tocopherol-Homologen sind in Abbildung 49 zusammengestellt. Auch hier sind, trotz der aufgrund der niedrigen Analytmengen sehr schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnisse, die meisten Signale noch gut zuzuordnen.

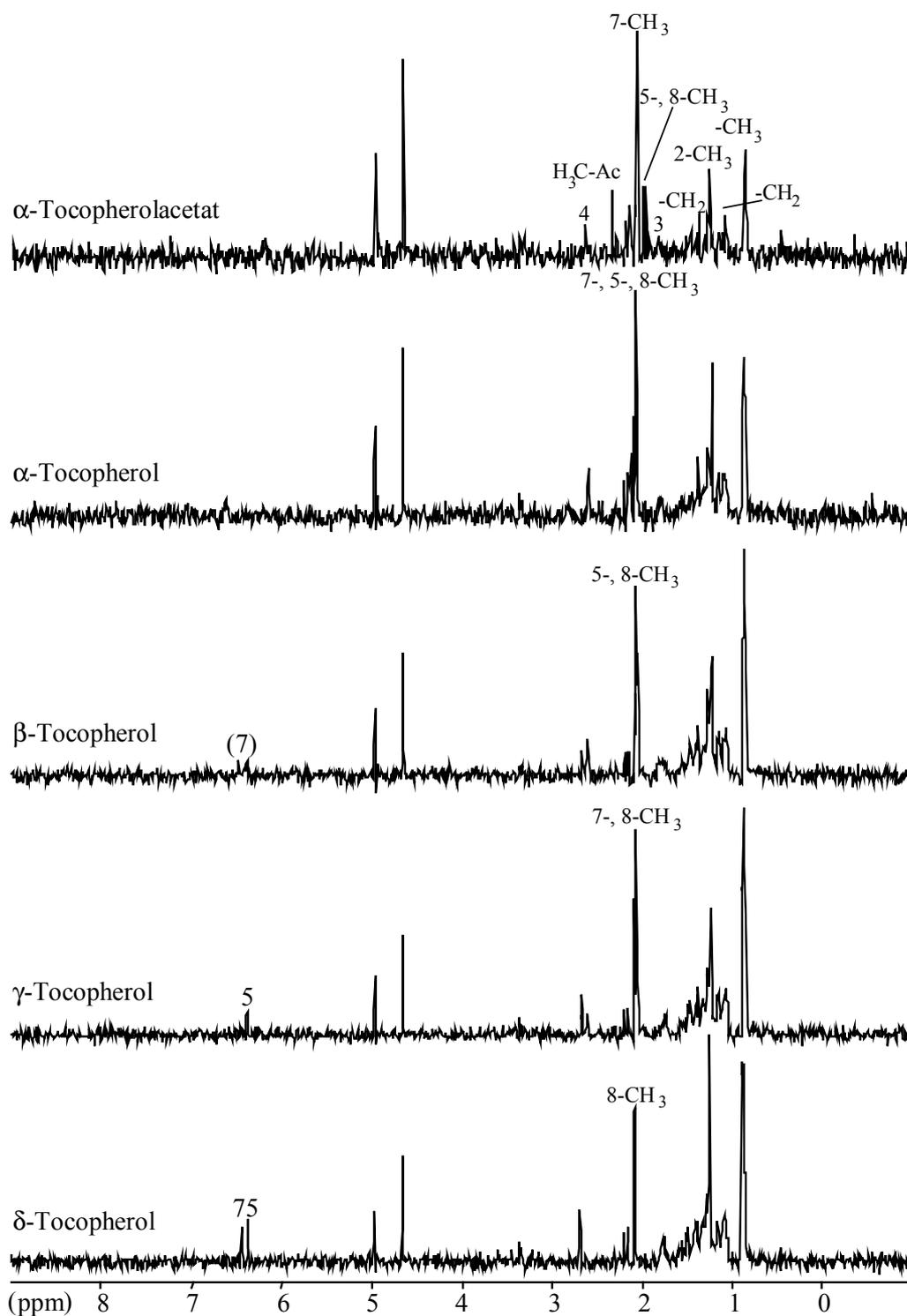


Abbildung 49: Protonen-NMR-Spektren der Tocopherole-Homologen, extrahiert aus den jeweiligen Peakmaxima der continuous-flow Messung

6 Experimenteller Teil

6.1 Geräte

6.1.1 HPLC-Anlagen

Für die Chromatographie wurden verwendet:

Agilent HPLC-Anlage Serie HP 1100 mit

- Binärer Pumpe G 1312A (Agilent Technologies, Waldbronn)
- Bischoff UV-Detektor Lambda 1010 (Bischoff Analysentechnik und -geräte, Leonberg) bzw. Agilent DAD-Detektor G1315B
- Steuerungssoftware Bruker Hystar NT (Bruker Daltonik, Bremen) bzw. Agilent Chemstation

bzw.

Waters Millennium System mit

- Quarternärer Pumpe Waters 616
- Autosampler Waters 717
- DAD-Detektor Waters 996
- Steuerungssoftware Waters Millennium (alles Waters Corporation, Milford, USA)

Für die HPLC-NMR-Kopplung wurde verwendet:

Agilent HPLC-Anlage Serie HP1100 mit

- Binärer Pumpe G 1312A
- UV-Detektor G 1314A
- Bruker Peak Sampling Unit BPSU-12 (Bruker Biospin, Rheinfelden)
- Steuerungssoftware Bruker Hystar NT

Für die μ HPLC-NMR-Kopplung wurde verwendet:

- Eldex μ HPLC-Pumpe Eldex Micro Pro (Eldex Laboratories, Napa, USA)
- UV-Detektor Knauer K-2500 (Wissenschaftliche Gerätebau Knauer, Berlin)

6.1.2 Massenspektrometer

Bruker Esquire-LC Ion Trap LC/MS⁽ⁿ⁾-System G 1980AA (Bruker Daltonik, Bremen) mit APCI-Interface

Die HPLC-APCI-MS-Kopplung wurde an einer Agilent HPLC-Anlage der Serie HP 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn) durchgeführt. Dabei standen als Software Bruker Daltonics Esquire NT 4.0 und Data Analysis 2.0 zu Verfügung.

6.1.3 NMR-Spektrometer

Bruker AC 250: 5,9 Tesla, ^{13}C -Resonanzfrequenz 62,86 MHz

Bruker AMX 400: 9,4 Tesla, Protonenresonanzfrequenz 400,13 MHz

^{13}C -Resonanzfrequenz 100,58 MHz

Bruker AMX 600: 14,1 Tesla, Protonenresonanzfrequenz 600,13 MHz

(alle Bruker Biospin, Rheinstetten)

Dabei wurden die Röhrenmessungen mit einem 5 mm Probenkopf am AMX 400-Spektrometer (HSQC-Messungen) und am AC 250-Spektrometer (^{13}C -Messungen) bei 300 K aufgenommen. Die HPLC-NMR-Messungen und die μHPLC -NMR-Messungen wurden am AMX 600-Spektrometer durchgeführt. Dabei wurde für die HPLC-NMR-Experimente ein inverser 120 μl -Durchflußprobenkopf verwendet, während die μHPLC -NMR-Kopplung mit einem ^1H -selektiven Protasis CapNMR-Probenkopf (Protasis Corporation, Marlborough, USA) mit einem Detektionsvolumen von 1,5 μl durchgeführt wurde.

6.2 Chemikalien

HPLC-reine Lösungsmittel: Aceton und Methanol (beide LiChrosolv, Merck, Darmstadt), sowie Chloroform, Ethanol, Hexan, Methanol, tert.-Butylmethylether und Tetrahydrofuran (alle JT Baker, Phillipsburg, USA)

Tocopherol-Standards: α -, β -, γ - und δ - Tocopherol sowie α -Tocopherolacetat (CalBiochem, San Diego, USA)

Carotinoid-Standards: all-E Lutein (Hoffmann LaRoche, Basel, Schweiz), all-E (R,R)-Zeaxanthin (BASF, Ludwigshafen) und β -Apo-8'-carotenal (Fluka, Neu-Ulm)

Stabilisator: 2,6-Di-tert.-butyl-p-kresol (BHT; Sigma-Aldrich, Steinheim)

MSPD-Sorbensmaterial: Isolute MSPD C₁₈ (Separtis, Grenzach-Wyhlen)

deuterierte Lösungsmittel: Methanol-d₄, Deuteriumoxid (Deutero, Kastellaun)

6.3 Probenvorbereitung und Extraktion

6.3.1 Tocopherole

6.3.1.1 Tocopherol-Standards

Zunächst wurden je 20 mg α -, β -, γ - und δ - Tocopherol sowie α -Tocopherolacetat in jeweils 1 ml Methanol gelöst. Aus diesen Stammlösungen wurde nun durch Mischen und geeignetes Verdünnen ein Standard der Konzentration 40 mg/ml hergestellt, der zu den gewünschten Konzentrationen 20, 8, 4, 2 und 0,8 μ g/ml weiterverdünnt wurde.

Für die HPLC-NMR- und die μ HPLC-NMR-Kopplung wurden jeweils 30 mg α -, β -, γ - und δ - Tocopherol in 0,75 ml Methanol-d₄ und, aufgrund der schlechteren Löslichkeit, 20 mg α -Tocopherolacetat in 1 ml Methanol-d₄ gelöst. Durch Mischen von je 50 mg der Tocopherol-Lösungen und 100 mg der α -Tocopherolacetat-Lösung wurde nun ein Standard mit der Konzentration 6,67 mg/ml erreicht.

Aus diesem Standard für die NMR-Spektroskopie konnte nun zur Verwendung mit der μ HPLC eine Verdünnung mit der Konzentration 0,67 mg/ml hergestellt werden.

6.3.1.2 Extraktion von Tocopherolen aus Zahncreme

Eine 500 mg-Portion der Zahncreme, die 0,2 % Tocopherole enthält, wurden zusammen mit 2,5 ml Methanol eingewogen und verrührt, bis das Bindemittel der Zahncreme ausflockte. Anschließend wurde das Gemisch 15 min mit Ultraschall behandelt und die ungelösten Bestandteile mit einem 45 μ m-Filter abgetrennt, damit beim Injizieren die Trennsäule nicht beschädigt wird.

6.3.1.3 Extraktion von Tocopherolen aus Zahnfleisch

Nachdem die Probanden 30 min zuvor ihre Zähne ein letztes Mal mit den Tocopherol-haltigen Zahncremes geputzt hatten, wurden die Zahnfleischproben von den Ärzten der Abteilung für Parodontologie und Zahnerhaltung der Klinik der Saarlandes in Homburg entnommen. Sie wurden unter Kühlung verschickt und bis zur Analyse im Gefrierschrank bei -30°C aufbewahrt.

Die Extraktion der Zahnfleischproben erfolgte mit Hilfe der MSPD. Dazu wurden die Proben mit 500 mg C_{18} -Sorbensmaterial in einem Mörser verrieben, das Gemisch in ein SPE-Säulchen gefüllt und zu einem festen Säulenbett gepreßt. Nun wurde die entstandene Säule zunächst mit 5 ml Wasser konditioniert, dann wurden die Tocopherole mit 6 ml Methanol extrahiert. Der Extrakt wurde unter Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt und mit 500 μl Methanol wieder aufgenommen.

6.3.2 Carotinoide

6.3.2.1 Carotinoid-Standards

Zunächst wurden jeweils 1 mg der all-E Carotinoide in 1 ml Aceton gelöst. Daraus konnte nun durch geeignetes Mischen und Verdünnen ein Standard bestehend aus Lutein und Zeaxanthin mit der Konzentration 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hergestellt werden. Dieser wurde nun mit einem Tropfen Iodlösung (in n-Hexan) versetzt und für eine Stunde unter UV-Licht isomerisiert^[191].

6.3.2.2 Zucht von intrinsisch gelabeltem Spinat und Extraktion der Carotinoide^[192,193]

Der Spinat (Sorte Melody) wurde am USDA/ARS Children's Nutrition Research Center in Houston, USA, von Prof. M. A. Grusak in einer Nährlösung, die mit 25 Atom-% deuteriertem Wasser angereichert war, hydroponisch angebaut. Dabei wurden die Pflanzen in einem, der natürlichen Umwelt nachempfundenen Gewächshaus mit einem 12 stündigen Tag bei 20°C und einer gleich langen Nacht bei 15°C sowie einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70 % gezüchtet.

Die Pflanzen wurden aus den Samen auf Filterpapier zum Keimen gebracht, anschließend wurden sie in Polyethylen-Töpfen gefüllt mit Polyethylen-Kügelchen zur Stabilisierung eingepflanzt. Dort wurden sie in einer Nährlösung mit 25 Atom-% Deuteriumoxid unter ständiger Belüftung des Nährmediums zu besseren Sauerstoff-Zufuhr der Wurzeln und unter Begasung der Pflanzen mit zusätzlichem CO₂ gezüchtet.

Nach vier Wochen wurden die Spinatpflanzen geerntet und unter Kühlung an das HNRC der Tufts University in Boston, USA, gesendet. Dort wurden die Pflanzen gewogen, zerkleinert und für fünf Minuten blanchiert. Anschließend wurde der Spinat püriert, portioniert und bis zur Analyse bzw. Verwendung für die Supplementierungsstudie bei -80 °C tiefgefroren.

Zur Extraktion der deuterierten Spinats wurden 500 mg des pürierten Gemüses zusammen mit 10 ml Methanol eine Stunde lang in einem Rütteler bei 120 U/min inkubiert. Dann wurde die Mischung in einem Eisbad 30 s lang homogenisiert und Methanol zugegeben. Diese Mischung wurde nun bei 3000 U/min für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Methanol-Phase in einen 50 ml-Maßkolben überführt und die Extraktion vier Mal mit 10 ml THF, gefolgt von Vortexen und Zentrifugieren, wiederholt. Die THF-Phasen wurden mit der Methanol-Phase vereinigt und auf 50 ml aufgefüllt. Davon wurden zur besseren Reproduzierbarkeit dreimalig jeweils 1 ml des Extraktes abgenommen, unter Stickstoffstrom getrocknet und in 1 ml Methanol wieder aufgenommen^[194].

6.3.2.3 Extraktion von Carotinoiden aus Serumproben

Aufgrund der hohen Lichtempfindlichkeit der Carotinoide wurde die Extraktion der Carotinoide unter Rotlicht durchgeführt. Zunächst wurde das Serum von den Vollblutproben mit Hilfe des Serum-Separators Sure-Sep®II abgetrennt. Dazu wurden die Blutproben 10 min lang bei 4 °C und 3000 U/min zentrifugiert (Sorvall RT6000 kühlbare Zentrifuge, Kendro Laboratory Products, Newton, USA) und das Serum anschließend abzentrifugiert.

Die Carotinoide wurden durch Zugabe von 4 ml einer Mischung aus Chloroform und Methanol (2:1, v/v), 0,5 ml Kochsalzlösung (0,85 %) und 375 µl des internen

Standards Echinenon (optische Dichte 0,15) zu 500 µl der Serumprobe extrahiert. Diese Mischung wurde gevortext und 10 min lang bei 4 °C und 3000 U/min zentrifugiert. Nun wurde die Chloroform-Phase abgetrennt und 5 ml Hexan zugegeben. Die Mischung wurde dann abermals gevortext und für 10 min zentrifugiert, anschließend wurde die Hexan-Phase mit dem Chloroform-Extrakt vereinigt und unter Stickstoffstrom in einem Wasserbad bei 40 °C zur Trockene eingengt. Die extrahierten Carotinoide wurden in 300 µl Ethanol aufgenommen^[127].

6.3.2.4 Extraktion von Carotinoiden aus retinalem Gewebe

Die zu untersuchenden Retinen stammen von Hühnern aus der Haltung am Institut für experimentelle Ophthalmologie der Universitäts-Augenklinik. Dort wurden auch die Fütterungsexperimente durchgeführt. Dazu erfolgte einer Aufteilung der Tiere in zwei Gruppen. Eine Gruppe wurde nun mit dem üblichen Hühnerfutter ernährt, während die andere Gruppe mit handelsüblichem Maisschrot gefüttert wurde. Nach 14 Tagen des Fütterungsexperiments wurden die Tiere nun getötet.

Die Präparation der Retinen erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Kohler. Die Augen wurden den getöteten Hühnern in der Dunkelheit entnommen und unter Eiskühlung aufgeschnitten. Der Füllkörper wurde entfernt und das Auge kurz in einen Phosphatpuffer getaucht, was zu leichter Ablösbarkeit der Netzhaut von Rest des Auges führt. Bis zur Analyse wurden die Retinen nun bei -40 °C tiefgekühlt.

Die Extraktion der Carotinoide erfolgte mit der MSPD. Dabei wurde eine Retina mit 1,5 g C₁₈-Sorbensmaterial, einigen Körnern des Stabilisators BHT sowie 40 ng des internen Standards β-Apo-8'-carotenal in einem Mörser verrieben. Das resultierende, homogene Gemisch wurde nun in ein SPE-Säulchen gefüllt und zu einem festen Säulenbett gepreßt. Die Säule wurde anschließend mit 15 ml Wasser konditioniert und die Carotinoide mit 4 ml Aceton extrahiert. Der Extrakt wurde nun im Stickstoffstrom getrocknet und mit 100 µl Aceton aufgenommen.

6.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

6.4.1 Säulen und Kapillaren

Für die Untersuchungen der Zahncreme und Zahnfleischproben auf Tocopherole sowie die Analyse der Hühnerretinen nach den Fütterungsexperimenten wurde verwendet:

- Bischoff ProntoSil 200-3-C30 mit 3 μm Partikelgröße, 200 \AA Porenweite, Dimension 250 x 4.6 mm bzw. 250 x 2 mm (Bischoff Analystechnik und -geräte, Leonberg)

Für die Analyse der Serumproben im Rahmen der Bioverfügbarkeitsstudie wurde verwendet:

- YMC Carotenoid S-3 micron mit 3 μm Partikelgröße, Dimension 150 x 4.6 mm (Waters Inc., Milford, USA)

Da zur Zeit noch keine C_{30} -RP-Kapillaren käuflich sind, war es notwendig für die μHPLC -Messungen eigene Kapillaren zu packen. Dabei wurden 20 mg der stationären Phase ProntoSil 200-3-C30 (3 μm Partikelgröße und 200 \AA Porenweite, Bischoff Analystechnik und -geräte, Leonberg) in 400 μl Tetrachlorkohlenstoff suspendiert und 10 min mit Ultraschall behandelt. Das erhaltene Slurry wurde in ein Slurry-Vorratsgefäß überführt und unter Verwendung einer pneumatischen Pumpe (Knauer, Berlin) mit Druck in eine Fused Silica Kapillare mit 250 μm I.D./360 μm O.D. (Ziemer Chromatographie, Mannheim) gepresst. Dabei fand das folgende Packprogramm Anwendung: Anfangsdruck 400 bar, in 5 min Gradient nach 650 bar, 30 min lang packen bei 650 bar, Druckabbau nach weiteren 30 min. Die Endfritten bestanden aus Totvolumen-freien Verbindungen, Stahlsieben und Ferrulen (Vici AG Valco Int., Schenk, Schweiz). Die gepackte Kapillaren waren 20 cm lang.

6.4.2 Chromatographische Bedingungen

6.4.2.1 Bedingungen für die HPLC

Die Tocopherol-Homologen wurden isokratisch bei einer Flussrate von 1 ml/min mittels HPLC getrennt und bei 280 nm detektiert. Als Eluent diente reines Methanol. Die Injektionsmengen lagen zwischen 20 und 25 μl .

Die HPLC-Untersuchungen der Carotinoid-Standards und Retina-Extrakte wurden bei einem Fluß von 1 ml/min und einer Detektions-Wellenlänge von 450 nm durchgeführt. Dabei wurde folgende Gradientenelution angewendet: 0 min Aceton:Wasser 86:14 (v/v), 20-25 min Gradient nach 100:0, 25-40 min 100:0, 40-45 min Gradient nach 86:14, 45-55 min 86:14. Die injizierte Probenmenge war 25 µl.

Die Serumproben der Bioverfügbarkeitsstudie wurden chromatographisch bei einem Fluß von 1 ml/min und bei der Wellenlänge 450 nm getrennt. Dazu wurde als mobile Phase ein Gradient bestehend aus Methanol, TBME und Wasser eingesetzt (Zusammensetzung Mischung A 83:15:2 (v/v/v), Zusammensetzung Mischung B 8:90:2 (v/v/v)): 0 min A:B 100:0, 1-8 min Gradient nach 70:30, 8-13 min 70:30, 13-22 min Gradient nach 45:55, 22-24 min 45:55, 24-34 min Gradient nach 5:95, 34-38 min 5:95, 38-40 min Gradient nach 100:0, 40-50 min 100:0. Die injizierte Menge an Serumextrakt lag bei 50 µl.

Für die HPLC-MS-Untersuchung der Serumproben wurde der Gradient wie folgt modifiziert: 0 min 100:0, 0-7 min Gradient nach 70:30, 7-12 min 70:30, 12-20 min Gradient nach 5:95, 20-25 min 5:95, 25-30 min Gradient nach 100:0.

6.4.2.2 Bedingungen für die µHPLC

Die Tocopherol-Homologen wurden mittels µHPLC isokratisch bei einer Flussrate von 5 µl/min getrennt und bei 280 nm detektiert. Als Eluent diente ein Methanol-Wasser-Gemisch der Zusammensetzung 90:10 (v/v). Die Injektionsmenge des Standards lag bei 200 nl.

Die µHPLC-Trennung der geometrischen Isomere von Lutein und Zeaxanthin fand bei einer Flussrate von 5 µl/min und bei einer Wellenlänge von 450 nm statt. Die mobile Phase bestand aus einem Gemisch aus Aceton und Wasser der Zusammensetzung 85:15 (v/v). Es wurden 200 nl injiziert.

6.5 MS-Experimente

Die Massenspektren der Carotinoide aus gelabeltem Spinat wurden mit der Ionisierungsmethode APCI im positiven Ionen-Modus aufgenommen. Dabei wurde ein Massenbereich von 545 bis 570 m/z aufgezeichnet. Die Corona-Spannung betrug 2000 V, während der Nebulizer bei 50 psi arbeitete. Der Strom des Trockengases Stickstoff betrug 4 l/min mit einer Temperatur von 250 °C. Die Temperatur der Ionisierungskammer lag bei 300 °C.

6.6 NMR-Experimente

6.6.1 HPLC-NMR-Kopplung

Das continuous-flow HPLC-NMR-Experiment der Tocopherol-Homologen wurde mit dem Pulsprogramm lc2pnps, einem Pseudo-2D-Experiment mit Unterdrückung der Lösemittelsignale via Shaped-Pulsen, durchgeführt. Es wurden 128 Reihen in F1-Dimension gemessen, wobei jede Reihe mit 32 Transienten und 4k Datenpunkten über ein spektrales Fenster von 8620 Hz aufgenommen wurde.

Die Lösungsmittelsignale des Methanols bei 3,3 und 4,7 ppm wurden mit Hilfe von Shaped-Pulsen unterdrückt. Dazu konnte die Vorsättigung während der Delayzeit von 1,6 s mit Rechteckpulsen der Länge 100 ms erreicht werden. Die Messtemperatur betrug 300 K. Vor der Fourier-Transformation wurden die Spektren in F2-Dimension mit einer Sinusfunktion multipliziert.

6.6.2 Hochauflösungs-NMR-Spektroskopie

Das Protonenspektrum von α -Tocopherol wurde mit dem Pulsprogramm zg30 mit 16 Transienten und 32k Datenpunkten über einen spektralen Bereich von 18,1 ppm aufgenommen.

Das ^{13}C - und das Dept-135-NMR-Spektrum wurden mit jeweils 512 Transienten und 32k Datenpunkten mit einem spektralen Fenster von 248,4 ppm aufgezeichnet. Vor der Fourier-Transformation wurden die FIDs jeweils mit einer Exponentialfunktion mit einer Linienverbreiterung von 3 Hz multipliziert.

Für das HSQC-NMR-Spektrum wurden mit dem Pulsprogramm sfhsqc in F2-Dimension 120 Transienten und 2 k Datenpunkte über einen spektralen Bereich von 11,8 ppm aufgenommen, während in F1-Dimension 104 Reihen über einen spektralen Bereich von 236,6 ppm gemessen wurden.

6.6.3 μ HPLC-NMR-Kopplung

Die continuous-flow μ HPLC-NMR-Messung zur Trennung der Tocopherol-Homologen wurde mit dem Pulsprogramm lc2pnps aufgenommen. Es wurden 256 Reihen in F1-Dimension gemessen, wobei jede Reihe mit 16 Transienten und 4k Datenpunkten über ein spektrales Fenster von 9615 Hz aufgenommen wurde.

Die Restsignale des deuterierten Methanols bei 3,3 und 4,7 ppm und des Deuteriumoxids bei 4,95 ppm wurden durch Shaped-Pulse unterdrückt. Dabei betrug Delayzeit der Vorsättigung von 1,6 s, während die Rechteckspulse 100 ms lang waren. Die Messtemperatur betrug 300 K. Vor der Fourier-Transformation wurde in F2-Richtung eine Multiplikation der Spektren mit einer quadrierten Sinusfunktion durchgeführt.

7 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass die Anreicherung und Bioverfügbarkeit von biologisch aktiven Substanzen mit Hilfe von analytischen Methoden bestimmt werden kann. Dabei war vor allem die maßgeschneiderte Kombination von Extraktion, chromatographischer Trennung und Detektion für die Untersuchung der instabilen sekundären Pflanzenwirkstoffe von Bedeutung.

Die Analytik von Tocopherolen, wie sie in der Studie zur Anreicherung von Tocopherolen in Zahnfleisch durchgeführt wurde, basiert vor allem auf der Auftrennung der Tocopherol-Homologen, die unter Verwendung einer hochselektiven C₃₀-Trennsäule durchgeführt wurde. Der hierfür verwendete Tocopherol-Extrakt war zuvor durch die MSPD, eine für feste, biologische Proben besonders schnelle und schonende Extraktionsmethode, aus den Zahnfleischproben isoliert worden. Die Identifizierung der verschiedenen, aufgetrennten Tocopherol-Homologen konnte durch ein continuous-flow HPLC-NMR-Experiment erreicht werden.

Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung der Zahnfleischproben ergaben, dass sich tatsächlich nach Verwendung der Tocopherol-haltigen Zahncreme Vitamin E im Zahnfleisch anreichert. Dies bedeutet, dass es dort aufgrund seiner antioxidativen Fähigkeiten tatsächlich einen präventiven oder kurativen Effekt bezüglich der Pathogenese von Gingivitis entwickeln könnte. In welchem Maße dies geschieht, muß nun in klinischen Studien untersucht werden.

Auch zur chromatographischen Trennung von Carotinoiden ist die C₃₀-Trennphase gut geeignet, wie der Einsatz zur Trennung von Serumcarotinoiden zeigen kann. Diese Untersuchung wurde im Rahmen einer Studie zur Bestimmung der absoluten Bioverfügbarkeit von Lutein aus intrinisch gelabeltem Gemüse durchgeführt. Dabei ermöglichte die HPLC-MS-Kopplung unter Verwendung der Ionisierungsmethode APCI die Unterscheidung von deuteriertem Lutein aus der Supplementierung mit gelabeltem Gemüse vom endogenen Serum-Lutein. Aus der Quantifizierung der unterschiedlichen Ionenspuren konnte die Anreicherung des deuterierten Luteins im Körper in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt werden. Die pharmakologische

Definition der Bioverfügbarkeit und das Kurvenfitting der erhaltenen Absorptions-Desorption-Kurven ermöglichte die Berechnung der absoluten Bioverfügbarkeit.

Die erhaltenen Werte liegen zwischen 0,53 und 2,10 %. Ob die relativ große Schwankungsbreite auf Messungenauigkeiten basiert oder ob es möglicherweise unterschiedliche Typen von Menschen bezüglich der Absorptionsfähigkeit von Carotinoiden gibt, ist dabei noch unbekannt. Um die erhaltenen Werte besser einordnen zu können, sollte die Studie durch weitere Probanden ergänzt werden.

Darüber hinaus wäre es sinnvoll, analoge Studien zur Bestimmung der Bioverfügbarkeiten anderer Carotinoide durchzuführen. Zu diesem Zweck werden derzeit auch andere intrinisch gelabelte Gemüsesorten, beispielsweise Tomaten und Möhren zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit von Lycopin bzw. β -Carotin, gezüchtet. Auch die pharmazeutische und die Lebensmittelindustrie haben Interesse an dieser Art zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit gezeigt, da sie ihre synthetisch hergestellten Carotinoide, die Lebensmitteln bzw. Nahrungsergänzungsmitteln zugesetzt werden, auf eine möglicherweise abweichende Bioverfügbarkeit hin untersuchen möchten.

Die Anreicherung von Carotinoiden am Wirkungsort, in diesem Falle der Retina, wurde mit Hilfe eines Fütterungsexperimentes analysiert. Dabei lag der Schwerpunkt auf der Betrachtung der Zusammensetzung der geometrischen Isomere von Lutein und Zeaxanthin in der Retina. Die chromatographische Trennung der Isomere erfolgte ebenfalls auf einer C_{30} -Trennsäule. Um eine möglicherweise unterschiedliche Anreicherung der Carotinoid-Isomere betrachten zu können, wurden Hühner 14 Tage lang entweder mit Standardfutter oder mit Maisschrot ernährt. Eine quantitative Analyse der beiden Futtersorten und der Retinen nach Supplementierung konnte jedoch noch nicht alle gewünschten Ergebnisse liefern. Gezeigt werden konnte bisher, dass die Bioverfügbarkeit der Carotinoide aus der natürlichen Matrix des Mais höher ist als diejenige der vermutlich synthetisch zugesetzten Carotinoide im Standardfutter. Außerdem wurde die Beobachtung gemacht, dass die Isomere nicht alle in gleichem Maße absorbiert werden, da das Isomerpattern des Futters und die Zusammensetzung der korrespondierenden Retina nicht exakt übereinstimmen.

Zur Zeit ist eine neue Phase der Fütterungsexperiments in Planung. Bei dieser sollen synthetisches, formuliertes Lutein und Zeaxanthin mit einer bekannten

Isomerenzusammensetzung verfüttert werden, damit die Anreicherung und mögliche Umformung der verschiedenen Isomeren unter definierten Ausgangsbedingungen bestimmt werden kann. Gleichzeitig kann bei Fütterung nur eines Carotinoids eventuell auch eine Umformung von Lutein zu Zeaxanthin oder umgekehrt beobachtet werden.

Um eine Miniaturisierung der bestehenden HPLC-Trennungen zur Untersuchung von Tocopherolen und Carotinoiden auf den Maßstab der μ HPLC zu ermöglichen, war es zunächst einmal notwendig, geeignete Fused Silica-Kapillaren zu akquirieren. Da bisher nur C_{18} -Kapillaren kommerziell erhältlich sind, die aber für eine adequate Lösung der vorliegenden Trennprobleme nicht geeignet sind, müssen C_{30} -Kapillaren selbst hergestellt werden. Dies konnte mit der Slurry-Packmethode erreicht werden, dabei wurden zur Fixierung des Packungsbetts in der Kapillare Metallsiebchen verwendet. Die Anpassung der Trennmethode auf die notwendigen kleinen Flußraten konnte ohne Probleme vollzogen werden.

Für die Kopplung der μ HPLC mit der NMR-Spektroskopie wurde ein neuartiger Kapillar-Durchflußprobenkopf eingesetzt, der eine solenoide Anordnung der Durchflussszelle horizontal zum B_0 -Feld besitzt. Dabei zeigten der Humptest und der Empfindlichkeitstest mit Sucrose, dass dieses neue Design sowohl eine schmale Linienbreite als auch eine gute Sensitivität gestattet. Als erstes Kopplungsexperiment wurde die on-line Detektion einer Trennung von Tocopherol-Homologen getestet. Dabei war es möglich, mit einer Injektion von nur 1,33 μ g jedes Tocopherols einen zur Identifizierung und Strukturaufklärung der verschiedenen Tocopherole ausreichenden Konturplot zu erhalten.

Einen nächsten Schritt auf dem Gebiet der μ HPLC-NMR-Kopplung stellt nun die Durchführung von stopped-flow Messungen dar, bei denen die μ HPLC-Trennung genau dann angehalten wird, wenn sich die zu untersuchende Probenkomponente im Detektionsvolumen des Kapillar-Durchflußprobenkopfes befindet. Dies bedeutet nicht nur, dass noch kleinere Analytmengen für eine Strukturaufklärung ausreichend sind, sondern gleichzeitig auch, dass nun für die Aufklärung komplexer Strukturen zusätzlich zweidimensionale NMR-Experimente zur Verfügung stehen.

8 Literatur

- [1] Bowman, B.A.; Russell, R.M. (Hrsg.); *Present Knowledge in Nutrition*, International Life Science Institute Press, Washington, 2001.
- [2] Biesalski, H.K.; Schrezenmeier, J.; Weber, P.; Weiß, H.E.; *Vitamine*, Thieme Verlag, Stuttgart, 1997.
- [3] Prasad, K.N.; Cole, W.; Hovland, P.; *Nutrition*, 1998, **14** (2), 197-210.
- [4] Cooper, D.A.; Eldridge, A.L.; Peters, J.C.; *Nutr. Rev.*, 1999, **57** (7), 201-14.
- [5] Pietta, P.-G.; *J. Nat. Prod.*, 2000, **63**, 1035-42.
- [6] Edge, R.; McGarvey, D.J.; Truscott, T.G.; *J. Photochem. Photobiol. B*, 1997, **41**, 189-200.
- [7] Liebler, D.C.; *Crit. Rev. Toxicol.*; 1993, **23** (2), 147-69.
- [8] Elmadfa, I.; Bosse, W.; *Vitamin E*, Wiss. Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1985.
- [9] Basu, H.N.; Del Vecchio, A.J.; Flider, F.; Orthoefer, F.T.; *JAOCS*, 2001, **78** (7), 665-75.
- [10] Tang, G.; Wang, X.-D.; Russell, R.M.; Krinsky, N.I.; *Biochemistry*, 1991, **30**, 9829-34.
- [11] Tang, G.; Krinsky, N.I.; *Meth. Enzymol.*, 1993, **214**, 69-74.
- [12] DeFelice, S.L.; *Scip. Mag.*, 1992, 9.
- [13] Castenmiller, J.J.M.; West, C.E.; *Annu. Rev. Nutr.*, 1998, **18**, 19-38.
- [14] Strohschein, S.; Pursch, M.; Lubda, D.; Albert, K.; *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 13-8.
- [15] Khachik, F.; *J. Chromatogr.* 1992, **582**, 153-66.
- [16] van Breemen, R.B.; *Pure & Appl. Chem.*, 1997, **69** (10), 2061-66.
- [17] Lacker, T.; Strohschein, S.; Albert, K.; *J. Chromatogr. A*, 1999, **854**, 37-44.
- [18] Albert, K. (Hrsg.), *On-line LC-NMR and Related Techniques*, Wiley, Chichester, 2002.
- [19] Dachtler, M.; Glaser, T.; Kohler, K.; Albert, K.; *Anal. Chem.*, 2001, **73** (3), 667-74.
- [20] Olson, D.L.; Lacey, M.E.; Sweedler, J.V.; *Anal. Chem. News Feat.*, April 1998, 257A-64A.
- [21] Albert, K.; Krucker, M.; Glaser, T.; Schefer, A.; Lienau, A.; Zeeb, D.; *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, **372**, 25-6.
- [22] R.P.M.; van Dusseldorp, M.; Weststrate, J.A.; Eskes, T.K.A.B.; Hautvast, J.G.A.J.; *Am. J. Clin. Nutr.*, 1999, **70**, 261-8.
- [23] Mares-Perlman, J.A.; Fisher, A.I.; Klein, R.; Palta, M.; Block, G.; Millen, A.E.; Wright, J.D.; *Am. J. Epidemiol.*, 2001, **153** (5), 424-32.
- [24] Evans, H.M.; Bishop, K.S.; *Science*, 1922, **56**, 650-1.

- [25] Fernholz, E.J.; *J. Amer. Chem. Soc.*, 1938, **40**, 700.
- [26] IUPAC-Kommission, *Eur. J. Biochem.*, 1982, **123**, 473-5.
- [27] Bieri, J.G.; Corash, L.; Hubbard, V.S.; *New Engl. J. Med.*, 1983, **308** (18), 1063-71.
- [28] Hamilton, R.J.; Kalu, C.; McNeill, G.P.; Padley, F.B.; Pierce, J.H.; *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1998, **75**, 813.
- [29] Schultz, G.; *Fat Sci. Technol.*, 1990, **92**, 86-91.
- [30] Jucker, E.; *Angew. Chemie*, 1959, **71**, 253-9.
- [31] Eugster, C.H.; *Chem. in uns. Zeit*, 1972, **6**, 146-53.
- [32] Kamal-Eldin, A.; Appelquist, L.-A.; *Lipids*, 1996, **31**, 671-701.
- [33] Wolf, R.; Wolf, D.; Ruocco, V.; *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 1998, **10**, 103-17.
- [34] Burton, G.W.; Traber, M.G.; *Annu. Rev. Nutr.*, 1990, **10**, 357-82.
- [35] Giuliani, A.; Cestaro, B.; *Eur. J. Cancer Prev.*, 1997, **6** (Suppl. 1), S55-S67.
- [36] Stephens, N.G.; Parsons, A.; Schofield, P.M.; et al.; *Lancet*, 1996, **347**, 781-6.
- [37] Pryor, W.A.; *Free Rad. Biol. Med.*, 2000, **28**, 141-64.
- [38] Heinonen, O.P.; Albanes, D.; *New Engl. J. Med.*, 1994, **330** (15), 1029-35.
- [39] Marchioli, R.; *Pharmacol. Res.*, 1999, **40** (3), 227-38.
- [40] Cooper, D.A.; Eldridge, A.L.; Peters, J.C.; *Nutr. Rev.*, 1999, **57** (5), 133-45.
- [41] Flynn, B.L.; Ranno, A.E.; *Ann. Pharmacother.*, 1999, **33**, 188-97.
- [42] Traber, M.G.; Arai, H.; *Annu. Rev. Nutr.*, 1999, **19**, 343-55.
- [43] Umbach, W.; *Kosmetik*, Thieme Verlag, Stuttgart, 2. Aufl., 1995.
- [44] Pader, M.; *Oral Hygiene Products and Practice*, Marcel Dekker Inc., New York, 1998.
- [45] Vollmer, G.; Franz, M.; *Chemie in Bad und Küche*, Thieme Verlag, Stuttgart, 84.
- [46] Vollmer, G.; Franz, M., *Chemische Produkte im Alltag*, Thieme Verlag, Stuttgart, 154.
- [47] Aebi, H. (Hrsg.); *Kosmetika, Riechstoffe und Lebensmittelzusätze*, Thieme Verlag, Stuttgart, 21.
- [48] Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Hrsg.); *Carotenoids*, Volume 1A, Birkhäuser, Basel, 1995.
- [49] Falbe, J.; Regitz, M.; *Römpp Chemie Lexikon*, 9. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1995.
- [50] International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) and International Union of Biochemistry (IUP) Commission on Nomenclature; *Pure & Appl. Chem.*, 1975, **69** (10), 2027-38.

- [51] Liaaen-Jensen, S.; *Pure & Appl. Chem.*, 1997, **69** (10), 2027-38.
- [52] Zechmeister, L.; *Cis-trans Isomeric Carotenoids, Vitamin A and Arylpolyenes*, Springer Verlag, Wien, 1962.
- [53] Ferruzzi, M.G.; Nguyen, M.L.; Sander, L.C.; Rock, C.L.; Schwartz, S.J.; *J. Chromatogr. A*, 2001, **760**, 289-99.
- [54] Rüttimann, A.; Schiedt, K.; Vecchi, M.; *J. High Resol. Chromatogr.*, 1983, **6**, 612-6.
- [55] Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Hrsg.); *Carotenoids*, Volume 1B, Birkhäuser, Basel, 1998.
- [56] <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/data/car98/car98.html>
- [57] Sandmann, G.; *Arch. Biochem. Biophys.*, 2001, **385** (1), 4-12.
- [58] Porter, J.W.; Spurgeon, S.L.; *Pure & Appl. Chem.*, 1979, **51**, 609-22.
- [59] Breitenbach, J.; Braun, G.; Steiger, S.; Sandmann, G.; *J. Chromatogr. A*, 2001, **936**, 59-69.
- [60] Isler, O.; *Pure & Appl. Chem.*, 1979, **51**, 447-62.
- [61] Pfander, H.; Traber, B.; Lanz, M.; *Pure & Appl. Chem.*, 1997, **69** (10), 2047-60.
- [62] Meyer, K.; *Chemie in uns. Zeit*, 2002, **36** (3), 178-92.
- [63] Khachik, F.; Beecher, G.R.; Smth, J.C.; *J. Cell. Biochem.*, 1995, **22** (Suppl.), 236-46.
- [64] Furr, H.C.; Clark, R.M.; *J. Nutr. Biochem.*, 1997, **8**, 364-77.
- [65] Olson, J.A.; *J. Nutr.*, 1989, **119**, 105-8.
- [66] Tang, G.; Gu, X.-F.; Hu, S.-M.; Xu, Q.-M.; Qin, J.; Dolnikoski, G.G.; Fjeld, C.R.; Gao, X.; Russell, R.M.; Yin, S.-A.; *Am. J. Clin. Nutr.*, 1999, **70**, 1069-76.
- [67] Krinsky, N.I.; *J. Nutr.*, 2002, **132**, 540S-2S.
- [68] Liebler, D.C.; McClure, T.D.; *Chem. Res. Toxicol.*, 1996, **9**, 8-11.
- [69] Mortensen, A.; Skibsted, L.H.; Truscott, T.G.; *Arch. Biochem. Biophys.*, 2001, **385** (1), 13-9.
- [70] Rice-Evans, C.A.; Sampson, J.; Bramley, P.M.; Holloway, D.E.; *Free Rad. Res.*; 1997, **26**, 381-98.
- [71] Klipstein-Grobusch, K.; Launer, L.J.; Geleijnse, J.M.; Boeing, H.; Hofman, A.; Witteman, J.C.M.; *Artherosclerosis*, 2000, **148**, 49-56.
- [72] Kritchevsky, S.B.; *J. Nutr.*, 1999, **129**, 5-8.
- [73] Arab, L.; Steck, S.; *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000, **71** (Suppl.), 1691S-5S.
- [74] Ness, A.R.; Powles, J.W.; *Int. J. Epidemiol.*, 1997, **26** (1), 1-13.
- [75] Palace, V.P.; Khaper, N.; Qin, Q.; Singal, P.K.; *Free Rad. Biol. & Med.*, 1999, **26** (5/6), 746-61.

- [76] Cohen, J.H.; Kristal, A.R.; Stanford, J.L.; *J. Nat. Cancer Inst.*, 2000, **92** (1), 61-8.
- [77] Miller, E.C.; Hadley, C.W.; Schwartz, S.J.; Erdman, J.W.; Boileau, T. W.-M.; Clinton, S.K.; *Pure & Appl. Chem.*, 2002, **74** (8), 1435-41.
- [78] Metz, G.; *PZ*, 1995, **140** (6), 9-23.
- [79] Slattery, M.L.; Benson, J.; Curtin, K.; Ma, K.-N.; Schaeffer, D.; Potter, J.D.; *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000, **71**, 575-82.
- [80] Comstock, G.W.; Alberg, A.J.; Huang, H.-Y.; Wu, K.; Burke, A.E.; Hoffman, S.C.; Norkus, E.P.; Gross, M.; Cutler, R.G.; Morris, J.S.; Spate, V.L.; Helzlsouer, K.J.; *Cancer Epidemiol. Biomark. & Prev.*, 1997, **6**, 907-16.
- [81] Dorgan, J.F.; Sowll, A.; Swanson, C.A.; Potischman, N.; Miller, R.; Schussler, N.; Stephenson, H.E.; *Cancer Causes and Control*, 1998, **9**, 89-97.
- [82] LeMarchand, L.; Hankin, J.H.; Kolonel, L.N.; Beecher, G.R.; Wilkens, L.R.; Zhao, L.P.; *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 1993, **2**, 183-7.
- [83] Ziegler, R.G.; Colavito, E.A.; Hartge, P.; McAdams, M.J.; Schoenberg, J.B.; Mason, T.J.; Fraumeni, J.F.; *J. Natl. Cancer Inst.*, 1996, **88** (9), 612-5.
- [84] Zhang, S.; Hunter, D.J.; Forman, M.R.; Rosner, B.A.; Speizer, F.E.; Colditz, G.A.; Manson, J.E.; Hankinson, S.E.; Willett, W.C.; *J. Natl. Cancer Inst.*, 1999, **91** (6), 547-56.
- [85] Omenn, G.S.; Goodman, G.E.; Thornquist, M.D.; Balmes, J.; Cullen, M.R.; Glass, A.; Keogh, J.P.; Meyskens, F.L.; Valanis, B.; Williams, J.H.; Barnhart, S.; Hammar, S.; *New Engl. J. Med.*, 1996, **334**, 1150-5.
- [86] Young, A.J.; Lowe, G.M.; *Arch. Biochem. Biophys.*, 2001, **385** (1), 20-7.
- [87] Food and Nutrition Board, *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids*, National Academy Press, Washington, 2000.
- [88] Wald, G.; *Nature* (London), 1945, **101**, 653-8.
- [89] Brown, P.K.; Wald, G.; *Nature* (London), 1963, **200**, 37-43.
- [90] Faller, A.; *Der Körper des Menschen*, 10. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1984.
- [91] www.regiosurf.net/supplement/wahrn/sehen/sehen/htm.
- [92] Schmidt, R.F.; Thews, G.; *Physiologie des Menschen*, 23. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, 1987.
- [93] Curran-Celentano, J.; Hammond, B.R.; Ciulla, T.A.; Cooper, D.A.; Danis, R.B.; *Am. J. Clin. Nutr.*, 2001, **74**, 796-802.
- [94] Landrum, J.T.; Bone, R.A.; *Arch. Biochem. Biophys.*, 2001, **385** (1), 28-40.
- [95] Sommerburg, O.; Siems, W.G.; Hurst, J.S.; Lewis, J.W.; Kliger, D.S.; van Kuijk, F.J.G.M.; *Curr. Eye Res.*, 1999, **19** (6), 491-5.
- [96] Dachtler, M.; Kohler, K.; Albert, K.; *J. Chromatogr. B*, 1998, **720**, 211-216.

- [97] Emerit, I.; Chance, B. (Hrsg.); *Free Radicals and Aging*, Birkhäuser Verlag, Basel, 1992.
- [98] www.focusonretina.com
- [99] Beatty, S.; Murray, I.J.; Henson, D.B.; Carden, D.; Koh, H.-H.; Boulton, M.E.; *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2001, **42** (2), 439-46.
- [100] Berendschot, T.T.J.M.; Goldbohm, R.A.; Klöpping, W.A.A.; van de Kraats, J.; van Norel, J.; van Norren, D.; *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2000, **41** (11), 3322-6.
- [101] Bone, R.A.; Landrum, J.T.; Mayne, S.T.; Gomez, C.M.; Tibor, S.E.; Twaroska, E.E.; *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2001, **42** (1), 235-40.
- [102] Bone, R.A.; Landrum, J.T.; Dixon, Z.; Chen, Y.; Llerena, C.M.; *Exp. Eye Res.*, 2000, **71**, 239-45.
- [103] Hammond, B.R.; Johnson, E.J.; Russell, R.M.; Krinsky, N.I.; Yeum, K.-Y.; Edwards, R.B.; Snodderly, D.M.; *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1997, **38**, 1795-1801.
- [104] Hammond, B.R.; Wooten, B.R.; Curran-Celentano, J.; *Arch. Biochem. Biophys.*, 2001, **385** (1), 41-6.
- [105] Johnson, E.J.; Hammond, B.R.; Yeum, K.-J.; Qin, J.; Wang, X.D.; Castaneda, C.; Snodderly, D.M.; Russell, R.M.; *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000, **71**, 1555-62.
- [106] Lyle, B.J.; Mares-Perlman, J.A.; Klein, B.E.; Klein, R.; Greger, J.L.; *Am. J. Epidemiol.*, 1999, **149** (9), 801-9.
- [107] Pauleikhoff, D.; van Kuijk, F.J.G.M.; Bird, A.C.; *Ophthalmologe*, 2001, **98**, 511-19.
- [108] Seddon, J.M.; Ajani, U.A.; Sperduto, R.D.; Hiller, R.; Blair, N.; Burton, T.C.; Farber, M.D.; Gragoudas, E.S.; Haller, J.; Miller, D.T.; Yannuzzi, L.A.; Willett, W.; *J.A.M.A.*, 1994, **272** (18), 1413-20.
- [109] Allen Taylor (Hrsg.); *Nutritional and Environmental Influences on Vision*, CRC Press, Boca Raton, 1999.
- [110] Mares-Perlman, J.A.; Millen, A.E.; Ficek, T.L.; Hankinson, S.E.; *J. Nutr.*, 2002, **132**, 518S-24S.
- [111] Fullmer, L.A.; Shao, A.; *Cereal Foods World*, 2001, **46** (9), 408-13.
- [112] Brown, L.; Rimm, E.B.; Seddon, J.M.; Giovannucci, E.L.; Chasan-Taber, L.; Spiegelman, D.; Willett, W.C.; Hankinson, S.E.; *Am. J. Clin. Nutr.*, 1999, **70**, 517-24.
- [113] Chasan-Taber, L.; Willett, W.C.; Seddon, J.M.; Stampfer, M.J.; Rosner, B.; Colditz, G.A.; Speizer, F.E.; Hankinson, S.E.; *Am. J. Clin. Nutr.*, 1999, **70**, 509-16.
- [114] Castenmiller, J.J.M.; West, C.; *Pure & Appl. Chem.*, 1997, **69** (10), 2145-50.
- [115] Traber, M.G.; *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000, **71**, 1029-30.
- [116] Yeum, K.-J.; Russell, R.M.; *Annu. Rev. Nutr.*, 2002, **22**, 483-504.

- [117] Boileau, A.C.; Merchen, N.R.; Wasson, K.; Atkinson, C.; Erdman, J.W.; *J. Nutr.*, 1999, **129**, 1176-81.
- [118] Castenmiller, J.J.M.; West, C.E.; Linssen, J.P.H.; van het Hof, K.H.; Voragen, A.G.J.; *J. Nutr.*, 1999, **129**, 349-55.
- [119] van het Hof, K.H.; West, C.E.; Weststrate, J.A.; Hautvast, J.G.A.J.; *J. Nutr.*, 2000, **130**, 503-6.
- [120] Deming, D.M.; Teixeira, S.R.; Erdman, J.W.; *J. Nutr.*, 2002, **132**, 2700-8.
- [121] Edwards, A.J.; Hguyen, C.H.; You, C.-S.; Swanson, J.E.; Emenhiser, C.; Parker, R.S.; *J. Nutr.*, 2002, **132**, 159-67.
- [122] Broekmans, W.M.R.; Klöpping-Ketelaars, I.A.A.; Schurrman, C.R.W.C.; Verhagen, H.; van den Berg, H.; Kok, F.J.; van Poppel, G.; *J. Nutr.*, 2000, **130**, 1578-83.
- [123] Bub, A.; Watzl, B.; Abrahamse, L.; Delincee, H.; Adam, S.; Wever, J.; Müller, H.; Rechkemmer, G.; *J. Nutr.*, 2000, **130**, 2200-6.
- [124] Müller, H.; Bub, A.; Watzl, B.; Rechkemmer, G.; *Eur. J. Nutr.*, 1999, **38**, 35-44.
- [125] van Vliet, T.; Schreurs, W.H.P.; van den Berg, H.; *Am. J. Clin. Nutr.*, 1995, **62**, 110-6.
- [126] Yeum, K.-J.; Booth, S.L.; Sadowski, J.A.; Liu, C.; Tang, G.; Krinsky, N.I.; Russell, R.M.; *Am. J. Clin. Nutr.*, 1996, **64**, 594-602.
- [127] King, J.C.; *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 2002, **72** (1), 7-12.
- [128] Tang, G.; Andrien, B.A.; Dolnikowski, G.; Russell, R.M.; *Meth. Enzymol.*, 1997, **282**, 140-54.
- [129] Van Horne, K.C.; *Handbuch der Festphasenextraktion*, 1. Aufl., ict GmbH, 1993.
- [130] Barker, S.A.; Long, A.R.; Short, C.R.; *J. Chromatogr.*, 1989, **475**, 353-61.
- [131] Barker, S.A.; *J. Chromatogr. A*, 2000, **880**, 63-8.
- [132] Barker, S.A.; *J. Chromatogr. A*, 2000, **885**, 115-27.
- [133] Meyer, V.R.; *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*, 8. Aufl., Salle und Sauerländer Verlag, Frankfurt, 1999.
- [134] Bell, C.M.; Sander, L.C.; Wise, S.A.; *J. Chromatogr. A*, 1997, **757**, 29-39.
- [135] Braumann, T.; Grimme, L.H.; *Biochim. Biophys. Acta*, 1981, **637**, 8-17.
- [136] Handelman, G.J.; Shen, B.; Krinsky, N.I.; *Meth. Enzymol.*, 1992, **213** (31), 336-46.
- [137] Sander, L.C.; Sjarpleess, K.E.; Craft, N.E.; Wise, S.A.; *Anal. Chem.*, 1994, **66**, 1667-74.
- [138] Albert, K.; Lacker, T.; Raitza, M.; Pursch, M.; Egelhaaf, H.-J.; Oelkrug, D.; *Angew. Chem.*, 1998, **110** (8), 810-2.
- [139] Albert, K.; *TRAC*, 1998, **17** (10), 648-58.

- [140] Pursch, M.; Brindle, R.; Ellwanger, A.; Sander, L.C.; Bell, C.M.; Händel, H.; Albert, K.; *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, 1997, **9**, 191-201.
- [141] Raitza, M.; Wegmann, J.; Bachmann, S.; Albert, K.; *Angew. Chem.*, 2000, **112** (19), 3629-32.
- [142] Emenhiser, C.; Simunovic, N.; Sander, L.C.; Schwartz, S.J.; *J. Agric. Food Chem.*, 1996, **44**, 3887-93.
- [143] Emenhiser, C.; Sander, L.C.; Schwartz, S.J.; *J. Chromatogr. A*, 1995, **707**, 205-16.
- [144] Sander, L.C.; Pursch, M.; Märker, B.; Wise, S.A.; *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 3477-83.
- [145] Abidi, S.L.; *J. Chromatogr. A*, 2000, **881**, 197-216.
- [146] Hollman, P.C.H.; Slangen, J.H.; Wagstaffe, P.J.; Faure, U.; Southgate, D.A.T.; Finglas, P.M.; *Analyst*, 1993, **118**, 475-80.
- [147] Abidi, S.L.; Mounts, T.L.; *J. Chromatogr. A*, 1997, **782**, 25-32.
- [148] Khachik, F.; Englert, G.; Daitch, C.E.; Beecher, G.R.; Tonucci, L.H.; Lusby, W.R.; *J. Chromatogr.*, 1992, **582**, 153-66.
- [149] Zang, L.-Y.; Sommerburg, O.; Kuijk, F.J.G.M.; *Free Rad. Biol. & Med.*, 1997, **23** (7), 1086-9.
- [150] Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H (Hrsg.); *Carotenoids*, Volume 1B, Birkhäuser, Basel, 1995.
- [151] Stöggel, W.M.; Huck, C.W.; Scherz, H.; Popp, M.; Bonn, G.K.; *Chromatographia*, 2001, **54** (3/4), 179-85.
- [152] Budzikiewicz, H.; *Massenspektrometrie*, 4. Aufl., VCH Verlag, Weinheim, 1998.
- [153] Lehmann, W.D.; *Massenspektrometrie in der Biochemie*, 1. Auflage, Spektrum Verlag, Heidelberg, 1996.
- [154] Careri, M.; Mangia, A.; Musci, M.; *J. Chromatogr. A*, 1998, **794**, 263-97.
- [155] van Breemen, R.B.; *Anal. Chem.*, 1995, **67**, 2004-9.
- [156] Rentel, C.; Strohschein, S.; Albert, K.; Bayer, E.; *Anal. Chem.*, 1998, **70** (20), 4394-400.
- [157] van Breemen, R.B.; Huang, C.-R.; Tan, Y.; Sander, L.C.; Schilling, A.B.; *J. Mass Spektrom.*, 1996, **31**, 975-81.
- [158] Bayer, E.; Albert, K.; Nieder, M.; Grom, E.; Keller, T.; *J. Chromatogr.*, 1979, **186**, 497-507.
- [159] Wolfender, J.-L.; Ndjoko, K.; Hostettmann, K.; *Phytochem. Anal.*, 2001, **12**, 2-22.
- [160] Albert, K.; Dachtler, M.; Glaser, T.; Händel, H.; Lackner, T.; Schlotterbeck, G.; Strohschein, S.; Tseng, L.-H.; Braumann, U.; *J. High Resol. Chromatogr.*, 1999, **22** (3), 135-43.

- [161] Lindon, J.C.; Nicholson, J.K.; Wilson, I.D.; *J. Chromatogr. B*, 2000, **748**, 233-58.
- [162] Levsen, K.; Preiss, A.; Godejohann, M.; *TRAC*, 2000, **19** (1), 27-48.
- [163] Glaser, T.; Albert, K.; *J.S.S.*, 2002, **25** (7), 393-8.
- [164] Sidelmann, U.G.; Bjornsdottir, I.; Shockcor, J.P.; Hansen, S.H.; Lindon, J.C.; Nicholson, J.K.; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2001, **24**, 569-79.
- [165] Albert, K.; *J. Chromatogr. A*, 1999, **856**, 199-211.
- [166] Strohschein, S.; Pursch, M.; Albert, K.; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1999, **21**, 669-77.
- [167] Strohschein, S.; Pursch, M.; Händel, H.; Albert, K.; *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1997, **357**, 498-502.
- [168] Günzler, H. (Hrsg.); *Analytiker-Taschenbuch*, Vol. 20, Springer Verlag, Berlin, 1998, 107-39.
- [169] Wilson, I.D.; Adlard, E.R.; Cooke, M., Poole, C.F. (Hrsg.); *Encyclopedia of Separation Science*, Academic Press, London, 2000, 747-60.
- [170] Novotny, M.; *J. Chromatogr. Sci.*, 1980, **18**, 473-8.
- [171] Boughtflower, R.J.; Underwood, T.; Paterson, C.J.; *Chromatographia*, 1995, **40** (5/6), 329-35.
- [172] Schmid, M.; Bäuml, F.; Köhne, A.P.; Welsch, T.; *J. High Resol. Chromatogr.*, 1999, **22** (8), 438-42.
- [173] Zhang, X.; Huang, S.; *J. Chromatogr. A*, 2001, **910**, 13-8.
- [174] Rapp, E.; Bayer, E.; *J. Chromatogr. A*, 2000, **887**, 367.
- [175] Wu, N.; Peck, T.L.; Webb, A.G.; Magin, R.L.; Sweedler, J.V.; *Anal. Chem.*, 1994, **66**, 3849-57.
- [176] Behnke, B.; Schlotterbeck, G.; Tallarek, U.; Strohschein, S.; Tseng, L.-H.; Keller, T.; Albert, K.; Bayer, E.; *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 1110-5.
- [177] Schlotterbeck, G.; Tseng, L.-H.; Händel, H.; Braumann, U.; Albert, K.; *Anal. Chem.*, 1997, **69**, 1421-5.
- [178] Subramanian, R.; Kelley, W.P.; Floyd, P.D.; Tan, Z.J.; Webb, A.G.; Sweedler, J.V.; *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 5335-9.
- [179] Lacey, M.E.; Tan, Z.J.; Webb, A.G.; Sweedler, J.V.; *J. Chromatogr. A*, 2001, **922**, 139-49.
- [180] Albert, K.; Krucker, M.; Glaser, T.; Schefer, A.; Lienau, A.; Zeeb, D.; *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, **372**, 25-6
- [181] Renggli, H.; Rateitschak, K.; *Lehrbuch der Parodontologie*, Karger Verlag, Basel, 1988.
- [182] Baker, J.K.; Myers, C.W.; *Pharm. Res.*, 1991, **8** (6), 763-70.

- [183] Coburn, S.P.; Townsend, D.W. (Hrsg.); *Mathematical Modeling in Eperimental Nutrition*, Academic Press, London, 1996, 3-22.
- [184] Burri, B.J.; Neidlinger, T.R.; Clifford, A.J.; *J. Nutr.*, 2001, **131**, 2096-100.
- [185] Greenblatt, D.J.; Pfeifer, H.J.; Ochs, H.R.; Franke, K.; MacLaughlin, D.S.; Smith, T.W.; Kock-Weser, J.; *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics*, 1977, **202** (2), 365-78.
- [186] Novotny, J.A.; Dueker, S.R.; Zech, L.A.; Clifford, A.J.; *J. Lipid Res.*, 1995, **36**, 1825-38.
- [187] O'Neill, M.E.; Thurnham, D.I.; *Brit. J. Nutr.*, 1998, **79**, 149-59.
- [188] Kohler, K.; Guenther, E.; Zrenner, E.; *Klin. Monatbl. Augenheitkd.*, 1997, **211**, 84-93.
- [189] Lee, C.M.; Boileau, A.C.; Boileau, T.W.M.; Williams, A.W.; Swanson, K.S.; Heintz, K.A.; Erdman, J. W.; *J. Nutr.*, 1999, **129**, 2271-7.
- [190] Moros, E.E.; Darnoko, D.; Cheryan, M.; Perkins, E.G.; Jerrell, J.; *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 5787-90.
- [191] Molnar, P.; Szabolcs, J.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1993, **2**, 261-6.
- [192] Grusak, M.A.; Pezeshgi, S.; *J. Sci. Food, Agric.*, 1994, **64**, 223-30.
- [193] Grusak, M.A.; *J. Nutr. Biochem.*, 1997, **8**, 164-71.
- [194] Riso, P.; Porrini, M.; *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 1997, **67**, 47-54.

Meine akademischen Lehrer waren:

K. Albert, E. Bayer, D. Christen, H. Eckstein, G. Gauglitz, W. Göpel, G. Häfelinger, 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, W. Nakel, H. Oberhammer, C. Ochsenfeld, D. Oelkrug, H. Pommer, V. Schurig, E. Schweda, F.F. Seelig, B. Speiser, J. Strähle, W. Voelter, K.-P. Zeller, C. Ziegler, T. Ziegler

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name	Annette Damaris Lienau
Geburtsort	Braunschweig
Geburtstag	17.12.1976
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung:

1982-1986	Grundschule Kettwig-Mitte, Essen
1986-1992	Theodor-Heuss-Gymnasium Kettwig, Essen
1992-1993	Senator Carl Harrison High School, Atlanta, Georgia, USA, als Austauschschülerin mit Youth for Understanding
1993-1995	Theodor-Heuss-Gymnasium Kettwig, Essen
20.06.1995	Allgemeine Hochschulreife

Studium:

WS 95/96-WS 97/98	Chemiestudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
SS 98	Chemiestudium an der University of Manchester Institute of Science and Technology (UMIST), GB, im Rahmen des Socrates-Programms
WS 98/99-WS 00/01	Chemiestudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Juli-Dez. 2000	Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. Klaus Albert am Institut für Organische Chemie zum Thema „Qualitative und quantitative Untersuchung von Tocopherolen in Zahncreme und Zahnfleisch unter Verwendung der HPLC-NMR- und HPLC-MS-Kopplung“
20.12.2000.1.1.1	Diplom in Chemie
Jan. 2001-April 2003	Promotion im Arbeitskreis von Prof. Dr. Klaus Albert am Institut für Organische Chemie zum Thema „Studien zur Bestimmung der Anreicherung und Bioverfügbarkeit von biologisch aktiven Substanzen unter Anwendung der HPLC-NMR- und HPLC-MS-Kopplung“
Feb. 2001-April 2003	Stipendiatin der Pro Retina Deutschland e.V.
Aug.-Okt. 2001	Forschungsaufenthalt in der Arbeitsgruppe von Dr. R. M. Russell am Jean Mayer Human Nutrition Research Center (HNRC) on Aging der Tufts University in Boston, USA