

**Direktkopplung moderner Extraktions- und  
Trenntechniken mit der NMR-Spektroskopie und  
Massenspektrometrie zur Strukturaufklärung  
biomedizinisch wirksamer Inhaltsstoffe**

DISSERTATION

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

2000

vorgelegt von

**Markus Dachtler**

Tag der mündlichen Prüfung:

21. Juli 2000

Dekan:

Professor Dr. U. Nagel

1. Berichterstatter:

Professor Dr. K. Albert

2. Berichterstatter:

Professor Dr. G. Häfeling

3. Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. B. Costisella

Wer immer nur das gemacht hat, was er immer schon getan hat,  
wird immer nur das erreichen, was er immer schon erreicht hat.  
(Prof. Dr. Wolfgang Göpel)

*Meinen Eltern  
und Saida*

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Klaus Albert im Zeitraum von Februar 1998 bis Juli 2000 am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Klaus Albert danke ich sehr herzlich für das Interesse an meiner Themenstellung und die Bereitstellung der optimalen Ausstattung, die mir zur Durchführung dieser Arbeit zur Verfügung stand, sowie für die Ermöglichung mehrerer ausländischer Forschungsaufenthalte und der Teilnahme an zahlreichen internationalen Tagungen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Kollegen Tobias Glaser für die hervorragende Zusammenarbeit. Die unzähligen wissenschaftlichen Diskussionen und seine stete Hilfsbereitschaft bei allen Problemen waren und sind von unschätzbarem Wert.

Herrn PD Dr. Konrad Kohler danke ich für die kameradschaftliche interdisziplinäre Zusammenarbeit mit der Universitätsaugenklinik Tübingen. Die Bereitstellung der zahlreichen Retinaproben waren Grundlage dieser Arbeit.

Besonderer Dank gilt meinen Kollegen Stefan Bachmann und Holger Fischer für die achtjährige Freundschaft während der Studienzeit. In schwierigen Situationen standen sie mir immer zur Seite und zahlreiche schöne Stunden konnten wir zusammen verbringen. Allen meinen Kollegen sowie den Mitarbeitern der NMR-Abteilung danke ich für die unzähligen Diskussionen und die wertvollen Ratschläge, sowie für das angenehme Arbeitsklima.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wagner Vilegas für die Möglichkeit meines brasilianischen Gastaufenthaltes in seinem Arbeitskreis. Der Einblick in sein Forschungsgebiet sowie die fortwährende Zusammenarbeit war äußerst interessant und erfolgreich.

Der Firma Bruker Daltonik und insbesondere Frau Dr. Andrea Kiehne danke ich für die Bereitstellung des Esquire-LC Massenspektrometers für die HPLC-MS-Messungen. Ein weiteres Dankeschön gilt Fred Bäuml von der Universität Ulm, der mir bei zahlreichen CEC-Problemen mit seinen Ratschlägen zur Seite stand.

Der Pro Retina Deutschland e.V. danke ich für das großzügige Promotions-Stipendium über den gesamten Zeitraum meiner Doktorarbeit.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre uneingeschränkte Unterstützung während meines Studiums.

Schließlich möchte ich mich ganz herzlich bei Saida bedanken. In Momenten der Anspannung stand sie mir stets zur Seite und die vielen aufmunternden Worte waren eine große Hilfe.

---

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>PROBLEMSTELLUNG.....</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>WIRKUNG BIOLOGISCH AKTIVER INHALTSSTOFFE IN PRÄVENTION UND INTERVENTION.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1</b>	<b>Carotinoide .....</b>	<b>7</b>
3.1.1	Allgemeines.....	7
3.1.2	Prävention der Carotinoide gegen Netzhauterkrankungen .....	11
<b>3.2</b>	<b>Tocopherole.....</b>	<b>14</b>
<b>3.3</b>	<b>Flavonoide .....</b>	<b>16</b>
<b>4</b>	<b>ANALYTIK VON BIOLOGISCH AKTIVEN INHALTSSTOFFEN.</b>	<b>18</b>
<b>4.1</b>	<b>Grundlagen der Festphasenextraktion .....</b>	<b>19</b>
4.1.1	SPE-HPLC-Kopplung (on-line SPE).....	22
4.1.2	Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD).....	24
<b>4.2</b>	<b>Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) .....</b>	<b>25</b>

---

---

<b>4.3 Grundlagen moderner Kopplungsmethoden .....</b>	<b>29</b>
4.3.1 On-line HPLC-MS-Kopplung.....	29
4.3.2 On-line HPLC-NMR-Kopplung .....	32
4.3.2.1 Experimenteller Aufbau .....	32
4.3.2.2 Anforderungen an die Chromatographie .....	36
4.3.2.3 Lösungsmittelunterdrückung .....	37
<b>4.4 Kapillarmethoden.....</b>	<b>38</b>
4.4.1 Allgemeines.....	38
4.4.2 Herstellung von Kapillaren .....	39
<b>5 ERGEBNISSE .....</b>	<b>41</b>
<b>5.1 Carotinoide.....</b>	<b>41</b>
5.1.1 Lutein und Zeaxanthin .....	41
5.1.1.1 Chromatographische Bedingungen.....	41
5.1.1.2 Kapillarelektrochromatographie (CEC) .....	50
5.1.1.3 HPLC-APCI-MS-Kopplung .....	52
5.1.1.4 HPLC-NMR-Kopplung.....	59
5.1.2 Bixin .....	66
5.1.2.1 Chromatographische Bedingungen.....	66
5.1.2.2 HPLC-NMR-Kopplung.....	67
<b>5.2 Tocopherole.....</b>	<b>69</b>
5.2.1 Extraktionsverfahren .....	69
5.2.2 Chromatographischen Bedingungen.....	71
5.2.3 HPLC-APCI-MS-Kopplung.....	72
5.2.4 HPLC-NMR-Kopplung.....	74

---

---

<b>5.3 Flavonoide .....</b>	<b>76</b>
5.3.1 <i>Maytenus aquifolium</i> Martius (Celestraceae).....	76
5.3.1.1 Chromatographische Bedingungen .....	77
5.3.1.2 HPLC-NMR-Kopplung .....	79
5.3.2 <i>Sorocea bomplandii</i> (Baill.) Burger (Moraceae) .....	82
5.3.2.1 Chromatographische Bedingungen .....	82
5.3.2.2 HPLC-ESI-MS-Kopplung .....	84
5.3.2.3 On-line HPLC-NMR-Kopplung .....	87
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....</b>	<b>90</b>
<b>6.1 Extraktionstechniken .....</b>	<b>90</b>
<b>6.2 Chromatographie .....</b>	<b>91</b>
<b>6.3 HPLC-MS-Kopplung.....</b>	<b>92</b>
<b>6.4 HPLC-NMR-Kopplung .....</b>	<b>93</b>
<b>6.5 Miniaturisierung der analytischen Methoden.....</b>	<b>94</b>
<b>7 EXPERIMENTELLER TEIL .....</b>	<b>96</b>
<b>7.1 Geräte .....</b>	<b>96</b>
7.1.1 HPLC-Anlagen.....	96
7.1.2 Massenspektrometer .....	97
7.1.3 NMR-Spektrometer.....	97
<b>7.2 Chemikalien .....</b>	<b>97</b>

---

<b>7.3</b>	<b>Probenvorbereitung und Extraktion.....</b>	<b>98</b>
7.3.1	Carotinoid-Stereoisomere .....	98
7.3.2	Tocopherol-Homologe .....	99
7.3.3	Flavonoid-Glycosylderivate.....	100
<b>7.4</b>	<b>Chromatographie .....</b>	<b>101</b>
7.4.1	Säulen und Kapillaren.....	101
7.4.2	Chromatographische Bedingungen.....	101
7.4.2.1	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) .....	101
7.4.2.2	Kapillar-Trennungen.....	103
7.4.2.3	Kopplungstechniken .....	103
<b>7.5</b>	<b>Massenspektrometrie .....</b>	<b>104</b>
<b>7.6</b>	<b>NMR-Spektroskopie.....</b>	<b>105</b>
<b>8</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>107</b>

---

---

**VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN:**

$\alpha_{\beta/\gamma}$	Selektivität
$\delta$	Chemische Verschiebung
$\tau$	Wartezeit
1D	Eindimensional
2D	Zweidimensional
ACN	Acetonitril
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
$B_0$	Magnetische Flußdichte
BPSU	Bruker Peak Sampling Unit
$CDCl_3$	Chloroform- $d_1$
COSY	Correlated Spectroscopy
CP	Cross Polarization
CW	Continuous Wave
$D_2O$	Deuteriumoxid
EI	Elektronenstoß Ionisation
ESI	Electro Spray Ionization
FID	Free Induction Decay
FT	Fourier Transformation
GC	Gaschromatographie
$H_2O$	Wasser
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IR	Infrarot
K	Kelvin
k	Kilo
LC	Liquid Chromatography
LUT	Lutein
M	Masse
m/z	Masse pro Ladung
MAS	Magic Angle Spinning

---

MeOH	Methanol
MS	Mass Spectrometry
NMR	Nuclear Magnetic Resonanz
NP	Normal Phase
PC	Personal Computer
ppm	Parts per Million
R <sub>β/γ</sub>	Auflösung
RP	Reversed Phase
T <sub>1</sub>	longitudinale Relaxationszeit
T <sub>2</sub>	transversale Relaxationszeit
TAPS	N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]-3-aminopropansulfonsäure
TBME	<i>tert.</i> Butyl-methy-ether
THF	Tetrahydrofuran
TIC	Total Ion Chromatogram
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
UV	Ultraviolett
WATERGATE	Water Suppression by Gradient Tailored Excitation
WATR	Water Attenuation by Transverse Magnetisation
WEFT	Water-Eliminated Fourier-Transform
WET	Water Suppression Enhanced through T <sub>1</sub> Effects
ZEA	Zeaxanthin

---

# 1 Einleitung

Zu Beginn der Neuzeit wurde beobachtet, dass Menschen unter langandauernder, einseitiger Ernährung spezifische Krankheitsbilder entwickeln. Erst Ende des letzten Jahrhunderts wurde damit begonnen, die Entstehung dieser Krankheiten tierexperimentell durch das Verfüttern sogenannter Mangeldiäten zu untersuchen, was zur Entstehung der modernen Ernährungswissenschaft führte.<sup>1</sup>

Während bisher Wissenschaftler hauptsächlich die schädigenden Wirkungen von ungesunden Nahrungsmitteln, wie beispielsweise den Fast-Food-Produkten oder Süßigkeiten untersuchten, wird seit einigen Jahren verstärkt die Suche nach Nahrungsmitteln mit pharmakologisch wirksamen Inhaltsstoffen von der Lebensmittelindustrie gefördert.<sup>2</sup> So gewinnt die Strukturaufklärung und Quantifizierung von biomedizinisch wirksamen Substanzen, die geeignet sind, die Entwicklung von Krankheiten zu hemmen (Primärprävention) bzw. deren Verlauf günstig zu beeinflussen (Sekundärprävention), immer mehr an Bedeutung.<sup>3</sup>

Ausgehend von der epidemiologischen Evidenz, dass es Lebensmittelinhaltsstoffe gibt, die bei ausreichendem Verzehr zu einer geringen Inzidenz bestimmter Erkrankungen führt, muss die Beziehung der als präventiv erkannten Inhaltsstoffe zum Verlauf der Erkrankung geprüft werden. Solche Lebensmittel, die einen Mikronährstoff enthalten, welcher sich wissenschaftlich nachweisbar auf bestimmte organische Funktionen positiv auswirkt oder das Risiko einer Krankheit vermindert, werden als sog. funktionelle Lebensmittel oder „Nutraceuticals“ bezeichnet.<sup>4</sup>

Pflanzliche Inhaltsstoffe enthalten ein großes Reservoir an organischen Verbindungen, wie beispielsweise die Stoffgruppe der Flavonoide und der Carotinoide, die in verschiedenen Therapien gezielt zum Einsatz kommen.<sup>5</sup> Der menschliche Körper kann viele dieser biomedizinischen Inhaltsstoffe nicht oder nur in unzureichender Menge selbst herstellen. Darüber hinaus werden diese Substanzen im Körper nur für eine kurze Zeit gespeichert, so dass die meisten dieser essentiellen Wirkstoffe täglich zugeführt werden müssen. Heutzutage geben Konsumenten in den USA jährlich über 150 Milliarden Mark für die mit vorbeugenden oder heilenden Substanzen aufgerüsteten Nahrungsmitteln wie Müslis, Milchprodukte oder Säfte aus.<sup>6</sup> Dabei

muss nach neuesten wissenschaftlichen Untersuchungen den zugesetzten Wirkstoffen, wie den Vitaminen und Flavonoiden, gezielte medizinische Heilkraft zugesprochen werden. So werden bestimmte Vitamine nicht länger nur als Allheilmittel gegen Beschwerden wie Erkältungen angesehen, sondern zielgerichtet in Prävention und Intervention von Herzinfarkt, Demenz und Krebs eingesetzt.<sup>7</sup>

Flavonoide sind in Pflanzen häufig vorkommende Farbstoffe mit weitreichenden biomedizinischen Anwendungen, einschließlich antioxidativer, antimutagener und anticancerogener Wirkung.<sup>8</sup> So erhöhen Flavonoide die Permeabilität der Körpergefäße bzw. verringern die Kapillarbrüchigkeit und werden als Medikamente gegen Venenschmerzen und Varizen (Krampfadern) eingesetzt.<sup>9</sup> Desweiteren wurde in neueren Studien die biologische Aktivität von verschiedenen polyglycosidischen Flavonoid-Derivaten gegen Gastritis und Magengeschwüre belegt. Der Aufguss der Blätter der brasilianischen Heilpflanze *Maytenus aquifolium* Martius (Celastraceae) wird traditionell gegen Magenschmerzen angewandt.<sup>10</sup> Die Isolierung und Strukturaufklärung von polyglycosidisch gebundenen Flavonoiden aus brasilianischen Pflanzen ist nützlich für die Validierung dieser Verbindungen als chemische Marker für die Beurteilung der riesigen Anzahl der in der brasilianischen Volksmedizin eingesetzten Aufgüsse.<sup>11</sup>

Unter Vitaminen versteht man eine Gruppe essentieller Nahrungsbestandteile, die dem Organismus in Mikromengen zugeführt werden müssen und ohne die der normale Ablauf der Stoffwechselprozesse nicht möglich ist. Zudem erlangen Vitamine in letzter Zeit verstärktes Interesse wegen ihrer möglichen immunstabilisierenden Wirkungen und chemopräventiven Eigenschaften. Vor allem die fettlöslichen Vitamine, wie Vitamin A, das Pro-Vitamin A ( $\beta$ -Carotin) und Vitamin E zeigen in Kombination mit dem wasserlöslichen Vitamin C anticancerogene Effekte.<sup>12</sup> Vitamin E ist ein essentielles Antioxidanz, das die Lipide biologischer Membranen vor der Schädigung durch Sauerstoffradikale schützt.<sup>13</sup> Vitamin A ist als Retinol in die Glycoprotein-Biosynthese, als Retinal in den Sehvorgang und als Retinoat in die Regulation der Genexpression eingeschaltet.<sup>14</sup> Desweiteren wird für die Stoffgruppe der Carotinoide, die in großen Mengen in Karotten, Tomaten und dunkelgrünem Blattgemüse vorhanden sind, ein positiver Einfluss auf den Zellschutz diskutiert. Insbesondere  $\beta$ -Carotin, Bixin und Lutein werden mit einer hemmenden Wirkung auf die Entwicklung des Colon-Karzinoms in Zusammenhang gebracht.<sup>15</sup> Zudem wird Bixin zur Reduzierung des Cholesterin- und Triglycerinspiegels im Blut eingesetzt.<sup>16</sup>

---

Die epidemiologische Grundlagenforschung schreibt den beiden Carotinoiden Lutein und Zeaxanthin eine entscheidende Rolle bei der Vorbeugung und Behandlung der adulten Makuladegeneration (AMD), der Haupt-Erblindungsursache in den Industrieländern, zu. So konnten klinische Studien einen Zusammenhang zwischen der Konzentration dieser Carotinoide und einer geringeren Inzidenz der AMD belegen.<sup>17</sup> Carotinoide sind, bedingt durch ihre konjugierte olefinische Struktur, sehr instabil gegenüber Temperatur, Licht und Sauerstoff und liegen in der Natur in unterschiedlichen Isomeren vor. Die verschiedenen Stereoisomere wirken im Körper als Antioxidantien. Die physiologischen Eigenschaften der einzelnen Stereoisomere können dabei beträchtlich variieren, so dass für das grundlegende Verständnis der biochemischen Regelmechanismen in der Behandlung der AMD die Kenntnis der Struktur und Konzentration jedes einzelnen Stereoisomeren notwendig ist.

Die klassischen Analysemethoden der Extraktion, Trennung, Isolierung und Strukturaufklärung von Naturstoffen sind bei der stetig wachsenden Anzahl von Proben sehr zeitaufwendig. Zudem ist eine Analytik von licht- und sauerstoffempfindlichen Substanzen ohne Erzeugung von Artefakten auf diesem konventionellen Weg nicht möglich. Die Identifizierung und Aufklärung dieser instabilen biologischen Inhaltsstoffe gelingt folglich nur mit Hilfe kombinierter Trennung-Identifizierungs-Methoden. So ist die Direktkopplung der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) mit der Massenspektrometrie (MS) bzw. der kernmagnetischen Resonanzspektroskopie (NMR) für die schnelle und effiziente Bearbeitung von Fragestellungen der modernen Analytik unerlässlich. Dies zeigt die rasante Entwicklung der HPLC-MS- wie auch der HPLC-NMR-Kopplung in den letzten Jahren. In jüngster Zeit hat sich jedoch herausgestellt, dass durch die Verwendung einer einzigen Kopplungsmethode oft keine ausreichenden Ergebnisse erhalten werden können. Durch die kombinierte Anwendung der HPLC-MS- mit der HPLC-NMR-Kopplung ist jedoch eine vollständige Strukturaufklärung verschiedenster Inhaltsstoffe aus biologischen Proben im ng-Bereich möglich.<sup>18</sup>

## **2 Problemstellung**

Ziel dieser Arbeit ist es, eine komplette Strukturaufklärung strukturell ähnlicher Substanzen mittels der HPLC-MS- und der HPLC-NMR-Kopplung durchzuführen. So sollen durch die kombinierte Anwendung dieser beiden Kopplungsmethoden sowohl Konstitutions- als auch verschiedene Konfigurationsisomere analysiert werden. Die zum Teil instabilen Substanzen werden dabei aus biologischen Proben schonend und zerstörungsfrei isoliert. Für die Anwendung der kombinierten Analytik von Extraktion, Trennung und Strukturaufklärung sollen drei klassische Vertreter biomedizinisch relevanter Inhaltsstoffe untersucht werden: Carotinoid-Stereoisomere, Tocopherol-Homologe und Flavonoid-Derivate.

Ein Schwerpunkt der Arbeit ist die Charakterisierung von Z/E-Stereoisomeren der Carotinoide Lutein und Zeaxanthin. Dies soll sowohl am Beispiel eines typischen funktionellen Lebensmittels wie Spinat als auch direkt am Wirkungsort der AMD, der Retina, erfolgen. Hierzu werden die einzelnen Carotinoid-Muster von Retinagewebe verschiedener Spezies (Mensch, Huhn, Rind) analysiert und verglichen. Mit Hilfe der eingesetzten Analysemethoden soll dabei erstmals eine Anreicherung der Carotinoide in der Retina am Tiermodell nach systemischer Gabe nachgewiesen werden.

Als weiteres Carotinoid wird Bixin untersucht. Dieses Carotinoid ist wasserlöslich und deshalb für die chemische Industrie von besonderem Interesse. Große Mengen an Bixin sind in *Bixa orellana* L. (Annato, Urucum) enthalten und kommt ebenfalls in mehreren Z/E-Stereoisomeren vor. Es soll untersucht werden, ob sich im wässrigen Extrakt im Vergleich zu einem Chloroform-Extrakt ein anderes Stereoisomeren-Pattern nachweisen lässt. Die Hauptkomponenten sollen dabei mit Hilfe der on-line HPLC-NMR-Kopplung analysiert werden.

Weiterer Bestandteil ist die Analyse von Tocopherol-Homologen und strukturell verwandten Verbindungen aus Speichel und Zahnfleisch nach zahnhygienischer Behandlung mit einer Vitamin E-haltigen Zahnpasta. Hierbei soll die Möglichkeit der Anreicherung bzw. die potentielle Schutzwirkung des Nutraceuticals Zahnpasta nachgewiesen werden.

---

Schließlich soll die Anwendung der gekoppelten Analysemethoden als moderne Screening-Methode aufgezeigt werden. Die Notwendigkeit einer effizienten und schnellen Strukturaufklärung kann exemplarisch an der riesigen Anzahl brasilianischer Pflanzen sowie deren biomedizinisch wirksamen Inhaltsstoffe bewiesen werden. Hierzu werden zwei biologisch völlig unterschiedliche brasilianische Spezies (*Maytenus aquifolium* Mart. und *Sorocea Bomplandii* Baill. Burger) untersucht. Beide Spezies besitzen jedoch strukturell ähnliche glycosidisch gebundene Flavonoid-Derivate. Nach Etablierung einer kombinierten analytischen Methode ist das schnelle Screening solcher ähnlicher Pflanzeninhaltsstoffe und somit ihre Unterscheidung möglich.

Aufgrund der Instabilität zahlreicher biomedizinisch wirksamer Inhaltsstoffe, wie beispielsweise den Carotinoid-Stereoisomeren, muss eine Extraktionsmethode gewählt werden, bei der die Substanzen möglichst schnell und schonend extrahiert und aufkonzentriert werden, ohne dass eine Isomerisierung oder Oxidation stattfindet. Durch die Anwendung verschiedener Anreicherungsverfahren, wie der direkt an die Chromatographie gekoppelten Festphasenextraktion (on-line Solid Phase Extraction) oder der Matrix-Festphasenextraktion (Matrix Solid Phase Dispersion), bei der das feste biologische Material direkt extrahiert wird, sollen aus unterschiedlichen biologischen Proben die jeweiligen biomedizinisch aktiven Substanzen isoliert und analysiert werden.

Carotinoid-Stereoisomere, Tocopherol-Homologe und glycosidisch gebundene Flavonoid-Derivate können auf herkömmlichen Umkehrphasen, wie der C<sub>18</sub>-Trennsäule oft nur unbefriedigend getrennt werden. Als stationäre Phase dient daher die 1994 vorgestellte hochselektive C<sub>30</sub>-Trennphase, die auch im Hinblick auf die NMR-Detektion eine höhere Beladung als konventionelle „reversed-phase“ Materialien ermöglicht.<sup>19</sup> Die mittels der Festkörper-NMR-Spektroskopie belegte Temperaturabhängigkeit der Selektivität soll dabei durch weiterführende chromatographische Studien optimiert werden.

Eine schnelle und eindeutige strukturelle Aufklärung der Naturstoffextrakte im Picogramm-Bereich gelingt mit Hilfe der direkten HPLC-MS-Kopplung. Da zahlreiche Naturstoffe unpolar sind, ist deren Ionisierung für die Massenspektrometrie oftmals problematisch. Die häufig verwendete Electrospray Ionisierung (ESI) ist nicht

---

anwendbar, da die Protonierung dieser Naturstoffe, insbesondere der Carotinoide, schwierig ist. Durch die Anwendung der chemischen Ionisierungstechnik unter Atmosphärendruck (APCI) soll das Ionisierungsproblem der Carotinoide gelöst werden.

Während mit der HPLC-MS-Kopplung eine Strukturaufklärung von Naturstoffen unterschiedlicher Molekülmasse möglich ist, können Konfigurationsisomere mit einem identischen Fragmentierungsmuster nicht unterschieden werden. Um eine vollständige und eindeutige Strukturzuordnung treffen zu können, ist die Anwendung der on-line HPLC-NMR-Kopplung unabdingbar. Neben den continuous-flow Spektren, bei denen während eines chromatographischen Laufes alle Peaks detektiert werden können, sollen zur vollständigen Strukturaufklärung im stopped-flow Verfahren ein- und zweidimensionale  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren aufgenommen werden und die einzelnen Naturstoffe eindeutig charakterisiert werden.

Problematisch bei der HPLC-NMR-Kopplung ist die geringe Empfindlichkeit im unteren Mikrogramm-Bereich. Eine NMR-Detektion vieler Naturstoffe ist daher nicht oder aufgrund eines schlechten Signal-zu-Rausch-Wertes nur unzureichend möglich. Ein Lösungsansatz für eine verbesserte Empfindlichkeit liegt in der Miniaturisierung der Methoden. Hierzu sollen die Kapillarchromatographie (CHPLC) und die Kapillarelektrochromatographie (CEC) auf die einzelnen Trennprobleme angewandt und schließlich erste Kopplungsversuche dieser Methoden mit einem speziell entwickelten miniaturisierten NMR-Probenkopf durchgeführt werden.

---

## **3 Wirkung biologisch aktiver Inhaltsstoffe in Prävention und Intervention**

### **3.1 Carotinoide**

#### **3.1.1 Allgemeines**

Als Carotinoide bezeichnet man eine Gruppe von etwa 600 in der Natur vorkommenden Substanzen, deren wichtigster Vertreter das  $\beta$ -Carotin, das Provitamin A, ist. Die Carotinoide werden in Carotine (reine Kohlenwasserstoffe) und Xanthophylle (sauerstoffhaltige Derivate) eingeteilt. Das Grundgerüst der Carotinoide besteht aus 8 Isopren-Einheiten, daher gehören Carotinoide zur Substanzklasse der Terpene. Es sind orangefarbene bis rote Pigmente, deren Farbe von der langen Polyenkette, bestehend aus 9-11 konjugierten Doppelbindungen, herrührt. Die Reste an den beiden Enden können acyclischer Natur sein, wie das in der Tomate vorkommende Lycopin, oder besitzen wie die meisten Carotinoide an einem oder beiden Enden einen  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Iononring und liegen hydriert, dehydriert oder oxidiert vor. Abbildung 1 zeigt die Strukturen der wichtigsten Carotinoide.

Carotinoide kommen in den Blättern der Laubbäume vor, die unter dem Einfluss von UV-Licht wachsen und Chlorophyll unter photosynthetischen Bedingungen bilden. In den Plastiden beteiligen sie sich an der Abbaureaktion des Chlorophylls, d.h. der Umwandlung der Chloroplasten in Chromoplasten. Da die Carotinoide als Antioxidantien und Radikalfänger wirken, ist für die Photosynthese die Anwesenheit von Chlorophyll und Carotinoiden erforderlich. Lutein und andere Carotinoide beugen dabei der vorzeitigen Zerstörung des Chlorophylls durch Sonneneinstrahlung vor.<sup>20,21</sup>

Große Vorkommen an Carotinoiden findet man neben Laubblättern auch in den Früchten, Pollen und Samen von Obst und Gemüse sowie in Pilzen, Algen und Bakterien.<sup>22</sup> Dabei besitzen die Carotinoide oftmals eine wichtige chemische bzw. biomedizinische Relevanz. Dies läßt sich anhand zahlreicher metabolischer

---

Umsetzungen der durch die Nahrung aufgenommenen Carotinoide, wie beispielsweise im Serum, der Muttermilch sowie in Federn und Schuppen belegen. <sup>23,24</sup> Als Lebensmittelfarbstoff gewinnen die Carotinoide ebenfalls zunehmende Bedeutung. Neben der Verfütterung von Carotinoiden an Fische (rötliches Fleisch der Lachse) und Hühnern (Eigelb), werden Carotinoide auch für die Färbung von Butter, Eis, Joghurt und Fruchtsäften verwendet. Schließlich belegen zahlreiche medizinische Studien die Wirkung zahlreicher Carotinoide als Radikalfänger, Antioxidantien sowie deren Vitamin A-Aktivität. <sup>25</sup>

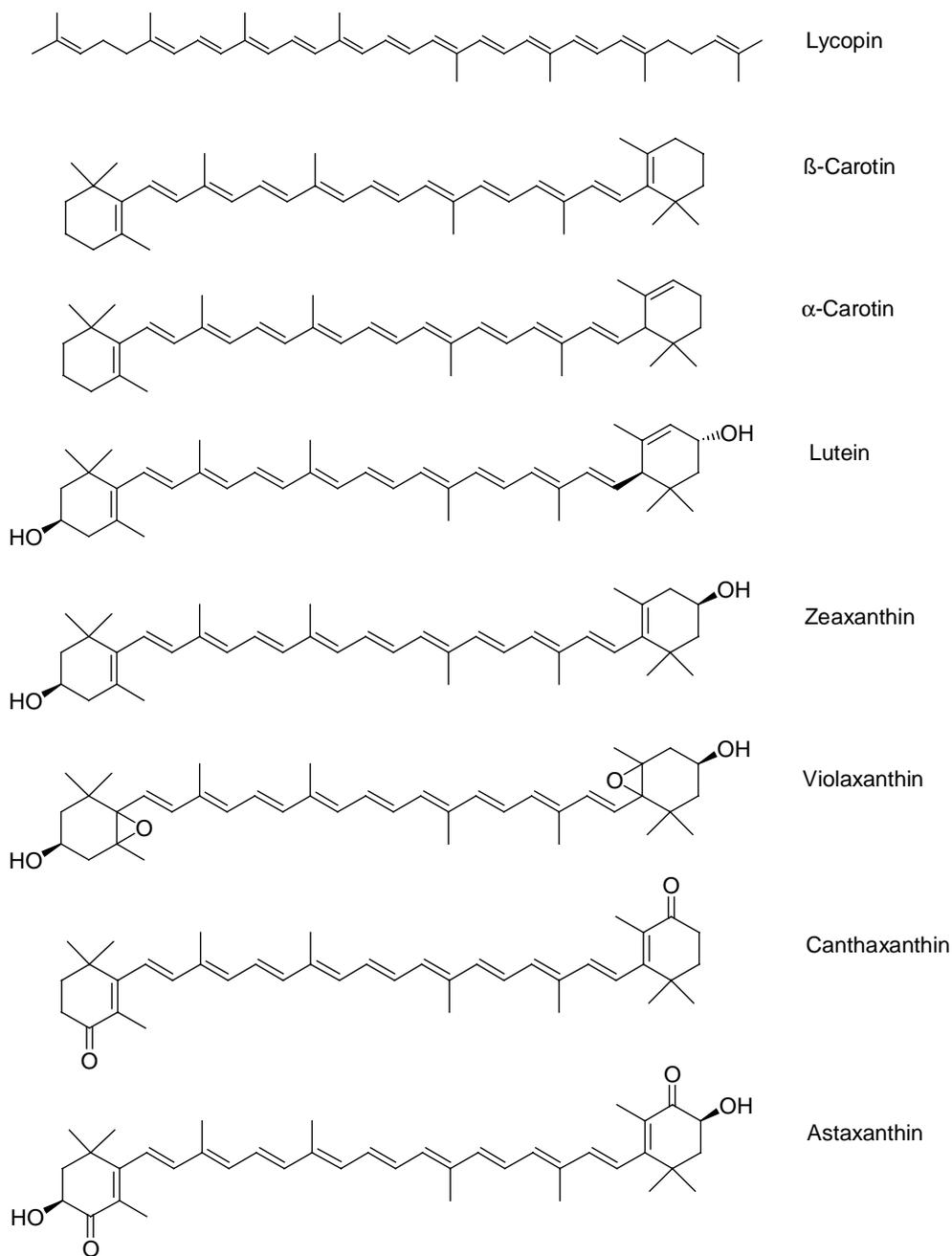


Abb. 1: Strukturformeln der wichtigsten Carotinoide

Die Fähigkeit der Carotinoide, Sauerstoffradikale aus der Umgebung abzufangen und als Antioxidanz zu wirken, führt zu einer starken Licht- und Luftempfindlichkeit. Neben einer Oxidation zu Epoxiden, Alkoholen und Carbonylverbindungen entstehen dabei hauptsächlich unterschiedliche Z/E-Stereoisomere durch Isomerisierung. Die Hauptstereoisomere von  $\beta$ -Carotin, Zeaxanthin und Lutein sind in Abbildung 2 dargestellt. Während es sich bei  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin um zentrosymmetrische Verbindungen handelt, weist Lutein keine totalsymmetrische Struktur auf, da es einen  $\alpha$ - und einen  $\beta$ -Ionon-Ring besitzt. Dadurch ergeben sich bei Lutein jeweils Paare an Z-Stereoisomeren.

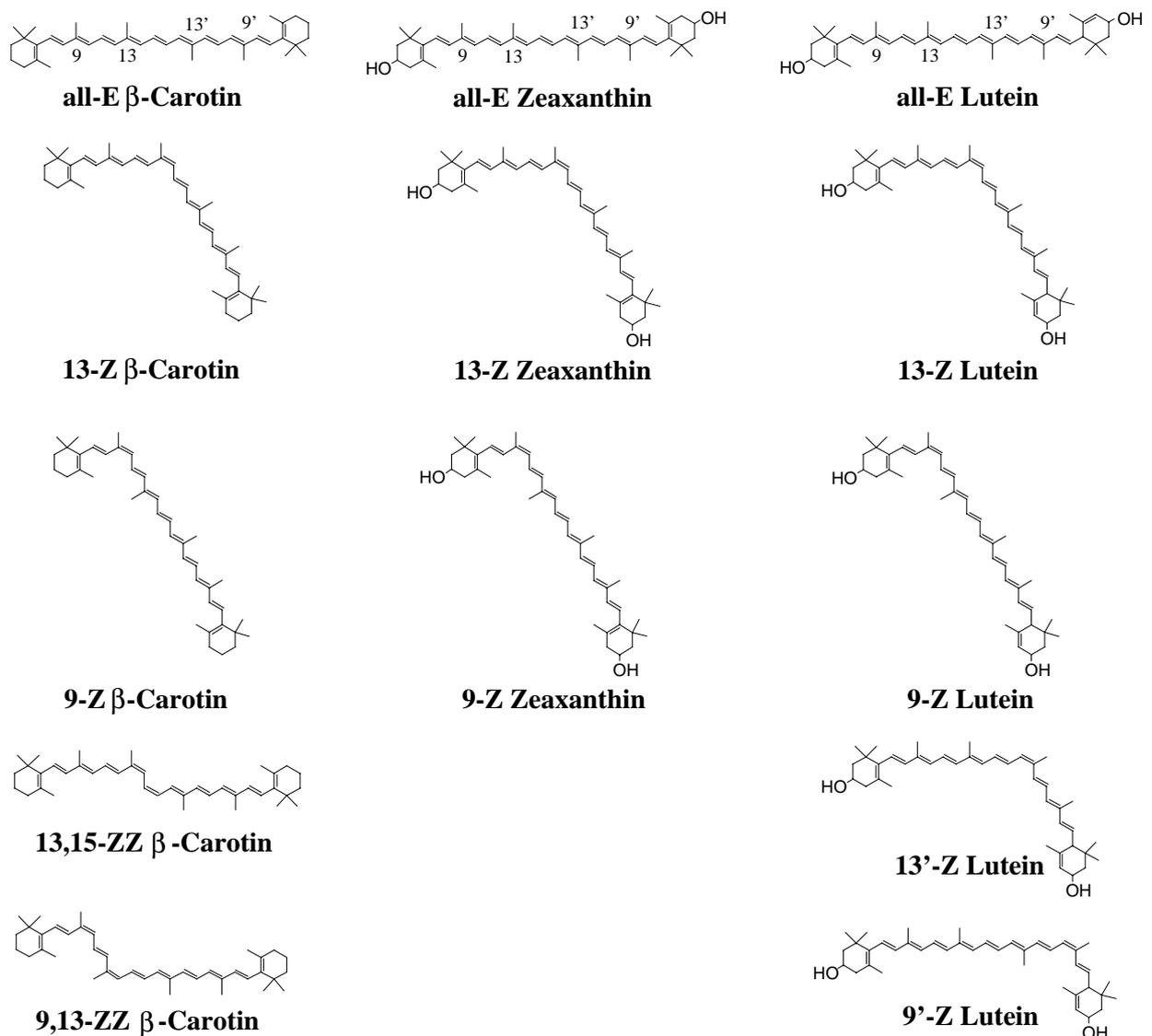


Abb. 2: Hauptstereoisomere von  $\beta$ -Carotin, Zeaxanthin und Lutein

Neben diesen geometrischen Isomeren besitzen Lutein und Zeaxanthin optische Isomere. Für eine vollständige Bezeichnung der Carotinoide muss folglich auch die R,S-Nomenklatur von Cahn, Ingold und Prelog angewandt werden. Das in der Natur vorherrschende Lutein wird folglich als all-E-(3R,3R',6R')-Lutein bezeichnet.

Lutein und Zeaxanthin sind die einzigen Carotinoide, die sich in der Retina nachweisen lassen.<sup>26</sup> Diese sind auch in hohen Konzentrationen in dunkelgrünem Blattgemüse wie Spinat und Mangold sowie Grünkohl, Brokkoli und Petersilie anzutreffen.<sup>27</sup> Klinische Studien konnten einen Zusammenhang zwischen dem Gehalt von Lutein und Zeaxanthin in der Retina und dem altersbedingten Degenerationsverlauf der Netzhaut belegen. Durch die systemische Gabe von Lutein- und Zeaxanthin-reichen Blattgemüse bzw. Lebensmitteln konnte präventiv diese Augenkrankheit vorgebeugt werden (vgl. Kap. 3.1.2).<sup>28</sup>

*Bixa orellana* L. ist eine südländische Pflanze, deren Samen große Mengen des Carotinoids Bixin enthalten. Besser bekannt ist diese Pflanze unter den Namen Annato oder Urucum. Abbildung 3 zeigt die Pflanze *Bixa orellana* L. mit ihren typischen carotinoidhaltigen Samenkörnern.



Abb. 3: *Bixa Orellana* L. mit den typischen roten Bixin-haltigen Samenkörnern

---

Bixin ist ein typischer Vertreter der Apo-Carotinoide. Es handelt sich also um ein verkürztes Carotinoid aus nur 4 Isopreneinheiten. Interessanterweise ist die stabilste Form dieses Carotinoids ein Z-Stereoisomer, das sog  $\alpha$ -Bixin. In Abbildung 4 ist die Struktur des  $\alpha$ -Bixins gezeigt. Es handelt sich um einen Monomethylester, welcher thermisch leicht zum all-E Stereoisomer  $\beta$ -Bixin isomerisiert. Daneben gibt es eine Vielzahl weiterer Z-Stereoisomere, die jedoch sehr instabil sind.<sup>29</sup>

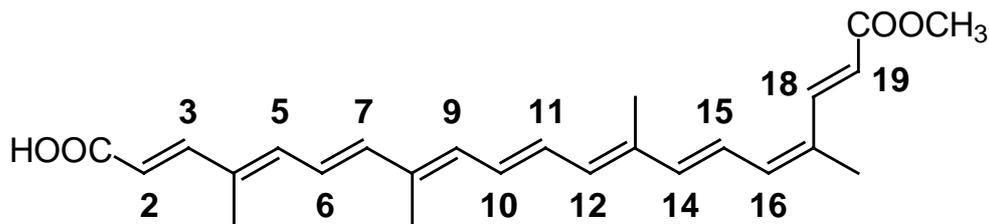


Abb. 4: Struktur von  $\alpha$ -Bixin

Bixin ist ein biomedizinischer Inhaltsstoff, der vielseitig eingesetzt werden kann. So wirkt Bixin antioxidativ vor UV-Strahlung und wird deshalb insbesondere in Brasilien als Sonnenschutzmittel eingesetzt. Dabei werden die Samenkörner mit Kokosöl vermischt und auf die Haut aufgetragen. Zudem zeigen neueste Untersuchungen, dass der wässrige Urucum-Aufguss den Cholesterin- und Triglycerid-Gehalt im Blut reduziert. Nach einem brasilianischen Rezept sollen etwa 25 Samenkörner über Nacht in einem Glas Wasser gelöst werden und zum Frühstück getrunken werden. Urucum ist also ein typisches funktionelles Lebensmittel, das präventiv gegen zahlreiche Volkskrankheiten eingesetzt wird.<sup>30</sup>

### 3.1.2 Prävention der Carotinoide gegen Netzhauterkrankungen

Vor mehr als fünfzig Jahren wurde das gelbe Pigment, das sich in der Makularegion der menschlichen Retina befindet (Abb. 5), als Carotinoid identifiziert.<sup>31</sup> Spätere Untersuchungen zeigten, dass sich das Makulapigment aus den Carotinoiden Lutein und Zeaxanthin zusammensetzt. Diese beiden Carotinoide lassen sich in verringerter Konzentration und in wechselnden Mengenverhältnissen über die ganze Retina verteilt nachweisen.<sup>32</sup> Das klinische Interesse an den beiden Makulapigmenten wurde dadurch

geweckt, dass sie bei bestimmten Formen von retinalen Degenerationen, und hier insbesondere bei der altersbedingten Makuladegeneration (AMD), eine protektive Wirkung besitzen.<sup>33</sup>

In der westlichen Welt ist die AMD die Hauptursache für Erblindung. Allein in Deutschland leiden etwa zwei Millionen Menschen an dieser Krankheit.<sup>34,35</sup> Makuladegenerationen sind Erkrankungen des Netzhautzentrums, die meist zu einer erheblichen und irreversiblen Störung der zentralen Sehschärfe führen. Sie besitzen eine genetische Disposition, sind aber in ihrer Ausprägung auch in erheblichem Umfang von Ernährungs- und Umweltfaktoren abhängig.<sup>36</sup> Eine wirksame Therapie zur kausalen Behandlung oder zur Verlangsamung der Degeneration existiert bisher nicht.

Neueste epidemiologische Untersuchungen zeigen, dass in der Altersgruppe der über 75-jährigen bereits beinahe 30% von dieser Degeneration der Photorezeptoren und den damit einhergehenden Beeinträchtigungen der visuellen Wahrnehmung ihrer Umwelt betroffen sind.<sup>37</sup>

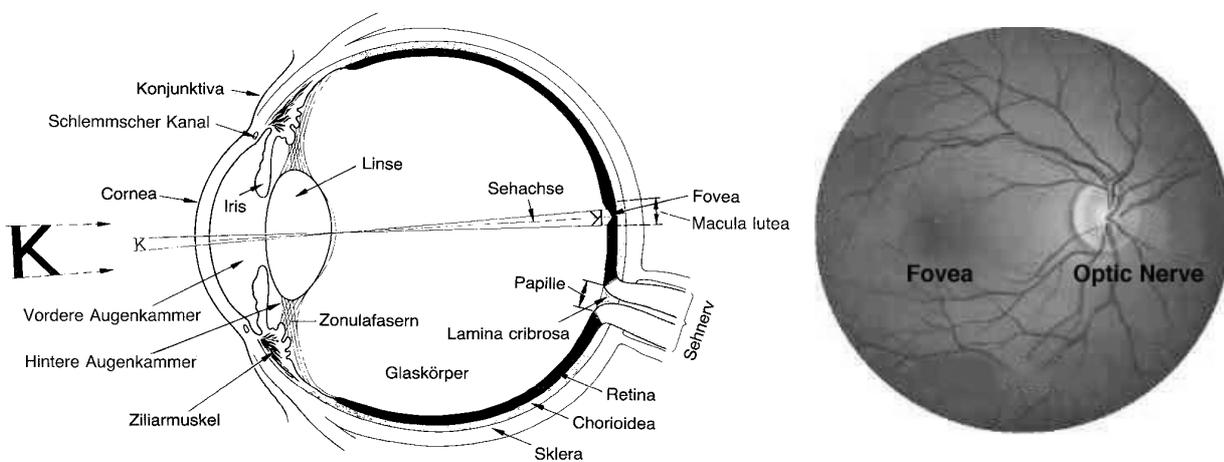


Abb. 5: Schnitt durch das menschliche Auge sowie Aufsicht auf die Retina

Die menschliche Netzhaut besitzt etwa 126 Millionen Photorezeptoren zur Reizaufnahme. Etwa 120 Millionen hell-dunkel-empfindliche Stäbchenrezeptoren, die eine lange und schlanke Struktur aufweisen, stehen etwa 6 Millionen farbempfindliche, kurze und dickbäuchige Zapfenrezeptoren gegenüber.<sup>38</sup> Die Stäbchen liegen vorwiegend in der Peripherie der Netzhaut und dienen dem Hell-Dunkel-Sehen. Die

Zapfen, die für das Farbsehen verantwortlich sind, liegen zentral an der Stelle, an der die Sehadse auf die Netzhaut trifft. Dort befindet sich eine grubenartige Vertiefung (Fovea), deren pigmentiertes Netzhautareal nur aus Zapfen besteht. Die Retina ist dort stark verdünnt, die Zapfen sind nur durch eine dünne Gewebeschicht überdeckt. Dadurch hat das einfallende Licht unmittelbaren Zutritt zu den Sinneszellen. Die gesamte Region des „schärfsten Sehens“ wird als Makula Lutea (Gelber Fleck) bezeichnet.<sup>39</sup> In diesem nur etwa 2 mm<sup>2</sup> großen ovalen Bereich sind die Carotinoide Lutein und Zeaxanthin angereichert, die auch für die gelbe Farbe verantwortlich sind.

Die schützende Wirkung von Lutein und Zeaxanthin in der Retina kann auf zweifache Weise erfolgen: Zum einen binden beide Carotinoide freie Radikale und reduzieren auf diese Weise den oxidativen Stress, zum anderen absorbieren sie energiereiche Wellenlängen im blauen Spektralbereich und verhindern so photochemische Schäden.<sup>40</sup> Lutein und Zeaxanthin kommen in der Retina in verschiedenen Stereoisomeren und zusätzlich in verschiedenen Oxidationsformen vor, die sich im Serum nicht in dieser Zusammensetzung nachweisen lassen. Dies verdeutlicht die enge Beziehung beider Stoffe zu wahrscheinlich lichtinduzierten oxidativen und photochemischen Vorgängen in der Retina.<sup>41</sup>

In einer weiteren epidemiologischen Studie ließ sich eine deutliche Korrelation zwischen dem erhöhten Konsum von carotinoidreichen Früchten und Blattgemüsen und einem verminderten Auftreten der AMD nachweisen.<sup>42</sup> Diese Untersuchung zeigte, dass Personen, die grünes Blattgemüse mit einem hohen Anteil an Lutein zu sich nahmen, ein um 43% geringeres Risiko hatten, an AMD zu erkranken als die Vergleichsgruppe ohne Luteinaufnahme. In einer anderen Studie führte eine an Spinat und Mais reiche Diät bei über der Hälfte der Testpersonen zu einer deutlich gesteigerten Dichte des Makulapigments. Dieser positive Effekt der Diät trat bereits vier Wochen nach Umstellen der Ernährungsgewohnheiten ein und ließ sich auch noch mehrere Monate nach Absetzen der Diät beobachten.<sup>43</sup>

Es ist anzunehmen, dass Lutein und Zeaxanthin auch bei anderen retinalen Degenerationen als Radikalfänger auftreten und den Degenerationsverlauf positiv beeinflussen können. So ist zum Beispiel nachgewiesen, dass bei den genetisch bedingten retinalen Degenerationen vom Retinitis pigmentosa (RP)-Typ, das als Antioxidanz wirkende Vitamin A den progressiven Verlauf der Erkrankung verlangsamt.<sup>44</sup>

### 3.2 Tocopherole

Vitamine sind wichtige Modulatoren des normalen, überbeanspruchten und gestörten Zellstoffwechsels. Eine besondere Rolle hierbei spielt das Vitamin E aufgrund dessen antioxidativen Eigenschaften und dessen Funktion als Radikalfänger. Die bedeutendste in der Natur vorkommende Verbindung mit Vitamin E-Aktivität ist das  $\alpha$ -Tocopherol. Es handelt sich um ein Derivat des 6-Chromanols mit einer gesättigten Phytolseitenkette. Das in der Natur vorkommende  $\alpha$ -Tocopherol ist meist begleitet von geringen Mengen an  $\beta$ -Tocopherol,  $\gamma$ -Tocopherol und auch  $\delta$ -Tocopherol, die sich von  $\alpha$ -Tocopherol durch Anzahl und Position der Methylgruppen am Chromanolringsystem unterscheiden (vgl. Abb. 6). Seit 1956 gilt als biologischer Standard für Vitamin E das  $\alpha$ -Tocopherolacetat.<sup>45</sup>

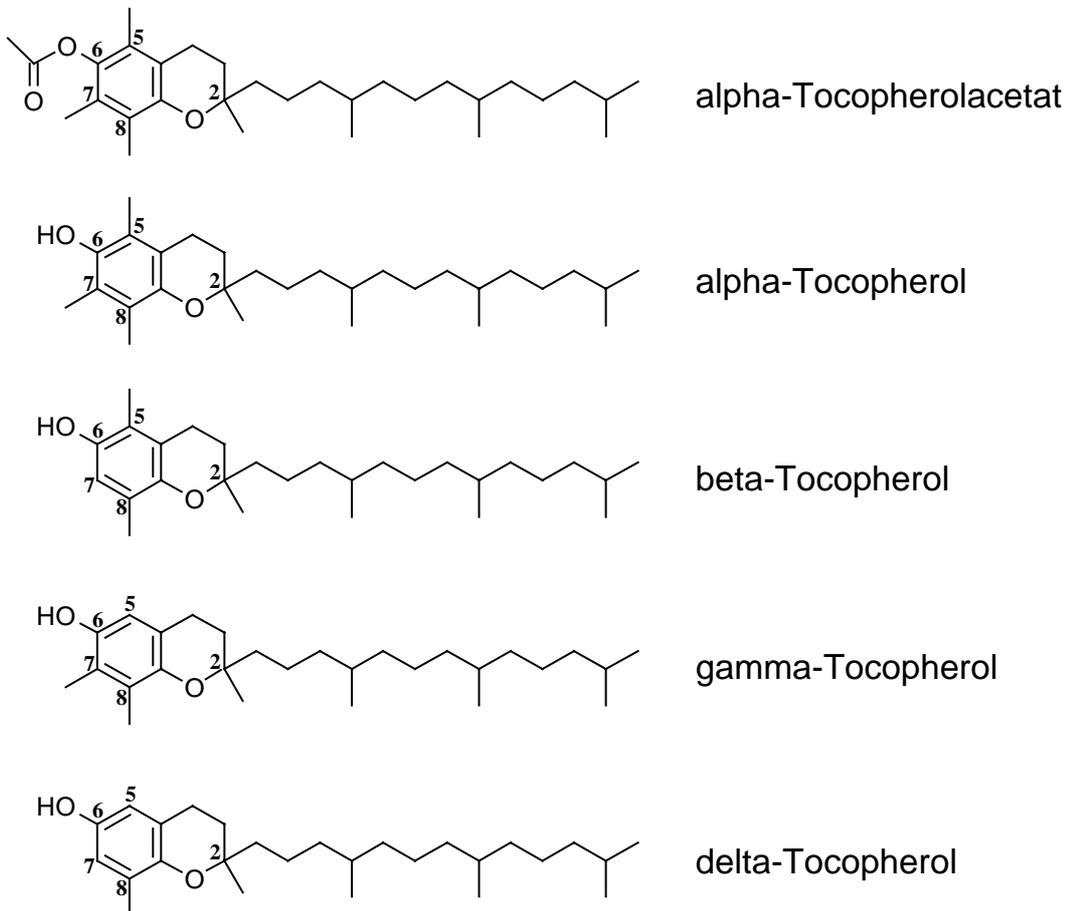


Abb. 6: Strukturformeln von  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -Tocopherol sowie von  $\alpha$ -Tocopherolacetat

Pflanzliche Öle stellen die Hauptquellen für Vitamin E dar. In Weizenkeim-, Sonnenblumen- und Olivenöl stellt  $\alpha$ -Tocopherol mit bis zu 100% den Hauptanteil an Vitamin E, während in Soja-, Maiskeim- und Palmöl  $\gamma$ -Tocopherol der Hauptanteil ist. Desweiteren treten die Tocopherole in Früchten, z.B. in Himbeeren, und Gemüse wie Bohnen, Erbsen und Paprika auf. In tierischen Produkten werden nur geringe Mengen an Tocopherolen nachgewiesen, so z.B. in Innereien, Eiern und Fisch.<sup>46</sup>

In tierischen Zellen ist  $\alpha$ -Tocopherol Bestandteil aller biologischen Membranen. Heutzutage wird angenommen, dass seine wichtigste biologische Funktion darin besteht, Membranlipide, Lipoproteine und Depotfette vor dem Abbau durch Lipidperoxidasen zu schützen. Die Auffassung, dass Vitamin E primär als Antioxidanz wirkt, wird durch zahlreiche in-vitro-Versuche gestützt. Diese zeigen, dass Vitamin E im Gewebe, in Zellen, Zellorganellen und artifiziellen Systemen ein hervorragendes Antioxidanz ist, welches verhindert, dass mehrfach ungesättigte Fettsäuren durch Lipidperoxidationsprozesse zerstört werden.<sup>47</sup>

Darüber hinaus besitzen Tocopherole eine Vielzahl von günstigen physiologischen Eigenschaften. Beispiele hierfür sind die Reduzierung von Muskelschäden, die auf oxidativen Stress während körperlicher Höchstleistung zurückzuführen sind, die Verzögerung diabetischer Spätschäden, die Verminderung des Risikos der Kataraktbildung, die Reduzierung von Cytostatika-bedingten Spätschäden und des Arteriosklerose-Risikos sowie die protektive Wirkung gegen Hautschäden wie Erythreme und Hautalterung.<sup>48</sup>

Neuere klinische Studien befassen sich mit dem Nutzen und Risiko einer Vitamin E-Supplementierung und Anwendung als Pharmakon. So wird beispielsweise die Möglichkeit einer Resorption von  $\alpha$ -Tocopherolacetat im Zahnfleisch nach zahnhygienischer Behandlung mit einer mit Vitamin E angereicherten Zahnpasta diskutiert.<sup>49</sup> In Frankreich wird dieses typische Nutraceutical bereits als präventive Schutzmaßnahme vermarktet. Bevor aber eine gesundheitsfördernde Wirkung eines solchen biomedizinischen Inhaltsstoffes propagiert werden kann, muss zunächst die positive Anreicherung sowie die Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherolacetat im Gewebe nachgewiesen werden.

### 3.3 Flavonoide

Flavonoide sind Derivate des 2-Phenylchromons (Flavon). Sie gehören zu den verbreitetsten sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, werden jedoch nicht von Bakterien und Pilzen gebildet. Früher wurden flavonoid-haltige Pflanzenextrakte als gelbe Beizenfarbstoffe (latein. flavus = gelb) verwendet. Flavonoide liegen vorwiegend wasserlöslich in den Vakuolen pflanzlicher Zellen in glycosidierter Form vor und sind häufig mit aliphatischen oder aromatischen Säuren verestert. Durch die Art, Anzahl und Anordnung acylierter oder nicht-acylierter Zuckerreste kommen mehr als 5000 bisher bekannte Strukturen zustande. Die Aglycone der Flavonoide werden nach dem Oxidationsgrad ihres zentralen Pyran-Rings in folgende Klassen unterteilt: Flavone, Flavonole, Flavonone, Anthocyanidine, Catechine und Isoflavone.<sup>50</sup>

Die am weitesten verbreiteten Flavonoide in Pflanzen sind die Flavonole (z.B. in Blüten des Goldlacks, der gelben Stiefmütterchen und Rosen, sowie in Tee und Hopfen). Flavonole und ihre Glycoside beeinflussen die Membranpermeabilität und werden deshalb auch als Vitamin P bezeichnet, obwohl sie nicht essentiell sind und ihnen somit kein echter Vitamincharakter zukommt. Ferner werden die Flavonol-Glycoside therapeutisch verwendet, da sie die Hyaluronidase hemmen. So werden heute in der Naturheilkunde Drogen, die sog. „Bioflavonoide“ enthalten, protektiv gegen Erkrankungen der Venen, zur Verbesserung der koronaren Durchblutung sowie präventiv und kurativ gegen Erkrankungen des Leberparenchyms verwendet.<sup>51</sup>

Die bekanntesten Vertreter der Flavonole sind die Glycosid-Derivate des Quercetins und des Kämpferols (Abb. 7).

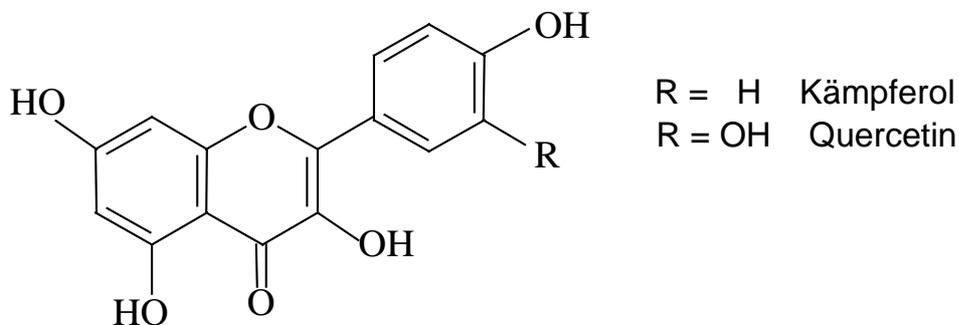


Abb. 7: Grundstruktur der Flavonole

*Maytenus aquifolium* Martius (Celastraceae) ist eine brasilianische Pflanze, deren Bekanntheit in Brasilien auf ihrer breiten Anwendung in der Volksmedizin und in der Homöopathie beruht. Sie wird sowohl als Getränk wie auch als medizinische Heilpflanze verwendet. Der Aufguß der Blätter wird traditionell gegen Magenschmerzen angewandt. Neue Erkenntnisse ergeben einen positiven Einfluß der Blätter auf die Behandlung von Magengeschwüren und Gastritis. Biologische Analysen mit *Maytenus aquifolium* bestätigen die Behandlung des Geschwürs ohne Anzeichen toxischer Nebenwirkungen.<sup>52</sup> Die Isolation und Strukturaufklärung ergibt zwei tetraglycosidisch gebundene Formen der Flavonoide, Kämpferol und Quercetin (vgl. Abb. 7).<sup>53</sup>

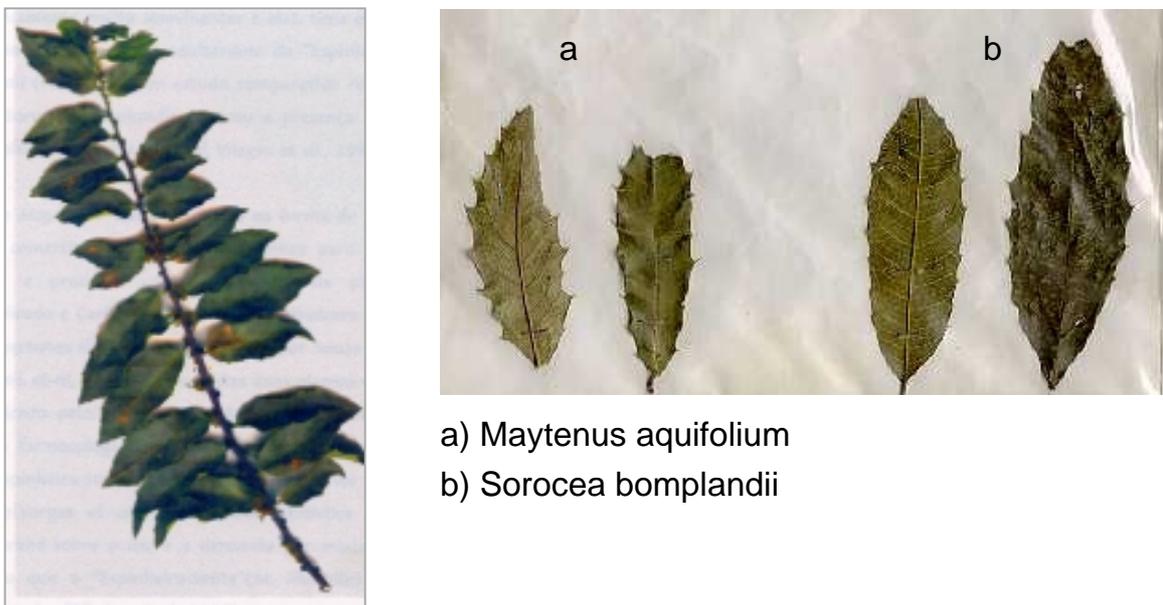


Abb. 8: *Maytenus aquifolium* (links) und Vergleich der Blätter von *Maytenus aquifolium* und *Sorocea bomplandii* (rechts)

*Sorocea bomplandii* (Baill.) Burger (Moraceae) besitzt sehr ähnliche morphologische Charakteristika wie *Maytenus aquifolium* aus der Familie der Celastraceae und spielt einen entscheidenden Faktor in der Verfälschung des heilend wirkenden *Maytenus*-Tees durch Zumischung als Streckungsmittel.<sup>54</sup> In Abbildung 8 ist die Pflanze *Maytenus aquifolium* sowie ein Vergleich der Blätter mit *Sorocea bomplandii* abgebildet. *Maytenus aquifolium* ist aufgrund ihrer Blätterform und ihrer heilenden Wirkung bekannt als „espinheira santa“ (heilige Dornen). Obwohl Tierversuche mit *Sorocea bomplandii* keine Hinweise auf toxische Nebenwirkungen geben, beinhaltet die Verwendung dieser Pflanze als Heilmittel große Risiken, solange die chemische Zusammensetzung dieser Spezies noch nicht vollständig aufgeklärt ist.<sup>55</sup>

## 4 Analytik von biologisch aktiven Inhaltsstoffen

Die Naturstoffchemie, die das Ziel verfolgt, biomedizinisch wirksame Inhaltsstoffe in großem Ausmaß zu gewinnen, gliedert sich in mehrere Arbeitsschritte. Die verschiedenen Phasen, vom Anbau der Pflanze, über die Isolation und Analyse der Inhaltsstoffe bis zu dessen Synthese und Produktion, sind in Abbildung 9 dargestellt.

### Phase 1

Anbau der Pflanze  
Ernte des Naturstoffs und Sammeln der Probe  
Ziel: einheitliches Pflanzenmaterial

### Phase 2

Isolation, Extraktion, Aufreinigung, Anreicherung,  
Trennung und Fraktionierung der Naturstoffkomponenten mittels  
chromatographischer Trennverfahren (HPLC)  
Ziel: Separation des Naturstoffs in reine Naturstoffkomponenten

### Phase 3

Strukturermittlung mit spektroskopischen Methoden (NMR, MS)  
Ziel: Ermittlung der Struktur und der Stereochemie der einzelnen  
Naturstoffkomponenten

### Phase 4

Testen der Naturstoffkomponenten auf ihre jeweilige biologische  
Aktivität und pharmakologische Wirkung, Naturstoffscreening

### Phase 5

Chemische Synthese der biologisch wirksamen Naturstoffe

### Phase 6

Optimierung der Synthese, Funktionalisierung, Derivatisierung

Abb. 9: Die Arbeitsschritte der Naturstoffchemie

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden vor allem im Bereich der Extraktion, Trennung und Identifizierung von Substanzen, die Arbeitstechniken der Phase 2 und 3, entscheidend optimiert: Neben der Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) werden zunehmend auch verschiedene schonende Festphasenextraktionstechniken für die Isolierung von biomedizinischen Substanzen eingesetzt.<sup>56</sup> Durch die Entwicklung der Kopplungstechniken werden heutzutage die beiden Phasen in einem Schritt durchgeführt. Dadurch wird die Strukturanalyse von licht- und sauerstoffempfindlichen Verbindungen in biologischen Geweben möglich. Darüber hinaus ist die Anwendung von Kopplungstechniken mit einer drastischen Reduzierung der Analysenzeit verbunden was für ein effizientes Screening von pharmakologischen Proben essentiell ist.

## 4.1 Grundlagen der Festphasenextraktion

Die Probenaufbereitung stellt für den Analytiker oft den aufwendigsten Arbeitsschritt dar. Oftmals ergeben sich Fehler bei der Komplettanalyse durch eine unzureichende Probenextraktion und Anreicherung.

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion (Liquid-Liquid-Extraction, LLE) ist ohne Zweifel die am häufigsten angewandte Methode der Probenaufbereitung. Der größte Nachteil der LLE ist jedoch neben dem großen Verbrauch an organischen Lösungsmitteln der extrem hohe Zeitaufwand. Dadurch können instabile Naturstoffkomponenten zerstört werden und sind einer weiteren Analytik somit unzugänglich. Desweiteren werden durch diese Aufbereitung der biologischen Probe unerwünschte Matrixbestandteile ebenfalls extrahiert, die bei den weiteren Analysemethoden stören bzw. das Ergebnis verfälschen. Problematisch können sich auch ein ungünstiger Verteilungskoeffizient, eine ungenügende Phasentrennung sowie Emulsionsbildung auswirken.

Mit der Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) wurde in den letzten Jahren eine schnelle und schonende Extraktionsmethode entwickelt.<sup>57</sup> Sie stellt heutzutage die leistungsfähigste Technik für eine effiziente und selektive Probenaufbereitung dar. Es handelt sich hierbei um die Abtrennung eines oder mehrerer Analyten aus einer Mischung von Verbindungen (Probe) durch selektive Verteilung zwischen einer festen Phase (Sorbens) und einer flüssigen Phase

---

(Lösungsmittel). Die Festphasenextraktion ist also eine Variante der Flüssigchromatographie.

Die SPE wird häufig mit einem Reversed Phase (RP)-Material, also einer sog. Umkehrphase, durchgeführt. Hier hat, im Gegensatz zur Normalphase, das Sorbens unpolare und die mobile Phase polare Eigenschaften. Als feste Phase dienen meist oberflächenmodifizierte Kieselgele. Die Oberflächenmodifikation erfolgt durch die Reaktion von Organosilanen mit Kieselgel. Die funktionellen Gruppen sind dann über Si-O-Si-Bindungen an das Grundkieselgel gebunden und können aus aliphatischen Alkylketten (z.B. C<sub>2</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>, C<sub>30</sub>), sowie alicyclischen oder aromatischen Resten bestehen. Werden die restlich verbliebenen freien Hydroxylgruppen des Sorbens durch Methylgruppen abgesättigt, so erhält man ein „endcapped“-Sorbens, dessen Trennleistung nur von den Eigenschaften der funktionellen Gruppen abhängt. Die Wechselwirkungen zwischen Analyt und Sorbens können je nach Art der Oberflächenmodifizierung auf van-der-Waals-Kräften (unpolare Wechselwirkungen), Wasserstoffbrückenbindungen und Dipol-Dipol-Kräften (polare Wechselwirkungen) sowie elektrostatischen Kräften (ionische Wechselwirkungen) beruhen.

Sorbentien auf Kieselgelbasis sind zwischen pH 2 und 8 und gegenüber nahezu allen organischen Lösungsmitteln stabil. Sie schrumpfen und quellen kaum, was dazu führt, dass die oberflächenmodifizierten Kieselgele sich schnell auf die Lösungsumgebung einstellen können. Somit wird ein hoher Probendurchsatz erreicht, da die Konditionierungsschritte rasch durchgeführt werden können.

Die Grundkieselgele der Sorbentien für die SPE haben in der Regel eine Teilchengröße von 30 bis 60 µm und eine Porenweite von 60 Å. Diese Eigenschaften erlauben einen schnellen Lösungsmittelfluss durch das Sorbensbett und eine effiziente Abtrennung von großen Moleküle wie Proteinen, da nur Teilchen bis zu einem Molekulargewicht von etwa 15000 in die SPE-Partikel hineindiffundieren können.

Voraussetzung für die SPE ist, dass die Probe flüssig oder gelöst vorliegt und ein Polaritätsunterschied zwischen den zu trennenden Probenmolekülen besteht. Die Durchführung einer Festphasenextraktion ist in Abbildung 10 schematisch wiedergegeben. Der Analyt wird „extrahiert“, d.h. am Sorbens zurückgehalten, während das Lösungsmittel das Sorbensbett durchfließt. Interferenzen können danach selektiv durch Wahl einer passenden Waschlösung eluiert werden. Schließlich wird der Analyt mit einem geeigneten Lösungsmittel in einer sauberen Fraktion selektiv eluiert.

---

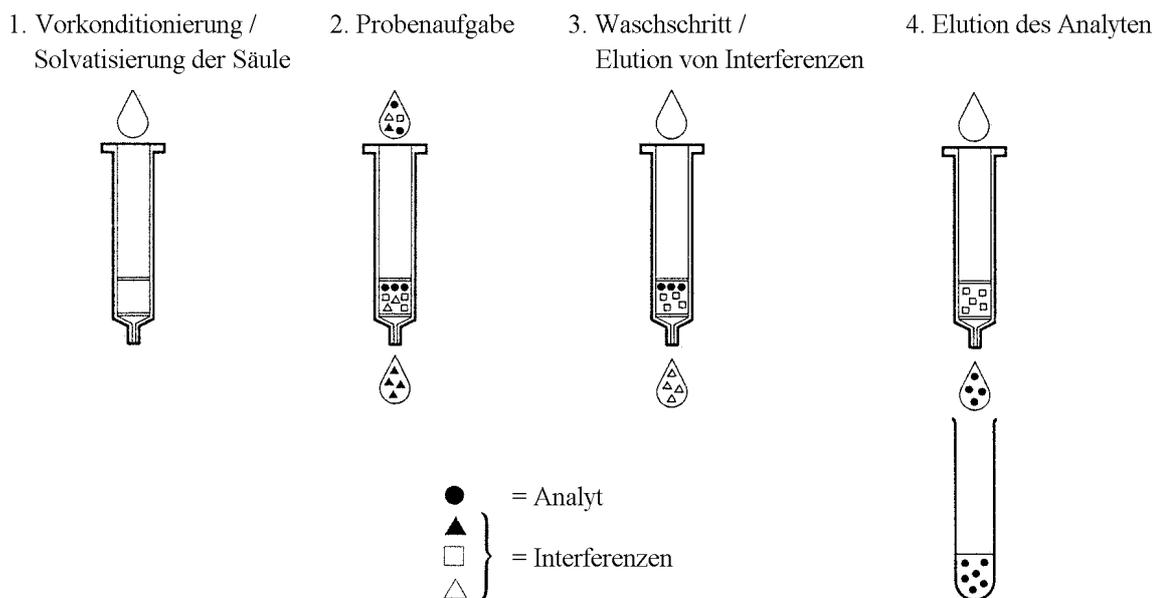


Abb. 10: Prinzipielle Durchführung einer Festphasenextraktion

Das Solvatisieren und Konditionieren der Säule spielt eine wichtige Rolle. Nur bei einer homogen und richtig konditionierten Säule kann die Extraktion gut und reproduzierbar verlaufen. Zuerst wird in der Regel mit Methanol solvatisiert, da es mit den Silanolgruppen und den funktionellen Gruppen eine gute Wechselwirkung zeigt. Danach wird die Konditionierung mit einem Lösungsmittel fortgesetzt, das sich mit Methanol mischt und der Probenmatrix ähnelt. Nach dem Probenauftrag können Interferenzen in einem Waschschrift herausgelöst werden, während der Analyt vollständig retardieren sollte. Der Analyt kann dann mit einem möglichst kleinen Volumen eines geeigneten Lösungsmittels vollständig eluiert werden.

Ein großer Vorteil der SPE gegenüber der LLE liegt in der Aufkonzentrierung des Analyten, da nur sehr geringe Lösungsmittelvolumina eingesetzt werden. Man erhält eine hohe Aufreinigung und durch die freie Wahl des Lösungsmittels eine höhere Selektivität. Der größte Vorteil der SPE liegt jedoch in der leichten Automatisierung der Technik und die problemlose Einbindung in die analytischen Kopplungstechniken.

### 4.1.1 SPE-HPLC-Kopplung (on-line SPE)

Die SPE-HPLC-Kopplung bietet im Vergleich zur konventionellen off-line Festphasenextraktion wesentliche Vorteile. Bei der on-line SPE ist das Sorbens nicht mehr in eine Säule gefüllt, sondern in eine Kartusche gepresst. Da diese mehrfach verwendet werden kann, ist eine einfache Automatisierung der Festphasenextraktion möglich. Die Kartusche kann direkt in die Probenschleife der HPLC-Anlage eingebaut werden. Somit ist ein direkter und vollständiger Proben transfer auf die Trennsäule möglich und die zeitaufwendige Aufbereitung der Probe wird minimiert.<sup>58</sup>

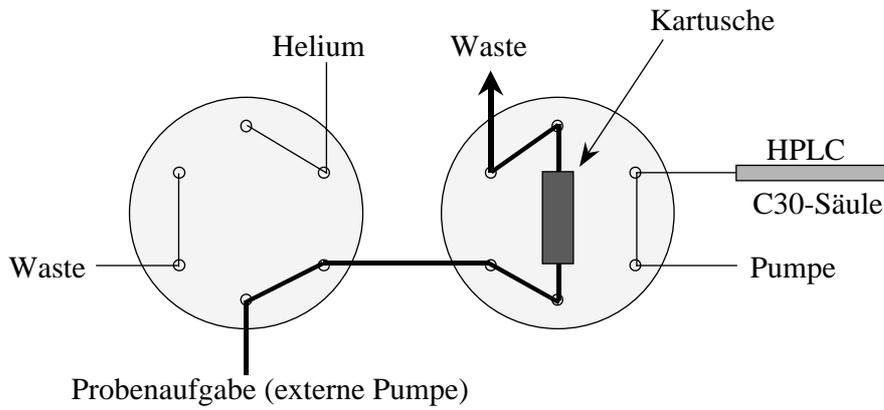
Über eine externe Pumpe wird die gesamte Probe auf die Kartusche gegeben, in der sich der Analyt anreichert (vgl. Abb. 11). Das Lösungsmittel und polare Interferenzen werden dem Abfall (Waste) zugeführt. Da sich das Sorbens in einem geschlossenen System befindet, können mit der SPE-HPLC-Kopplung auch licht- und sauerstoffempfindliche Verbindungen schonend angereichert werden.

Da die Probenmatrix häufig nicht mit der mobilen Phase des HPLC-Systems mischbar ist, kann nach der Probenaufgabe ein Arbeitsschritt folgen, bei dem die Kartusche mit dem angereicherten Analyt getrocknet wird. Dabei wird durch einfaches Drehen des Ventils (vgl. Abb. 11) Helium durch das System durchgeleitet, wobei nur die Flüssigkeit zwischen den Partikeln und Poren des Sorbens entfernt wird, jedoch keine Trocknung der benetzten Schicht der stationären Phase erfolgt. Der Vorteil dieses Arbeitsschrittes besteht also in der einfachen Möglichkeit, das Lösungsmittel auszutauschen.

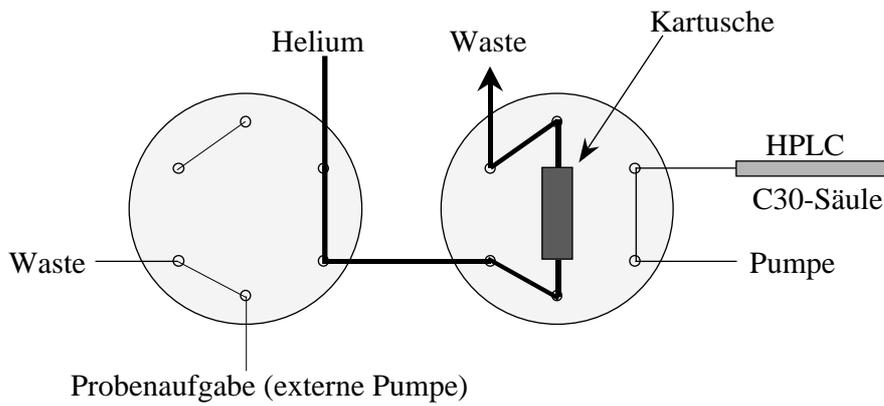
Im letzten Arbeitsschritt kann durch Drehen des HPLC-Ventils die Kartusche zwischen die HPLC-Pumpe und die Trennsäule geschaltet werden. Der Analyt eluiert nun mit der mobilen Phase von der Kartusche und die einzelnen Analytmoleküle werden auf der HPLC-Säule aufgetrennt.

---

## 1. Probenaufnahme (Probe gelöst in Hexan):



## 2. Spülen mit Helium, Trocknen der Kartusche:



## 3. Elution des Analyten (Aceton-Wasser-Gemisch):

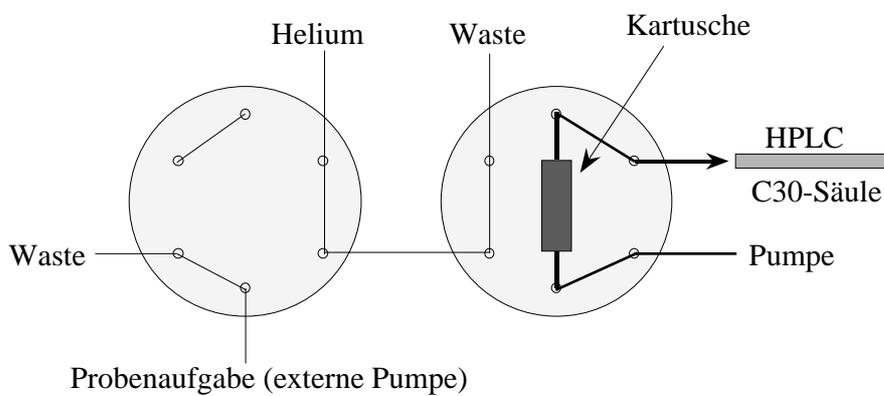


Abb. 11: Durchführung der on-line-SPE-HPLC-Kopplung

### 4.1.2 Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD)

Die MSPD ist eine analytische Technik zur Aufarbeitung und Extraktion von festen und hoch viskosen Proben. Sie wurde erst in den letzten Jahren entwickelt und findet seitdem immer mehr Anwendung. Besonders für komplizierte Matrices, wie z.B. tierischem Gewebe, ist diese Technik durch ihre einfache und schnelle Handhabung geeignet.<sup>59,60,61</sup>

Die MSPD ist gegenüber der SPE mit einem drastischen Zeitgewinn für die Aufarbeitung von festen Proben sowie einem reduzierten Verbrauch an Lösungsmitteln verbunden. Die Durchführung der Aufkonzentrierung mittels MSPD ist in Abbildung 12 skizziert.

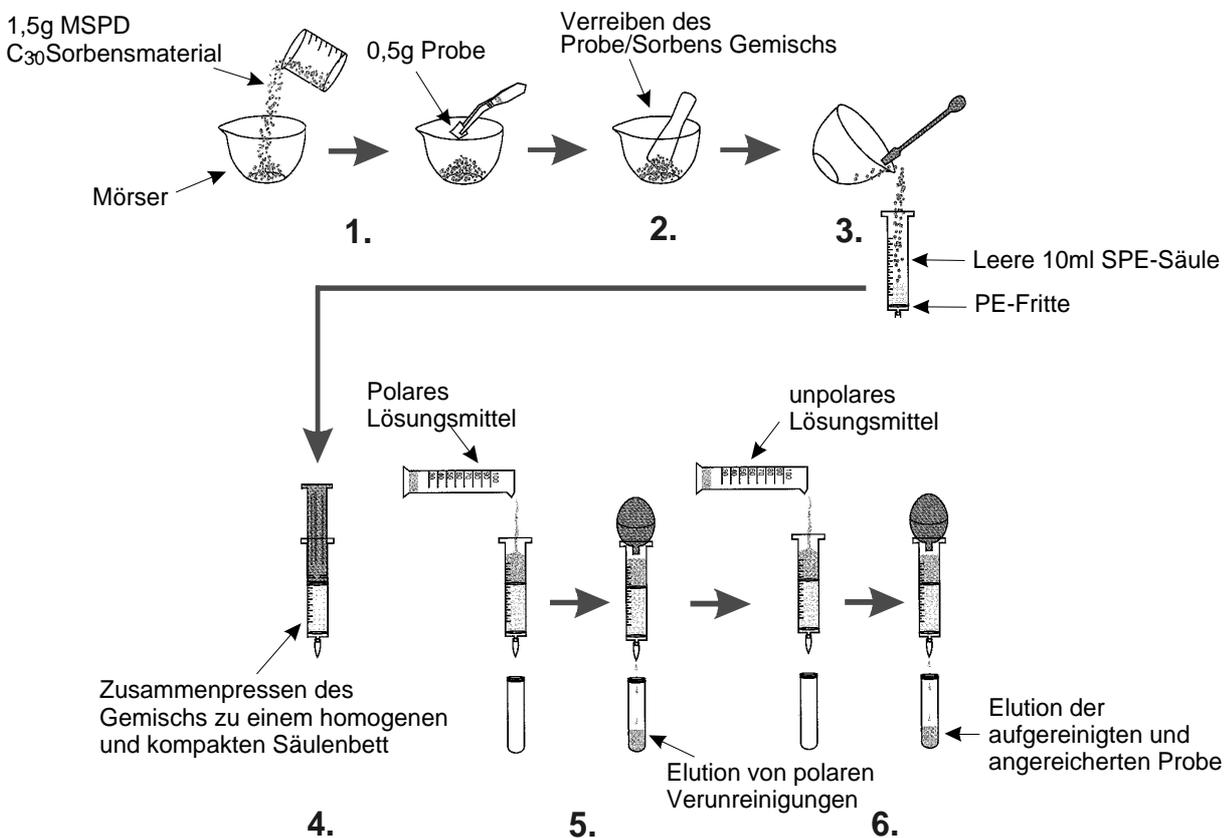


Abb. 12: Durchführung der Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD)

Die feste oder viskose Probe wird zusammen mit dem Sorbens in einer Reibschale vermischt und zu einem homogenen Probe-Sorbens-Gemisch verrieben (Schritt 1 und 2). Das Homogenisat wird dann in ein leeres SPE-Säulchen gefüllt und mit Hilfe eines Spritzenstempels zusammengepreßt (Schritt 3 und 4). Man erhält ein homogenes und dichtes Säulenbett, was für eine gleichmäßige Elution entscheidend ist und dazu beiträgt, daß die Elutionsvolumina verringert werden. Durch einen Waschschrift (Schritt 5) können Interferenzen entfernt werden. Mit einem möglichst geringen Lösungsmittelvolumen wird dann der aufgereinigte und aufkonzentrierte Analyt eluiert (Schritt 6).

Der entscheidende Unterschied zur SPE liegt darin, daß die feste Probe direkt mit dem Sorbens vermischt wird. Es entsteht eine Wechselwirkung zwischen Probe und Sorbens, die im Vergleich zur SPE wesentlich größer ist. Die einzelnen Inhaltsstoffe der Probe (Analyt und Interferenzen), die Matrix und das Sorbens wechselwirken dabei untereinander und zusätzlich mit den Elutionsmitteln. Die Anreicherung und Abtrennung des Analyten erfolgt durch die Änderung der jeweiligen Wechselwirkungen zwischen Matrix und fester Phase.<sup>62</sup>

## 4.2 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Seit den grundlegenden Versuchen von Tswett, die zur Entwicklung der Chromatographie geführt haben, wurden durch den Einsatz der HPLC und der Entwicklung neuer Trennphasen enorme Fortschritte in der Analytik erreicht.<sup>63</sup> Neben der Verwendung von Normalphasen sind heutzutage hauptsächlich sog. reversed-phase-(RP)-Materialien im Einsatz.<sup>64</sup> Die Selektivität der routinemäßig eingesetzten reversed-phase (RP) C<sub>18</sub>-Phasen ist aber für die Trennung von unpolaren Verbindungen oftmals nicht ausreichend (vgl. Kap. 5.1.1). Die 1994 von Sander et al. entwickelte C<sub>30</sub>-Phase zeigt eine erhöhte Selektivität bei Trennungen von unpolaren Verbindungen, insbesondere von Carotinoid-Stereoisomeren.<sup>65</sup> Die Synthese der C<sub>30</sub>-Phase, bei der das Kieselgel oberflächenmodifiziert wird, ist inzwischen deutlich optimiert worden.<sup>66</sup>

Bei einem neuen Syntheseweg auf der Basis des Sol-Gel-Prozesses wird das Kieselgel aus Tetraethoxysilan und den entsprechenden Triethoxyalkylsilanen aufgebaut. Der Vorteil der von Bachmann et al. vorgestellten Synthese besteht darin, dass sich die Alkylketten nicht nur an der Oberfläche befinden, sondern sich im gesamten Raum verteilen.<sup>67</sup>

Die erhöhte Selektivität und Formerkennung der C<sub>30</sub>-Phase beruht auf dem Auftreten von geordneten starren n-Alkylkettenbereichen mit *trans*-Konformation und ungeordneten mobilen Domänen mit *gauche*-Konformation. Abbildung 13 zeigt den Vergleich von Suspensions-NMR-Spektren einer C<sub>30</sub>-Phase, welche bei unterschiedlichen Temperaturen aufgenommen wurden. Dabei wurde das C<sub>30</sub>-Material in einer Mischung Methanol/*tert.*-Butylmethylether (75:25) suspendiert. Bei 295 K dominiert das Signal der (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Gruppen bei 32,8 ppm das Spektrum, welches den starren *trans*-Konformationen zugeordnet werden kann. Das Signal der mobilen *gauche*-Konformationen ist als zusätzliche Schulter bei 30 ppm sichtbar. Durch Erhöhung der Temperatur wird das Signal bei 30 ppm intensiver, während das Signal bei 32,8 ppm bei zunehmender Temperatur kleiner wird. Bei 315 K sind im Vergleich zum Spektrum bei 295 K die Signalverhältnisse umgekehrt. Durch Erhöhung der Temperatur nimmt folglich die Dynamik in der C<sub>30</sub>-Phase zu und es werden Domänen mit zunehmend mobilen Anteilen erhalten.<sup>68,69</sup>

Das Verhältnis von *trans*- zu *gauche*-Konformationen ist für die selektiven Trenneigenschaften verantwortlich. Durch die Existenz von Domänen mit starren *trans*-Konformationen der extrem langen Kohlenstoffketten ist, im Vergleich zu den C<sub>18</sub>-Phasen, eine bessere Wechselwirkung der unpolaren Moleküle mit der stationären Phase möglich. Dies ist in Abbildung 14 verdeutlicht. Bei 295 K sind die Hauptstereoisomere des  $\beta$ -Carotins basisliniengetrennt. Eine erhöhte Selektivität ( $\alpha_{\text{all-E/9-Z}} = 1,20$ ) kann durch Erniedrigung der Temperatur erzielt werden, wobei jedoch die Retentionszeiten sehr lang werden. Bei einer erhöhten Temperatur von 305 K wird sowohl die Selektivität als auch die Retentionszeit verringert, was schließlich zu einer Co-Elution der Isomere bei 315 K führt. Eine Erhöhung der Dynamik der C<sub>30</sub>-Ketten kann folglich direkt mit einer Verringerung des Trennverhaltens in Korrelation gesetzt werden.<sup>70</sup>

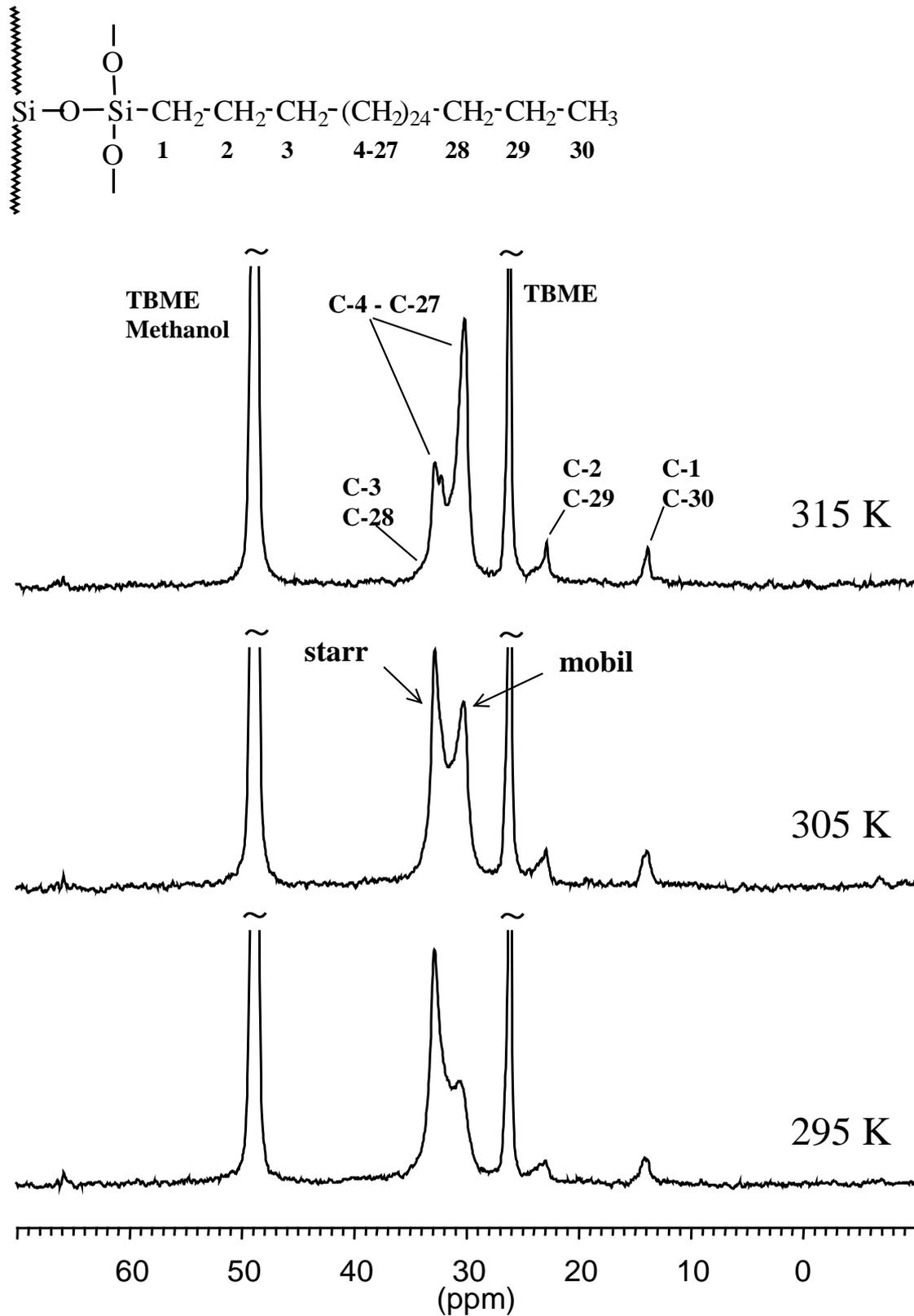


Abb. 13: Temperaturabhängige Suspensions- $^{13}\text{C}$ -MAS-NMR-Spektren einer Triacontylphase

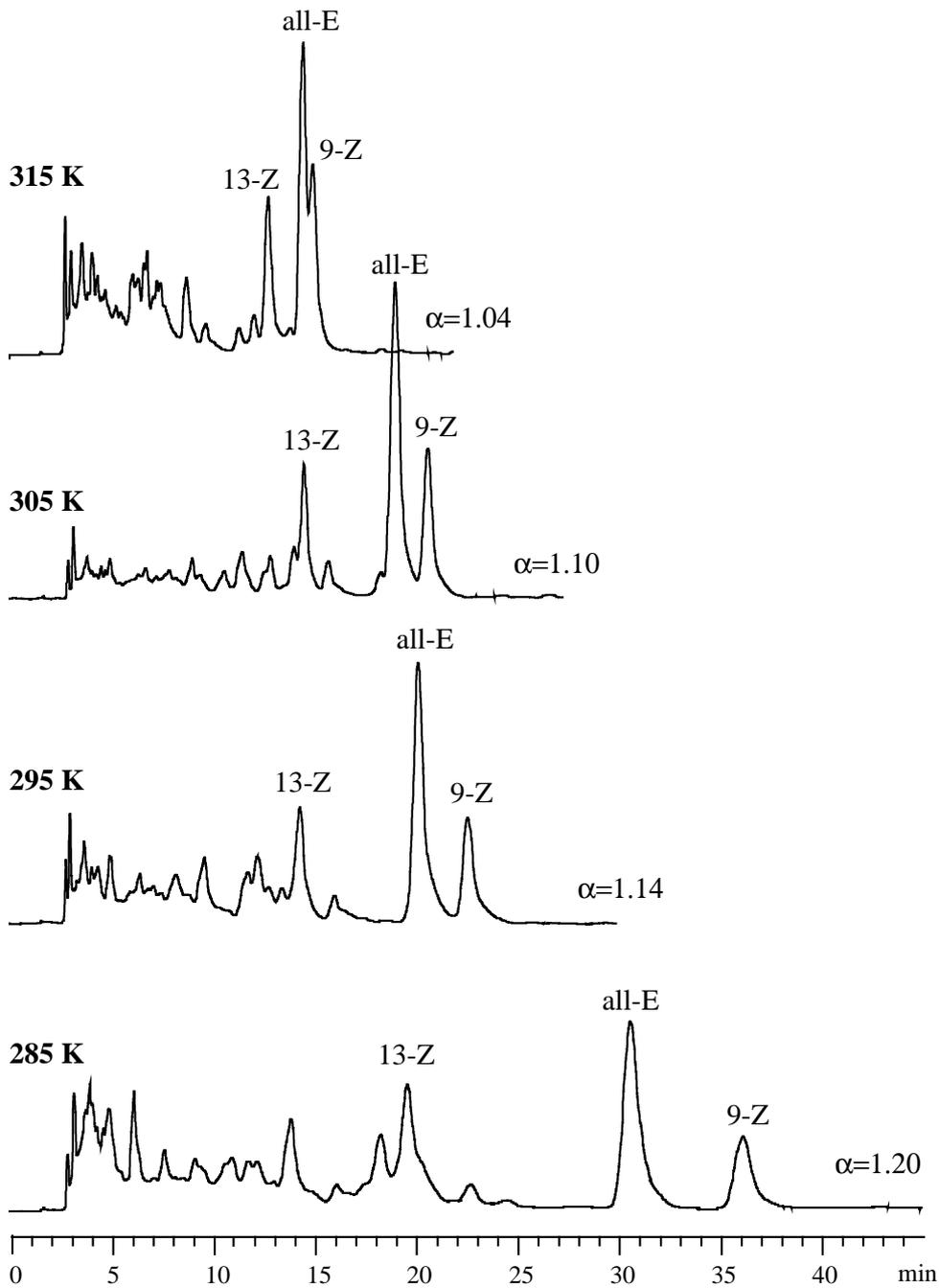


Abb. 14: HPLC-Trennungen von  $\beta$ -Carotin-Stereoisomeren bei verschiedenen Temperaturen auf einer  $C_{30}$ -Phase.

### 4.3 Grundlagen moderner Kopplungsmethoden

Die „klassische“ Analysetechnik der Trennung, Isolierung und Strukturaufklärung bei einer großen Anzahl von Proben ist sehr zeitaufwendig. Zudem erhöht jeder Arbeitsgang die Gefahr der Zersetzung der Probe oder der Kontamination mit Fremdstoffen. Um die Zahl der Arbeitsschritte zu verringern, wurden „gekoppelte“ Techniken eingeführt. Darunter wird im allgemeinen die Kombination einer Trenntechnik wie Gaschromatographie (GC) oder Flüssigkeitschromatographie (HPLC) mit einer eigenständigen spektroskopischen Technik wie Massenspektrometrie (MS), Infrarotspektroskopie (IR) oder Kernresonanzspektroskopie (NMR) verstanden.

In den 70iger Jahren wurden Anstrengungen unternommen, das NMR- und das Massenspektrometer als universelle und spezifische Detektoren mit der HPLC zu koppeln.<sup>71</sup> Ein großer Vorteil der HPLC-MS- als auch HPLC-NMR-Analytik ist neben der Analyse von licht- und sauerstofflabilen Verbindungen, die enorme Zeitersparnis der gekoppelten Methode. Daher wurde in jüngster Zeit die Möglichkeit der dreifach-Kopplung (HPLC-NMR-MS) diskutiert. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie unterschiedliche Anforderungen an das chromatographische System stellen. Daher ist es wichtig, die chromatographischen Bedingungen sowohl im Hinblick auf die HPLC-MS- wie auch der HPLC-NMR-Kopplung zu optimieren.<sup>72</sup>

#### 4.3.1 On-line HPLC-MS-Kopplung

Die on-line HPLC-MS-Kopplung stellt eine Technik dar, welche die leistungsstarke analytische HPLC-Trenntechnik mit der sehr empfindlichen MS-Detektion verbindet.<sup>73,74</sup> Die Schwierigkeit dieser Kombination besteht jedoch darin, einen Übergang von der flüssigen mobilen Phase in die Gasphase und den Vakuumbereich des Massenspektrometers zu erreichen. Eine Möglichkeit stellt die sog. *Atmospheric Pressure Ionization* dar. Hierbei werden sowohl die Analytmoleküle bei Atmosphärendruck in die Gasphase überführt, als auch die Ionen selbst erzeugt. Erst nachdem die Moleküle ionisiert sind, gelangen sie durch die Anordnung einer Kapillare und verschiedener Skimmer in den Vakuumbereich des Massenspektrometers. Hierfür wurden zwei Systeme entwickelt, die Electrospray

---

Ionisierung (ESI) und die chemische Ionisierung unter Atmosphärendruck (APCI). Beide Methoden benötigen polare Lösungsmittel als mobile Phase und unterscheiden sich in der Art der Ionisierung der Moleküle.<sup>75</sup>

*Electrospray Ionization (ESI):*

In der ESI strömt der Eluent aus einer geladenen Kapillare in einen Gasstrom, so dass ein Aerosol aus geladenen Tropfen entsteht. Diese Tropfen verdampfen bei Atmosphärendruck, wobei sich die geladenen Teilchen auf einer stetig abnehmenden Oberfläche befinden. Sobald die abstoßenden Kräfte der geladenen Teilchen die Oberflächenspannung übersteigen, explodiert dieser Tropfen und bildet neue, kleinere Tröpfchen. Der Vorgang wird als Coulomb-Explosion bezeichnet und wiederholt sich, bis die elektrische Feldstärke auf der Oberfläche der Tropfen groß genug ist, um die Solvatisierungsenergie zu überwinden. Wenn das Analytaerosol diese kritische Dimension erreicht, werden die geladenen Analytmoleküle in die Gasphase herausgeschleudert.

*Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI):*

Im Gegensatz zur ESI, bei der die Ionen in der flüssigen Umgebung der Aerosoltröpfchen gebildet werden, werden bei der APCI die Ionen in der Gasphase gebildet. Hierfür wird das Eluat in einem Heizblock pneumatisch vernebelt. Die Induktion der chemischen Ionisation erfolgt über eine Corona-Entladungsnadel. Hierbei wird der Lösungsmitteldampf ionisiert und es entstehen Reagenzionen. Diese protonieren oder deprotonieren die Analytmoleküle und Analytionen werden erhalten.

---

In einer Ionenfalle können die Ionen eingefangen und für variable Zeiten (Millisekunden bis Sekunden) festgehalten werden, bevor sie dann nach ihrer Masse analysiert werden. Der Aufbau der Ionenfalle ist in Abbildung 15 skizziert. Die Ionenfalle besteht aus einer Ringelektrode, die auf zwei Seiten von sogenannten Endkappenelektroden überdeckt ist. An die Ringelektrode wird ein Hochfrequenzfeld angelegt. Die Ionen, die in einem breiten Massenbereich stabil im Inneren der Ionenfalle festgehalten werden, können durch Variation der angelegten Hochfrequenzamplitude massenselektiv analysiert werden. Dabei werden die Ionen durch Perforation einer Endkappe aus der Ionenfalle herausgeschleudert und im Detektor nachgewiesen. Die Ionenfalle bietet auch die Möglichkeit der Tandem- oder  $MS^{(n)}$ -Massenspektrometrie. Dabei kann das Molekül sukzessive in seine Fragmente abgebaut werden. Durch diese Fragmentierungsanalyse kann eine Strukturbestimmung erreicht werden.<sup>76</sup>

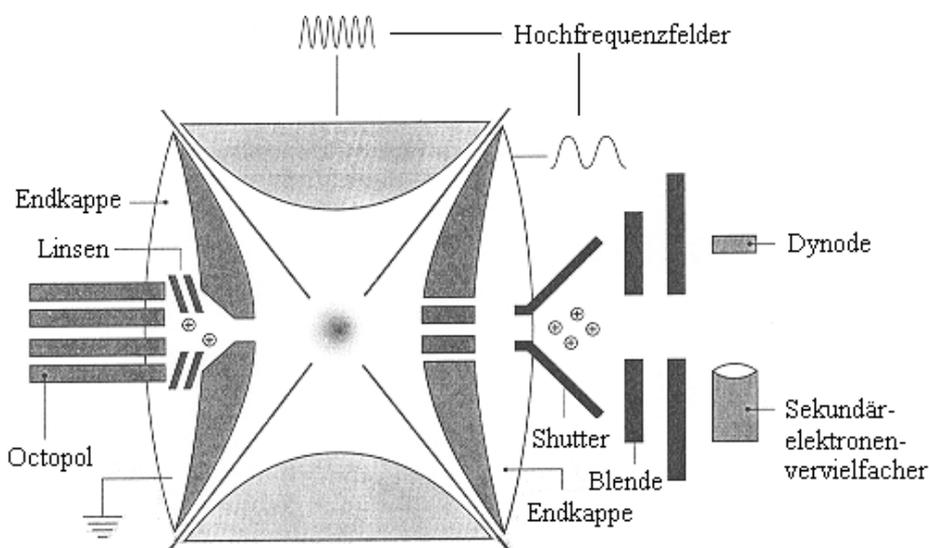


Abb. 15: Aufbau der Ionenfalle

Die HPLC-MS-Kopplung besitzt eine sehr hohe Empfindlichkeit bis in den Picogramm-Bereich und ermöglicht eine schnelle und eindeutige Strukturaufklärung aller Peaks eines chromatographischen Laufes mit unterschiedlichen Molekülmassen und Fragmentierungsmustern. Hierbei ist eine Registrierung sowohl von positiven als auch negativ geladener Ionen möglich. Auf diese Weise können beispielsweise in kürzester Zeit die unterschiedlichen Flavonoid-Derivate aus einem brasilianischen

Pflanzenextrakt analysiert werden.<sup>77</sup> Problematisch ist jedoch die Ionisierung von unpolaren Verbindungen, zu denen auch die Carotinoide zählen. Durch das Fehlen von polaren, leicht ionisierbaren Gruppen ist die Verwendung einer Elektrospray-Ionisierungsquelle nur durch den Zusatz von Additiven möglich.<sup>78</sup> Mit der APCI-Technik lassen sich die unpolaren Carotinoide ohne Zugabe von Additiven gut ionisieren.<sup>79</sup>

Bei der on-line HPLC-MS-Kopplung können die Ionen als Totalionenstrom-Chromatogramm (TIC) aufgezeichnet werden, wobei zu jeder Zeit die Gesamtzahl aller durch den Analysator tretenden Ionen registriert werden. Für jeden beliebigen Zeitpunkt im Chromatogramm kann dabei das entsprechende Massenspektrum registriert oder andererseits der zeitliche Verlauf einer bestimmten Masse (Massenspur) angezeigt werden. In jüngster Zeit findet die Aufzeichnung von  $T_{\max}$  zunehmende Bedeutung. Hierbei werden zu jeder Zeit nur diejenigen Ionen, deren  $m/z$ -Wert die größte Intensität aufweist, registriert.

## 4.3.2 On-line HPLC-NMR-Kopplung

### 4.3.2.1 Experimenteller Aufbau

Für die Vermessung von Einzelproben ist die konventionelle NMR-Spektroskopie unter Verwendung von Probenröhrchen zwar gut geeignet, die fortlaufende Registrierung von zeitlichen Veränderungen ist jedoch nur schwer realisierbar.<sup>80,81</sup> Die on-line HPLC-NMR-Kopplung stellt hier das Mittel der Wahl als kontinuierliche Messmethode dar. Insbesondere die Schnelligkeit, mit der die Proben in die Messzelle transferiert werden können, sowie die schonende Probenbehandlung (Licht- und Luftausschluss) sind von großem Vorteil.<sup>82,83</sup>

In Abbildung 16 ist der Aufbau der HPLC-NMR-Kopplung schematisch wiedergegeben. Der Aufbau der HPLC bleibt bei der Kopplung mit der NMR unverändert erhalten. Zwischen UV-Detektor und NMR-Messzelle wird ein computergesteuertes Schaltventil-Modul (z.B. BPSU, Bruker Peak Sampling Unit) geschaltet. Einfache Transferkapillaren verbinden das chromatographische System mit dem NMR-Probenkopf.<sup>84</sup>

---

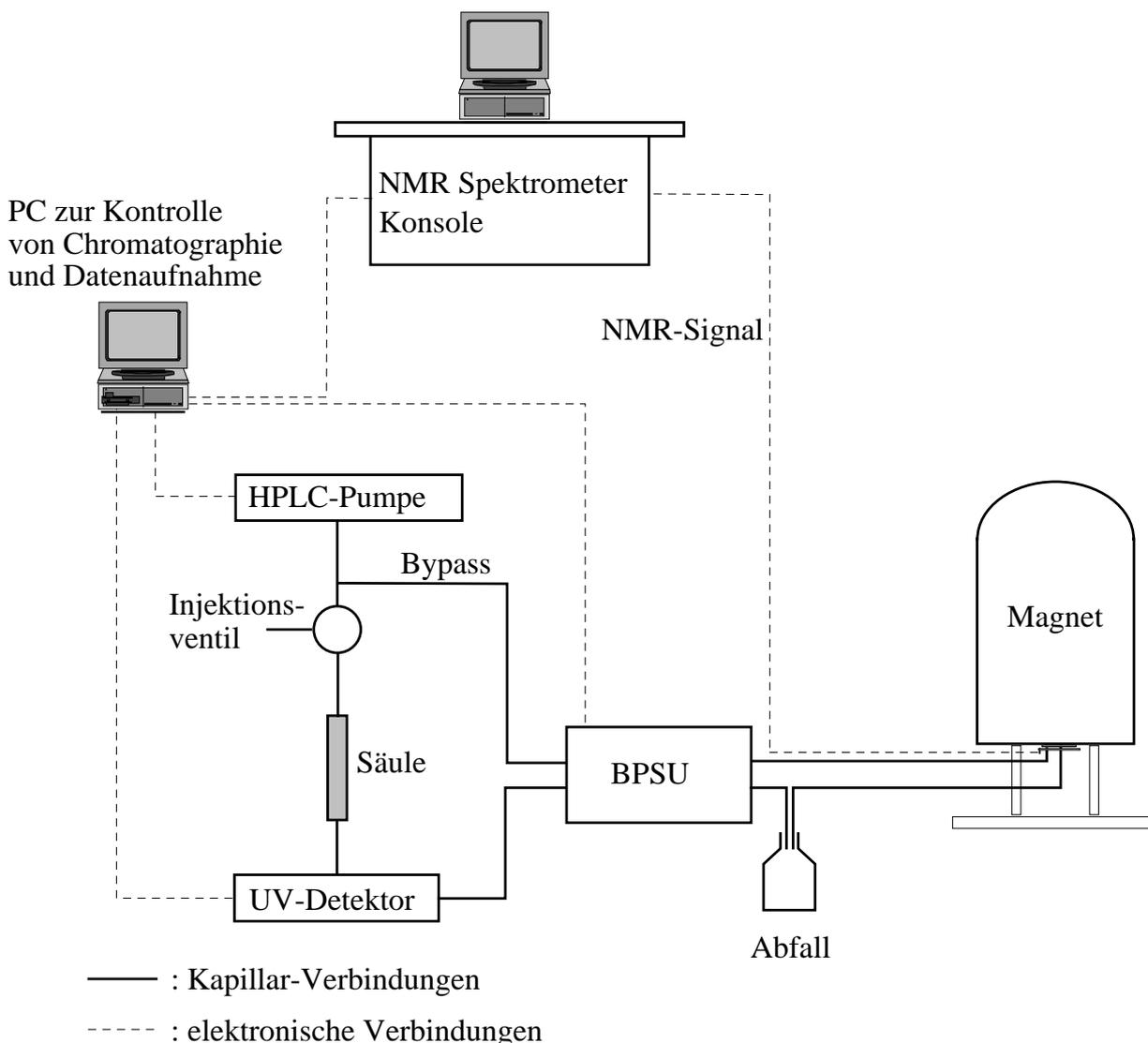


Abb. 16: Schematischer Aufbau der on-line HPLC-NMR-Kopplung

Das unterschiedliche Design von Probenköpfen ist in Abbildung 17 dargestellt. Beim konventionellen Probenkopf beträgt das reine Messvolumen unter Verwendung eines 5 mm NMR-Röhrchens 250  $\mu$ l. Sende- und Empfangsspulen sind in einem Abstand von ca. 1 mm vom NMR-Röhrchen angebracht. Die Probe kann während der Messung rotiert werden, um mögliche Feldinhomogenitäten in xy-Richtung auszugleichen.

Für die HPLC-NMR-Kopplung musste eine spezielle Durchflusszelle entwickelt werden. Der entscheidende Unterschied zwischen „konventionellen“ Probenköpfen und Durchflussprobenköpfen liegt in der Tatsache, dass die Detektionszelle fest im Probenkopf installiert ist. Die Durchflusszellen können ein Messvolumen von 40 bis

200  $\mu\text{l}$  besitzen. Die Sende-/Empfangsspulen sind direkt auf der Durchflusszelle aufgebracht, wodurch ein optimaler Füllfaktor (Anteil des Probenvolumens, an dem von der Empfangsspule umschlossenen Gesamtvolumen) und damit eine gute Empfindlichkeit erreicht wird. Eine Probenrotation ist bei diesem Design jedoch nicht mehr möglich.<sup>85</sup>

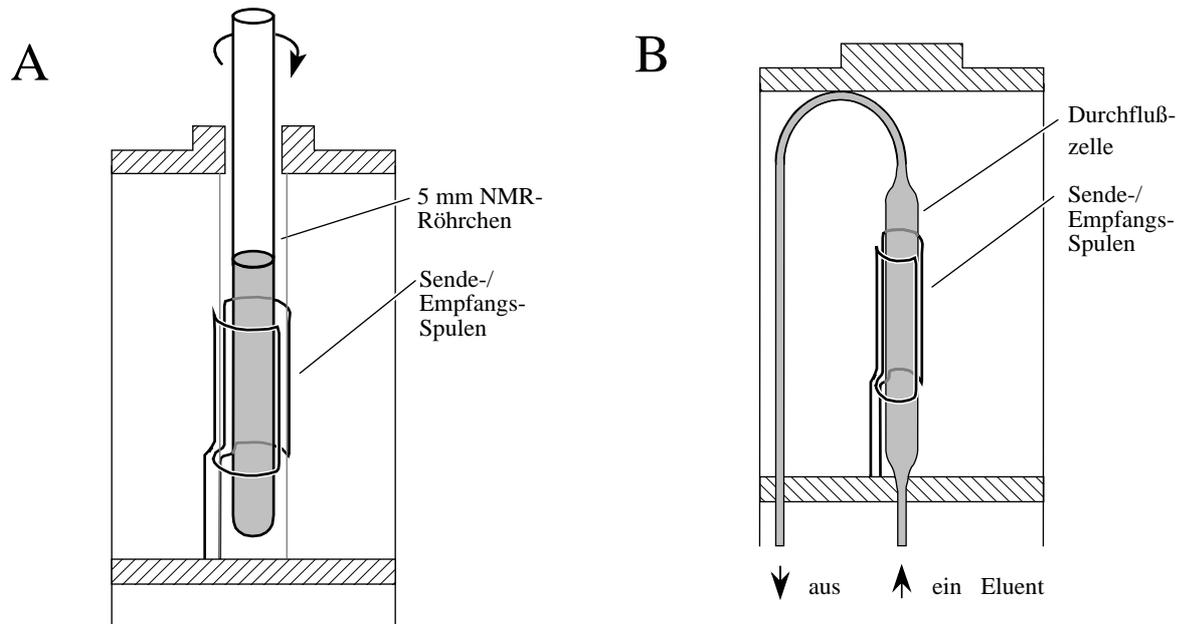


Abb. 17: Design eines konventionellen Probenkopfes (A) und eines Durchflussprobenkopfes (B).

Prinzipiell existieren zwei Möglichkeiten, um HPLC-NMR-Kopplungsexperimente durchzuführen. Diese werden über das BPSU-Interface geschaltet (Abb. 18).

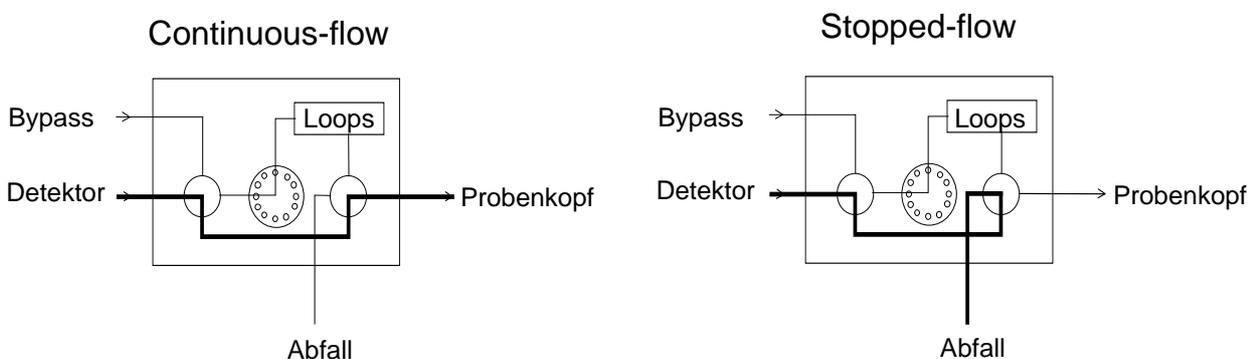


Abb. 18: Betriebsarten der HPLC-NMR-Kopplung

- Continuous-flow:

Hierbei wird unter konstantem, meist verringertem Fluss der Verlauf der chromatographischen Trennung simultan über  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren aufgezeichnet. Die Datenaufnahme bei on-line Experimenten erfolgt über ein continuous-flow 2D-NMR-Experiment. Die F2-Dimension wird durch die chemische Verschiebung bestimmt, während die chromatographische Elutionszeit in der F1-Dimension erscheint.

Problematisch beim continuous-flow Experiment ist die begrenzte Aufnahmezeit, die für ein einzelnes  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zur Verfügung steht. Dadurch kann dieses Verfahren nur bei relativ hohen Probenkonzentrationen angewendet werden.

- Stopped-flow:

Beim Stopped-flow Modus wird die Chromatographie zum gewünschten Zeitpunkt angehalten und die NMR-Messzeit kann der jeweiligen Probenkonzentration angepasst werden. Durch die unbegrenzte Messzeit besteht ebenfalls die Möglichkeit, stopped-flow 2D-NMR-Spektren (z.B. COSY, TOCSY) aufzunehmen.

Um eine Peak-Diffusion der Probe durch lange Standzeiten auf der Säule während der Stopped-flow Messungen zu vermeiden, besteht die Möglichkeit, die einzelnen Peaks einer Trennung in sogenannten „Loops“ zu speichern. Loops sind Kapillaren mit einem der Durchflusszelle entsprechenden Volumen. Dabei erfolgt vor Beginn der NMR-Messungen die Trennung, anschließend werden die Peaks in den Loops zwischengelagert. Diese können dann einzeln in die Durchflusszelle transferiert werden.

#### 4.3.2.2 Anforderungen an die Chromatographie

Die HPLC-NMR-Kopplung erfordert die Anpassung der beiden analytischen Systeme aneinander. Für die NMR-Spektroskopie ergeben sich aus der Verwendung von protonierten Lösungsmitteln bei der chromatographischen Trennung spezifische Schwierigkeiten (die Verwendung von volldeuterten Eluenten ist mit Ausnahme des relativ günstigen D<sub>2</sub>O aus Kostengründen nicht geeignet). Bedingt durch den Fluss des Lösungsmittels besitzen die zu untersuchenden Kerne nur eine begrenzte Aufenthaltsdauer  $\tau$  in der Messzelle. Die Verweilzeit  $\tau$  ist definiert als das Verhältnis des Detektionsvolumens zur Flussrate. Dies führt zu einer Verkürzung der Spin-Spin-Relaxationszeit und der Lebensdauer der angeregten Spinzustände in der Durchfluss-Messzelle:

$$1 / T_2 (\text{flow}) = 1 / T_2 (\text{static}) + 1 / \tau \quad (1)$$

Da die Signalhalbwertsbreite umgekehrt proportional zur Spin-Spin-Relaxationszeit ist, führt die Verringerung der Lebensdauer zu einer Verbreiterung der NMR-Signale.

Andererseits wird durch den ständigen Zustrom nicht angeregter Kerne der Gleichgewichtszustand schneller wieder erreicht, als dies allein durch die Spin-Gitter-Relaxation geschehen würde. Dies ermöglicht eine schnellere Wiederholungsrate der Spektrenaufnahme und ergibt dadurch einen Empfindlichkeitsgewinn.

Bei der Chromatographie muss die Auswahl der mobilen Phase nach den Bedürfnissen der NMR-Spektroskopie erfolgen: Zum einen sollte die Anzahl der Lösungsmittelsignale im NMR-Spektrum möglichst gering sein. Vor der eigentlichen Datenaufnahme müssen die Resonanzsignale der Lösungsmittel unterdrückt werden, um eine für die Detektion der Probensignale geeignete Empfindlichkeit zu gewährleisten. Zum anderen können durch die Lage der Lösungsmittel-Restsignale unter Umständen informationstragende Bereiche im Spektrum verdeckt werden. Desweiteren ist eine isokratische Trennung einer Gradiententrennung vorzuziehen, da die chemische Verschiebung vom verwendeten Lösungsmittel abhängt. Schließlich spielt die Reinheit der HPLC-Lösungsmittel eine große Rolle. Die meisten HPLC-Lösungsmittel enthalten kleine Mengen an Verunreinigungen. Oft handelt es sich dabei um Zusätze, die die Stabilität und Lagerfähigkeit des Lösungsmittels erhöhen. Diese

---

stören zwar das chromatographische Ergebnis nicht, da sie keine oder nur geringe UV-Aktivität zeigen, werden jedoch im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum detektiert.

#### 4.3.2.3 Lösungsmittelunterdrückung

Für die Unterdrückung der intensiven Resonanzsignale der Lösungsmittel stehen mehrere Pulssequenzen zur Verfügung, die auf unterschiedlichen physikalischen Phänomenen beruhen. Sie lassen sich in folgende Gruppen einteilen:

- **Vorsättigungs-Methoden:** Mit einem selektiven low-power Puls wird vor der Datenaufnahme 0.5-2 s auf die Resonanzfrequenz(en) der Lösungsmittel eingestrahlt; diese werden dadurch gezielt gesättigt. Die Vorsättigung kann dabei durch einen low-power continuous-wave (CW)-Puls, durch eine der NOESY-Sequenz angelehnte Pulsfolge oder durch sogenannte „Shaped-Pulse“, die ein breites Anregungsprofil auf gegebenenfalls mehreren Frequenzen besitzen, erfolgen.
  - **Relaxations-Methoden:** Diese Verfahren nutzen Unterschiede in den Relaxationszeiten zwischen Lösungsmittel (meist Wasser) und Probe. Sie unterscheiden sich von den übrigen dadurch, daß sie eine ungestörte Detektion von Resonanzen in nächster Nähe zum unterdrückten Signal erlauben. Erwähnt seien hier die WEFT- (Water-Eliminated Fourier-Transform) Methode und das WATR- (Water Attenuation by Transverse Magnetisation) Experiment.
  - **Selektive Nichtanregung der Lösungsmittelresonanz (Tailored Excitation):** Die am häufigsten verwendete Methode ist die Einstrahlung binominaler Pulsfolgen. Sie beruhen auf einer kurzen Folge von Pulsen mit einer Wartezeit  $\tau$ , die ein symmetrisches Anregungsprofil mit Maxima zwischen Nullstellen im Abstand von  $1/\tau$  bewirken. Dies hat den Nachteil, dass außer dem Lösungsmittelsignal noch weitere Signalbereiche im Spektrum nicht angeregt werden.
  - **Lösungsmittelunterdrückung durch  $B_0$ -Feld-Gradienten:** Diese modernen Techniken beruhen auf einer selektiven Dephasierung der Lösungsmittelsignale durch Anlegen eines Feldgradienten. In der Praxis zeigen die WATERGATE- (Water Suppression by Gradient Tailored Excitation) und die WET- (Water Suppression Enhanced through  $T_1$  Effects) Sequenz gute Ergebnisse.
-

## 4.4 Kapillarmethoden

### 4.4.1 Allgemeines

Aufgrund des häufig sehr geringen Gehaltes von pharmakologisch wirksamen Inhaltsstoffen in biologischen Proben, wie den Carotinoiden in der Retina, ist eine Miniaturisierung der analytischen Säulen zu Kapillarsäulen erforderlich. Dies führte zur Entwicklung der Kapillar-HPLC (CHPLC), bei welcher der Innendurchmesser der chromatographischen Trennkapillare auf eine Größe zwischen 50 und 250  $\mu\text{m}$  verringert wurde.<sup>86,87,88,89,90,91</sup>

Bereits 1974 schlugen Pretorius et al. vor, den elektroosmotischen Fluss (EOF) als alternativen Pumpmechanismus im Gegensatz zum Anlegen von Druck zum Transport der mobilen Phase durch die Säule zu verwenden.<sup>92</sup> Dieses Grundprinzip der Kapillarelektrophorese (CE) wurde von Jorgenson et al. und Tsuda et al. weiterentwickelt, was schließlich zur Kapillarelektrochromatographie (CEC), einer Hybridmethode aus CHPLC und CE, führte.<sup>93,94</sup> Die CEC vereint die Vorteile der geringen Innersäulen-Bandenverbreiterung der CE, die auf dem stempelförmigen Flussprofil der mobilen Phase beruht, mit der Selektivität der HPLC, die durch die Wechselwirkung der Analytmoleküle mit der stationären Phase zustande kommt. Somit können in der CEC sowohl geladene Moleküle aufgrund ihrer unterschiedlichen Mobilität im elektrischen Feld, als auch verschiedene neutrale Moleküle durch Wechselwirkung mit der stationären Phase voneinander getrennt werden.

Über eine Mikro-HPLC-Pumpe kann zusätzlich ein Druck angelegt werden. Mit dieser druckbetriebenen CEC (PCEC) wird die Durchführung einer schnelleren Trennung ermöglicht. Desweiteren kann auch eine Gradienten-Elution analog zur HPLC durchgeführt werden.<sup>95,96</sup>

In Abbildung 19 ist der experimentelle Aufbau einer CEC-Anlage gezeigt. Dieses Eigenbau-Gerät wurde in Kooperation mit der Universität Ulm (Arbeitsgruppe Prof. Welsch) im Hinblick einer zukünftigen direkten Kopplung mit einem NMR-Gerät entwickelt. Die aus Teflon bestehenden, druckstabilen Puffervorratsgefäße können direkt unterhalb des NMR-Probenkopfes angebracht werden, während das Hochspannungsgerät (30 kV) im Abstand von ca. 3 m vom NMR-Gerät platziert werden kann, um die NMR-Spektrenaufnahme nicht zu stören. An den

---

Puffervorratsgefäßen befinden sich zusätzlich zu den Elektroden-Einlässen Gasanschlüsse, über die mit einer Heliumbombe zusätzlich Druck angelegt werden kann. Im UV-Detektor befindet sich eine speziell entwickelte Kapillarzelle.

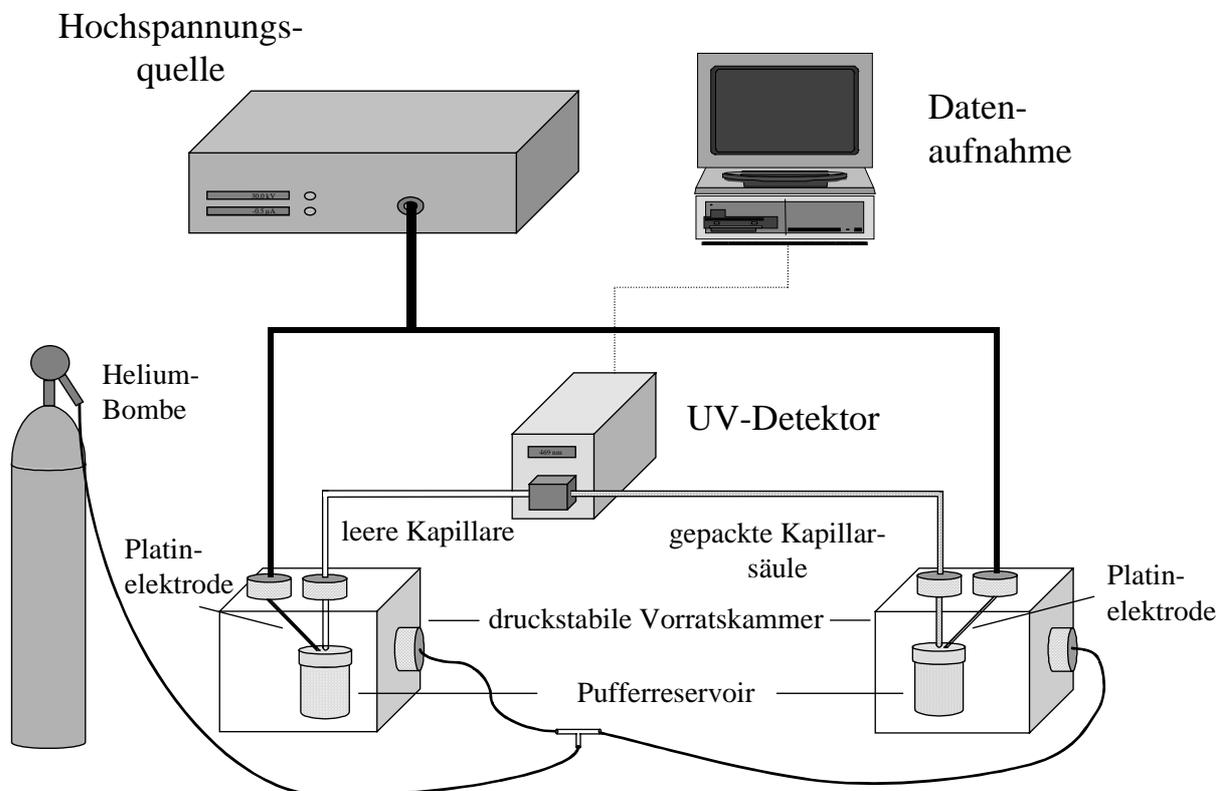


Abb. 19: Schematische Darstellung einer Anlage für die Kapillarelektrochromatographie (CEC)

#### 4.4.2 Herstellung von Kapillaren

Es gibt verschiedene Ansätze, gepackte Kapillaren, wie in Abbildung 20 gezeigt, herzustellen. Bei der hauptsächlich verwendeten Druckmethode wird die stationäre Phase unter Druck mit Hilfe einer pneumatischen Pumpe, vergleichbar mit der Herstellung von HPLC-Säulen, gepackt. Dabei wird die stationäre Phase während des Packungsvorgangs in einer druckbetriebenen Ultraschallkammer aufgeschlämmt.<sup>97</sup> Anstelle von organischem Lösungsmittel kann auch überkritisches CO<sub>2</sub> verwendet werden.<sup>98</sup> Eine andere Methode beruht auf der elektrokinetischen Migration der Teilchen unter einem angelegten elektrischen Feld.<sup>99</sup>

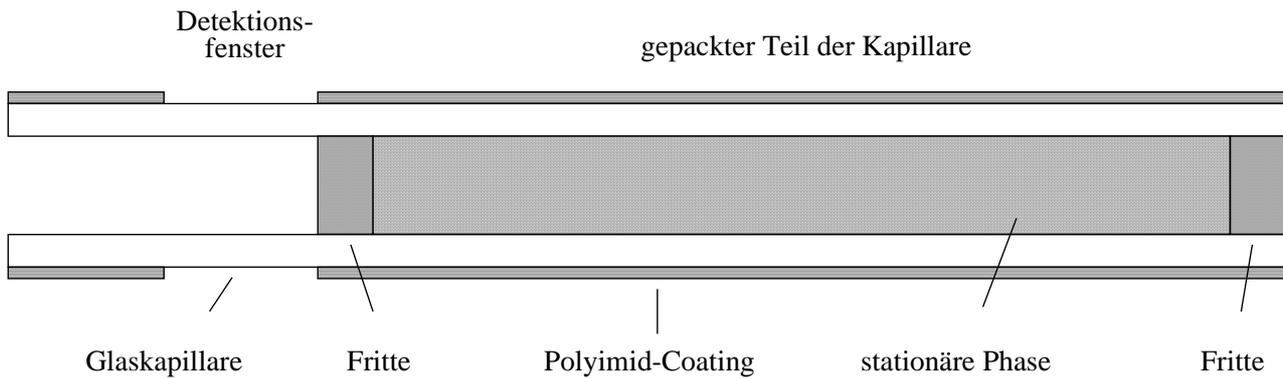


Abb. 20: Schematische Darstellung einer gepackten Kapillare mit Detektionsfenster

Nach dem Packen der Kapillare muss das Packungsbett durch geeignete Fritten in der Kapillare gehalten werden. Dafür gibt es verschiedene Ansätze. Zum einen besteht die Möglichkeit der Herstellung eines Polymers aus Kaliumsilikat und Formamid oder auf Basis des Sol-Gel-Prozesses aus Polydimethoxysiloxan bei Raumtemperatur.<sup>100,101</sup> Die anderen Verfahren gehen von reinem Kieselgel oder von einer Mischung aus Kieselgel und Kaliumsilikat oder von RP-Packungsmaterialien aus, aus denen durch Sintern bei hohen Temperaturen mit einem Heizdraht oder einem elektrischen Lichtbogen die Fritten gebrannt werden.<sup>102</sup> Da die Herstellung geeigneter Fritten problematisch ist, wurden verschiedene Ansätze zur Darstellung offener Kapillaren durchgeführt. Sie sind als sog. „Silica Rods“ oder im Falle von Polymer-Packungen, z.B. von Acrylaten als „Continuous beds“ erhältlich. Dabei wird der organische Teil der Trennphase durch Bildung einer Silicium-Sauerstoff-Bindung direkt an die Kapillarwand gebunden. Zur Erhöhung der Oberfläche kann dabei die Kapillarwand mit Fluorwasserstoff angeätzt werden.<sup>103</sup> Eine andere Möglichkeit besteht in der Herstellung einer porösen Glasmatrix an der Innenwand der Kapillare mit Hilfe des Sol-Gel-Prozesses.<sup>104</sup>

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Carotinoide

#### 5.1.1 Lutein und Zeaxanthin

Von den mehr als 600 in der Natur vorkommenden Carotinoiden sind etwa 50 Derivate zur Bildung von Retinol befähigt, besitzen also eine Vitamin-A-Aktivität. In der Nahrungskette sind etwa 50 und im menschlichen Serum noch 15 Carotinoide nachweisbar. In der Retina sind schließlich nur noch die beiden Xanthophylle Lutein und Zeaxanthin vorhanden. Diese beiden Carotinoide sind in hohen Konzentrationen auch in dunkelgrünem Blattgemüse wie Spinat und Mangold sowie Grünkohl, Brokkoli und Petersilie anzutreffen.

Klinische Studien konnten einen Zusammenhang zwischen dem Gehalt von Lutein und Zeaxanthin in der Retina und dem altersbedingten Degenerationsverlauf der Netzhaut belegen. Durch die systemische Gabe von Lutein- und Zeaxanthin-reichen Blattgemüse bzw. Lebensmitteln konnte präventiv gegen diese Augenkrankheit vorgebeugt werden. Im folgenden werden diese Carotinoide, die in verschiedenen Z/E-Stereoisomeren vorliegen, sowohl in der Quelle, dem funktionellen Lebensmittel Spinat, als auch am Wirkungsort, der Retina verschiedener Spezies (Mensch, Huhn, Rind) untersucht.

##### 5.1.1.1 Chromatographische Bedingungen

Mit der Einführung der C<sub>30</sub>-Phase und deren eingehenden Charakterisierung (vgl. Kap. 4.2) ist ein Trennmaterial verfügbar, welches für die Auftrennung von unpolaren Verbindungen, wie den Carotinoid-Stereoisomeren, besonders gut geeignet ist.<sup>105,106</sup>

---

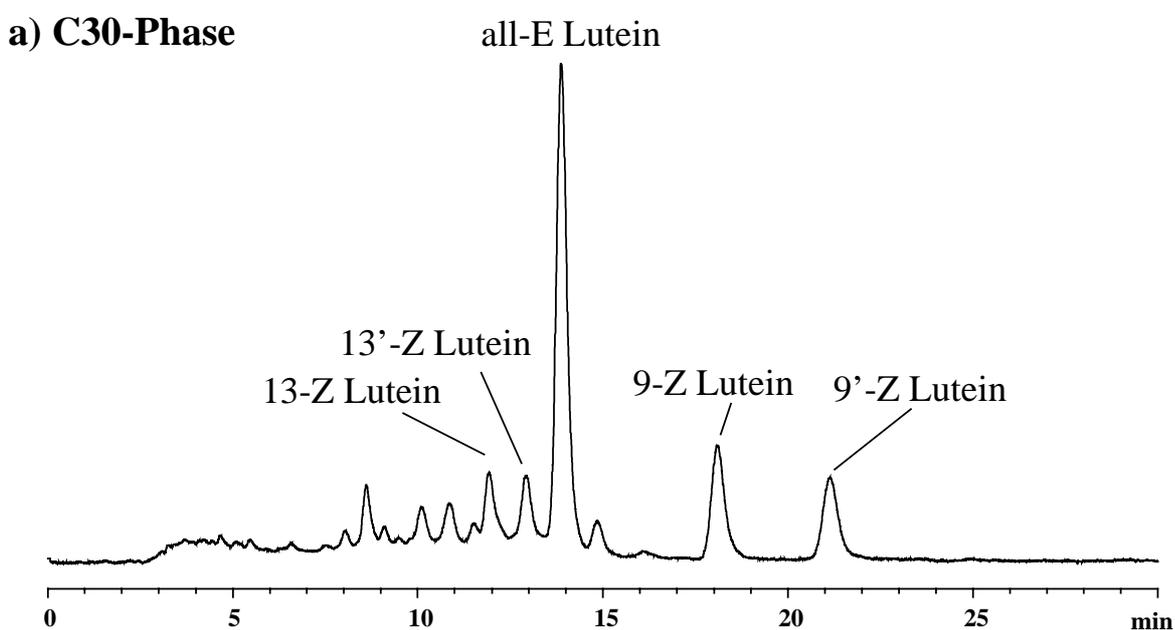
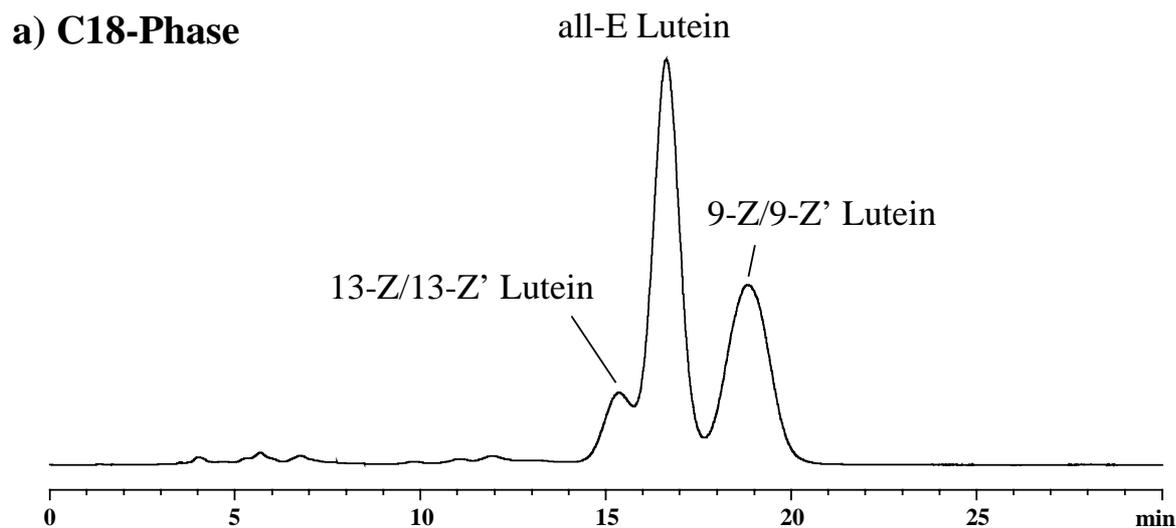


Abb. 21: HPLC-Trennungen (UV/Vis 450 nm) von Lutein-Stereoisomeren

a) C<sub>18</sub>-Phase: Mobile Phase: Aceton:H<sub>2</sub>O 76:24 (v/v), 1 ml/min, 295 K

b) C<sub>30</sub>-Phase: Mobile Phase: Aceton:H<sub>2</sub>O 86:14 (v/v), 1 ml/min, 295 K

Abbildung 21 zeigt die UV-Chromatogramme von Lutein-Stereoisomeren, getrennt auf einer C<sub>18</sub>- und einer C<sub>30</sub>-Phase. Die Selektivität der C<sub>18</sub>-Phase ist nicht ausreichend, um die einzelnen Z/E-Stereoisomere effizient zu trennen. Mit der C<sub>30</sub>-Phase erhält man eine Basislinientrennung aller Hauptstereoisomere und auch die früh eluierenden Peaks sind gut aufgelöst. Die C<sub>30</sub>-Phase ermöglicht darüber hinaus die Trennung der sehr ähnlichen Stereoisomere 9-Z und 9-Z', sowie der 13-Z- und 13-Z'-Isomere.

Diese deutlich verbesserte Erkennungskapazität der  $C_{30}$ -Phase wurde bei 295 K erhalten. Eine analog hohe Selektivität kann auch mit Zeaxanthin-Stereoisomeren erreicht werden (vgl. Abb. 22 oben). Für die Trennung der Isomere all-E und 9-Z Zeaxanthin wurde für die Selektivität der Faktor  $\alpha = 1,20$  und für die Auflösung der Wert  $R = 2,17$  berechnet.

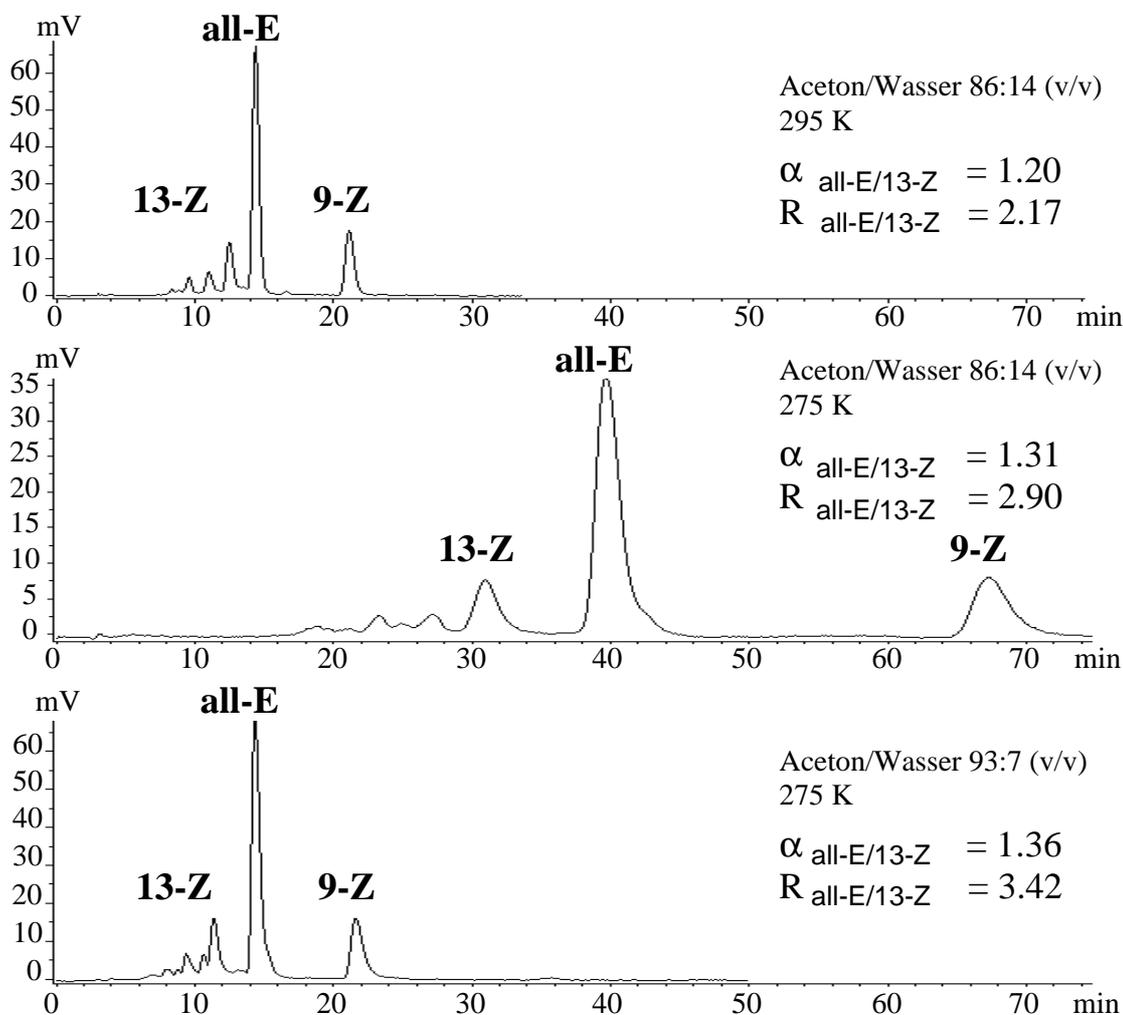


Abb. 22: Vergleich der Selektivität  $\alpha$  und Auflösung  $R$  bei Trennungen von Zeaxanthin-Stereoisomeren auf einer  $C_{30}$ -Säule

Ein Nachteil dieser Trennung ist der relativ hohe Anteil an Wasser im Eluenten, da dadurch die Konditionierung der unpolaren Alkylketten schwierig und zeitaufwendig ist. Eine nicht vollständig äquilibrierte Säule führt zu Doppelpeaks und einer unzureichenden Trennung. Zusätzlich kann die Säule mit steigendem Wassergehalt im Eluentengemisch weniger mit Analytmolekülen beladen werden. Für die HPLC-NMR-

Kopplung ist jedoch eine hohe Beladungskapazität der Trennsäule notwendig, um eine ausreichende detektierbare Substanzmenge in die NMR-Detektionszelle transferieren zu können.<sup>107</sup>

Eine erhöhte Selektivität ( $\alpha = 1,31$ ;  $R = 2,90$ ) kann bei niedrigeren Temperaturen erhalten werden, bei der mehr starre *trans*-Konformationen der C<sub>30</sub>-Ketten vorhanden sind (vgl. Kap. 4.2). Das mittlere Chromatogramm in Abbildung 22 zeigt die Trennung von Zeaxanthin-Stereoisomeren bei 275 K unter sonst gleichen chromatographischen Bedingungen wie bei 295 K. Die dabei auftretenden extrem langen Retentionszeit können durch die Verringerung des Wassergehaltes im Eluentengemisch verkürzt werden (vgl. Abb. 22 unten). Dadurch können nicht nur die zuvor genannten Nachteile minimiert, sondern die Selektivität und Auflösung weiter optimiert werden ( $\alpha = 1,36$ ;  $R = 3,42$ ).

Diese hohe Selektivität kann auch mit biologischen Proben erzielt werden. Abbildung 23 zeigt die Trennung der biomedizinisch wirksamen Inhaltsstoffe eines Spinatextraktes. Neben den Chlorophyllen enthält Spinat große Mengen an  $\beta$ -Carotin sowie den Carotinoiden Lutein und Zeaxanthin. Eine Verseifung der Chlorophylle und anschließende Abtrennung von den Carotinoiden ist nicht notwendig, da die Trennung der einzelnen Carotinoid-Stereoisomere nicht gestört wird.<sup>108</sup>

Für die quantitativen Analysen wurde jeweils  $\beta$ -Apo-8'-Carotenal als interner Standard zugemischt. Alle untersuchten Spinatproben enthalten große Mengen an all-E Lutein und all-E  $\beta$ -Carotin, wogegen nur wenig all-E Zeaxanthin detektiert werden kann. Interessant hierbei ist, dass bereits im Pflanzenextrakt, also der Quelle der essentiellen Carotinoide bereits ein vollständiges Stereoisomeren-Pattern zu erkennen ist, wobei die all-E-Stereoisomere mit mehr als 80 % der Gesamtmenge an Carotinoid-Isomeren jedoch deutlich überwiegen.

Aufgrund der UV-Labilität der Carotinoid-Stereoisomere und um eine Artefaktbildung zu vermeiden, muss eine Extraktionsmethode angewandt werden, bei der die Carotinoide schnell und schonend isoliert und aufkonzentriert werden, ohne dass eine Isomerisierung oder Oxidation der Stereoisomere stattfindet. Die Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) ist eine sehr effiziente und zeitsparende Methode und die gesamte Probenpräparation einschließlich der Isolierung der Carotinoid-Isomere aus der Matrix benötigt weniger als 30 min. Alle Stereoisomere eluieren innerhalb einer schmalen Bande, so dass die Z/E-Isomere in einem Lösungsmittelvolumen von ca. 50  $\mu$ l

aufgefangen werden können und direkt ohne Lösungsmittel-Evaporation in die HPLC-Anlage injiziert werden können.

Die Präsenz der Z-Isomere ist nicht auf eine Isomerisierung aufgrund des Extraktionsprozesses zurückzuführen. Dass es sich um keine Artefaktbildung handelt, wurde durch Tests mit all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin bewiesen, welche keiner Isomerisierung zu den Z-Isomeren während des Extraktionsprozesses unterliegen.

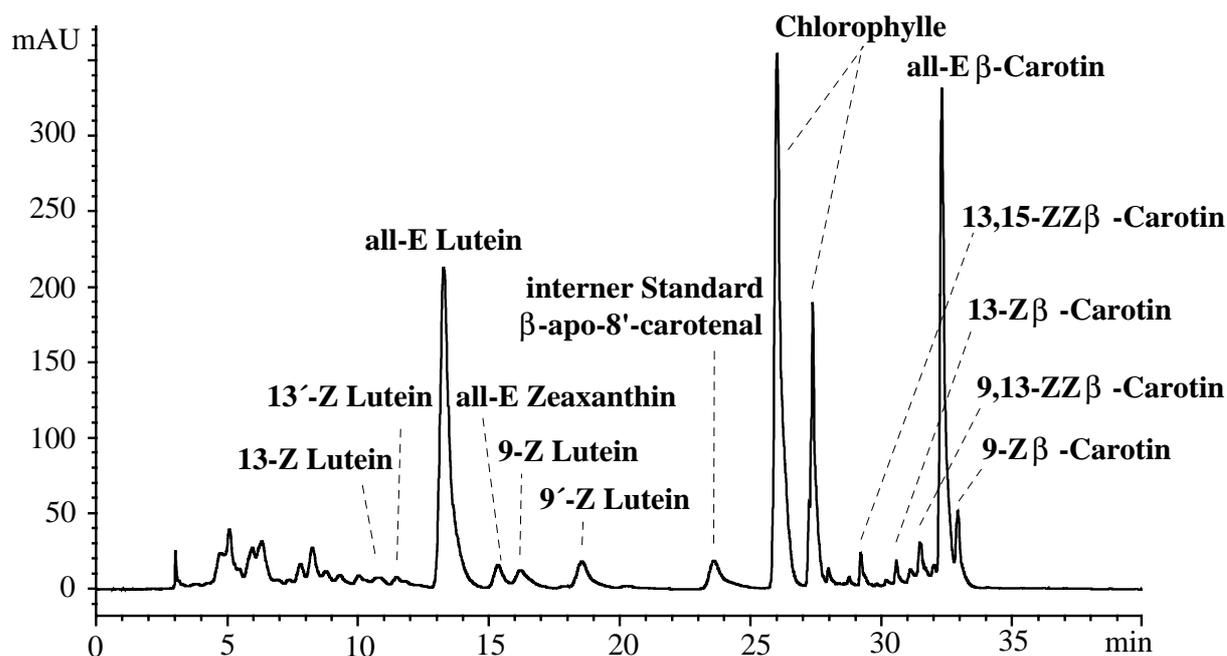


Abb. 23: HPLC-Trennung von Carotinoid-Stereoisomeren aus einem Spinat-Extrakt

Die Carotinoid-Stereoisomere sind biomedizinisch wirksame Inhaltsstoffe des funktionellen Lebensmittels Spinat.<sup>109</sup> Ihnen wird ein protektiver Schutz der Retina vor Netzhautdegenerationen, wie der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) zugeschrieben. Daher wurden die einzelnen Lutein- und Zeaxanthin-Stereoisomere nicht nur in der natürlichen Quelle des funktionellen Lebensmittels Spinat, sondern auch direkt am Wirkungsort, der Retina, untersucht.

In Abbildung 24 sind die HPLC-Trennungen von Retinaextrakten unterschiedlicher Spezies (Mensch, Huhn, Rind) dargestellt. Die einzelnen Stereoisomere können aufgrund der erhöhten Selektivität der C<sub>30</sub>-Phase gut getrennt werden:

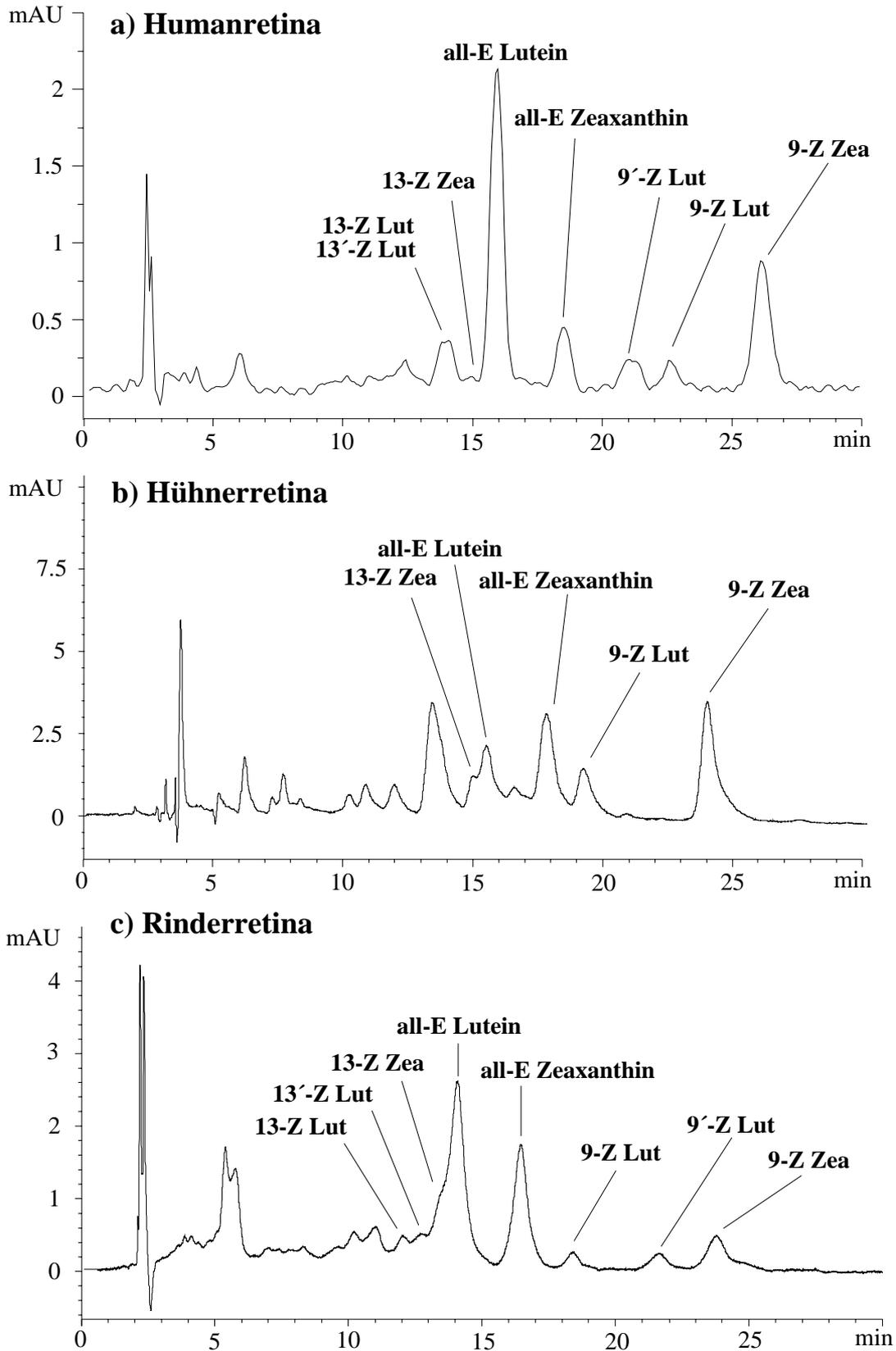


Abb. 24: Vergleich der HPLC-Trennungen (UV-Detektion bei 450 nm) von Carotinoid-Stereoisomeren aus Retinen verschiedener Spezies

In einer Humanretina werden insgesamt 209,4 ng der Carotinoide Lutein und Zeaxanthin gefunden, eine einzelne Rinder-Retina enthält etwa 50 ng an Carotinoid-Stereoisomeren, eine Hühner-Retina noch 14 ng. Die Humanretina besitzt also viel größere Mengen an Carotinoiden, was daran liegt, dass nur Menschen und Primaten eine ausgeprägte Makula Lutea besitzen, worin sich die Carotinoide anreichern (vgl. Kap. 3.1.2). Bei allen anderen Retinen verteilen sich die Carotinoide gleichmäßig über die gesamte Retina.

Interessant ist die Tatsache, dass in den Retinen viel mehr Zeaxanthin zugegen ist als im Spinat. Diese völlig unterschiedliche Zusammensetzung zwischen der Quelle der Carotinoide, dem Spinat, und dem Wirkungsort, der Retina, lässt auf eine spezielle Funktion dieser Zeaxanthin-Stereoisomere in der Retina schließen. Der Anteil an Zeaxanthin Stereoisomeren variiert dabei von Spezies zu Spezies. Während in der Humanretina der Anteil an Zeaxanthin mit 36 % von allen Carotinoiden im selben Bereich wie in der Rinderretina (40 %) liegt, haben insbesondere Hühner mit 68 % einen ausgeprägt hohen Anteil an Zeaxanthin.

Wie aus dem Vergleich der Chromatogramme gut zu erkennen ist, besitzen die einzelnen Spezies die selben Carotinoid-Stereoisomeren-Muster, jedoch in unterschiedlichen Konzentrationen. Besonders auffallend ist der extrem hohe Anteil an 9-Z Zeaxanthin in allen untersuchten Spezies. Er beträgt im Huhn 42,9 %, im Rind 52,6 % und in der Humanretina sogar 72,9 % aller Zeaxanthin Stereoisomere. Diese Isomere scheinen also eine ausgewiesene biologische Aktivität in der Retina zu besitzen. Möglicherweise ist das 9-Z Zeaxanthin das Schlüssel-molekül in der Behandlung bzw. der Prävention der altersbedingten Makuladegeneration (AMD).

In der folgenden Abbildung ist der Vergleich zwischen einer Humanretina (Injektion von 1/10 einer Retina) und dem Humanserum (20 µl) dargestellt. Das Verhältnis all-E Lutein zu all-E Zeaxanthin beträgt im Serum 2:1, in der Humanretina jedoch 5:1. Diese Verschiebung der Verhältnisse kommt durch die Bildung von Z-Isomeren in der Retina zustande. Wie aus den UV/Vis-Chromatogrammen zu entnehmen ist, sind im menschlichen Serum, im Gegensatz zur Retina, keine Z-Isomere nachweisbar. Dies ist ein eindeutiger Beweis dafür, dass die Stereoisomere spezifisch in der Retina gebildet werden und ihnen somit eine besondere biologische Aktivität zugeordnet werden kann. Auffällig hierbei ist der extrem hohe Anteil an 9-Z Zeaxanthin, der mehr als 50 % aller Zeaxanthin-Stereoisomere ausmacht.

---

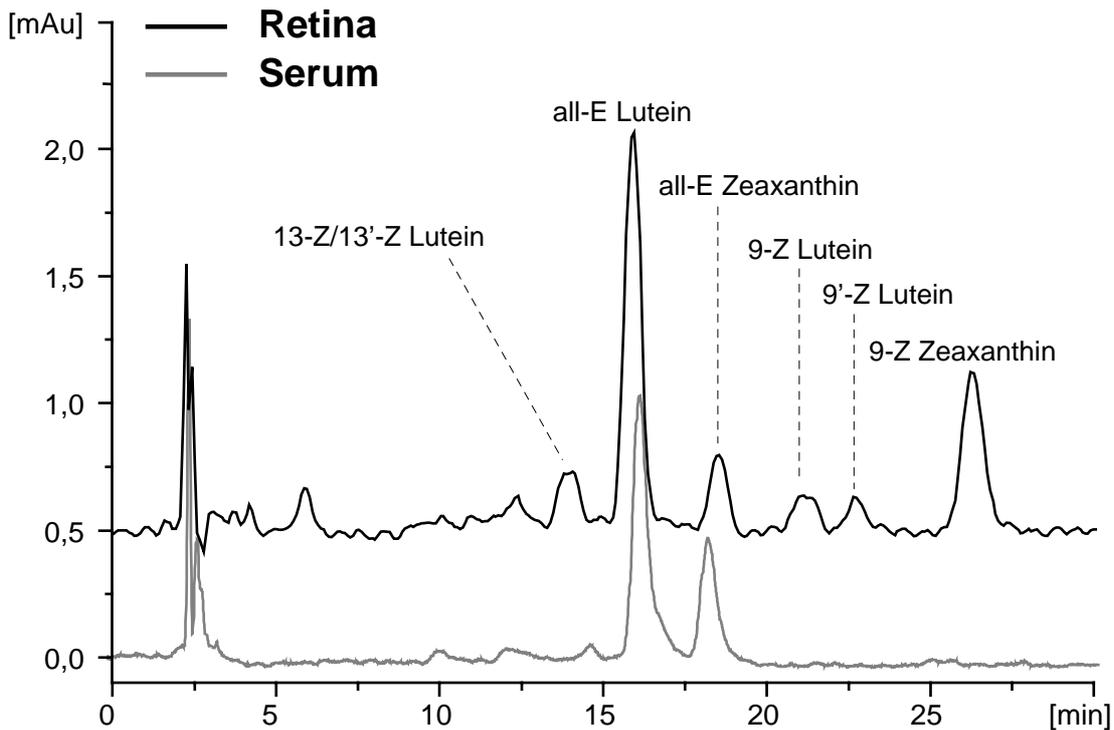


Abb. 25: Vergleich der HPLC-Trennungen von Carotinoid-Stereoisomeren aus einer humanen Retina und dem Serum

Prinzipiell sind 2 Möglichkeiten der Anreicherung der Carotinoid-Stereoisomere in der Retina vorstellbar. Zum einen kann es sich um eine passive Ansammlung der Stereoisomere in der Retina handeln, zum anderen ist eine aktive metabolische Umwandlung der Carotinoide denkbar.

Um dies zu untersuchen wurden 50 µl einer reinen 0,1 %igen Lösung von all-E Lutein in DMSO in den Vitreus des linken Auges eines Huhns injiziert (vgl. Abb. 26 oben). In das rechte Auge wurde zum Vergleich 50 µl reines DMSO injiziert. Nach 1 h ist im linken Auge nicht nur eine Anreicherung des gespritzten all-E Luteins feststellbar, sondern auch eine erhebliche Menge an all-E Zeaxanthin. Zusätzlich fand auch eine Metabolisierung in die einzelnen Z-Isomere statt. Dieses Ergebnis beweist eindeutig, dass die einzelnen Carotinoid-Stereoisomere spezifisch in der Retina gebildet werden. Dies steht auch im Einklang mit dem Befund, dass im Serum keine Carotinoid-Stereoisomere detektierbar sind.

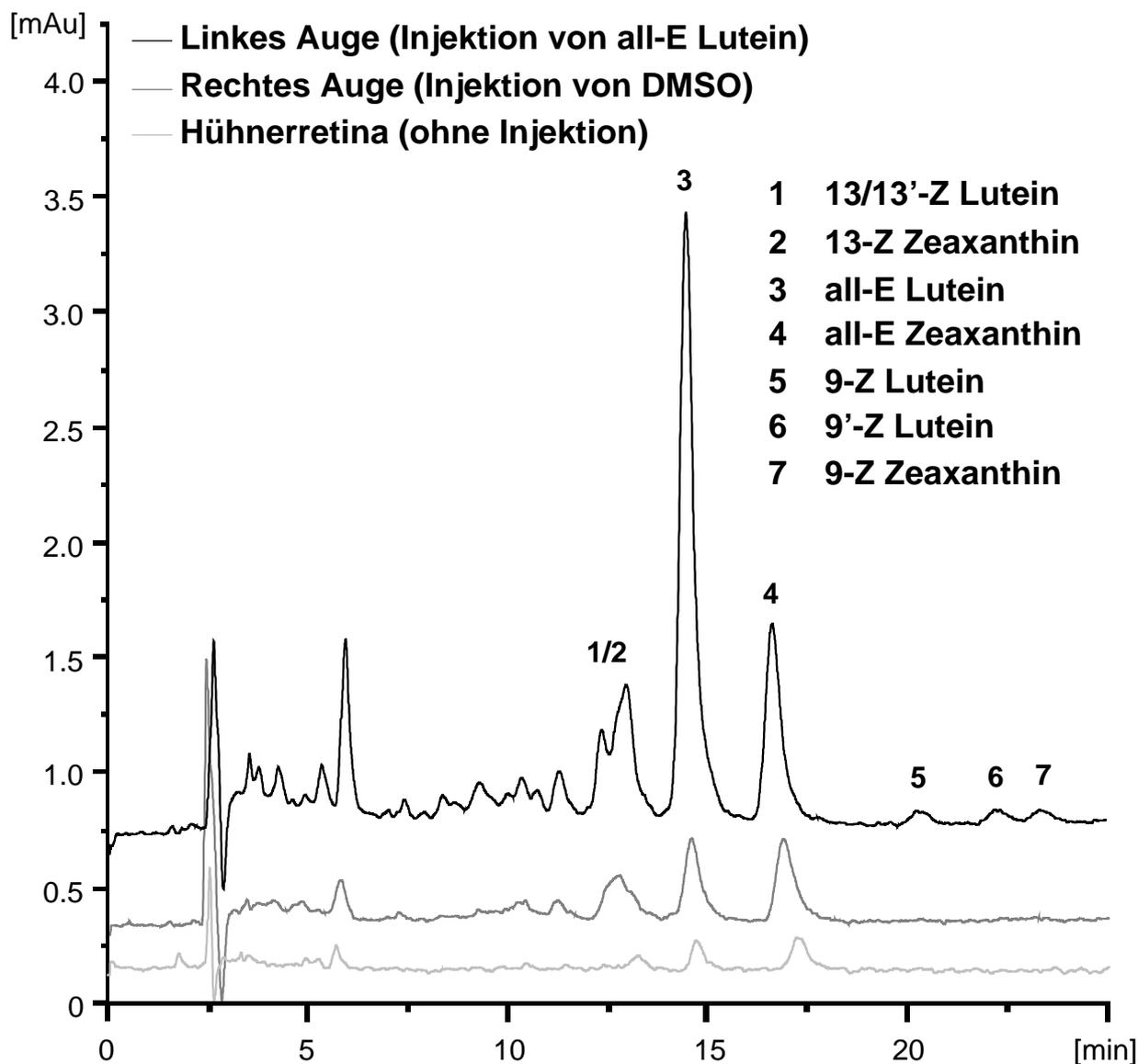


Abb. 26: HPLC-Trennungen von Carotinoid-Stereoisomeren aus Hühnerretinen  
(Nach Injektion von all-E Lutein in den Vitreus des linken Auges)

Für jedes der gezeigten Chromatogramme wurden 10 % der jeweils aus der Retina extrahierten Carotinoide injiziert. Im Vergleich zu einem nichtbehandelten Tier (vgl. Abb. 26 unten) findet man auch einen erhöhten Gehalt der Carotinoid-Stereoisomere in dem rechten Kontrollauge (vgl. Abb. 26 mitte). Das injizierte all-E Lutein hat folglich innerhalb 1 h die Retina-Blut-Barriere überwunden und ist so in den Blutkreislauf gelangt. Von dort hat es sich, nach nochmaliger Überwindung der Retina-Blut-Barriere auch im nicht injizierten Kontrollauge angereichert.

Mit diesem grundlegenden Versuch konnte eine eindeutige Anreicherung von Lutein und Zeaxanthin Stereoisomeren in der Retina durch exogen zugeführte Carotinoide nachgewiesen werden. In weiterführenden Studien werden nun die Carotinoide direkt in die Blutbahn injiziert, um eine mögliche Kontamination der Retina mit den Carotinoiden zu vermeiden. Desweiteren lassen zukünftige Fütterungsversuche mit carotinoidreichen funktionellen Lebensmitteln, wie Spinat, ebenfalls eine Anreicherung in der Retina erwarten.

#### 5.1.1.2 Kapillarelektrochromatographie (CEC)

Um die Korrelation der Carotinoid-Stereoisomere und dem Degenerationsverlauf der Retina untersuchen zu können, müssen degenerierte sog. RCS-Ratten untersucht werden. Aufgrund der sehr niedrigen Menge an Carotinoiden in diesen biologischen Proben, ist eine Miniaturisierung der Trennung von analytischen Säulen zu Kapillarsäulen erforderlich. Die Gesamtmenge an Carotinoiden beläuft sich in einer Rattenretina auf etwa 1 ng. Da die einzelnen Stereoisomere von Lutein und Zeaxanthin identifiziert und charakterisiert werden sollen, ist es erforderlich, Substanzmengen unter 1 ng detektieren zu können.

Die Kapillarelektrochromatographie (CEC) ist eine der effizientesten miniaturisierten Trenntechniken. Sie kombiniert die hohe Trennleistung der Kapillar-HPLC (CHPLC) mit dem Vorteil der geringen Bandenverbreiterung der Kapillarelektrophorese (CE). Um die hohe Selektivität der C<sub>30</sub>-Phase auch in miniaturisierten Systemen verwenden zu können, wurden Kapillaren (20 cm, 100 µm I.D.) mit ProntoSil C<sub>30</sub>-Material (3 µm, 200 Å) gepackt (vgl. Kap. 4.4.2). Nach dem Packen der Kapillare muss das Packungsbett durch geeignete Fritten in der Kapillare gehalten werden. Dies geschah auf Basis des Sol-Gel-Prozesses durch Zugabe von Polydimethoxysiloxan bei Raumtemperatur.

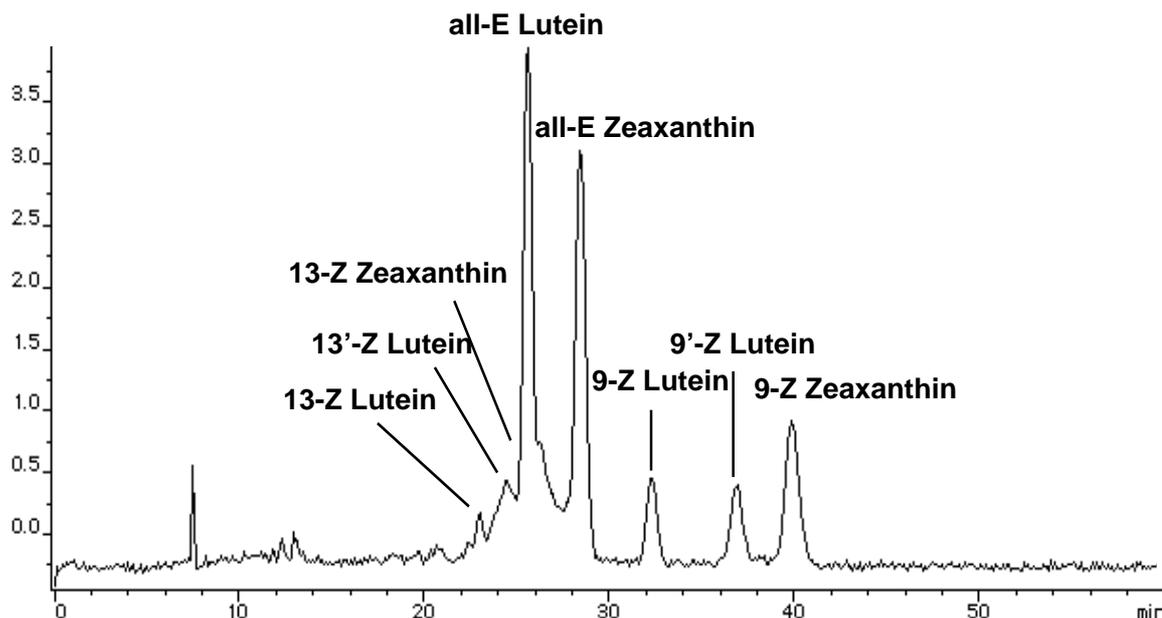


Abb. 27: CEC-Trennung (20 kV) von Lutein und Zeaxanthin-Stereoisomeren mit einer  $C_{30}$ -Kapillare (20 cm, 100  $\mu\text{m}$  I.D.)

Abbildung 27 zeigt die CEC-Trennung (20 kV) von Lutein und Zeaxanthin-Stereoisomeren mit einer eigens hergestellten  $C_{30}$ -Kapillare. Die hohe Selektivität konnte bei der Miniaturisierung der Trenntechnik beibehalten werden und die 9-Z Stereoisomere sind alle basisliniengetreunt. Bei der manuellen Injektion der Carotinoide durch Anlegen einer geringen Spannung (10 kV) sind nur 1 ng Carotinoide auf die Kapillarsäule aufgebracht worden. Ein weiterer Vorteil dieser Kapillarmethode ist die Reduzierung des Lösungsmittel- und Probenvolumens. Dadurch können nicht nur die Kosten gesenkt werden, sondern vor allem die Empfindlichkeit verbessert werden.

Mit der CEC-Technik sollte es also möglich sein, die Carotinoid-Stereoisomere in einer einzelnen Ratten-Retina untersuchen zu können. Desweiteren wurde das CEC-Eigenbaugerät so entwickelt, dass es direkt mit dem NMR-Gerät gekoppelt werden kann. Inzwischen ist auch ein neues NMR-Probenkopf-Design für die on-line CEC-NMR-Kopplung entwickelt worden, so dass nach diesen grundlegenden Versuchen mit dem CEC-Gerät in Kürze mit der Strukturaufklärung und Quantifizierung der Stereoisomere von Lutein und Zeaxanthin in degenerierten Rattenretinen begonnen werden kann.

### 5.1.1.3 HPLC-APCI-MS-Kopplung

Die on-line HPLC-MS Kopplung mit ihrer hohen Empfindlichkeit im pmol-Bereich ist für eine schnelle Strukturaufklärung von verschiedenen Carotinoiden sehr effizient. So können mit einem chromatographischen Lauf alle Peaks identifiziert und den jeweiligen Carotinoiden zugeordnet werden. Aufgrund der Unpolarität der Carotinoide ist ihre Ionisierung jedoch problematisch. Die Elektrospray-Ionisierung (ESI) ist bei Carotinoiden sehr schwierig und gelingt beispielsweise durch den Zusatz von Silbersalzen, welche den Ionisierungsprozess erleichtern. Die Kopplung der HPLC mit der APCI-Massenspektrometrie ermöglicht die Ionisierung der unpolaren Carotinoide ohne Zugabe von Additiven, die einen Einfluss auf die Isomerisierung oder Oxidation dieser instabilen Verbindungen haben können. Eine Detektion ist sowohl im positiven als auch im negativen Modus möglich, wobei jeweils nur eine geringe Fragmentierung zu beobachten ist.

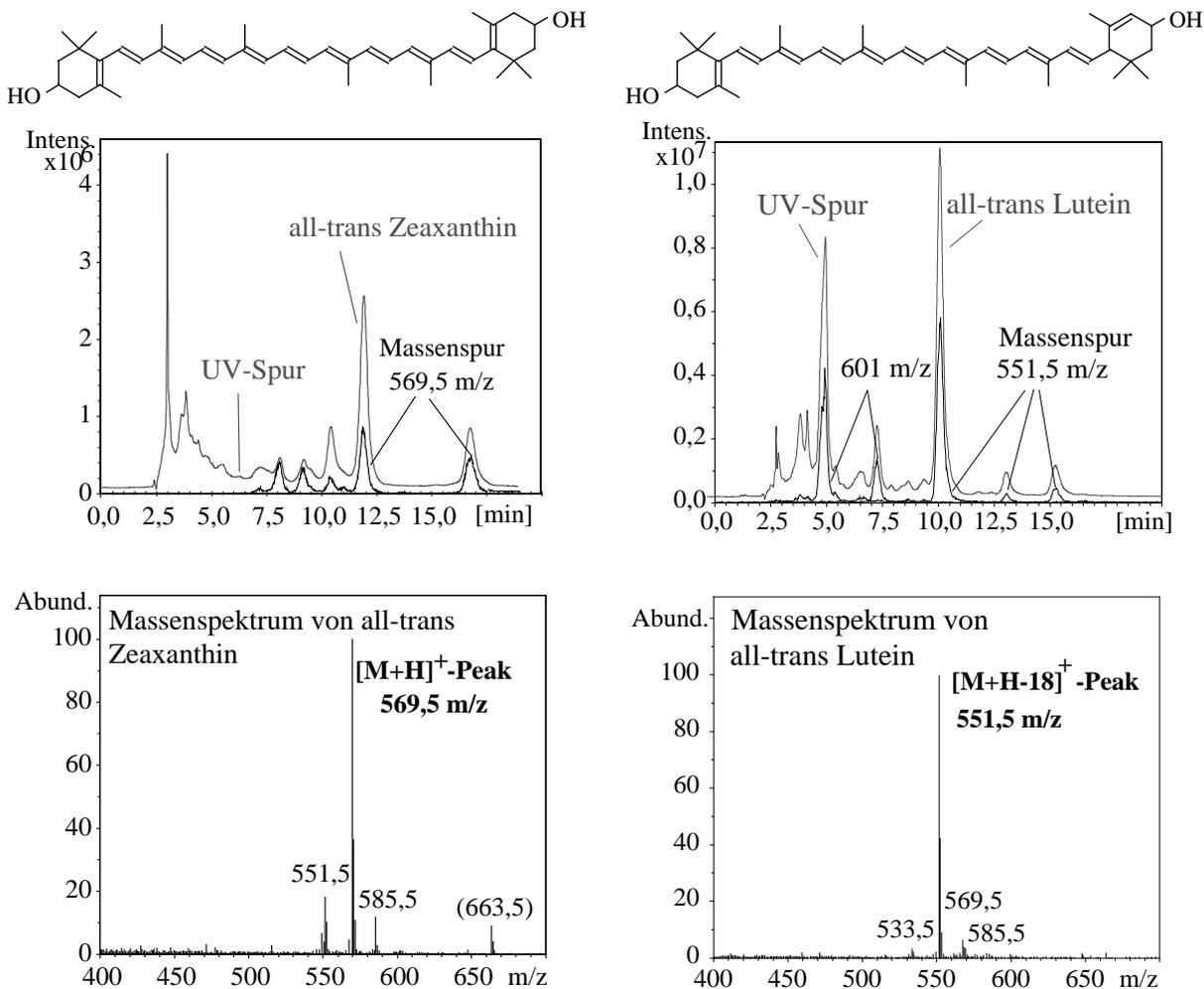


Abb. 28: HPLC-APCI-MS Analyse von Lutein und Zeaxanthin (Massen in Klammern sind systembedingt und enthalten keine Strukturinformation)

In Abbildung 28 sind die UV-Chromatogramme (450 nm) von Zeaxanthin und Lutein sowie die jeweiligen Massenspuren dargestellt. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Carotinoide Lutein und Zeaxanthin und der möglichen Co-Elution von Verunreinigungen, welche in der biologischen Matrix vorhanden sind, ist eine eindeutige Struktur-Identifikation der Carotinoid-Stereoisomere durch die UV/Vis-Absorption des HPLC-Detektors nicht möglich. Mit der HPLC-APCI-MS Kopplung ist eine Identifizierung der strukturähnlichen Xanthophylle Lutein und Zeaxanthin, welche sich nur durch die Stellung einer Doppelbindung im Ionon-Ring unterscheiden, möglich. Zeaxanthin wird bei der protonierten Molekülmasse  $[M+H]^+$  von 569,5 m/z detektiert. Lutein besitzt durch die isolierte Doppelbindung eine allylische Hydroxylgruppe. Nach der Protonierung findet eine spontane Wasserabspaltung statt, wobei das durch Mesomerieeffekte äußert stabile Allylkation entsteht (vgl. Abb. 29). Deshalb werden alle Lutein-Stereoisomere mit der Masse 551,5 m/z  $[M+H-H_2O]^+$  detektiert. Folglich überwiegt bei Lutein im Massenspektrum der Basispeak 551,5 m/z, im Gegensatz zum Zeaxanthin mit einem Basispeak von 569,5 m/z.

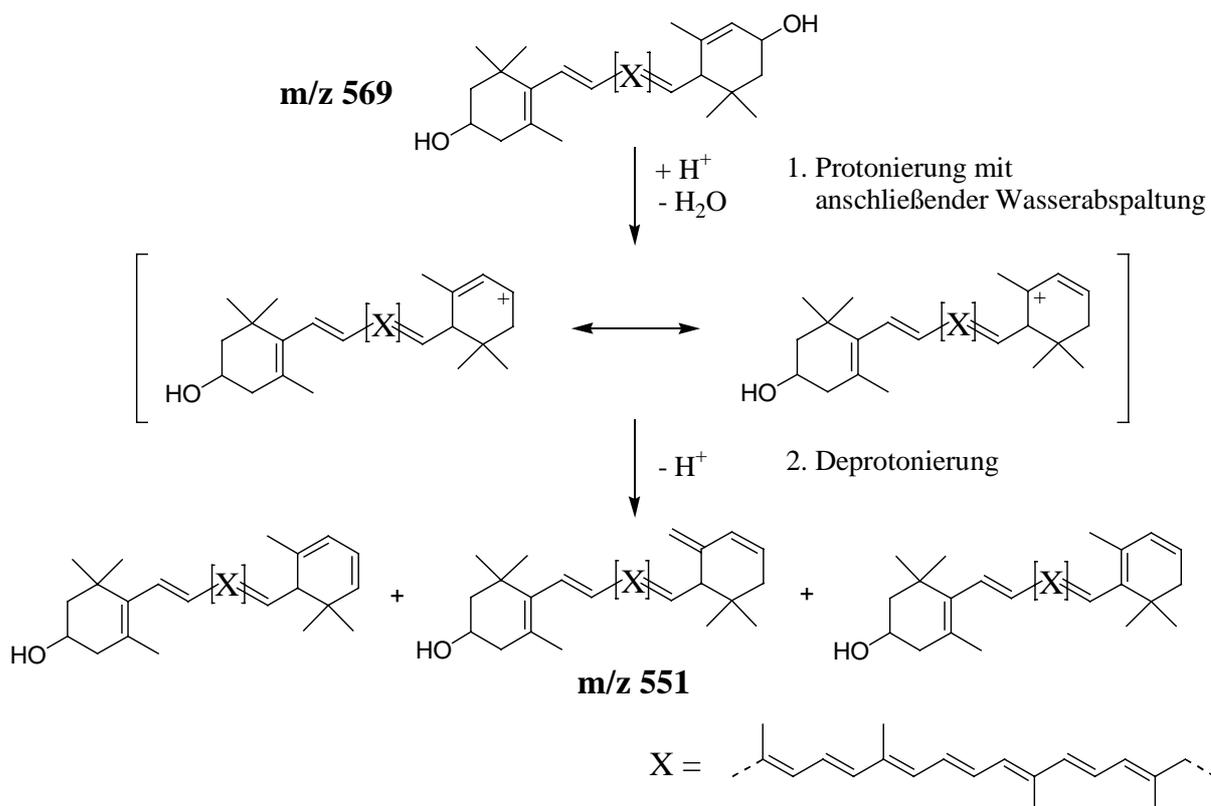


Abb. 29: Fragmentierung von *all-E* Lutein durch Wasserabspaltung

Werden die extrahierten Massenspuren 551,5 m/z und 569,5 m/z mit den UV-Chromatogrammen verglichen, ist eine einfache Unterscheidung zwischen Lutein- und Zeaxanthin-Stereoisomeren möglich.

Die Positiv-Ionen-HPLC-APCI-Massenspektren führen zu einem geringen Fragmentierungs-Pattern, wie am Beispiel der Massenspektren von Zeaxanthin und Lutein in Abbildung 28 gezeigt werden kann. Neben dem protonierten Molekülpeak  $[M+H]^+$  bei 569,5 m/z können für Zeaxanthin folgende charakteristische Artefakte auftreten (in m/z): 585,5  $[M+H+O]^+$ ; 601,5  $[M+H+2*O]^+$ ; 551,5  $[M+H-H_2O]^+$ ; 533,5  $[M+H-2*H_2O]^+$  und 567,5  $[M+H+O-H_2O]^+$ . Für Lutein findet man die gleichen Fragmente, jedoch infolge der spontanen Wasserabspaltung in unterschiedlichen Intensitäten. So zeigt Lutein im Massenspektrum einen Basispeak bei 551,5 m/z. Die Ergebnisse sind in folgendem Fragmentierungsschema zusammengefasst:

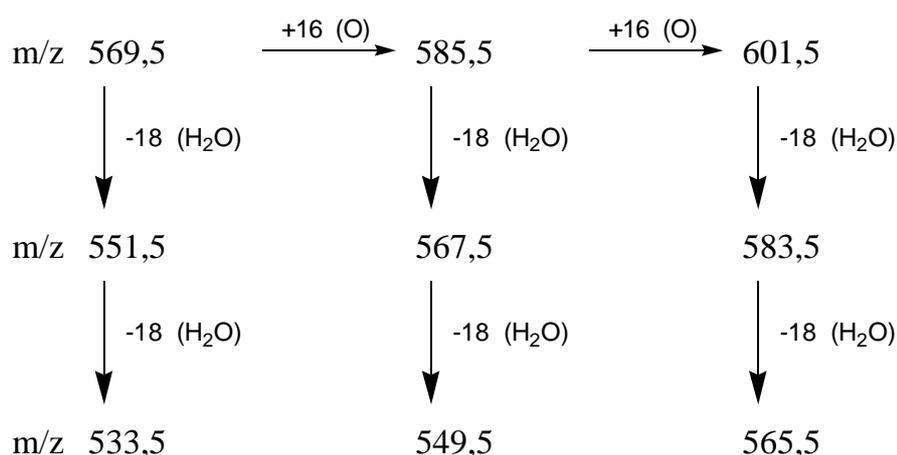


Abb. 30: Fragmentierungsschema für Lutein und Zeaxanthin

Für die Positiv-Ionen-HPLC-APCI-MS-Kopplung wurde das Detektionslimit durch Flow-Injection bestimmt. Die Untersuchungen wurden mit einer Standardsubstanz aus einer nicht isomerisierten all-E Zeaxanthin-Lösung in Chloroform durchgeführt. Es wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt und von jeder Probe jeweils dreimal 3  $\mu\text{l}$  im Abstand von 1,5 min injiziert. Die HPLC-Bedingung war mit einer Flussrate von 1 ml/min und einem Elutionsmittel-Gemisch von Aceton/Wasser 86:14 (v/v) identisch mit den zuvor beschriebenen Versuchen. Aus dem aufgenommen Massenbereich m/z 200-800 wurde die Masse 569,5 m/z, entsprechend dem protonierten Zeaxanthin-Ion  $[M+H]^+$ , extrahiert. Das Detektionslimit bei einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von

3:1 beträgt 1 pmol, was einer Absolutmenge von 0,57 ng Zeaxanthin entspricht. Das beobachtete Detektionslimit ist mit anderen Ergebnissen für Carotinoide im positiven APCI-Modus vergleichbar. Lacker bestimmte ein Detektionslimit für  $\beta$ -Carotin von 1 pmol, van Bremen berichtet von einem Detektionslimit für  $\alpha$ -Carotin von 3 pmol und für Lutein von 13 pmol.<sup>110,111</sup>

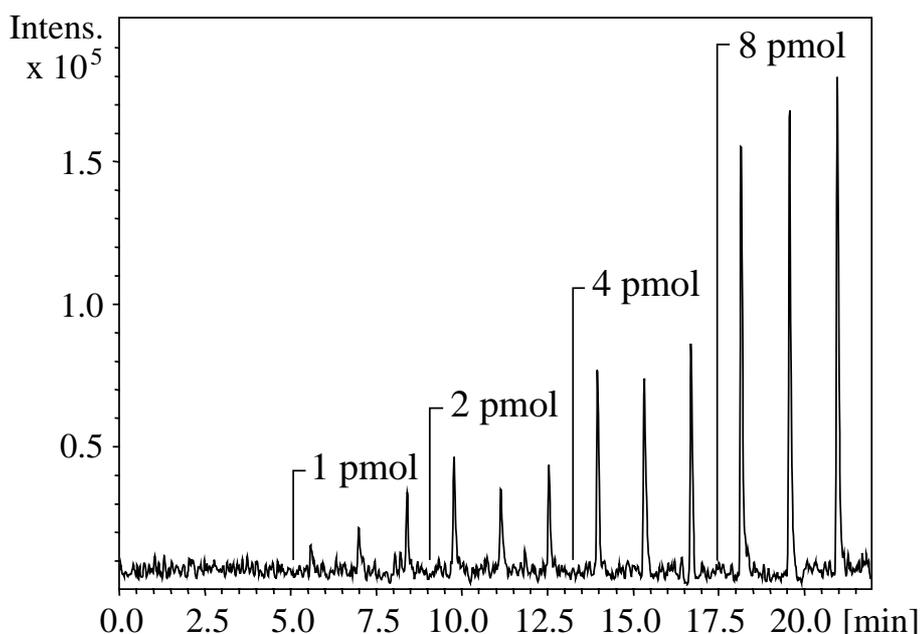


Abb. 31: Detektionslimit von all-E Zeaxanthin im positiven APCI-MS-Modus

In Abbildung 32 ist die HPLC-APCI-MS-Analyse eines Spinatextraktes gezeigt. Das obere Chromatogramm zeigt die UV-Spur bei 450 nm, darunter sind die Massenspuren  $m/z$  551,5 (Lutein), 569,5 (Zeaxanthin) und 537,5 ( $\beta$ -Carotin) abgebildet. Die im positiven Modus aufgenommenen Massenspektren von all-E Lutein, all-E Zeaxanthin und all-E  $\beta$ -Carotin wurden jeweils am Peakmaximum des UV-Chromatogramms herausgeschnitten. Obwohl das all-E-Isomer von Zeaxanthin im UV-Chromatogramm kaum detektierbar ist, zeigt das Massenspektrum einen Basispeak bei 569,5  $m/z$ , welcher dem protonierten Molekül  $[M+H]^+$  zugeordnet werden kann. Andere Fragmentationen sind kaum und nur in geringer Intensität vorhanden. Bei Lutein, das die gleiche Molekülmasse wie Zeaxanthin aufweist, findet aufgrund der im Iononring verschobenen Doppelbindung eine spontane Wasserabspaltung statt (vgl. Abb. 29). Die  $\beta$ -Carotin-Isomere können anhand ihres protonierten Molekülions bei 537,5  $m/z$  detektiert werden.

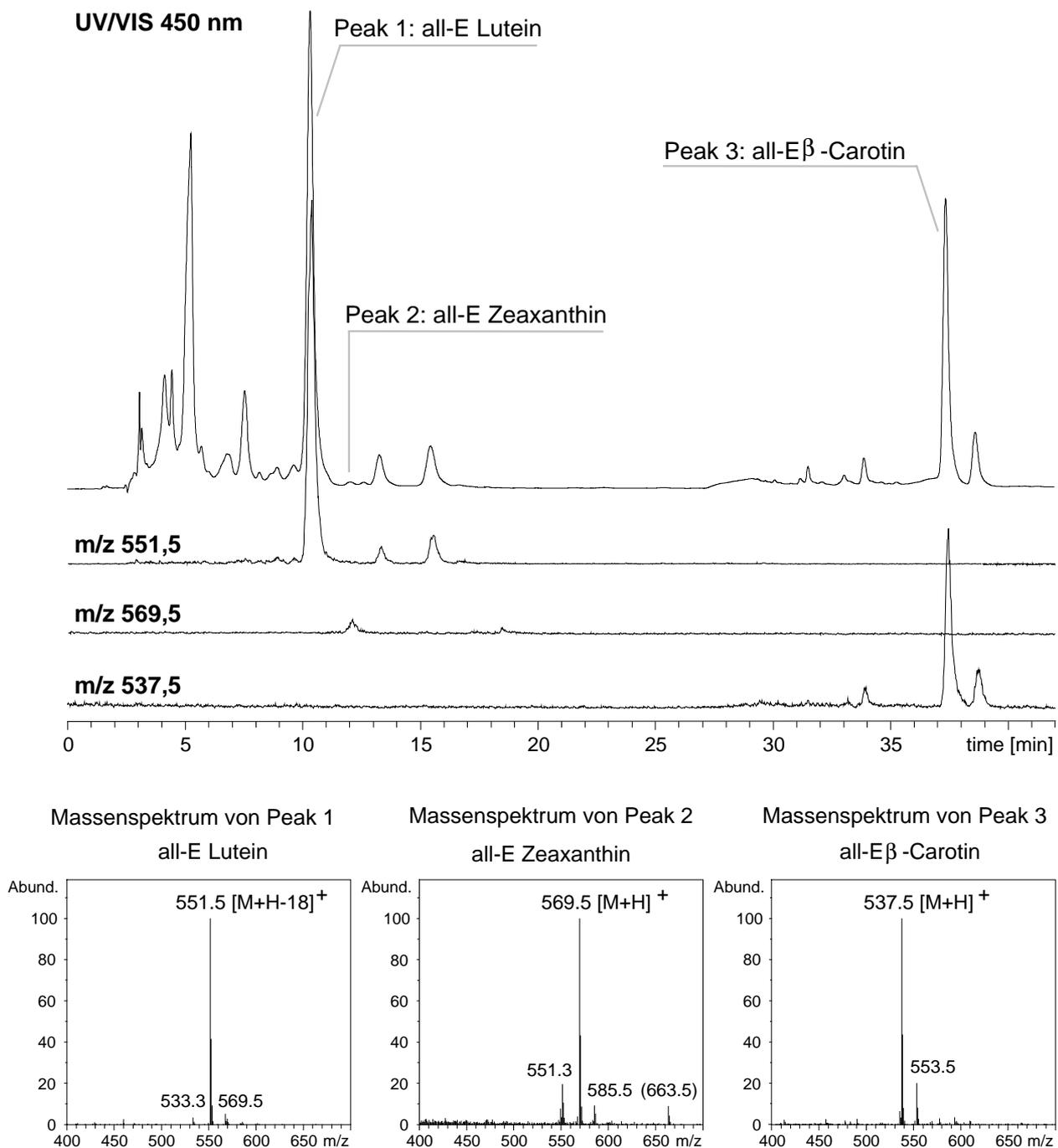


Abb. 32: HPLC-APCI-MS-Untersuchung eines Spinatextraktes:  
UV-Chromatogramm (450 nm) und die Massenspuren  $m/z$  551,5 (Lutein);  
569,5 (Zeaxanthin) und 537,5 ( $\beta$ -Carotin) sowie die Massenspektren der  
Carotinoide am jeweiligen Peak-Maximum des Chromatogramms

Mit der on-line HPLC-APCI-MS-Kopplung wurden die Carotinoide auch am Wirkungsort, im Serum und in der Retina, untersucht. In Abbildung 33 ist das UV-Chromatogramm der aus dem Serum eines Huhnes (20  $\mu$ l) extrahierten Carotinoide, sowie die entsprechenden Massenspuren, dargestellt. Das all-E-Isomer von Zeaxanthin, welches im UV-Chromatogramm bei 15,9 min detektierbar wird, zeigt im Massenspektrum einen Basispeak bei 569,5 m/z, welcher dem protonierten Molekül  $[M+H]^+$  zugeordnet werden kann. Das all-E Lutein zeigt wiederum die charakteristische Wasserabspaltung und wird bei der protonierten Masse m/z 551,5  $[M+H-H_2O]^+$  detektiert.

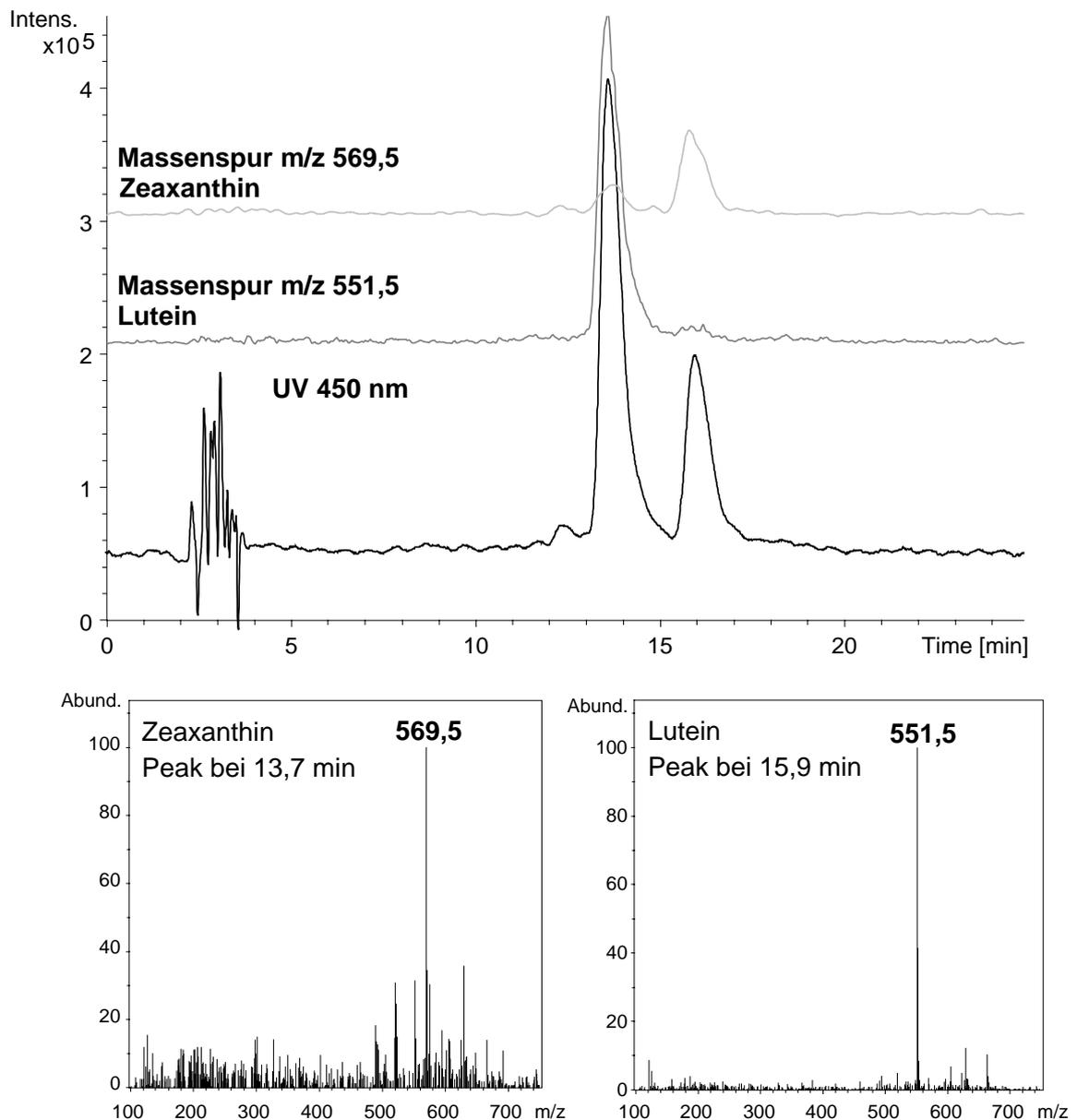


Abb. 33: HPLC-APCI-MS-Analyse der Carotinoide Lutein und Zeaxanthin in Serum eines Huhnes

Analog zum menschlichen Serum (vgl. Abb. 25) findet man ebenfalls ein Lutein zu Zeaxanthin Verhältnis von 2:1. Da in einer Hühnerretina jedoch mehr Zeaxanthin als Lutein gefunden wird (vgl. Kap. 5.1.1), metabolisiert diese Spezies das Carotinoid Lutein offensichtlich mehr zu Zeaxanthin als beispielsweise der Mensch oder das Rind.

Durch einen Vergleich der Massenspuren  $m/z$  551,5 und 569,5 mit der HPLC-Trennung der aus einer menschlichen Retina extrahierten Carotinoide, lassen sich mit einem einzigen chromatographischen Lauf sämtliche Carotinoide eindeutig identifizieren. Dies ist in Abbildung 34 gezeigt. Für dieses Experiment wurden nur 1/10 des Retinaextraktes verwendet.

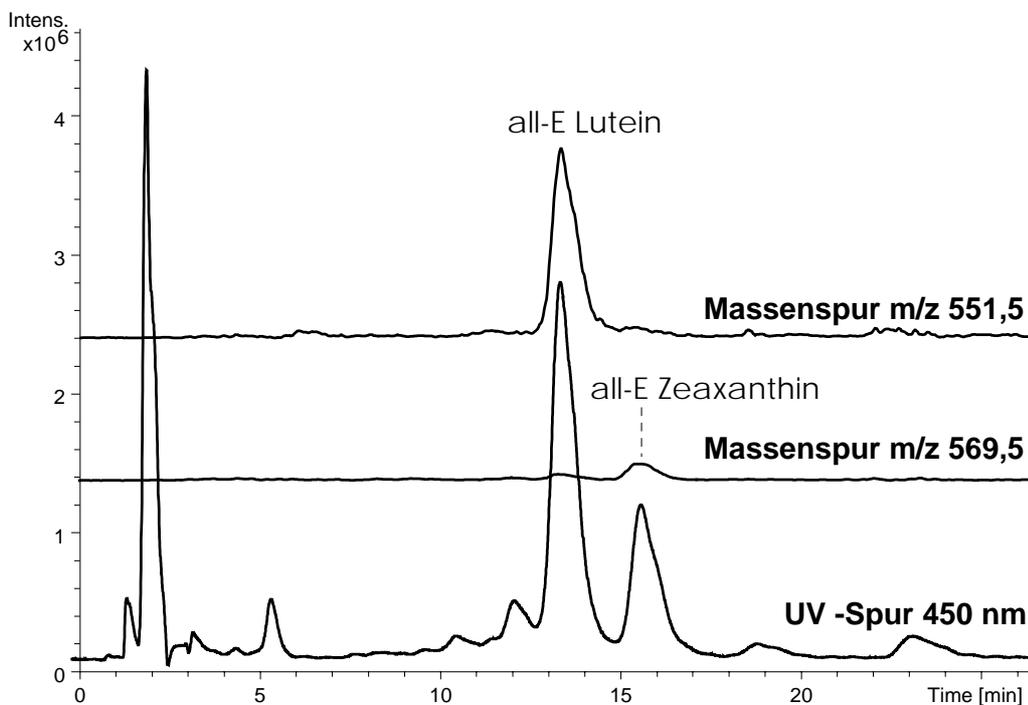


Abb. 34: *On-line HPLC-APCI-MS Analyse von Lutein und Zeaxanthin Stereoisomeren in einer humanen Retina*

Auffallend ist, dass die *Z*-Isomere im UV-Chromatogramm eindeutig zu detektieren sind, während sie sich aus den Massenspuren kaum vom Grundrauschen abheben. Da für die Extraktion eine schnelle und schonende Methode, die Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD), verwendet wurde, um keine Oxidation und Isomerisierung der Carotinoide zuzulassen, wurden die Carotinoide nicht vollständig von der umgebenden Matrix getrennt. Im UV-Chromatogramm werden diese Verunreinigungen nicht analysiert, da sehr selektiv bei 450 nm detektiert wird und somit nur die Carotinoid-

Stereoisomere im Chromatogramm sichtbar sind. Die Verunreinigungen machen sich jedoch in der Ionenfalle des Massenspektrometers bemerkbar. Ist die Ionenfalle mit Fremdionen überfüllt, befinden sich nur noch wenige Analytmoleküle in der Ionenfalle und die Empfindlichkeit wird entsprechend erniedrigt.

Die gezeigten Beispiele der HPLC-APCI-MS-Kopplung zeigen, dass mit dieser Technik in kurzer Zeit verschiedene Carotinoide in unterschiedlichen biologischen Proben identifiziert werden können. Selbst die massengleichen Carotinoide Lutein und Zeaxanthin können mit dieser Methode detektiert und unterschieden werden. Diese Methode versagt jedoch bei der Strukturaufklärung der einzelnen Stereoisomere, da diese ein identisches Fragmentierungsmuster aufweisen. Daher muss die HPLC-APCI-MS-Kopplung mit der on-line HPLC-NMR-Kopplung kombiniert werden, um eine exakte Strukturaufklärung jedes einzelnen Stereoisomeren durchführen zu können.<sup>112</sup>

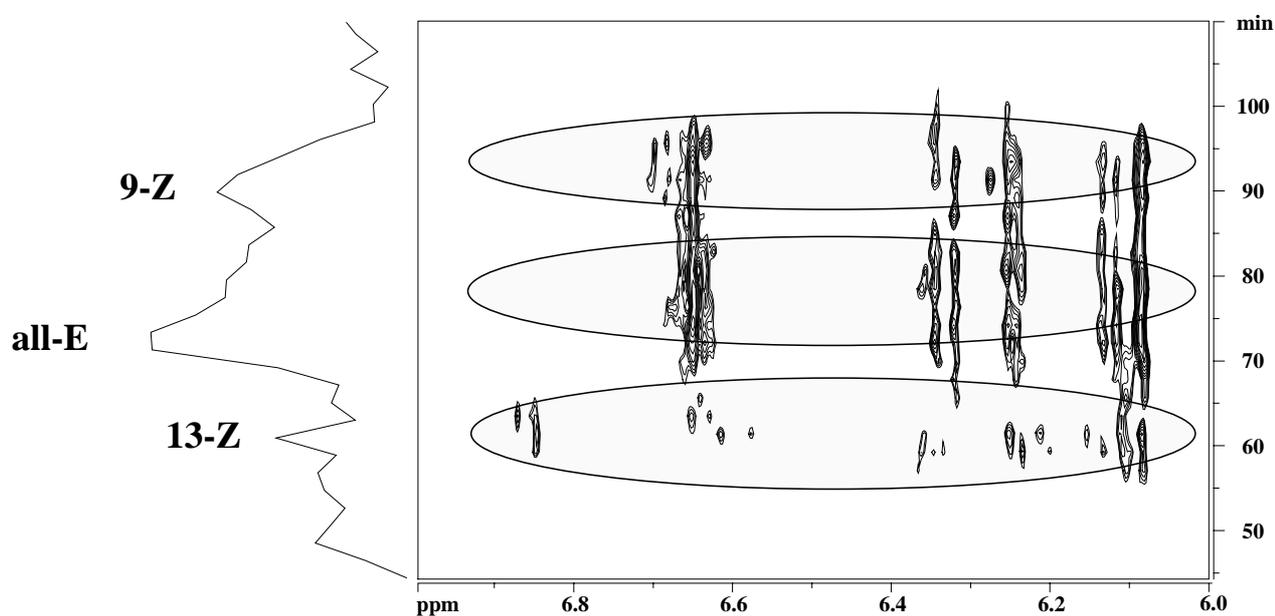
#### 5.1.1.4 HPLC-NMR-Kopplung

Die on-line HPLC-NMR-Kopplung ist noch nicht empfindlich genug, um Substanzen im pmol-Bereich detektieren zu können. Sie ist jedoch die einzige Methode, die eine eindeutige Strukturaufklärung von instabilen Verbindungen, wie den Carotinoid-Stereoisomeren, unter Ausschluss von Licht und Sauerstoff ermöglicht. Durch den Einsatz der hochselektiven C<sub>30</sub>-Phasen mit ihrer hohen Beladungskapazität kann der Nachteil der geringen Empfindlichkeit der on-line HPLC-NMR-Kopplung deutlich minimiert werden.

Alle on-line HPLC-NMR-Kopplungsexperimente wurden an einem Bruker AMX 600 NMR-Spektrometer durchgeführt. Es wurde ein inverser Durchflussprobenkopf mit einem Detektionsvolumen von 120 µl verwendet. Die Lösungsmittelsignale wurden durch Vorsättigung mittels sog. Shaped-Pulse (mit einem Rechteck-Anregungsprofil) unterdrückt.

Der Kontur-Plot eines continuous-flow HPLC-NMR-Experiments in Abbildung 35 zeigt die Trennung der Hauptstereoisomere von Zeaxanthin. Das Isomeren-Gemisch wurde durch Isomerisierung von all-E Zeaxanthin unter dem Einfluss von natürlichem Licht erhalten. Bei einem on-line continuous-flow HPLC-NMR-Experiment können aufgrund der begrenzten Verweilzeit der Probe in der NMR-Flusszelle (120 µl) maximal 128 Scans pro Reihe aufgenommen werden. Daraus ergibt sich eine zeitliche

Auflösung von 2,5 min. Trotz der geringeren Zeitauflösung im Vergleich zu einem UV-Chromatogramm, ist eine Trennung der einzelnen Isomere erkennbar. Mit dieser zweidimensionalen Technik ist es also möglich, Komponenten mit einer geringen Konzentration, die nicht basisliniengetrennt sind, zu detektieren. Dies ist eindrucksvoll im continuous-flow 2D-Plot dargestellt. Neben der Retentionszeit erhält man die vollständige Strukturinformation jeder Komponente aufgrund der zusätzlichen Information der chemischen Verschiebungswerte. Mit einem chromatographischen Lauf kann somit die Struktur jedes einzelnen Stereoisomeren aufgeklärt werden. Dadurch eignet sich diese Methode aufgrund des geringen Zeitbedarfs insbesondere auch für das Screening von Pharmaka. Die Menge an 13-Z Zeaxanthin entspricht



ungefähr 10 % aller Isomere und wurde zu  $24 \mu\text{g}$  berechnet.<sup>113</sup>

Abb. 35:  $^1\text{H}$  NMR Chromatogramm (600 MHz, Kontur-Plot) der HPLC-Trennung von Zeaxanthin-Stereoisomeren

Abbildung 36 zeigt die olefinischen Regionen der stopped-flow- $^1\text{H}$  NMR Spektren der einzelnen Zeaxanthin Stereoisomere aus der Trennung des Stereoisomeren-Gemisches. Im Gegensatz zu dem continuous-flow Spektrum können stopped-flow Spektren bei einer maximalen Peak-Konzentration gemessen und mehr Scans akkumuliert werden. Somit wird ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis erreicht bzw. die Empfindlichkeit gesteigert. So wurde für das stopped-flow Experiment eine Gesamtmenge von  $0,8 \mu\text{g}$  für das 13-Z Zeaxanthin berechnet.

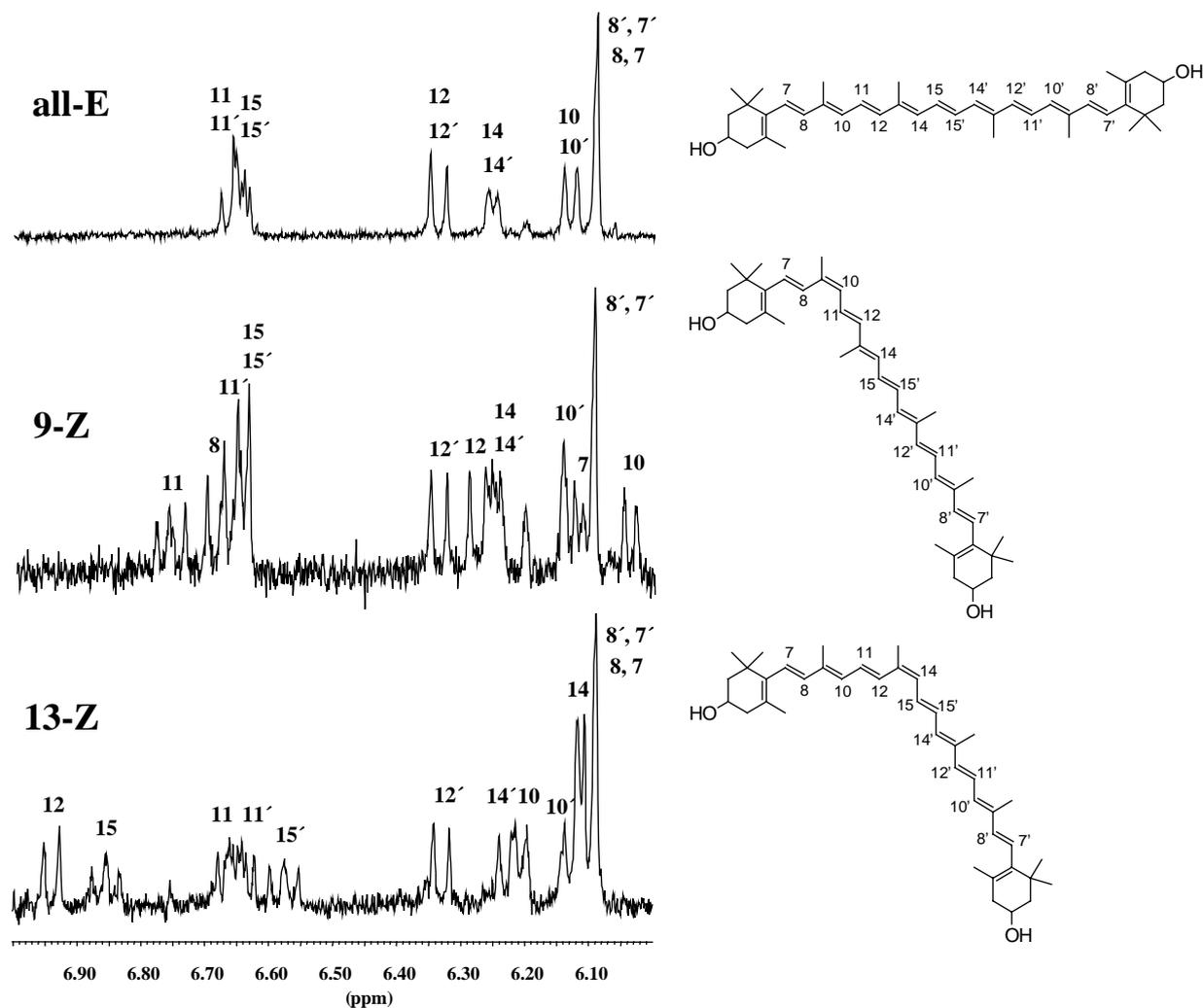


Abb. 36: Stopped-flow  $^1\text{H}$  NMR Spektren (600 MHz, olefinische Region) von all-E, 9-Z und 13-Z Zeaxanthin.

Im Vergleich zum all-E Stereoisomer ist die Zentrosymmetrie bei den Z-Stereoisomeren aufgehoben. Durch die unterschiedliche chemische Umgebung in der Nähe der *cis*-Bindung ergeben sich für die gestrichelten und ungestrichelten Protonen unterschiedliche Resonanzfrequenzen.

Die Zuordnung von Z/E-Isomeren ist nach Karplus im allgemeinen über den Unterschied der Kopplungskonstanten von 14–16 Hz für *trans*-ständige Protonen und 11–12 Hz für *cis*-ständige Protonen möglich. Bei konjugierten olefinischen Systemen sind jedoch die Änderungen der chemischen Verschiebung  $\delta$  in den meisten Fällen aussagekräftiger. Sie können bis zu 0,6 ppm betragen. Die  $\delta$ -Werte der „äußeren“ Protonen erfahren im allgemeinen eine Hochfeldverschiebung, während die „inneren“ Protonen zu tieferem Feld verschoben werden.

In folgender Tabelle sind die chemischen Verschiebungswerte  $\delta$  der olefinischen Protonen aller Hauptstereoisomere von Lutein und Zeaxanthin zusammengefasst:

Proton	Zeaxanthin			Lutein				
	all-E	13-Z	9-Z	all-E	13-Z	13'-Z	9-Z	9'-Z
H-4'	-	-	-	5.54	5.54	5.54	5.52	5.52
H-7	6.09	6.09	6.13	6.08	6.10	6.10	6.11	6.10
H-7'	6.09	6.09	6.09	5.43	5.43	5.43	5.43	5.46
H-8	6.10	6.10	6.68	6.15	6.12	6.12	6.68	6.10
H-8'	6.10	6.10	6.10	6.13	6.13	6.13	6.09	6.68
H-10	6.14	6.21	6.04	6.13	6.21	6.13	5.98	6.13
H-10'	6.14	6.13	6.14	6.15	6.13	6.21	6.14	6.03
H-11	6.67	6.66	6.75	6.64	6.64	6.64	6.76	6.64
H-11'	6.67	6.64	6.66	6.64	6.64	6.64	6.65	6.76
H-12	6.34	6.94	6.28	6.34	6.90	6.34	6.26	6.33
H-12'	6.34	6.33	6.33	6.34	6.34	6.91	6.33	6.28
H-14	6.24	6.11	6.25	6.23	6.12	6.24	6.24	6.24
H-14'	6.24	6.23	6.25	6.23	6.24	6.14	6.24	6.24
H-15	6.63	6.85	6.63	6.65	6.82	6.58	6.64	6.64
H-15'	6.63	6.58	6.63	6.65	6.58	6.82	6.64	6.64

Tabelle 1:  $^1\text{H}$  NMR Verschiebungswerte  $\delta$  (in ppm) für die Hauptstereoisomere von Lutein und Zeaxanthin

Wie in Abbildung 36 gezeigt sind die Protonen H-12 ( $\delta = 6,94$  ppm,  $\Delta\delta = 0,6$  ppm) und H-15 ( $\delta = 6,85$  ppm,  $\Delta\delta = 0,2$  ppm) von 13-Z Zeaxanthin tieffeldverschoben, während Proton H-14 ( $\delta = 6,11$  ppm,  $\Delta\delta = 0,1$  ppm) sich zu höherem Feld verschiebt. Die Protonen H-10 und H-15' weisen ebenfalls einen geringen Einfluss von etwa  $\Delta\delta = 0,05$  ppm auf. Die restlichen Protonen besitzen die gleichen Verschiebungswerte

wie all-E Zeaxanthin und die *cis*-Bindung besitzt keinen Einfluss mehr. Analoge Effekte tauchen auch beim 9-Z Zeaxanthin auf. Die *cis*-Bindung hat keinen Einfluss auf die gestrichenen Protonen und nur die ungestrichenen Protonen erfahren eine unterschiedliche chemische Verschiebung. So sind die Protonen H-8 ( $\delta = 6,68$  ppm,  $\Delta\delta = 0,42$  ppm) und H-11 ( $\delta = 6,75$  ppm,  $\Delta\delta = 0,11$  ppm) tieffeldverschoben, während sich Proton H-10 ( $\delta = 6,04$  ppm,  $\Delta\delta = 0,1$  ppm) zu höherem Feld verschiebt. Geringe Unterschiede in der chemischen Verschiebung ergeben sich auch noch für die Protonen H-7 und H-12.

Die Aufnahme von zweidimensionalen NMR-Spektren hat den Vorteil, dass neben der Information der chemischen Verschiebungswerte  $\delta$  auch das Kopplungsmuster von jedem Proton erhalten wird.

Abbildung 37 zeigt das stopped-flow COSY Spektrum von 9-Z Zeaxanthin. Das gesamte Kopplungsmuster aller olefinischen Protonen ist aufgezeigt. Das Proton H-11' besitzt zwei magnetisch nicht äquivalente Protonen (H-10' und H-12') in direkter Nachbarschaft und somit 2 unterschiedliche Kopplungspartner. H-15' koppelt mit H-14', H-7' mit H-8'. Analoge Kopplungsmuster werden auch für die ungestrichenen Protonen erhalten, wobei aber die chemischen Verschiebungswerte  $\delta$  aufgrund der *cis*-Bindung unterschiedlich sind.

Das stopped-flow COSY Spektrum von all-E Lutein, welches aus Spinat extrahiert wurde, ist in Abbildung 38 gezeigt. Die Menge an all-E Lutein in der NMR-Detektionszelle betrug für dieses Spektrum 3  $\mu\text{g}$ . Lutein besitzt 2 unterschiedliche Iononringe und ist somit unsymmetrisch. Dies kann anhand des COSY Spektrums veranschaulicht werden. Durch die Verschiebung der Doppelbindung in einem Iononring ist das Proton H-7' ( $\delta = 5,43$  ppm,  $\Delta\delta = 0,65$  ppm) hochfeldverschoben, da das aliphatische Proton H-6' benachbart ist. Das olefinische Proton H-7 besitzt dagegen eine chemische Verschiebung von  $\delta = 6,09$  ppm. Eine weitere Konsequenz dieser Verschiebung der Doppelbindung im Lutein ist das Auftreten eines zusätzlichen olefinischen Protons H-4' bei  $\delta = 5,54$  ppm. Dadurch ist eine einfache Unterscheidung der Zeaxanthin- und Lutein-Stereoisomere gegeben.

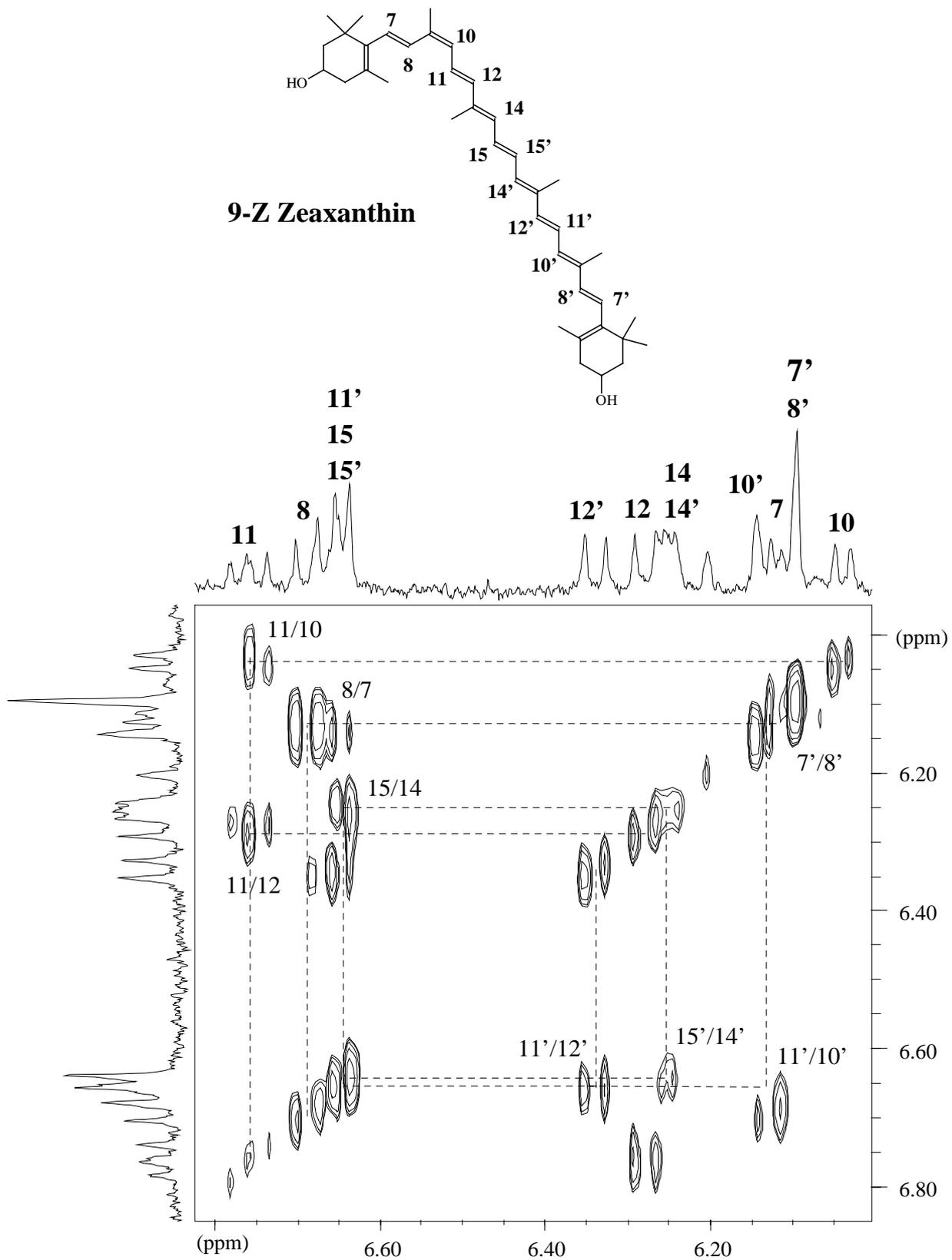


Abb. 37: Stopped-flow COSY Spektrum (600 MHz, olefinische Region) von 9-Z-Zeaxanthin

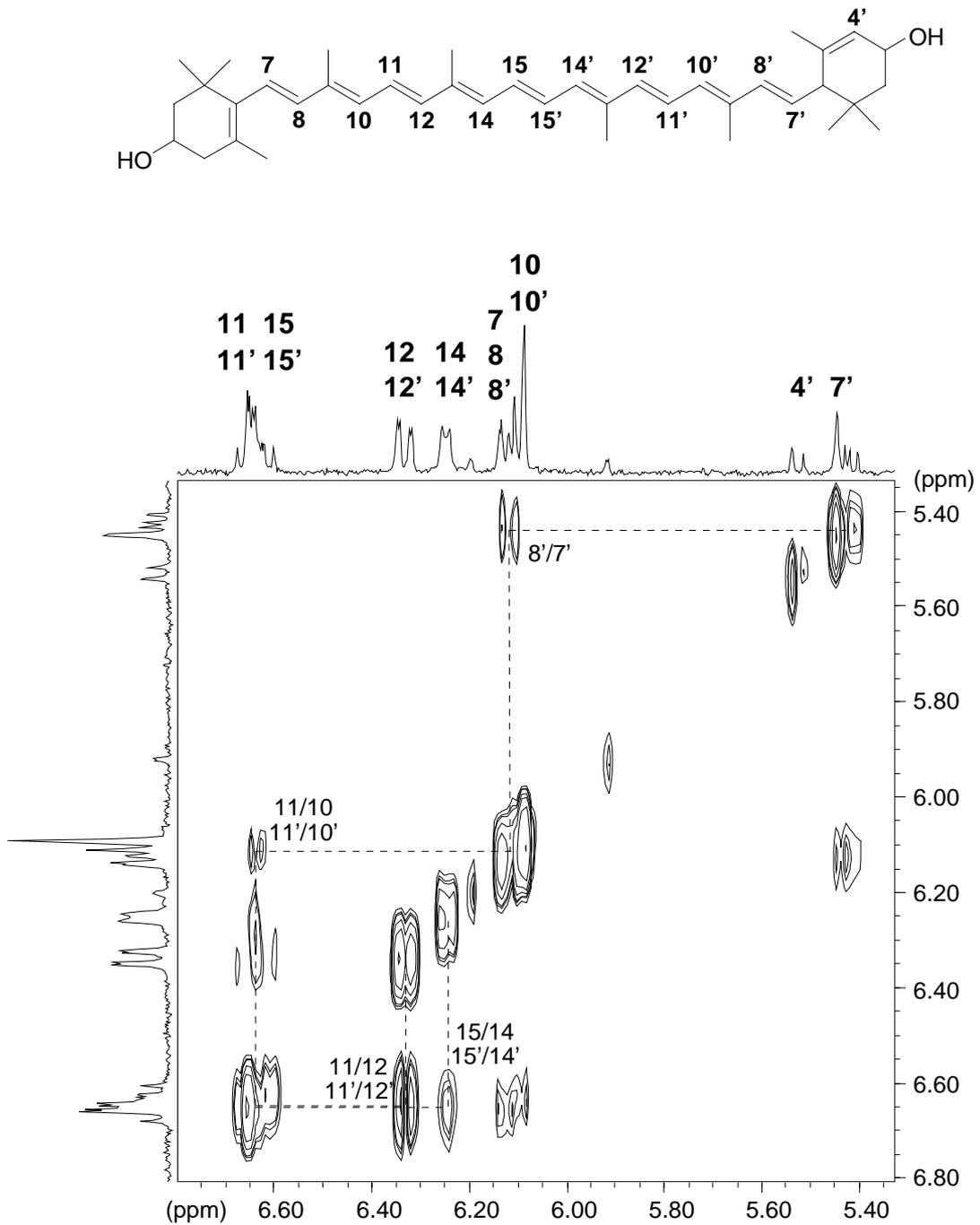


Abb. 38: Stopped-flow COSY Spektrum (600 MHz, olefinische Region) von all-E Lutein aus einem Spinatextrakt

## 5.1.2 Bixin

Der Einnahme von Urucum als Tee-Aufguss wird eine gesundheitsfördernde Wirkung zugeschrieben. Aufgrund der Wasserlöslichkeit des Bixins ist dieser biomedizinische Inhaltsstoff besonders leicht bioverfügbar. So reduziert das tägliche Trinken eines Glas Wassers, in dem etwa 25 Urucum-Samenkörner gelöst sind, den Cholesterin- und Triglyceridgehalt im Blut. Im folgenden sollen die Hauptkomponenten dieses Extraktes getrennt und mit Hilfe der on-line HPLC-NMR-Kopplung identifiziert werden.

### 5.1.2.1 Chromatographische Bedingungen

Natürliches vorkommendes Bixin ( $\alpha$ -Bixin) tritt häufig zusammen mit seinen Z/E-Stereoisomeren auf. Mit einer C<sub>30</sub>-Säule können diese mit einer hohen Selektivität getrennt werden, wie die UV-Chromatogramme (460 nm) in Abbildung 39 bewiesen.

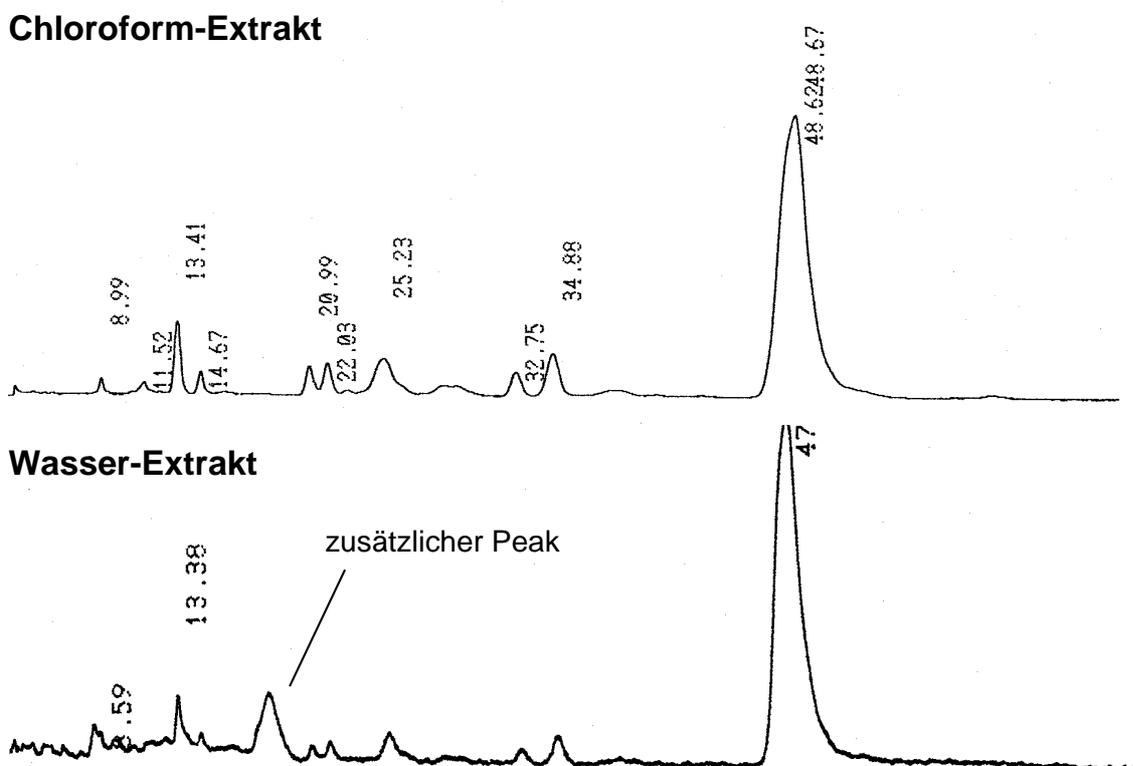


Abb. 39: Vergleich der HPLC-Chromatogramme (460 nm) zweier Urucum-Extrakte (CHCl<sub>3</sub> und H<sub>2</sub>O)

Für die gezeigten Chromatogramme wurden jeweils 5 Urucum-Samenkörner in 1 ml Chloroform bzw. Wasser gelöst und über Nacht im Dunkeln stehen gelassen. Von den gefilterten Lösungen wurden jeweils 2  $\mu\text{l}$  in die HPLC-Anlage injiziert. Die einzelnen Bixin-Stereoisomere können mit einem Eluentengemisch von Aceton/H<sub>2</sub>O 80:20 (v/v) und einer Flussrate von 1 ml/min basisliniengetrennt werden.

Wie man aus dem Vergleich der Chromatogramme deutlich erkennen kann, sind alle Bixin-Stereoisomere sowohl in Chloroform als auch in Wasser löslich. Allerdings taucht im Wasser-Extrakt noch ein zusätzlicher Peak bei 18,1 min auf. Möglicherweise kommt dieser zusätzlich extrahierten Verbindung eine besondere biomedizinische Bedeutung zu und ist für die Senkung des Cholesterinspiegels im Blut mitverantwortlich.

#### 5.1.2.2 HPLC-NMR-Kopplung

Um die Struktur dieser instabilen Verbindungen aufklären zu können, muss die Chromatographie direkt mit einem NMR-Spektrometer gekoppelt werden. Dadurch wird gewährleistet, dass die licht- und sauerstoffempfindlichen Isomere während der Analyse nicht zerstört werden. Die on-line HPLC-MS-Kopplung kann für diese analytische Fragestellung nicht verwendet werden, da die Bixin-Stereoisomere die gleiche Masse und Fragmentierung aufweisen und somit ihre Identifizierung mit dieser Analysetechnik nicht möglich ist.

In Abbildung 40 ist der olefinische Teil eines stopped-flow TOCSY-Spektrums der Hauptkomponente  $\alpha$ -Bixin (Peak bei 48,6 min) dargestellt. Zudem sind sämtliche Protonen-Kopplungen angegeben. Durch die Bestimmung der Konnektivitäten können alle Protonen eindeutig zugeordnet werden. Interessant ist die sehr starke Tieffeldverschiebung von Proton H-18 bei  $\delta = 7,91$  ppm. Dies liegt zum einen an der Estergruppe, wird aber auch durch die *cis*-Bindung hervorgerufen. So ist auch Proton H-15 bei  $\delta = 6,86$  ppm tieffeldverschoben, während das „äußere Proton“ H-16 ( $\delta = 6,39$  ppm) der *cis*-Bindung bei höherem Feld anzutreffen ist.

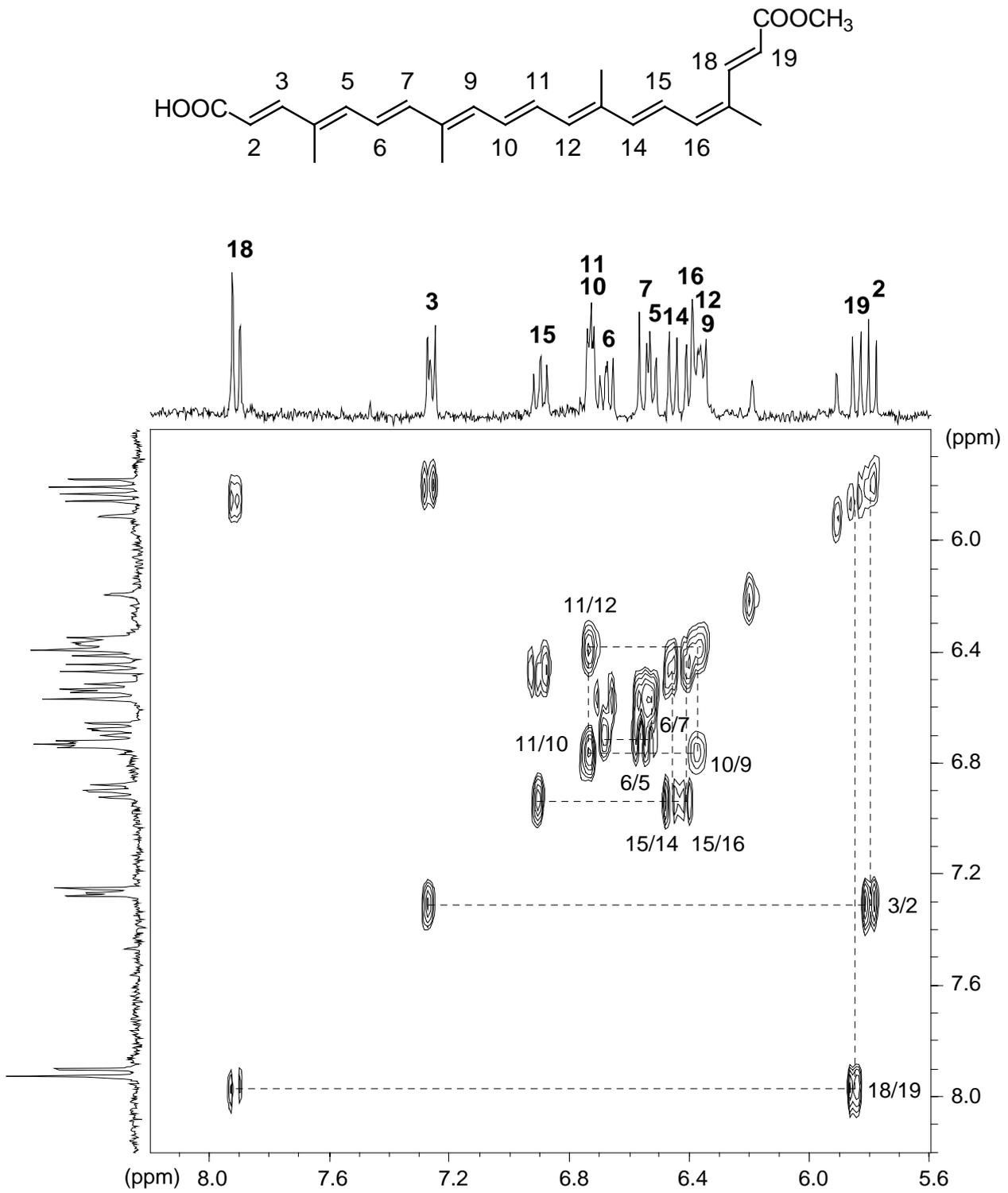


Abb. 40: Stopped-flow TOCSY-Spektrum (600 MHz, olefinische Protonen) von  $\alpha$ -Bixin

## 5.2 Tocopherole

Eine sehr intensiv diskutierte Fragestellung ist, ob durch Zufuhr von Vitamin E, besonders in Kombination mit Carotinoiden und Ascorbinsäure, die Schädigung biologischer Strukturen durch oxidativen Stress verringert werden kann. Von besonderem Interesse ist hierbei, in wie weit Vitamin E durch exogene Zufuhr im Körper resorbiert werden kann.

Hintergrund folgender analytischen Studien ist, ob sich durch zahnhygienische Pflege mit einer Vitamin E-haltigen Zahnpasta, eine Anreicherung von Vitamin E im gingivalen Gewebe möglich ist. Hierfür wurde eine Zahnpasta verwendet, die 0,2 % Tocopherolacetat enthält.

### 5.2.1 Extraktionsverfahren

In Voruntersuchungen wurden die verschiedenen vorgestellten Extraktionsmethoden LLE, on-line SPE und MSPD auf die Anwendbarkeit für diese spezielle Fragestellung überprüft und die Wiederfindungsrate des in der Zahnpasta zugesetzten Tocopherolacetats bestimmt. Hierfür wurde 1 g Zahnpasta mit entsprechender Menge Speichel vermischt, um die gleichen Verhältnisse zu erreichen, wie sie im Mundraum beim Zähneputzen vorherrschen.

Die LLE mit Methanol führt zu sehr guten Wiederfindungsraten (> 95 %). Problematisch wirkt sich aber der in der Zahnpasta enthaltene Gelbildner aus, der durch Zugabe von Methanol flockig ausfällt und abfiltriert werden muss. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist der nicht abgetrennte Speichel, der bei der nachfolgenden Chromatographie auf der HPLC-Säule retardiert und diese langfristig unbrauchbar macht.

Die folgende Abbildung verdeutlicht die Korrelation zwischen der Wiederfindungsrate an Tocopherolacetat und dem Verhältnis Methanol zu Speichel in der Probe. Erst wenn mindestens 80 % Methanol in der Probe für die Extraktion zur Verfügung stehen, werden adequate Wiederfindungsraten erreicht. Bei 1 g Zahnpaste vermischt mit 1 ml Speichel, sind also etwa 10 ml Methanol notwendig.

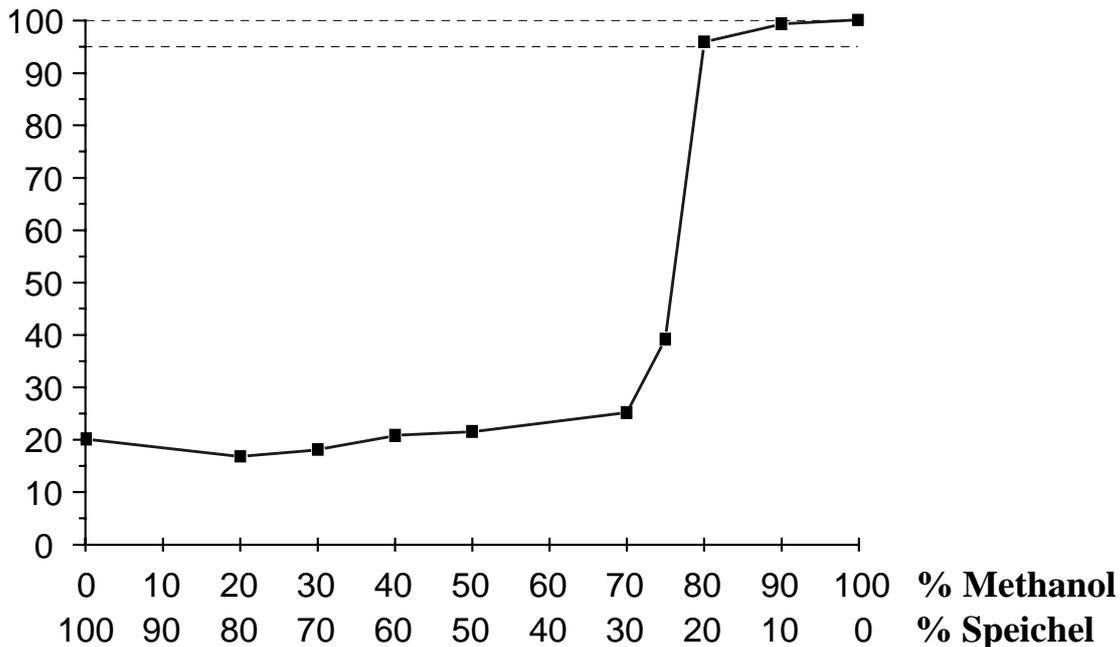
**Wiederfindungsrate [%]**

Abb. 41: Wiederfindungsraten bei der Flüssig-flüssig-Extraktion (LLE) von verschiedenen Zahnpasta/Speichel-Mischungen mit Methanol

Durch den Einsatz eines mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmittels (Chloroform, Hexan, Diethylether) wird der Speichel durch Ausschütteln in die wässrige Phase überführt. Mit Hexan oder Diethylether werden Wiederfindungsraten von über 95 % erhalten und die unlöslichen Partikel befinden sich in der wässrigen Phase. Chloroform ist ungeeignet, weil es als Lösungsmittel mit der höheren Dichte alle störenden, unlöslichen Partikel beinhaltet. Von Nachteil bei der LLE wirken sich auch die Schaum- und Emulsionsbildung aus, so dass die Mischung zentrifugiert werden muss.

Der große Vorteil der on-line SPE ist, dass die gesamte Zahnpaste/Speichel-Probe direkt auf eine Anreicherungskartusche aufgebracht werden kann. Es ist nur ein geringes Lösungsmittelvolumen notwendig und der langwierige Prozess der Lösungsmittel-Einengung entfällt. Das Vitamin E kann direkt auf der Kartusche angereichert werden und in einem clean-up Schritt weiter aufgereinigt werden. Nachteilig wirkt sich jedoch die limitierende und nicht genau bekannte Kartuschenkapazität aus, so dass Probleme bei der Reproduzierbarkeit auftreten und Wiederfindungsraten zwischen 80-100 % erhalten werden.

Bei der MSPD wurde 200 mg Zahnpasta/Speichel-Mischung mit 1 g C<sub>30</sub>-Sorbensmaterial (25-40 µm) verrieben. Das homogenisierte Material wurde in eine SPE-Säule gefüllt. Nach der Konditionierung mit Wasser wurde das Tocopherolacetat mit Methanol extrahiert. Die Wiederfindungsrate betrug 90 %. Ist zu viel Speichel vorhanden (> 1 ml) versagt diese Methodik. Für die Untersuchung der Zahnfleischproben ist jedoch die MSPD die Methode der Wahl, da die feste biologische Matrix direkt verwendet werden kann und die MSPD somit die schnellste und effizienteste Extraktionstechnik darstellt.

### 5.2.2 Chromatographischen Bedingungen

Für die HPLC-Trennung der Tocopherol-Homologen aus Zahnpasta wurde eine ProntoSil C<sub>30</sub>-Säule (3 µm, 200 Å) verwendet. Abbildung 42 zeigt das UV-Chromatogramm (285 nm) der einzelnen Tocopherole in der Zahnpasta bei einer mobilen Phase von 100 % Methanol und einem Fluss von 1 ml/min.

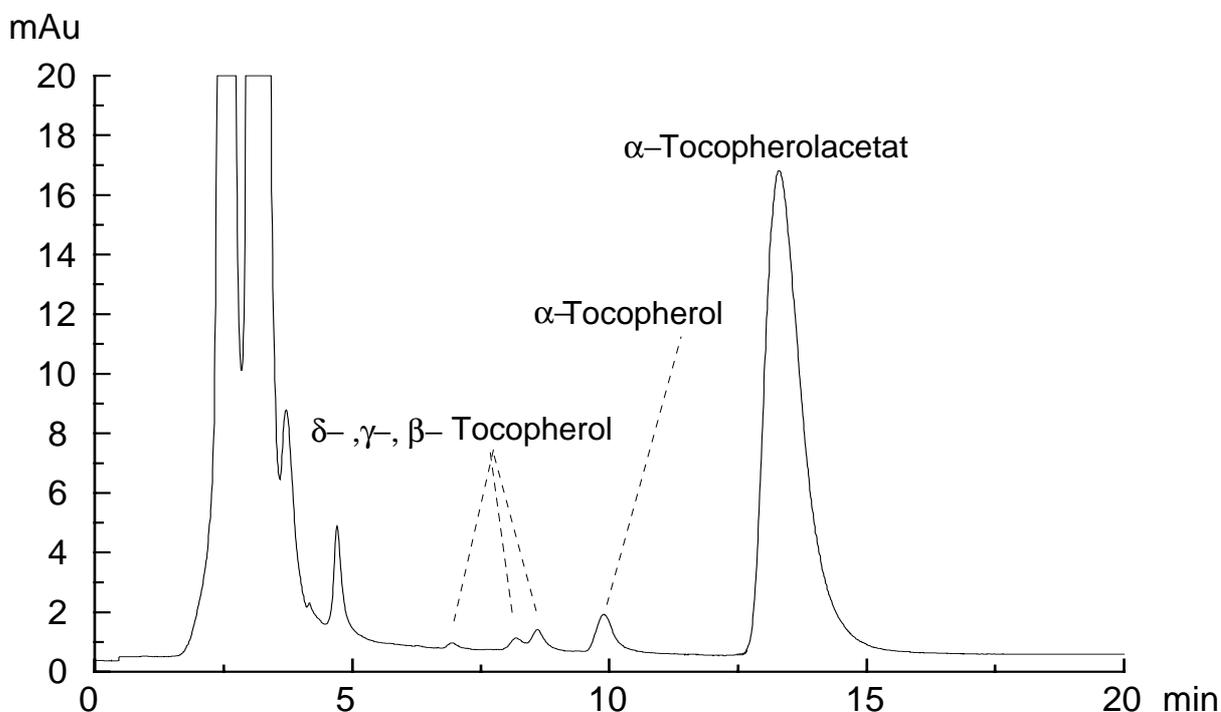


Abb. 42: HPLC-Trennung der aus Zahnpasta extrahierten Tocopherol-Homologe

Durch Aufnahme von Kalibrierkurven konnte die genaue Zusammensetzung der Tocopherol-Isomere in der Zahnpasta bestimmt werden. So können neben dem Hauptpeak von  $\alpha$ -Tocopherolacetat (96,4 %) auch  $\alpha$ -Tocopherol (2,1 %),  $\beta$ -Tocopherol (0,8 %),  $\gamma$ -Tocopherol (0,5 %) und  $\delta$ -Tocopherol (0,2 %) in der Zahnpasta nachgewiesen werden.

Die Zuordnung aller Peaks eines chromatographischen Laufes ist mit Hilfe der kombinierten Analysemethoden von online HPLC-MS- und HPLC-NMR-Kopplung möglich.

### 5.2.3 HPLC-APCI-MS-Kopplung

Die Ionisierung von unpolaren Verbindungen mittels on-line HPLC-ESI-MS-Kopplung gelingt in vielen Fällen nur durch die Zugabe von Additiven, z.B. Silber-Salzen, die den Ionisationsprozess erleichtern. Die HPLC-APCI-MS-Kopplung bietet die Möglichkeit, derartige Verbindungen ohne den Zusatz von Additiven zu analysieren. Analog zu den Carotinoid-Stereoisomeren wurden daher die Tocopherol-Homologe auch mit Hilfe der APCI-Massenspektrometrie untersucht.

Abbildung 43 zeigt neben dem UV-Chromatogramm (285 nm) die gleichzeitige Aufnahme der  $T_{\max}$ -Spur. Hierbei werden zu jedem Zeitpunkt nur diejenigen Ionen registriert, deren  $m/z$ -Wert die größte Intensität aufweist. Diese Analysemethode ist im Vergleich zum Totalionenstrom-Chromatogramm (TIC), bei der zu jeder Zeit die Gesamtzahl aller durch den Analysator tretenden Ionen registriert werden, wesentlich selektiver. Die Trennung wurde mit 100 % Methanol bei einem Fluss von 1 ml/min durchgeführt. Aus dem Vergleich der UV-Spur mit der  $T_{\max}$ -Spur wird deutlich, dass die HPLC-MS-Analytik für eine sensitive Detektion des  $\alpha$ -Tocopherolacetats, welches in der Zahnpasta vorherrschend ist (vgl. Abb. 42), einsetzbar ist. Zudem ist  $\alpha$ -Tocopherolacetat aufgrund der polaren Acetat-Gruppe leicht zu ionisieren.

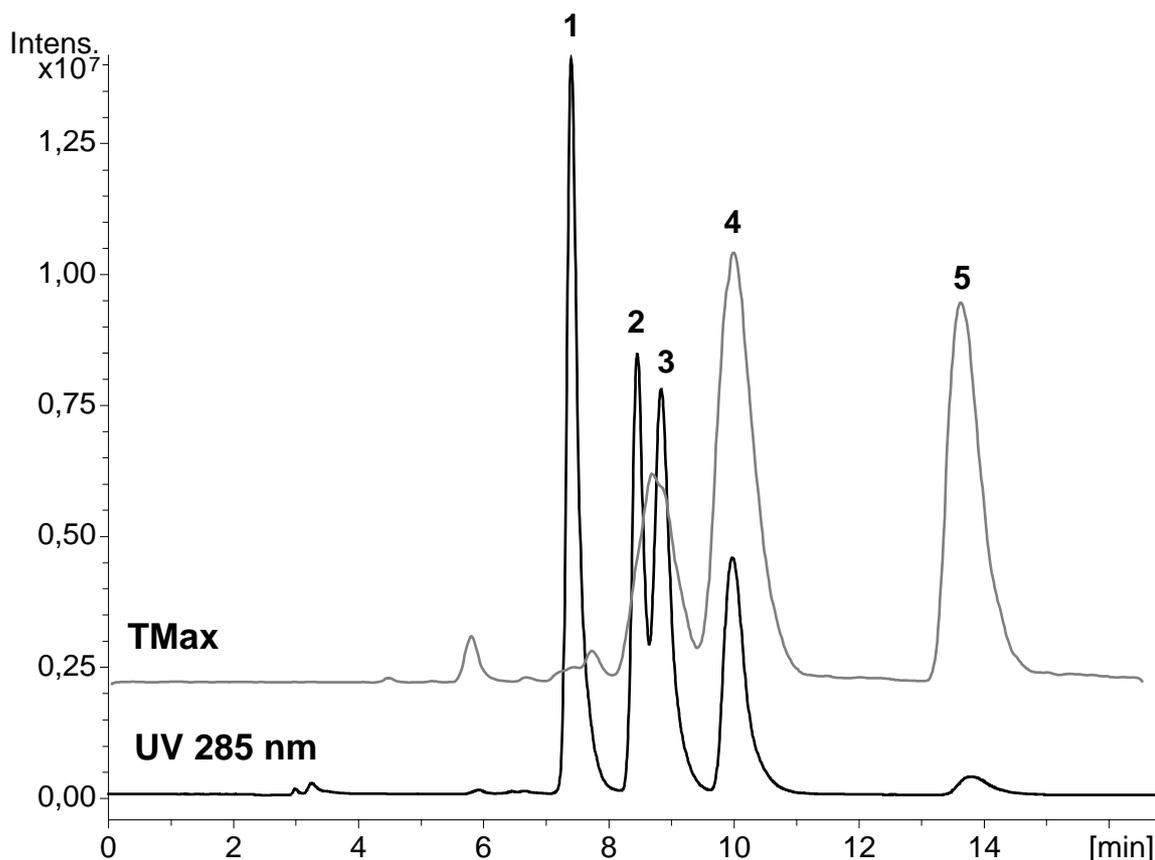


Abb. 43: HPLC-APCI-MS-Analyse von Tocopherol-Homologen:  
1  $\delta$ -Tocopherol, 2  $\gamma$ -Tocopherol, 3  $\beta$ -Tocopherol, 4  $\alpha$ -Tocopherol,  
5  $\alpha$ -Tocopherolacetat

In Abbildung 44 ist das Massenspektrum von  $\alpha$ -Tocopherolacetat gezeigt. Es wurde aus dem im positiven Modus aufgenommenen HPLC-APCI-MS-Lauf von Abbildung 43 herausextrahiert. Neben dem protonierten Molekülpeak bei 473,4 m/z ist auch das Fragmentierungsign  $[M+H-COCH_3]^+$ , entsprechend der Abspaltung der Acetylgruppe, bei einer Masse von 430,4 m/z deutlich zu detektieren.

Mit der vorgestellten HPLC-APCI-MS-Methode ist ein schnelles Screening von verschiedenen Zahnpasta-Proben möglich und kann im folgenden Versuchen für die Untersuchung des  $\alpha$ -Tocopherolacetat-Gehaltes im Zahnfleisch vor und nach zahnhygienischer Behandlung mit  $\alpha$ -Tocopherolacetat-haltiger Zahnpasta verwendet werden. Durch die Optimierung der HPLC-MS-Methode für die Detektion des  $\alpha$ -Tocopherolacetats, wurde eine deutlich erhöhte Sensitivität im Vergleich zur reinen UV-Detektion erreicht.

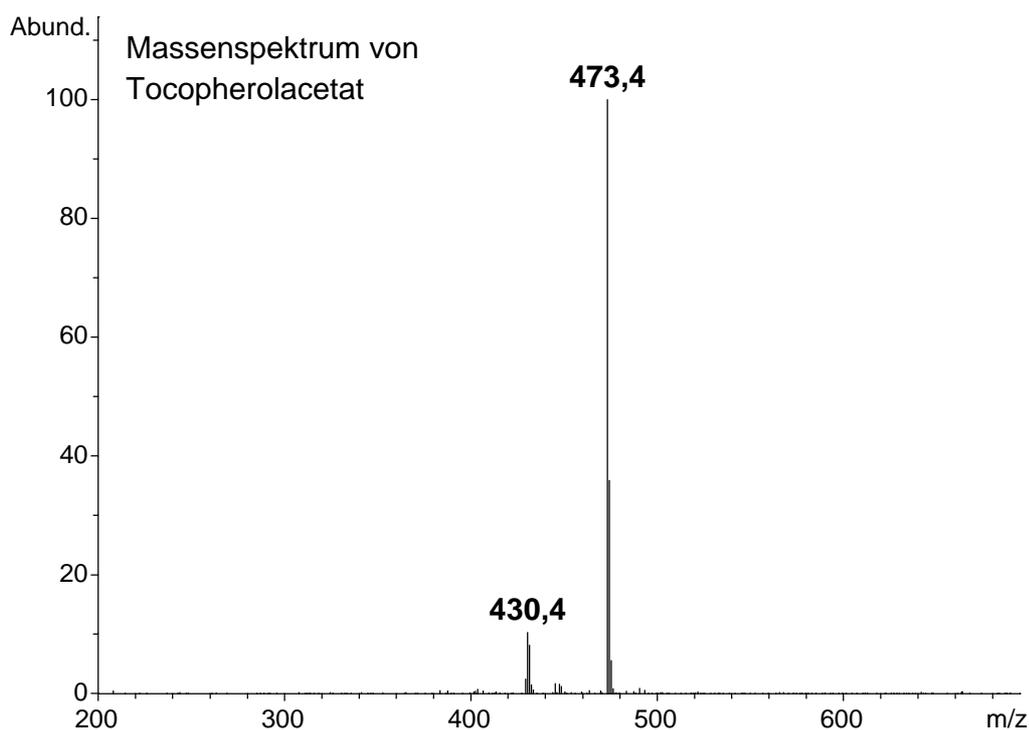


Abb. 44: Positiv-Ion HPLC-APCI-Massenspektrum von  $\alpha$ -Tocopherolacetat

## 5.2.4 HPLC-NMR-Kopplung

Zur eindeutigen Strukturaufklärung des  $\alpha$ -Tocopherolacetats wurde von dem Peak ein stopped-flow  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum aufgenommen (vgl. Abb. 45). Das  $\alpha$ -Tocopherolacetat wurde mit der MSPD-Methode aus dem Zahnpasta/Speichel-Gemisch extrahiert. Wie aus dem NMR-Spektrum ersichtlich ist, treten kaum Verunreinigungen auf. Mit dieser schonenden und zeitsparenden Extraktionsmethode konnte das  $\alpha$ -Tocopherolacetat sehr selektiv vom Speichel und den weiteren Bestandteilen der Zahnpasta, wie beispielsweise Sorbitol und Glycerin, abgetrennt werden.

Neben den Methylgruppen 5- $\text{CH}_3$  ( $\delta = 1,98$  ppm), 7- $\text{CH}_3$  ( $\delta = 2,07$  ppm) und 8- $\text{CH}_3$  ( $\delta = 1,95$  ppm) ist beim  $\alpha$ -Tocopherolacetat die zusätzliche Methylgruppe des Acetats bei  $\delta = 2,30$  ppm gut zu erkennen. Eine vollständige Zuordnung aller Protonen ist in Abbildung 45 gegeben.

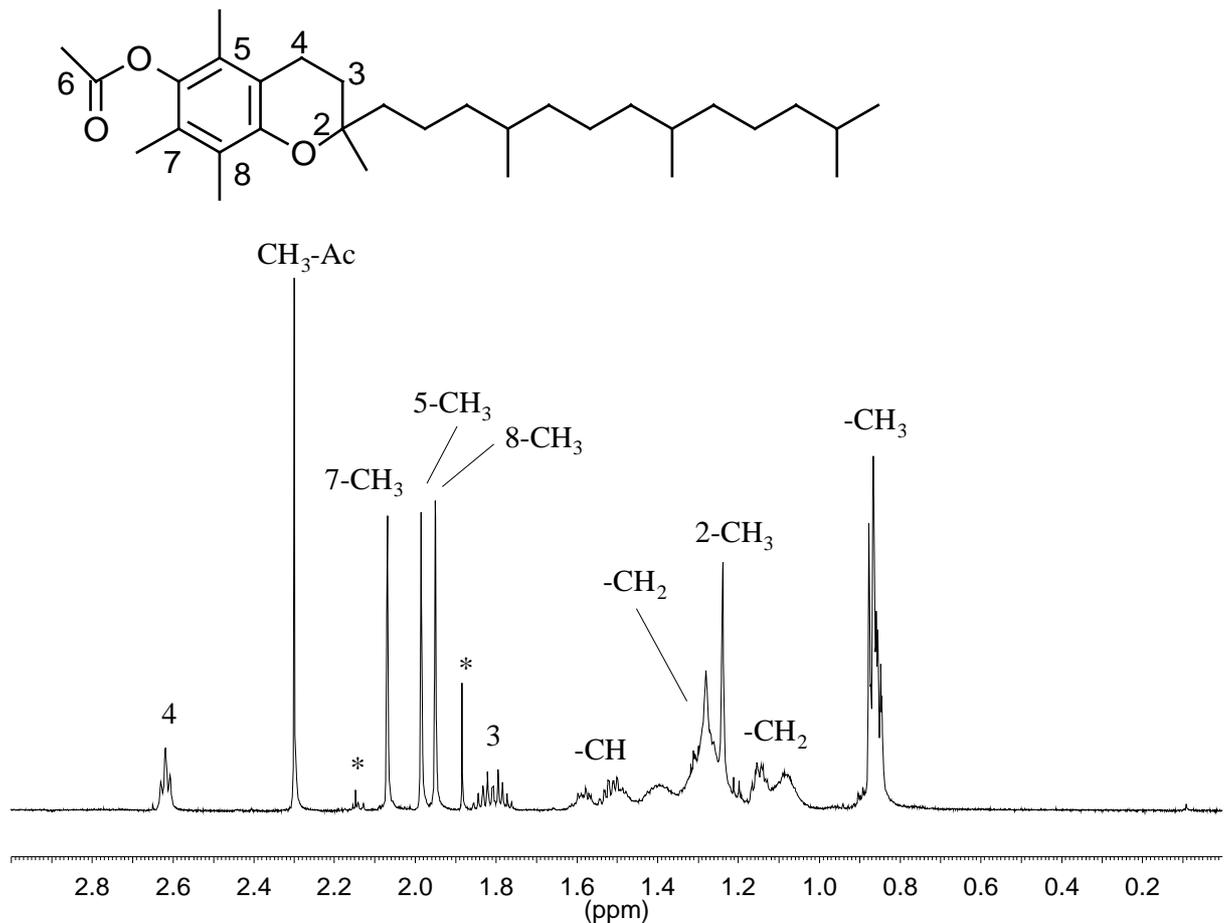


Abb. 45: Stopped-flow  $^1\text{H}$ -HPLC-NMR-Spektrum von  $\alpha$ -Tocopherolacetat, extrahiert aus einem Zahnpasta/Speichel-Gemisch  
(\* = Verunreinigungen)

Mit der kombinierten Anwendung der on-line HPLC-APCI-MS-Kopplung mit der HPLC-NMR-Kopplung ist die Strukturaufklärung der einzelnen Tocopherol-Homologe möglich. Werden die Kopplungstechniken zusätzlich mit der schonenden MSPD-Extraktionstechnik kombiniert und hochselektive  $\text{C}_{30}$ -Trennphasen verwendet, ist die Identifizierung dieser Substanzen auch in komplizierten biologischen Matrixen, wie z.B. im gingivalen Gewebe, möglich.

## 5.3 Flavonoide

Die Anwendung von Kopplungstechniken für die Untersuchung von polaren Naturstoffen aus Pflanzenmaterial gewinnt in jüngster Zeit immer mehr an Bedeutung. Die Entwicklung der HPLC-UV bzw. HPLC-DAD waren die ersten Schritte für eine on-line Detektion von polaren Phytochemikalien. Diese Technik beschränkt sich jedoch auf die Analytik von UV-aktiven Verbindungen. Durch die Einführung der HPLC-MS-Kopplung gelang die Identifikation zahlreicher unbekannter Naturstoffe aus Pflanzenmaterial und funktionellen Lebensmitteln, einschließlich der Strukturaufklärung glycosidisch gebundener Verbindungen. Oftmals ist aber eine eindeutige Strukturaufklärung mittels der HPLC-MS-Kopplung nicht möglich, da die glycosidischen Verbindungen und ihre Aglycone in verschiedenen Isomeren vorkommen und nicht aufgrund ihrer Masse unterschieden werden können. Die hochauflösende NMR-Spektroskopie ist die Methode der Wahl für die Strukturaufklärung dieser komplexen Verbindungen. Mit Hilfe der Direktkopplung von HPLC und NMR kann eine vollständige Strukturinformation aller Verbindungen eines Pflanzenextraktes erhalten werden.

Im folgenden wird die Strukturaufklärung von Flavonoid-Glycosylderivaten der zwei brasilianischen Pflanzen *Maytenus aquifolium* Martius (Celastraceae) und *Sorocea bomplandii* (Baill.) Burger (Moraceae) diskutiert. Obwohl es sich um zwei biologisch völlig unterschiedliche brasilianische Spezies handelt, besitzen beide Pflanzen strukturell sehr ähnliche, glycosidisch gebundene Flavonoid-Derivate.

### 5.3.1 *Maytenus aquifolium* Martius (Celastraceae)

Flavonoide sind eine wichtige Verbindungsklasse mit einer weitreichenden biologischen Aktivität, einschließlich antioxidativer, antimutagener und anticancerogener Wirkung. Bei dem Blätterextrakt von *Maytenus aquifolium* Martius (Celastraceae) wurde 1988 von Carlini die biologische Aktivität gegen Magengeschwüre und Gastritis nachgewiesen.<sup>114</sup> Schon seit langer Zeit werden chromatographische Trennungen systematisch durchgeführt, um eine analytische Routinemethode zu entwickeln und sie für alle Phytopharmaka zu standardisieren.

---

Die Isolation von polyglycosidischen Flavonoiden aus dem Aufguss von *Maytenus aquifolium* ist nützlich für die Validierung dieser Verbindungen als chemische Marker für die Beurteilung der brasilianischen *Maytenus*-Aufgüsse. So findet man zahlreiche Verfälschungen durch Zumischung ähnlicher Verbindungen in den kommerziell erwerblichen Produkten, ohne deren toxischen Eigenschaften genau zu kennen.

### 5.3.1.1 Chromatographische Bedingungen

Frühere Untersuchungen von Flavonoiden mit C<sub>8</sub>- oder C<sub>18</sub>-Säulen verwendeten meist wässrige Ameisensäure/Acetonitril-Mischungen als mobile Phase für die Trennung der *Maytenus* Flavonoide. Problematisch war hierbei immer die hohe Pufferkonzentration, die oftmals höher war als die des Analyten. Dadurch wurde das NMR-Spektrum der Flavonoid-Verbindung immer von den NMR-Signalen des Lösungsmittelgemisches überlagert. Für die on-line HPLC-NMR-Experimente wurden daher unter Verwendung der C<sub>30</sub>-Phase verschiedene Lösungsmittel-Mischungen ohne Puffer-Zusätze getestet. Schließlich wurde eine befriedigende Trennung unter Berücksichtigung der HPLC-NMR-Parameter bei einer mobilen Phase von Methanol/H<sub>2</sub>O 50:50 (v/v) und einem Fluss von 0,8 ml/min erhalten.

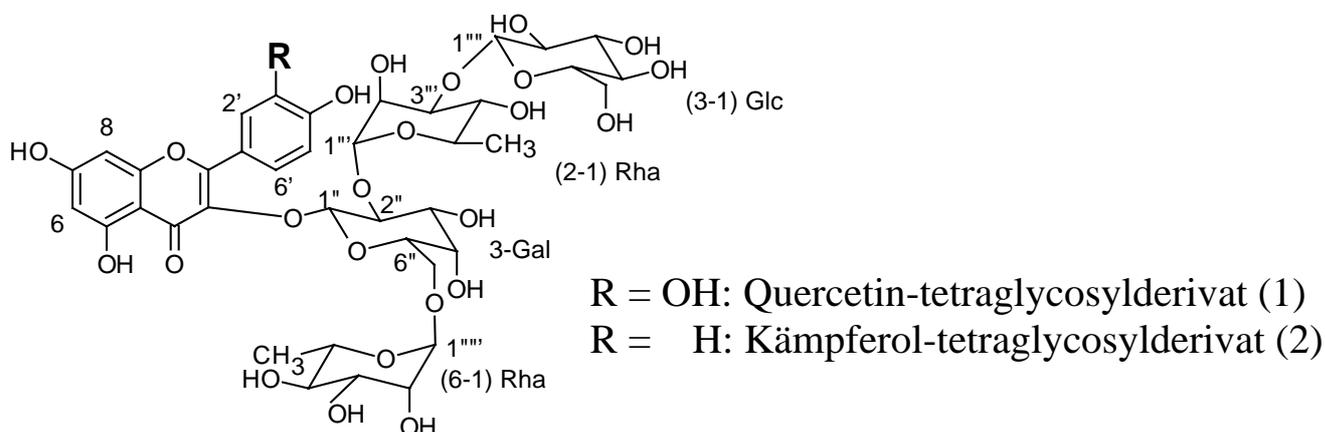


Abb. 46: Struktur von Quercetin- und Kämpferol-tetraglycosylderivaten

Das typische *Maytenus aquifolium* Extrakt besitzt ein einfaches chromatographisches Profil mit zwei dominanten Peaks, entsprechend den tetraglycosidischen Verbindungen von Quercetin (1) und Kämpferol (2) (vgl. Abb. 46). Die beiden tetraglycosidischen Flavonoidderivate eluieren bei den oben genannten chromatographischen Bedingungen innerhalb von 10 min und eine Basislinientrennung der beiden Komponenten wurde erhalten. Das UV-Chromatogramm (370 nm) ist in Abbildung 47 gezeigt.

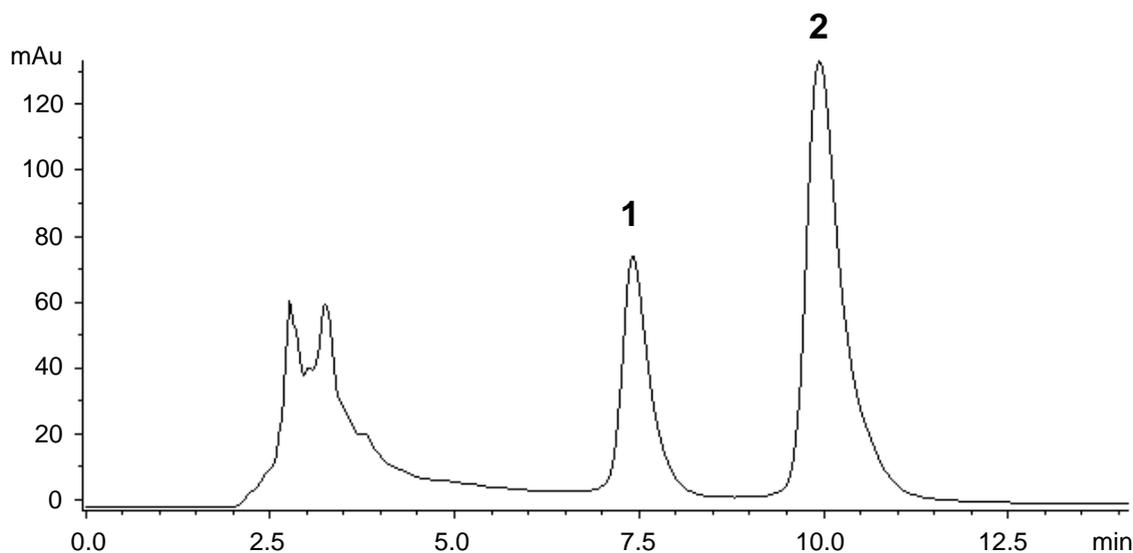


Abb. 47: HPLC-Chromatogram (370 nm) der Flavonoidfraktion aus dem Blätter-Extrakt von *Maytenus aquifolium*

Die Blätter von *Maytenus aquifolium* wurden in Ribeirão Preto, Brasilien gesammelt und bei 40°C getrocknet, zerkleinert und gesiebt. Hierbei wurden nur Partikel zwischen 0,5 und 1 mm für die analytischen Untersuchungen verwendet. 1 g Pflanzenmaterial wurde für 10 min in 10 ml H<sub>2</sub>O gekocht. Nach Abkühlung der Lösung wurde diese gefiltert, eingedampft und in 3 ml Methanol aufgenommen. Diese Lösung wurde nach Zentrifugation direkt chromatographisch getrennt.

Die C<sub>30</sub>-Säule wurde erstmals für die Trennung von polaren Verbindungen verwendet. Quercetin besitzt im Vergleich zu Kämpferol eine zusätzliche Hydroxylgruppe und ist somit polarer, wodurch es früher von der unpolaren C<sub>30</sub>-Säule eluiert. Analog zu den unpolaren Verbindungen, wie den gezeigten Carotinoid- und Tocopherol-Trennungen, kann auch bei polaren Verbindungen eine hohe Selektivität erhalten werden. Nahezu kein Peak-Tailing ist sichtbar.<sup>115</sup>

Trotz der großen Probenmenge von 70  $\mu\text{l}$  einer 0,1%igen Lösung, welche auf die  $\text{C}_{30}$ -Säule injiziert wurde, sind keine Überladungseffekte sichtbar. Die Überladung der Säule ist nötig, damit eine genügend hohe Probenkonzentration in der NMR-Flusszelle für die Detektion vorliegt.

### 5.3.1.2 HPLC-NMR-Kopplung

Die hohe Beladungskapazität der  $\text{C}_{30}$ -Säule ermöglicht eine Strukturaufklärung von polaren biologisch aktiven Verbindungen in Naturstoffen und funktionellen Lebensmitteln mit Hilfe von on-line HPLC-NMR-Experimenten. Die folgenden Abbildungen zeigen die stopped-flow  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren eines *Maytenus aquifolium*-Extraktes. Sie wurden jeweils am Peak-Maximum des chromatographischen Laufes (vgl. Abb. 47) aufgenommen.

Der Aromatenbereich der stopped-flow  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der beiden Flavonoidderivate Quercetin (1) und Kämpferol (2) ist in Abbildung 48 abgebildet. Das Protonenspektrum von (1) zeigt die typischen Signale eines ABX-Systems bei  $\delta = 7,67$  ppm (1H, d,  $J = 1,5$  Hz), bei  $\delta = 7,53$  ppm (1H, dd,  $J = 8,5$  Hz und  $1,5$  Hz) und bei  $\delta = 6,92$  ppm (1H, d,  $J = 8,5$  Hz) entsprechend den Protonen H-2', H-6' und H-5'. Sie können dem B-Ring des Flavonoid-Grundgerüsts zugeordnet werden, ebenso wie das AB-System bei  $\delta = 6,38$  ppm (1H, d,  $J = 1,5$  Hz) und bei  $\delta = 6,19$  ppm (1H, d,  $J = 1,5$  Hz) der Protonen H-8 und H-6 dem A-Ring. Aufgrund der eindeutig zugeordneten Signale handelt es sich folglich um ein Quercetin-Derivat.

Die Substanz (2) besitzt zwei Dubletts bei  $\delta = 8,00$  ppm und  $\delta = 6,94$  ppm mit einer Kopplungskonstante von  $J = 8,0$  Hz. Die Integration ergibt für jedes Dublett zwei Protonen. Sie können den Protonen H-2'/H-6' und H-3'/H-5' des B-Ringes zugeordnet werden. Desweiteren erlauben die zusätzlichen Signale der Protonen des A-Ringes bei  $\delta = 6,21$  ppm und  $\delta = 6,41$  ppm eine Identifizierung der Substanz als ein Kämpferol-Derivat.

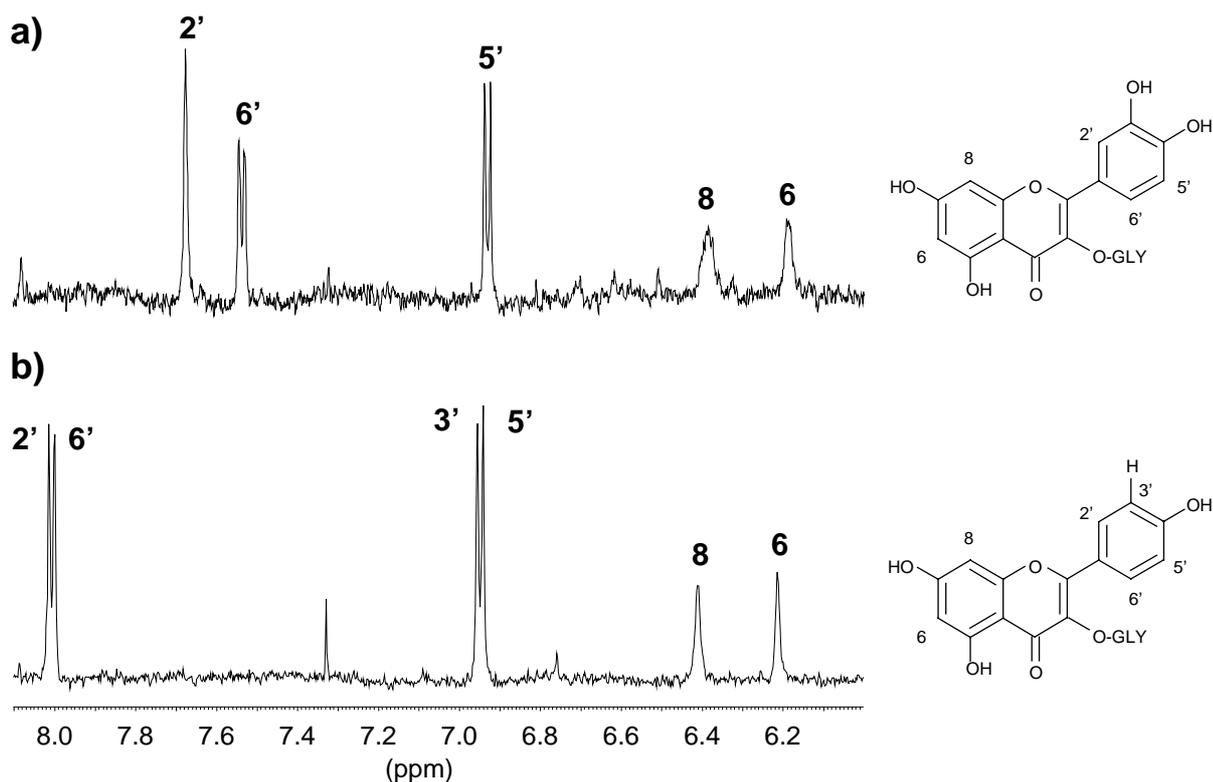


Abb. 48: Stopped-flow <sup>1</sup>H-NMR-Spektren (600 MHz, Aromatenbereich) von einem  
 a) Quercetin-tetraglycosylderivat (1)  
 b) Kämpferol-tetraglycosylderivat (2)

Die aliphatische Region der stopped-flow <sup>1</sup>H NMR Spektren von (1) und (2) ist identisch, da beide Flavonoid-Derivate den gleichen Zuckerrest besitzen. Abbildung 49 zeigt die 4 anomeren Protonen der Zuckerkette des Kämpferol-tetraglycosids. Sie können wie folgt zugeordnet werden:  $\delta = 5,26$  ppm (1H, d,  $J = 7,5$  Hz, 3-gal-1"),  $\delta = 5,13$  ppm (1H, d,  $J = 1,5$  Hz, (2-1)-rha-1"),  $\delta = 4,59$  ppm (1H, d,  $J = 7,5$  Hz, (3-1)-glc-1") und  $\delta = 4,47$  ppm (1H, d,  $J = 1,5$  Hz, (6-1)-rha-1"). Die beiden Dubletts mit einem Integrationsverhältnis von jeweils 3 Protonen bei  $\delta = 1,10$  ppm (d,  $J = 6,0$  Hz, (6-1)-rha-6") und bei  $\delta = 1,02$  ppm (d,  $J = 6,0$  Hz, (2-1)-rha-6") können den beiden Rhamnose-Einheiten zugeordnet werden.

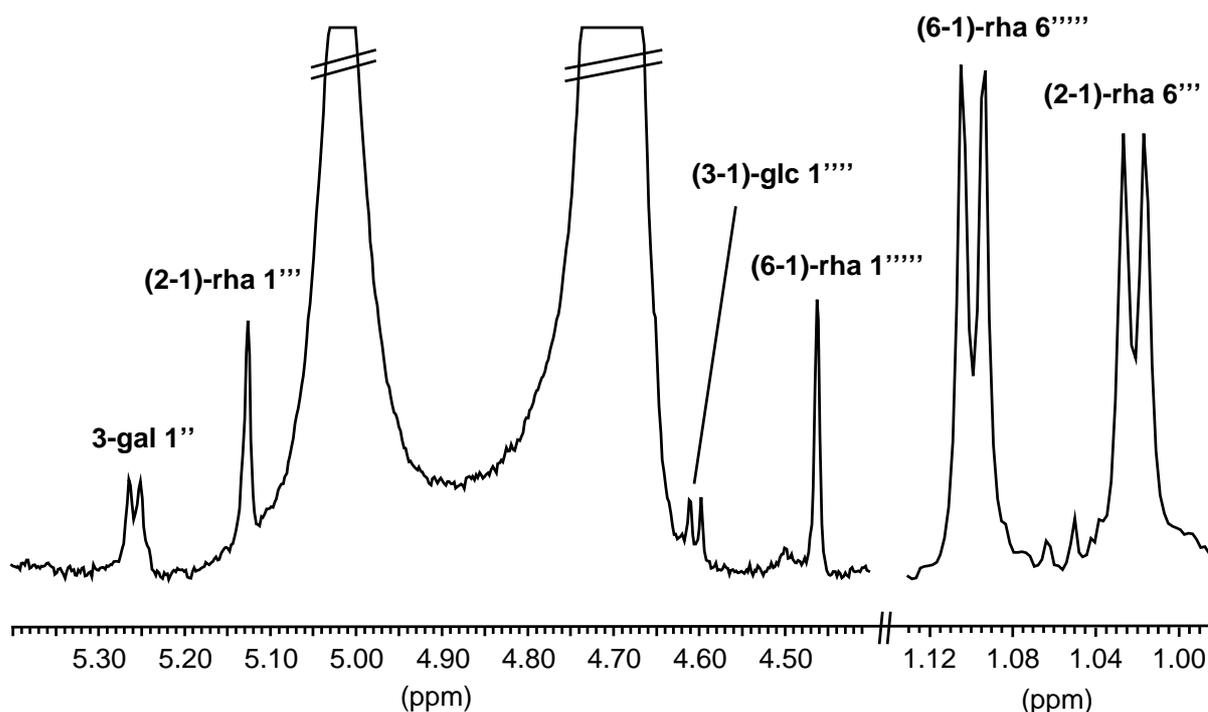


Abb. 49: Stopped-flow  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (600 MHz, aliphatischer Bereich) von einem Kämpferol-tetraglycosylderivat

Trotz der unterdrückten Lösungsmittelsignale des Methanol/ $\text{D}_2\text{O}$ -Gemisches bei  $\delta = 3,3$  ppm und  $\delta = 4,7$  ppm sind die Signale der anomeren Protonen weder überlagert noch gestört. Die Kopplungskonstanten von  $J = 7,5$  Hz beweisen die  $\beta$ -Konfigurationen der Galaktose- und Glucose-Einheit, während die Kopplungskonstante von  $J = 1,5$  Hz der Rhamnose-Einheiten ihre  $\alpha$ -Konfiguration belegt.

Die on-line HPLC-NMR-Experimente unter den beschriebenen Bedingungen ermöglichen eine vollständige Identifizierung der beiden komplexen Flavonoid-tetraglycoside aus der methanolischen Lösung des Blattextraktes von *Maytenus aquifolium*. Mit der erarbeiteten Methodik ist zukünftig ein schnelles Screening der zahlreichen unbekannteten Naturstoffe möglich. Dadurch werden die biologisch aktiven Substanzen, wie sie beispielsweise in *Maytenus aquifolium* vorkommen, für eine präventive und interventive Behandlung schneller zugänglich.

Diese Anwendung soll anhand eines zweiten Beispiels gezeigt werden. Mit analogen Bedingungen kann eine vollständig unterschiedliche Spezies, *Sorocea bomplandii* (Baill.) Burger (Moraceae) auf ihre flavonoiden Inhaltsstoffe untersucht werden.

### 5.3.2 *Sorocea bomplandii* (Baill.) Burger (Moraceae)

*Sorocea bomplandii* (Baill.) Burger (Moraceae) wird als Streckungsmittel zur Verfälschung des Medikaments aus den “espinheira santa” Pflanzen *Maytenus ilicifolia* und *Maytenus aquifolium*, zwei Spezies aus der Familie der Celastraceae, verwendet. Deren Tee-Aufguss wird traditionell gegen Gastritis und Magengeschwüre verwendet. *Sorocea bomplandii* wurde hingegen bisher nicht auf ihre biologische Aktivität untersucht. Zwar zeigten Tierversuche keine akuten toxischen Nebenwirkungen, jedoch birgt die Verwendung von *Sorocea bomplandii* als Phytopharmakon große Risiken, solange die chemische Zusammensetzung dieser Pflanze nicht vollständig geklärt ist.

#### 5.3.2.1 Chromatographische Bedingungen

Die chromatographischen Bedingungen für die Trennung von glycosidisch gebundenen Flavonoid-Derivaten unter Verwendung der hochselektiven C<sub>30</sub>-Phase, sowie unter Berücksichtigung der Parameter für die nachfolgenden HPLC-MS- und HPLC-NMR-Kopplungsexperimente wurden bereits bei dem *Maytenus*-Extrakt eingehend getestet. Für die Trennung der Flavonoide aus *Sorocea bomplandii*, wurden die gleichen Eluenten verwendet. Die Trennung wurde optimiert und ein Gradient gefahren, da das Extrakt mehrere Komponenten aufweist. So wurde 20 min mit den Eluenten Methanol/H<sub>2</sub>O 40:60 (v/v) eluiert und anschließend ein 40-minütiger Gradient bis zu einem Gemisch Methanol/H<sub>2</sub>O 80:20 (v/v) verwendet. Die Flussrate wurde auf 0,7 ml/min reduziert, um den hohen Rückdruck der Säule zu verringern.

Abbildung 50 zeigt die Trennung der einzelnen Flavonoid-Derivate aus *Sorocea bomplandii*. Alle Hauptkomponenten sind basisliniengetrennt und fast kein Peak-Tailing ist feststellbar. Auch die in geringen Konzentrationen vorkommenden Komponenten können aufgrund der hohen Selektivität der verwendeten C<sub>30</sub>-Säule getrennt werden.

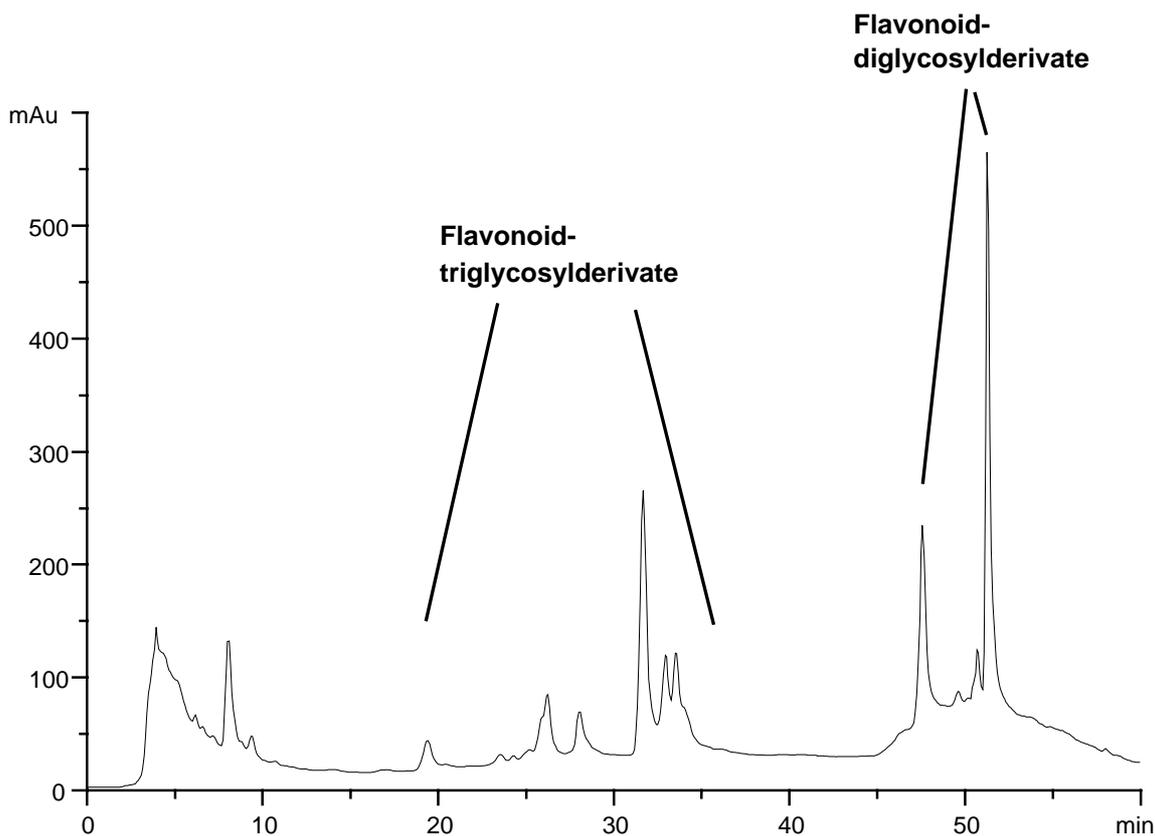


Abb. 50: HPLC-Chromatogramm (370 nm) der Flavonoidfraktion aus dem Blätter-Extrakt von *Sorocea bomplandii*

Die triglycosidischen Verbindungen besitzen wegen ihrer erhöhten Polarität geringere Retentionszeiten auf der unpolaren  $C_{30}$ -Säule als die entsprechend unpolaren diglycosidischen Vertreter. Analog zu der Trennung des *Maytenus*-Extraktes eluieren die Quercetin-Derivate aufgrund der zusätzlichen Hydroxylgruppe etwas früher von der Säule als die entsprechenden Kämpferolderivate.

Für die chromatographische Trennung wurden die Blätter von *Sorocea bomplandii* (290 g) jeweils 7 Tage in je 1 l Hexan, Dichlormethan und Ethanol bei Raumtemperatur gerührt. Die Ethanol-Fraktion wurde unter Vakuum bis zur Trockenheit eingedampft. 100 mg des Ethanolextraktes wurden in 1 ml Methanol gelöst und gefiltert. 10  $\mu$ l dieser Lösung wurden direkt die HPLC-Anlage injiziert.

Trotz der großen eingespritzten Probenmenge sind keine Überladungseffekte im HPLC-Chromatogramm sichtbar. Aufgrund der hohen Kapazität der  $C_{30}$ -Säule können die einzelnen Peaks ohne weitere Aufkonzentrierung direkt mit der HPLC-MS- und HPLC-NMR-Kopplung analysiert werden.

### 5.3.2.2 HPLC-ESI-MS-Kopplung

Flavonoide lassen sich gut mit Hilfe der on-line HPLC-ESI-MS-Kopplung identifizieren.<sup>116</sup> In Abbildung 51 sind neben dem HPLC-Chromatogramm (370 nm) die wichtigsten im Negativ-Ion-Modus aufgenommenen Massenspuren dargestellt. Im Bereich des Chromatogramms zwischen 40 - 60 min befinden sich große Mengen an diglycosidischen Verbindungen. Wie in zahlreichen Literaturstellen beschrieben, handelt es sich bei Moraceae, wie *Sorocea bomplandii*, dabei hauptsächlich entweder um Glucose (glc)- oder Rhamnose (rha)-Einheiten. Das Aglycon von Kämpferol (K) wird im negativen Ion-Modus bei  $m/z$  285  $[M-H]^-$  und Quercetin (Q) entsprechend bei  $m/z$  301  $[M-H]^-$  detektiert.

Daraus ergibt sich für den Peak bei 39,2 min mit der Masse  $m/z$  609 entweder ein Quercetin-Derivat mit einem Glucose- ( $m/z$  162) und einem Rhamnoseresest ( $m/z$  146)  $[Q-glc-rha]^-$  oder ein Kämpferolderivat mit 2 Rhamnoseresesten  $[K-rha-rha]^-$ . Der bei 44,9 min eluierende Peak mit der Masse  $m/z$  593 ist entsprechend entweder ein Quercetin-diglycosylderivat  $[Q-glc-glc]^-$  oder ein Kämpferol-diglycosylderivat  $[K-glc-rha]^-$ . Eine eindeutige Strukturaufklärung ist mit der Aufnahme von einfachen Massenspektren folglich nicht möglich, wenn das Aglycon nicht bekannt ist.

Durch die Verwendung eines Ionenfallen-Massenspektrometers kann zu jedem Zeitpunkt der Analyse auch ein Tandem-Massenspektrum aufgenommen werden. So wurde während des on-line HPLC-ESI-MS-Experimentes gleichzeitig von den  $T_{max}$ -Spektren auch MS/MS-Spektren für eine detaillierte Strukturaufklärung aufgenommen. Diese sind von den Flavonoid-Diglycosidderivaten in Abbildung 52 gezeigt.

Durch die ebenfalls im negativen Ion-Modus aufgenommenen MS/MS-Spektren können die Glycosid-Derivate eindeutig einem Aglycon zugeordnet werden. So zeigen die MS/MS-Spektren von  $m/z$  771 und 593 einen Massenpeak bei  $m/z$  285, der eindeutig dem Aglycon des Kämpferols zugeordnet werden kann, während man für die Masse  $m/z$  609 bei den Tandem-MS-Aufnahmen, entsprechend den bereits diskutierten Ergebnissen, das Quercetin-Aglycon bei  $m/z$  301 nachweisen kann.

Durch die Kenntnis des Aglycons können nun auch die entsprechenden Zuckerreste den Flavonoid-Derivaten eindeutig zugeordnet werden (vgl. Abb. 51).

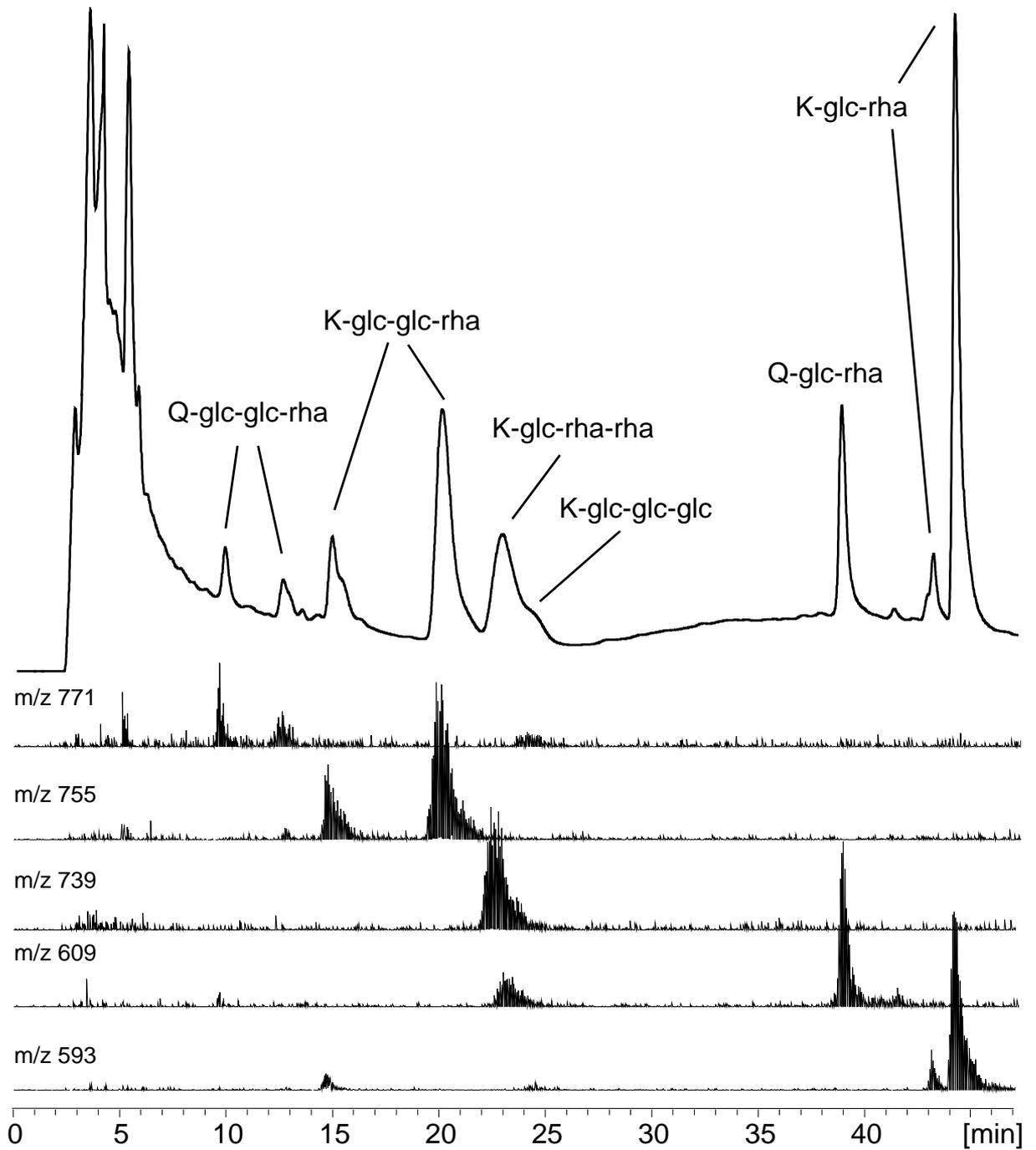


Abb. 51: HPLC-ESI-MS-Untersuchung von *Sorocea bomplandii*  
UV-Chromatogramm (370 nm) und die Massenspektren (in m/z)

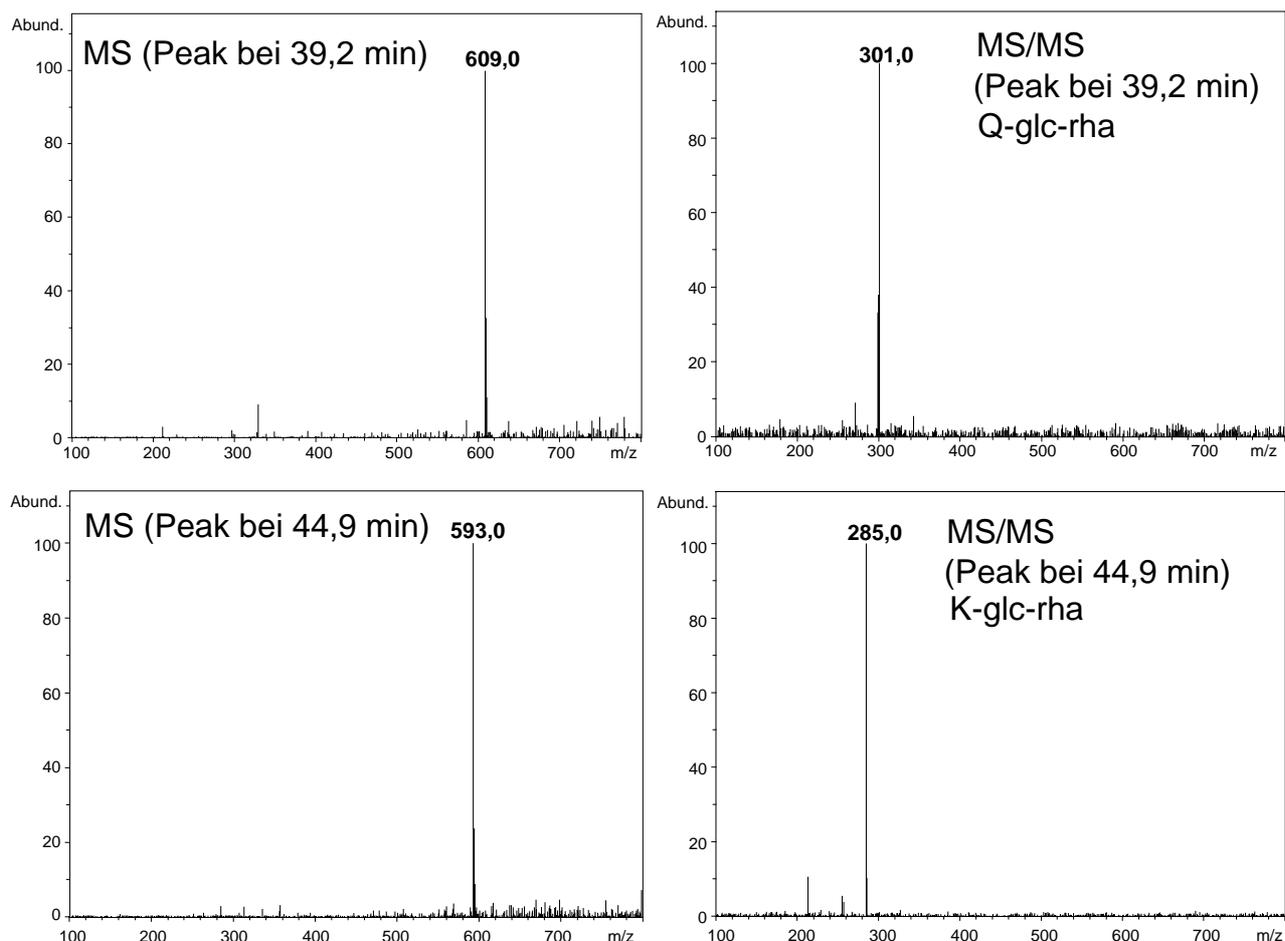


Abb. 52: HPLC-MS- und HPLC-MS/MS-Spektren der Flavonoid-diglycosylderivate der UV-Peaks bei 39,2 min (Q-Glc-Rha) und 44,9 min (K-Glc-Rha)

Für den Peak bei 39,2 min mit der Masse  $m/z$  609 ergibt sich folglich aus den Ergebnissen der Massenspektren und MS/MS-Spektren ein Quercetin-Derivat mit einem Glucose- ( $m/z$  162) und einem Rhamnoseres ( $m/z$  146) [Q-glc-rha]<sup>-</sup>. Der bei 44,9 min eluierende Peak mit der Masse  $m/z$  593 ist entsprechend ein Kämpferol-diglycosylderivat [K-glc-rha]<sup>-</sup>. Interessant ist, dass in den Massenspektren  $m/z$  609 und  $m/z$  593 auch im Bereich der triglycosidischen Flavonoide, welche im Zeitraum von 10-25 min eluieren, gewisse Signalintensitäten nachgewiesen werden können (vgl. Abb. 51). Die Triglycoside fragmentieren also teilweise unter den verwendeten Meßbedingungen und zeigen diglycosidische Anteile.

Entsprechend konnten die triglycosidischen Flavonoid-Derivate anhand den Massenspuren (in  $m/z$ ) und den MS/MS-Aufnahmen wie folgt zugeordnet werden: 771 [Q-glc-glc-rha], 755 [K-glc-glc-rha] und 739 [K-glc-rha-rha]. Im Gegensatz zu *Maytenus aquifolium*, wo große Mengen an tetraglycosidischen Flavonoiden identifiziert werden konnten, wurden im *Sorocea bomplandii*-Extrakt keine Flavonoide mit 4 Zuckerresten nachgewiesen.

Die einzelnen Massenspuren zeigen z.T. mehrere Peaks, was darauf hindeutet, dass jeweils unterschiedliche Flavonoid-Derivate mit gleichen Zuckerresten in *Sorocea bomplandii* vorhanden sind. Diese haben wahrscheinlich in der Zuckerkette eine unterschiedliche Anordnung oder liegen verzweigt vor.

Mit Hilfe der on-line HPLC-MS-Kopplung lassen sich in sehr kurzer Zeit die verschiedenen Kämpferol- und Quercetin-Derivate unterscheiden und identifizieren. Innerhalb eines chromatographischen Laufes lassen sich nicht nur die Massenspektren und Massenspuren eines gewissen Massenbereiches aufnehmen, sondern es werden auch detaillierte Informationen durch die MS/MS-Spektren erhalten. Mit der on-line HPLC-ESI-MS-Kopplung kann jedoch nicht die vollständige Struktur der Flavonoid-Glycosylderivate aufgeklärt werden. So geben beispielsweise die Massenspektren keine Auskunft über die genaue Konfiguration der einzelnen Zucker. Daher muss wiederum die kombinierte Durchführung von HPLC-MS- und HPLC-NMR-Kopplung für eine eindeutige Strukturanalyse angewandt werden.

### 5.3.2.3 On-line HPLC-NMR-Kopplung

Wie bei den stopped-flow  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von *Maytenus aquifolium* wurden auch bei den in Abbildung 53 gezeigten Spektren die Lösungsmittelsignale von Methanol ( $\delta = 3,3$  ppm und  $\delta = 4,7$  ppm) durch Vorsättigung mittels sog. Shaped-Pulse (Rechteckform) unterdrückt. Der Aromatenbereich sowie die anomeren Protonen der stopped-flow  $^1\text{H}$  NMR Spektren der Hauptkomponenten eines *Sorocea bomplandii*-Extraktes ist in Abbildung 53 abgebildet. Die einzelnen Quercetin- und Kämpferol-Derivate können leicht durch den Vergleich des Aromaten-Bereiches unterschieden werden (vgl. Kap. 5.3.1.2). So findet man für Kämpferol die typischen 2 Dubletts ( $\delta = 8,00$  ppm und  $\delta = 6,94$  ppm,  $J = 8$  Hz) eines p-substituierten Aromaten und für Quercetin das ABX-System bei  $\delta = 7,67$  ppm (1H, d,  $J = 1,5$  Hz), bei  $\delta = 7,53$  ppm

---

(1H, dd,  $J = 8,5$  Hz und  $1,5$  Hz) und bei  $\delta = 6,92$  ppm (1H, d,  $J = 8,5$  Hz) eines trisubstituierten Aromaten.

a) Quercetin-diglucosylderivat (Peak bei 44,9 min)

b) Kämpferol-diglucosylderivat (Peak bei 39,2 min)

c) Kämpferol-triglucosylderivat (Peak bei 20,3 min)

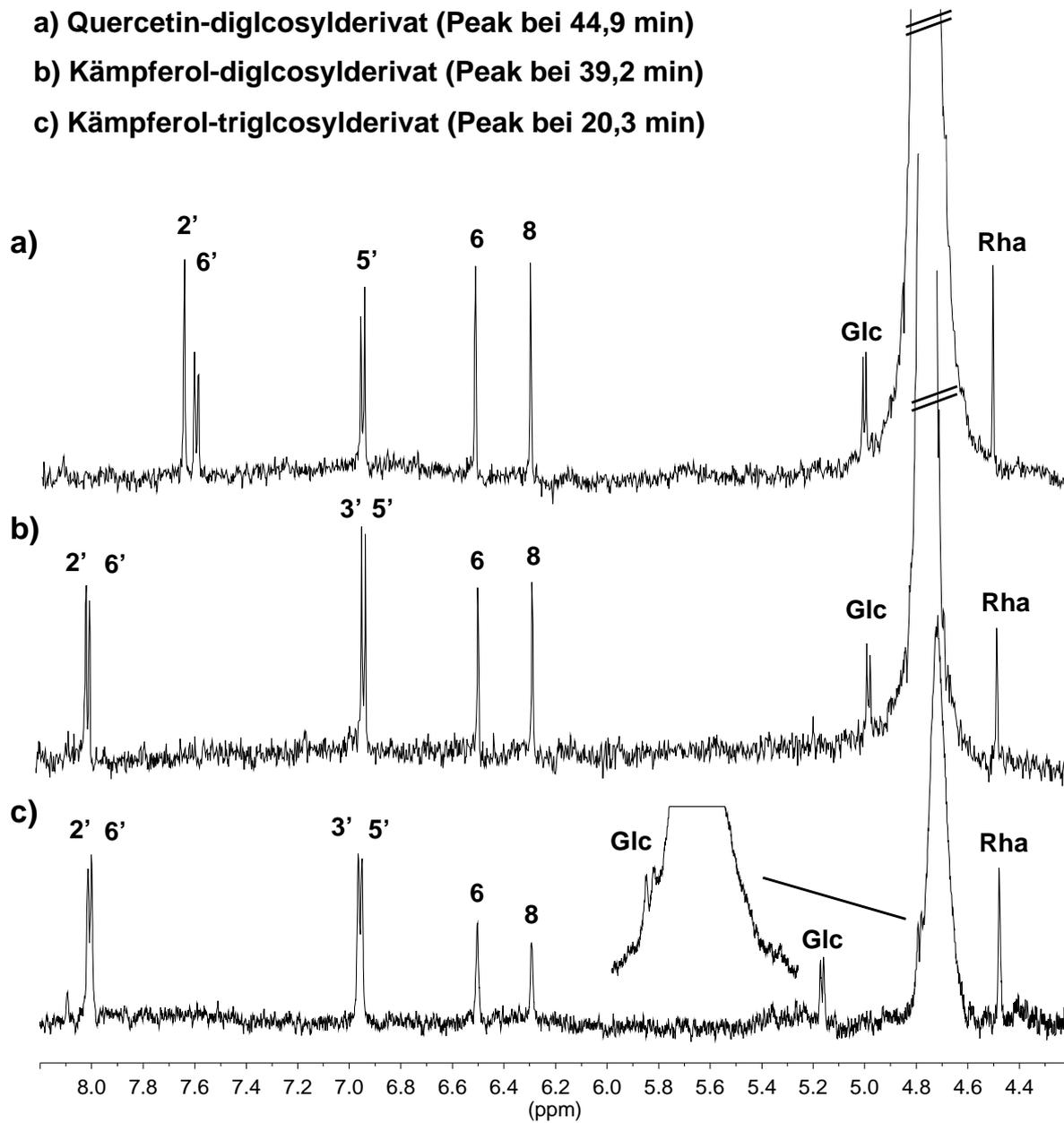


Abb. 53: Stopped-flow  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (600 MHz, aromatische und anomere Protonen) der Hauptkomponenten eines *Sorocea bomplandii*-Extraktes

Die Anzahl der Zuckereinheiten an einem Flavonoid-Derivat lässt sich schnell anhand der detektierten Signale der anomeren Protonen im Bereich von 5,2-4,4 ppm bestimmen. Trotz der unterdrückten Lösungsmittelsignale des Methanol/D<sub>2</sub>O-Gemisches bei  $\delta = 3,3$  ppm und  $\delta = 4,7$  ppm können alle anomeren Protonen detektiert werden.

Der untersuchte Peak bei 44,9 min (vgl. Abb. 53a) enthält 2 Zuckereinheiten. Sie können wie folgt zugeordnet werden:  $\delta = 5,01$  ppm (1H, d,  $J = 7,5$  Hz, glc) und  $\delta = 4,47$  ppm (1H, d,  $J = 1,5$  Hz, rha). Die Kopplungskonstanten von  $J = 7,5$  Hz beweisen die  $\beta$ -Konfigurationen der Glucose-Einheit, während die Kopplungskonstante von  $J = 1,5$  Hz der Rhamnose-Einheiten ihre  $\alpha$ -Konfiguration belegt. Diese Signale werden auch beim entsprechenden Quercetin-diglycosylderivat gefunden, welches nach 39,2 min von der C<sub>30</sub>-Säule eluiert (vgl. Abb. 53b). Bei dem nach 20,3 min eluierenden Peak (vgl. Abb. 53c) sind 3 Zuckereinheiten enthalten:  $\delta = 5,17$  ppm (1H, d,  $J = 7,5$  Hz, glc),  $\delta = 4,78$  (1H, d,  $J = 7,5$  Hz, glc) und  $\delta = 4,47$  ppm (1H, d,  $J = 1,5$  Hz, rha). Diese Ergebnisse sind mit den Resultaten der Massenspektrometrie übereinstimmend.

Durch die Kombination der HPLC-MS-Kopplung mit der HPLC-NMR-Kopplung ist eine schnelle Strukturaufklärung von phytochemischen Verbindungen möglich. Dies wurde anhand der zwei völlig unterschiedlichen Spezies *Maytenus aquifolium* Martius (Celastraceae) und *Sorocea bomplandii* (Baill.) Burger (Moraceae) gezeigt. Die Anwendung der on-line Kopplungstechniken ermöglicht die Analyse der verschiedenen Flavonoid-Glycosylderivate in diesen Spezies. In der Tat wurden in *Sorocea bomplandii* unterschiedliche Verbindungen als die biologisch aktiven Substanzen in *Maytenus aquifolium* gefunden. Es ist daher bedenklich, den *Sorocea bomplandii*-Extrakt ebenfalls als Phytopharmakon anzuwenden, ohne deren genauen heilenden bzw. toxischen Eigenschaften zu kennen. Es ist zu erwarten, dass biologische Tests in kurzer Zeit folgen werden. Ebenso werden in Zukunft sicherlich viele der bereits verwendeten brasilianischen Pflanzenextrakte mit den erarbeiteten on-line Analyseverfahren geprüft werden.

## **6 Zusammenfassung und Ausblick**

### **6.1 Extraktionstechniken**

Die Probenaufbereitung stellt häufig das größte Problem bei der Bestimmung von qualitativen und quantitativen Analysen von biologischen Proben dar. Insbesondere die Extraktion von instabilen Verbindungen ist eine Herausforderung an den Analytiker. Mit der on-line Solid Phase Extraktion (on-line SPE) und der Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) wurden 2 schonende Extraktionsverfahren angewandt und weiterentwickelt. Sie es erlauben, instabile Verbindungen in hoher Reinheit von der biologischen Matrix abzutrennen.

Die on-line SPE-HPLC bietet die Möglichkeit des direkten und vollständigen Probentransfers unter Licht- und Sauerstoffausschluss. Die Analytmoleküle werden auf einer Kartusche angereichert und nach einem oder mehreren clean-up-Schritten direkt auf einer HPLC-Säule aufgetrennt. Dabei können auch große Mengen verwendet werden. Dieses Verfahren wurde erfolgreich bei einer Zahnpasta/Speichel-Probe angewendet. So konnten die in der Zahnpasta enthaltenen Tocopherol-Homologe angereichert und anschließend getrennt werden. Die on-line SPE hat sich heutzutage zu einer weitverbreiteten Extraktionstechnik entwickelt und wird auch in Automation betrieben.

Die MSPD wurde erfolgreich bei der Extraktion von Carotinoid-Stereoisomeren aus verschiedenen Retinaprogenen und Spinatproben angewandt. Mit dieser sehr schnellen und schonenden Extraktionsmethode konnten die instabilen Stereoisomere ohne Bildung von Artefakten direkt aus der festen Probe extrahiert werden.

Die MSPD soll im folgenden auch für die Extraktion von Tocopherolacetat aus Zahnfleischproben verwendet werden. Außerdem wird derzeit im Rahmen der Kooperation mit Prof. Vilegas, Brasilien die Fragestellung untersucht, ob die Extraktion von biologisch aktiven Pflanzeninhaltsstoffen, wie den glycosidisch gebundenen Flavonoid-Derivaten ebenfalls mit MSPD möglich ist.

---

## 6.2 Chromatographie

Die hochselektiven  $C_{30}$ -Phasen wurden erstmals nicht nur für Standard-Trennungen, sondern für schwierige biomedizinische Fragestellungen verwendet. So konnten die Carotinoid-Stereoisomere in Retina- und Spinatproben aufgetrennt und quantifiziert werden. Hierbei wurde die temperaturabhängige Trennleistung dieser Phase speziell für die Carotinoid-Problematik optimiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Spezies (Huhn, Rind, Mensch) zwar die gleichen Lutein und Zeaxanthin-Stereoisomere in der Retina aufweisen, jedoch jede Spezies ihr eigenes quantitatives Pattern dieser Carotinoid-Stereoisomere besitzt. Im Serum konnten praktisch keine Z-Stereoisomere nachgewiesen werden und auch in der Quelle der Carotinoide Lutein und Zeaxanthin, dem funktionellen Lebensmittel Spinat, sind nur geringe Mengen an Z-Stereoisomere zugegen.

Besonders interessant ist, dass in allen untersuchten Spezies große Mengen an 9-Z Zeaxanthin angereichert sind, was für eine besondere biologische Aktivität dieses Stereoisomeren in der Retina spricht. Es ist also im folgenden zu klären, ob das 9-Z Zeaxanthin das Schlüssel-Molekül für die Prävention der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) ist.

Erstmals wurden Anreicherungsversuche der Carotinoide direkt im Auge durchgeführt. Dabei wurde neben einer Metabolisierung von all-E Lutein zu all-E Zeaxanthin auch die Bildung der Z-Stereoisomere beobachtet. Desweiteren konnte nachgewiesen werden, dass die Carotinoide die Retina-Blut-Barriere durchbrechen, da auch im Kontroll-Auge eine Anreicherung der Carotinoide nachgewiesen werden konnte. Derzeit werden in Kooperation mit der Augenklinik Tübingen weitere Anreicherungsversuche, sowohl durch Injektion in die Blutbahn, als auch durch spezielle Fütterungsversuche durchgeführt.

In dem wässrigen Extrakt von Urucum konnte im Vergleich zum organischen Extrakt ein zusätzlicher Peak nachgewiesen werden. Dieser soll nun in der Arbeitsgruppe von Prof. Vilegas, Brasilien, in Kooperation mit unserer Arbeitsgruppe näher untersucht werden.

Ebenso konnten die unpolaren Tocopherol-Homologe in einer Zahnpasta/Speichel-Mischung bis zur Basislinie getrennt werden. Alle Trennungen zeigen kaum ein Peak-Tailing, was für die außerordentliche Selektivität dieser Trennsäule spricht. In Zukunft sollen die im Zahnfleisch angereicherten Tocopherol-Homologe nach zahnhygienischer Behandlung untersucht werden.

Erstmals wurden auch polare Verbindungen wie die glycosidisch gebundenen Flavonoid-Derivate auf der C<sub>30</sub>-Säule getrennt. Hierfür wurden zwei unterschiedliche brasilianische Pflanzen *Maytenus aquifolium* Martius (Celastraceae) und *Sorocea bomplandii* (Baill.) Burger (Moraceae) untersucht. Dabei konnten jeweils Chromatogramme mit einer hohen Selektivität erzielt werden.

Schon heute steigt die Zahl der Publikationen stetig, die auf eine C<sub>30</sub>-Säule für ihre Trennprobleme zurückgreifen. Aufgrund der hohen Beladungskapazität ist die C<sub>30</sub>-Säule insbesondere auch für die on-line HPLC-NMR-Kopplung sehr geeignet. In Kürze dürfte also mit einer Vielzahl neuer Applikationen, auch im Bereich der miniaturisierten Techniken, wie der Kapillar-HPLC (CHPLC) und der Kapillarelektrochromatographie (CEC), zu rechnen sein.

### 6.3 HPLC-MS-Kopplung

Die HPLC-MS-Kopplung ist eine sehr empfindliche Methode, die selbst die Detektion von Substanzen im unteren Picomol-Bereich ermöglicht. Mit Hilfe der APCI-Methode konnten die unpolaren Carotinoide ionisiert und somit massenspektrometrisch untersucht werden. Dabei konnten sogar die massengleichen Carotinoide Lutein und Zeaxanthin durch ihr unterschiedliches Fragmentmuster voneinander unterschieden werden. Dadurch ist in Zukunft ein schnelles Screening der Retinaprobe möglich und die Peaks eines chromatographischen Laufes können sofort als Lutein- oder Zeaxanthin-Stereoisomere identifiziert werden.

Ebenso wurden die einzelnen Tocopherol-Homologe mittels der on-line HPLC-APCI-MS-Kopplung eingehend untersucht. Die massenspektrometrischen Bedingungen wurden dabei für das Tocopherolacetat optimiert, da diese Verbindung zukünftig im Zahnfleisch nachgewiesen werden soll.

Die Flavonoid-Glycosylderivate wurden im Negativ-Ion-Modus mittels der HPLC-ESI-Kopplung untersucht. Durch einen Vergleich der einzelnen Massenspuren mit dem UV-Chromatogramm können die einzelnen Quercetin- und Kämpferolderivate unterschieden, sowie die jeweilige Anzahl der Zuckereinheiten bestimmt werden. Durch die Verwendung eines Massenspektrometers mit einer Ionenfalle können auch  $MS^n$ -Spektren aufgenommen und die Flavonoidderivate somit eingehend analysiert werden. So ergibt sich aus den on-line HPLC-MS/MS-Spektren direkt das Flavonoid-Grundgerüst.

Die HPLC-MS-Kopplung ist jedoch nicht in der Lage, die einzelnen Carotinoid-Stereoisomere zu identifizieren. Die Stereoisomere besitzen alle die gleiche Masse und zeigen ein identisches Fragmentierungsmuster. Auch die Bestimmung der absoluten Konfiguration der Zuckereinheiten der Flavonoide, sowie deren exakte Anordnung ist mit der HPLC-MS-Kopplung nicht möglich. Eine Kombination der HPLC-MS-Kopplung mit der on-line HPLC-NMR-Kopplung war daher unerlässlich.

## 6.4 HPLC-NMR-Kopplung

Für eine eindeutige Strukturaufklärung ist die HPLC-NMR-Kopplung die analytische Methode der Wahl. Alle Hauptstereoisomere von Lutein und Zeaxanthin konnten zweifelsfrei identifiziert werden. Die Analytik dieser instabilen Verbindungen ist nur durch diese gekoppelte Methode möglich, da die Einwirkung von Licht- und Sauerstoff ausgeschlossen werden kann. Es wurden sowohl continuous-flow als auch stopped-flow-Spektren aufgenommen, wobei die Detektionsgrenze bei etwa  $1 \mu\text{g}$  Substanzmenge liegt.

Durch die Aufnahme von 2D-Spektren erhält man zu den chemischen Verschiebungswerten auch die Konnektivitäten zu den benachbarten Protonen. Diese zusätzliche Information ist besonders bei den langen olefinischen Ketten der Carotinoide sehr hilfreich.

---

Mit der on-line HPLC-NMR-Kopplung ist auch die Strukturaufklärung der einzelnen Tocopherol-Homologe möglich. So wurde das in Zahnpasta enthaltene  $\alpha$ -Tocopherol-acetat über die Aufnahme von stopped-flow  $^1\text{H}$ -HPLC-NMR-Spektren eindeutig identifiziert. Die NMR-Spektren zeigten kaum Verunreinigungen, was für eine hohe Selektivität der MSPD-Extraktion bzw. des für die Extraktion und Trennung verwendeten  $\text{C}_{30}$ -Materials spricht. Durch die Kombination der HPLC-NMR-Kopplung mit der schonenden MSPD-Extraktionstechnik und der Verwendung von hochselektiven  $\text{C}_{30}$ -Trennphasen ist die Identifizierung dieser Substanzen auch in komplizierten biologischen Matrixen, wie z.B. im gingivalen Gewebe, möglich.

Im Bereich der Phytoanalytik konnte eine on-line HPLC-NMR-Methode entwickelt werden, die bereits an mehreren Systemen erfolgreich angewendet wurde. Zwar ist aufgrund der geringen Substanzmenge eine Strukturaufklärung ins letzte Detail nicht möglich, jedoch können mit einem chromatographischen Lauf alle Peaks einem Flavonoid-Grundgerüst zugeordnet werden. Außerdem kann die Anzahl und Art der Zuckerreste sowie ihre Konfiguration anhand der anomeren Protonen leicht bestimmt werden. Dies wurde anhand der zwei völlig unterschiedlichen Spezies *Maytenus aquifolium* Martius (Celastraceae) und *Sorocea bomplandii* (Baill.) Burger (Moraceae) gezeigt. Für diese Problematik eignet sich also die on-line HPLC-NMR-Methode besonders gut, um ein schnelles Screening durchzuführen.

## 6.5 Miniaturisierung der analytischen Methoden

Um in Zukunft auch geringere Substanzmengen detektieren zu können, müssen die analytischen Verfahren empfindlicher werden.<sup>117</sup> Eine Möglichkeit hierbei ist die Miniaturisierung dieser Techniken. Erste Trennversuche mit Kapillaren wurden bereits erfolgreich durchgeführt. Die Trennung der Carotinoid-Stereoisomere mit der CEC-Anlage zeigt, dass zukünftig Substanzmengen-Gemische unter 1 ng getrennt werden können. Das ist ungefähr die Menge an Carotinoid-Stereoisomeren in einer einzelnen Rattenretina. Dies ermöglicht in Zukunft die Untersuchung von degenerierten Ratten, um eine Korrelation zwischen den Carotinoid-Stereoisomeren und dem Degenerationsverlauf der Retina untersuchen zu können.

---

In Zusammenarbeit mit der Universität Ulm wurde der Aufbau einer CEC-NMR-Kopplung und zusätzlich mit der Fa. Bruker ein spezieller Kapillar-Probenkopf entwickelt. Der prinzipielle Aufbau der CEC-NMR-Kopplung ist in Abbildung 54 skizziert:

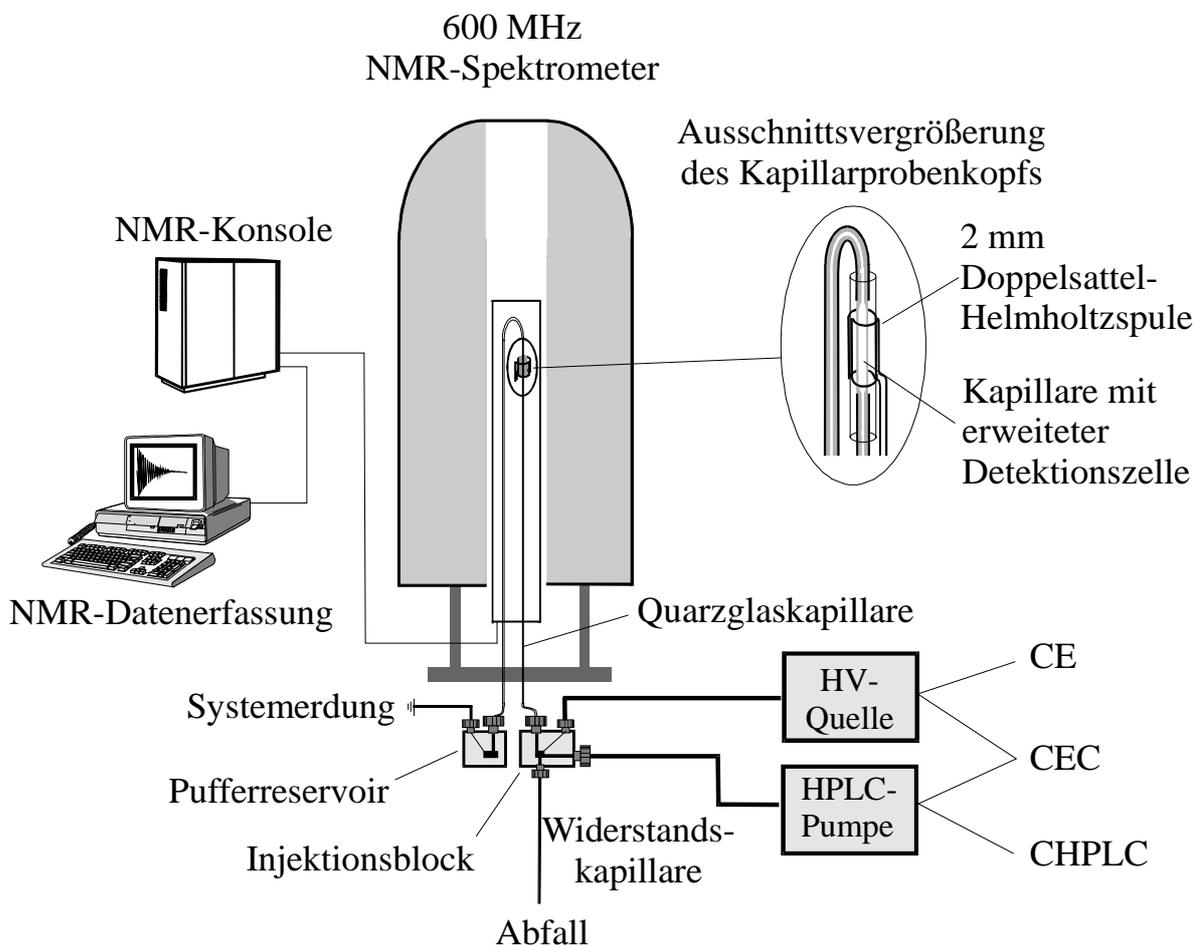


Abb. 54: Aufbau der CEC-NMR-Kopplung

Erste Kopplungsversuche wurden bereits in unserem Institut unternommen. Diese miniaturisierte Kopplungstechnik muss jedoch noch weiter optimiert werden. So sind beispielsweise die Kapillarwege noch sehr lang, der Kapillarprobenkopf sehr schwer zu homogenisieren und es ergeben sich Hintergrundsignale in den NMR-Spektren durch die momentane Anordnung der RF-Spulen. Nach Beseitigung dieser Probleme ist diese moderne Kopplungstechnik jedoch bereit für den Einsatz vielseitiger analytischer Fragestellungen mit geringsten Probenmengen.

## **7 Experimenteller Teil**

### **7.1 Geräte**

#### **7.1.1 HPLC-Anlagen**

- Merck/Hitachi L-6200 A Intelligent Pump  
Merck/Hitachi L-4000 A UV-Detektor  
Steuersoftware: Hystar-Software (Bruker Daltonik, Bremen)
- Shimadzu HPLC Pumpe  
Binäres System LC-10AD  
Shimadzu DAD-Detektor SPD-M10AVP  
Steuersoftware: Shimadzu Class LC10
- Hewlett Packard HP Serie 1100  
Binäre Pumpe G 1312A (Hewlett-Packard GmbH, Waldbronn)  
UV-Detektor G1314A (Hewlett-Packard GmbH, Waldbronn)  
Steuersoftware: HP Chemstation (Hewlett-Packard GmbH, Waldbronn)
- CEC-Anlage (Eigenbau)  
Fug Hochspannungsgenerator HCN 35-35000 (Fug, Rosenheim-Langenpfunzen)  
Knauer K-2500 UV-Detektor ausgestattet mit einer Kapillardetektionszelle  
Steuersoftware: Chromstar (Bruker Daltonik, Bremen)

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

---

### 7.1.2 Massenspektrometer

Als Massenspektrometer wurde ein Bruker Esquire-LC Ion Trap LC/MS<sup>(n)</sup>-System G1980AA (Bruker Daltonik, Bremen) mit ESI und APCI Interface und Ionenfalle verwendet. Die HPLC-MS-Kopplung erfolgte mit einem HP 1100 Series-Gerät (Hewlett-Packard GmbH, Waldbronn). Steuersoftware: Bruker Data Analysis Esquire-LC 1.5i.

Die LC-MS-Messungen wurden in Bremen in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Andrea Kiehne sowie Dipl. Chem. Tobias Glaser durchgeführt.

### 7.1.3 NMR-Spektrometer

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

Die HPLC-NMR-Messungen wurden mit einem inversen 120 µl-Durchflussprobenkopf durchgeführt.

Das Gerät wurden über eine Aspect-Workstation mit XWINNMR-Software (Bruker Daltonik, Bremen) gesteuert. Die Datenauswertung wurde sowohl an einer INDY-Workstation mit XWINNMR-Software als auch am PC mit 1D und 2D WINNMR-Software (Bruker Daltonik, Bremen) durchgeführt.

## 7.2 Chemikalien

### Probenvorbereitung und Extraktion:

BHT (Butylated Hydroxytoluol, 2,6-Di-t-butyl-p-kresol; Fa. Sigma, Steinheim)

LiChrosolv (Fa. Merck, Darmstadt): Aceton, Diethylether, Ethanol, n-Hexan,

Methanol

---

Chromatographie:

LiChrosolv (Fa. Merck, Darmstadt): Aceton, Acetonitril, Chloroform, Diethylether, Ethanol, n-Hexan, Methanol.

Polydimethylsiloxan (ABCR, Karlsruhe)

N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]-3-aminopropansulfonsäure (TAPS) (Fa. Merck, Darmstadt)

NMR-Spektroskopie:

D<sub>2</sub>O, (Deutero, Herresbach)

Standards:

β-Apo-8'-carotenal (Fa. Fluka, Neu-Ulm)

β-Carotin (BASF AG, Ludwigshafen)

Zeaxanthin (Hoffmann LaRoche, Basel)

Lutein (Hoffmann LaRoche, Basel sowie Kemin Ind., Des Moines IA, USA)

Tocopherol-Homologe (Merck, Darmstadt)

Die Isomerisierung der Standardsubstanzen erfolgte durch Zugabe eines Tropfens einer Iod-Hexanlösung.<sup>118</sup>

## 7.3 Probenvorbereitung und Extraktion

### 7.3.1 Carotinoid-Stereoisomere

Retinaproben:

Die Augen wurden den getöteten Hühnern in der Dunkelheit entnommen und unter Eiskühlung vorsichtig aufgeschnitten. Der Füllkörper wurde entfernt, danach wurde das Auge kurzzeitig in einen Phosphatpuffer getaucht. Dadurch kann sich die Netzhaut vom Rest des Auges ablösen.

---

Spinatproben:

Nach der Ernte wurden die Spinatblätter mit flüssigem Stickstoff kurz abgeschreckt. Dadurch wurden die Spinatblätter tief gefroren und konnten so in einem Mörser fein zerkleinert werden. Für die Untersuchung von gekochtem Spinat wurde dieser wie vorgeschrieben mit etwas Wasser versetzt und in einer Mikrowelle bei 600 W sechs Minuten erhitzt.

Urucum:

Je 5 Samenkörner wurden in je 1 ml Chloroform bzw. Wasser gelöst und über Nacht im Dunkeln stehen gelassen. Die Lösung wurde filtriert und im Eisschrank bei  $-40^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Durchführung der MSPD:

Eine Retina bzw. 0,5 g der Spinatprobe wurden mit 1,5 g MSPD-Sorbensmaterial sowie 8,25  $\mu\text{g}$  an  $\beta$ -Apo-8'-carotenal in einem Mörser vermischt und zu einem homogenen Pulver verrieben. Das resultierende glatte, trockene Pulver wurde in ein Leerreservoir mit eingelegter Fritte eingefüllt. Eine zweite, obere Fritte wurde eingelegt und vorsichtig nach unten gedrückt. Das Sorbensbett wurde so dicht wie möglich zusammengepresst. Man eluiert polare Verunreinigungen mit 15 ml dest. Wasser. Zur Elution der Carotinoide wurden etwa 0,5 ml Chloroform verwendet.

MSPD-Sorbens: Bischoff ProntoSil C<sub>30</sub>-Material mit 25-40  $\mu\text{m}$  Teilchengröße (Bischoff Chromatography, Leonberg)

### 7.3.2 Tocopherol-Homologe

1 g Zahnpasta, welche 0,2 %  $\alpha$ -Tocopherolacetat enthält, wurde mit 1-10 ml Speichel vermischt.

Flüssig-flüssig-Extraktion (LLE):

Die verschiedenen Zahnpasta/Speichel-Proben wurden mit 1-10 ml Methanol versetzt. Der dabei ausflockende Gelbildner wurde abfiltriert.

On-line SPE:

---

2 ml einer Zahnpasta/Speichel-Mischung wurden vollständig über eine externe HPLC-Pumpe auf einer C<sub>30</sub>-Kartusche (Bischoff Chromatography, Leonberg) extrahiert. Das  $\alpha$ -Tocopherolacetat wird dabei auf der Kartusche angereichert, welches anschließend durch die mobile Phase des HPLC-Systems wieder eluiert und auf der C<sub>30</sub>-Säule aufgetrennt wird.

MSPD:

0,2 g Zahnpasta/Speichel-Mischung wurden mit 1 g C<sub>30</sub>-Sorbensmaterial (Bischoff Chromatography, Leonberg) verrieben. Das homogenisierte Material wurde in ein Leerreservoir eingefüllt und nach Konditionierung mit H<sub>2</sub>O das  $\alpha$ -Tocopherolacetat mit Methanol extrahiert.

### 7.3.3 Flavonoid-Glycosylderivate

Maytenus aquifolium:

Die Blätter von *Maytenus aquifolium* wurden in Ribeirão Preto, SP, Brasilien gesammelt, wo sie von Dr. Pereira kultiviert werden. Die Blätter werden bei 40°C getrocknet, zerkleinert und gesiebt. Nur Partikel zwischen 0,5 und 1 mm Durchmesser wurden für die analytischen Untersuchungen verwendet. 1 g Pflanzenmaterial wurde für 10 min in 10 ml H<sub>2</sub>O gekocht. Nach Abkühlung der Lösung wurde diese gefiltert, eingedampft und in 3 ml Methanol aufgenommen. Diese Lösung wurde nach Zentrifugation direkt chromatographisch getrennt.

Sorocea bomplandii:

Für die chromatographische Trennung wurden die Blätter von *Sorocea bomplandii* (290 g) jeweils 7 Tage in 1 l Hexan, Dichlormethan und Ethanol bei Raumtemperatur gerührt. Die Ethanol-Fraktion wurde unter Vakuum bis zur Trockenheit eingedampft. 100 mg des Ethanolextraktes wurden in 1 ml Methanol gelöst und gefiltert. 10  $\mu$ l dieser Lösung wurden direkt die HPLC-Anlage injiziert.

In einer Extraktionsvariante wurde die Infusion konzentriert auf eine XAD-2 Säule gegeben und mit H<sub>2</sub>O und Methanol eluiert. Die Methanol-Phase wurde getrennt, wobei sich ähnliche Ergebnisse ergaben.

---

## 7.4 Chromatographie

### 7.4.1 Säulen und Kapillaren

#### HPLC-Säulen:

Das Kieselgel (ProntoSil, 3  $\mu\text{m}$  Teilchengröße, 200 Å Porenweite; Bischoff Chromatography, Leonberg) wurde mit Triacetyltrichlorsilan (ABCR, Karlsruhe) entsprechend der Literaturvorschrift modifiziert. Die stationäre Phase wurde über ein Slurry in eine 250  $\times$  4.6 mm Stahlsäule (Bischoff, Leonberg, Deutschland) gepackt.

#### CEC-Kapillaren:

Modifiziertes Kieselgel (ProntoSil C<sub>30</sub>-Material) wurde suspendiert und im Ultraschallbad homogenisiert. Die Suspension wird in ein Reservoir gegossen und an einer Seite an eine 350 mm \* 100  $\mu\text{m}$  fused silica Kapillare (Polymicro Technologies, LLC, Phoenix) angeschlossen. Die stationäre Phase wurde durch Anlegen von Druck (600 bar) in die Kapillare gepresst. Der Druck baut sich nach Abschalten der Pumpe über Nacht ab. Beide plan abgeschnittenen Enden werden in eine Mischung von Polydimethoxysiloxan/Methanol 1:5 (v/v) getaucht und 20 min getrocknet. Der Vorgang wird 3-4 mal wiederholt, bis eine stabile Fritte entsteht.

### 7.4.2 Chromatographische Bedingungen

#### 7.4.2.1 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

##### Carotinoid-Stereoisomere:

Die Carotinoide Lutein und Zeaxanthin wurden bei einer Flußrate von 1 ml/min getrennt und bei 450 nm detektiert. Als Eluent diente ein Gemisch Aceton/Wasser 85:15 (v/v). Die Probenmengen lagen zwischen 5  $\mu\text{l}$  und 40  $\mu\text{l}$  der verdünnten Standardlösungen.

---

Von den einzelnen Spinatproben wurden jeweils 5 µl in die HPLC eingespritzt. Zur Analyse der Spinatproben wurde ein Lösungsmittelgradient eingesetzt. Dabei wurde nach der Injektion 21 Minuten lang konstant mit Aceton/Wasser 85:15 (v/v) eluiert. Es folgte ein 4-minütiger linearer Gradient bis Aceton/Wasser 97:3 (v/v). Dieses Lösungsmittelgemisch wurde bis zum Ende der Chromatographie beibehalten.

Je nach Versuch wurden von den Retinaprogenen entweder der zehnte Teil oder die gesamte Retina injiziert, die Probenmengen lagen zwischen 10 und 25 µl. Es wurde konstant mit Aceton/Wasser 85:15 (v/v) eluiert.

Der Bixin-Extrakt wurde mit einem linearen Lösungsmittel-Gemisch Aceton/Wasser 80:20 (v/v) bei einer Flussrate von 1 ml/min getrennt und bei einer Wellenlänge von 460 nm detektiert. Insgesamt wurden 2 µl des Urucum-Extraktes injiziert.

#### Tocopherol-Homologe:

10 µl des Extraktes aus dem Zahnpasta/Speichel-Gemisch wurden mit 100 % Methanol und einem Fluss von 1 ml/min getrennt. Detektiert wurde beim UV-Maximum von  $\alpha$ -Tocopherolacetat (285 nm).

#### Flavonoid-Glycosylderivate:

Der *Maytenus*-Extrakt wurde mit einer mobilen Phase Methanol/Wasser 50:50 (v/v) isokratisch getrennt. Die Flussrate betrug 0,8 ml/min und die Elution wurde über UV-Detektion (370 nm) verfolgt. Da gleichzeitig eine NMR-Detektion erfolgte, wurden 70 µL einer 0,1 %igen Lösung (w/v) des Pflanzenextraktes auf die Trennsäule injiziert.

Für die Trennung des *Sorocea*-Extrakt (10 µl) wurden die gleichen Eluenten verwendet, jedoch wurde ein Gradient für die Trennung der Flavonoid-glycosylderivate verwendet. So wurde 20 min mit Methanol/Wasser 40:60 (v/v) eluiert und anschließend ein 40-minütiger Gradient bis zu einem Methanol/Wasser-Gemisch 80:20 (v/v) gefahren. Die Flussrate betrug 0,7 ml/min bei gleicher Wellenlängendetektion.

---

#### 7.4.2.2 Kapillar-Trennungen

Die Kapillar-Trennungen wurden mit einem Eluentengemisch Aceton/TABS (pH-Wert 6,95, 2,5 mmol) 85:15 (v/v) durchgeführt. Es wurde eine Spannung von 20 kV angelegt und die UV-Absorption bei 450 nm gemessen. Für die Injektion der Probe wurde für 3 s eine Spannung von 10 kV angelegt.

#### 7.4.2.3 Kopplungstechniken

Bei allen on-line HPLC-NMR-Experimenten wurde H<sub>2</sub>O durch D<sub>2</sub>O ersetzt.

##### Carotinoid-Stereoisomere:

Das Injektionsvolumen für die stopped-flow <sup>1</sup>H-HPLC-NMR-Experimente betrug 2 µl einer 4%igen Zeaxanthin-Lösung. Für die stopped-flow COSY-Spektren wurden von der selben Lösung 60 µl injiziert. Bei der on-line continuous-flow NMR-Detektion wurde die Flussrate auf 0,3 ml/min reduziert und 60 µl des Zeaxanthin-Stereoisomeren-Gemisches wurden injiziert.

Das Lutein der Spinatprobe wurde mit Aceton/D<sub>2</sub>O 92:8 (v/v) eluiert, das Injektionsvolumen betrug 40 µl.

Die HPLC-MS-Kopplung wurde mit einer Einspritzmenge von 5 µl bei Spinatproben und 5-10 µl bei Retinaproben betrieben. Die chromatographischen Bedingungen wurden nicht verändert.

Der Bixin-Extrakt wurde mit einem linearen Lösungsmittel-Gemisch Aceton/D<sub>2</sub>O 80:20 (v/v) bei einer Flussrate von 1 ml/min getrennt und bei einer Wellenlänge von 460 nm detektiert. Insgesamt wurden 2 µl des Urucum-Extraktes injiziert.

##### Tocopherol-Homologe:

Das Extrakt aus dem Zahnpasta/Speichel-Gemisch wurden mit 100 % Methanol und einem Fluss von 1 ml/min getrennt. Für die HPLC-NMR-Experimente wurden 50 µl des Extraktes injiziert. Bei den HPLC-MS-Experimente wurde der Extrakt um den Faktor 100 verdünnt und 2 µl eingespritzt.

---

Flavonoid-Glycosylderivate:

Für die HPLC-NMR-Detektion blieben die chromatographischen Bedingungen erhalten und 70 µl einer 0,1 %igen Lösung (w/v) des *Maytenus*-Extraktes wurden auf die Trennsäule injiziert. Von dem *Sorocea*-Extrakt (100 mg/ml) wurden 10 µl direkt in das HPLC-NMR-System eingespritzt.

Für die HPLC-MS-Messungen wurden die Extrakte um den Faktor 100 verdünnt und zwischen 2 – 10 µl injiziert.

## 7.5 Massenspektrometrie

Carotinoid-Stereoisomere:

Die Massenspektren wurden in einem Massenbereich von 200-800 m/z aufgenommen. Die Corona-Spannung wurde auf 4 kV optimiert, so daß der resultierende Strom 8-10 µA betrug. Stickstoff wurde als Trocknungsgas und als Trägergas bei 300 °C verwendet. Die Temperatur der Ionisierungskammer betrug 300 °C. Die Detektion erfolgte im positiven APCI-Modus.

Tocopherol-Homologe:

Die HPLC-MS-Spektren wurden im Positiv-Ion-Modus unter Verwendung einer APCI-Ionenquelle gemessen. Die Massenspektren wurden in einem Massenbereich von 150-750 m/z aufgenommen. Die Corona-Spannung wurde auf 3 kV optimiert, so daß der resultierende Strom 4-6 µA betrug. Die Temperatur der Ionisierungskammer betrug 300 °C.

Flavonoid-Glycosylderivate:

Die Flavonoid-Glycosylderivate wurden im Massenbereich von 100-1000 m/z aufgenommen. Die ESI-Massenspektren sind im negativen Modus aufgenommen worden. Die Kapillar-Spannung betrug 4 kV, wobei sich ein resultierender Strom von 4-6 µA ergab. Die Temperatur der Ionisierungskammer betrug 350 °C.

---

## 7.6 NMR-Spektroskopie

### Carotinoid-Stereoisomere:

Bei allen NMR-Experimenten wurde das Lösungsmittelsignal von Aceton bei 2,04 ppm unterdrückt. Hierzu wurde zur Vorsättigung eine Shaped-Puls-Sequenz (Rechteckpulse mit einer Länge von 100 ms) mit Vorsättigungszeiten zwischen 0,8 und 1,6 s verwendet. Zur Kalibrierung der Spektren wurde das Restsignal von Aceton auf 2,04 ppm gesetzt. Die Messtemperatur betrug generell 300 K.

### **Stopped-flow $^1\text{H}$ -HPLC-NMR-Spektren:**

Für die stopped-flow  $^1\text{H}$ -HPLC-NMR-Experimente wurden 2 k Transienten akkumuliert. Alle Spektren wurden mit 16 k Datenpunkten in einem spektralen Bereich von 8400 Hz aufgenommen. Vor der Fourier-Transformation wurde der FID mit einer Exponentialfunktion mit einer Linienverbreiterung von 1 Hz multipliziert sowie ein Zero-Filling auf 32 k Datenpunkten durchgeführt.

### **Stopped-flow 2D $^1\text{H}$ -HPLC-NMR-Spektren:**

Hierfür wurde entweder eine COSY oder TOCSY Pulssequenz verwendet. Alle Spektren wurden mit 2 k Datenpunkten in einem spektralen Bereich von 13500 Hz aufgenommen. 240 Experimente in F1-Dimension und 256 akkumulierte Transienten wurden aufgenommen. Vor der Fourier-Transformation mit 2 k Datenpunkten in beiden Dimensionen wurden die FIDs mit einer Sinusfunktion multipliziert. Die Spektren wurden basislinienkorrigiert.

### **Continuous-flow $^1\text{H}$ -HPLC-NMR-Spektren:**

Für die on-line continuous-flow Detektion wurden 128 Transienten mit 4 k Datenpunkten pro FID akkumuliert. Insgesamt wurden 75 Experimente in F1-Dimension aufgenommen.

---

Tocopherol-Homologe:

Für alle Aufnahmen der  $^1\text{H}$ -HPLC-NMR-Spektren wurden die Lösungsmittelsignale von Methanol bei 3,3 ppm und 4,7 ppm unterdrückt. Hierzu wurde zur Vorsättigung eine Shaped-Puls-Sequenz (Rechteckpulse mit einer Länge von 100 ms) mit einer Vorsättigungszeit von 1,6 s verwendet. Die Messtemperatur betrug 300 K. 256 Transienten mit jeweils 16 k Datenpunkten wurden bei einem spektralen Bereich von 7246 Hz pro FID addiert. Vor der Fourier-Transformation wurde ein Zero-Filling auf 32 k Datenpunkten und eine Multiplikation mit einer Exponentialfunktion mit 0,3 Hz Linienverbreiterung durchgeführt.

Flavonoid-Glycosylderivate:

Für alle Aufnahmen der  $^1\text{H}$ -HPLC-NMR-Spektren war eine Lösungsmittelunterdrückung notwendig. Hierfür wurde eine Shaped-Puls-Sequenz (Rechteckpulse mit einer Länge von 100 ms) für die Vorsättigung von 1,6 s der 2 Methanolsignale ( $\delta = 3,3$  ppm und  $\delta = 4,7$  ppm) verwendet. 2 k Transienten wurden mit 16 k Datenpunkten und einem spektralen Bereich von 9600 Hz akkumuliert. Vor der Fourier-Transformation wurde ein Zero-Filling auf 32 k Datenpunkten und eine Multiplikation mit einer Exponentialfunktion mit 0,3 Hz Linienverbreiterung durchgeführt.

---

## 8 Literatur

- [ 1 ] Löffler, G.; Petrides, P. E. (Eds) *Biochemie und Pathochemie*, 5. Aufl., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **1997**.
  - [ 2 ] Biesalski, H. K.; Schrezenmeir, J.; Weber, P.; Weiß, H. E. *Vitamine*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York **1997**.
  - [ 3 ] Biesalski, H. K. *Dt. Ärzteblatt* **1995**, 92, 2143.
  - [ 4 ] *FTE-Info* **1998**, 2, 18.
  - [ 5 ] ATBC Cancer Prevention Study Group, *N. Engl. J. Med.* **1994**, 330, 1029.
  - [ 6 ] Pelz, R.; Schmidt-Faber, B.; Hesecker, H.; *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 2612.
  - [ 7 ] Roodenburg, A. J. C.; Leenen, R.; Hof, K. H. V.; Weststrate, J. A.; Tijburg, L. B. M. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, 71 (5), 1187.
  - [ 8 ] Wolfender, J.-L.; Maillard, M.; Marston, M.; Hostettmann, K. *Phytochem. Anal.* **1992**, 3, 193.
  - [ 9 ] Harborne, J. B. (Ed.) *The Flavonoids - Advances in Research Since 1986*, Chapman & Hall, London, **1994**.
  - [ 10 ] Vilegas, J. H. Y.; Lanças, F. M.; Cervi, A. C. *Phytother. Res.* **1994**, 8, 241.
  - [ 11 ] Vilegas, W.; Sannomiya, M.; Rastrelli, L.; Pizza, C. *J. Agric. Food Chem.* **1999** in press.
  - [ 12 ] 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.
  - [ 13 ] Witting, L. A. *Free Radicals in Biology Vol. IV*, Academic Press, London, **1980**.
  - [ 14 ] Blomhoff, R.; Green, M. H.; Norum, K. R. *Ann. Rev. Nutr.* **1992**, 12, 37.
  - [ 15 ] Gey, K. F.; *Brit. Med. Bull.* **1993**, 49, 679.
  - [ 16 ] Mercadante, A. Z.; Steck, A.; Pfander, H. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 1050.
  - [ 17 ] Khachik, F.; Beecher, G. R.; Whittaker, N. F. *J. Agric. Food Chem.* **1986**, 34, 603.
-

- 
- [ 18 ] Glaser, T.; Dachtler, M.; Kohler, K.; Albert, K. *J. Nutr.* submitted for publication.
- [ 19 ] Sander, L. C.; Epler Sharpless, K.; Craft, N. E.; Wise, S. A. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1667.
- [ 20 ] Jucker, E. *Angew. Chem.* **1959**, *71*, 253.
- [ 21 ] Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds) *Carotenoids Vol. 3: Biosynthesis and Metabolism*, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, **1998**.
- [ 22 ] Böhm, V.; Bitsch, R. *GIT Labor-Fachzeitschrift* **1997**, *2*, 154.
- [ 23 ] Krinsky, N. I.; Russett, M. D.; Handelman, G. J.; Snodderly D. M. *J. Nutr.* **1990**, *120*, 1654.
- [ 24 ] Khachik, F.; Spangler, C. J.; Smith, J. C. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 1873.
- [ 25 ] Krinsky, N. *Pure Appl. Chem.* **1979**, *41*, 649.
- [ 26 ] Dachtler, M. *Retina aktuell* **1998**, *69*, 20.
- [ 27 ] Glaser, T.; Dachtler, M.; Albert, K. *GIT Labor-Fachzeitschrift* **1999**, *43*, 904.
- [ 28 ] Bone, R. A.; Landrum, J. T.; Friedes, L. M.; Gomez, C. M.; Kilburn, M. D.; Menendez, E.; Vidal, I.; Wang, W. *Exp. Eye Res.* **1997**, *64*, 211.
- [ 29 ] Brücher, H. *Tropische Nutzpflanzen*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **1977**.
- [ 30 ] Kelly, D. R.; Edwards, A. A.; Parkinson, J. A.; Olovsson, G.; Trotter, J.; Jones, S.; Malik, A. K. M.; Hursthouse, M. B.; Hibbs, D. E. *J. Chem. Research* **1996**, 446.
- [ 31 ] Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds) *Carotenoids Vol. 1, Isolation and Analysis*, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, **1995**.
- [ 32 ] 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. Am. Med. Assoc.* **1994**, *18*, 1413.
- [ 33 ] Hammond, B. R.; Johnson, E. J.; Russell, R. M.; Krinsky, N. I.; Yeum, K.; Edwards, R. B.; Snodderly, D. M. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **1997**, *38*, 1795.
- [ 34 ] Greyn, F.; Leydhecker, W. *Augenheilkunde*, 26. Aufl., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **1995**.
- [ 35 ] Snodderly, D. M. *Am. J. Clin. Nutr.* **1995**, *62*, 1448.
- [ 36 ] Schalch, W. *Free Radicals and Aging* (I. Emerit, B. Chance, Eds.), Birkhäuser Verlag Basel, Boston, Berlin, **1992**.
-

- 
- [ 37 ] Vingerling, J. R.; Klaver, C. W.; Hofman, A.; de Jong, P. T. *Epidemiol. Rev.* **1995**, *17*, 347.
- [ 38 ] Leonhardt, H. *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*, 8. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1990**.
- [ 39 ] Faller, A. *Der Körper des Menschen*, 10. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1984**.
- [ 40 ] Schmidt, R. F.; Thews, G. *Physiologie des Menschen*, 23. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **1987**.
- [ 41 ] Khachik, F.; Bernstein, P. S.; Garland, D. L. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **1997**, *38*, 1802.
- [ 42 ] Eye Disease Case-Control Study Group, *Arch. Ophthalmol.* **1993**, *111*, 104.
- [ 43 ] Sommerburg, O.; Keunen, J. E. E.; Bird, A. C.; van Kuijk, F. J. G. M. *J. Ophthalmol.* **1998**, *82*, 907.
- [ 44 ] Stahl, W.; Nicolai, S.; Briviba, K.; Hanusch, M.; Broszeit, G.; Petres, M.; Martin, H.-D.; Sies, H. *Carcinogenesis* **1997**, *18*, 89.
- [ 45 ] Falbe, J.; Regitz, M. (Eds) *Römpp Chemie Lexikon*, 9. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1995**.
- [ 46 ] Hamilton, R. J.; Kalu, C.; McNeill, G. P.; Padley, F. B.; Pierce, J. H. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **1998**, *75*, 813.
- [ 47 ] Behrens, W. A.; Thompson, J. N.; Madere, R. *Am. J. Clin. Nutr.* **1982**, *35*, 691.
- [ 48 ] *Der Deutsche Apotheker* **1997**, *5*, 128.
- [ 49 ] Liede, K. E.; Haukka, J. K.; Saxen, L. M.; Heinonen, O. P. *Ann. Med.* **1998**; *30*, 542.
- [ 50 ] Finger, A., Kuhr, S.; Engelhardt, U. H. *J. Chromatogr.* **1992**, *624*, 293.
- [ 51 ] Watson, D. G.; Oliveira, E. J. *J. Chromatogr. B* **1999**, *723*, 203.
- [ 52 ] Sannomiya, M.; Vilegas, W.; Rastrelli, L.; Pizza, C. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 237.
- [ 53 ] Wolfender, J.-L.; Rodriguez, S.; Hostettmann, K. *J. Chromatogr. A* **1998**, *794*, 299.
- [ 54 ] Vilegas, J. H. Y.; Lanças, F. M.; Wauters, J. N.; Angenot, L. *Phytochem. Anal.* **1998**, *9*, 263.
- [ 55 ] Andrade, F. D. P.; Dachtler, M.; Santos, L. C.; Albert, K.; Vilegas, W. *Chromatographia*, submitted for publication.
- [ 56 ] Berrueta, L. A.; Gallo, B.; Vicente, F. *Chromatographia*, **1995**, *40*, 474.
-

- 
- [ 57 ] Van Horne, K. C. *Handbuch der Festphasenextraktion*, 1. Aufl., ict GmbH, 1993.
- [ 58 ] Dachtler, M.; Kohler K.; Albert, K. *J. Chromatogr. B* **1998**, 720, 211.
- [ 59 ] Barker, S. A. *LC GC International*, **1998**, 11, 719.
- [ 60 ] Tolls, J.; Haller, M.; Sijm, D. T. *Anal. Chem.* **1999**, 71, 5242.
- [ 61 ] Zhao, M.; van-der-Wielen, F.; de-Voogt, P. *J. Chromatogr.* **1999**, 837, 129.
- [ 62 ] Barker, S. A.; Long, A. R.; Short, C. R. *J. Chromatogr.*, **1989**, 475, 353.
- [ 63 ] Tswett, M. S. *Ber. Deut. Botan. Ges.* **1906**, 24, 322.
- [ 64 ] Meyer, V. R. *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*, 7. Aufl., Salle und Sauerländer Verlag, Frankfurt am Main, **1992**.
- [ 65 ] Emenhiser, C.; Sander, L. C.; Schwartz, S. J. *J. Chromatogr. A* **1995**, 707, 205.
- [ 66 ] Pursch, M.; Strohschein, S.; Händel, H.; Albert, K. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 386.
- [ 67 ] Bachmann, S. Diplomarbeit, Universität Tübingen, **1998**.
- [ 68 ] Albert, K.; Ellwanger, A.; Dachtler, M.; Lacker, T.; Strohschein, S.; Wegmann, J.; Pursch, M.; Raitza, M. *Fundamentals and Applied Aspects of Chemically Modified Surfaces*, Vol. 7 (J. Blitz, C. Little, Eds.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1999**.
- [ 69 ] Raitza, M.; Pursch, M.; Strohschein, S.; Albert, K.; Sander, L. C. *GIT Laboratory Journal*, **1998**, 4, 237.
- [ 70 ] Albert, K.; Lacker, T.; Raitza, M.; Pursch, M.; Egelhaaf, H. J.; Oelkrug, D. *Angew. Chem.* **1998**, 110, 809.
- [ 71 ] Albert, K. Habilitationsschrift, Universität Tübingen, **1988**.
- [ 72 ] Lindon, J. C.; Nicholson, J. K.; Wilson I. D. *Adv. Chromatogr.* **1996**, 36, 315.
- [ 73 ] Lehmann, W. D. *Massenspektrometrie in der Biochemie*, 1. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, **1996**.
- [ 74 ] Budzikiewicz, H. *Massenspektrometrie*, 3. Aufl., VCH Verlag, **1992**.
- [ 75 ] Van Breemen, R. B. *Anal. Chem.* **1995**, 67, 2004.
- [ 76 ] Niessen, W. M. A.; van der Greef, J. *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry*. Marcel Dekker, New York, 1992.
- [ 77 ] Wolfender, J.-L.; Maillard, M.; Hostettmann, K. *Phytochem. Anal* **1994**, 5, 152.
- [ 78 ] Rentel, C.; Strohschein, S.; Albert, K.; Bayer, E.; *Anal. Chem.* **1998**, 70, 4394.
- [ 79 ] Careri, M.; Mangia, A.; Musci, M. *J. Chromatogr. A* **1998**, 794, 263.
-

- [ 80 ] Guglielmi, H.; Dachtler, M.; Albert, K. *Z. Naturforsch.* **1999**, 54b, 1055.
- [ 81 ] Lindquist, D. M.; Dachtler, M.; Hawk, R. M.; Karson, C. N.; Albert, K.; Komoroski, R. A. *Magn. Reson. Med.* **2000**, 43, 756.
- [ 82 ] Albert, K. *Trends Anal. Chem.* **1998**, 17, 648.
- [ 83 ] Strohschein, S.; Pursch, M.; Händel, H.; Albert, K. *Fres. J. Anal. Chem.* **1997**, 357, 498.
- [ 84 ] Albert, K. *J. Chromatogr. A* **1995**, 703, 123.
- [ 85 ] Dachtler, M.; Glaser, T.; Händel, H.; Lacker, T.; Tseng L.-H.; Albert, K. *Encyclopedia of Separation Science*, London, in press.
- [ 86 ] Bäuml, F.; Welsch, T. *Chemie in Labor und Biotechnik* **1998**, 49, 388.
- [ 87 ] Dittmann, M. M.; Wienand, K.; Beck, F.; Rozing, G. P. *LC-GC* **1995**, 13, 800.
- [ 88 ] Colón, L. A.; Reynolds, K. J.; Alicea-Maldonado, R.; Fermier, A. M. *Electrophoresis* **1997**, 18, 2162.
- [ 89 ] Pesek, J. J.; Matyska, M. T. *Electrophoresis* **1997**, 18, 2228.
- [ 90 ] Altria, K. D.; Smith, N. W.; Turnbull, C. H. *Chromatographia*, **1997**, 46, 664.
- [ 91 ] Robson, M. M.; Cikalo, M. G.; Myers, P.; Euerby, M. R.; Bartle, K. D. *J. Microcol. Sep.* **1997**, 9, 357.
- [ 92 ] Pretorius, V.; Hopkins, B. J.; Schieke, J. D. *J. Chromatogr.* **1974**, 99, 23.
- [ 93 ] Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D. *J. Chromatogr.* **1981**, 218, 209.
- [ 94 ] Tsuda, T.; Nomura, K.; Nakagawa, G. J. *J. Chromatogr.* **1981**, 248, 241.
- [ 95 ] Eimer, T.; Unger, K. K.; Tsuda, T. *Fres. J. Anal. Chem.* **1995**, 352, 649.
- [ 96 ] Behnke, B.; Bayer, E. *J. Chromatogr. A* **1994**, 680, 93.
- [ 97 ] Boughtflower, R. J.; Underwood, T.; Maddin, J. *Chromatographia* **1995**, 41, 398.
- [ 98 ] Robson, M. M.; Roulin, S.; Shariff, S. M.; Raynor, M. W.; Bartle, K. D.; Clifford, A. A.; Myers, P.; Euerby, M. R.; Johnson, C. M. *Chromatographia* **1996**, 43, 313.
- [ 99 ] Dulay, M. T.; Yan, C.; Rakestraw, D. J.; Zare J. *J. Chromatogr. A* **1996**, 725, 361.
- [ 100 ] Cortes, H. J.; Pfeiffer, C. D.; Richter, B. E.; Stevens, T. S. *J. High Res. Chromatogr. Comm.* **1987**, 10, 446.
- [ 101 ] Schmid, M.; Bäuml, F.; Köhne, A. P.; Welsch, T. *J. High Resol. Chromatogr.*
-

**1999**, 22, 438.

- [ 102 ] Behnke, B.; Grom, E.; Bayer, E. *J. Chromatogr. A* **1995**, 716, 207.
- [ 103 ] Pesek, J. J.; Matyska, M. T. *J. Chromatogr. A* **1996**, 736, 255.
- [ 104 ] Guo, Y.; Colón, L. A. *Anal. Chem.* **1995**, 67, 2511.
- [ 105 ] Strohschein, S.; Pursch, M.; Lubda, D.; Albert, K. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 13.
- [ 106 ] Albert, K.; Dachtler, M.; Glaser, T.; Händel, H.; Lackner, T.; Schlotterbeck, G.; Strohschein, S.; Tseng, L.-H. *J. High Resol. Chromatogr.* **1999**, 22, 135.
- [ 107 ] Dachtler, M.; Händel, H.; Lindquist, D.; Hawk, R. M.; Craig, K. N.; Komoroski, R. A.; Albert, K. *Magn. Reson. Chem.* submitted for publication.
- [ 108 ] Dachtler, M.; Glaser, T.; Kohler, K.; Albert, K. *Retina aktuell*, **1999**, 74, 7.
- [ 109 ] Tang, G.; Andrien, B. A.; Dolnikowski, G. G.; Russell R. M. *Methods Enzymol.* **1997**, 282, 140.
- [ 110 ] Lackner, T.; Strohschein, S.; Albert, K. *J. Chromatogr. A* **1999**, 854, 37.
- [ 111 ] Van Breemen, R. B.; Huang, C.-R.; Tan, Y.; Sander, L. C.; Schilling, A. B. *J. Mass. Spectrom.* **1996**, 31, 975.
- [ 112 ] Englert, G. NMR of Carotenoids. In *Carotenoids Vol. 1B*, Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H., Eds.; Birkhäuser Verlag Basel, **1995**, 147.
- [ 113 ] Dachtler, M.; Glaser, T.; Kohler, K.; Albert, K. *Anal. Chem.*, submitted for publication:
- [ 114 ] Carlini, E. A. CEME/AFIF, **1988**.
- [ 115 ] Vilegas, W.; Vilegas, J. H. Y.; Dachtler, M.; Glaser, T.; Albert, K. *Phytochem. Anal.* in press.
- [ 116 ] Verpoorte, R.; Niessen, W. M. A. *Phytochem. Anal.* **1994**, 5, 217.
- [ 117 ] Albert, K.; Schlotterbeck, G.; Tseng, L.-H.; Braumann, U. *J. Chromatogr. A* **1996**, 750, 303.
- [ 118 ] Zechmeister, L. *Cis-trans isomeric Carotenoids, Vitamin A and Arylpolyenes*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **1962**.
-

Meine akademischen Lehrer waren:

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

# Lebenslauf

Markus Dachtler

18. Oktober 1972

Saulgau

ledig

deutsch

## Ausbildung

1979 - 1983	Grundschule Saulgau
1983 - 1992	Störk-Gymnasium Saulgau
22. Mai 1992	Allgemeine Hochschulreife
1992 - 1998	Chemiestudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
05. Oktober 1994	Vordiplom in Chemie
Aug. 1997 – Jan. 1998	Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen bei Herrn Prof. Dr. K. Albert: „Strukturbestimmung von Carotinoid-Stereoisomeren aus der Retina mittels HPLC-NMR-Kopplung“
22. Januar 1998	Abschluß: Diplom-Chemiker
seit Februar 1998	Dissertation am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. K. Albert über das Thema „Direktkopplung moderner Extraktions- und Trenntechniken mit der NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie zur Strukturaufklärung biomedizinisch wirksamer Inhaltsstoffe“