

**Miniaturisierte direktgekoppelte Analysensysteme
zur Strukturaufklärung von Carotinoiden und
Bestimmung der Bioverfügbarkeit von
markiertem Lutein**

DISSERTATION

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

2005

vorgelegt von
Karsten Putzbach

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Dezember 2004

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Professor Dr. S. Laufer

Professor Dr. K. Albert

Professor Dr. V. Schurig

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. Klaus Albert im Zeitraum von Juli 2002 bis Dezember 2004 durchgeführt.

Bei Herrn Professor Dr. Klaus Albert möchte ich mich sehr herzlich bedanken für die interessante Themenstellung, sein stetiges Interesse an meiner wissenschaftlichen Arbeit und für die Bereitstellung der optimalen Ausstattung zur Durchführung dieser Arbeit. Zudem gab er mir die Möglichkeit, mein Wissen durch einen Forschungsaufenthalt in den USA zu vertiefen und meine erzielten Ergebnisse auf zahlreichen nationalen und internationalen Tagungen zu präsentieren.

Mein Dank gilt allen meinen Freunden, Kollegen und Kooperationspartnern, ohne deren Unterstützung die erfolgreiche Fertigstellung der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Besonders möchte ich mich bedanken bei:

Manfred Krucker für die sehr freundschaftliche und perfekte Zusammenarbeit und Arbeitsteilung, sowie die unzähligen wissenschaftlichen Diskussionen und außeruniversitären Unternehmungen.

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

Bei Petra Hentschel für die Unterstützung bei den Experimenten und Auswertung für die Strukturermittlung von Staphyloxanthin aus *Staphylococcus aureus*.

Meinen Kollegen Marc-David Grynbaum, Christoph Meyer, Siri Schauf, Norbert Welsch für die Hilfsbereitschaft bei allen Fragen und Problemen, sowohl fachlicher als auch organisatorischer Natur, sowie das freundschaftliche Arbeitsklima.

Den ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Dr. Gerd Fischer, Dr. Heidrun Händel, Dr. Annette Lienau, Dr. Urban Skogsberg und Dr. Daniel Zeeb für die Hilfestellung bei der Einarbeitung in die Thematik.

Prof. Friedrich Götz und Sascha Pelz für die Zusammenarbeit bei der Strukturermittlung von Staphyloxanthin aus *Staphylococcus aureus*.

Prof. Hong-Bin Xiao für die Zusammenarbeit bei der Analyse des *Radix astragali*.

Prof. Andrew Webb für die Einweisung und Hilfe bei der Herstellung eines solenoiden NMR-Mikroprobenkopfes.

Dr. Guangwen Tang, Dr. Robert M. Russell, Dr. Norman Krinsky, Dr. Gregory Dolnikowski und Jian Qin für die herzliche Aufnahme und Gastfreundschaft am Human Nutrition Research Center der Tufts University, Boston, USA.

Der Firma Bischoff Chromatography für die Bereitstellung unterschiedlichster stationärer Phasen zur Verwendung in der Kapillar-HPLC.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester Sabine und meinen Freunden für ihre uneingeschränkte Unterstützung während des gesamten Studiums.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	PROBLEMSTELLUNG	2
3	CAROTINOIDE ALS BIOLOGISCH AKTIVE INHALTSSTOFFE	3
3.1	Allgemeines	3
3.1.1	<i>Strukturen</i>	3
3.1.2	<i>Vorkommen</i>	7
3.1.3	<i>Biosynthese</i>	7
3.2	Staphyloxanthin aus <i>Staphylococcus aureus</i>	9
3.2.1	<i>Allgemeines</i>	9
3.2.2	<i>Biosynthese von Staphyloxanthin</i>	9
3.3	Carotinoide in der Prävention	11
3.3.1	<i>Allgemeines</i>	11
3.3.2	<i>Protektive Wirkungen von Carotinoiden</i>	12
3.3.3	<i>Bioverfügbarkeit von Carotinoiden</i>	14
3.3.4	<i>Bestimmung der absoluten Bioverfügbarkeit von Carotinoiden</i>	15
4	ANALYTIK VON CAROTINOIDEN AUS BIOLOGISCHEN MATRICES	17
4.1	Schonende Extraktion instabiler Analyten	17
4.1.1	<i>Flüssig-Flüssig-Extraktionstechniken</i>	18
4.1.2	<i>Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD)</i>	19
4.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	21
4.2.1	<i>HPLC-Grundlagen</i>	21

4.2.2	<i>Miniaturisierung in der HPLC</i>	22
4.3	Grundlagen moderner Kopplungsmethoden	25
4.3.1	<i>HPLC-UV-Kopplung</i>	25
4.3.2	<i>HPLC-APCI/MS-Kopplung</i>	27
4.3.3	<i>Kapillar-HPLC-NMR-Kopplung</i>	28
4.3.3.1	Experimenteller Aufbau.....	29
4.3.3.2	Mikroprobenkopf-NMR gekoppelt mit der Kapillar-HPLC..	30
4.3.3.3	Anforderungen an die Chromatographie	32
5	ERGEBNISSE	36
5.1	Herstellung von hocheffizienten Kapillartrennsäulen	36
5.1.1	<i>Optimierung der Endfitting-Technik für Kapillartrennsäulen</i>	37
5.1.2	<i>Optimierung des Packprozesses für partikuläre stationäre Phasen</i>	39
5.1.3	<i>Ermittlung der Trennleistung von Kapillartrennsäulen</i>	41
5.2	Kapillar-HPLC-NMR-System Sensitivität	42
5.2.1	<i>Bestimmung der Bandenverbreiterung in der Transferkapillare</i>	42
5.2.2	<i>Simulation der Durchströmung einer Kapillar-NMR-Detektionszelle</i>	45
5.2.3	<i>Bestimmung der Sensitivität des Kapillar-HPLC-NMR-Systems</i>	50
5.3	Trennung und Identifizierung von Carotinoiden aus Spinat mittels Kapillar-HPLC-NMR-Kopplung	51
5.3.1	<i>Etablierung der Kapillar-HPLC-Trennung</i>	51
5.3.2	<i>Kapillar-HPLC-NMR-Messungen des Carotinoid-Standards</i>	52
5.3.3	<i>Kapillar-HPLC-NMR-Messungen eines Spinat MSPD-Extraktes</i>	59
5.4	Untersuchungen zur Struktur und Bioverfügbarkeit von Carotinoiden aus intrinsisch markiertem Gemüse	62
5.4.1	<i>Aufzucht der intrinsisch markierten Gemüsesorten</i>	63

5.4.2	<i>Strukturermittlung der partiell deuterierten Carotinoide aus intrinsisch markiertem Gemüse</i>	63
5.4.2.1	Probenvorbereitung und Aufreinigung der partiell deuterierten Carotinoide	64
5.4.2.2	HPLC-APCI/MS Untersuchungen der partiell deuterierten Carotinoide	66
5.4.2.3	¹ H-NMR Untersuchungen der partiell deuterierten Carotinoide	68
5.4.3	<i>Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Lutein aus intrinsisch markiertem Spinat</i>	77
5.4.3.1	Design der Studie	77
5.4.3.2	Analyse des für die Bioverfügbarkeitsstudie verwendeten Spinats	78
5.4.3.3	Untersuchung zur Anreicherung von Lutein aus intrinsisch markiertem Spinat mittels HPLC-UV- und HPLC-APCI/MS-Kopplung	79
5.5	Strukturermittlung von Staphyloxanthin aus <i>Staphylococcus aureus</i>	85
5.5.1	<i>NMR-spektroskopische Experimente</i>	86
5.5.1.1	Interpretation der Carotinoidteilstruktur	87
5.5.1.2	Interpretation der Zuckerteilstruktur	91
5.5.1.3	Interpretation der Fettsäureteilstruktur	93
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	96
7	EXPERIMENTELLER TEIL	99
7.1	Geräte	99
7.1.1	<i>HPLC- und Kapillar-HPLC-Anlagen</i>	99
7.1.2	<i>Herstellung von Kapillartrennsäulen</i>	99
7.1.3	<i>Massenspektrometer</i>	100
7.1.4	<i>NMR-Spektrometer</i>	100
7.2	Chemikalien	101

7.3	Probenvorbereitung und Extraktion.....	102
7.3.1	<i>Carotinoid-Standards.....</i>	<i>102</i>
7.3.2	<i>Zucht von intrinsisch markiertem Gemüse und Extraktion der Carotinoide.....</i>	<i>102</i>
7.3.3	<i>Extraktion von Carotinoiden aus Serumproben.....</i>	<i>103</i>
7.3.4	<i>Extraktion von Staphyloxanthin aus Staphylococcus aureus.....</i>	<i>104</i>
7.4	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	104
7.4.1	<i>Chromatographische Bedingungen.....</i>	<i>104</i>
7.5	HPLC-MS-Experimente	106
7.6	NMR-Spektroskopie	106
7.6.1	<i>Flow-Injektion-NMR-Experimente.....</i>	<i>106</i>
7.6.2	<i>Kapillar-HPLC-NMR-Kopplungsexperimente.....</i>	<i>106</i>
7.6.3	<i>Hochauflösungs-NMR-Spektroskopie</i>	<i>107</i>
8	LITERATUR	109

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	Trennfaktor
δ	Chemische Verschiebung
1D	Eindimensional
2D	Zweidimensional
A-D-Wandler	Analog-Digital-Wandler
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
ATBC	Alpha-Tocopherol Beta-Carotene Cancer Prevention Trial
AUC	Area Under Curve
BHT	Butylated Hydroxytoluene
CapLC	Kapillar-HPLC
CARET	Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial
COSY	Correlated Spectroscopy
d	Day, Tag
DAD	Dioden-Array UV-Detektor
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
D ₂ O	Deuteriumoxid
ESI	Electrospray Ionisierung
FID	Free Induction Decay, freier Induktionsabfall
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
h	Hour, Stunde
H ₂ O	Wasser
HDL	High Density Lipoprotein
HETP	Höhenequivalent eines theoretischen Bodens
HNRC	Human Nutrition Research Center
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
I.D.	Innendurchmesser
IPP	Isopentylpyrophosphat
k'	Retentionsfaktor
K	Kelvin

LC	Liquid Chromatography, Flüssigkeitschromatographie
LDL	Low Density Lipoprotein
LLE	Liquid Liquid Extraction
l/min	Liter pro Minute
M	Molar (mol/l)
MeOH	Methanol
Min	Minute
MS	Mass Spectrometry, Massenspektrometrie
MSPD	Matrix Solid Phase Dispersion
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungs Verhältnis, Mass-Charge Ratio
M/MW	Molekulargewicht
N	Anzahl an theoretischen Böden
nl	Nanoliter
NMR	Nuclear Magnetic Resonance, Kernresonanz-Spektroskopie
NP	Normal Phase, Normalphasen
Ppm	Parts per Million
ROS	Reactive Oxygen Species, reaktive Sauerstoff-Spezies
RP	Reversed Phase, Umkehrphasen
S	Standardabweichung
SIC/EIC/TIC	Selected/Extracted/Total Ion Chromatogram
S/N	Signal-zu-Rausch Verhältnis, Signal-to-Noise Ratio
SPE	Solid Phase Extraction, Festphasenextraktion
THF	Tetrahydrofuran
U/min	Umdrehungen pro Minute
USDA	United States Department of Agriculture
UV	Ultraviolett
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

1 Einleitung

Immer mehr klinische Studien in den letzten Jahren befassen sich mit sekundären Pflanzenwirkstoffen. Sehr häufig treten Korrelationen zwischen einer erhöhten Aufnahme dieser Substanzen und z.B. einem reduzierten Krebsrisiko auf. Diese Studien ergeben auch für andere Volkskrankheiten, wie die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen, positive gesundheitliche Effekte. Diese sind hauptsächlich auf die antioxidativen Eigenschaften dieser Substanzen zurückzuführen. Neben den Vitaminen zeichnen sich die Substanzklassen der Flavonoide und Carotinoide durch gleiche Fähigkeiten aus.

In den ursprünglichen Studien zur Wirkungsweise der Carotinoide wurde am Beispiel des β -Carotins die Spaltung des Moleküls in Vitamin A untersucht. Dabei zeigten sich jedoch immer häufiger die antioxidativen Eigenschaften dieser Substanzklasse, was zu einer teilweisen Neuausrichtung der klinischen Studien führte.

Die Identifizierung dieser sekundären Pflanzenstoffe in den unterschiedlichsten Nahrungsmitteln stellt bis heute enorme Anforderungen an die verwendeten Analysensysteme. Sie treten zum Teil nur im Spurenbereich auf und sind sehr licht- und luftempfindlich. Für die Untersuchungen muss deshalb eine moderne maßgeschneiderte Analytik verwendet werden. Hierfür ist eine besonders schonende und sehr sorgfältige Extraktionstechnik notwendig, die spezifisch auf die Analyten, die Probenmatrix und die verwendete Detektionsmethode angepasst ist. Die on-line Kopplung der chromatographischen Trennung mit einem spektroskopischen bzw. spektrometrischen Detektor reduziert zudem die Möglichkeit der Artefaktbildung oder Isomerisierung der untersuchten Analyten. Die Kopplung der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) mit der kernmagnetischen Resonanzspektroskopie (NMR) kommt dabei vorwiegend bei der Strukturaufklärung zum Einsatz^[1] und die Kopplung mit der Massenspektrometrie (MS) beim Nachweis von sehr geringen Analytmengen. Den geringen Proben- und Analytmengen wird durch die Miniaturisierung dieses „hyphenated systems“ Rechnung getragen.

2 Problemstellung

Diese Arbeit setzt sich aus unterschiedlichen Teilprojekten zusammen, die durch die verwendeten Analyten eng miteinander verknüpft sind.

Das erste Teilprojekt befasst sich mit der Optimierung der miniaturisierten Trenntechnik Kapillar-HPLC unter Verwendung eines speziell entwickelten solenoiden NMR Mikroprobenkopfes. Das on-line System soll dabei vor allem in Bezug auf Robustheit und Reproduzierbarkeit weiterentwickelt werden. Neben der chromatographischen Trennung und spektroskopischen Detektion muss auch die Probenvorbereitung an die geringen Proben- und Analytmengen angepasst werden. Diese Optimierungen sollen am Beispiel der Analytik von Carotinoide aufgezeigt und anhand einer Realprobe auf die Praxistauglichkeit überprüft werden. Für die Trennung der Carotinoide werden selbst hergestellte C₃₀-Kapillarsäulen verwendet, da diese bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht kommerziell erhältlich sind.

Ein weiteres Teilprojekt ist die Bestimmung der absoluten Bioverfügbarkeit von Lutein aus intrinsisch markiertem Spinat. Dieses gliedert sich wiederum in zwei Gebiete; zum einen in die Strukturbestimmung des deuterierten Carotinoids mittels Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie und zum anderen in die Bestimmung der Bioverfügbarkeit in einer klinischen Studie. Die erreichte Empfindlichkeitssteigerung durch die Entwicklung des solenoiden Mikroprobenkopfes soll anhand der Strukturaufklärung des markierten Carotinoids mit einer sehr geringen Analytmenge gezeigt werden. Die Deuterierung des Luteins wiederum soll eine Unterscheidung zwischen endogenem Lutein aus dem Serum und markiertem Lutein aus der Supplementierung ermöglichen, wodurch schließlich die absolute Bioverfügbarkeit berechnet werden kann.

Das Ziel des letzten Projektes ist die Strukturaufklärung von biotechnologisch gewonnenem Staphyloxanthin aus *Staphylococcus aureus* mit Hilfe der NMR-Spektroskopie. Dieses Carotinoid ist seit längerer Zeit bekannt, die postulierte Struktur konnte aber bislang noch nicht bestätigt werden.

3 Carotinoide als biologisch aktive Inhaltsstoffe

3.1 Allgemeines^{[2],[3],[4]}

Der Begriff Carotinoide fasst eine Gruppe von etwa 600 in der Natur vorkommende Farbstoffe zusammen, die den „sekundären Pflanzenstoffen“ zugeordnet werden und deren wichtigster und bekanntester Vertreter das β -Carotin (Provitamin A) ist. Als sekundäre Pflanzenstoffe bezeichnet man Mikronährstoffe, die in geringen Mengen in pflanzlichen Nahrungsmitteln vorkommen. Neben den Carotinoiden gehören zum Beispiel auch Polyphenole und Flavonoide zu dieser Stoffklasse. Sie sind unter anderem verantwortlich für die Farbe der Nahrungsmittel und tragen auch zu deren Geschmack bei. Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass viele von ihnen eine positive Wirkung auf die menschliche Gesundheit besitzen.

3.1.1 Strukturen

Das Grundgerüst der C_{40} -Carotinoide besteht aus acht Isopren-Einheiten und sie werden der Substanzklasse der Tetraterpene zugeordnet. In der Regel sind sie pflanzlichen Ursprungs, können aber auch von einigen Bakterien und Pilzen gebildet werden. Unterschieden werden die Carotinoide (Oberbegriff der Gruppe) in Carotine (reine Kohlenwasserstoffe) und Xanthophylle (sauerstoffhaltige Derivate).

Im Jahr 1826 wurde als erstes Carotinoid das β -Carotin von Wackenroder aus Möhren extrahiert. Willstätter konnte 1907 die Summenformel ermitteln und Karrer 1930 die Konstitutionsformel aufklären. Die synthetische Herstellung des wichtigsten Vertreters β -Carotin gelang erstmals 1950^[5].

Alle C_{40} -Carotinoide bestehen aus einer olefinischen Kette der Formel $C_{22}H_{26}$, an dessen beide Enden je eine Carotinoid-Endgruppe angebaut ist^[6]. Entsprechen beide Endgruppen einem acyclischen ψ -Rest, so erhält man das Lycopin mit der Summenformel $C_{40}H_{56}$, von dem sich formal alle anderen ableiten. Durch Hydrierung, Dehydrierung, Cyclisierung oder den Einbau von funktionellen Gruppen, wie Hydroxyl-, Carbonyl- oder Epoxygruppen, entstehen die anderen Carotinoide. In Abbildung 1 sind die Strukturen der wichtigsten C_{40} -Carotinoide dargestellt. Die lange

Polyenkette der Carotinoide besteht aus neun bis elf konjugierten Doppelbindungen, welche für die typischen Farben von gelb bis tiefrot verantwortlich sind.

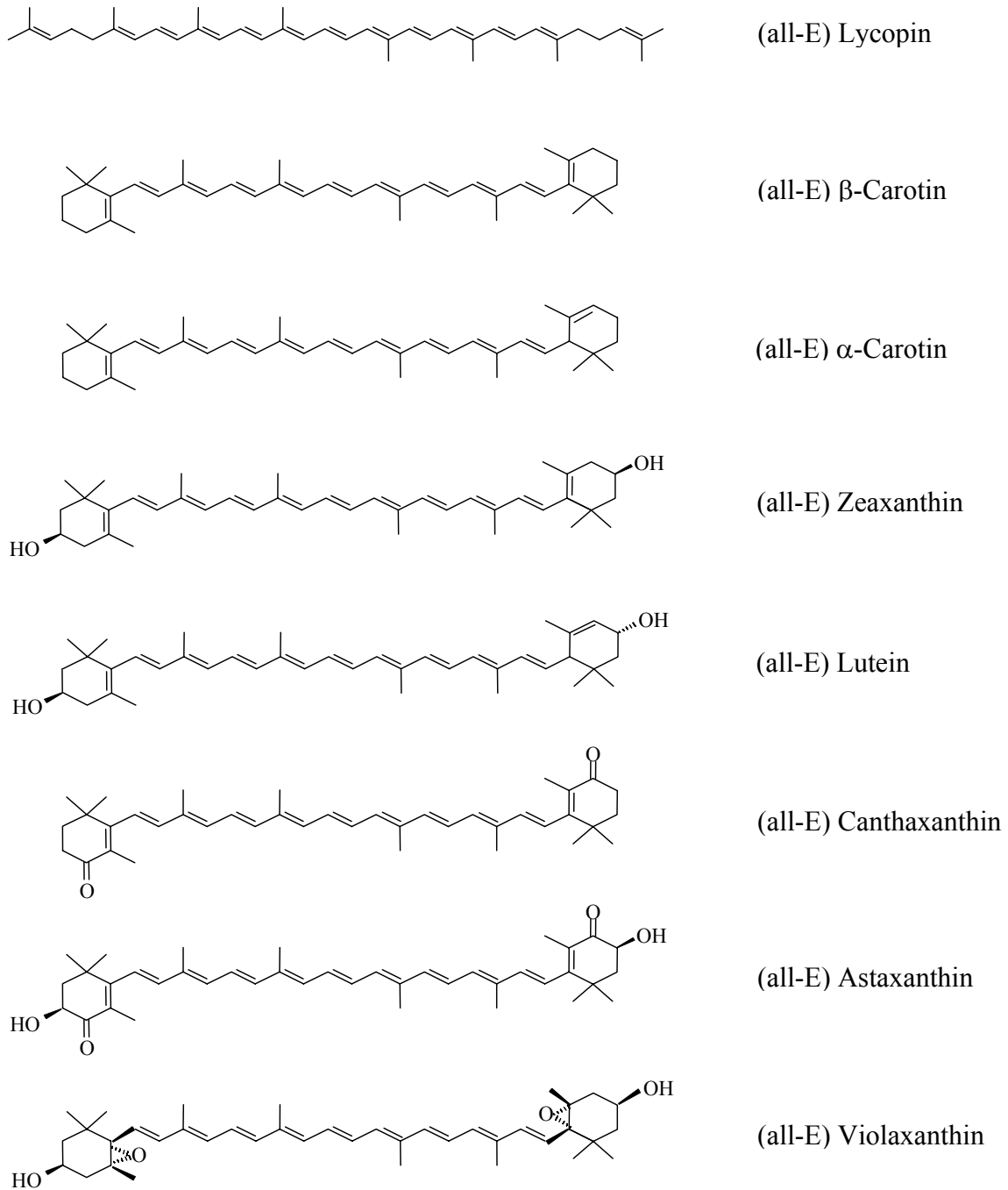


Abbildung 1: Strukturen der wichtigsten C_{40} -Carotinoide.

Neben der bereits erwähnten Einteilung in Carotine und Xanthophylle gibt es noch eine weitere Möglichkeit der Klassifizierung, in symmetrische (z.B. Lycopin, β -Carotin, Astaxanthin) und asymmetrische (z.B. α -Carotin, Lutein) Carotinoide.

Besitzen die Carotinoide ein stereogenes Zentrum, wie zum Beispiel die asymmetrischen Carotinoide oder Carotinoide mit Hydroxyl- oder Epoxygruppen, muss zur zweifelsfreien Benennung die R,S-Nomenklatur nach Cahn, Ingold und Prelog (CIP-System) angewandt werden^[7]. Das Zeaxanthin-Molekül mit seinen zwei Hydroxylgruppen an den Iononringen hat deshalb zwei stereogene Zentren. Durch die zentrosymmetrische Struktur des Moleküls ergeben sich drei optische Isomere (3R,3'R; Meso und 3S,3'S) für die natürliche (all-E) Anordnung. Lutein hingegen besitzt durch seine asymmetrische Struktur drei stereogene Zentren und somit acht optische Isomere, wobei das natürliche Isomer das (all-E) 3R,3'R,6'R-Lutein ist^[8].

Neben den in Abbildung 1 gezeigten Carotinoiden mit einer all-trans-(all-E) Konfiguration der olefinischen Kette existieren auch mehrere geometrische Isomere mit einer oder mehreren Z-(cis) Anordnungen. Diese Z-Isomere können sich unter dem Einfluss von Licht, Wärme oder auch Sauerstoff bilden. In Abbildung 2 sind beispielhaft die Hauptstereoisomere von Lutein und Zeaxanthin graphisch dargestellt. Das zentrosymmetrische Zeaxanthin-Molekül besitzt zwei sterisch bevorzugte Z-Isomere in 9- und 13-Stellung.

Lutein hingegen weist zwei unterschiedliche Ionon-Ringe auf und ist somit unsymmetrisch, daher ergibt sich auch die doppelte Anzahl an Z-Isomeren. Neben dem 9- und 13-Z Lutein treten noch 9'- und 13'-Z Lutein auf.

Lycopin zeigt eine noch höhere Tendenz zur Isomerisierung und besitzt zusätzlich weitere Z-Isomere. Weiterhin existieren bei Lycopin noch diverse ZZ- bzw. ZZZ-Isomere^{[9],[10]}.

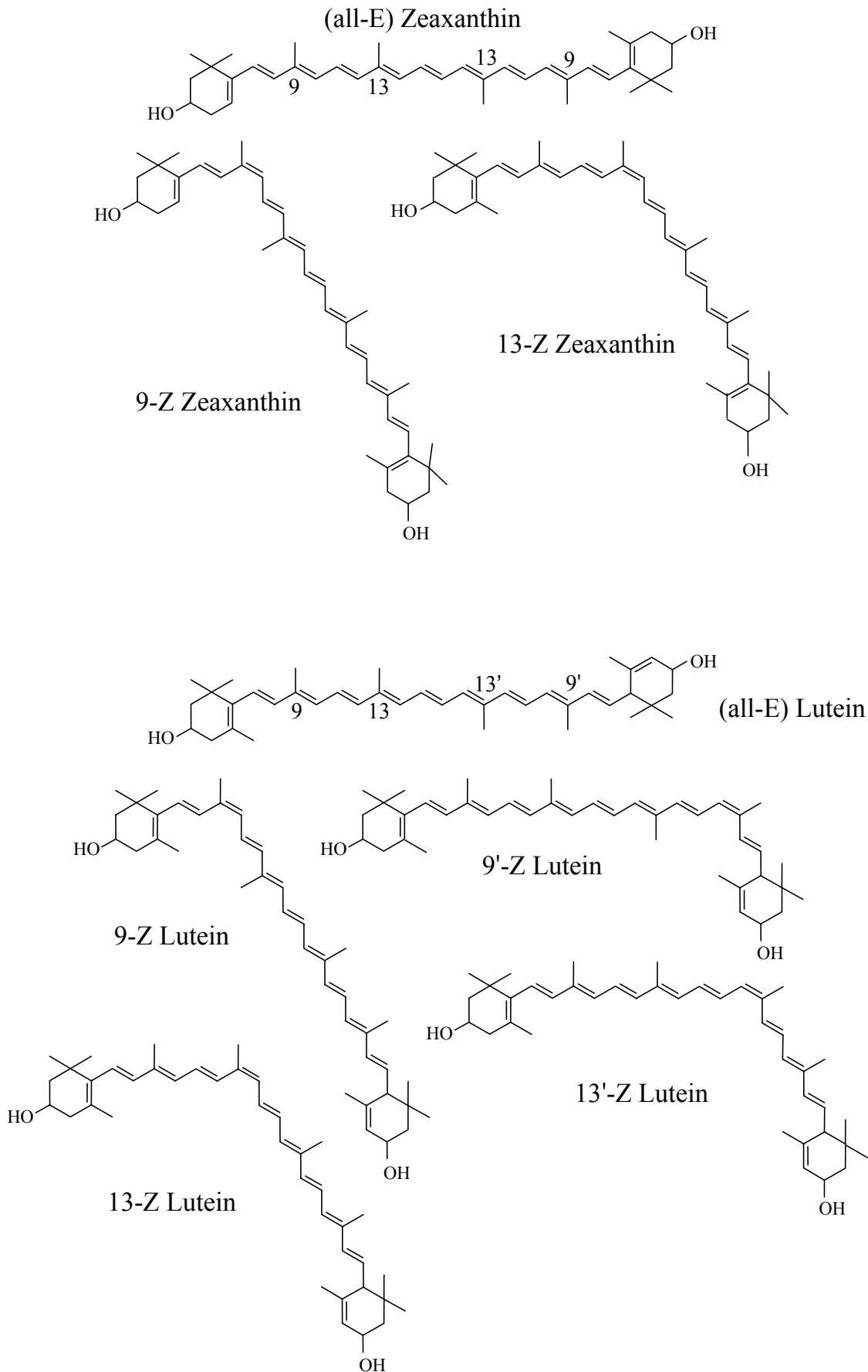


Abbildung 2: Hauptstereoisomere von Zeaxanthin und Lutein.

3.1.2 Vorkommen

Carotinoide kommen hauptsächlich in den Blättern von Pflanzen, in vielen Früchten, Pollen und Obstsaamen, aber auch in verschiedenen Pilzen, Algen oder Bakterien vor. In den grünen Blättern der Pflanzen sind sie in den Chloroplasten am Prozess der primären Lichtabsorption und der Photonenkanalisation bei der Photosynthese beteiligt. In den Plastiden beteiligen sie sich an der Abbaureaktion des Chlorophylls, d.h. der Umwandlung der Chloroplasten in Chromoplasten. Die carotinoid-typische Farbe der Carotinoide wird in den Blättern jedoch meist von der dunkelgrünen Farbe des Chlorophylls überdeckt und kommt erst nach deren Zerstörung zum Vorschein^[11]. Dieser Vorgang kann jedes Jahr im Herbst unter anderen bei den Laubbäumen beobachtet werden.

Die in den Früchten, Pollen und Samen enthaltenen Carotinoide sind hauptverantwortlich für deren Farbe. Die rote Farbe von Karotten wird durch α - und β -Carotin hervorgerufen, die von Tomaten durch Lycopin. Die häufig vorkommenden Xanthophylle werden vor allem in dunkelgrünem Blattgemüse, wie z.B. in Spinat, Kohl und Mais gefunden^{[12],[13]}.

Weiterhin sind Carotinoide für die Farben von Blumen (Narzisse, Sumpfdotterblume), Vögeln (Flamingo, Kanarienvogel), Insekten (Marienkäfer) und Meerestieren (Krill, Lachs) verantwortlich.

3.1.3 Biosynthese^{[14],[15],[16],[17]}

Die Biosynthese der Carotinoide ist in Abbildung 3 vereinfacht wiedergegeben. Sie findet zunächst analog der Synthese anderer Isoprenoide statt. Dazu werden im Anschluss an die Synthese von Isopentenylpyrophosphat (IPP, aktives Isopren) zwei solcher IPP Einheiten an ein Molekül Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) addiert. Das so entstandene Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) wird mit einem zweiten GGPP-Molekül in einer Schwanz-Schwanz-Addition zu der C₄₀-Verbindung Phytoen verknüpft. Bei dieser und bei den folgenden Reaktionen werden nicht nur die all-E Isomere gebildet, sondern auch Z-Isomere. Durch die anschließende Dehydrierung des Phytoen werden sukzessive Doppelbindungen in das Molekül eingeführt.

Nacheinander entstehen die Zwischenstufen (all-E) ζ -Carotin, (all-E) Neurosporin, welches sehr instabil ist, und schließlich (all-E) Lycopin. Dieses ist nun Ausgangsstoff für alle weiteren symmetrischen und unsymmetrischen Carotinoide. So wird durch Zyklisierungsreaktionen Lycopin unter anderem in das symmetrische β -Carotin und das unsymmetrische α -Carotin umgewandelt, welche anschließend durch zweifache Hydroxylierung in Zeaxanthin bzw. Lutein überführt werden.

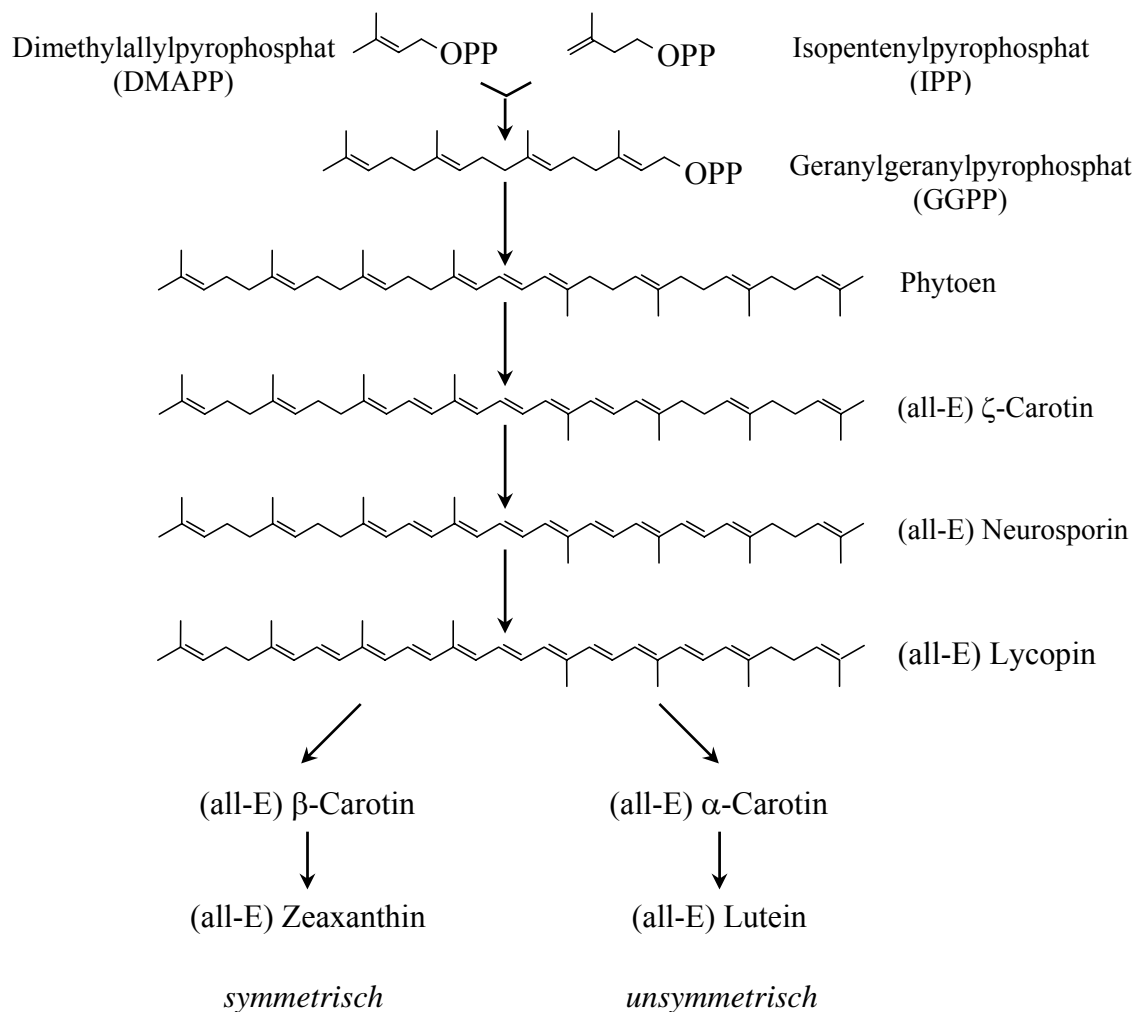


Abbildung 3: Schema der Carotinoid-Biosynthese.

3.2 Staphyloxanthin aus *Staphylococcus aureus*

3.2.1 Allgemeines

Wie bereits erwähnt, können Carotinoide auch in Bakterien biosynthetisch produziert werden. Bei Staphyloxanthin handelt es sich um einen solchen Bakterienfarbstoff, welcher erstmals im Jahre 1975 durch Taylor und Davies als Hauptpigment bei *Staphylococcus aureus* (Stamm 209P) beschrieben wurde^[18]. Auf Grund der chemischen Struktur gehört dieser Bakterienfarbstoff zur Gruppe der Triterpenoid-Carotinoide. Die Bedeutung dieser Pigmente liegt bei den nicht photosynthetisch aktiven Mikroorganismen in einer membranstabilisierenden Wirkung^[19], sie unterscheiden sich somit in der Bedeutung von denen der Pflanzen. Die Triterpenoide (C₃₀-Carotinoide) unterscheiden sich von den Tetraterpenoiden (C₄₀-Carotinoiden) im wesentlichen in der Länge ihrer Kohlenstoffkette. Obwohl die Triterpenoide strukturelle Übereinstimmungen mit Dehydrosqualen aufweisen^[20], was eine Vorstufe bei der Steroidsynthese ist, werden sie wegen der Übereinstimmung der biochemischen und spektralen Eigenschaften mit denen der Tetraterpenoide als „bakterielle Phytoene“ bezeichnet.

3.2.2 Biosynthese von Staphyloxanthin

Der von Taylor et al.^[21] durch Mutantanalyse ermittelte und später von Marshall et al.^{[22],[23]} bei der Pigmentextraktion aus *Staphylococcus aureus* bestätigte Biosyntheseweg (Abbildung 4) beginnt wie bei den Tetraterpenoiden mit einer Schwanz-Schwanz-Addition. Bei der Synthese der Triterpenoide werden jedoch anstelle von zwei Geranylgeranylpyrophosphat-Einheiten zwei Farnesyldiphosphat-Moleküle zu einem C₃₀-Grundgerüst verknüpft (*Schritt 1a*). Bei diesem ersten Biosyntheseschritt kann auch Squalen aus den beiden C₁₅-Einheiten synthetisiert werden (*Schritt 1b*), was bisher noch nicht mit entgültiger Gewissheit bestätigt werden konnte. Die allgemeine Reaktionsfolge für die Umformung von 15-cis-4,4'-Diapophytoen in Staphyloxanthin umfasst verschiedene Dehydrogenierungs-, Oxygenierungs- und Veresterungsschritte.

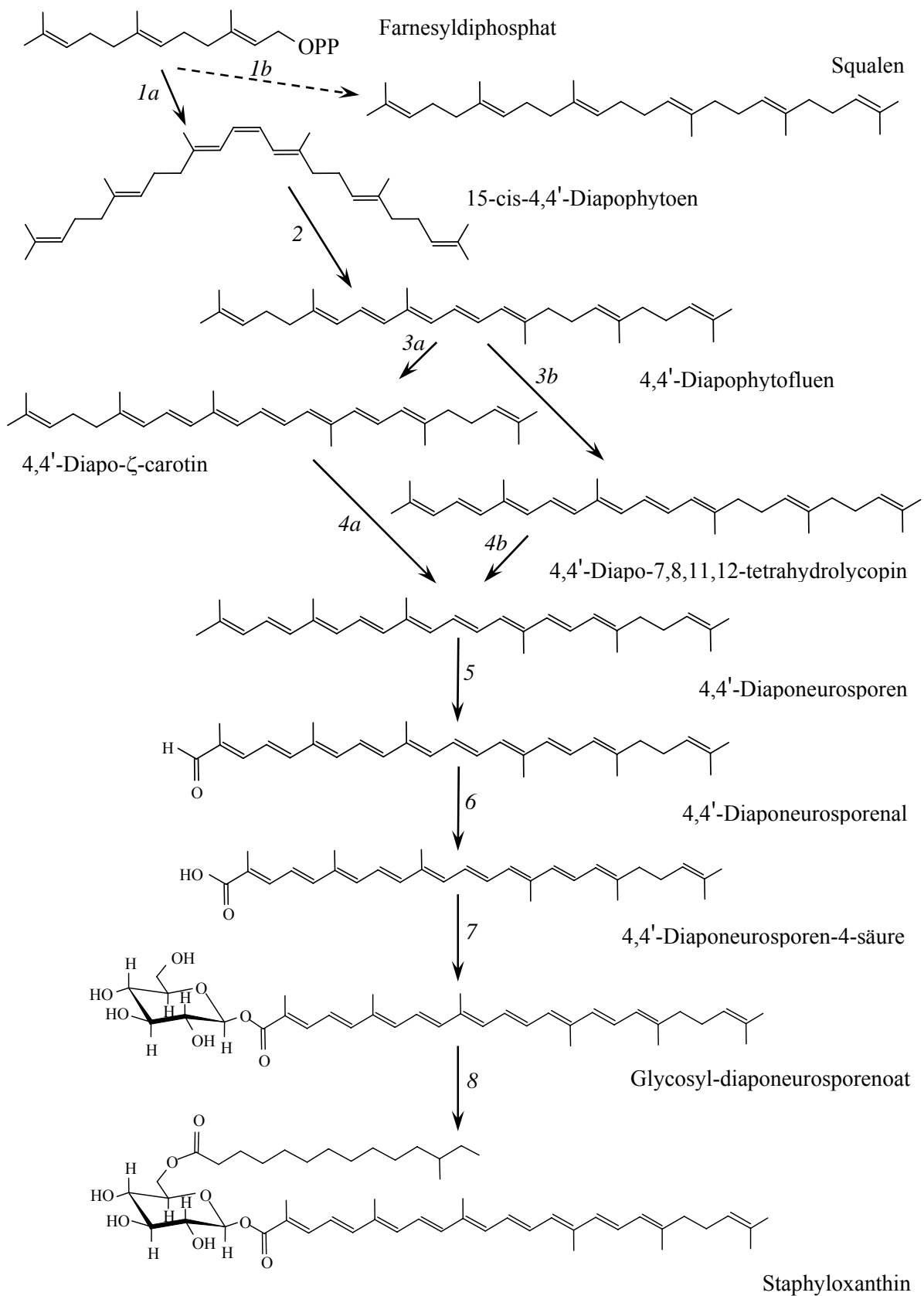


Abbildung 4: Postulierter Biosyntheseweg für Staphyloxanthin in *Staphylococcus aureus*.

Durch drei aufeinander folgende Oxidations- (Dehydrogenierungs-) schritte (*Schritte 2, 3a/b und 4a/b*) wird das 15-cis-4,4'-Diapophytoen in das 4,4'-Diaponeurosporen überführt. Durch diese Dehydrogenierungsschritte wird die Anzahl der Doppelbindungen im Molekül erhöht und ein konjugiertes Doppelbindungssystem aufgebaut. Dies kann an einer Farbänderung beobachtet werden. Während das 15-cis-4,4'-Diapophytoen noch vollkommen farblos ist, zeigt das 4,4'-Diaponeurosporen eine deutliche Gelbfärbung. Als nächster Reaktionsschritt erfolgt eine Oxygenierung, bei der unter Mitwirkung einer Oxygenase molekularer Sauerstoff an eine der terminalen Methylgruppen in das Molekül eingebaut wird (*Schritt 5*). Bei einer weiteren Oxygenierung dieses enzymgebundenen Aldehyds entsteht die 4,4'-Diaponeurosporensäure (*Schritt 6*), welche einen intensiven Gelbton aufweist. Die so entstandene Säure wird im nächsten Reaktionsschritt mit der Glucose verestert (*Schritt 7*). Im letzten Reaktionsschritt wird die Glucose ihrerseits mit der 12-Methyltetradecansäure zum Staphyloxanthin verestert (*Schritt 8*). Durch diese abschließenden Veresterungen erfolgt der Farbumschlag von Gelb nach Orange.

Neben der hier beschriebenen Modifikation des Staphyloxanthins können noch weitere Modifikationen auftreten. So können neben der Glucose auch andere Zucker, wie zum Beispiel Mannose und Galactose, mit der 4,4'-Diaponeurosporensäure verestert werden. In anderen Fällen kann anstelle der C₁₅-Fettsäure eine homologe C₁₇-Fettsäure vorhanden sein.

3.3 Carotinoide in der Prävention

3.3.1 Allgemeines

Der menschliche und tierische Organismus ist nicht in der Lage Carotinoide selbst zu synthetisieren und muss sie deshalb vollständig über die Nahrung aufnehmen. Er ist jedoch fähig die aufgenommenen Carotinoide umzuwandeln. 50 Carotinoide konnten bis jetzt in der Nahrungskette nachgewiesen werden. Im Körper des Menschen werden davon allerdings nur 15 Carotinoide sowie 8 Metabolite gefunden. Sie werden

hauptsächlich im Fettgewebe, im Serum, der Leber, sowie in den Augenpigmenten (Lutein, Zeaxanthin) gespeichert^{[24],[25]}.

3.3.2 Protektive Wirkungen von Carotinoiden

Sekundären Pflanzenstoffen, zu denen auch die Carotinoide zählen, wird eine vielfältige gesundheitsfördernde Wirkung zugesprochen, die in den letzten Jahren in klinischen und epidemiologischen Studien eingehend untersucht^[26] wurde. Sie beeinflussen dabei die menschliche Gesundheit in verschiedenen Bereichen und können nach ihren Fähigkeiten unterschieden werden:

- mögliche Bildung von Vitamin A aus Carotinoiden
- Schutz des Organismus auf Grund der antioxidativen Eigenschaften der Carotinoide^[27].

Es ist allgemein bekannt, dass etwa 50 Carotinoide Provitamin A-Aktivität besitzen. Dies bedeutet, dass sie in der Lage sind Retinol (Vitamin-A) zu bilden^{[28],[29],[30]}. Für diese Fähigkeit spielt die Struktur der Carotinoide eine bedeutende Rolle. So muss ein unsubstituierter β -Iononring vorhanden sein, weshalb β -Carotin mit zwei β -Iononringen die größte Provitamin A-Aktivität besitzt. Die Umwandlung zu Retinol erfolgt entweder durch eine Spaltung der zentralen Doppelbindung oder aber an einer oder mehreren exzentrischen Doppelbindungen^[31].

Ein weiterer sehr wichtiger Punkt ist die antioxidative Eigenschaft der Carotinoide, die in zahlreichen medizinischen Studien belegt wurde^{[32],[33]}. Sie können zum einen als Radikalfänger wirken und die Zellen des Organismus gegen Angriffe durch freie Radikale, die sogenannten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), schützen^[34]. Beispiele dieser ROS sind das Superoxid ($O_2^{\cdot-}$), sowie Peroxyl- (ROO^{\cdot}), Alkoxyl- (RO^{\cdot}), äußerst reaktive Hydroxyl- (HO^{\cdot}) und Stickstoffoxid- (NO^{\cdot}) Radikale. Zum anderen sind die Carotinoide in der Lage reaktiven Singulett-Sauerstoff (1O_2) physikalisch und chemisch zu quenchen. Diese beiden Punkte vermindern den oxidativen Stress für den Organismus, weshalb ihnen eine protektive Wirkung zugeschrieben wird^{[35],[36],[37]}.

Inzwischen gibt es Hinweise darauf, dass oxidativer Stress bei der Entstehung von Volkskrankheiten wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Krebs und dem Alterungsprozess eine Rolle spielt. Für die protektive Wirkung von Carotinoiden wird meist eine inverse Korrelation zwischen der Carotinoid-Serumkonzentration und einem bestimmten Marker der Krankheit als epidemiologischer Beweis angeführt. So wurde eine inverse Korrelation zwischen einer erhöhten Einnahme von β -Carotin und der Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und bei der Entwicklung von Arteriosklerose und der Aufnahme von Lycopin bzw. β -Carotin gefunden^{[38],[39],[40],[41],[42],[43]}. Die verschiedenen Carotinoide zeigen gegen unterschiedliche Krebsarten günstige Effekte, wie zum Beispiel:

- Lycopin - Prostatakrebs^{[44],[45]}
- β -Carotin - Hautkrebs^[46]
- Lutein - Darmkrebs^[47]
- Lutein, Zeaxanthin - Katarakt^{[48],[49],[50],[51]}, altersbedingte Makula-Degeneration^{[52],[53],[54],[55]}.

Darüber hinaus wird auch die Entstehung von Brust- und Lungenkrebs gehemmt^{[56],[57],[58],[59],[60]}.

Anfang der 90er Jahre stellte sich jedoch in einigen Studien heraus, dass Carotinoide auch eine schädliche Wirkung auf die menschliche Gesundheit haben können. Diese Interventionsstudien zeigten, dass eine übermäßige Supplementierung mit β -Carotin bei einigen Risikogruppen schaden und sogar einen procarcinogenen Effekt haben kann. In der sogenannten ATBC- oder Finnlandstudie sowie in der CARET-Studie zeigte sich, dass das Lungenkrebsrisiko bzw. die allgemeine Sterblichkeit bei Rauchern und Asbestarbeitern signifikant höher war als in den Kontrollgruppen^{[61],[62]}.

Die Physicians Health Studie hingegen zeigte weder einen positiven noch einen negativen Effekt^[63]. Die in diesen Studien verabreichten Mengen lagen im Bereich bis 50 mg und damit weit über dem physiologischen Wert. Deshalb sollten diese Ergebnisse mit vorbelasteten Probanden nicht verallgemeinert werden und nicht als

grundsätzliches Argument gegen die präventiven Eigenschaften der Carotinoide eingesetzt werden^[64]. Aus diesem Grunde wurde bisher auch weder durch die World Health Organisation (WHO) noch eine andere Institution eine Empfehlung für die Supplementierung mit Carotinoiden ausgesprochen. Zuerst müssen noch weitere, konkretere Ergebnisse bezüglich der gesundheitsfördernden oder -schädigenden Wirkung bei den verschiedenen Dosierungen vorliegen^{[65],[66]}.

3.3.3 Bioverfügbarkeit von Carotinoiden

Wie bereits erwähnt, ist der menschliche und tierische Organismus nicht in der Lage Carotinoide selbst zu synthetisieren. Die Verbindungen müssen über die Aufnahme von Nahrung in ausreichenden Mengen dem Körper zugeführt werden. Den Anteil der Carotinoide, der mit der Nahrung aufgenommen wird und der nach Absorption und Transport im Körper auch tatsächlich seine Wirkung entfalten kann, wird als die Bioverfügbarkeit des Carotinoids bezeichnet. Es muss dabei auf Grund der selektiven Wirkung einzelner Carotinoide an bestimmten Organen eine differenzierte Betrachtung dieser Bioverfügbarkeit für den Menschen in Betracht gezogen werden^{[67],[68]}.

Ein wichtiger Fakt ist, dass die Bioverfügbarkeit der Carotinoide sehr eng an die Fettresorption gekoppelt ist und durch die Anwesenheit von Fett entscheidend verbessert wird. Natürlich beeinflussen noch weitere Faktoren die Bioverfügbarkeit, so sind die Art der Zubereitung und der pH-Wert im Magen für die Freisetzung der Carotinoide aus der pflanzlichen Zellmatrix mit verantwortlich^{[69],[70]}. Studien mit Karotten zeigen, dass eine Verarbeitung der Karotten (kochen oder pürieren) mit einer deutlichen erhöhten Aufnahme korrelierbar ist^{[71],[72]}. Die räumliche Struktur der Carotinoide (E- und Z-Isomerie) spielt bei der Bioverfügbarkeit der Carotinoide ebenfalls eine gewisse Rolle. So wurde in einer Studie mit Frettchen nachgewiesen, dass die Z-Isomere von Lycopin in Serum, Leber und besonders Lymphe im Vergleich zum (all-E) Lycopin stark angereichert wurden^[73]. Es wurden auch Unterschiede in der Bioverfügbarkeit von verschiedenen Carotinoiden gefunden^{[74],[75]}. Zusätzlich liegen, durch die Einbettung der Carotinoide in die Zellmatrix, weitere Wechselwirkungen mit anderen bioaktiven Substanzen vor, die beachtet werden müssen^{[76],[77]}.

Nach der Aufnahme der Carotinoide im Dünndarm werden sie mit Gallensäuremicellen als Transportstoff, die aus Gallensäure, freien Fettsäuren Monoglyceriden und Phospholipiden bestehen, durch die Membran der Dünndarmzellen passiv aufgenommen. In den Enterozyten werden sie dann in Chylomikronen eingelagert, gelangen über die Lymphe in den Blutkreislauf und werden zur Leber transportiert. Dort werden sie an verschiedene Lipoproteine angelagert und können wiederum über den Blutkreislauf an die Wirkungsorte gelangen^[78]. Die für den Transport wichtigen Lipoproteine werden in VLDL (very low density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein) und HDL (high density lipoprotein) eingeteilt. Die Carotine werden dabei hauptsächlich an VLDL und die Xanthophylle hauptsächlich an die HDL gebunden. Bei LDL werden hingegen beide Gruppen gefunden. Nach einer einmaligen Aufnahme der Carotinoide verweilen sie etwa 2 bis 3 Wochen in nachweisbaren Mengen im Blut.

3.3.4 Bestimmung der absoluten Bioverfügbarkeit von Carotinoiden

Die absolute Bioverfügbarkeit ist pharmakologisch definiert als der Quotient der Plasmakonzentration einer Substanz nach einer oral verabreichten Dosis und der Plasmakonzentration der Substanz nach einer gleich hohen intravenösen Dosis^[79] (Gl. 1).

$$\text{Bioverfügbarkeit [\%]} = \frac{\text{AUC}_{\text{absorb. orale Dosis}}}{\text{AUC}_{\text{absorb. intraven. Dosis}}} \times 100 \quad (\text{Gl. 1})$$

Das bedeutet, dass der Quotient der Integrale (area under curve, AUC) einer absorbierten, oralen und einer theoretisch absorbierten, intravenösen Dosis, wie in Abbildung 5 dargestellt, bestimmt werden muss. Das Integral kann mittels der Absorptions-Desorptions-Kurve, die aus den Anreicherungsdaten bestimmt wird, bzw. den Absolutmengen an absorbiertem Carotinoid berechnet werden. Die Bestimmung der Absorption nach einer intravenösen Dosis ist mit den in Wasser unlöslichen Carotinoiden jedoch nicht möglich. Aus diesem Grund wird eine theoretische intravenöse Dosis extrapoliert und für die Berechnung der absoluten Bioverfügbarkeit

verwendet. Zur Berechnung des Integrals der oral verabreichten Dosis wird die Kurve in einen Absorptionsteil und einen Desorptionsteil zerlegt. Diese beiden Teile werden dann unabhängig voneinander durch Funktionen angenähert^{[80],[81],[82],[83]}.

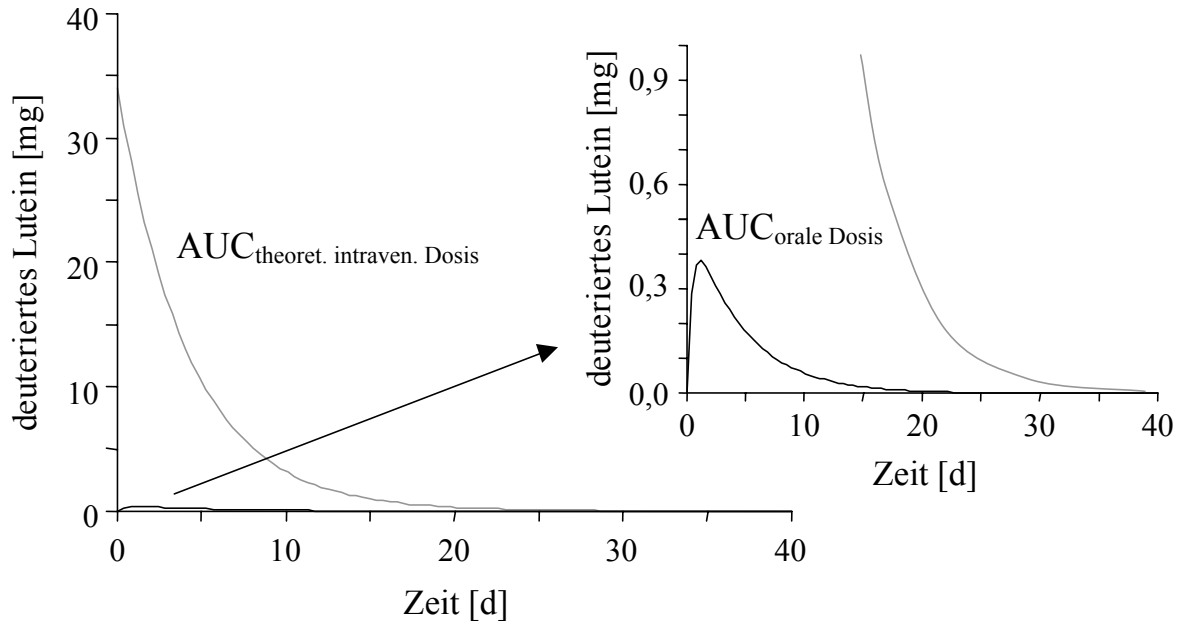


Abbildung 5: Graphik zur Berechnung der absoluten Bioverfügbarkeit.

Für den Absorptionsprozess der Carotinoide wird eine annähernd lineare Zeitabhängigkeit angenommen und durch die nachstehende Funktion beschrieben (Gl. 2).

$$y = m \cdot x \quad (\text{Gl. 2})$$

Der Desorptionsprozess folgt näherungsweise einem exponentiellen Zerfall und kann mit dieser Funktion beschrieben werden (Gl. 3):

$$y = a + b \cdot e^{-\frac{x}{t_1}} \quad (\text{Gl. 3})$$

Für die Bestimmung des Integrals der theoretischen intravenösen Dosis wird angenommen, dass im Moment der Injektion ($x = 0$) die komplette Menge an injiziertem Lutein im Serum zur Verfügung steht. Von diesem Moment an unterliegt das Lutein ausschließlich einem Desorptionsprozess, welcher näherungsweise mit der gleichen Geschwindigkeit wie die Desorption der oralen Dosis erfolgt (Gl. 4).

$$y = m_{\text{Lutein, total}} \cdot e^{-\frac{x}{t_1}} \quad (\text{Gl. 4})$$

4 Analytik von Carotinoiden aus biologischen Matrices

4.1 Schonende Extraktion instabiler Analyten

Die Analyse von biomedizinisch wirksamen Substanzen aus komplexen biologischen Matrices, wie z.B. Serum, Urin, tierischem Gewebe und pflanzlichem Material, wird in mehrere Teilschritte untergliedert. Sie beinhaltet die Teilschritte der Probennahme, die Extraktion der Analyten aus ihrer biologischen Matrix, die chromatographische Trennung der einzelnen Komponenten des Extraktes, sowie deren anschließende spektroskopische und/oder spektrometrische Detektion. Bei dem Extraktionsschritt der Analyten aus der Probenmatrix werden zwei Ziele verfolgt, die Aufreinigung und die Aufkonzentration der zu untersuchenden Substanzen. Im Rahmen dieser einzelnen Schritte gilt es, eine möglichst vollständige, reproduzierbare und artefaktfreie Isolierung und Bestimmung der Analyten zu erreichen. Die kombinierte Auswertung der unterschiedlichen Daten ermöglicht schließlich eine eindeutige Identifikation, Quantifikation und Strukturbestimmung der untersuchten Analyten.

Gerade die schonende Extraktion von instabilen Analyten stellt eine fortwährende Herausforderung für den Analytiker dar. Carotinoide werden auf Grund ihrer antioxidativen Eigenschaften an UV-Licht und Luft leicht selbst oxidiert, so dass eine nicht sorgfältig durchgeführte Analyse zu falschen Ergebnissen führen kann. Da es auf Grund dieser Voraussetzungen keine universelle Methode zur Extraktion von verschiedensten Analyten aus unterschiedlichsten biologischen Matrices gibt, ist die Probenaufbereitung oft der zeitaufwendigste, arbeitsintensivste und kritischste Arbeitsschritt einer Analyse. Die Probenvorbereitung und -aufarbeitung stellt auch eine der Hauptursachen für Fehler und Ungenauigkeiten während einer Analyse dar.

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden auf dem Gebiet der Extraktionstechniken große Fortschritte erzielt. Neben der Verbesserung der Flüssig-Flüssig-Extraktion (liquid liquid extraction, LLE) werden zunehmend schonende Festphasenextraktionen (solid phase extraction, SPE) für die Isolierung von biomedizinisch aktiven Substanzen eingesetzt^{[84],[85],[86]}. Diese können im Gegensatz zur LLE direkt an ein chromatographisches Trennsystem gekoppelt werden. Durch die direkte Kopplung

erfolgt die gesamte Analyse unter Lichtausschluss, was die Untersuchung von licht- und sauerstoffempfindlichen Verbindungen erleichtert^[87]. Weitere wichtige Vorteile liegen in der Automatisierbarkeit, wodurch die gesamte Analysenzeit noch weiter reduziert wird, und in der Möglichkeit, verschiedene Festphasen für unterschiedliche Problemstellungen einsetzen zu können^[88].

4.1.1 Flüssig-Flüssig-Extraktionstechniken

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

- hoher Verbrauch an organischen Lösungsmitteln
- limitiert auf miteinander nicht mischbare Lösungsmittel
- sehr zeitaufwendig
- schwer automatisierbar
- mit vielen potentiellen Fehlerquellen behaftet.

Zur Aufkonzentration der extrahierten Analyten ist ein Einengen der großen Lösungsmittelmengen unter erhöhter Temperatur erforderlich. Durch diese Tatsache und die daraus resultierende Dauer der Aufarbeitung werden instabile Analyten, wie zum Beispiel die Carotinoide, über einen sehr langen Zeitraum UV-Licht, Luftsauerstoff und Wärme ausgesetzt, was zu einer Isomerisierung, Artefaktbildung oder gar vollständigen Zerstörung der Analytmoleküle führen kann.

Auf Grund der erwähnten Nachteile ist die Flüssig-Flüssig-Extraktion eigentlich nicht die Methode der Wahl zur schonenden Anreicherung von instabilen Substanzen. Da sie aber einfach zu handhaben ist, wird sie trotzdem vielfach eingesetzt. So wird sie zum Beispiel bei der Analyse von Carotinoiden aus humanen Serumproben verwendet. Dieses vom U.S. Landwirtschaftsministerium (USDA) geprüfte Verfahren der Tufts

University Boston erfolgt sehr schonend, da die Aufarbeitung unter Ausschluss von Sonnenlicht verläuft und das Einengen der Lösungsmittel im Stickstoffstrom bei Raumtemperatur erfolgt^[89]. Ebenso wurden optimiertere Varianten oder auf derselben Grundidee basierende modernere Extraktionstechniken wie die ultrasonic^[90]- oder accelerated-solvent extraction^[91] entwickelt.

4.1.2 Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD)

Die Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) ist eine Festphasenextraktionsmethode, die 1989 von Barker speziell für die Aufarbeitung von pflanzlichem und tierischem Gewebe entwickelt wurde^[92]. Ihr entscheidender Vorteil gegenüber der Flüssig-Flüssig-Extraktion und der Solid Phase Extraktion ist die direkte Anwendbarkeit auf feste und hochviskose Proben^[93]. Auf Grund der einfachen Handhabung und des relativ geringen Zeitaufwands hat sich die MSPD seit ihrer Einführung besonders auf den Gebieten der klinischen Analytik sowie der Naturstoff- und Lebensmittelanalytik etabliert und findet dort vermehrt Anwendung^[94]. Durch den geringen Zeitaufwand eignet sie sich vor allem für die Aufarbeitung von instabilen Substanzen, da die Analytmoleküle durch die schnelle und direkte Extraktion vor Isomerisierung und Oxidation geschützt werden. Ein Nachteil dieser Technik für die industrielle Anwendung besteht in der schwierigen Automatisierbarkeit.

Die MSPD beinhaltet mehrere Schritte, welche in Abbildung 6 schematisch dargestellt sind. Zuerst wird das zu analysierende Probenmaterial mit einem abrasiven Sorbensmaterial, bei Carotinoiden mit einem C₁₈- oder C₃₀-alkylierten Kieselgel, mechanisch zu einem rieselfähigen Pulver zerrieben. Dadurch wird die Struktur der Probenmatrix zerstört und die Probe homogen auf der Oberfläche des Sorbensmaterials verteilt. Das erhaltene Homogenisat wird dann in eine leere SPE-Säule überführt und zu einem kompakten Säulenbett zusammengepresst. Durch einen Waschschrift können störende Interferenzen der Matrix entfernt werden. Mit einer möglichst geringen Menge eines geeigneten Lösungsmittels wird der aufgereinigte und aufkonzentrierte Analyt eluiert.

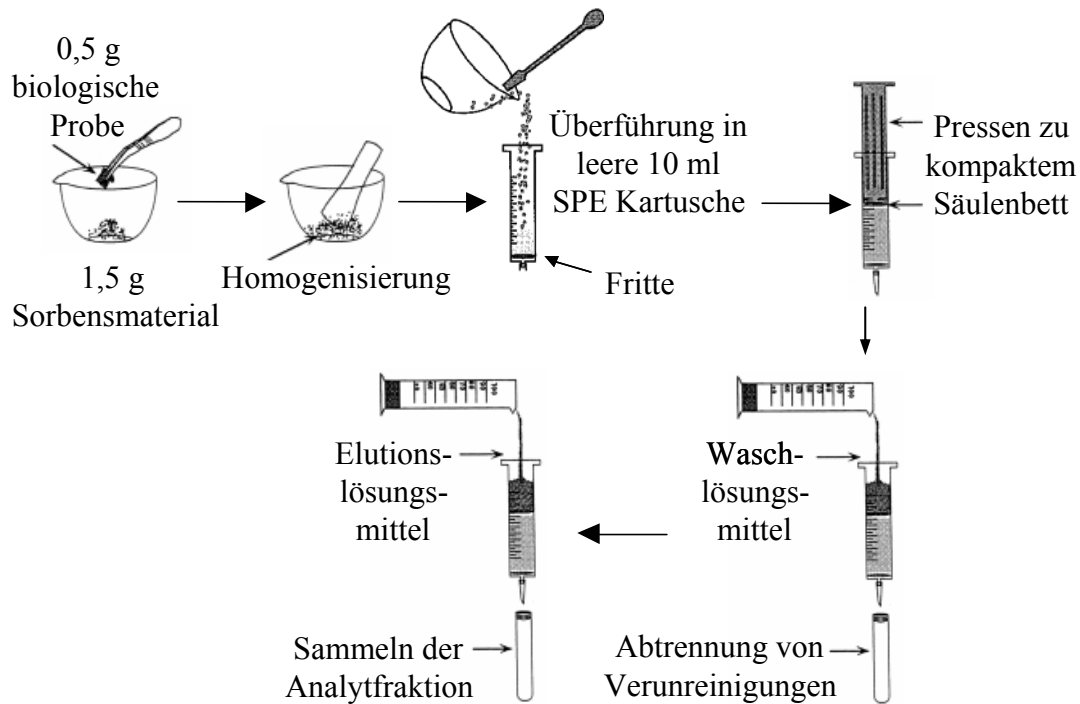


Abbildung 6: Schematischer Ablauf der MSPD.

Im Anschluss an die Elution kann die geringe Lösungsmittelmenge sehr schnell und somit auch sehr schonend entfernt werden. Die Aufnahme des Rückstandes in einer geringen und definierten Lösungsmittelmenge liefert konzentrierte Proben, die ohne weitere Aufarbeitungsschritte in das HPLC-System injiziert werden können. Neben ihrer einfachen Handhabung zeichnet sich die MSPD auch durch eine gute Reproduzierbarkeit und durch die Möglichkeit der Quantifizierung aus.

Der entscheidende Unterschied zur SPE liegt darin, dass die feste oder viskose Probe direkt mit dem Sorbensmaterial vermischt wird. Es entstehen chemische Matrix-Sorbens-Analyt-Wechselwirkungen. Durch die Wahl des Lösungsmittels können die zu untersuchenden Analyten selektiv extrahiert werden.

4.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

4.2.1 HPLC-Grundlagen^[95]

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) beruht auf einem physikalisch-chemischen Trennprozess, welcher erstmals von Tswett im Jahre 1903 beschrieben wurde^[96]. Dabei wird das zu trennende Probengemisch in einer mobilen Phase gelöst und unter hohem Druck bei konstanter Fließgeschwindigkeit durch eine mit stationärer Phase gefüllte Trennsäule gepumpt. Die Auftrennung der Analyten wird dabei durch unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit der stationären Phase ermöglicht, da die speziellen Wechselwirkungen zu unterschiedlich langen Verweilzeiten an der stationären Phase führen. Als wichtige Kenngrößen für ein solches System gelten neben der Verweilzeit, ausgedrückt in der Retentionszeit t_R (oder dem Retentionsfaktor k'), auch die Trenneffizienz (z.B. Anzahl an theoretischen Böden N in einem Peak, Höhe eines theoretischen Bodens) und die Selektivität (meist als Trennfaktor α angegeben).

Es gibt mittlerweile eine Vielzahl von stationären Phasen, die sich in der Oberflächenmodifikation oder in der Eigenschaft des Trägermaterials unterscheiden. Man kann sie einteilen in die sogenannte Normal Phasen (Normal Phase, NP)-Chromatographie und die Umkehr-Phasen (Reversed Phase, RP)-Chromatographie. Bei der NP-Chromatographie ist die stationäre Phase (z.B. Aluminiumoxid oder Kieselgel) im Vergleich zur mobilen Phase polarer, während bei der RP-Chromatographie die stationäre Phase aus mit organischen Molekülen (z.B. Alkylketten) oberflächenmodifiziertem Kieselgel besteht und somit unpolarer als die mobile Phase ist.

Zur Trennung von Carotinoiden und deren geometrischen Stereoisomeren wurden früher, auf Grund ihrer besseren Selektivität, ausschließlich Normalphasen^{[97],[98]} oder auch Nitrilphasen eingesetzt^[99]. Die herkömmlichen RP-Trennsäulen mit C_{18} -Material konnten die Carotinoid-Stereoisomere nur sehr unzureichend auftrennen. 1994 wurde von Sander und Albert eine C_{30} -Trennphase speziell auf dieses Trennproblem hin entwickelt und optimiert. Eine Variation der Alkylkettenlänge von C_{18} bis C_{34} erbrachte für die C_{30} -Phase die beste Selektivität bei der Trennung von Carotinoid-

Stereoisomeren^[100]. Diese Trennphase weist für die Carotinoid-Stereoisomere eine ausgeprägte Formerkennung (shape selectivity) auf^[101]. Diese beschriebene Formerkennung beruht auf dem Auftreten von geordneten starren n-Alkylkettenbereichen mit *trans*-Konformation neben anderen ungeordneten mobilen Domänen mit *gauche*-Konformation^{[102],[103]}. Die Temperaturabhängigkeit dieser Formerkennung wurde mittels Festkörper- und Suspensions-NMR-Messungen untersucht^{[104],[105]} und konnte mit den chromatographischen Ergebnissen korreliert werden^{[106],[107]}. Seit der Einführung dieser Phase wird sie bei der Trennung von Carotinoid-Stereoisomeren mittels klassischer HPLC und Kapillartrenntechniken fast ausschließlich eingesetzt^{[108],[109],[110],[111]}.

Neben der Verwendung dieser speziellen Trennphase ist auch die Wahl des Lösungsmittels für die erfolgreiche Trennung der instabilen Carotinoid-Stereoisomere von Bedeutung. So zeigt das in der HPLC gebräuchliche Acetonitril beispielsweise sehr schlechte Wiederfindungsraten und die Auftrennung der Analyten ist ungenügend. Deshalb werden zwei unterschiedliche Lösungsmittelgemische zur Trennung von Carotinoid-Stereoisomeren eingesetzt. Für die HPLC-APCI/MS-Kopplung wird meist eine ternäre Mischung aus Methanol, *tert*-Butylmethylether und Wasser verwendet und für die Kapillar-HPLC-NMR-Kopplung meist eine binäre Mischung aus Aceton und Wasser.

Die Detektion der Analyten nach der chromatographischen Trennung erfolgt zumeist mit der UV-Spektroskopie bei einer Wellenlänge. In den letzten Jahren wurde durch den vermehrten Einsatz von Dioden Array Detektoren (DAD) auch die Aufnahme von ganzen UV-Spektren ermöglicht. Speziell für die Strukturaufklärung von unbekanntem Substanzen kommt seit einiger Zeit auch die on-line Kopplung mit der Massenspektrometrie und der NMR-Spektroskopie zum Einsatz.

4.2.2 Miniaturisierung in der HPLC

Seit der Einführung der Chromatographie haben sich unterschiedliche Flüssigkeits- und Gas-chromatographische Trenntechniken entwickelt. Zu den Flüssigkeits-chromatographischen Trenntechniken gehören die Hochleistungsflüssigkeits-

chromatographie (HPLC), die Ionenchromatographie, die Dünnschichtchromatographie (Thin Layer Chromatography, TLC) und die superkritische Flüssigchromatographie (Supercritical Fluid Chromatography, SFC). Zu den Gas-chromatographischen Trenntechniken gehören die Gas-Fest-Chromatographie (Gas Solid Chromatography, GSC) und die Gas-Flüssig-Chromatographie (Gas Liquid Chromatography, GLC)^[112]. Alle diese Techniken verwenden wiederum eine Vielzahl an stationären Trennphasen mit charakteristischer Morphologie, um durch geeignete Oberflächenmodifikationen unterschiedliche Phasen-Analyt-Wechselwirkungen zur Auftrennung der Analyten auszunützen. Es kommen zum Beispiel partikuläre Teilchen oder monolithische Strukturen zum Einsatz. Weiterhin wird die Partikel-, die Porengröße und die Oberflächenmodifikation variiert. Bei der Flüssigkeitschromatographie kann zudem noch die Triebkraft des Trennprozesses verändert werden. Entweder wird der Druck, wie in der HPLC, durch das Hagen-Poiseuillesche Gesetz beschrieben oder die Elektrosmose angewendet, wie bei der Kapillarelektrophorese (Capillary Electrophoresis, CE) und Kapillarelektrochromatographie (Capillary Electchromatography, CEC), bzw. eine Kombination beider.

Mit Ausnahme der TCL verwenden alle Chromatographietechniken meist langgestreckte zylindrische Säulen. Die Säulenlängen reichen heute von unter 3 cm, bei der HPLC in Verbindung mit kleinen Teilchen^{[113],[114]}, bis zu Säulenlängen über 100 m bei der Gaschromatographie. Auch wenn es noch keine geregelte Definition dieser HPLC-Säulen-Formate gibt, soll die zum jetzigen Zeitpunkt gebräuchliche Einteilung^[115] anhand des Säuleninnendurchmessers in Verbindung mit den dazu verwendeten Flussraten in Tabelle 1 auf der nächsten Seite gezeigt werden.

Bereits 1967 wurden durch Horvath et al.^[116] erste wissenschaftliche Versuche zur Miniaturisierung von HPLC-Säulen durchgeführt und seit diesem Zeitpunkt haben die miniaturisierten chromatographischen Trenntechniken immer mehr an Interesse gewonnen. Aber erst in den letzten Jahren kam es zu entscheidenden Fortschritten bei der Miniaturisierung der HPLC. So sind seit kurzer Zeit erste kommerzielle Kapillartrennsäulen erhältlich^[117]. Aber auch die Entwicklung von Kapillar-HPLC-Systemkomponenten, wie auf kleine Flussraten optimierte Pumpen, Ventile, Mischkammern und Detektoren, wurde entscheidend vorangetrieben. Bei den Detektoren sind dabei die Z-Zellen für die UV-Detektion, die miniaturisierten

Ionenquellen für die Massenspektrometrie und die Mikrodurchflussprobenköpfe für die NMR-Spektroskopie zu nennen.

	Innendurchmesser	typische Flussrate
Präparative HPLC	> 5,0 mm	> 5 ml/min
Normal-bore HPLC	4,0 mm – 5,0 mm	1 ml/min – 10 ml/min
Narrow-bore HPLC	2,1 mm – 4,0 mm	300 µl/min – 2 ml/min
Micro-bore HPLC	500 µm – 2,1 mm	50 µl/min – 1 ml/min
Capillary HPLC	100 µm – 500 µm	1 µl/min – 50 µl/min
Nano-bore HPLC	25 µm – 100 µm	25 nl/min – 1 µl/min

Tabelle 1: Einteilung von HPLC-Säulen.

Die miniaturisierten Trenntechniken haben gegenüber den klassischen Methoden vielfältige attraktive Vorteile^{[118],[119]}, stellen aber auch eine gewisse Herausforderung dar^{[120],[121]}. Zu den Vorteilen bei der Verwendung von Kapillartrennsäulen zählt zum einen der drastisch reduzierte Bedarf an stationärer Phase. So wird bei klassischen HPLC-Säulen (normal-bore) Füllmaterial im Gramm-Bereich und bei der Herstellung von Kapillarsäulen im Milligramm-Bereich benötigt. Dies ist bei der Evaluierung von neusynthetisierten Materialien oder aber auch bei der Verwendung von sehr teuren stationären Phasen besonders wichtig. Ein weiterer entscheidender Vorteil ist die deutliche Senkung des Lösungsmittelverbrauchs. In der klassischen HPLC (4,6 mm Säulen-Innendurchmesser) wird häufig eine Flussrate von 1 ml/min verwendet, was einem Verbrauch von 60 ml pro Stunde entspricht. Bei der Kapillar-HPLC (250 µm Säulen-Innendurchmesser) kommt meist eine Flussrate von 5 µl/min zum Einsatz, was einem Lösungsmittelbedarf von 0,3 ml pro Stunde entspricht. Das bedeutet, dass der Lösungsmittelverbrauch um den Faktor 200 reduziert wird. Dies ist besonders für die Kapillar-HPLC-NMR-Kopplung entscheidend, da die sehr teuren volldeuterierten Lösungsmittel ökonomisch sinnvoll eingesetzt werden können. Bisher wurde bei der HPLC-NMR-Kopplung nur das Wasser durch Deuteriumoxid (D₂O) ersetzt und der organische Modifier weiter in protonierter Form verwendet, was zu Problemen auf der Seite der NMR-Spektroskopie führt.

Die Miniaturisierung führt weiterhin zu einer gesteigerten Sensitivität durch die Reduktion der eluierten Peakbreite, was eine Konzentrationserhöhung des Analyten

zur Folge hat. Voraussetzung ist, dass sich der Analyt auch in erhöhter Konzentration in der mobilen Phase vollständig löst und die stationäre Phase nicht überladen wird. Zusätzlich erfolgt eine Erhöhung der Trenneffizienz durch die Minimierung von Diffusionsparametern (van Deemter-Gleichung).

Neben den Vorteilen soll auch auf die Herausforderungen eingegangen werden, die diese Technik an die einzelnen Systemkomponenten stellt. So werden durch die kleinen Flussraten (unterer Mikroliter-Bereich) erhebliche Ansprüche an die Pumpentechnologie und Mischkammern gestellt. Die verwendeten Pumpen müssen die geforderten Flussraten konstant und reproduzierbar fördern können, und die Mischkammern müssen für eine gute Durchmischung der Lösungsmittel der mobilen Phase sorgen. Die Detektoren müssen in Hinblick auf ihre Sensitivität und das gesamte System auf ein möglichst geringes Totvolumen hin optimiert werden. Diese Totvolumina können zu einer deutlichen Bandenverbreiterung führen und die beschriebenen Vorteile in Bezug auf Sensitivitätssteigerung wieder zunichte machen. Deshalb wird darauf geachtet, dass alle Verbindungsstellen im System ein möglichst kleines oder gar kein Totvolumen besitzen.

4.3 Grundlagen moderner Kopplungsmethoden

4.3.1 HPLC-UV-Kopplung

Die UV-Spektroskopie ist eine einfache Methode zur on-line Detektion der in der HPLC getrennten Carotinoiden und zeichnet sich durch ihre hohe Selektivität und Empfindlichkeit aus^{[9],[122]}. Meist werden Dioden-Array-Detektoren (DAD) zur Aufnahme der UV-Spektren eingesetzt.

Auf Grund der Anwesenheit von bis zu elf konjugierten Doppelbindungen im Molekül zeigen die Carotinoide charakteristische Absorptionsbanden im nahen UV (300 nm) bis in den visuellen Bereich (550 nm). Die Hauptabsorptionsbande besitzt ein sogenanntes 3-Finger-Spektrum, d. h. eine Bande mit aufgelöster Feinstruktur (Abbildung 7). Sie besteht aus einem Hauptmaximum (Bande II) und aus je einem Nebenmaximum bei kleinerer Wellenlänge (Bande I) sowie bei höherer Wellenlänge

(Bande III). Die Bande I ist teilweise nur als Schulter zu erkennen. Die spektrale Feinstruktur gibt Aufschluss über die Struktur des Carotinoids und wird als Verhältnis der Peakhöhen III/II in Prozent angegeben.

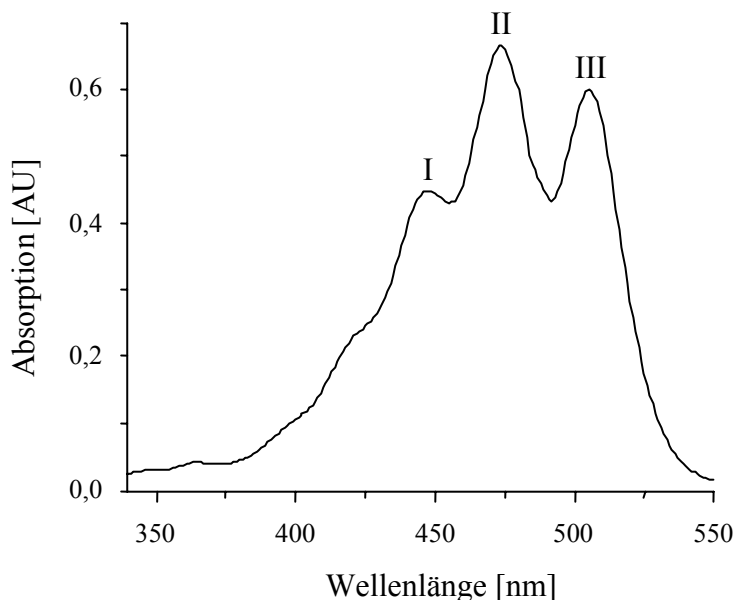


Abbildung 7: Exemplarisches UV-Spektrum von (*all-E*) Lycopin in Aceton.

Die genaue Lage der Absorptionsmaxima und die Feinstruktur hängt zum einem von dem verwendeten Lösungsmittel und zum anderen natürlich von der Struktur des Carotinoid-Moleküls ab. So gilt, je mehr konjugierte Doppelbindungen im Carotinoid-Molekül auftreten, desto mehr verschiebt sich das Hauptmaximum II zu höheren Wellenlängen. Phytoen zum Beispiel hat 3 konjugierte Doppelbindungen, weshalb die Bande II bei 286 nm erscheint, wohingegen diese bei Lycopin mit 11 konjugierten Doppelbindungen bei 470 nm auftritt. Cyclische Carotinoide weisen eine reduzierte Feinstruktur im Vergleich zu acyclischen Carotinoiden auf, und β -Iononringe zeigen zusätzlich eine hypsochrome Verschiebung von etwa 10 nm im Gegensatz zu anderen Endgruppen^[123].

Die *Z*-Isomere der Carotinoide besitzen ein leicht modifiziertes UV-Spektrum im Vergleich zu der *all-E* Struktur. Die Spektren zeigen eine schwache hypsochrome Verschiebung von 2 - 6 nm, sowie einen starken hypochromen Effekt. Die Feinstruktur wird reduziert und eine neue *cis*-Bande entsteht durch die Aufhebung der Molekülsymmetrie. Diese neue Bande tritt im Vergleich zu Bande III um 140 nm zu niedrigeren Wellenlängen hin verschoben auf, wobei ihre Intensität mit zunehmender Nähe der *Z*-Bindung zum Zentrum des Moleküls hin ansteigt. Eine Hydroxylgruppe

hingegen zeigt keinen erkennbaren Einfluss auf das Chromophor, weshalb sich die UV-Spektren von (all-E) Zeaxanthin und (all-E) β -Carotin auch kaum unterscheiden.

4.3.2 HPLC-APCI/MS-Kopplung

Die on-line HPLC-APCI/MS-Kopplung verbindet die leistungsstarke und selektive Trennmethode der HPLC mit der hochempfindlichen Detektionsmethode der Massenspektrometrie^{[124],[125]}. Die Massenspektrometrie ist eine massenselektive Analysenmethode, die eine Strukturermittlung selbst von komplizierten Naturstoffen ermöglicht. Die Schwierigkeit bei der Analyse von Carotinoiden besteht in deren Labilität, ihrer teilweise sehr geringen Polarität und Flüchtigkeit und damit in ihrer schlechten Ionisierbarkeit. Aus diesem Grund mussten geeignete Ionisierungstechniken entwickelt werden, die auf der einen Seite die große Menge an Lösungsmittel (1 ml/min) verdampfen und andererseits die unpolaren Carotinoide ohne starke Fragmentierung ionisieren können.

Die zwei hauptsächlich verwendeten Techniken zur Ionisierung von Carotinoiden sind die Elektrospray Ionisierung (Electrospray Ionization, ESI) und die chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI)^{[126],[127]}. Beide Methoden benötigen zur Ionisierung der Carotinoid-Moleküle andere polare Moleküle. Die ESI-Technik erfordert den Zusatz von polaren Additiven wie Silbersalzen oder halogenhaltigen Lösungsmitteln^{[128],[129]}. Die APCI-Technik hingegen benötigt keine Hilfsreagenzien. Die polare mobile Phase mit Wasser oder Methanol im Eluat reicht aus, um ein gutes Spray und damit eine gute Ionisierung zu erhalten^{[130],[131]}.

Beide Techniken können im positiven und negativen Ionenmodus betrieben werden, d.h. es entstehen durch die Ionisierung protonierte oder deprotonierte Molekül-Ionen. Durch die schonende Ionisierung beider Techniken werden kaum Fragmentierungen beobachtet. Bei der Verwendung von Ionenfallen kann mittels MS⁽ⁿ⁾-Detektion eine exakte Fragmentierung durchgeführt werden, was Rückschlüsse auf die Molekül-Struktur zulässt.

Die Empfindlichkeit der HPLC-APCI/MS-Kopplung für die Carotinoide liegt im Picogramm-Bereich und ermöglicht somit die Detektion von geringsten Mengen in biologischen Proben^{[132],[133]}. Ein Nachteil der Massenspektrometrie liegt in der Unterscheidung von massengleichen Carotinoiden oder von E/Z-Stereoisomeren eines Carotinoids.

Eine weitere Neuentwicklung bei den Ionisierungsquellen, die erst seit kurzem kommerziell erhältlich ist, basiert auf dem Prinzip der Photoionisation. Die sogenannte Photoionisation bei Atmosphärendruck (Atmospheric Pressure Photoionization, APPI) soll die Ionisierung von unpolaren Analyten, wie den Carotinoiden, ermöglichen. Sie wird vor allem dann eingesetzt, wenn mit der ESI oder der APCI keine ausreichend gute Ionisierung der Analyten erreicht werden kann^{[134],[135]}.

4.3.3 Kapillar-HPLC-NMR-Kopplung

Die on-line Kopplung der chromatographischen Trennmethode HPLC mit der kernmagnetischen Resonanz Spektroskopie^[136] (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) stellt neben der UV-Spektroskopie und der MS-Spektrometrie eine weitere, sehr wertvolle Methode zur Strukturaufklärung von Substanzen dar. Sie ist zwar im Gegensatz zu den beiden anderen Detektionstechniken relativ unempfindlich, liefert aber als einzige eine detaillierte Strukturinformation der untersuchten Analytmoleküle^{[137],[138]}. Somit können zum Beispiel die massengleichen E/Z-Stereoisomere der Carotinoide eindeutig unterschieden werden, was mit MS-Spektrometrie nicht möglich ist^{[139],[140]}. Ein weiterer großer Vorteil ist die Schnelligkeit, mit der die Proben in die Messzelle transferiert werden können, sowie die schonende Probenbehandlung (Licht- und Luftausschluss).

30 Jahre nach Veröffentlichung der ersten NMR-Experimente^{[141],[142]} und 12 Jahre nach Entwicklung der Puls-Fourier-Transform-(PFT)-Methode^[143] wurde 1978 erstmals die NMR-Spektroskopie mit der HPLC gekoppelt^{[144],[145],[146]}. Eine stetige Weiterentwicklung der NMR-Probenköpfe (Mikroprobenköpfe, kryogene Probenköpfe) und des experimentellen Aufbaus führten dazu, dass die on-line HPLC-NMR-Kopplung heute eine der wichtigsten Routinemethoden in der Naturstoff-

[147],[148],[149], Wirkstoff-^[150] und Umweltanalytik^[151] sowie in der Metabolismusforschung^[152] geworden ist.

4.3.3.1 Experimenteller Aufbau

Für die on-line Kopplung wird ein nahezu unverändertes chromatographisches System zur Trennung der Analyten verwendet. Die NMR-spektroskopische Detektion hingegen benötigt speziell gestaltete Durchflussprobenköpfe (Abbildung 8).

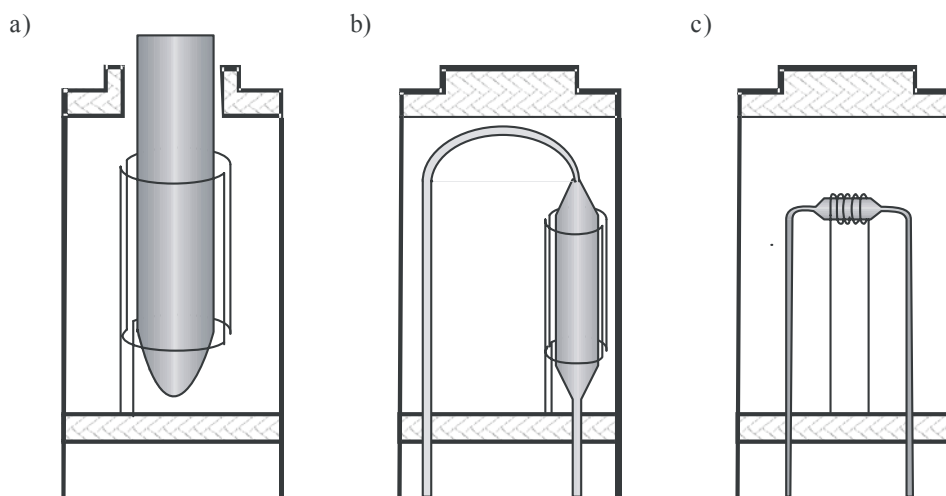


Abbildung 8: NMR-Probenköpfe, a) 5 mm Röhrenprobenkopf, b) Durchfluss-Probenkopf im Doppelsattel-Helmholtz-Design, c) solenoider Mikro-durchflussprobenkopf.

Die oben gezeigten Durchflussprobenköpfe sind entweder analog zu den klassischen 5 mm Röhrenprobenkopf im Doppelsattel-Helmholtz-Design (b) konfiguriert^[153] oder haben ein solenoides Spulendesign (c), welches senkrecht zum B_0 -Feld steht^[154]. Die üblichen Zellvolumina sind in 5 mm Röhren ca. 700 μl , in klassischen HPLC-NMR Durchflusszellen 120 - 200 μl und in solenoiden Mikrozellen 5 μl . Bei beiden Durchflusszelltypen werden die Sende- und Empfangsspule direkt auf der Detektionszelle angebracht. Dadurch ist zwar keine Rotation zur Minimierung von Magnetfeldinhomogenitäten mehr möglich, aber es resultiert ein deutlich erhöhter Füllfaktor (Anteil des Probenvolumens an dem von der Empfangsspule umschlossenen Gesamtvolumen), wodurch die Empfindlichkeit gesteigert wird. Durch das spezielle

Spulendesign der solenoiden Probenköpfe ergibt sich zusätzlich eine dreifach bessere Sensitivität gegenüber dem Doppelsattel-Helmholtz-Design^{[155],[156]}.

Prinzipiell existieren zwei Möglichkeiten, um HPLC-NMR-Kopplungsexperimente durchzuführen, der continuous-flow und der stopped-flow Modus. Im continuous-flow Modus wird unter konstantem, meist verringertem Fluss der Verlauf der chromatographischen Trennung simultan über ¹H-NMR-Spektren aufgezeichnet. Dabei erfolgt die Datenprozessierung der on-line Messung mittels eines Pseudo-2D-Experimentes. Die F2-Dimension wird durch die chemische Verschiebung bestimmt, während die chromatographische Retentionszeit in der F1-Dimension erscheint. Durch die begrenzte Aufnahmezeit für die einzelnen Spektren können nur relativ hoch konzentrierte Proben in diesem Modus vermessen werden, und die Aufnahme von 2D-NMR-Spektren ist nicht möglich.

Beim stopped-flow Modus wird die chromatographische Trennung zum gewünschten Zeitpunkt angehalten, und der Analyt kann vermessen werden. Die Vorteile dieses Modus sind, dass die NMR-Messzeit auf die Probenkonzentration angepasst werden kann und die Möglichkeit besteht, 2D-NMR-Spektren (z.B. COSY, HMBC, HSQC, TOCSY) aufzunehmen.

4.3.3.2 Mikroprobenkopf-NMR gekoppelt mit der Kapillar-HPLC

In Abbildung 9 ist das für diese Arbeit aufgebaute und verwendete Kapillar-HPLC-NMR System schematisch dargestellt.

Die verwendeten Systemteilkomponenten sollen nachfolgend kurz im Einzelnen mit ihren Vorteilen und Anforderungen besprochen werden. Zu den Komponenten zählen die miniaturisierte chromatographische Trenneinheit, der on-column UV-Detektor, die fused-silica Transferkapillare und der NMR-Mikrodurchflussprobenkopf.

Die miniaturisierte chromatographische Trenneinheit besteht aus einer splitlosen ternären Kapillar-HPLC-Pumpe, einem Injektionsventil mit Probenschleife (loop) von 100 bis 500 nl, einem Kapillar-Säulenofen und einer selbst-gepackten Kapillar-Trennsäule mit einem Innendurchmesser von 100 bis 250 µm. Die splitlose Kapillar-HPLC-Pumpe ermöglicht die Förderung von konstanten Flussraten im Bereich von 1

bis 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Durch die geringen Flussraten im unteren Mikroliter-Bereich ist der tägliche Lösungsmittelbedarf sehr niedrig und ermöglicht damit den ökonomisch sinnvollen Einsatz von volldeuterierten Lösungsmitteln in der Kapillar-HPLC-NMR-Kopplung. Für stopped-flow NMR-Experimente wird zusätzlich ein Peak-Parking-Ventil vor dem Injektionsventil eingefügt.

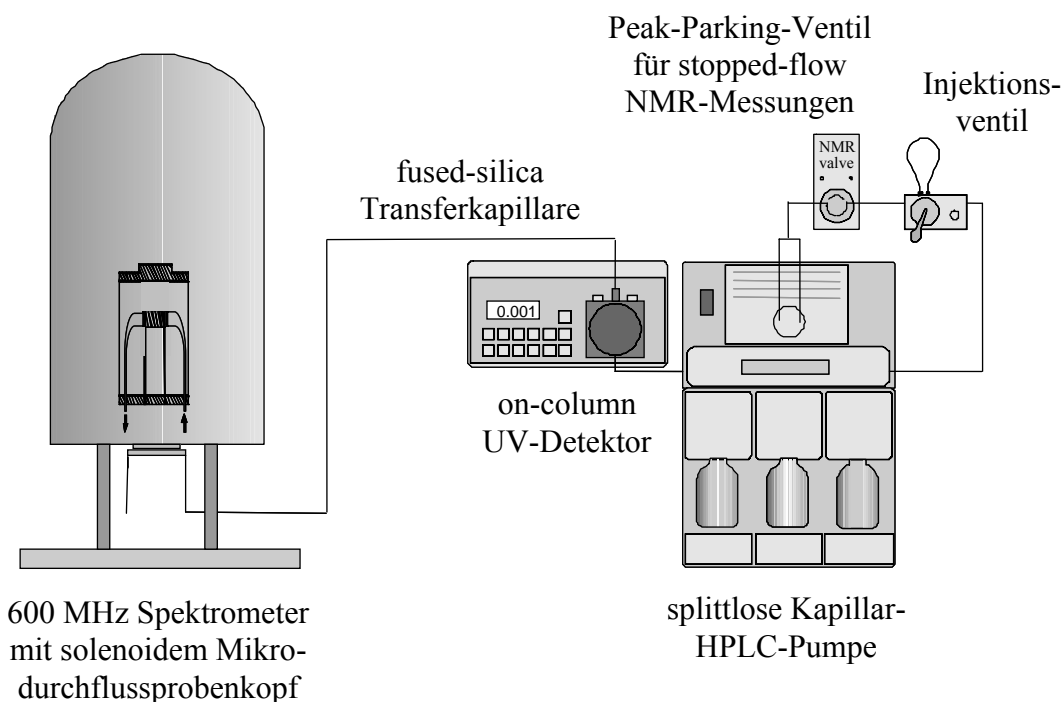


Abbildung 9: Kapillar-HPLC-NMR System.

Die UV-Detektion erfolgt nicht wie in der klassischen HPLC mit Durchfluss-Zellen sondern direkt in der Kapillare. Dafür wird die Polyimid-Schicht einer fused-silica Kapillare entfernt und die so vorbereitete Kapillare in dem Lichtweg des UV-Detektors fest fixiert. Der Vorteil dieser Technik liegt in der sehr leichten Austauschbarkeit der Kapillare und die somit einfache Anpassung an die eluierenden Peakvolumina, welche je nach verwendetem Innendurchmesser der Trennkapillare sehr unterschiedlich sind.

Zur Kopplung des chromatographische Trennsystems an den NMR-Mikrodurchflussprobenkopf, wird der Ausgang der UV-Detektionskapillare über eine 3 m lange (50 μm I.D.) fused-silica Transferkapillare mit dem Eingang des Probenkopfes verbunden.

Um die aus der Kapillar-HPLC eluierenden geringen Analytmengen mittels NMR-Spektroskopie zu detektieren, muss die Empfindlichkeit deutlich erhöht werden. Solche Empfindlichkeitssteigerungen in der NMR-Detektion können zum einen durch

die Verbesserung der Magnetfeldhomogenität zum anderen durch eine Erhöhung der Magnetfeldstärke erreicht werden. Beides wird aber zunehmend schwieriger und vor allem kostenspielig. Es können aber auch andere Techniken verwendet werden, wie die Methode des Polarisationsstransfers^[157], Techniken zur Reduktion von Relaxationszeiten^[158], sowie kryogene Plattformen^[159]. Ein anderer Ansatz für die gekoppelten HPLC-NMR Systeme ist die Verkleinerung der Sende- und Empfangsspule und damit verbunden des aktiven Detektionsvolumens^[160]. Solche speziell auf die eluierenden Peakvolumina (etwa 2 μl) von Kapillartrenntechniken optimierten Mikrodurchflussprobenköpfe werden im Doppelsattel-Helmholtz- und im solenoiden Design hergestellt. Auf Grund der bereits erwähnten dreifach besseren Sensitivität des solenoiden Designs kommen diese primär zum Einsatz. In diesem Design wird eine Kupfer-Spule direkt um eine fused-silica Kapillare gewickelt^[161], was einen höchst möglichen Füllfaktor gewährleistet und die Probe transversal zum Spektrometer-Magnetfeld positioniert. Um Suszeptibilitäts-Inhomogenitäten zu vermeiden, wird die Spule in einem Container mit FC-43 (Perfluorotributylamin, eine Flüssigkeit, die den Suszeptibilitätsprung der Kupferspule ausgleicht) fixiert.

Beide Mikroprobenkopf-Designs wurden bereits mehrfach erfolgreich mit miniaturisierten Trenntechniken on-line gekoppelt und liefern Detektionslimits im niedrigen Nanogramm-Bereich^[162]. Neben der Kapillar-HPLC (CapLC-NMR)^{[163],[164],[165]} wurde die miniaturisierte NMR-Detektion ebenfalls erfolgreich mit der Kapillarelektrophorese (CE-NMR)^{[166],[167]}, Kapillarelektrochromatographie (CEC-NMR)^[168] und der Kapillarisotachophorese (cITP-NMR)^[169] gekoppelt.

4.3.3.3 Anforderungen an die Chromatographie

Im Vergleich zur Messung in NMR-Röhrchen gibt es durch den kontinuierlichen Lösungsmittelfluss bei continuous-flow Experimenten etwas geänderte Gesetzmäßigkeiten^[1]. Bedingt durch den Fluss besitzen die zu untersuchenden Kerne nur eine begrenzte Aufenthaltsdauer τ in der Detektionszelle. Die Verweilzeit τ ist definiert als das Verhältnis des Detektionsvolumens zur Flussrate (Gl. 5). Eine kürzere

Aufenthaltsdauer τ der Kerne in der Durchflusszelle bewirkt eine Verkürzung der effektiven Lebensdauer der einzelnen Spinzustände.

$$\text{Aufenthaltsdauer, } \tau = \frac{\text{Detektionsvolumen}}{\text{Flussrate}} \quad (\text{Gl. 5})$$

$$1 / T_{1 \text{ Fluss}} = 1 / T_{1 \text{ Statisch}} + 1 / \tau \quad (\text{Gl. 6})$$

$$1 / T_{2 \text{ Fluss}} = 1 / T_{2 \text{ Statisch}} + 1 / \tau \quad (\text{Gl. 7})$$

Nach Heisenberg führt das zu einer Linienverbreiterung und damit verbunden zu einem Verlust an Auflösung (Tabelle 2). Andererseits wird durch den ständigen Zustrom nicht angeregter Kerne der Gleichgewichtszustand schneller erreicht, als dies allein durch die Spin-Gitter- und die Spin-Spin-Relaxation geschehen würde (Gl. 6 und 7). Dies ermöglicht eine schnellere Pulswiederholungsrate und ergibt dadurch einen Empfindlichkeitsgewinn.

Detektionsvolumen [nl]	Aufenthaltsdauer τ [s]		Linienverbreiterung $1/\tau$ [Hz]	
	Flussrate 2 $\mu\text{l}/\text{min}$	Flussrate 5 $\mu\text{l}/\text{min}$	Flussrate 2 $\mu\text{l}/\text{min}$	Flussrate 5 $\mu\text{l}/\text{min}$
5	0,15	0,06	6,66	16,66
500	15,00	6,00	0,06	0,16
750	22,52	9,01	0,04	0,11
1500	45,05	18,02	0,02	0,05

Tabelle 2: Berechnete Aufenthaltsdauer τ und die resultierende Linienverbreiterung bei unterschiedlich großen Detektionsvolumina und Flussraten.

Trotz des Einsatzes von volldeuterten Lösungsmitteln treten häufig Resonanzsignale von protonierten Rest-Lösungsmitteln im NMR-Spektrum auf. Sie überdecken einen gewissen Resonanzbereich, welcher dann für die Detektion der Analytmoleküle unbrauchbar ist. Sie führen weiterhin zu Dynamikproblemen im A-D-Wandler des NMR-Spektrometers und sollten deshalb mittels Lösungsmittelunterdrückung auf etwa die Höhe der ^{13}C -Satelliten verringert werden^[170]. Denn nur wenn der dynamische Bereich des Empfängers an die Intensität des Analytsignals angepasst wird, kann eine Digitalisierung der Signale erfolgen. Die Lösungsmittelunterdrückung kann auf mehrere Arten erfolgen, z. B. durch

Vorsättigungsmethoden, Relaxationsmethoden, selektive Nichtanregung der Lösungsmittelresonanz (Tailored Excitation) oder durch eine Lösungsmittelunterdrückung mit B_0 -Feld-Gradienten.

Wegen ihrer einfachen Handhabung wird meist eine Vorsättigungsmethode mit Shaped-Pulsen eingesetzt. Sie kann leicht in verschiedenste Pulsprogramme implementiert werden und ist durch ihre große Effizienz selbst zur Unterdrückung mehrerer NMR-Signale verwendbar. Dabei wird während des Relaxationsdelays etwa 1 s mit einem selektiven low-power Shaped-Puls, meist in Rechteckform, auf die Resonanzfrequenz des Lösungsmittels eingestrahlt und diese gezielt gesättigt.

Auch bei der Wahl der mobilen Phase gilt es einige Regeln zu beachten. So sollten möglichst nur binäre Gemische eingesetzt werden, damit so wenige Resonanzsignale wie möglich die Analytsignale überlagern. Besonders geeignet sind binäre Mischungen von Deuteriumoxid und deuteriertem Aceton- d_6 , MeCN- d_3 oder MeOH- d_4 . Isokratische Trennungen sollten den Gradienten Trennungen vorgezogen werden, da die chemische Verschiebung δ der Analytsignale zum Teil erheblich von der Lösungsmittelzusammensetzung abhängt und auch die Lösungsmittelunterdrückung problematischer wird.

Für die Kapillar-Trennsäulen ist eine hohe Beladbarkeit der eingesetzten stationären Phase wünschenswert, so dass bei einer extremen Beladung der Säule noch eine gute Trennleistung gegeben ist. C_{30} -Trennsäulen zeichnen sich durch eine solch hohe Beladbarkeit und Selektivität aus und werden deshalb vermehrt bei der HPLC-NMR-Analytik von Naturstoffen eingesetzt^{[171],[172]}.

5 Ergebnisse

5.1 Herstellung von hocheffizienten Kapillartrennsäulen

Durch die Miniaturisierung von direktgekoppelten Analysensystemen ist es möglich, selbst kleinste Analytmengen aus nur limitiert vorhandenen biologischen Proben zu identifizieren und deren Struktur zu ermitteln. Die Voraussetzung dafür ist ein hocheffizientes und hochsensitives Trennsystem. Für die Sensitivität des Systems muss die verwendete Detektionstechnik (UV, MS, NMR) den kleinen Analytmengen gerecht werden. Die Effizienz des Systems wird zu einem erheblichen Teil durch die erzielte chromatographische Auftrennung der zu untersuchenden Analyten bestimmt. Eine gute chromatographische Trennung wird dabei hauptsächlich durch die Wahl der stationären Phase und durch die Packungsqualität der Trennsäule beeinflusst. Die Trennstärke wird durch den Trennfaktor α und die Trenneffizienz durch die Anzahl und die Höhe der theoretischen Böden N im jeweiligen Peak beschrieben. Um die so erzielte Trennleistung auch mit einem Detektor erfassen zu können, darf es zu keiner Bandenverbreiterung außerhalb der Trennkapillare kommen. Diese Bandenverbreiterung wird vor allem durch Totvolumina im Trennsystem hervorgerufen.

Als stationäre Phasen werden überwiegend partikuläre chromatographische Trennphasen verwendet. Sie weisen eine große Bandbreite an unterschiedlichen Morphologien (z.B. Porosität der Partikel, Partikelgröße) und verschiedenen Oberflächenmodifikationen (Normalphasen, Umkehrphasen) auf. Sie erlauben die Auftrennung der Komponenten durch spezifische Wechselwirkungen der Analytmoleküle mit der mobilen Phase, dem Lösungsmittel, und der stationären Phase. Meist werden für die unterschiedlichen Trennprobleme speziell angepasste stationäre Phasen verwendet.

Für die Trennung von verschiedenen Carotinoiden und deren E/Z-Stereoisomeren kommt die speziell dafür entwickelte C_{30} -Phase zum Einsatz. Ein entscheidender Punkt in dieser Arbeit war deshalb die Herstellung von hocheffizienten C_{30} -Kapillartrennsäulen.

5.1.1 Optimierung der Endfitting-Technik für Kapillartrennsäulen

Bei der Herstellung von Kapillartrennsäulen werden die sphärischen Partikel (1 - 5 μm) möglichst dicht und homogen in eine fused-silica Kapillare mit einem Innendurchmesser von 100 - 250 μm gepackt. Ein entscheidender Punkt dabei ist die stabile Fixierung dieser Partikel in der Kapillare. Daher soll zunächst einmal auf das verwendete Endfitting-Design eingegangen werden.

Einige wichtige Punkte, die das Endfitting erfüllen muss sind:

- möglichst geringes Totvolumen, um die Trennleistung nicht zu beeinträchtigen
- gute Fixierung der Partikel und Langzeit-Stabilität der Fritte, ohne Beeinflussung der Eigenschaften der stationären Phase und der Porosität der Fritte,
- sowie eine hohe mechanische Stabilität und Reproduzierbarkeit.

Seit Beginn der Herstellung von Kapillartrennsäulen wurden verschiedenste Techniken zur Fixierung der stationären Phase in der Kapillare ausgetestet und verwendet. So werden Fritten entweder durch eine Quervernetzung der stationären Phase mittels Sintern^{[173],[174]} (sogenanntes Brennen) oder durch eine partielle Polymerisation^[175] (sogenanntes Dippen) hergestellt. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Nutzung des Keystone-Effektes^{[176],[177]}, wobei die Glaskapillare am Ende auf etwa 10 μm verjüngt und die stationäre Phase durch diesen Effekt zurückgehalten wird.

Das Sintern ist die am weitesten verbreitete Endfitting-Technik, obwohl sie kaum reproduzierbar und bei C_{30} -Phasen schwer anwendbar ist. Das Problem bei der C_{30} -Phase besteht darin, dass für den Sinterprozess auf eine wässrige NaCl-Lösung umgestellt werden muss, was aber zum Kollabieren und/oder Ablösen der C_{30} -Alkylketten vom Trägermaterial führen kann. Versuche in organischen Lösungsmitteln ergaben für das Sintern keine stabilen Fritten. Auch durch das sogenannte Dippen wurden keine stabilen Fritten erhalten. Es muss immer ein guter Kompromiss zwischen der Haltbarkeit/Stabilität und der Permeabilität der Fritte gefunden werden.

Dies ist nur sehr schwer erzielbar und eine reproduzierbare Herstellung dieser Fritten ist deshalb kaum möglich.

Die Fixierungstechnik unter Ausnutzung des Keystone-Effektes kommt im Vergleich zu den beiden vorher beschriebenen Techniken ohne Fritten aus. Diese Technik mit einem verjüngten Kapillarende ist in der Herstellung sehr zeitaufwendig, da die mittels eines H₂-Brenners zugeschmolzene fused-silica Kapillare zuerst plan aufgeschliffen werden muss. Das erfordert eine erhebliche Fingerfertigkeit, weil die Glaskapillaren durch die Beanspruchung beim Schleifprozess sehr schnell splintern können. Gleichzeitig wird beim Schmelzprozess die stabilisierende Polyimidschicht zerstört, was die fused-silica Kapillare sehr bruchempfindlich macht.

Auf Grund der vielfältigen Nachteile dieser Techniken wurde im Arbeitskreis eine neue Endfitting-Technik etabliert. Sie ähnelt stark dem Design von klassischen HPLC-Säulen und ist in Abbildung 10 schematisch dargestellt.

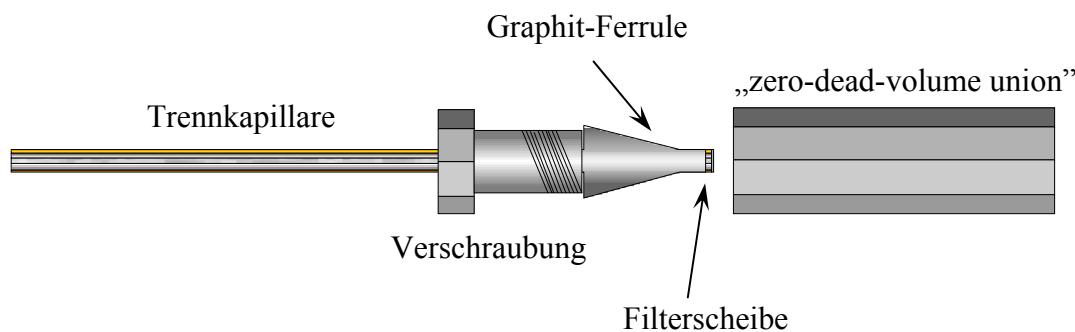


Abbildung 10: Schematische Darstellung des verwendeten Endfitting-Designs.

Die fused-silica Kapillare wird mit einer Verschraubung und einem Graphit-Ferrule in einem „zero-dead-volume Union“ fest fixiert und mit einem 75 µm dünnen Stahlsiebchen mit einer Porengröße von 2 µm abgeschlossen. Diese Endfitting-Technik zeichnet sich durch eine hohe Reproduzierbarkeit (die Morphologie der Fritte, z.B. Porosität, ist durch die Filterscheibe vorgegeben) sowie Stabilität der Fritte aus und kann ganz einfach über das Union mit den anderen Systemkomponenten (Injektionsventil, UV-Detektionskapillare) verbunden werden. Beim Zusammenbau ist besonders darauf zu achten, dass die fused-silica Kapillare einen sauberen und glatten Schnitt hat und dass die Filterscheibe ganz plan im Union liegt. Dies ist sehr wichtig, da sonst an dieser Stelle ein Totvolumen in das Trennsystem eingeführt wird, welches

sich negativ auf die Trennleistung auswirkt. Diese Anordnung wird fest miteinander verschraubt, wobei das Graphit-Ferrule dafür sorgt, dass die Verbindung dicht ist.

Neben den genannten Vorteilen ist aber darauf hinzuweisen, dass der Außendurchmesser der Filterscheibe mit ca. 2 mm deutlich größer ist als der Innendurchmesser der verwendeten fused-silica Kapillaren (100 - 250 μm), wodurch rein formal ein Totvolumen eingeführt wird. Die Auswirkungen auf die Trennleistung der so hergestellten Kapillartrennsäulen war jedoch real nicht nachweisbar, und auf Grund der sehr einfachen Handhabung und Anwendbarkeit auf die benötigte C_{30} -Phase wurde diese Endfitting-Technik zur Herstellung von Kapillartrennsäulen verwendet.

5.1.2 Optimierung des Packprozesses für partikuläre stationäre Phasen

Neben der Optimierung der Endfitting-Technik musste der Packprozess an die verwendete stationäre Phase angepasst und die Packanlage modifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit kam der Slurry-Packprozess zum Einsatz. Diese Technik ist die am häufigsten angewandte Methode und wurde bereits 1981 zum Packen von C_{18} -Material in klassische HPLC-Säulen verwendet^[178]. Das Packen der Säulen erfolgt abwärtsgerichtet bei einem konstantem Druck von etwa 600 bar. Als Slurry-Medium wird hauptsächlich Isopropanol oder Tetrachlorkohlenstoff und als Packmedium Methanol verwendet. Die empfohlene Slurry-Konzentration der suspendierten stationären Phase liegt bei 60 bis 70 mg/ml.

In Abbildung 11 ist das verwendete System dargestellt. Es besteht aus einer pneumatischen Pumpe, zwei Hochdruckventilen und einem Slurry-Reservoir. Dieses Slurrygefäß ist eine 12,5 cm lange HPLC-Leersäule mit einem Innendurchmesser von 1 mm und einem Volumen von ca. 100 μl . Am Ende dieser Leersäule wird die zu packende fused-silica Kapillare mittels eines speziell angepassten konischen Ferruls befestigt.

Für den Packprozess werden 20 mg der stationären Phase in 300 μl Tetrachlorkohlenstoff suspendiert. Um eine gute Suspension der Partikel zu erreichen wird die Suspension für 10 min im Ultraschallbad behandelt. Die Suspension wird anschließend zügig mit einer Spritze in das Slurry-Reservoir überführt. Um

Verstopfungen der Kapillare während des Packprozesses zu vermeiden, wird anstelle einer Metall-Nadel eine fused-silica Kapillare, mit dem selben Innendurchmesser wie die zu packende Kapillarsäule, als Nadelspitze verwendet. Dadurch können eventuell vorhandene Partikelagglomerate bereits beim Befüllen des Slurry-Reservoirs eliminiert werden. Nach Verschließen des Slurrygefäßes wird an der pneumatischen Pumpe ein Initialdruck von etwa 400 bar aufgebaut und durch Öffnen eines Hochdruckventils zum Slurry-Reservoir geleitet. Durch das Packmedium, eine binäre Mischung aus Acetonitril und Wasser (70 : 30, v/v), wird die Suspension aus dem Reservoir in die Kapillarsäule gepresst. Innerhalb der ersten Minuten wird der Druck langsam auf 650 bar erhöht und dann für ca. 30 Minuten gehalten.

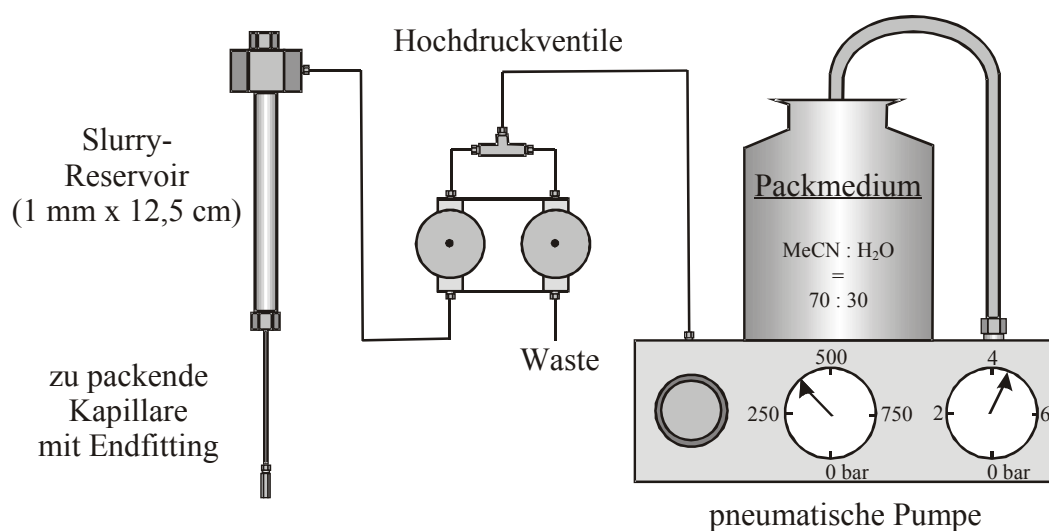


Abbildung 11: Schematische Darstellung der verwendeten Packanlage.

Nach etwa 10 Minuten ist eine Trübung erkennbar. Diese Trübung wird durch den Lösungsmittelwechsel vom Slurry-Medium zum Packmedium hervorgerufen. Der Grund dafür ist, dass die Partikel der stationären Phase im Packmedium schlechter suspendiert werden. Nach ca. 30 Minuten wird das Hochdruckventil wieder geschlossen und der Druck in der gepackten Kapillare langsam abgebaut. Anschließend kann die Kapillare aus dem System entfernt und auf die benötigte Länge gekürzt werden.

5.1.3 Ermittlung der Trennleistung von Kapillartrennsäulen

Um die Qualität und Effizienz der gepackten Kapillarsäulen zu bestimmen, wurde eine einfache Testmischung (Propyl-, Butyl- und Pentylbenzol, je 1 mg/ml) verwendet. Als mobile Phase kam wiederum die binäre Mischung Acetonitril und Wasser (70 : 30, v/v) bei einer Flussrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ zum Einsatz. Exemplarisch ist in Abbildung 12 eine Testtrennung auf einer selbstgepackten 3 μm C₁₈-Kapillartrennsäule (10 cm x 250 μm I.D.) gezeigt.

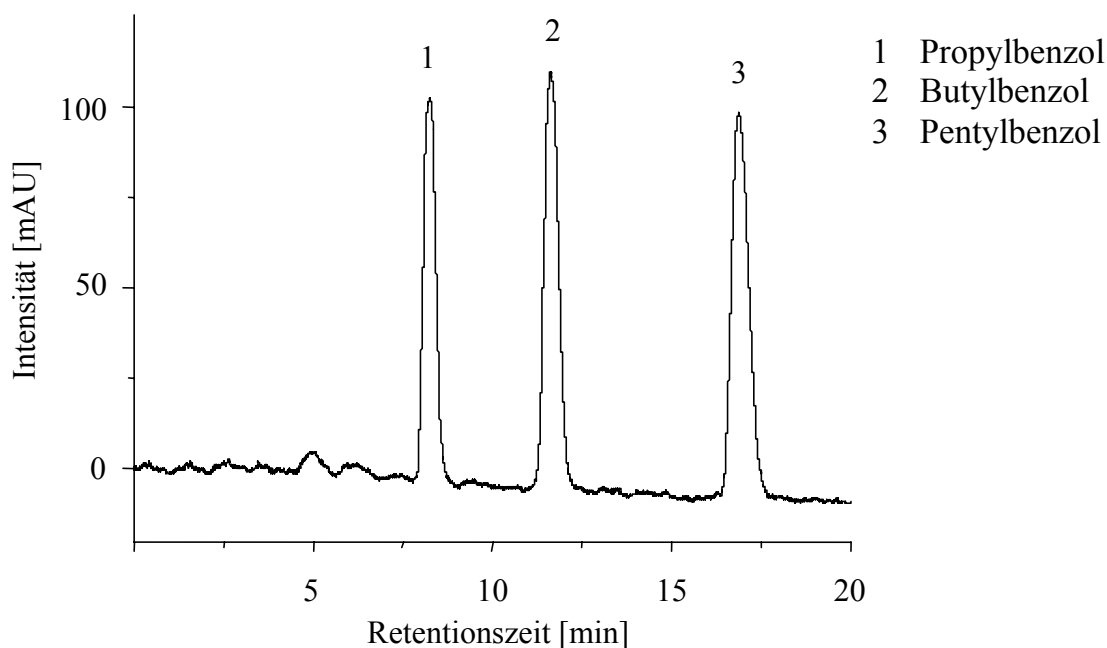


Abbildung 12: Testtrennung auf einer C₁₈-Kapillartrennsäule.

Die gute Packungsqualität der Kapillarsäule zeigt sich durch scharfe und symmetrische Peaks. Die Trenneffizienz wird durch die Anzahl an theoretischen Böden gezeigt und erreicht bei dieser Kapillarsäule etwa den Wert von 100.000 theoretischen Böden pro Meter als Mittelwert (Tabelle 3).

	Retentionszeit [min]	Signalhalbwertsbreite	Theoretische Böden
Propylbenzol	8,26	0,23	6869
Butylbenzol	11,64	0,29	9170
Pentylbenzol	16,88	0,37	11854

Tabelle 3: Berechnete Anzahl an theoretischen Böden für eine 10 cm lange C₁₈-Kapillarsäule.

5.2 Kapillar-HPLC-NMR-System Sensitivität

Nach der Charakterisierung der selbstgepackten Kapillartrennsäulen soll in diesem Abschnitt die Sensitivität des gesamten Kapillar-HPLC-NMR-Systems ermittelt werden. Dazu wurden Untersuchungen in Bezug auf Bandenverbreiterungen durch die verwendeten Transferkapillaren, Simulationen des Strömungsverhaltens in der NMR-Detektionszelle und NMR-spezifische Sensitivitätstest durchgeführt.

5.2.1 Bestimmung der Bandenverbreiterung in der Transferkapillare

Neben Signalverbreiterungen in der Trennkapillare, die während der chromatographischen Trennung durch Diffusion auftreten, können noch zusätzlich Bandenverbreiterungen z.B. in den Transferkapillaren hervorgerufen werden. Diese Bandenverbreiterungen reduzieren die Trenneffizienz der Trennsäule und führen zu unsymmetrischen Peaks. Die zwei Hauptursachen, die zu Bandenverbreiterungen führen können, sind Totvolumina in den Verbindungen der einzelnen System-Komponenten und zu große Innendurchmesser der Transferkapillaren. Es muss deshalb darauf geachtet werden, dass für alle Verbindungsstellen im System „zero-dead-volume unions“ eingesetzt werden, dass die Transferkapillaren möglichst kurz sind und einen kleinen Innendurchmesser besitzen. Für UV- und MS-Experimente sind diese beiden Punkte leicht umsetzbar. Bei NMR-Experimenten muss aber auf Grund des Streufeldes des verwendeten NMR-Spektrometers eine drei Meter lange Transferkapillare verwendet werden. Dies ist erforderlich, damit die Pumpe außerhalb der 5 Gauss-Linie des Streufeldes des Spektrometers steht und das Magnetfeld während der Messungen nicht beeinflusst wird.

Für die Untersuchung wurden zwei Transferkapillaren mit Innendurchmessern von 150 μm und 75 μm gewählt. Als Standard diene erneut eine Mischung aus Propyl-, Butyl- und Pentylbenzol, welche auf einer C_{18} -Kapillarsäule (20 cm x 250 μm I.D.) chromatographisch getrennt wurde. Die mobile Phase war Acetonitril : Wasser (70 : 30, v/v). Die Detektion erfolgte bei 254 nm und die Flussrate betrug 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Für die Bestimmung der Bandenverbreiterung wurden die Signalhalbwertsbreiten $w_{0,5}$ der drei Substanzen genutzt. Dazu wurde jeweils die Signalhalbwertsbreite direkt nach der Kapillarsäule und am Ende der Transferkapillare mit einem UV-Detektor bestimmt. In

Tabelle 4 sind die erhaltenen Werte für die Transferkapillare mit einem Innendurchmesser von 150 μm zusammengefasst.

		Länge der Transferkapillare							
		0,0 m	0,25 m	0,5 m	0,75 m	1,0 m	1,5 m	2,0 m	3,0 m
Propyl- benzol	$w_{0,5}$	0,234	0,263	0,292	0,306	0,330	0,374	0,420	0,465
	RSD	$\pm 0,004$ (1,66%)	$\pm 0,001$ (0,30%)	$\pm 0,014$ (4,89%)	$\pm 0,019$ (6,37%)	$\pm 0,007$ (2,06%)	$\pm 0,005$ (1,29%)	$\pm 0,005$ (1,13%)	$\pm 0,008$ (1,69%)
Butyl- benzol	$w_{0,5}$	0,281	0,311	0,345	0,343	0,379	0,397	0,446	0,505
	RSD	$\pm 0,002$ (0,58%)	$\pm 0,011$ (3,52%)	$\pm 0,013$ (3,90%)	$\pm 0,011$ (3,15%)	$\pm 0,012$ (3,18%)	$\pm 0,010$ (2,48%)	$\pm 0,014$ (3,10%)	$\pm 0,017$ (3,27%)
Pentyl- benzol	$w_{0,5}$	0,349	0,381	0,409	0,423	0,448	0,474	0,526	0,578
	RSD	$\pm 0,007$ (2,01%)	$\pm 0,011$ (2,76%)	$\pm 0,008$ (1,92%)	$\pm 0,010$ (2,34%)	$\pm 0,004$ (0,88%)	$\pm 0,009$ (1,91%)	$\pm 0,017$ (3,23%)	$\pm 0,017$ (2,87%)

Tabelle 4: Signalhalbwertsbreiten $w_{0,5}$ [min] der Alkylbenzole unter Verwendung einer Transferkapillare mit 150 μm Innendurchmesser.

Anhand der ermittelten Signalhalbwertsbreiten ist eindeutig sichtbar, dass bei der Verwendung eines Innendurchmessers von 150 μm erhebliche Diffusionseffekte und somit Bandenverbreiterungen auftreten. Bei Propylbenzol wird nach drei Metern Transferkapillare fast eine Verdopplung der Signalhalbwertsbreite gefunden, was einem Wert von 32,9% pro Meter entspricht. Auch bei den anderen beiden Alkylbenzolen wurden ähnliche Werte gemessen. Der Mittelwert für die Bandenverbreiterung für alle drei Verbindungen liegt bei 27,1% pro Meter Transferkapillare.

		Länge der Transferkapillare							
		0,0 m	0,25 m	0,5 m	0,75 m	1,0 m	1,5 m	2,0 m	3,0 m
Propyl- benzol	$w_{0,5}$	0,234	0,235	0,239	0,238	0,238	0,242	0,240	0,259
	RSD	$\pm 0,004$ (1,66%)	$\pm 0,004$ (1,85%)	$\pm 0,003$ (1,33%)	$\pm 0,005$ (2,30%)	$\pm 0,003$ (1,42%)	$\pm 0,001$ (0,59%)	$\pm 0,002$ (0,99%)	$\pm 0,004$ (1,60%)
Butyl- benzol	$w_{0,5}$	0,281	0,279	0,280	0,287	0,291	0,292	0,287	0,309
	RSD	$\pm 0,002$ (0,58%)	$\pm 0,007$ (2,36%)	$\pm 0,006$ (2,25%)	$\pm 0,009$ (2,98%)	$\pm 0,008$ (2,80%)	$\pm 0,008$ (2,75%)	$\pm 0,002$ (0,60%)	$\pm 0,009$ (3,07%)
Pentyl- benzol	$w_{0,5}$	0,349	0,348	0,368	0,360	0,361	0,380	0,368	0,393
	RSD	$\pm 0,007$ (2,01%)	$\pm 0,008$ (2,38%)	$\pm 0,006$ (1,74%)	$\pm 0,004$ (1,11%)	$\pm 0,005$ (1,48%)	$\pm 0,008$ (2,08%)	$\pm 0,008$ (2,13%)	$\pm 0,012$ (3,00%)

Tabelle 5: Signalhalbwertsbreiten $w_{0,5}$ [min] der Alkylbenzole unter Verwendung einer Transferkapillare mit 75 μm Innendurchmesser.

In Tabelle 5 sind zum Vergleich die erhaltenen Werte für 75 μm Innendurchmesser zusammengefasst. Wie leicht zu sehen ist, liegen die Signalhalbwertsbreiten für die Alkylbenzole bei der Verwendung eines Innendurchmesser von 75 μm für die Transferkapillare unter denen mit 150 μm Innendurchmesser. Besonders deutlich wird das bei Propylbenzol, wo die Signalverbreiterung von 32,9% pro Meter auf 3,6% pro Meter reduziert wurde. Der Mittelwert der Bandenverbreiterung liegt bei nur noch 3,7% und ist im Vergleich zu vorher mehr als 7 mal geringer. In Abbildung 13 sind die ermittelten Zahlenwerte noch einmal graphisch dargestellt.

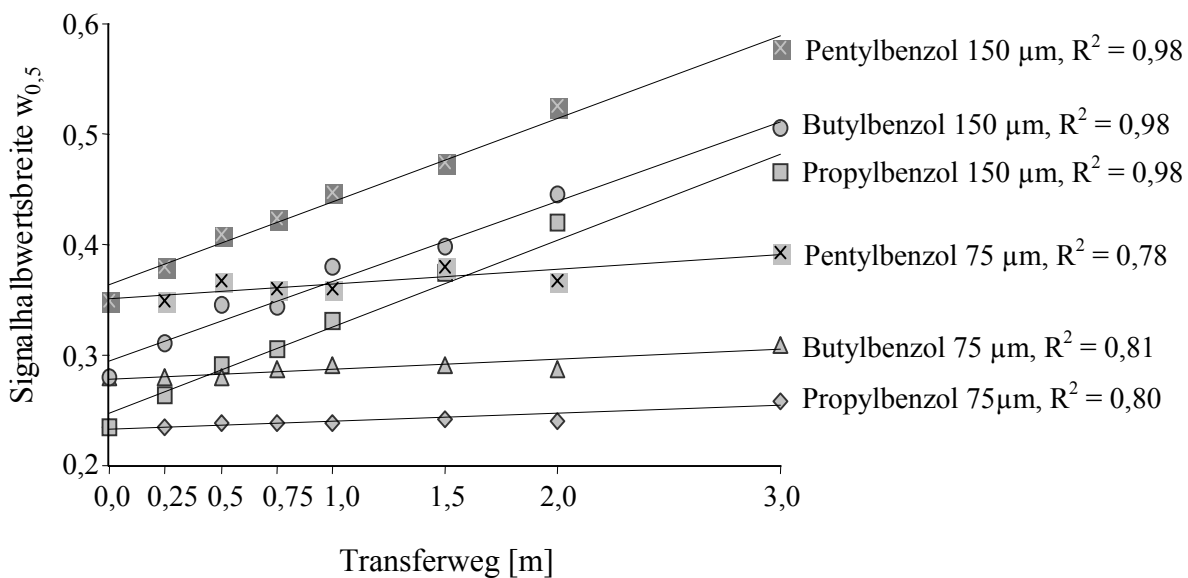


Abbildung 13: Graphische Darstellung der Bandenverbreiterung durch Transferkapillaren mit unterschiedlichen Innendurchmessern.

Diese starke Bandenverbreiterung wirkt sich vor allem negativ auf die Konzentration der Analyten im Detektionsbereich aus. Sie verlieren deutlich an Signalintensität, was ist gleichbedeutend mit einem Konzentrationsverlust im Peakmaximum ist. Das wirkt sich wiederum negativ auf die NMR-Detektion aus.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde für alle Transferkapillaren im Kapillar-HPLC-NMR-System ein Innendurchmesser von 50 μm gewählt. Damit konnte die Bandenverbreiterung auf ein Minimum reduziert und die erzielten Trenneffizienzen der Kapillarsäulen erhalten werden.

5.2.2 Simulation der Durchströmung einer Kapillar-NMR-Detektionszelle

In Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Hasse aus Stuttgart sollte das Strömungsverhalten eines Substanzpeaks in der Kapillar-NMR-Zelle analysiert werden. Dazu wurde das Verweilzeitverhalten eines idealen Rechteck-Peaks von Methanol in Wasser theoretisch mit der Strömungssimulationssoftware FLUENT untersucht. Für die Berechnung der Simulation wurde die in Abbildung 14 schematisch dargestellte Kapillar-NMR-Detektionszelle benutzt.

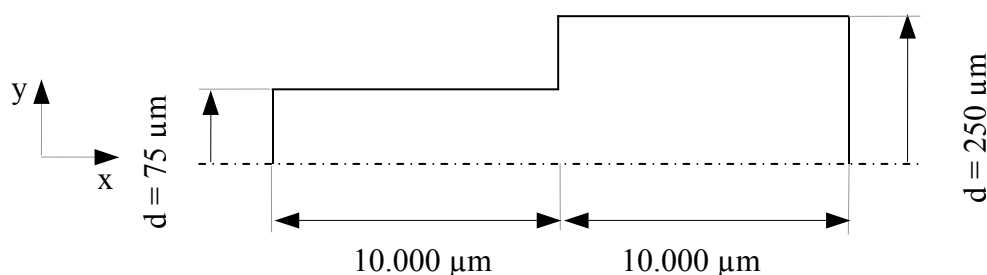


Abbildung 14: Geometrie der zur Berechnung verwendeten Kapillar-NMR-Detektionszelle.

Untersucht wurde, inwieweit sich die Form des Peaks durch die Strömung und Geometrie von Zu- und Ablauf sowie der Detektionszelle verändert. Besonderes Augenmerk lag dabei auf dem Einfluss der Querschnittsänderung am Eintritt in die Detektionszelle und der Diffusion in axialer und radialer Richtung. Als Rechengrundlage dienten die Maße der vereinfachten Detektionszelle in Abbildung 14 und ein Volumenstrom $V = 1 \mu\text{l}/\text{min}$. Um unangemessen lange Rechenzeiten zu vermeiden, wurde das Modell der Detektionszelle auf ein Stück Zulauf sowie den Übergang auf die Detektionszelle beschränkt.

Die Berechnung erfolgte zweidimensional axialsymmetrisch zur Längsachse der Zelle, also in Zylinderkoordinaten. Die Diskretisierung des Rechengebiets erfolgte mit rechteckigen Elementen, die Elementgröße betrug in x-Richtung $10 \mu\text{m}$, in y-Richtung $5 \mu\text{m}$. In der Umgebung der Längsachse wurde die Gittergröße in y-Richtung auf $2 \mu\text{m}$ verringert, um eine bessere Auflösung zu erhalten. Für die axiale Strömungsgeschwindigkeit ergibt sich aus dem genannten Volumenstrom im Zulauf $v_x = 3,8 \cdot 10^{-3} \text{ m/s}$, in der Detektionszelle $v_x = 0,34 \cdot 10^{-3} \text{ m/s}$. Aus Elementgröße und Strömungsgeschwindigkeit ergibt sich eine maximale Zeitschrittweite von $\Delta t = 10^{-3} \text{ s}$.

Als mobile Phase wurde Wasser gewählt und der Peak wurde durch Ethanol simuliert. Die gesamte Simulation erfolgte isotherm bei 300 K. In Tabelle 6 sind die relevanten Größen für die Simulation angegeben. Die Werte für die Dichte ρ und die dynamische Viskosität η stammen aus der Datenbank von FLUENT und der Diffusionskoeffizient D aus der Literatur^[175]. Die Mischungsviskosität wurde als unabhängig von der Zusammensetzung angenommen und gleich der des Wassers gesetzt, die Mischungsdichte als volumengewichteter Mittelwert zweier inkompressibler Medien berechnet.

	Dichte ρ [kg/m ³]	Viskositätskoeffizient η [kg/ms]	Diffusionskoeffizient D [m ² /s]
Wasser	998,2	$1,0 \cdot 10^{-3}$	
Ethanol	790,0	$1,2 \cdot 10^{-3}$	$8,4 \cdot 10^{-10}$

Tabelle 6: Stoffwerte für die Strömungsberechnung mit FLUENT.

Für den Peak wurde ein ideales Rechteckprofil und eine Konzentration von $0,2 \text{ g}_{\text{Ethanol}}/\text{g}_{\text{Lösung}}$ angenommen. Zum Zeitpunkt $t = 0 \text{ s}$ wurde am „linken Ende“ des Simulationsgebiets ein solcher Peak mit einer Länge von 5 mm und einer Breite von 75 μm aufgegeben. Anschließend wurde dessen Bewegung durch die Zelle über die Zeit beobachtet. Die Transportgleichungen ergeben ein gekoppeltes System nichtlinearer Differentialgleichungen. Dabei werden die Impulsgleichungen in axialer und radialer Richtung, die Kontinuitätsgleichung und eine Zustandsgleichung für die Dichte simultan iterativ gelöst. Für jeden Zeitschritt wurden 30 Iterationsschritte vorgegeben.

Mithilfe der beiden dimensionslosen Kennzahlen Reynoldszahl Re (Gl. 8) und Pécletzahl Pe (Gl. 9) lassen sich das Strömungsfeld und der Stofftransport charakterisieren.

$$\text{Reynoldszahl, } Re = \frac{v_x \cdot \rho \cdot d}{\eta} \quad (\text{Gl. 8})$$

$$\text{Pécletzahl, } Pe = \frac{v_x \cdot d}{\eta} \quad (\text{Gl. 9})$$

Die Reynoldszahl beschreibt das Verhältnis aus Trägheits- und Zähigkeitskraft, die Pécletzahl ist ein Maß für das Verhältnis von konvektivem zu diffusivem Transport.

Für die gegebenen Verhältnisse ergeben sich die Werte in Tabelle 7. Die Reynoldszahl ist in beiden Fällen deutlich kleiner als 1, es liegt also eine laminare, schleichende Strömung vor. Die Werte der Pécletzahl liegen deutlich über 2, somit überwiegt der konvektive Transport gegenüber dem diffusiven, der jedoch nicht vernachlässigt werden darf. Dies ist erst für $Pe > 10^5$ zulässig.

	Reynoldszahl Re	Pécletzahl Pe
Zulauf	0,285	678,6
Detektionszelle	0,085	202,4

Tabelle 7: Berechnete Reynolds- und Pécletzahlen.

Ein Ergebnis der Strömungssimulation ist in Abbildung 15 dargestellt. Es zeigt das Strömungsprofil des Ethanol-Peaks in der oberen Hälfte des Kanals. Deutlich ist hier das für eine laminare Strömung charakteristische Parabelprofil zu erkennen. An der Aufweitung sind, bedingt durch die sehr langsame Strömung, keinerlei Verwirbelungen zu erkennen, bereits nach einer kurzen Laufstrecke hat sich wieder das Parabelprofil eingestellt.

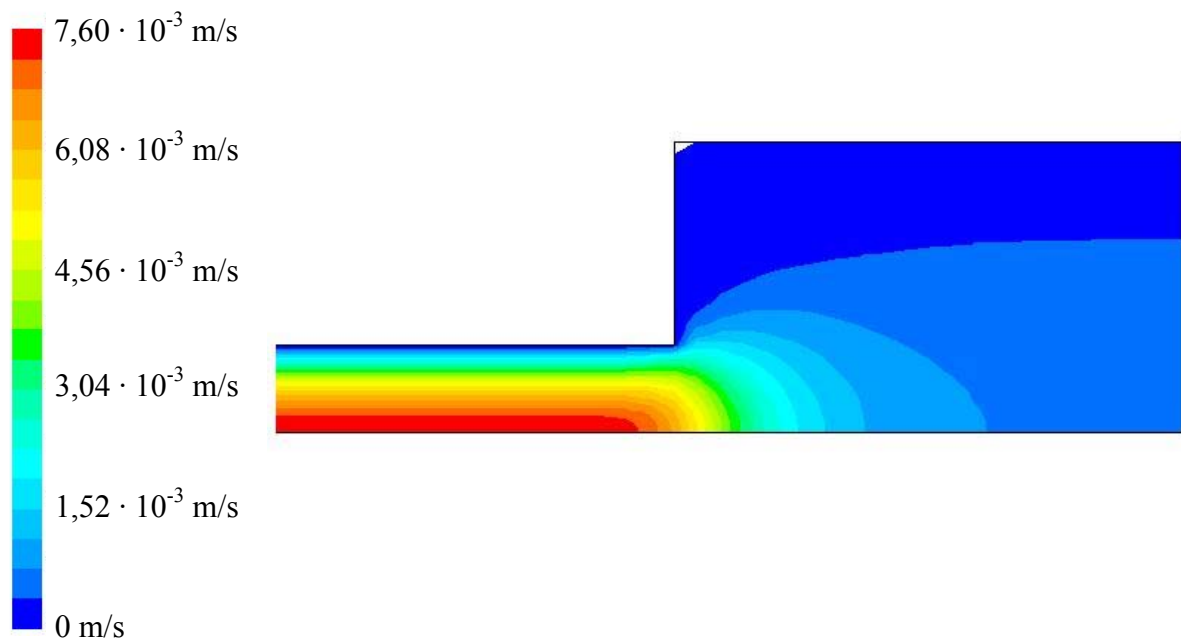


Abbildung 15: Stationäres Strömungsfeld als Konturdarstellung (obere Hälfte der Kapillar-NMR-Detektionszelle).

Führt man die Berechnung unter Vernachlässigung der diffusiven Terme der Transportgleichungen durch, wird der Peak erwartungsgemäß stark in axialer Richtung

verzogen. Das parabelförmige Strömungsprofil führt hier zu starken Verweilzeitunterschieden in radialer Richtung. Beim Eintritt in die Detektionszelle richtet sich der Peak auf, was auf die hier wesentlich langsamere Strömung, bedingt durch die Aufweitung des Querschnitts, zurückzuführen ist. Wird die Berechnung unter Berücksichtigung der diffusiven Terme durchgeführt und dabei ein konstanter Diffusionskoeffizient in axialer und radialer Richtung angenommen, ergibt sich ein anderes Simulationsergebnis (Abbildung 16).

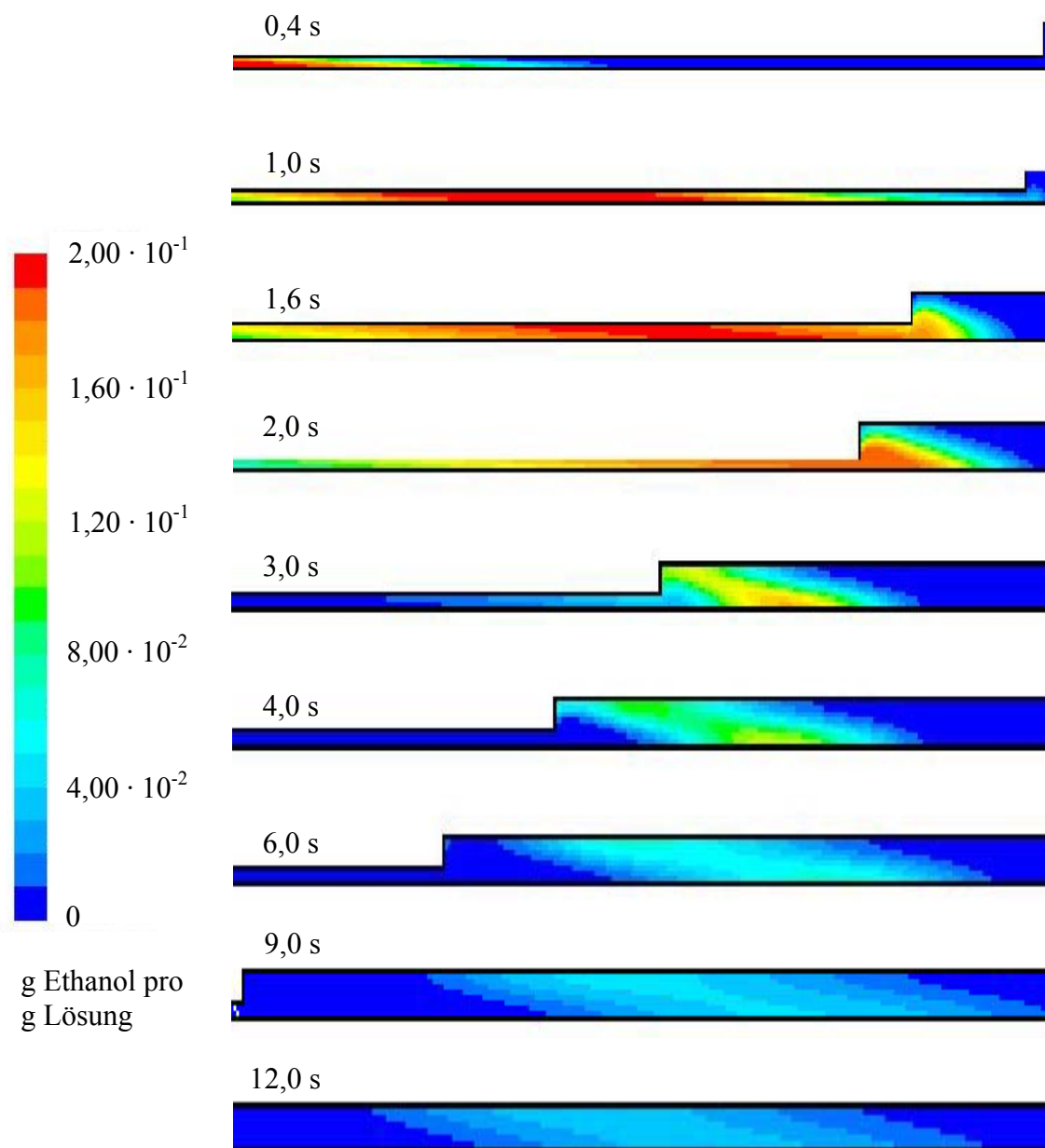


Abbildung 16: Zeitliche Veränderung der Ethanolkonzentration unter Berücksichtigung der Diffusion.

Die Ethanolmoleküle in der Kapillarmitte werden zwar auch hier schneller transportiert als die an den Wandungen, jedoch ist das Parabelprofil im Gegensatz zu vorher erheblich verwaschen. Dies ist auf die Diffusion der Ethanolmoleküle in radialer Richtung zurückzuführen. Ferner ist zu beobachten, dass der Peak auf Grund axialer Dispersion auseinander läuft. Hierzu muss jedoch angemerkt werden, dass das Auseinanderlaufen des Peaks in axialer Richtung quantitativ nicht aussagefähig ist. Auf Grund der verhältnismäßig groben Diskretisierung in x-Richtung breiten sich Rundungsfehler rasch aus. Beim Durchtritt durch die Querschnittsänderung verändert der Peak seine Form, das radiale Profil wird steiler und die Ausdehnung in axialer Richtung nimmt deutlich ab. Beides ist auf den nun erheblich größeren Querschnitt zurückzuführen. Der scharfe Übergang hat hier zur Folge, dass sich die Form des Peaks von einem leicht verzogenen Rechteck hin zu einer Pfeilform verändert. Dies erfolgt dadurch, dass die Ethanolmoleküle erst von der Mitte der Zelle an den Rand gelangen müssen. Weiterhin ist die Strömungsgeschwindigkeit in der Detektionszelle um den Faktor 10 niedriger als im Zulauf, weshalb auch die Reynolds- und Pécletzahl deutlich kleiner sind und somit der diffusive Transport gegenüber dem konvektiven eher zum Tragen kommt. Dennoch behält der Peak die Pfeilform weitgehend bei, wird allerdings im weiteren Verlauf in axialer Richtung leicht verzogen. Detektiert wird im NMR ein integraler Mittelwert über den Querschnitt. Daher wird anstelle eines relativ kurzen Impulses hoher Konzentration eine mit der Zeit zunächst zunehmende, dann gleichbleibende und schließlich wieder abfallende Konzentration registriert. Dadurch geht Empfindlichkeit verloren. Würde anstelle der abrupten Querschnittsänderung ein konusförmiger Übergang gewählt, ließe sich diese Erscheinung abmildern.

Es sollte jedoch bedacht werden, dass die in der Praxis verwendete Detektionszellen-Geometrie etwas mehr abgerundet ist und dass dadurch der Empfindlichkeitsverlust geringer als in der Simulation ist. Was mit der Simulation auch noch gezeigt werden konnte, ist die Tatsache, dass es zu keinen oder nur geringen Rückvermischungseffekten kommt und dass der Substanz-Peak nicht in den Ecken der Detektionszelle zurück bleibt (Memory-Effekte).

5.2.3 Bestimmung der Sensitivität des Kapillar-HPLC-NMR-Systems

Abschließend soll nun noch die Qualität der mit dem solenoiden Mikroprobenkopf erhaltenen NMR-Spektren dargestellt und die Nachweisgrenze ermittelt werden. Für die Ermittlung des Auflösungsvermögens des NMR-Spektrometers in Verbindung mit dem solenoiden Mikroprobenkopf wird die Signalbreite von Chloroform in Aceton- d_6 bestimmt. Beim sogenannten Hump-Test (5% Chloroform in Aceton- d_6) wird die Linienbreite des ^1H -Chloroformsignals in Höhe seiner ^{13}C -Sateliten abgelesen. Die Bestimmung der Sensitivität erfolgt mit einer wässrigen Sucroslösung am Signal des anomeren Protons. Die mit dem in dieser Arbeit verwendeten $^1\text{H}/^{13}\text{C}_{\text{inverse}}$ solenoiden Mikroprobenkopf (1,5 μl aktives Detektionsvolumen) erhaltenen Spektren für den Hump- und Sensitivitäts-Test sind in Abbildung 17 dargestellt.

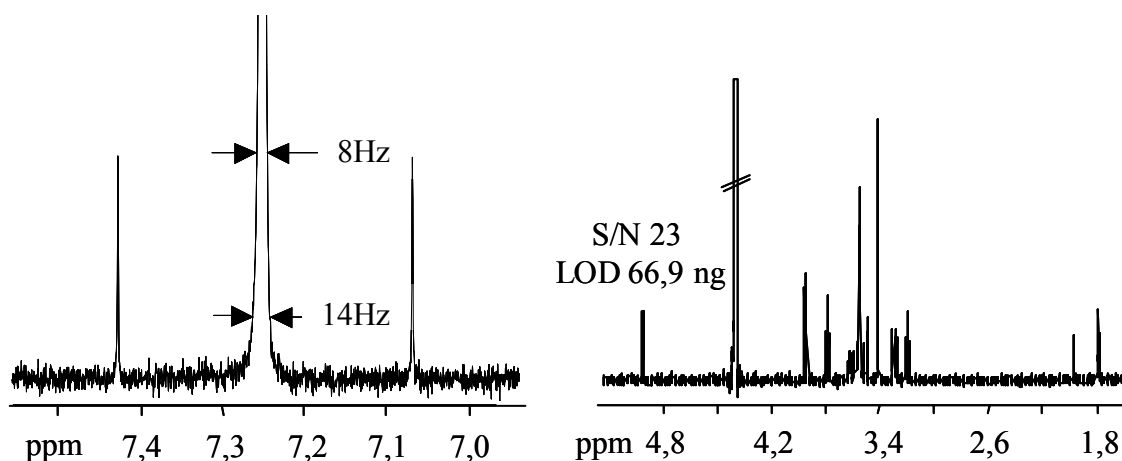


Abbildung 17: Hump-Test (links) und Sensitivitäts-Test mit 1 mM Sucrose (rechts).

Das ^1H -Chloroformsignal beim Hump-Test zeigt eine Linienbreite von 8 Hz auf Höhe seiner ^{13}C -Sateliten. Das heißt, dass selbst in dieser sehr geringen Signalhöhe noch $^3\text{J}_{\text{H,H}}$ -Kopplungen von Alkanen (um 7 Hz) detektiert werden können. Der Sensitivitäts-Test wurde mittels einer 1 mM Sucroslösung in D_2O und Acetonitril- d_3 (90 : 10, v/v) durchgeführt. Nach der Vermessung eines Transienten (1 Scan) hat das Resonanzsignal des anomeren Proton ein Signal-zu-Rausch Verhältnis (Signal to Noise, S/N) von 23, dies entspricht einer Nachweisgrenze von nur 66,9 ng (Limit of Detection, LOD, S/N = 3).

Diese ermittelten Werte zeigen sehr eindeutig, dass mit dem verwendeten Kapillar-HPLC-NMR-System Substanzen im niedrigen Nanogramm-Bereich NMR-

spektroskopisch detektiert werden können und dass eine eindeutige Auswertung der gewonnenen Spektren möglich ist.

5.3 Trennung und Identifizierung von Carotinoiden aus Spinat mittels Kapillar-HPLC-NMR-Kopplung

5.3.1 Etablierung der Kapillar-HPLC-Trennung

Die Trennung von unterschiedlichen Carotinoiden und Carotinoid-Stereoisomeren mit klassischen HPLC-Säulen (25 cm x 4,6 mm bzw. 12,5 cm x 2 mm) wurde in der Literatur bereits mehrfach gezeigt und stellt mit der maßgeschneiderten C₃₀-Phase heute kein Problem mehr dar. Der Augenmerk dieser Arbeit liegt jetzt auf der Etablierung einer Kapillar-HPLC-Trennung.

Als Einstieg diente eine Carotinoid-Standard bestehend aus (all-E) Lutein, (all-E) Zeaxanthin, (all-E) Canthaxanthin, (all-E) β -Carotin und (all-E) Lycopin. Die Konzentration der Carotinoide lag bei jeweils 0,1 mg/ml. Zur Trennung der Carotinoide wurde eine selbstgepackte C₃₀-Kapillarsäule (15 cm x 250 μ m I.D., 3 μ m, 200 Å) verwendet und als mobile Phase kam eine binäre Mischung aus Aceton und Wasser bei einer Flussrate von 5 μ l/min zum Einsatz. Die Trennung erfolgte in den ersten 15 min isokratisch mit einer Lösungsmittelzusammensetzung von 80 : 20 (v/v). Anschließend folgte ein 5minütiger linearer Gradient zu 99 : 1 (v/v) und diese Zusammensetzung wurde noch weitere 25 min beibehalten. Die UV-Detektion wurde jeweils bei 450 nm durchgeführt und das Injektionsvolumen betrug 100 nl. Das erhaltene Chromatogramm ist in Abbildung 18 zu sehen.

Die Carotinoide eluieren in Reihenfolge ihrer abnehmenden Polarität zwischen 8,70 min für (all-E) Lutein mit je einer OH-Gruppe pro Iononring und 36,70 min für (all-E) Lycopin, welches keine polaren Gruppen besitzt. Das Chromatogramm für die Kapillar-HPLC-Trennung zeigt symmetrische und schmale Peaks, was für eine gute Säulenpackung sowie für vernachlässigbare Totvolumen im Analysensystem spricht.

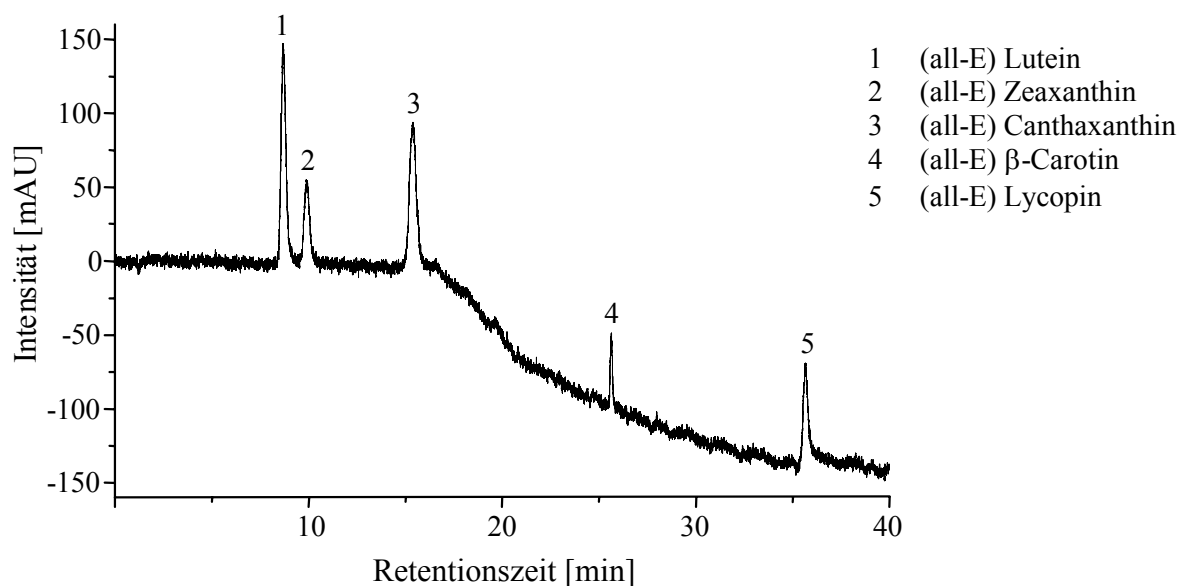


Abbildung 18: Kapillar-HPLC-Trennung eines Carotinoid-Standards.

Im Vergleich zu Literaturdaten^[180] ermöglicht die Kapillartrenntechnik eine drastische Reduzierung der verwendeten Probenmengen. So wurden bei der klassischen HPLC-Trennung 10 μ l einer Standardmischung (1 mg/ml) und bei der Kapillar-HPLC-Trennung 100 nl der Standardmischung (0,1 mg/ml) injiziert. Dadurch verringerten sich die Absolutmengen je injiziertem Carotinoid von 10 μ g auf 10 ng. Auch der Verbrauch an mobiler Phase wurde deutlich gesenkt, von 1 ml/min (60 ml pro h) auf 5 μ l/min (0,3 ml pro h).

5.3.2 Kapillar-HPLC-NMR-Messungen des Carotinoid-Standards

Nachdem die Carotinoid-Trennung erfolgreich in den Kapillarmaßstab übertragen wurde, sollte diese chromatographische Trennung mit der Kapillar-NMR-Spektroskopie on-line gekoppelt werden. Dazu sind einige methodische Anpassungen nötig, die nachfolgend besprochen werden.

Auf der chromatographischen Seite erfolgte eine Lösungsmittelumstellung auf die volldeuterten Analoga Aceton- d_6 und Deuteriumoxid sowie eine Erhöhung des Injektionsvolumens. Bei der Umstellung auf die volldeuterten Lösungsmittel muss darauf geachtet werden, dass das komplette System ausreichend lange mit diesen gespült wird, um keine Proton-Restsignale im Spektrum zu bekommen. Diese Restlösungsmittelsignale können zu Dynamikproblemen im A-D-Wandler des NMR-Spektrometers führen, was die Detektion der Analytsignale stört. Die Erhöhung des Injektionsvolumens von 100 nl (10 ng je Carotinoid) auf 500 nl (50 ng je Carotinoid)

ist notwendig, um eine genügend große Analytmenge in der Kapillar-Detektionszelle zu gewährleisten. Die daraus resultierende Volumen- und Konzentrationsüberladung der Trennphase wirkt sich natürlich auf die Peakformen aus. Es kommt zu einer deutlichen Verbreiterung der Analytsignale und dadurch zu einer Verringerung der Intensität. Dennoch werden die Carotinoide gut voneinander getrennt und können nun mit dem Mikrodurchflussprobenkopf vermessen werden. Trotz der deutlich erhöhten Analytmenge ist es nicht möglich die Carotinoide im continuous-flow Modus zu vermessen. Aus diesem Grund kam der stopped-flow Modus zum Einsatz, der eine Vermessung von Analytmengen im unteren Nanogramm-Bereich ermöglicht. Bei dieser Aufnahmetechnik wird die chromatographische Trennung gestoppt, wenn das Maximum des zu vermessenden Peaks die NMR-Detektionszelle erreicht. Dazu muss vorher die Transferzeit vom UV-Detektor zur NMR-Detektionszelle ermittelt werden. Diese kann mit Hilfe von Benzol ganz einfach bestimmt werden. Dafür wird die Zeit zwischen dem Auftreten des Maximums des Benzolsignals im UV-Detektor und dem Erscheinen des Benzolsignals in der NMR-Detektionszelle gemessen.

In Abbildung 19 sind die stopped-flow ^1H -NMR-Spektren (olefinischer Bereich, 5 - 7 ppm) der fünf Carotinoide (Abbildung 20) in ihrer Elutionsreihenfolge im Chromatogramm gezeigt. In den fünf Spektren ist eine eindeutige Zuordnung aller olefinischen Protonen möglich. Die Spektren wurden jeweils in der aktuellen Lösungsmittelzusammensetzung aus der chromatographischen Trennung vermessen. Sie betrug für (all-E) Lutein, (all-E) Zeaxanthin Aceton- d_6 : D_2O = 80 : 20 (v/v), für (all-E) Canthaxanthin Aceton- d_6 : D_2O = 82 : 18 (v/v) und für (all-E) β -Carotin, (all-E) Lycopin Aceton- d_6 : D_2O = 99 : 1 (v/v). In den Spektren von (all-E) Canthaxanthin und (all-E) β -Carotin kann jeweils ein zusätzliches Lösungsmittelsignal von Dichlormethan- d_2 beobachtet werden, was zugegeben wurde, um die Löslichkeit der Carotinoide zu verbessern. Nachfolgend wird jeweils der olefinische Bereich der einzelnen Spektren ausführlich besprochen.

Das Spektrum **A** des unsymmetrischen (all-E) Lutein zeigt bei $\sim 6,60$ ppm ein Multiplett für die Protonen 11/11' (6,62 ppm) und 15/15' (6,59 ppm) mit einem Integral von vier. Die Multiplett-Struktur kommt durch die Überlagerung der beiden einzelnen Signale zustande. Die Protonen 11/11' koppeln dabei mit den Protonen 10/10' und 12/12' und die Protonen 15/15' mit 14/14'. Die zwei folgenden Dubletts

werden von den Protonen 12/12' (6,30 ppm) und 14/14' (6,22 ppm) hervorgerufen und besitzen jeweils ein Integral von zwei.

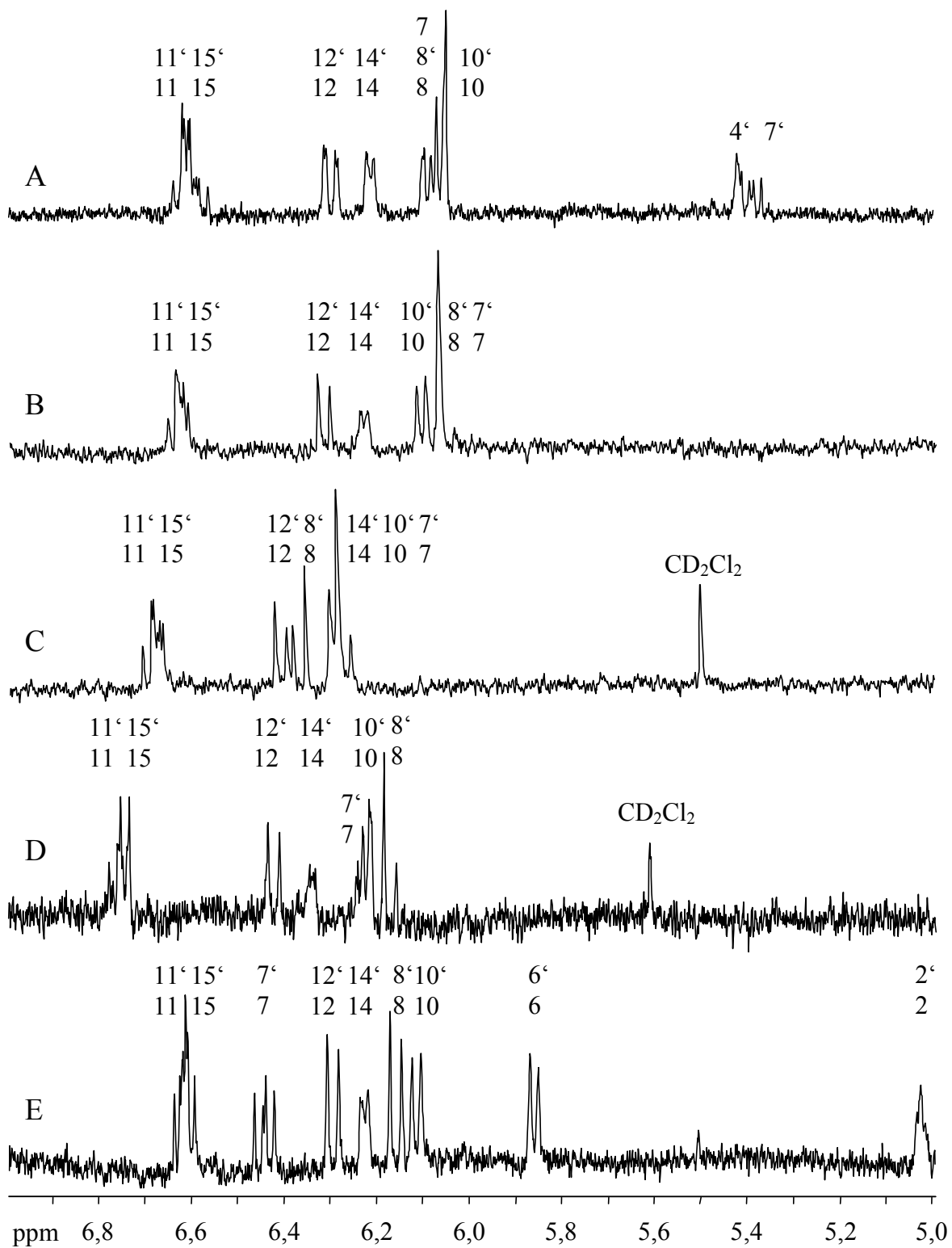


Abbildung 19: Stacked-Plot (olefinischer Bereich) der stopped-flow ¹H-NMR-Spektren von **A** (*all-E*)Lutein, **B** (*all-E*) Zeaxanthin, **C** (*all-E*) Canthaxanthin, **D** (*all-E*) β-Carotin und **E** (*all-E*) Lycopin.

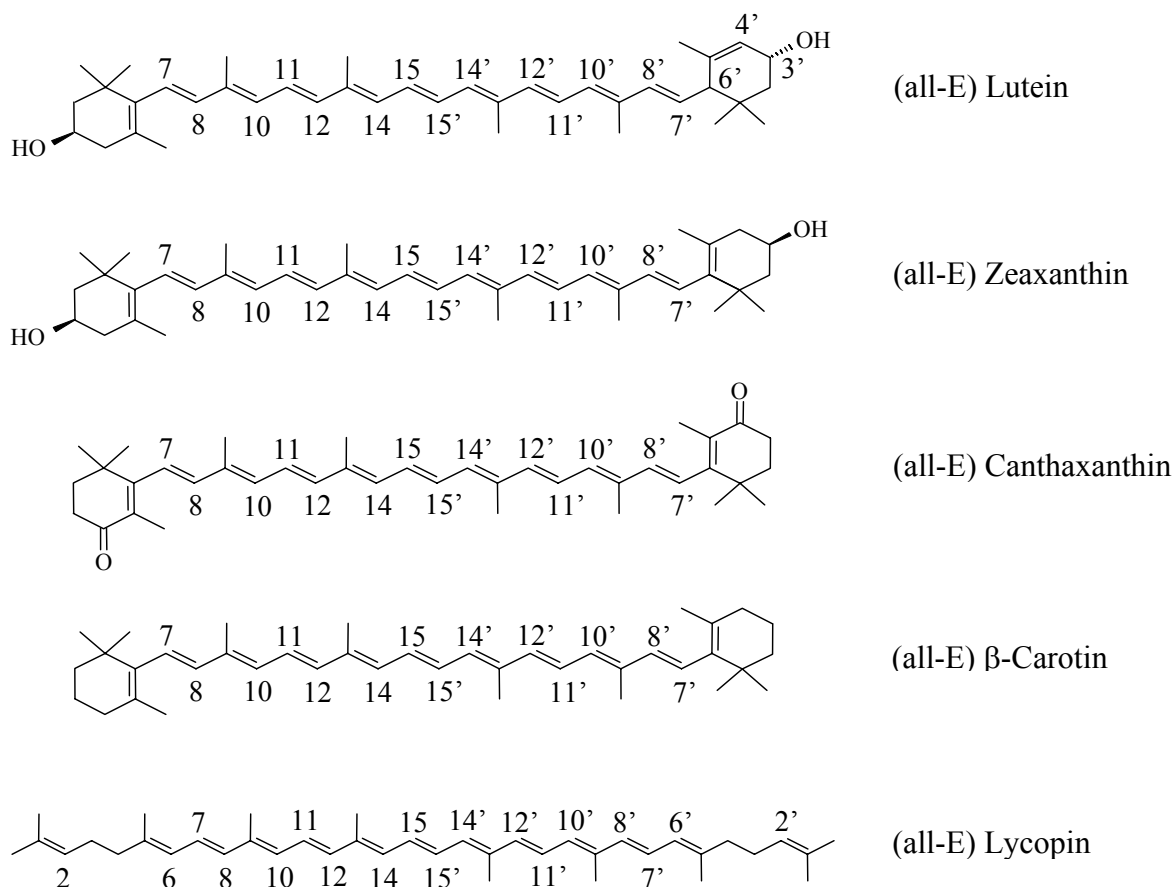


Abbildung 20: Strukturen der untersuchten Carotinoide.

Die Dublett-Struktur kommt bei den Protonen 12/12' durch die Kopplung mit den Protonen 11/11' und bei den Protonen 14/14' mit 15/15' zustande. Das nächste Multipllett im Spektrum mit einem Integral von fünf zeigt die Protonen 8/8' (6,09/6,07 ppm), 10/10' (6,07/6,09 ppm) und 7 (6,06 ppm). Die Protonen 8/8' koppeln mit den Protonen 7/7', die Protonen 10/10' mit 11/11' und das Proton 7 mit Proton 8. Durch die Verschiebung der Doppelbindung in einen der Iononringe kommt es zu einer Unterbrechung der konjugierten Doppelbindungskette und daraus resultierend zu einer Hochfeldverschiebung des Proton 7' (5,39 ppm). Der Unterschied in der chemischen Verschiebung beträgt zwischen den Protonen 7 und 7' etwa 0,67 ppm. Durch die veränderte Lage der Doppelbindung im Iononring kann ein weiteres olefinisches Proton in der Position 4' mit einer chemischen Verschiebung von 5,42 ppm beobachtet werden. Das Signal von Proton 7' ist ein Dublett eines Dubletts, was durch die Kopplung mit den beiden chemisch und magnetisch nicht äquivalenten Protonen 6' und 8' hervorgerufen wird. Das Signal von Proton 4' ist ein Singulett, da es nur mit dem Proton in Position 3' koppeln kann.

Das Spektrum **B** von (all-E) Zeaxanthin ist sehr ähnlich wie das Spektrum **A** von (all-E) Lutein aufgebaut. Es unterscheidet sich nur in den beiden Protonen 7' und 4'. Durch die symmetrische Struktur des Moleküls treten nur Protonenpaare mit absolut identischen chemischen Verschiebungen auf. Wie beim (all-E) Lutein überlagern sich die Protonen 11/11' (6,65 ppm) und 15/15' (6,62 ppm) zu einem Multiplett mit einem Integral von vier. Auch die beiden Dubletts von den Protonen 12/12' (6,32 ppm) und 14/14' (6,23 ppm) mit jeweils einem Integral von zwei zeigen nur eine geringe Verschiebung im Vergleich zum Spektrum von (all-E) Lutein. Wie bereits diskutiert, ist das (all-E) Zeaxanthin-Molekül zentrosymmetrisch, was dazu führt, dass das Proton 7' zusammen mit dem Proton 7 (beide 6,07 ppm) sowie den Protonen 10/10' (6,11 ppm) und 8/8' (6,08 ppm) als Multiplett mit einem Integral von sechs im Spektrum erscheint. Durch die veränderte Lage der Doppelbindung in einem der Iononringe erscheint im olefinischem Bereich des Spektrums diesmal kein Signal für die Position 4', anstelle tritt ein Multiplett für die jetzt vorhandene -CH₂-Gruppe im aliphatischem Bereich auf (nicht gezeigt).

Das nächste Spektrum zeigt den olefinischen Bereich von (all-E) Canthaxanthin (Spektrum **C**). Durch die zwei Sauerstoffatome in den Iononringen kommt es im Vergleich zu den beiden vorher besprochenen Spektren zu einer geänderten Signalreihenfolge und die Signale erscheinen in einem kleineren Bereich. Die größte Tieffeldverschiebung aller Signale im Spektrum zeigt das Multiplett bestehend aus den Protonen 11/11' (6,68 ppm) und 15/15' (6,65 ppm). Das Integral ist entsprechend der Anzahl der Protonen vier. Die nächsten Signale erfahren eine teilweise sehr deutliche Tieffeldverschiebung durch die Anwesenheit der Sauerstoffatome in den Iononringen. Für die Protonen 12/12' (6,40 ppm) ist dieser Effekt noch nicht so deutlich im Gegensatz zu den Protonen 8/8' (6,36 ppm) die als nächstes im Spektrum erscheinen. Beide Dubletts haben ein Integral von zwei. Das Multiplett setzt sich dementsprechend diesmal aus den Protonen 14/14' (6,29 ppm), 10/10' (6,27 ppm) und 7/7' (6,25 ppm) zusammen mit einem Integral von sechs.

Die beiden letzten Spektren **D** und **E** von (all-E) β -Carotin und (all-E) Lycopin zeigen die schlechtesten Signal-zu-Rausch Verhältnisse der gemessenen Spektren, was auf eine geringere Löslichkeit der beiden unpolarsten Carotinoide zurückzuführen ist. Trotzdem ist die Auflösung und die Signalintensität ausreichend, um eine eindeutige

Peakzuordnung durchzuführen. Im Spektrum **D** von (all-E) β -Carotin erscheint wiederum das Multiplett für die Protonen 11/11' (6,76 ppm) und 15/15' (6,74 ppm) mit der stärksten Tieffeldverschiebung aller Signale und einem Integrationswert von vier. Die nächsten zwei Dubletts sind von den Protonen 12/12' (6,43 ppm) und 14/14' (6,34 ppm) mit Integrationswerten von jeweils zwei. Diese Reihenfolge der ersten 4 Signale ist wieder identisch mit der von (all-E) Lutein und (all-E) Zeaxanthin. Das folgende Multiplett mit einem Integral von vier repräsentiert die Protonen 7/7' (6,24 ppm) und 10/10' (6,23 ppm). Und als letztes Signal im olefinischem Bereich kann das Dublett mit einem Integral von zwei den Protonen 8/8' (6,18 ppm) zugeordnet werden.

Die Molekülstruktur von (all-E) Lycopin unterscheidet sich von den bereits besprochenen vier Carotinoiden. Lycopin besitzt keine endständigen Iononringe dafür aber zwei zusätzliche Doppelbindungen an jedem Ende der Kette. Deshalb erscheinen zwei neue olefinische Signale im Spektrum **E** und die Reihenfolge der Signale ändert sich. Auch im Spektrum von (all-E) Lycopin besitzt das Multiplett der Protonen 11/11' (6,63 ppm) und 15/15' (6,60 ppm) die stärkste Tieffeldverschiebung und einen Integrationswert von vier. Das folgende Signal ist ein Dublett eines Dubletts mit einem Integral von zwei und wird durch die Protonen 7/7' (6,44 ppm) hervorgerufen. Die beiden Protonen koppeln mit den Protonen 6/6' und 8/8'. Weil diese durch ihre unterschiedliche Lage im Molekül chemisch und magnetisch nicht äquivalent sind, erscheint anstelle eines Triplettts ein Dublett eines Dubletts. Die nächsten vier Signale sind je Dubletts mit Integrationswerten von jeweils zwei und können den Protonen 12/12' (6,29 ppm), 14/14' (6,22 ppm) 8/8' (6,15 ppm) sowie 10/10' (6,10 ppm) zugeordnet werden. Die zwei zusätzlichen Signale im olefinischem Bereich zeigen eine Hochfeldverschiebung durch ihre Position im Molekül. Die Protonen 6/6' (5,85 ppm) befinden sich jeweils am äußeren Ende der konjugierten Doppelbindungskette und werden deshalb weniger stark entschirmt als im konjugiertem System. Sie koppeln mit den Protonen 7/7', was zu einer Dublettaufspaltung führt. Das Signal hat ein Integrationswert von zwei. Die Lage der Doppelbindung mit den beiden Protonen 2/2' ist komplett isoliert vom konjugiertem System, wodurch das Signal für die Protonen 2/2' (5,00 ppm) noch stärker hochfeldverschoben wird. Das Kopplungsmuster sollte durch die Kopplung mit der benachbarten Methylen-Gruppe eine Triplett-Struktur zeigen. Die Auflösung reicht bei diesem Signal jedoch nicht aus, um dieses

Kopplungsmuster zu erkennen. Der Integrationswert kann mit zwei trotzdem richtig bestimmt werden.

	(all-E) Lutein	(all-E) Zeaxanthin	(all-E) Canthaxanthin	(all-E) β -Carotin	(all-E) Lycopin
H 2	-	-	-	-	5,00
H 2'	-	-	-	-	5,00
H 4	-	-	-	-	-
H 4'	5,42	-	-	-	-
H 6	-	-	-	-	5,85
H 6'	-	-	-	-	5,85
H 7	6,06	6,07	6,25	6,24	6,44
H 7'	5,39	6,07	6,25	6,24	6,44
H 8	6,09	6,08	6,36	6,18	6,15
H 8'	6,07	6,08	6,36	6,18	6,15
H 10	6,07	6,11	6,27	6,23	6,11
H 10'	6,09	6,11	6,27	6,23	6,11
H 11	6,62	6,65	6,68	6,76	6,63
H 11'	6,62	6,65	6,68	6,76	6,63
H 12	6,30	6,32	6,40	6,43	6,29
H 12'	6,30	6,32	6,40	6,43	6,29
H 14	6,22	6,23	6,29	6,34	6,22
H 14'	6,22	6,23	6,29	6,34	6,22
H 15	6,59	6,62	6,65	6,74	6,60
H 15'	6,59	6,62	6,65	6,74	6,60

Tabelle 8: $^1\text{H-NMR}$ Verschiebungswerte δ (in ppm) der olefinischen Protonen der untersuchten Carotinoide.

Durch die all-E Strukturen der untersuchten Carotinoide liegen die Kopplungskonstanten für alle olefinische Signale zwischen 11 und 12 Hz, was typisch für *trans*-ständige olefinische Protonen ist. Unterschiede zu den hier angegebenen chemischen Verschiebungen der olefinischen Signale mit der Literatur^{[11],[99],[140],[181]}

sind auf die unterschiedlichen Lösungsmittelzusammensetzungen bei der LC-NMR im Vergleich zur konventionellen Röhrenmessung zurückzuführen. Die chemischen Verschiebungen aller olefinischen Protonen sind in Tabelle 8 noch einmal zusammengefasst.

5.3.3 Kapillar-HPLC-NMR-Messungen eines Spinat MSPD-Extraktes

Nach den erfolgreichen Kapillar-NMR-Messungen eines Carotinoid-Standards sollten die Carotinoide (all-E) Lutein und (all-E) β -Carotin aus einer Spinatprobe detektiert werden. Für die Extraktion der licht- und sauerstoffempfindlichen Carotinoide kam die speziell für feste und hochviskose Proben entwickelte MSPD zum Einsatz.

Nach der Ernte wurden die Spinatblätter mit flüssigen Stickstoff tiefgefroren und zerkleinert. Davon wurden 0,5 g mit 1,5 g C₁₈ (EC) Sorbensmaterial in einem Achatmörser sorgfältig zu einem homogenen, trockenen und rieselfähigen Pulver verrieben. Dieses Homogenisat wurde anschließend in eine leere SPE-Säule mit einer Polyethylenfritte auf dem Boden überführt, mit einer weiteren Polyethylenfritte bedeckt und zu einem kompakten Säulenbett zusammengepresst. Die Kartusche wurde mit 10 ml Wasser gewaschen, um polare Verunreinigungen zu entfernen. Nach dem Waschschrift wurden die Carotinoide mit 4 ml Aceton eluiert. Nach dem Trocknen im Stickstoffstrom wurde der Rückstand mit 100 μ l Aceton-d₆ wieder aufgenommen und 500 nl direkt in das Kapillar-HPLC-System injiziert. Das erhaltene UV-Chromatogramm bei 450 nm ist in Abbildung 21 gezeigt.

Das Chromatogramm zeigt 4 Hauptkomponenten des Spinatextraktes. Die Zuordnung der einzelnen Peaks erfolgte durch einen Vergleich mit einer Trennung desselben Extraktes auf einer klassischen HPLC-Säule (Abbildung 22). Es ergibt sich folgende Zuordnung, die zwei Carotinoide eluieren bei 9,18 min für (all-E) Lutein und bei 24,56 min für (all-E) β -Carotin sowie bei 19,29 min für das Chlorophyll a und bei 20,06 min für das Chlorophyll b. Weiterhin sind noch zwei Stereoisomere von β -Carotin, das (9,13-ZZ) β -Carotin bei 23,60 min und das (9-Z) β -Carotin bei 24,84 min, sichtbar.

Der Vergleich der beiden Chromatogramme zeigt, dass die Kapillar-HPLC-Trennung bei gleicher Trenneffizienz geringere Retentionszeiten liefert. So konnte die Retentionszeit für (all-E) β -Carotin von 32,30 min bei der klassischen Trennung auf 24,56 min bei der Kapillartrennung verkürzt werden, was einer Reduzierung von 25% entspricht. Zusätzlich ist eine schmalere Peakform erkennbar, was für die NMR-Kopplung sehr wichtig ist, da die Analytmenge in diesem Fall in einem kleineren Volumen eluiert und somit die Konzentration im Peakmaximum erhöht ist.

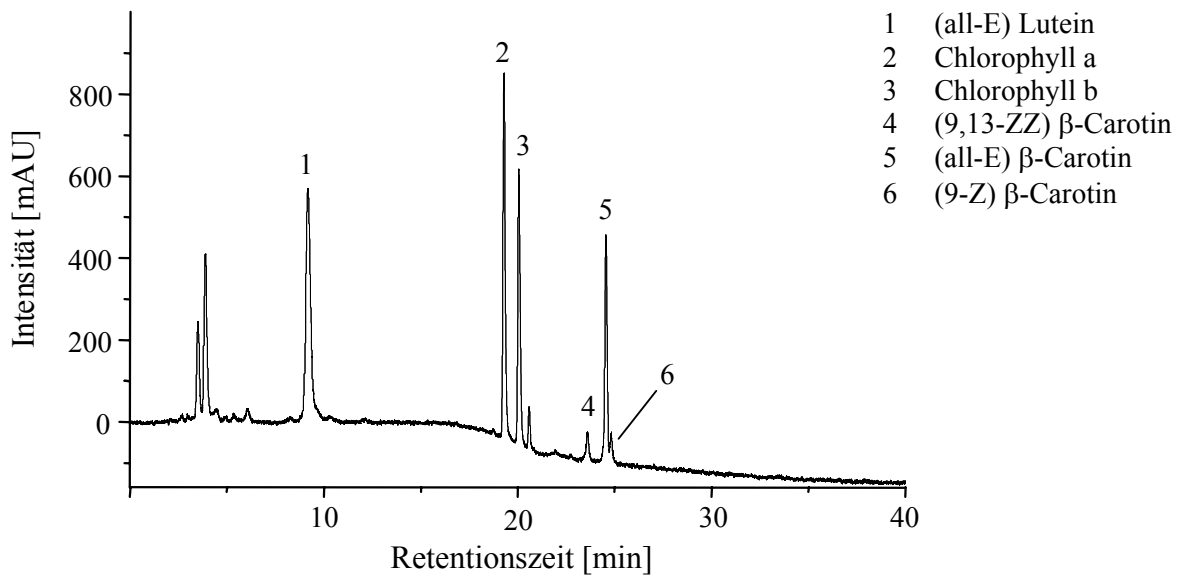


Abbildung 21: Kapillar-HPLC-UV-Chromatogramm des MSPD Extraktes von Spinat.

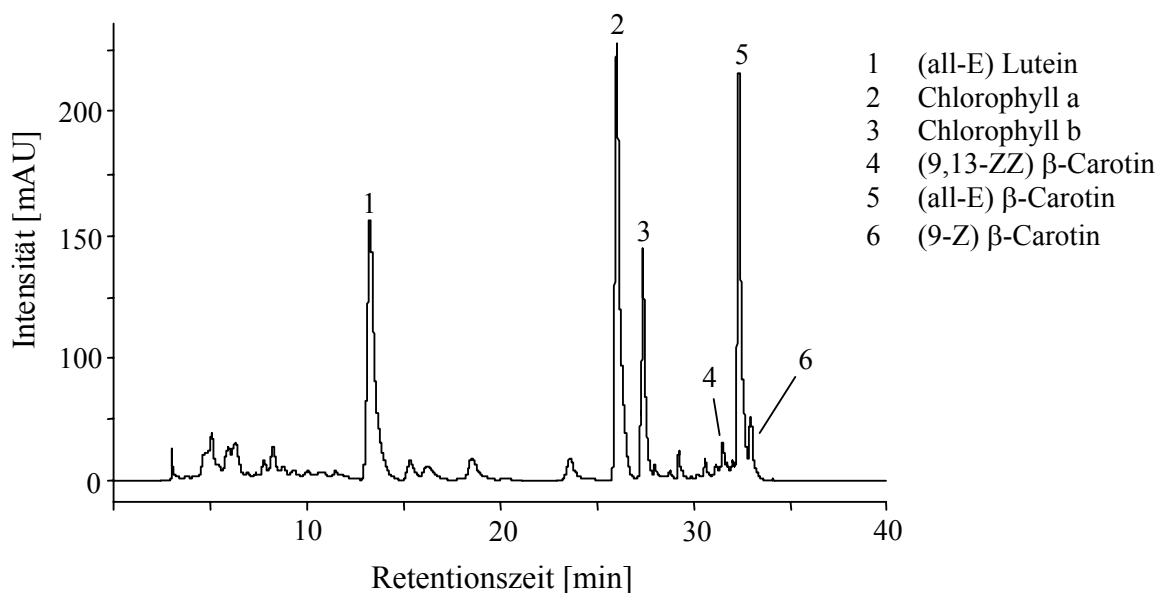


Abbildung 22: HPLC-UV-Chromatogramm eines MSPD Extraktes von Spinat, getrennt auf einer klassischen HPLC-Säule (25 cm x 4,6 mm).

Ausgehend von dieser Trennung wurden die Kapillar-HPLC-NMR-Messungen für (all-E) Lutein und (all-E) β -Carotin durchgeführt. Wie bei den Standards erfolgte die

NMR-Kopplung mit Aceton- d_6 und Deuteriumoxid und einer Loopgröße von 500 nl. Die erhaltenen $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (olefinischer Bereich) aus dem Extrakt sind in Abbildung 23 im Vergleich mit den beiden $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (olefinischer Bereich) der Standards dargestellt.

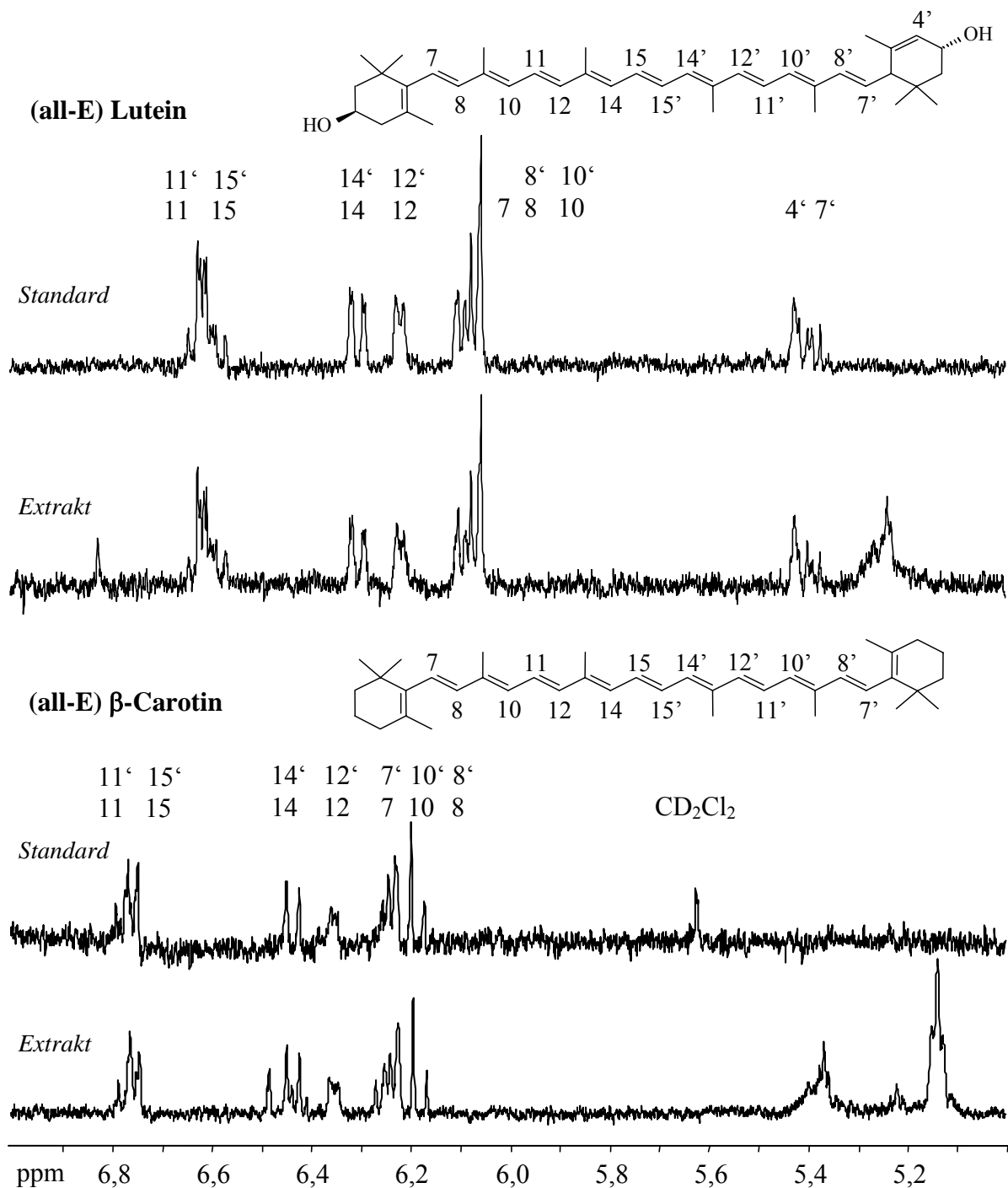


Abbildung 23: Stopped-flow $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (olefinischer Bereich) von (all-E) Lutein und (all-E) β -Carotin aus einem MSPD Extrakt von Spinat im Vergleich zu deren $^1\text{H-NMR}$ -Spektren eines Standards.

Die Spektren aus dem MSPD Extrakt zeigen ebenfalls die gute Auflösung der Standard Spektren. Alle olefinischen Protonen können eindeutig zugeordnet werden. Natürlich können auch alle Integrationswerte und Kopplungskonstanten ermittelt werden.

Auf Grund der komplexen Matrix bei der Spinatprobe, die nicht zu 100% durch die HPLC eliminiert werden konnte, sind wenige zusätzliche Signale im olefinischen Bereich sichtbar. Bei Lutein ist das ein kleines scharfes Signal bei 6,83 ppm sowie ein breiteres Signal bei 5,30 ppm und bei β -Carotin zwei breitere Signale bei 5,15 ppm und 5,40 ppm sowie ein kleines scharfes Signal neben den Protonen 14/14'. Es kommt jedoch zu keiner Überlagerung mit Analytsignalen, was eine Auswertung deutlich erschweren würde.

Eine durchgeführte Abschätzung der absoluten Substanzmenge der Carotinoide aus dem MSPD Extrakt im aktiven Detektionsvolumen ergibt für (all-E) Lutein einen Wert von ca. 70 ng und für (all-E) β -Carotin einen Wert von ca. 50 ng. Diese Daten basieren auf Mengenangaben für ca. 5 bis 6 Wochen alten Spinat^[180]. Im Vergleich dazu wurden für die Standards jeweils nur ca. 20 ng vermessen. Diese Zahlen zeigen sehr deutlich, dass eine Strukturaufklärung mit Substanzmengen im niedrigen Nanogramm-Bereich möglich ist.

5.4 Untersuchungen zur Struktur und Bioverfügbarkeit von Carotinoiden aus intrinsisch markiertem Gemüse

Klinische und epidemiologische Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass die erhöhte Einnahme des Carotinoids Lutein positive Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit haben kann. Lutein ist auf Grund seiner antioxidativen Fähigkeit in der Lage, Zellen und Organismen gegen photooxidative Schäden zu schützen. Bisher war es nicht möglich eine genaue Anreicherung und die absolute Bioverfügbarkeit von Carotinoiden zu bestimmen, weder aus natürlichen Quellen noch aus Supplementen. Eine Studie mit synthetisch markiertem β -Carotin war ein erster Versuch, diese beiden Werte zu bestimmen. Die erhaltenen Ergebnisse sind jedoch nur wenig aussagekräftig und nicht auf die Nahrungsaufnahme von Carotinoiden aus pflanzlichen Quellen

übertragbar, da die Resorption und die Anreicherung der synthetisierten Carotinoide deutlich vermindert ist^[131].

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

Zu diesem Zweck wurden verschiedene Gemüsesorten (Spinat: Melody, Kohl: Grandsimpson und Bluemax, Karotten: Lucky BF Hybrid) in einer speziellen Gewächskammer hydroponisch angebaut.

5.4.1 Aufzucht der intrinsisch markierten Gemüsesorten

Der kontrollierte Anbau von intrinsisch markierten Gemüsepflanzen erfordert speziell entwickelte Gewächskammern sowie eine über die gesamte Wachstumsdauer (ca. fünf Wochen) stabile Konzentration an Deuteriumoxid in der Nährlösung. Die Deuteriummarkierung der Gemüsesorten wurde am USDA HNRC on Childrens in Houston, Texas (USA) von Prof. M. A. Grusak entwickelt^{[182],[183]}. Die drei Gemüsesorten wurden hydroponisch in partiell deuteriertem Wasser angepflanzt. Der Gehalt an Deuteriumoxid wurde variiert und reichte von 15 Atom-% bis 30 Atom-% an Deuteriumoxid. Die Pflanzen entwickelten sich im Vergleich zu im Boden gezüchteten Pflanzen normal, die Blätter wie auch die Wurzeln zeigen keine Unterentwicklung bis zu einem Deuteriumoxidanteil von 30 Atom-%. Für die Studie zur Strukturermittlung der deuterierten Carotinoide wurde Spinat mit 15 Atom-% und Karotten mit 30 Atom-% an Deuteriumoxid verwendet. Bei der Supplementierungsstudie am USDA HNRC on Aging wurde Spinat und Kohl mit jeweils 25 Atom-% an Deuteriumoxid verwendet. Die Pflanzen wurden alle nach fünf Wochen geerntet.

5.4.2 Strukturermittlung der partiell deuterierten Carotinoide aus intrinsisch markiertem Gemüse

Für die Strukturermittlung von partiell deuterierten Carotinoiden wurden (all-E) Lutein und (all-E) β -Carotin aus Spinat sowie (all-E) α -Carotin und (all-E) β -Carotin

aus Karotten als Beispiele ausgewählt. Der Spinat der Sorte Melody wurde in 15 Atom-% und die Karotten der Sorte Lucky BF Hybrid in 30 Atom-% Deuteriumoxid aufgezogen. Die exakte Struktur wurde nach der Extraktion der Carotinoide mit Hilfe der Massenspektrometrie (HPLC-APCI/MS) und der $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie ermittelt.

5.4.2.1 Probenvorbereitung und Aufreinigung der partiell deuterierten Carotinoide

Der erste Schritt der Analyse war die Extraktion der zu untersuchenden Carotinoide aus der Pflanzenmatrix. Sie erfolgte, wie auch schon im Abschnitt 5.3.3 beschrieben, mit der MSPD. An diesem Punkt soll noch einmal gezeigt werden, warum die MSPD-Extraktion von Analyten aus festen Proben für die NMR Detektion so wichtig ist. Als Beispiel dient ein Vergleich der flüssig-flüssig Extraktion (LLE) mit der MSPD Extraktion von (all-E) α -Carotin und (all-E) β -Carotin aus Karotten.

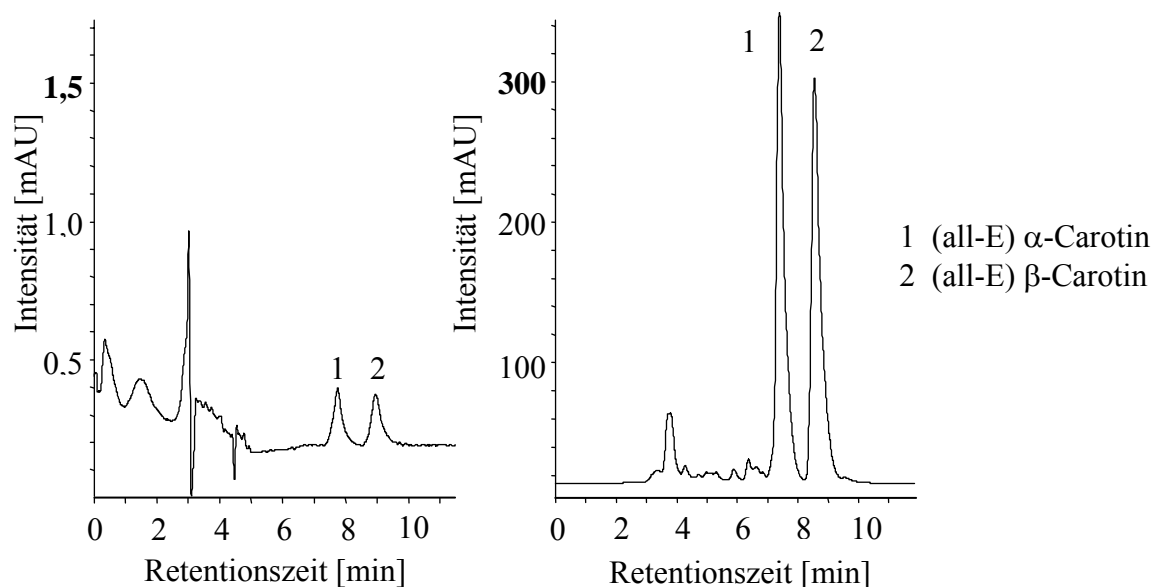


Abbildung 24: Vergleich der Effizienz der flüssig-flüssig Extraktion mit der MSPD Extraktion bei festen Proben am Beispiel von (all-E) α -Carotin und (all-E) β -Carotin aus Karotten.

Vor beiden Extraktionen wurden die Karotten fein zerkleinert und mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Für die LLE wurden 0,5 g der zerkleinerten Karotten mit 10 ml Aceton bei Raumtemperatur 1 h gerührt. Der Extrakt wurde im Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit 200 μl Aceton wieder aufgenommen. Die

MSPD Extraktion wurde ebenfalls mit 0,5 g der zerkleinerten Karotten durchgeführt. Die Elution der Carotinoide erfolgte mit 4 ml Aceton. Auch dieser Extrakt wurde am Stickstoffstrom abgedampft und der Rückstand in 200 μ l Aceton aufgenommen. Von beiden Proben wurden jeweils 50 μ l in das HPLC-System injiziert. Die erhaltenen UV-Chromatogramme sind in Abbildung 24 zu sehen.

Auf den ersten Blick ist zu erkennen, dass die MSPD Extraktion deutlich effektiver als die flüssig-flüssig Extraktion ist. Für die Massenspektrometrische Detektion ist die Effizienz der LLE ausreichend, für eine erfolgreiche NMR Detektion muss jedoch die MSPD verwendet werden.

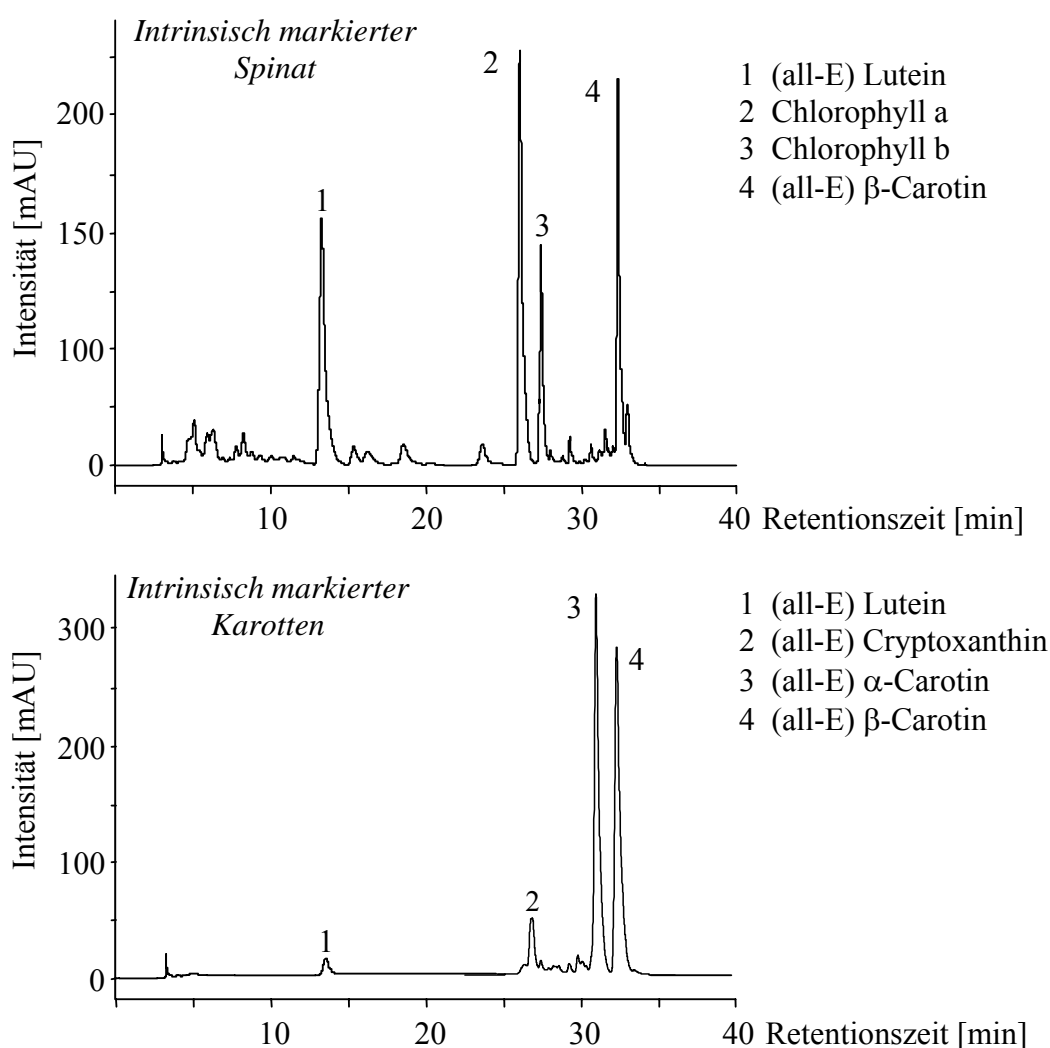


Abbildung 25: HPLC-UV-Chromatogramme der MSPD Extrakte von intrinsisch markiertem Spinat und Karotten.

Nach der erfolgreichen Extraktion der Carotinoide aus der Pflanzenmatrix mussten diese noch von den anderen enthaltenen Verbindungen sauber abgetrennt werden. Dazu wurden beide Rückstände chromatographisch auf einer klassischen C_{30} -HPLC-

Trennsäule (25 cm x 4,6 mm) mit einer binären Mischung aus Aceton und Wasser getrennt (Abbildung 25). Bei beiden Chromatogrammen zeigen sich keine Unterschiede in der Zusammensetzung der Extrakte im Vergleich zu unter normalen Bedingungen aufgezogenen Pflanzen. Das bedeutet, dass das Wachstum in partiell deuteriertem Wasser keine sichtbaren Auswirkungen auf die Pflanzen hat.

Mittels Fraktionssammeln aus der HPLC von (all-E) Lutein und (all-E) β -Carotin aus Spinat sowie (all-E) α -Carotin und (all-E) β -Carotin aus den Karotten wurden die aufgereinigten Carotinoide für die NMR Untersuchungen gewonnen. Die gesammelten Fraktionen wurden im Stickstoffstrom eingedampft und die Rückstände in jeweils 50 μ l Chloroform- d_1 aufgenommen.

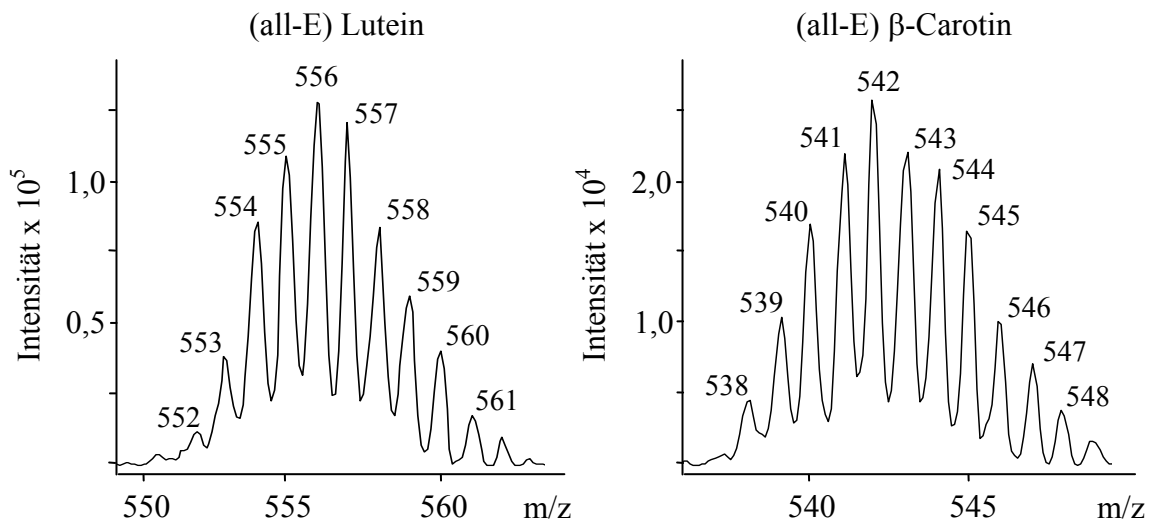
5.4.2.2 HPLC-APCI/MS Untersuchungen der partiell deuterierten Carotinoide

Zur Bestimmung des Deuterierungsgrades der Carotinoide wurden jeweils 10 μ l des MSPD Extraktes vor dem Eindampfen in das HPLC-APCI/MS-System injiziert und unter den gleichen Bedingungen wie oben beschrieben chromatographisch getrennt. Die erhaltenen Massenspektren (Abbildung 26) zeigen für alle vier Carotinoide eine annähernd gaußförmige Isotopenverteilung.

Die partiell deuterierten (all-E) Lutein und (all-E) β -Carotin aus dem markierten Spinat (15 Atom-% D_2O) besitzen eine Isotopenverteilung von 2H_1 bis $^2H_{12}$ und die am häufigsten vorkommende Markierung ist 2H_5 . Das bedeutet, dass in die Carotinoid-Moleküle zwischen 1 und 12 Deuteriumatomen eingebaut werden und das Moleküle mit fünf Deuteriumatome am häufigsten vorkommen. Das undeuterierte Lutein zeigt im Massenspektrum ein m/z -Verhältnis von 551 $[M + H - H_2O]^+$ was der Molekülmasse von Lutein abzüglich eines Moleküls Wasser entspricht (Abbildung 35). Diese Wasserabspaltung wird durch die Stellung der Doppelbindung im Iononring, welche nicht mit der konjugierten Kette in Kontakt steht, ermöglicht. Es kommt zu einer Umlagerung dieser Doppelbindung, wodurch das entstehende Molekül-Ion energetisch stabilisiert wird. Diese Tatsache muss bei der Auswahl des Massenbereiches sowie bei der Auswertung beachtet werden und kommt nur bei Lutein vor. Natürlich zeigt auch dieses Massenspektrum die Anwesenheit von Deuteriumatomen im eigentlich „undeuterierten“ Lutein-Molekül an. Diese

Deuteriumatome im Molekül resultieren aus dem natürlichem Auftreten dieses Isotopes und sind deutlich seltener (1 Deuteriumatom auf 100 Wasserstoffatome).

intrinsisch markierter Spinat



intrinsisch markierte Karotten

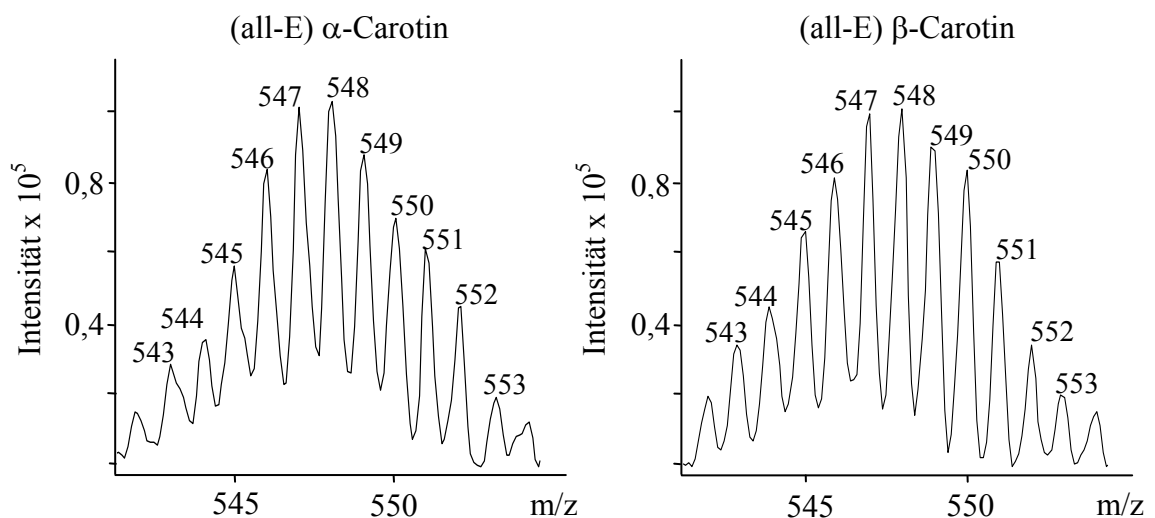


Abbildung 26: Massenspektren der partiell deuterierten Carotinoide aus dem intrinsisch markierten Spinat (15 Atom-% D_2O) und Karotten (30 Atom-% D_2O).

Das deuterierte Lutein hat eine Isotopenverteilung von m/z 552 bis 563 mit der größten Intensität bei m/z 556 $[M-(^2H_5) + H - H_2O]^+$. Das undeuterierte β -Carotin besitzt ein m/z -Verhältnis von 537 $[M + H]^+$, was dem wahren Molekulargewicht entspricht, natürlich mit der selben Einschränkung in Bezug auf „undeuteriert“ wie bei

Lutein. Das deuterierte β -Carotin besitzt eine Isotopenverteilung von m/z 538 bis 549 mit der größten Intensität bei m/z 542 $[M-(^2H_5) + H]^+$.

Im Vergleich dazu zeigt das partiell deuterierte (all-E) α -Carotin und (all-E) β -Carotin aus den markierten Karotten (30 Atom-% D_2O) eine Isotopenverteilung von 2H_5 bis $^2H_{17}$ mit der größten Intensität bei $^2H_{11}$. Es werden also zwischen 5 und 17 Deuteriumatome in die Carotinoid-Moleküle eingebaut und das Molekül mit 11 Deuteriumatomen tritt am meisten auf. Sowohl das undeuterierte (all-E) α -Carotin und das (all-E) β -Carotin besitzt dasselbe m/z -Verhältnis von 537 $[M + H]^+$, was jeweils dem Molekulargewicht entspricht. Auch die deuterierten Analoga zeigen dasselbe Massenspektrum. Beide haben ein Isotopenverteilung von m/z 542 bis 554 mit der größten Intensität bei m/z 548 $[M-(^2H_{11}) + H]^+$.

Der Unterschied in der Deuteriumanreicherung in den Molekülen bei den untersuchten Carotinoiden ist darauf zurückzuführen, dass die Pflanzen mit verschiedenen Mengen an Deuteriumoxid aufgezogen worden sind.

5.4.2.3 1H -NMR Untersuchungen der partiell deuterierten Carotinoide

Nach der Bestimmung der Isotopenverteilung mit der HPLC-APCI/MS, die eine Aussage über die Anzahl der Deuteriumatome im Molekül ermöglicht, soll mit Hilfe der NMR Spektroskopie die Position der Deuteriumatome im Molekül ermittelt werden. Grundsätzlich gibt es dafür zwei Möglichkeiten der Anordnung:

- eine gleichmäßige Verteilung im gesamten Molekül oder
- eine Anhäufung in speziellen Teilen des Moleküls, z.B.: Methylgruppen.

Diese Frage soll mittels Vergleich von 1H -NMR-Spektren der undeuterierten Carotinoide und der deuterierten Carotinoide beantwortet werden. Zusätzlich soll ein Vergleich zwischen biosynthetisch deuteriertem β -Carotin und industriell synthetisch deuteriertem β -Carotin eventuelle Unterschiede oder Gemeinsamkeiten zeigen.

Für die Messungen wurden jeweils annähernd gleiche Probenkonzentration der Carotinoide und identische Aufnahmebedingungen für die Spektren gewählt, um einen Vergleich überhaupt zu ermöglichen.

Lutein aus Spinat

Für die Auswertung der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren wurden diese in einen aliphatischen und einen olefinischen Bereich unterteilt. In Abbildung 27 sind die aliphatischen Bereiche des undeuterten (unten) und des biosynthetisch deuterierten (all-E) Lutein (oben) dargestellt.

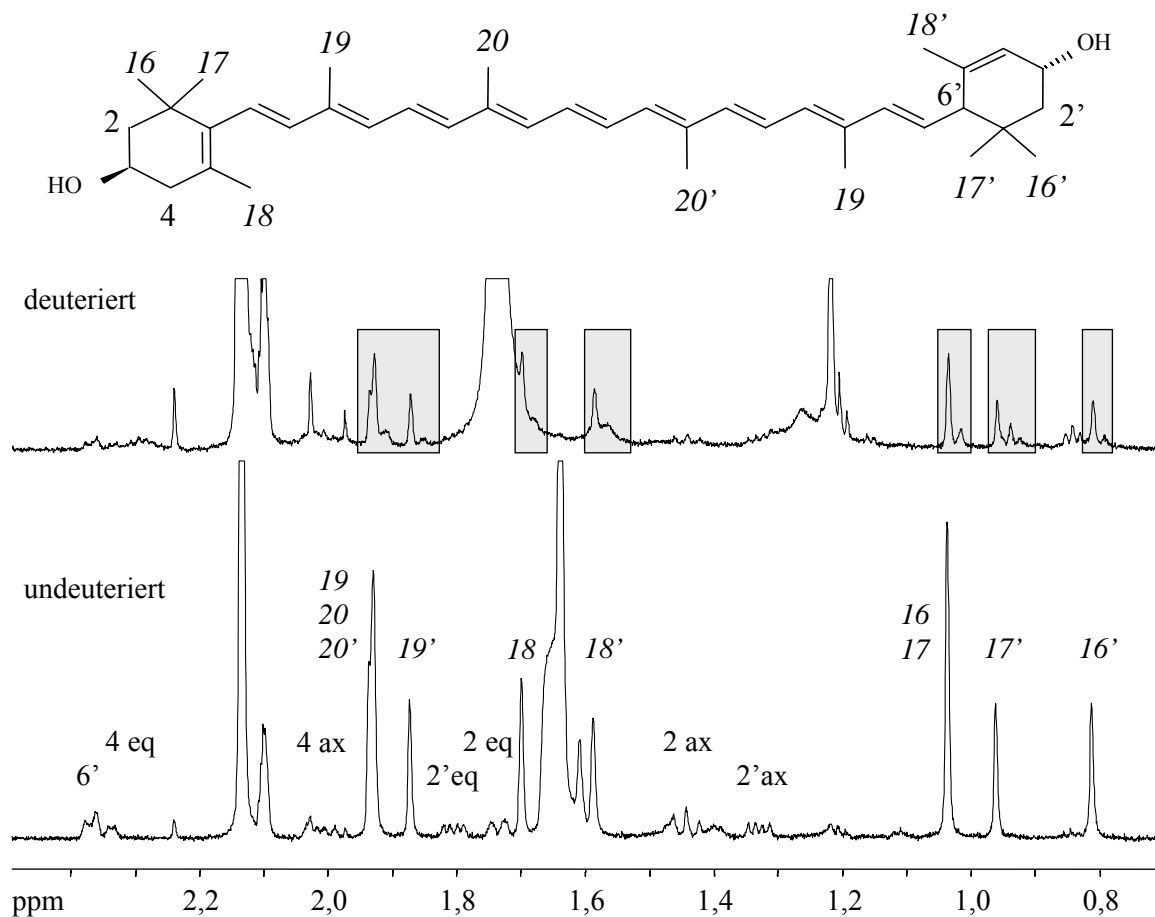


Abbildung 27: Vergleich der aliphatischen Bereiche der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (in Chloroform- d_1) von undeutertem (unten) und deuteriertem (all-E) Lutein (oben).

Im aliphatischen Bereich des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des undeuterten (all-E) Lutein erscheinen für die Methylgruppen 16' (0,82 ppm), 17' (0,96 ppm), 18' (1,59 ppm), 19' (1,87 ppm) sowie 18 (1,70 ppm) jeweils ein Singulett mit einem Integral von drei. Das Auftreten der einzelnen Signale kommt durch die unsymmetrische Struktur des Lutein-Moleküls zustande. Die beiden Methylgruppen 16 und 17 erscheinen als ein Singulett bei 1,04 ppm mit einem Integral von sechs. Auch für die Methylgruppen 19, 20 und 20' erscheint nur ein Singulett bei 1,93 ppm, welches jedoch einen Integrationswert von neun besitzt. Im Spektrum des deuterierten (all-E) Lutein erscheinen diese

Singulett auch, besitzen aber eine geringere Intensität als im Spektrum für das undeuterte (all-E) Lutein. Weiterhin treten zusätzliche Signale mit einer leichten Verschiebung zu höherem Feld in direkter Nachbarschaft dieser Methylgruppen-Singulett auf (graue Boxen). Die zusätzlichen Signale werden durch eine teilweise Deuterierung der Methylgruppen hervorgerufen und zeigen eine geringere Intensität als die Signale für die CH_3 -Gruppen. Dadurch ändert sich die chemische und magnetische Umgebung der Methylgruppen, was zu einem leicht veränderten lokalen Magnetfeld der restlichen Protonen führt. Die Ursache für die leichte Verschiebung zu höherem Feld liegt in dem Austausch der leichteren Wasserstoffatome durch die schwereren Deuteriumatome. Durch den Austausch kommt es zu einer höheren Elektronendichte und damit zu einer stärkeren Abschirmung der restlichen Wasserstoffatome. Diese Verschiebung wird als Isotopen Effekt bezeichnet^[184]. In den Molekülen des deuterierten (all-E) Lutein können theoretisch vier verschiedene Methylgruppen auftreten, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{D}$, $-\text{CHD}_2$ und $-\text{CD}_3$, wobei die Methylgruppe $-\text{CD}_3$ in einem ^1H -NMR-Spektrum natürlich nicht beobachtet werden kann. Die Methylgruppen $-\text{CH}_3$ und $-\text{CH}_2\text{D}$ sind im ^1H -NMR-Spektrum eindeutig nachweisbar. Sie unterscheiden sich nur in ihrer Intensität, was zum einen auf die reduzierte Anzahl an Protonen in der Gruppe und zum anderen auf eine geringere Häufigkeit der $-\text{CH}_2\text{D}$ Gruppe in den Molekülen zurückzuführen ist. Signale für die $-\text{CHD}_2$ Gruppe sind mit Ausnahme der Position 17' nicht erkennbar. Dies liegt in der noch geringeren Intensität der Signale durch eine nochmals reduzierte Anzahl an Protonen in der Gruppe und an der noch geringeren Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins dieser Gruppe im Molekül.

Ein Problem bei der Auswertung der Integrationswerte ist die Tatsache, dass in der deuterierten Probe die Moleküle nicht alle einheitlich deuteriert sind. Die Massenspektren zeigen dies deutlich mit der gaußförmigen Isotopenverteilung. Das bedeutet, dass die erhaltenen Integrationswerte eine Summe aller in der Lösung vorkommenden Moleküle sind. Es ist nur die Aussage möglich, dass sich die Integrationsverhältnisse der undeuterten Methylgruppen in der deuterierten Probe im Vergleich zur undeuterten Probe zueinander nicht verändert haben. Daraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Deuterierung der Methylgruppen gleichmäßig abläuft und dass keine Methylgruppe bevorzugt deuteriert wird.

Die Methylengruppen 2, 2', 4 und das Proton 6' in den zwei Iononringen zeigen in beiden Teilspektren eine Multiplett-Struktur, mit dem Unterschied, dass die Signale der deuterierten eine geringere Intensität aufweisen. Dies kann wiederum mit einer teilweisen Deuterierung dieser Gruppen begründet werden und der daraus resultierenden Intensitätsabnahme des undeuterierten Signals. Die Integrationsverhältnisse ändern sich wie bei den Methylgruppen nicht, was auf eine gleichmäßige Deuterierung schließen lässt. Die Aufspaltungsmuster der Methylengruppen sind schon in der undeuterierten Probe relativ komplex, was durch ein chirales Zentrum in Position 3 bzw. 3' hervorgerufen wird, und werden durch die Einführung von Deuteriumatomen noch komplizierter. So zeigen die Protonen im undeuteriertem Lutein nicht nur Kopplungen zu dem Proton 3 bzw. 3', sondern auch Kopplungen untereinander, da sie chemisch und magnetisch nicht äquivalent sind (Dublett von Dublett). Durch die Einführung der Deuteriumatome kommt noch die Kopplung zu diesen hinzu. Im Spektrum selber kann diese Kopplung oftmals aber nicht beobachtet werden, da die Kopplungskonstanten zwischen Protonen und Deuteriumatomen deutlich kleiner sind als zwischen Protonen ($J(H,H) \approx 6,5 \cdot J(H,D)$) [185]

Nach der Interpretation des aliphatischen Bereiches soll nun auf den olefinischen Bereich eingegangen werden. Da eine genaue Auswertung des Bereiches bereits in Abschnitt 5.3.2 (Abbildung 19 A) erfolgte, wird hier nun das Augenmerk auf die Deuterierung gelegt. Die Unterschiede bei den chemischen Verschiebungen resultieren durch die Verwendung von unterschiedlichen Lösungsmitteln bei der Spektrenaufnahme. Nur die zwei Signale von Position 3 und 3' kommen auf Grund der Erweiterung des dargestellten Bereiches in Abbildung 28 hinzu. Im Spektrum erscheinen natürlich alle bereits in Abschnitt 5.3.2 beschriebenen Signale sowie zwei zusätzliche für die Protonen 3 (3,99 ppm) und 3' (4,23 ppm). Beide sind im Vergleich zu den anderen Signalen stark verbreitert, was auf die direkte Nachbarschaft der OH-Gruppe am selben Kohlenstoffatom und auf nicht gut genug aufgelöste Kopplungen zu Nachbarprotonen zurückzuführen ist. Das Signal des Protons 3 erscheint noch etwas breiter als das von 3', da das Proton 3' nur mit einer Methylengruppe (Dublett von Dublett) und einem olefinischen Proton (Singulett) anstelle von zwei

Methylengruppen (zwei Dubletts von Dubletts) koppelt. Der Integrationswert beträgt bei beiden Signalen jeweils eins.

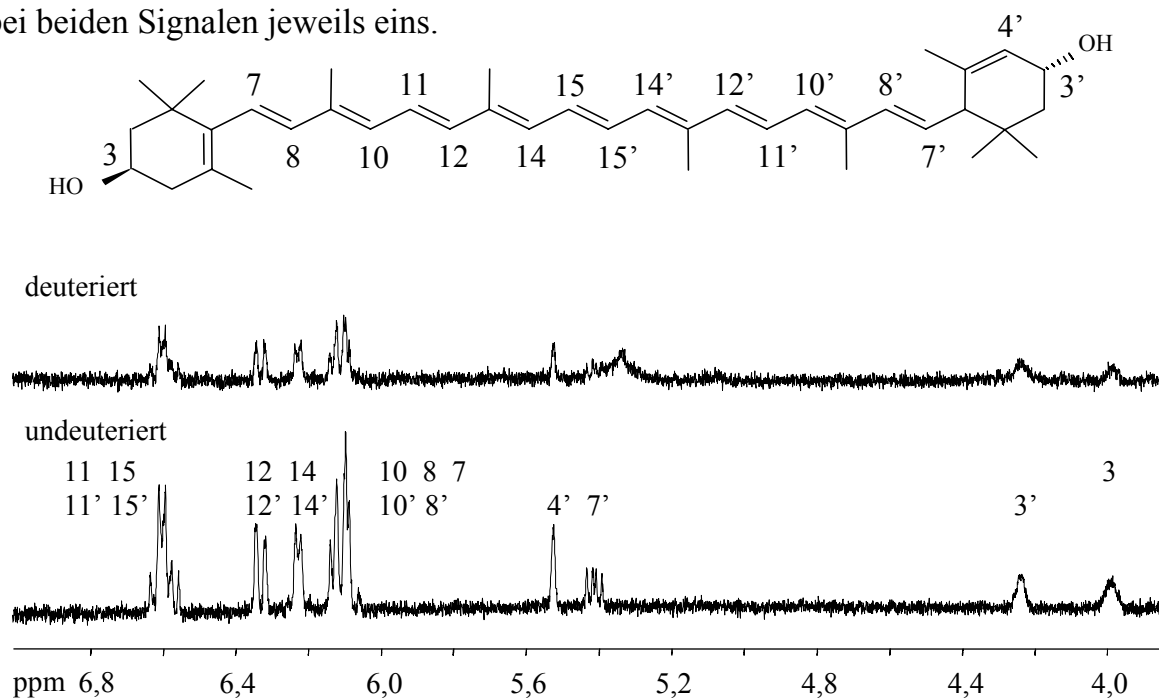


Abbildung 28: Vergleich der olefinischen Bereiche der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (in Chloroform- d_1) von undeutertem (unten) und deutertem (all-E) Lutein (oben).

Im olefinischen Bereich des Spektrums für das deutertete (all-E) Lutein kommt es bei allen Signalen zu einer sichtbaren Verringerung der Signalintensität durch die Deuterierung. Die vorhandenen Kopplungen zwischen den Protonen und den Deuteriumatomen, wie bereits bei den Methylengruppen erklärt, sind auf Grund der deutlich kleineren Kopplungskonstanten nicht aufgelöst und somit nicht sichtbar. Auch bei den olefinischen Protonen geben die Integrationswerte nur eine Summe aller vorhandenen Lutein-Moleküle wieder. Die Verhältnisse zueinander bleiben jedoch gleich, womit auch bei den olefinischen Protonen auf eine gleichmäßige Deuterierung geschlossen werden kann. Zusammenfassend kann man für (all-E) Lutein sagen, dass das Molekül gleichmäßig deutert wird und dass es keine bevorzugten Positionen im Molekül gibt.

β -Carotin aus Karotten

Für die Auswertung der deuterteten Carotinoide aus Karotten wurde (all-E) β -Carotin ausgewählt, um mögliche Unterschiede zwischen unsymmetrischen und symmetrischen Carotinoiden zu erkennen. In Abbildung 29 sind die aliphatischen

Bereiche der ^1H -NMR-Spektren des undeuterten (unten) und des deuterierten (all-E) β -Carotin (oben) dargestellt.

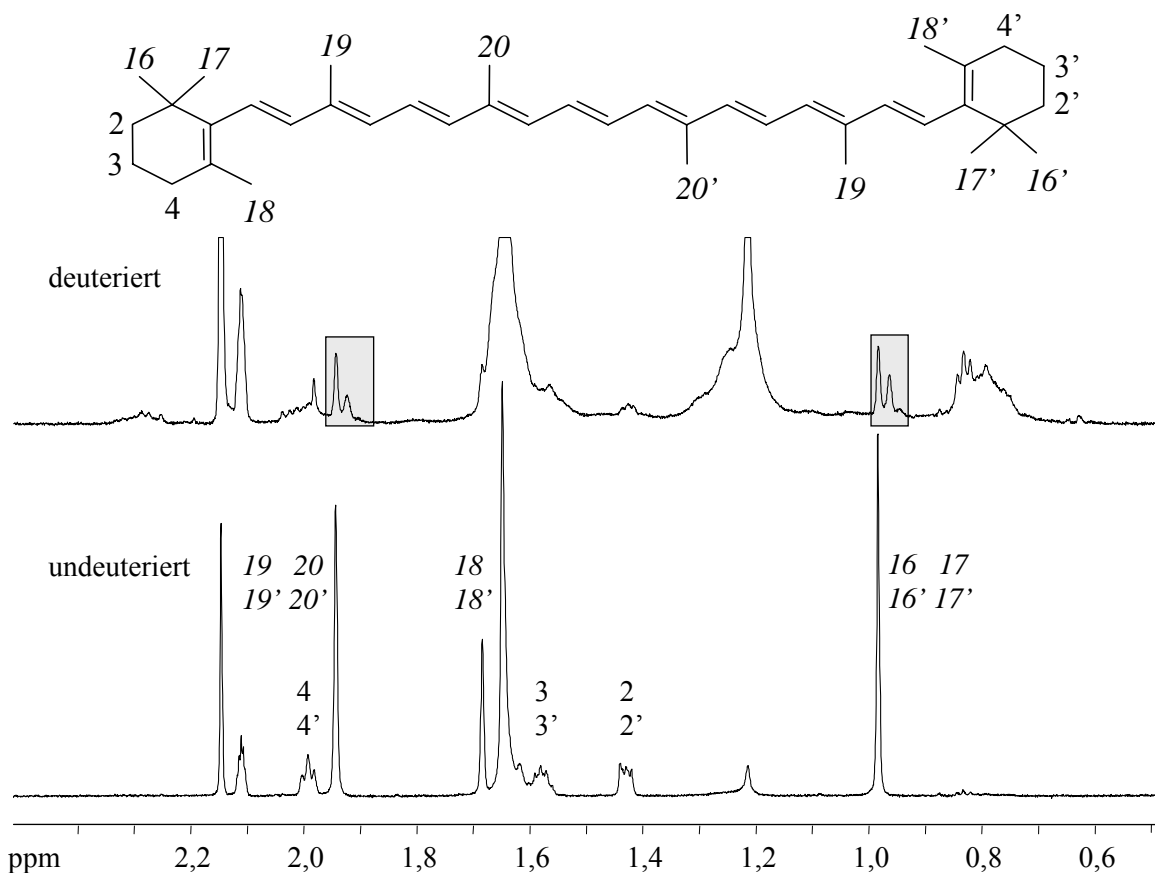


Abbildung 29: Vergleich der aliphatischen Bereiche der ^1H -NMR-Spektren (in Chloroform- d_1) von undeutertem (unten) und deuteriertem (all-E) β -Carotin (oben).

Durch die symmetrische Molekül-Struktur von (all-E) β -Carotin fallen im Vergleich zum unsymmetrischen (all-E) Lutein mehrere Methylgruppen zu einem Singulett im Spektrum zusammen. Das Singulett bei 1,00 ppm setzt sich aus den Methylgruppen 16,16',17 und 17' zusammen und hat ein Integral von zwölf. Das nächste Singulett bei 1,70 ppm setzt sich aus den zwei Methylgruppen 18 und 18' zusammen und besitzt ein Integrationswert von sechs. Die Methylgruppen 19, 19', 20 und 20' zeigen ein Singulett bei 1,95 ppm und ein Integral von zwölf. Im Spektrum des deuterierten (all-E) β -Carotin erscheinen wie beim deuterierten (all-E) Lutein zusätzliche Signale (graue Boxen) mit einer leichten Verschiebung zu höherem Feld neben den Signalen für die undeuterten Methylgruppen. Wie bereits beim deuterierten (all-E) Lutein besprochen, zeigen sie die Anwesenheit von teilweise deuterierten Methylgruppen im

Molekül an und werden durch den Isotopen-Effekt hervorgerufen. Die höheren Intensitäten der teilweise deuterierten Methylgruppen können mit der größeren Anzahl an Deuteriumatomen in den Molekülen erklärt werden. Zur Erinnerung, beim Spinat lag die Isotopenverteilung zwischen $^2\text{H}_1$ und $^2\text{H}_{12}$ und bei den Karotten zwischen $^2\text{H}_5$ und $^2\text{H}_{17}$. Auch die Methylengruppen 2, 2', 3, 3', 4 und 4' zeigen ein ähnliches Verhalten wie die Methylengruppen beim deuterierten (all-E) Lutein. Im Vergleich zum undeuterten (all-E) β -Carotin kommt es zu einer Verringerung der Signalintensität und die Signale werden etwas breiter durch die zusätzlich auftretenden Kopplungen. Die Erklärung dafür ist die gleiche wie bei den Methylengruppen des deuterierten (all-E) Luteins. Durch die Tatsache, dass die Integrationswerte im Verhältnis zueinander gleich bleiben, kann auch hier davon ausgegangen werden, dass die Deuterierung der Methyl- und Methylengruppen gleichmäßig erfolgt.

Abschließend soll noch kurz auf den olefinischen Bereich (Abbildung 30) eingegangen werden, der sich bezüglich der Intensitäten analog zum deuterierten (all-E) Lutein verhält.

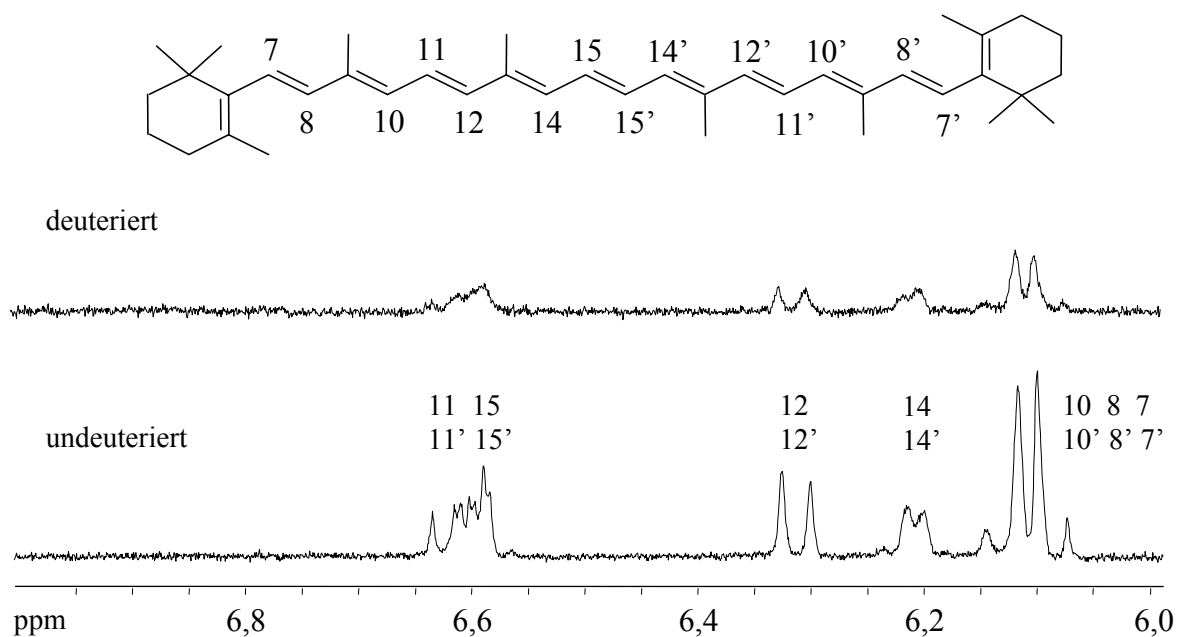


Abbildung 30: Vergleich der olefinischen Bereiche der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (in Chloroform- d_1) von undeuterten (unten) und deuterierten (all-E) β -Carotin (oben).

Ein Vergleich der beiden Spektren zeigt, dass sich die Signalintensitäten verringert haben, was an der teilweisen Deuterierung liegt. Die Verhältnisse der Integrationswerte ändern sich nicht, womit auch hier eine gleichmäßige Deuterierung

vorliegt. Auch beim deuterierten (all-E) β -Carotin liegt, wie auch schon zuvor ermittelt, eine gleichmäßige Deuterierung des gesamten Moleküls vor. Auch die bei der NMR-Auswertung nicht behandelten Analyten ((all-E) β -Carotin aus Spinat und (all-E) α -Carotin aus Karotten) zeigen das gleiche Deuterierungsverhalten.

Synthetisch deuteriertes β -Carotin

In diesem Teilabschnitt soll der Unterschied zwischen biosynthetisch deuterierten Carotinoiden und synthetisch deuterierten Carotinoiden gezeigt werden. Als Beispiel dient hierfür das synthetisch hergestellte $^2\text{H}_8$ -(all-E) β -Carotin, welches von der BASF AG (Ludwigshafen) zur Verfügung gestellt wurde. Die Messungen wurden auf Grund von größeren Analytmengen in einem 5 mm Röhrenprobenkopf durchgeführt.

Im Molekül des synthetisch deuterierten $^2\text{H}_8$ -(all-E) β -Carotins wurden bei der Synthese die Methylgruppen 19 und 19' sowie die olefinischen Protonen 11 und 11' gezielt deuteriert. Das Massenspektrum dieser Substanz zeigt durch die gezielte Deuterierung einzelner Positionen im Molekül im Gegensatz zu den Massenspektren der biosynthetisch deuterierten Carotinoide keine gaußförmige Isotopenverteilung, sondern nur ein einzelnes Signal bei m/z 559 $[\text{M}-(^2\text{H}_8) + \text{H}]^+$ (nicht gezeigt). Auch in den NMR-Spektren können Unterschiede ausgemacht werden. In Abbildung 31 sind die aliphatischen Bereiche der aufgenommenen ^1H -NMR-Spektren vom undeuterierten (all-E) β -Carotin (unten) und synthetisch deuterierten $^2\text{H}_8$ -(all-E) β -Carotin (oben) dargestellt. In diesem Bereich sind im Gegensatz zu vorher keine zusätzlichen Signale sichtbar. Beide Teilspektren zeigen das gleiche Signalpattern, lediglich die Auswertung der Integrationswerte zeigt Unterschiede. Durch die komplette Deuterierung der Methylgruppen 19 und 19' erscheinen diese nicht mehr im Spektrum. Das Integral des Signals (1,95 ppm) reduziert sich von zwölf im Spektrum des undeuterierten (all-E) β -Carotin auf sechs im Spektrum von $^2\text{H}_8$ -(all-E) β -Carotin. Alle anderen Signale bleiben unverändert.

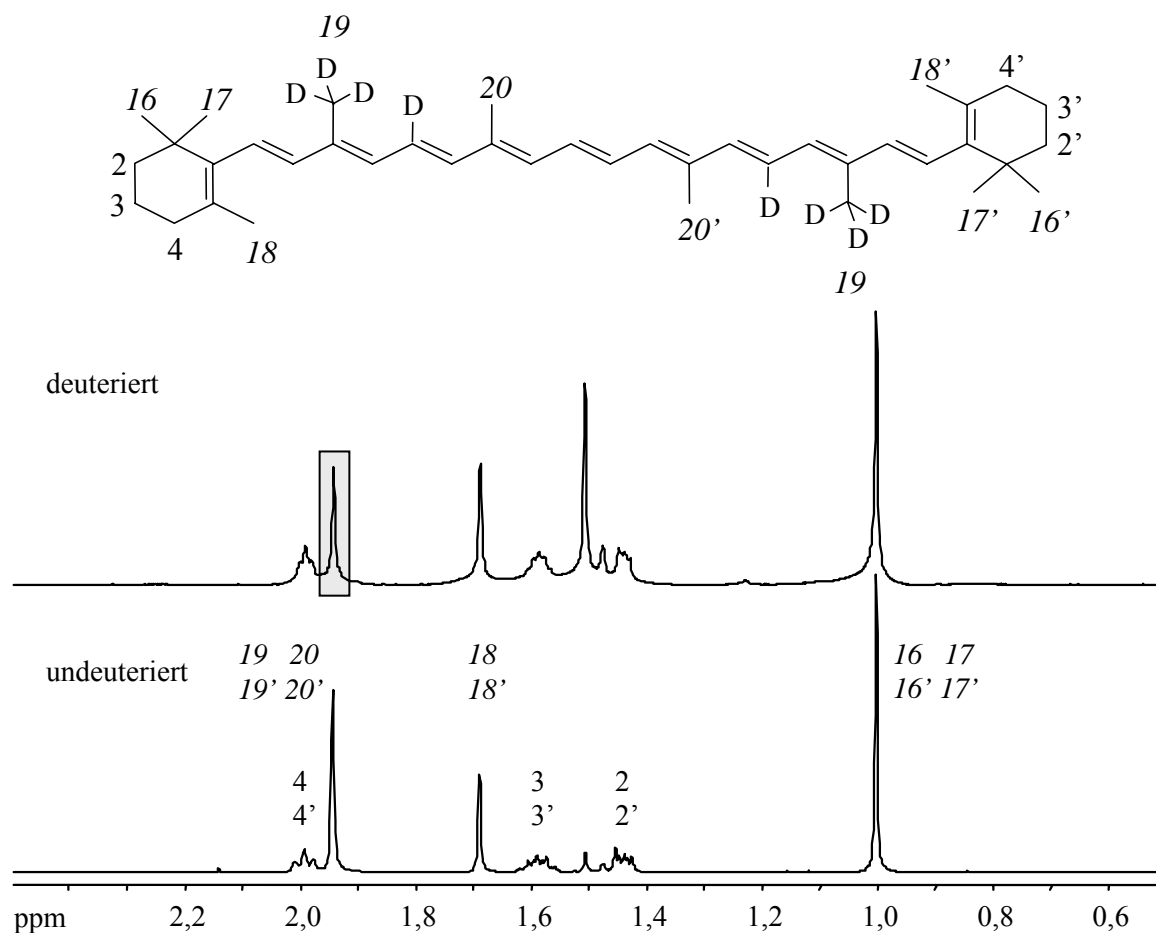


Abbildung 31: Vergleich der aliphatischen Bereiche der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (in Chloroform- d_1) von undeutertem (*all-E*) β -Carotin (unten) und synthetisch deuteriertem $^2\text{H}_8$ -(*all-E*) β -Carotin (oben).

Der olefinische Bereich hingegen zeigt mehr Veränderungen durch die Deuterierung des Moleküls (Abbildung 32). Der Austausch der Protonen durch Deuteriumatome in Position 11 und 11' beeinflusst natürlich die Kopplung mit den Protonen 10/10' und 12/12'. Die Aufspaltung dieser Signale (10/10' 6,12 ppm; 12/12' 6,33 ppm) ändert sich von einem Dublett zu einem Singulett, auf Grund der nicht mehr vorhandenen Proton-Proton-Kopplung. Die Kopplung der Protonen mit den Deuteriumatomen ist nicht sichtbar, weil die Kopplungskonstanten zu gering sind und im Spektrum nicht aufgelöst werden können. Die Integrationswerte ändern sich hingegen nicht, da die Anzahl der Protonen in diesen Positionen nicht geändert wird. Das Signal für die Protonen 11 und 11' ist im Spektrum von $^2\text{H}_8$ -(*all-E*) β -Carotin durch den Austausch mit Deuteriumatomen nicht mehr sichtbar. Anstelle des Multipletts bei 6,62 ppm erscheint jetzt ein Dublett für die Protonen 15 und 15' (6,60

ppm) mit einem Integral von zwei. Die Signale für die restlichen olefinischen Protonen bleiben unverändert.

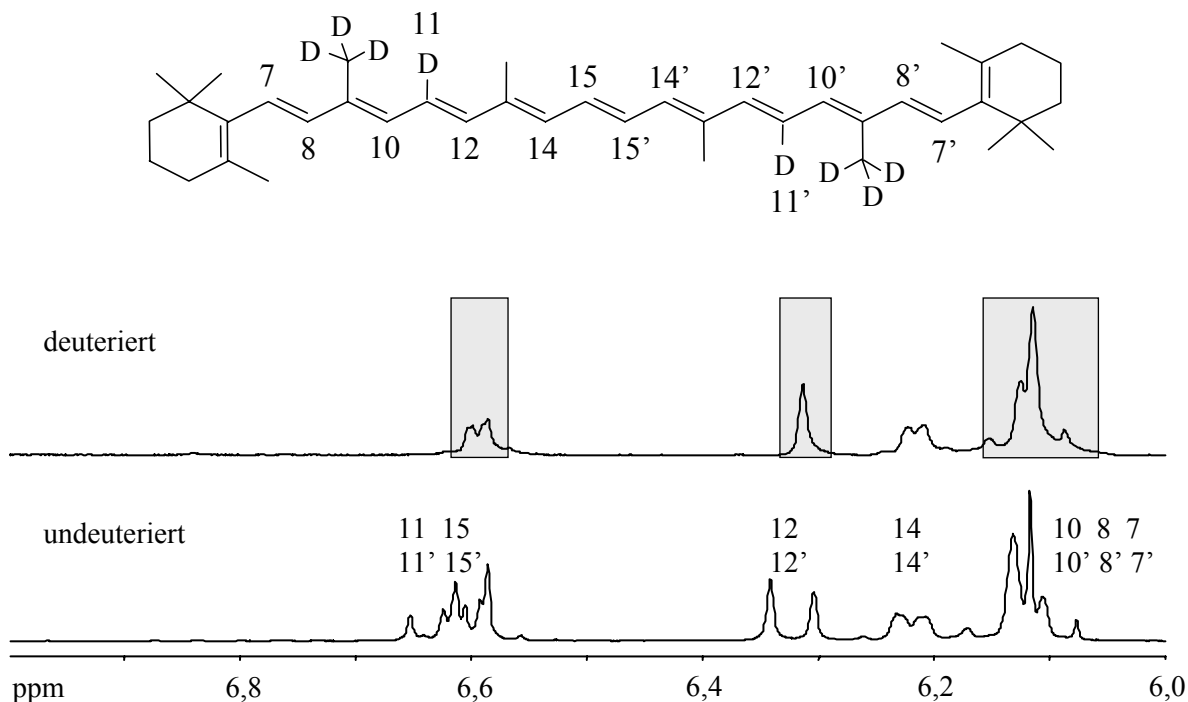


Abbildung 32: Vergleich der olefinischen Bereiche der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (in Chloroform- d_1) von undeutertem (*all-E*) β -Carotin (unten) und synthetisch deuteriertem $^2\text{H}_8$ -(*all-E*) β -Carotin (oben).

5.4.3 Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Lutein aus intrinsisch markiertem Spinat

5.4.3.1 Design der Studie

Mit dieser Studie sollte die genaue Anreicherung und die Bioverfügbarkeit von Lutein aus Nahrungsmitteln bestimmt werden. Durch den Einsatz der intrinsisch markierten Gemüsesorten kann, im Gegensatz zu vielen anderen Studien zuvor, nicht nur der Gesamt-Carotinoidspiegel im Serum verfolgt, sondern auch zwischen dem bereits vorhandenen Carotinoidspiegel im Serum und den applizierten Carotinoiden aus der Nahrung unterschieden werden.

Die Probanden für diese Studie waren gesunde, nicht-rauchende Männer (8) und Frauen (9) zwischen 45 und 71 Jahren mit Body Mass Indizes (BMI) zwischen 21,1

und 30,3 kg/m². Die Studienteilnehmer waren angehalten, innerhalb des letzten Monats vor der Studie keine Vitamin-Supplemente zu sich zu nehmen und wurden zwei Wochen vor Beginn der Studie einer Carotinoid-armen Diät unterworfen. Einen Tag vor der Studie wurden die Teilnehmer in der Tufts Medical School einquartiert. Am ersten Tag des Experiments erhielten die Testpersonen eine Carotinoid-reiche Mahlzeit bestehend aus gedämpftem und püriertem Gemüse sowie einem fetthaltigen Getränk (20 g Fett, 17 g Proteine, 78 g Kohlenhydrate), um die Aufnahme der lipophilen Carotinoide in den Organismus zu verbessern. Im Anschluss an diese einmalige Supplementierung verbrachten die Teilnehmer die nächsten zwei Wochen in der Tufts Medical School und erhielten in diesem Zeitraum eine Carotinoid-freie Diät. Nach diesen 15 Tagen konnten die Teilnehmer die Klinik verlassen und zu ihren üblichen Ernährungsgewohnheiten zurückkehren.

Tag [d]	Art und Dosis der Nahrung	Zeitpunkt der Entnahme von Blutproben
-14 bis -1	Carotinoid-arme Ernährung	keine
0	pürierter Spinat bzw. Kohl, fetthaltiges Getränk	0, 3, 5, 7, 9, 11, 13 h
0 bis 13	Carotinoid-freie Ernährung	Täglich
14 bis 35	frei wählbar	jeden zweiten Tag

Tabelle 9: Zeitliche Planung der Bioverfügbarkeitsstudie von Lutein.

Zur Registrierung der Carotinoideaufnahme durch den Körper wurden den Teilnehmern regelmäßig Blutproben entnommen (Tabelle 9). Dies erfolgte vor der Supplementierung, um den Ausgangswert zu ermitteln, alle zwei Stunden bis zur Hälfte des ersten Tages, bis zum 13. Tag täglich und bis zum Ende der Studie alle zwei Tage.

5.4.3.2 Analyse des für die Bioverfügbarkeitsstudie verwendeten Spinats

Vor der eigentlichen Durchführung der Supplementierungsstudie war es notwendig, eine quantitative Analyse des im Spinat vorhandenen Luteins durchzuführen. Dafür wurden die Carotinoide aus 0,5 g Spinat mit Methanol und THF extrahiert und der

Extrakt chromatographisch getrennt. Die durchgeführte Quantifizierung ergab, dass etwa 11 mg (chargenabhängig) an deuteriertem Lutein pro 100 g Spinat vorlagen.

Das aufgenommene Massenspektrum (Abbildung 33) von (all-E) Lutein aus dem markiertem Spinat (25 Atom-% D₂O) zeigt eine Isotopenverteilung von m/z 552 bis m/z 569 mit der größten Häufigkeit bei m/z 559 [M-(²H₈) + H - H₂O]⁺. Das Wissen über die genaue Isotopenverteilung ist wichtig, weil diese Werte später für eine Fehlerrechnung bei der Auswertung benötigt werden.

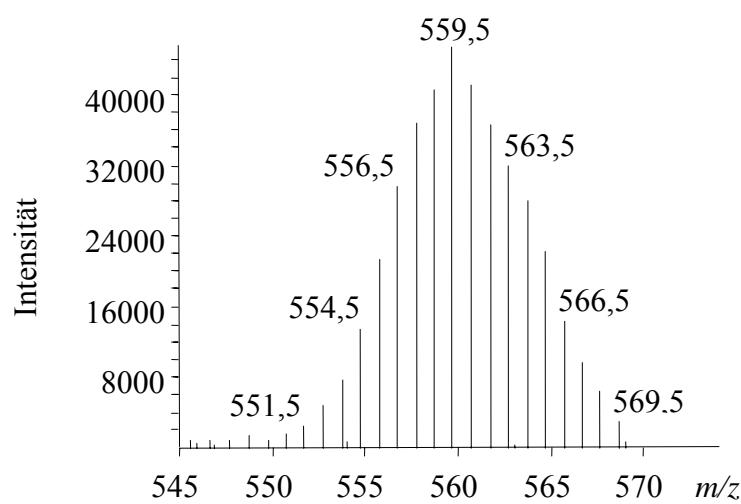


Abbildung 33: Gaußförmige Isotopenverteilung des deuterierten (all-E) Lutein.

5.4.3.3 Untersuchung zur Anreicherung von Lutein aus intrinsisch markiertem Spinat mittels HPLC-UV- und HPLC-APCI/MS-Kopplung

Die den Teilnehmern entnommenen Blutproben wurden nun auf ihren Carotinoidgehalt hin untersucht. Die Carotinoide wurden mit Hilfe einer flüssig-flüssig-Extraktion aus 0,5 ml Serum extrahiert und anschließend der erhaltene Extrakt auf einer C₃₀-Trennphase chromatographisch aufgetrennt (Abbildung 34). Für die Quantifizierung des Luteins aus dem Serum wurde der interne Standard Echinenon verwendet.

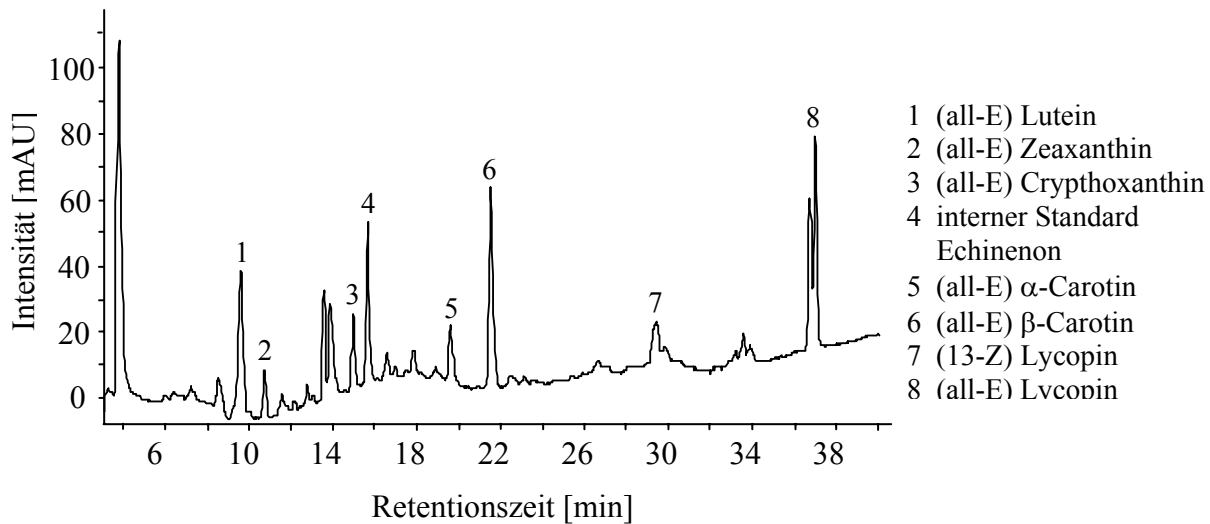


Abbildung 34: UV-Chromatogramm von humanem Serum vor der Supplementierung.

Durch den Einsatz der HPLC-APCI/MS-Kopplung ist es nun möglich, zwischen dem deuteriertem Lutein aus der Supplementierung und dem undeuterten Lutein, welches im Körper gespeichert ist, zu unterscheiden. Dazu werden gezielt die spezifischen Ionenspuren (Selected Ion Chromatograms, SIC) beider Moleküle betrachtet. Beim undeuterten Lutein ist es der Masse-zu-Ladungsverhältnis-Bereich m/z 551 bis 554 und beim deuterierten Lutein m/z 556 bis 563. In Abbildung 35 sind beispielhaft die SICs aus dem Serumextrakt eines Teilnehmers vor der Supplementierung dargestellt.

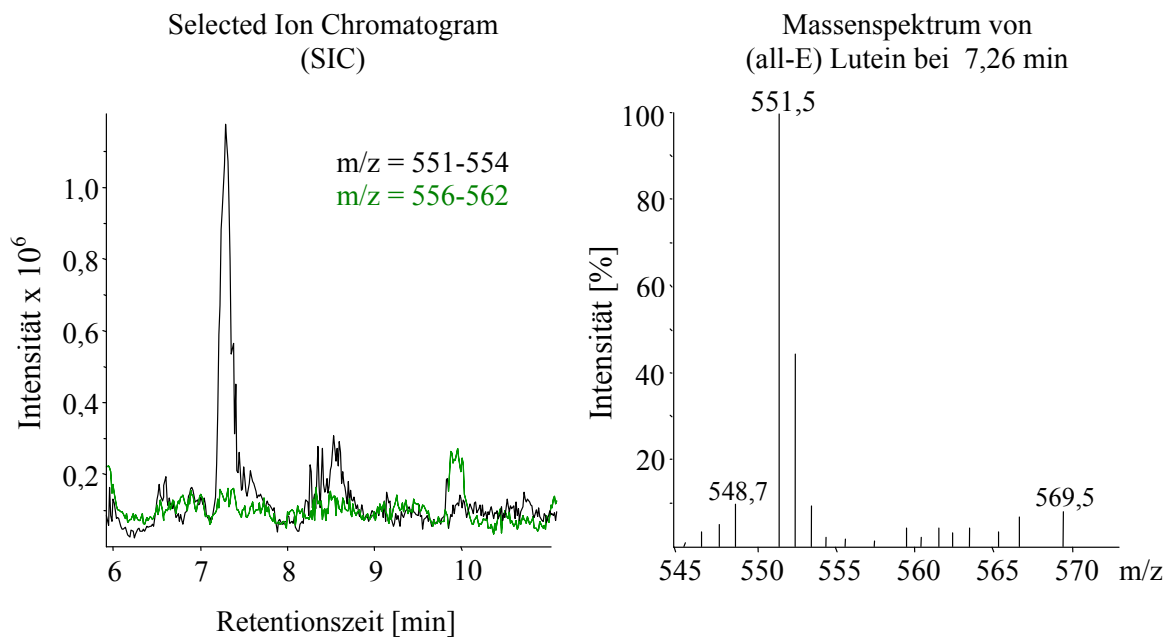


Abbildung 35: SICs von undeutertem (m/z 551-554) und deuteriertem (m/z 556-563) Lutein vor der Supplementierung und das korrespondierende Massenspektrum am Signalmaximum.

Es ist zu erkennen, dass nur der SIC des undeuterten Luteins mit m/z 551-554 ein Signal im Chromatogramm zeigt. Auch das extrahierte Massenspektrum aus diesem Signal zeigt nur die Massen des undeuterten Luteins. Im Vergleich dazu sind in Abbildung 36 die SICs desselben Teilnehmers 24 Stunden nach der Supplementierung gezeigt.

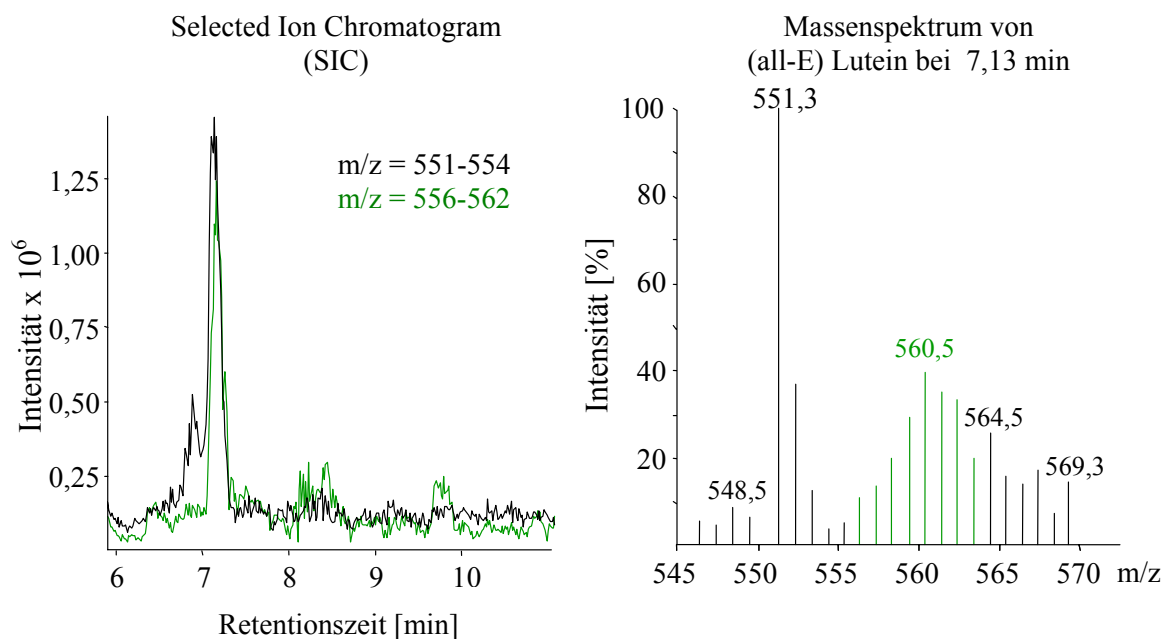


Abbildung 36: SICs von undeutertem (m/z 551-554) und deuteriertem (m/z 556-563) Lutein 24 h nach der Supplementierung und das korrespondierende Massenspektrum am Signalmaximum.

Im Gegensatz zu vorher erscheinen jetzt bei beiden m/z -Verhältnissen Signale. Das zeigt, dass das supplementierte Lutein durch den Körper bereits aufgenommen wurde. Das extrahierte Massenspektrum enthält neben den Massen für das undeuterte Lutein auch die Gaußförmige Isotopenverteilung für das deuterierte Lutein aus dem Spinat.

Berechnung der Anreicherung

Für die Bestimmung der Anreicherung des Luteins im Blut (relative Bioverfügbarkeit) ist zunächst eine quantitative Auswertung der SICs für das undeuterte und das deuterierte Lutein notwendig. Nach der Integration der Signale kann die Anreicherung mit Gleichung 10 berechnet werden. Die Berechnung der Anreicherung wird für jeden Zeitpunkt der Blutentnahme einzeln durchgeführt. Die so erhaltenen Werte können gegen die Zeit aufgetragen werden und ergeben für jeden

Teilnehmer eine individuelle Absorptions-Desorptions-Kurve des Luteins. In Abbildung 37 ist solch eine erhaltene Kurve beispielhaft von einem Teilnehmer dargestellt.

$$\text{Anreicherung [\%]} = \frac{S_{\text{deuteriert}}}{S_{\text{deuteriert}} + S_{\text{undeuteriert}}} \times 100 \quad (\text{Gl. 10})$$

$S_{\text{undeuteriert}}$ Integral des Signals bei m/z 551-554

$S_{\text{deuteriert}}$ Integral des Signals bei m/z 556-563

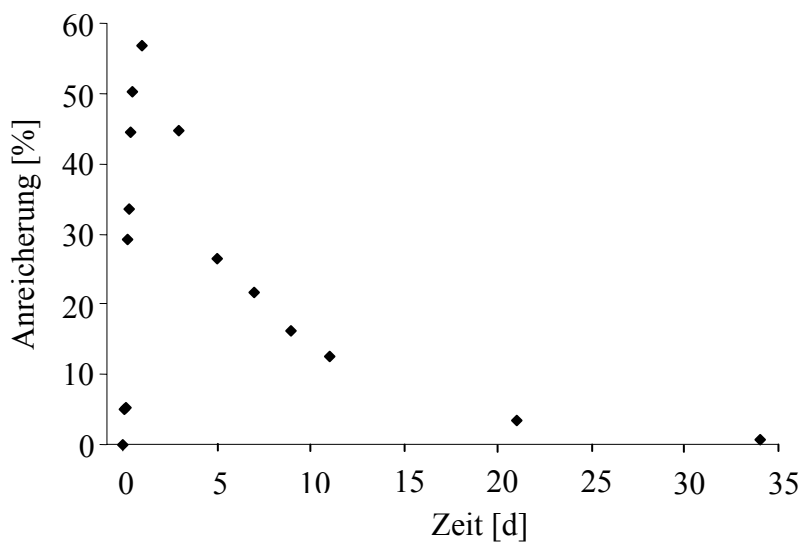


Abbildung 37: Ermittelte Anreicherungskurve eines Teilnehmers der Studie.

Die größten Anreicherungsraten für das deuterierte Lutein können nach dem ersten und im Verlauf des zweiten Tages nach der Supplementierung beobachtet werden. Die Werte für die maximale Anreicherung schwanken von Teilnehmer zu Teilnehmer und liegen im Bereich von 36 bis 68%. Eine Ursache dieser Schwankung kann in den unterschiedlichen Lutein-Serumkonzentrationen der Teilnehmer zum Beginn (Zeitpunkt $t = 0$ h) der Studie liegen. Um das zu überprüfen, wurde die maximale Anreicherung des deuterierten Luteins gegen die Anfangsserumkonzentration des undeuterierten Luteins aufgetragen (Abbildung 38). Auch die Anfangsserumkonzentrationen des Luteins der Teilnehmer zeigen teilweise deutliche Schwankungen, was wahrscheinlich auf unterschiedliche Ernährungsgewohnheiten zurückzuführen ist. Sie reichen von 0,27 bis 1,56 μg pro Liter Serum.

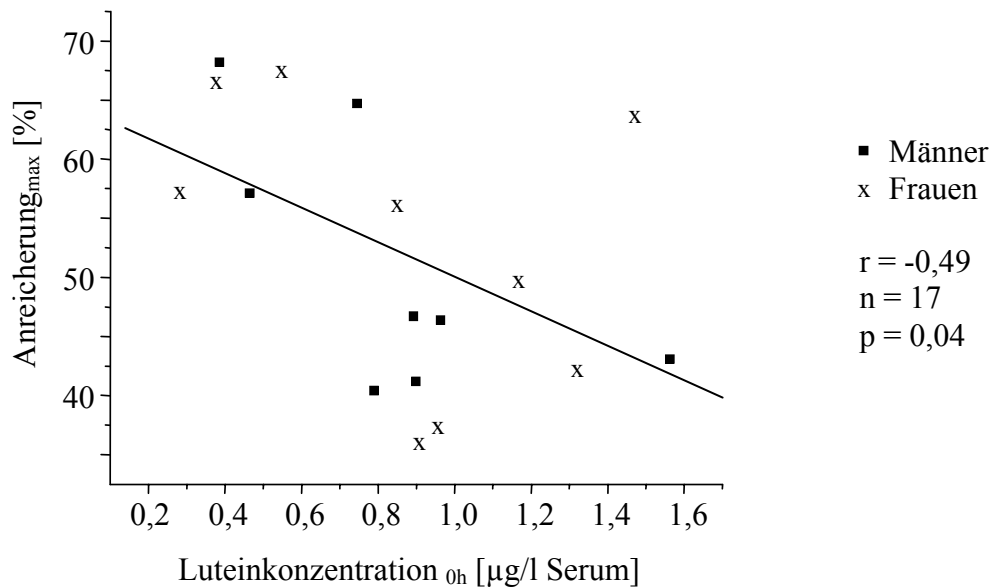


Abbildung 38: Korrelation zwischen der maximalen Anreicherung und der Anfangsserumkonzentration von Lutein vor der Supplementierung.

In dieser Darstellung ist eindeutig zu erkennen, dass die Werte für die maximale Anreicherung abnehmen, wenn die Anfangsserumkonzentration vom Lutein zunimmt. Das bedeutet, dass ein geringerer Serumlevel an Lutein eine stärkere Anreicherung des Luteins ermöglicht und das ein höherer Serumlevel die Anreicherung verschlechtert. Es besteht sogar die Möglichkeit, dass bei einer noch höheren Anfangsserumkonzentration kaum noch Lutein aus der Nahrung aufgenommen wird, weil ein Art Sättigung eintritt. Dies ist aber nur rein hypothetisch und müsste durch weitere Experimente überprüft werden.

Berechnung der absoluten Bioverfügbarkeit

Um die absolute Bioverfügbarkeit berechnen zu können, muss zuerst einmal die Absolutmenge an aufgenommenem Lutein für jeden Zeitpunkt bestimmt werden (Gleichungen 11 und 12). Dafür wird die vorher bestimmte Anreicherung mit der Gesamtmenge an Lutein in der Serumprobe ($c_{\text{Lutein, total}}$) und dem geschätzten Volumen an Blut im Körper (V_{Blut}) multipliziert.

$$m_{\text{absorb. Lutein}} [\mu\text{g}] = \text{Anreicherung} \cdot c_{\text{Lutein, total}} \cdot V_{\text{Blut}} \quad (\text{Gl. 11})$$

$$V_{\text{Blut}} = \text{Körpergewicht} [\text{kg}] \cdot 0,0435 \text{ L} \quad (\text{Gl. 12})$$

Mit Hilfe dieser Absolutmengen können nun die Absorptions-Desorptions-Kurven für jeden Teilnehmer erstellt werden. Wie bereits im Abschnitt 3.3.4 gezeigt, kann

mittels der Integrale (Area Under Curve, AUC) dieser Kurven die absolute Bioverfügbarkeit bestimmt werden (Gleichung 1).

$$\text{Bioverfügbarkeit [\%]} = \frac{\text{AUC}_{\text{absorb. orale Dosis}}}{\text{AUC}_{\text{absorb. intraven. Dosis}}} \times 100 \quad (\text{Gl. 1})$$

Die so ermittelten absoluten Bioverfügbarkeiten liegen im Bereich von 0,45 bis 8,07%. Dieser relativ große Bereich lässt sich mit der Tatsache erklären, dass unterschiedliche Mengen an Lutein den Teilnehmern verabreicht wurde. In Abbildung 39 ist diese Korrelation zwischen der absoluten Bioverfügbarkeit gegen die verabreichte Lutein-Dosis gezeigt.

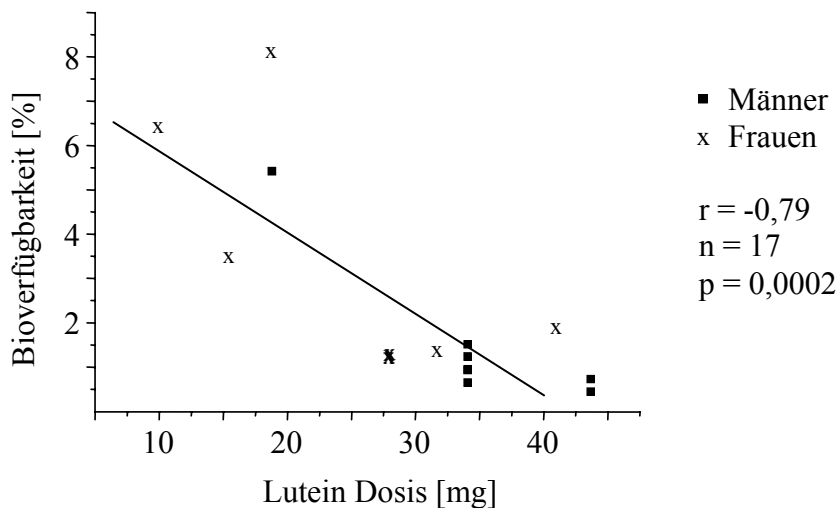


Abbildung 39: Korrelation zwischen der absoluten Bioverfügbarkeit von Lutein und der verabreichten Lutein Dosis.

Bei der Gabe einer großen Menge an Lutein zu einem Zeitpunkt nimmt die absolute Bioverfügbarkeit deutlich ab. Im Gegensatz dazu liegen bei der Aufnahme derselben Menge an Lutein die Werte für die absoluten Bioverfügbarkeiten enger beieinander.

verabreichte Lutein Dosis	absolute Bioverfügbarkeit	Anzahl der Probanden
18,8 mg	6,75% ± 1,87	2
27,9 mg	1,27% ± 0,06	4
34,1 mg	1,06% ± 0,33	5
43,7 mg	0,59% ± 0,19	2

Tabelle 10: Absolute Bioverfügbarkeiten für unterschiedliche Lutein-Dosen.

Daraus kann geschlossen werden, dass durch die Gabe von mehreren kleineren Dosen von Lutein eine bessere Bioverfügbarkeit des Carotinoids ermöglicht wird. Dieser Punkt ist für die Ernährung sehr wichtig, da mit solchen Informationen noch gezieltere Diäten entwickelt werden können.

5.5 Strukturermittlung von Staphyloxanthin aus *Staphylococcus aureus*

Im letzten Teil der Arbeit erfolgte die Strukturaufklärung von Staphyloxanthin aus *Staphylococcus aureus* mittels verschiedener NMR-spektroskopischer Experimente. Diese Projekt wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Friedrich Götz und Sascha Pelz von der Fakultät für Biologie und der Bruker BioSpin AG in Fällanden (Schweiz) durchgeführt.

Die charakteristische orange-gelbe oder „goldene“ Färbung des Bakterienstamms *Staphylococcus aureus* (lat. = gold) gab diesem auch den Namen. Das Hauptpigment, Staphyloxanthin konnte als ein β -D-glucopyranosyl-1-O-(4,4'-diaponeurosporen-4-ooat)-6-O-(12-methyltetradecanoat) identifiziert werden, indem die Glucose über 1''- und 6''- Position mit einer gesättigten Fettsäure (C₁₅) sowie einer Carbonsäure eines Carotinoids verknüpft ist (Abbildung 40). Marshall und Rodwell^[22] konnten bereits 1972 Staphyloxanthin als das Hauptpigment in *Staphylococcus aureus* identifizieren. Taylor und Davies stellten schließlich einige Jahre später fest, dass das Hauptxanthophyll von *Staphylococcus aureus* nicht die allgemeine Tetraterpenoid- (C₄₀) Carotenoidstruktur aufweist, sondern dass es sich um ein Triterpenoid (C₃₀) mit der Struktur 4,4'-diaponeurosporen-4-carbonsäure handelt.

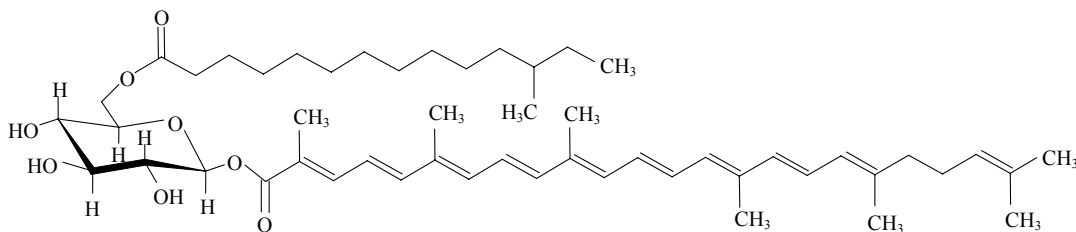


Abbildung 40: Struktur von β -D-glucopyranosyl-1-O-(4,4'-diaponeurosporen-4-ooat)-6-O-(12-methyltetradecanoat).

Die beobachtete Polarität bei der Aufreinigung des Carotinoids deutet auf eine glycosidische Struktur hin. Mittels ^1H -, ^{13}C sowie homo- und heteronuklearen 2D-Spektren konnte diese Vermutung untermauert werden, einschließlich der β -D-Konfiguration sowie die Verknüpfung der Glucose über Esterbindungen. Auf Grund der erheblichen Lichtempfindlichkeit der Carotinoide wurden alle Schritte der Extraktion, Isolierung sowie Strukturaufklärung unter Lichtausschluss durchgeführt.

5.5.1 NMR-spektroskopische Experimente

Zur Charakterisierung des Staphyloxanthins wurden eindimensionale wie auch zweidimensionale NMR-Experimente durchgeführt. Die eindimensionalen Verfahren umfassten ein ^1H - und ^{13}C -Experiment, der zweidimensionale Spektrensatz enthielt COSY-, TOCSY-, HSQC-, HSQC-TOCSY und HMBC-Experimente, sowie NOESY und ROESY-Spektren. Die NMR-Experimente wurden in Aceton- d_6 auf einem 700 MHz-NMR-Gerät mit Kryoplattform aufgenommen. Für eine bessere Strukturierung der NMR-Auswertung sollen die drei Strukturfragmente (Carotinoid, Glucose und Fettsäure) des Staphyloxanthins getrennt voneinander betrachtet werden.

Anhand des homonuklear korrelierten zweidimensionalen COSY-Spektrums wurden zunächst die Spinsysteme im olefinischen Bereich des Carotinoids betrachtet. Durch dieses Experiment ist es möglich Kopplungen über 2 bzw. 3 Bindungen ($^2J/{}^3J$) sichtbar zu machen. In einem komplizierten Spektrum erlauben die Kreuzsignale somit eine direkte Zuordnung benachbarter Protonen. Zusätzliche Informationen erbrachte schließlich das TOCSY-Experiment, da durch dieses Aufnahmeverfahren Korrelationen eines ganzen Spinsystems betrachtet werden können. Besonders das HSQC-TOCSY brachte viele Erkenntnisse bei der Aufklärung des Zuckerrestes, da über ^{13}C -chemische Verschiebungen und die zusätzliche Information der Korrelationspeaks zuzuordnen war, welches Proton zum Glucoserest gehört.

Die vollständige Bestimmung der Konnektivitäten und somit den wesentlichen Teil der Strukturbestimmung von Staphyloxanthin erbrachte das HMBC-Spektrum. Durch die heteronuklearen 3J - bis 5J -Kopplungen konnten zudem die durch das HSQC nicht bestimmbaren ^{13}C -chemischen Verschiebungen von quartären C-Atomen bzw. die der

Carboxylkohlenstoffe zugeordnet werden. Auf diese Weise war eine einfache Zuordnung der quartären Signale des Carotinoids, die sehr ähnliche chemische Verschiebungen aufweisen ($\delta(^{13}\text{C}) = 120 - 140 \text{ ppm}$), möglich. Die gesamten chemischen Verschiebungen sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Die Bestimmung der relativen Konfiguration, also die Bestimmung der Verknüpfungspunkte der Zuckereinheit, erfolgte mit Hilfe von NOESY- und ROESY-Spektren.

5.5.1.1 Interpretation der Carotinoidteilstruktur

Grob kann das ^1H -NMR-Spektrum in drei Abschnitte unterteilt werden, einen Hochfeldbereich zwischen 0,87 und 2,14 ppm, mit den aliphatischen Methylgruppen, einem mittleren Verschiebungsbereich zwischen 3,74 und 5,69 ppm, der dem Zuckerbereich entspricht und einen Tieffeldbereich zwischen 5,99 und 7,33 ppm, der dem olefinischen Teil des Carotinoids zugeordnet werden kann.

Das ^1H -NMR-Spektrum von Staphyloxanthin (Abbildung 41, Tabelle 11, die angegebenen Verschiebungswerte beziehen sich auf die Messung in Aceton- d_6) zeigt die Signale eines Polyensystems (13 olefinische Protonen im Bereich von $\delta = 5,99 - 7,33 \text{ ppm}$) mit Kopplungskonstanten $^3J_{H,H} = 11,1 - 15,0 \text{ Hz}$, welche für eine *trans*-Anordnung der Doppelbindungen sprechen. Das Signal bei $\delta = 5,15 \text{ ppm}$ stammt von einem Proton an einer isolierten Doppelbindung und ist aus diesem Grund im Gegensatz zu den anderen olefinischen Protonen des Carotinoids hochfeldverschoben. Auf Grund seiner aliphatischen Nachbarprotonen 3'a und 3'b ist das Signal zu einem Multiplett aufgespalten. Das Proton H_2 ($\delta(^1\text{H}) = 7,33 \text{ ppm}$) ist durch die Nähe zur Carboxylgruppe tieffeldverschoben und in ein Dublett mit $^3J_{\text{H}_2,\text{H}_3} = 11,5 \text{ Hz}$ aufgespalten. Des Weiteren gibt es im aliphatischen Bereich ($\delta(^1\text{H}) = 1,63 - 2,06 \text{ ppm}$) 7 Singulets, die von Methylgruppen des Carotinoids stammen. Die endständigen Methylgruppen ($12'\text{-CH}_3$ und $13'\text{-CH}_3$) sind im Gegensatz zu den Methylgruppen in der Carotinoidkette leicht hochfeldverschoben und besitzen auf Grund ihrer verschiedenen chemischen und magnetischen Umgebung die gleiche ^{13}C -chemische

Verschiebung ($\delta(^{13}\text{C}) = 16,8 \text{ ppm}$), jedoch eine unterschiedliche Verschiebung im ^1H -NMR ($\delta(^1\text{H}) = 1,63; 1,68 \text{ ppm}$).

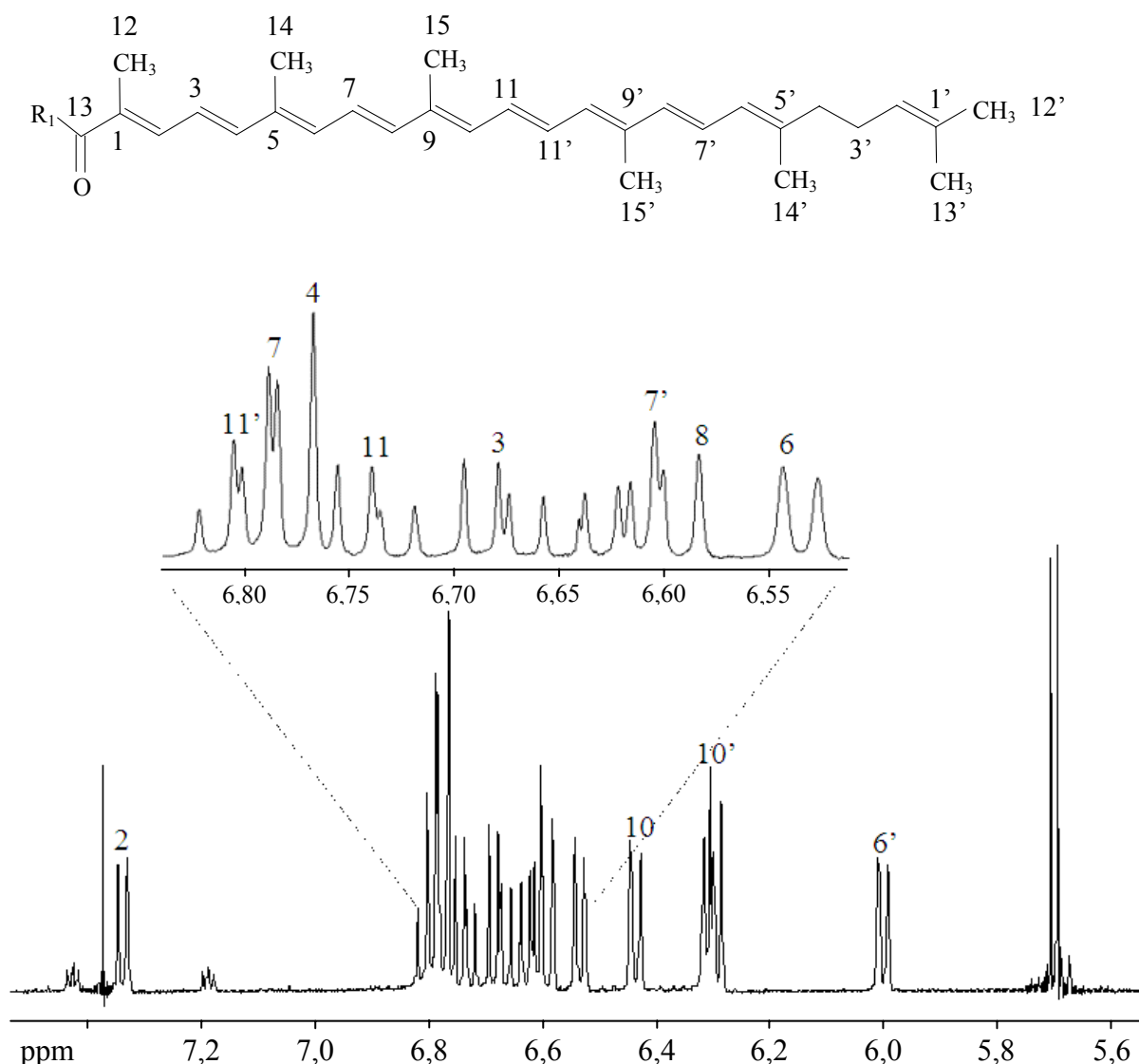


Abbildung 41: Olefinischer Teil des ^1H -NMR-Spektrums von Staphyloxanthin.

In Abbildung 42 ist der olefinische Bereich des $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY-Spektrums vergrößert dargestellt. Alle Außerdiagonalpeaks, die sogenannten cross peaks, stellen homonukleare Spin-gekoppelte Protonen dar (also die Information, welche aus der Multiplizität der jeweiligen Signale im 1D ^1H -NMR ersichtlich ist). Durch die Untersuchung der Kreuzpeaks konnte den olefinischen Signalen aus dem ^1H -NMR, Spinsysteme im COSY- und TOCSY-Spektrum zugeordnet werden und somit die Korrelationen im Carotinoidteil aufgeklärt werden.

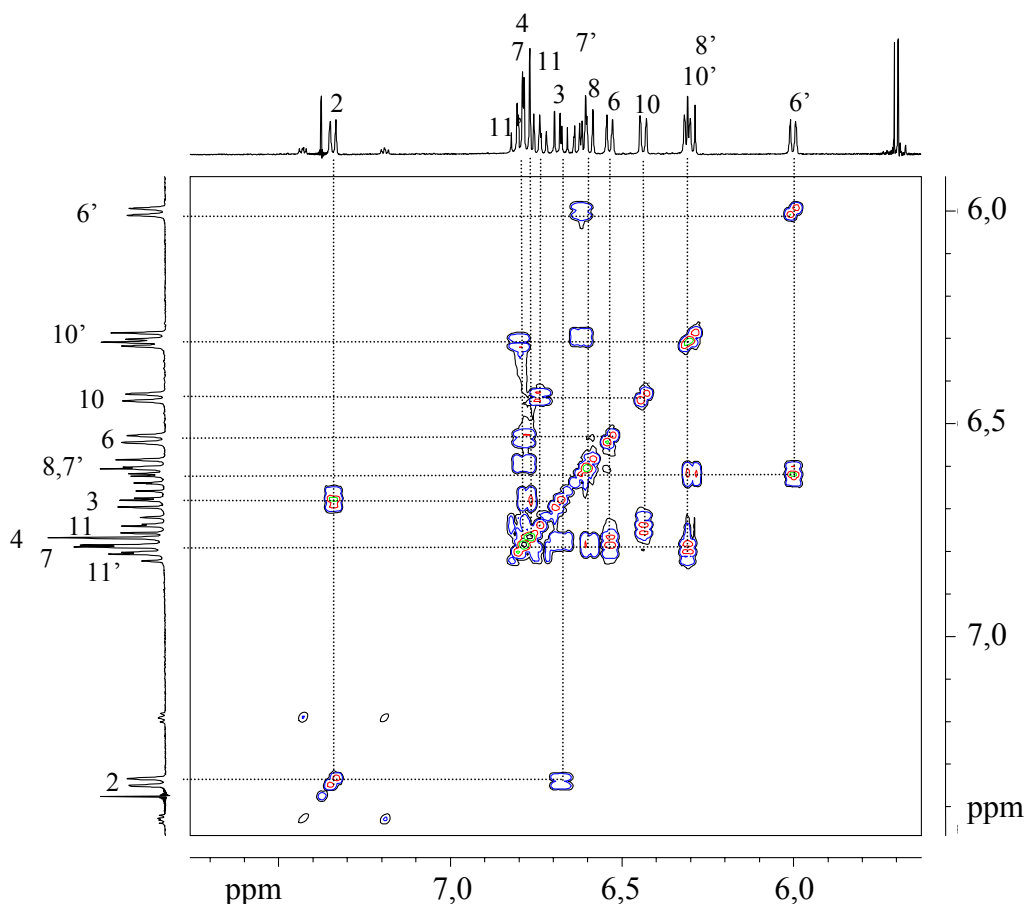


Abbildung 42: Olefinischer Teil des $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrums von Staphyloxanthin.

Mit Hilfe des HSQC-Spektrums (Abbildung 43) konnten schließlich die ^1H - ^{13}C -chemischen Verschiebungen der bereits aus dem $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrum erhaltenen Protonen zugeordnet werden. Es konnten alle ^1H - ^{13}C -Kontakte dem HSQC-Spektrum entnommen (s. Tabelle 11) und den entsprechenden ^1H -chemischen Verschiebungen zugeordnet werden. Geht man bei der Analyse von ^1H -Resonanzen aus, so kann man über die Korrelationspeaks problemlos die entsprechenden ^{13}C -Resonanzen ermitteln. Einige der Signale zeigten sehr ähnliche ^1H -chemische Verschiebungen, konnten aber auf Grund der unterschiedlichen ^{13}C -Signale eindeutig zugeordnet werden. Zusätzlich zu den schon bekannten Signalen aus den $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY- und TOCSY-Spektren konnten zusätzlich noch die ^{13}C -chemischen Verschiebungen der Methyl-Gruppen ($\delta(^1\text{H}) = 1,99 - 2,07 \text{ ppm} / \delta(^{13}\text{C}) = 11,2 - 11,9 \text{ ppm}$) ermittelt werden.

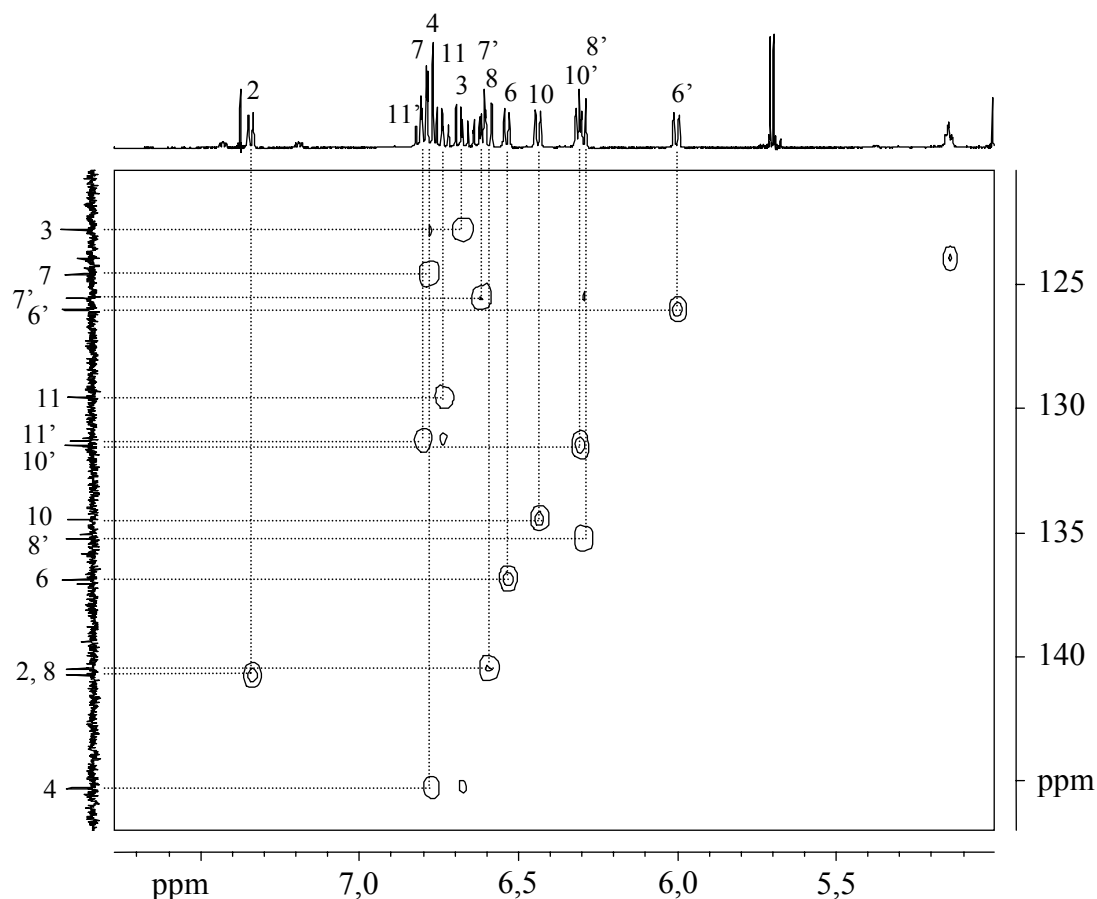


Abbildung 43: Olefinischer Teil des HSQC-Spektrums von Staphyloxanthin.

Die vollständige Bestimmung der Konnektivitäten und somit den wesentlichen Anteil an der Strukturbestimmung erbrachte das HMBC-Spektrum (Abbildung 44). Anhand der heteronuklearen 3J - bis 5J -Kopplungen konnten die durch das HSQC nicht bestimmbaren ^{13}C -chemischen Verschiebungen von quartären bzw. des Carboxylkohlenstoffs ($\delta(^{13}\text{C}) = 165,8 \text{ ppm}$) festgelegt werden und die Position der einzelnen olefinischen Protonen im Molekül eindeutig durch die Korrelationen zu den quartären Kohlenstoffatomen bestimmt werden. Durch die Bestimmung der chemischen Verschiebung des Carboxylkohlenstoffes ($\delta(^{13}\text{C}) = 165,8 \text{ ppm}$) und die Betrachtung seiner Korrelationen war auch die Verknüpfung der Glucose mit dem Carotinoid in 1''-Position möglich.

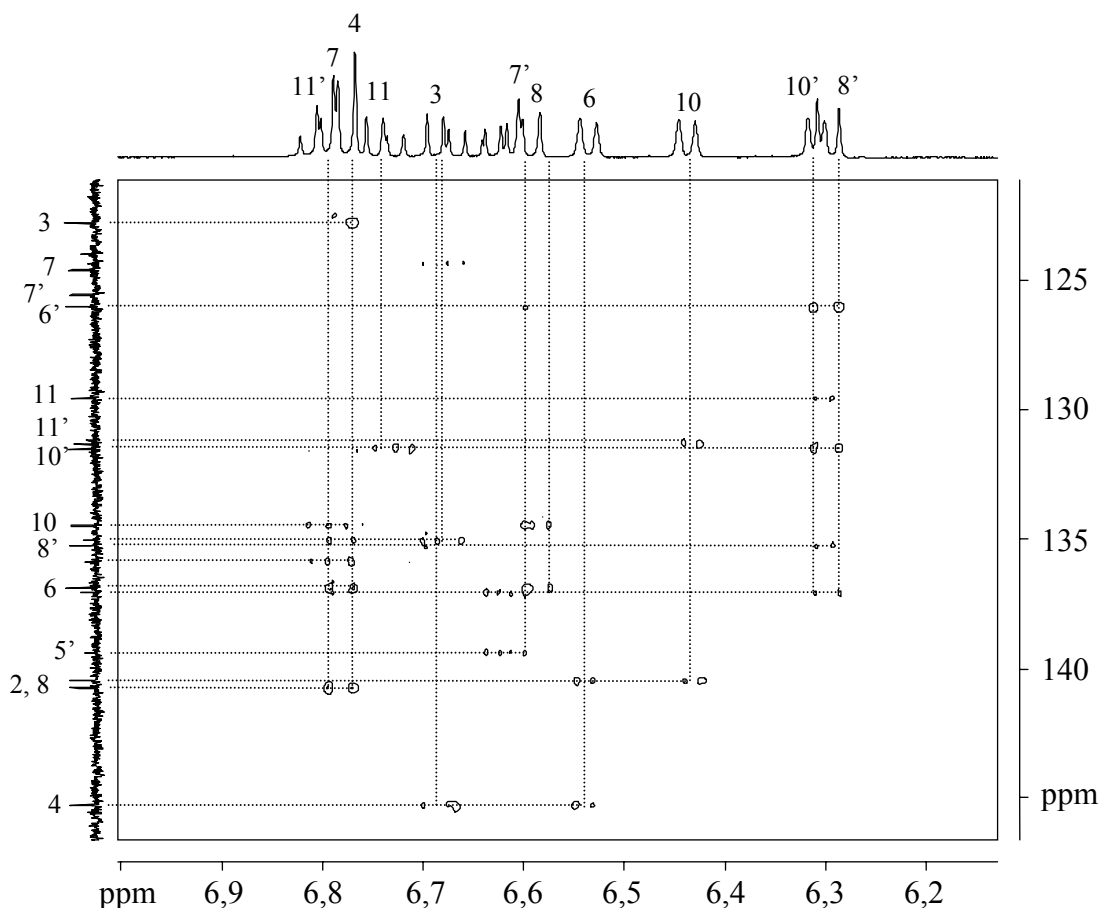


Abbildung 44: Olefinischer Teil des HMBC-Spektrums von Staphyloxanthin.

5.5.1.2 Interpretation der Zuckerteilstruktur

Glycoside kommen in der Natur häufig vor, D-Zucker kommen in der Regel β -glycosidisch gebunden, L-Zucker hingegen meist α -glycosidisch gebunden vor. 1976 postulierte Gerard P. Moss^[186] eine α -D-Glucose für das Glycosid des Staphyloxanthins. Nun sollte mit Hilfe der NMR dieser Strukturvorschlag bewiesen werden.

Für die Interpretation wurde zunächst der für Zucker typische Verschiebungsbereich näher betrachtet. Die Protonen des Glycosids weisen im ^1H -NMR (Abbildung 45) einen Verschiebungsbereich von 3,52 bis 5,69 ppm auf. Eine exakte Zuordnung der Signale des Zuckers erfolgte über die Auswertung sowohl ein- wie auch zweidimensionaler Spektren. Im COSY-Spektrum (Abbildung 46) treten insgesamt 5 Spinsysteme auf, die dem Zuckerbereich zugeordnet werden können. Das anomere

Proton ist auf Grund seiner Nähe zum Sauerstoff tieffeldverschoben $\delta (^1\text{H}) = 5,69$ ppm.

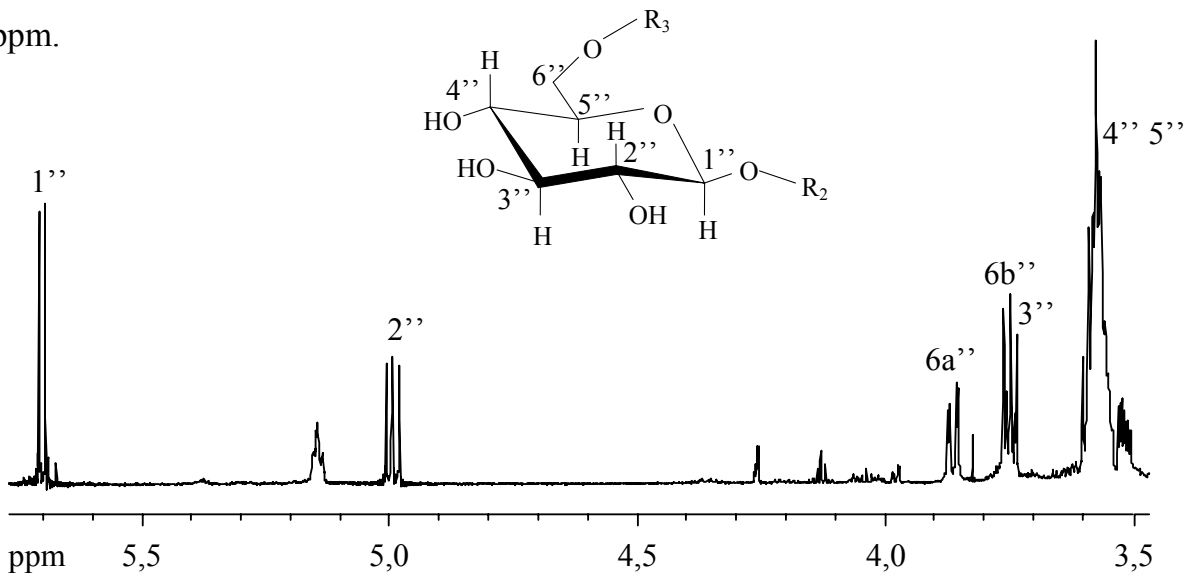


Abbildung 45: Zuckerbereich des ^1H -NMR-Spektrums von Staphyloxanthin.

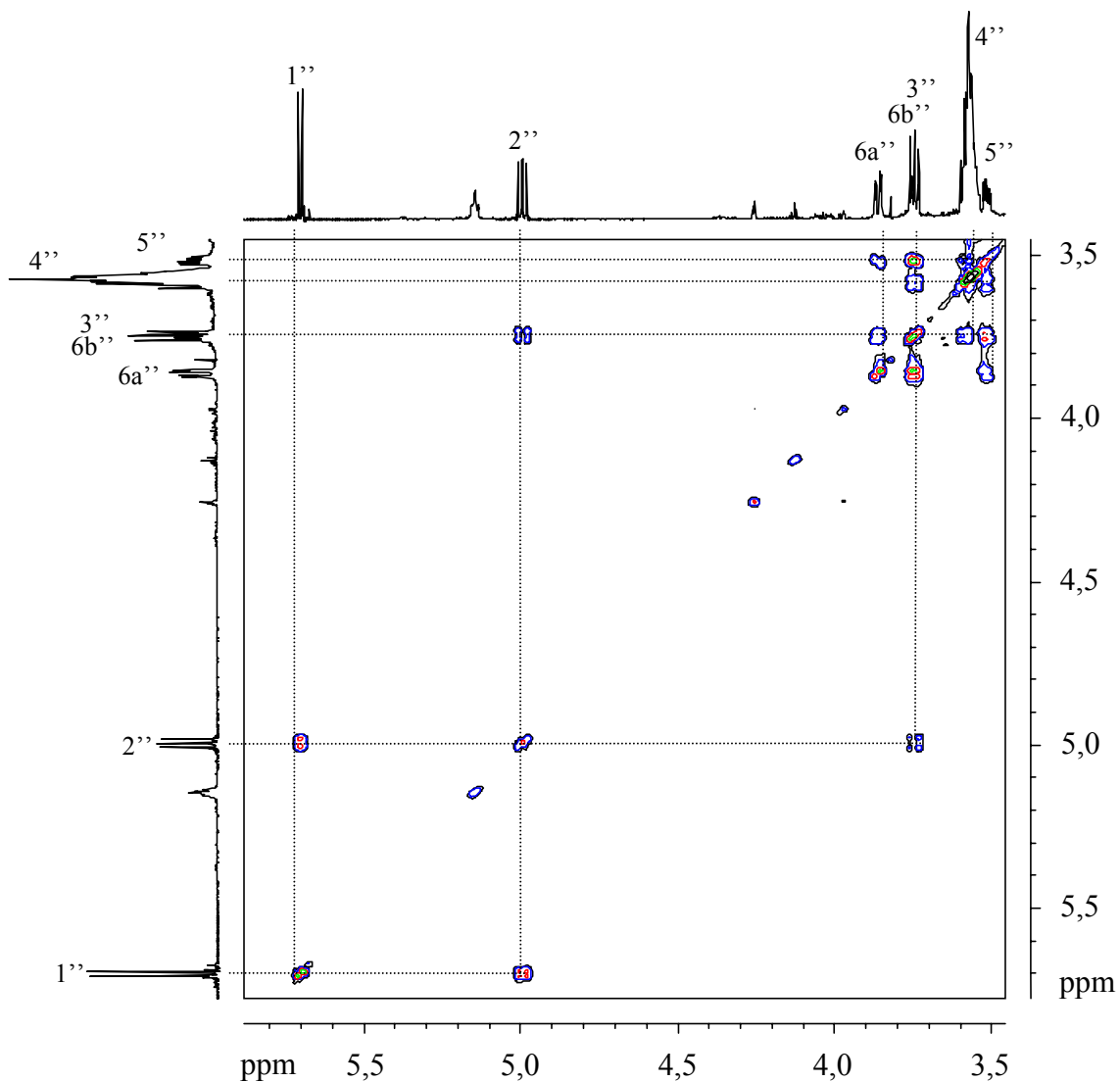


Abbildung 46: Zuckerbereich des $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrums von Staphyloxanthin.

Mit dem HSQC-Spektrum wurden die ^{13}C -chemischen Verschiebungen der aus dem COSY und TOCSY charakteristischen Protonen des Zuckerbereichs zugeordnet. Es konnten alle ^1H - ^{13}C -Kontakte dem HSQC-Spektrum entnommen werden (s. Tabelle 11). Das Signal bei $\delta(^{13}\text{C}) = 61,3$ ppm ist entartet. So besitzen die Protonen am C_6'' des Zuckers auf Grund ihrer unterschiedlichen chemischen und magnetischen Umgebung zwar die gleiche ^{13}C -chemische Verschiebung von $\delta(^{13}\text{C}) = 61,3$ ppm aber eine unterschiedliche ^1H -chemische Verschiebung $\delta(^1\text{H}) = 3,74/3,84$ ppm. Die ^{13}C -chemische Verschiebung von $\delta(^{13}\text{C}) = 92,6$ ppm des anomeren Kohlenstoffatoms weist auf eine D-Glucose hin, was aber durch die Betrachtung der Kopplungskonstanten belegt werden muss.

Die Bestimmung der Stereochemie der Hydroxylgruppen der Zuckereinheit erfolgte aus dem ^1H -NMR-Spektrum. Im Falle des Zuckers sind vicinale diaxiale Kopplungen sehr viel größer als axial, äquatoriale oder äquatorial, äquatoriale Kopplungen. Die Größe dieser Kopplungen ist wichtig bei der Bestimmung der Stereochemie der OH-Gruppen, die dazu dient, den Zuckertyp genau festzulegen. In unserem Falle konnte die β -D-Glucose identifiziert werden. Es gibt zwei gleich große ($\text{H}_{2''} - \text{H}_{3''}$ und $\text{H}_{2''} - \text{H}_{1''}$) Kopplungen mit jeweils 8,4 Hz. Im Falle einer α -D-Glucose hätte die Kopplung 3J der Protonen $\text{H}_{1''}$ und $\text{H}_{2''}$ einen Wert von 1 bis 4 Hz.

Die Bestimmung der relativen Konfiguration, also die Bestimmung der Verknüpfungspunkte der Zuckereinheit erfolgte mit Hilfe von NOESY- und ROESY-Spektren.

5.5.1.3 Interpretation der Fettsäureteilstruktur

Abschließend erfolgt noch die Bestimmung des Fettsäurerestes (Abbildung 47), welcher an den Zucker in Position $6''$ gebunden ist. Da die Bestimmung der Fettsäure nur mit NMR-Daten nicht zu einem eindeutigen Ergebnis führte wurde noch zusätzlich eine GC/MS Untersuchung durchgeführt. Eine alkalische Hydrolyse von Staphyloxanthin führte zum polarerem Glycosid sowie der freien Fettsäure. Mit Hilfe der MS-Auswertung konnte die Fettsäure als 12-Methyltetradecansäure (C_{15}) identifiziert werden.

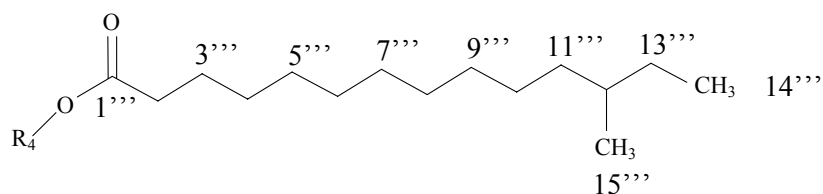


Abbildung 47: Struktur des Fettsäurerestes (12-Methyltetradecansäure) von *Staphyloxanthin*.

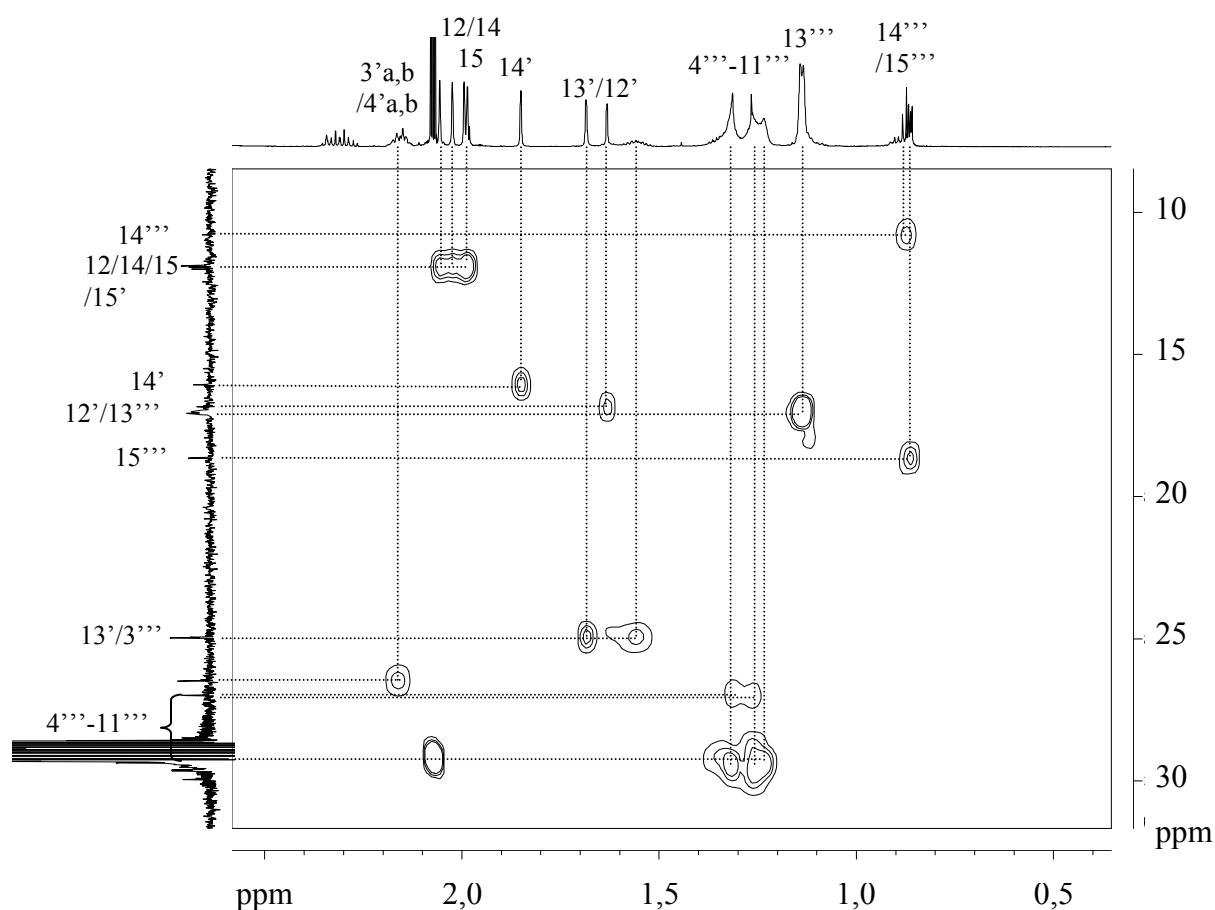


Abbildung 48: Fettsäureteil des HSQC-Spektrums von *Staphyloxanthin*.

Die Auswertung des aliphatischen Bereich des HSQC-Spektrums (Abbildung 48) bestätigt dieses Ergebnis. Die ^1H - und ^{13}C -Signale der Methylen-Gruppen $4'''$ bis $11'''$ des Fettsäurerestes sind chemisch und magnetisch so ähnlich, dass sie jeweils zu einer Signalgruppe zusammenfallen und nicht sauber aufgelöst werden können. Nur die Methylen-Gruppen $2'''$, $3'''$ und $13'''$ sowie die zwei endständigen Methylgruppen $14'''$ und $15'''$ besitzen unterschiedliche chemische Verschiebungen. Weiterhin können in diesem Teilspektrum auch die Methylgruppen des Carotinoidteils eindeutig zugeordnet werden.

	Position	$^1\text{H } \delta$ (ppm)	$^{13}\text{C } \delta$ (ppm)	Kopplungskonstanten J (Hz)
Carotinoid	1	---	124,3	---
	1'	---	165,8	---
	2	7,33	140,7	$J_{2/3} = 11,5$
	2'	5,15	123,9	n.b.
	3	6,67	122,7	$J_{3/2} = 11,5$
	3'a,b	2,16	26,5	n.b.
	4	6,77	145,2	$J_{4/3} = 11,9$
	4'a,b	2,14	40,0	---
	5	---	134,9	---
	5'	---	139,5	---
	6	6,53	136,8	$J_{6/7} = 11,6$
	6'	5,99	125,9	$J_{6'/7'} = 11,1$
	7	6,78	124,5	$J_{7/8} = 11,6$
	7'	6,62	125,5	$J_{7'/6'} = 11,1$
	8	6,59	140,7	$J_{8/7} = 11,7$
	8'	6,28	135,1	$J_{8'/7'} = 14,9$
	9	---	135,9	---
	9'	---	126,1	---
	10	6,43	134,4	$J_{10/11} = 11,4$
	10'	6,30	131,5	$J_{10'/11'} = 11,4$
	11	6,73	129,5	$J_{11/11'} = 11,6$
	11'	6,80	131,2	$J_{11'/11} = 11,6$
	12	1,98	11,9	---
	12'	1,63	16,8	---
	13	---	165,8	---
13'	1,68	24,8	---	
14	2,06	11,8	---	
14'	1,85	16,0	---	
15	2,02	11,8	---	
15'	1,99	11,2	---	
Zucker	1''	5,69	92,6	$J_{1''/2''} = 8,4$
	2''	4,99	72,9	$J_{2''/3''} = 8,4$
	3''	3,76	74,5	$J_{3''/4''} = 9,2$
	4''	3,58	70,3	$J_{4''/5''} = 7,0$
	5''	3,52	77,7	$J_{5''/6a''} = 2,7$ $J_{5''/6b''} = 5,11$
	6''a,b	3,74/3,84	61,3	$J_{6a''/6b''} = 12,1$
Fettsäure	1'''	---	172,5	---
	2'''	2,32	33,8	n.b.
	3'''	1,55	24,9	n.b.
	4'''-11'''	1,26-1,31	26,1-29,6	n.b.
	12'''	1,31	34,2	n.b.
	13'''	1,24/1,31	29,4	n.b.
	14'''	0,87	10,7	n.b.
	15'''	0,87	18,6	n.b.

Tabelle 11: ^1H - und ^{13}C -NMR Verschiebungswerte δ sowie Kopplungskonstanten von *Staphyloxanthin* in Aceton- d_6 . (n.b. - nicht bestimmbar)

6 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die gezielte Verwendung von direktgekoppelten Analysensystemen die Beantwortung von sehr komplexen biomedizinischen Fragestellungen ermöglicht. Dabei stellt vor allem die Miniaturisierung der HPLC-NMR-Kopplung zur chromatographischen Trennung und Detektion von sehr kleinen Probenmengen oder geringen Analytmengen in der Probe einen bedeutenden Fortschritt in der instrumentellen Analytik dar. Das für die Bioverfügbarkeitsstudie eingesetzte partiell deuterierte Lutein hingegen zeigt neue Wege und Möglichkeiten auf dem Gebiet klinischer Studien.

Die reproduzierbare Herstellung von effizienten Kapillartrennsäulen (250 µm I.D.) stand vor allem am Beginn der Arbeit im Vordergrund. Neben der Optimierung des Slurry-Packprozesses auf die verwendete C₃₀-Trennphase wurde auch eine stabile und universell einsetzbare Endfitting-Technik entwickelt. Durch diese Optimierungen war es nun möglich Kapillartrennsäulen mit einer gleichbleibenden Qualität selber herzustellen, was maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug. Die gepackten Kapillartrennsäulen zeigten im Vergleich zu klassischen HPLC-Trennsäulen gleichwertige und sogar bessere Trenneigenschaften (Trennstärke, Effizienz).

Die Bestimmung von Kenngrößen wie z.B. der Nachweisgrenze, die Breite der NMR-Signale oder die Bandenverbreiterung durch Diffusionseffekte des gekoppelten miniaturisierten Systems stand ebenfalls zu Beginn der Untersuchungen im Mittelpunkt. Die erhaltenen Werte mit Standardsubstanzen deuteten darauf hin, dass die Untersuchung, Detektion und Strukturbestimmung von mengenmäßig limitierten Analyten aus komplexen biologischen Proben theoretisch möglich sein sollte. Die NMR-spektroskopische Detektion von jeweils weniger als 100 ng (all-E) Lutein und (all-E) β-Carotin aus einem Standard und später aus 0,5 g Spinat zeigte eindrucksvoll, dass dies auch in der Praxis mit realen Proben umgesetzt werden konnte.

Auch der Einsatz des Mikroprobenkopfes ohne on-line HPLC-Kopplung bietet vielfältige Möglichkeiten. So konnten die Strukturen von partiell deuterierten Carotinoiden aus intrinsisch markiertem Gemüse aus nur 0,5 g Probe bestimmt werden. Es zeigte sich, dass die Deuteriumatome gleichmäßig im Molekül eingebaut wurden, unabhängig vom Carotinoid und vom Deuterierungsgrad. Die Deuterierung

der Carotinoidmoleküle während der Biosynthese liefert somit ein vollkommen anderes Ergebnis als die Deuterierung im Syntheselabor. Diese Strukturinformation ist vor allem für klinische Studien von Interesse, wo die Carotinoide unter anderem auf ihre Bioverfügbarkeit hin untersucht werden sollten.

Neben der cHPLC-NMR-Kopplung zur Strukturaufklärung von Carotinoiden kam die HPLC-MS/APCI-Kopplung zur Detektion von geringsten Carotinoidkonzentrationen in Serum zum Einsatz. Die MS-Kopplung wurde in einer klinischen Studie zur Bestimmung der absoluten Bioverfügbarkeit von Lutein aus Spinat eingesetzt. Zusammen mit der Verwendung von partiell deuteriertem Lutein war es möglich zwischen dem supplementierten Lutein und dem endogenen Serum-Lutein zu unterscheiden. Die Quantifizierung der unterschiedlichen Massenspuren erlaubte die eindeutige Bestimmung der Anreicherung des markierten Luteins im Serum in Abhängigkeit von der Zeit. Mit Hilfe dieser Ergebnisse konnten die absoluten Bioverfügbarkeiten für die Teilnehmer der Studie berechnet werden. Die erhaltenen Werte liegen zwischen 0,5% und 8% und zeigen eine lineare Abhängigkeit mit der Luteinmenge in der Spinatdosis. Um die erhaltenen Werte besser einordnen zu können, sollten noch weitere Studien auch mit anderen Carotinoiden durchgeführt werden. Die Ergebnisse aus diesen Studien sind sowohl für die pharmazeutische als auch für die Lebensmittelindustrie interessant, da Carotinoide sehr oft als Wirk- oder Zusatzstoffe zu verschiedensten Produkten beigegeben werden.

Die Entwicklung von kryogenen Probenköpfen stellt neben den solenoiden Mikroprobenköpfen eine weitere Möglichkeit dar, geringe Analytmengen NMR spektroskopisch zu untersuchen. Die Strukturaufklärung von Staphyloxanthin aus *Staphylococcus aureus* wurde mittels einer solchen kryogenen Plattform durchgeführt. Die bereits seit längerer Zeit postulierte Molekülstruktur konnte nun eindeutig bestimmt werden. Dabei zeigte sich, dass die angenommene α -Konfiguration des Zuckers nicht mit den erhaltenen NMR-Daten übereinstimmte. Die Kopplungskonstante des anomeren Protons lag bei 8,4 Hz, was eindeutig auf einen β -Zucker hinweist.

In näheren Zukunft werden beide Probenkopffentwicklungen immer unverzichtbarer, um geringe Analytmengen zu detektieren und zu analysieren. Weiterhin wird es

sicherlich auch zu einem vermehrten Einsatz beider Techniken in der Forschung und Entwicklung von großen pharmazeutischen Firmen kommen.

Die Weiterentwicklung von solenoiden Probenköpfen erfolgt zum einem auf dem Gebiet der direkten Detektion von ^{13}C -Kernen, aber auch von ^{15}N -Kernen und ^{19}F -Kernen, sowie bei der parallelen Detektion in einem Probenkopf. Vor allem eine Sensitivitätssteigerung bei der ^{13}C -NMR-Detektion ist für die Strukturaufklärung von Interesse, da diese Informationen bei sehr komplexen Molekülen meist unerlässlich sind. Neben der geringen natürlichen Häufigkeit der ^{13}C -Atome sind auch die im Vergleich zu den Protonen längeren Relaxationszeiten ein Nachteil bei der direkten Detektion. Diese Probleme können zum Beispiel durch den Einsatz größerer Detektionsvolumina und Relaxationszeit-verkürzender Gadoliniumchelate^[187] gelöst werden. Erste Arbeiten im Arbeitskreis mit den Gadoliniumchelaten zeigten, dass eine continuous-flow ^{13}C -NMR-Detektion, möglich ist. Für die Industrie ist natürlich nicht nur die continuous-flow ^{13}C -NMR-Detektion sondern auch die continuous-flow ^1H -NMR-Detektion von Interesse, da sich dadurch der Probendurchsatz deutlich steigern und die benötigte Analysenzeit reduzieren lässt. Durch die parallele NMR Detektion kann der Probendurchsatz noch einmal drastisch erhöht werden. Zunächst werden dafür zwei getrennte Messspulen in einem Probenkopf positioniert. Langfristig ist jedoch geplant bis zu 16 getrennte Messspulen zu verwenden. Durch die räumliche Nähe bei dieser großen Anzahl an Messspulen im Probenkopf muss darauf geachtet werden, dass es zu keiner gegenseitigen Beeinflussung der einzelnen Spulen untereinander kommt.

Ein weiteres Einsatzgebiet der Mikroprobenköpfe ist das Reaktion-Monitoring zur Aufklärung von Reaktionsmechanismen in der organischen Synthese. In ersten Versuchen konnte gezeigt werden, dass durch die gesteigerte Sensitivität eine continuous-flow ^1H -NMR-Detektion ohne weiteres möglich ist. Durch ein angepasstes Probenkopfdesign sollte es möglich sein auch kurzlebige Zwischenstufen zu detektieren und somit ein besseres Verständnis von bestimmten Reaktionen zu erlangen.

7 Experimenteller Teil

7.1 Geräte

7.1.1 HPLC- und Kapillar-HPLC-Anlagen

HPLC-Anlagen:

Agilent HPLC-Systeme der Serie HP 1100 mit einer binären Pumpe, Degaser, Säulenofen und UV- bzw. DAD-Detektor (Agilent Technologies, Waldbronn). Als Steuerungssoftware diente HyStar NT 2.0 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) bzw. Agilent ChemStation.

Kapillar-HPLC-Anlagen:

Waters modulare, ternäre und splitlose Kapillar-HPLC-Pumpe (Waters, Milford, MA, USA) mit einem Vici Cheminert 1004-1 Injektionsventil (Vici AG, Schenk, Schweiz) und einem Bischoff Lambda 1010 UV-Detektor (Bischoff Analysentechnik und -geräte GmbH, Leonberg). Als Steuerungssoftware wurde HyStar NT 2.3.b74 verwendet.

Eldex MicroPro splitlose binäre Spritzenpumpe (Eldex Laboratories, Napa, CA, USA) mit Knauer UV-Detektor K-2500 (Knauer GmbH, Berlin-Zehlendorf) und Mikro-Injektionsventil (Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA, USA) mit externem fused-silica Injektionsloop. Als Software wurde ChromStar 5.03 (SCPA GmbH, Stuhr) eingesetzt.

7.1.2 Herstellung von Kapillartrennsäulen

Zum Slurry-Packen wurde eine pneumatische HPLC-Pumpe (Knauer GmbH, Berlin-Zehlendorf) an eine 1 mm I.D. HPLC-Leersäule gekoppelt, an welches die zu packenden fused-silica Kapillarsäulen (100 - 250 μm I.D., Polymicro Technologies, Phoenix, USA) befestigt wurden. Als Endfittings dienten ein Valco zero-dead-volume union ZU1C mit einer Stahlfilterscheibe 2SR1 und einem Graphit-Ferrule FS1.4-5 (Vici AG Valco Int., Schenk, Schweiz). Es werden 20 mg stationäre Phase in 300 μl

Tetrachlorkohlenstoff suspendiert und für 10 min im Ultraschallbad homogenisiert. Dieser Slurry wird in das 1 mm I.D. Slurry-Gefäß transferiert und mit einem initialen Druck von 400 bar mittels einer mobilen Packphase aus MeCN : H₂O = 70 : 30 in die Kapillarsäule gepresst. Innerhalb von 5 min wird der Druck auf 650 bar erhöht und dieser Enddruck für 30 min gehalten. Nach Abklingen des Drucks wird die gefüllte Kapillare entfernt, auf die gewünschte Länge (meist 15 cm) gekürzt und auch am späteren Einlass mit einem Endfitting versehen.

7.1.3 Massenspektrometer

Bruker Esquire 3000plus Ion Trap LC/MS⁽ⁿ⁾-System (Bruker Daltonik, Bremen) mit APCI Interphase unter Verwendung der Bruker Daltonics Esquire NT 4.0 Steuersoftware und Data Analysis 2.0 Software (Bruker Daltonik, Bremen).

7.1.4 NMR-Spektrometer

Die Röhrenmessungen mit einem 5 mm Probenkopf und die on- und off-line Mikroprobenkopf-NMR-Kopplungsexperimente wurden an einem Bruker AMX 600 Spektrometer (Magnetfeldstärke 14,1 Tesla, Protonenresonanzfrequenz 600,13 MHz, Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten) durchgeführt. Als Mikroprobenkopf diente ein inverser ¹H/¹³C-Mikrodurchflussprobenkopf mit 1,5 µl aktivem Detektionsvolumen in solenoider Konfiguration (Protasis Corp., Marlboro, MA, USA). Für die Kapillar-HPLC-NMR-Kopplung wurde dieser NMR-Probenkopf über eine 3 m lange, 50 µm I.D. Transferkapillare mit dem Auslaß des UV-Detektors verbunden. Für die stopped-flow NMR-Experimente wurde ein NMR Peak Parking Ventil vor dem Injektionsventil verwendet. Das NMR-Gerät wurde über eine O2-Workstation (Silicon Graphics) mit XWINNMR-Software (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) gesteuert. Die Datenauswertung erfolgte am PC mit 1D und 2D WINNMR oder XWINNMR 3.0 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen).

Die Messungen zur Strukturaufklärung von Staphyloxanthin wurden an einem Bruker 700 MHz UltraShield Spektrometer (Magnetfeldstärke 16,44 Tesla, Protonenresonanzfrequenz 700,13 MHz, Bruker BioSpin AG, Fällanden, Schweiz) bei der Bruker BioSpin AG in Fällanden, Schweiz, durchgeführt. Als Probenkopf diente

ein $^1\text{H}\{^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\}$ CryoProbe mit Z-Gradient (700 MHz 5 mm TXI H-C/N, Bruker BioSpin AG, Fällanden, Schweiz). Das NMR-Gerät wurde über einen PC mit XWINNMR-Software (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) gesteuert. Die Datenauswertung erfolgte in Tübingen am PC mit XWINNMR 3.0 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen).

7.2 Chemikalien

HPLC-reine Lösungsmittel:

Aceton, Tetrachlorkohlenstoff, Chloroform, *tert*-Butylmethylether und Acetonitril (alle LiChrosolv, Merck, Darmstadt) für Messungen in Tübingen, sowie Chloroform, Methanol, Ethanol, *n*-Hexan, Tetrahydrofuran und *tert*-Butylmethylether (alle JT Baker, Phillipsburg, USA) für Messungen in Boston. Wasser wurde jeweils über ein Milli-Q Reinigungssystem (Millipore, Billerica, MA, USA) aufbereitet.

Deuterierte Lösungsmittel:

Für die Kapillar-HPLC-NMR-Kopplung wurde Aceton- d_6 , Acetonitril- d_3 , Dichlormethan- d_2 , Chloroform- d_1 und Deuteriumoxid (alle von Deutero, Kastellaun) verwendet.

Carotinoid-Standards:

(all-E) β -Carotin (Fluka, Taufkirchen) und (all-E) Lutein, (all-E) Zeaxanthin, (all-E) Canthaxanthin, (all-E) Lycopin, $^2\text{H}_8$ (all-E) β -Carotin (BASF AG, Ludwigshafen)

Stabilisator:

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

MSPD-Sorbensmaterial:

Isolute MSPD C₁₈ (EC) (Separtis, Grenzach-Wyhlen)

7.3 Probenvorbereitung und Extraktion

7.3.1 Carotinoid-Standards

Für die Kapillar-HPLC-UV-Messungen wurden je 0,5 mg pro Carotinoid in 1 ml Aceton gelöst und für die Kapillar-HPLC-NMR-Messungen in Aceton-d₆. Zur Verbesserung der Löslichkeit wurde bei (all-E) Canthaxanthin, (all-E) β -Carotin und (all-E) Lycopin noch ein Tropfen Dichlormethan bzw. Dichlormethan-d₂ beigegeben. Von den Einzelstandards wurden anschließend je 100 μ l entnommen und zu einer Standardmischung vereinigt mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml.

7.3.2 Zucht von intrinsisch markiertem Gemüse und Extraktion der Carotinoide

Der Spinat (Sorte Melody), die Karotten (Sorte Cultivar Lucky BF Hybrid) und der Kohl (Sorte Grandsimpson und Bluemax) wurden am USDA/ARS Childrens Nutrition Research Center in Houston, USA, von Prof. M. A. Grusak in einer Nährlösung, die mit 15 bzw. 25 Atom-% (Spinat), 30 Atom-% (Karotten) und 25 Atom-% (Kohl) deuteriertem Wasser angereichert war, hydroponisch angebaut. Dabei wurden die Pflanzen in einem, der natürlichen Umwelt nachempfundenen Gewächshaus mit einem zwölfstündigen Tag bei 20°C und einer gleich langen Nacht bei 15°C sowie einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70% gezüchtet.

Die Pflanzen wurden aus den Samen auf Filterpapier zum Keimen gebracht und anschließend in Polyethylen-Töpfen gefüllt mit Polyethylen-Kügelchen zur Stabilisierung eingepflanzt. Dort wurden sie in der Nährlösung unter ständiger Belüftung des Nährmediums zur besseren Sauerstoffzufuhr der Wurzeln und unter Begasung der Pflanzen mit CO₂ gezüchtet. Nach etwa fünf Wochen wurden die Gemüsepflanzen geerntet und unter Kühlung an das HNRC der Tufts University in Boston, USA, gesendet.

Der Spinat und der Kohl für die Supplementierungsstudie wurde dort gereinigt, gewogen, zerkleinert und für fünf Minuten in heißem Wasser blanchiert. Anschließend wurde der Spinat und der Kohl püriert, portioniert und bis zur Verwendung bei -80°C

tiefgefroren. Für die Bestimmung der Deuterierungspositionen der Carotinoide in Tübingen wurden die Karotten und der Spinat nur gereinigt, zerkleinert und bis zur Analyse bei -30°C gelagert.

Zur Extraktion der deuterierten Carotinoide aus dem intrinsisch markierten Gemüse wurden zwei unterschiedliche Techniken verwendet. Für die Studien an der Tufts University in Boston wurde 0,5 g des pürierten Gemüses zusammen mit 10 ml Methanol eine Stunde lang in einem Rüttler bei 120 U/min inkubiert. Dann wurde die Mischung in einem Eisbad 30 s lang homogenisiert und Methanol zugegeben. Diese Mischung wurde nun bei 3000 U/min und 4°C für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Methanol-Phase in einem 50 ml Maßkolben überführt und die Extraktion vier Mal mit 10 ml THF (mit Vortexen und Zentrifugieren) wiederholt. Die THF-Phasen wurden mit der Methanol-Phase vereinigt und auf 50 ml aufgefüllt. Davon wurden dreimalig jeweils 1 ml des Extraktes abgenommen, unter einem Stickstoffstrom getrocknet und in 1 ml Ethanol wieder aufgenommen.

Für die Studien in Tübingen wurde die MSPD eingesetzt. Dafür wurden jeweils 0,5 g des Gemüses mit 1,5 g C_{18} -Sorbensmaterial in einem Mörser zu einem trockenen und rieselfähigen Pulver zerrieben. Dieses homogene Gemisch wurde in eine leere SPE-Säule mit einer Filterscheibe auf dem Boden überführt. Nach dem Befüllen wurde die SPE-Säule mit einer weiteren Filterscheibe versehen und das Gemisch zu einem festen und kompakten Säulenbett zusammengepresst. Anschließend wurde die Säule mit 10 ml Wasser gewaschen und die Carotinoide mit 4 ml Aceton extrahiert. Der Extrakt wurde danach im Stickstoffstrom getrocknet. Für die Kapillar-HPLC-NMR-Experimente wurde der Rückstand in 100 μl Aceton- d_6 aufgenommen. Für die Strukturbestimmung der deuterierten Carotinoide wurde der gesamte Rückstand in 200 μl Aceton und nach der HPLC-Aufreinigung die einzelnen Carotinoide in je 50 μl Chloroform- d_1 aufgenommen.

7.3.3 Extraktion von Carotinoiden aus Serumproben

Durch die hohe Lichtempfindlichkeit der Carotinoide erfolgte die Extraktion aus dem Serum unter Rotlicht, um etwaige Isomerisierungen auszuschließen. Im ersten Schritt wurde das Serum vom Vollblut mit Hilfe des Serum-Separators Sure-Sep®II

abgetrennt. Dazu wurden die Blutproben für zehn Minuten bei 4°C und 3000 U/min zentrifugiert (Sorvall RT6000 kühlbare Zentrifuge, Kendro Laboratory Products, Newton, CT, USA) und das Serum abdekantiert.

0,5 ml Serum wurden mit 4 ml einer Mischung aus Chloroform/Methanol (2:1, v/v), 375 µl des internen Standards Echinenon (optische Dichte 0,15) sowie 0,5 ml einer 0,85% Kochsalzlösung versetzt, anschließend gevortext und zehn Minuten bei 4°C und 3000 U/min zentrifugiert. Die Chloroformphase wurde abgetrennt und zum verbleibenden Rückstand 5 ml *n*-Hexan gegeben. Diese Mischung wurde wieder gevortext und unter den selben Bedingungen zentrifugiert. Die erhaltene Hexanphase wurde mit der Chloroformphase vereinigt und im Stickstoffstrom bei 30°C zur Trockne eingengt. Die extrahierten Carotinoide wurden zur HPLC-MS-Analyse in 80 µl Ethanol wieder aufgenommen.

7.3.4 Extraktion von Staphyloxanthin aus *Staphylococcus aureus*

5 g des getrockneten Zellpellets der Bakterien wurden in 80 ml Ethanol aufgenommen, im Wasserbad bei 45°C für 25 min erwärmt, anschließend abgekühlt und filtriert, bis alle sichtbaren Rückstände entfernt waren. Die erhaltene Ethanolphase wurde portioniert und im Vakuum aufkonzentriert. Die einzelnen Extrakte wurden dann mit einer Mischung aus Ethylacetat und 2 molarer NaCl-Lösung (1:3, v/v) extrahiert. Die farbigen Ethylacetat-Extrakte wurden vereinigt und im Vakuum aufkonzentriert. Die Abtrennung von Staphyloxanthin erfolgte mittels präparativer HPLC auf einer C₃₀-Säule. Die so gewonne Staphyloxanthin-Fraktion wurde im Vakuum zur Trockne eingengt.

7.4 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

7.4.1 Chromatographische Bedingungen

Kapillar-HPLC-UV-Kopplung:

Die Standard-Mischung der Carotinoide wurde auf einer selbst gepackten 15 cm x 250 µm C₃₀-Kapillare (ProntoSil 200 Å - 3 µm - C₃₀, Bischoff Analystechnik und -

geräte GmbH, Leonberg) mit einer binären Mischung von Aceton und Wasser als mobile Phase und einer Flussrate von 5 µl/min getrennt. Die Trennung erfolgte in den ersten 15 min isokratisch mit einer Lösungsmittelzusammensetzung von 80 : 20 (v/v). Anschließend folgte ein fünfminütiger linearer Gradient zu 99 : 1 (v/v) und diese Zusammensetzung wurde noch weitere 25 min beibehalten. Die UV-Detektion wurde bei 450 nm durchgeführt und das Injektionsvolumen betrug 100 nl.

Kapillar-HPLC-NMR-Kopplung:

Für die NMR-Experimente erfolgte lediglich eine Umstellung auf Aceton-d₆ und Deuteriumoxid sowie eine Vergrößerung des Injektionsloops auf 500 nl.

HPLC-UV-Kopplung:

Die Trennung von Carotinoiden aus Spinat und Karotten erfolgte auf einer 25 cm x 4,6 mm C₃₀-Trennsäule (ProntoSil 200 Å - 3 µm - C₃₀) mit einem Lösungsmittelgradienten von Aceton und Wasser bei einem Fluss von 1 ml/min. Der Gradient begann linear mit einer Zusammensetzung von 86 : 14 (v/v) von 0 bis 21 min, anschließend wurde die Zusammensetzung linear bis 25 auf 97 : 3 (v/v) geändert und diese Zusammensetzung bis 40 min beibehalten. Die Detektion erfolgte bei 450 nm.

Für die Trennung der Carotinoide aus den Serumproben wurde eine 15 cm x 4,6 mm C₃₀-Trennsäule (200 Å - 3 µm - C₃₀, YMC Inc., Milford, MA, USA) verwendet. Die mobile Phase setzte sich aus Methanol, *tert*-Butylmethylether und Wasser zusammen (Mischung A 83 : 15 : 2 (v/v/v), Mischung B 8 : 90 : 2 (v/v/v)). Der Gradientenverlauf war von A : B: die erste Minute 100 : 0, von 0, 1 bis 8 min Gradient nach 70 : 30, von 8 bis 13 min 70 : 30, von 13 bis 22 min Gradient nach 45 : 55, von 22 bis 24 min 45 : 55, von 24 bis 34 min Gradient nach 5 : 95, von 34 bis 38 min 5 : 95, von 38 bis 40 min Gradient zurück nach 100 : 0 und halten bis 50 min bei 100 : 0. Der Fluß war 1 ml/min und die injizierte Menge lag bei 50 µl

HPLC-APCI/MS-Kopplung:

Für die MS-Untersuchungen der Serumproben wurde der Gradient wie folgt abgeändert: Start bei 100 : 0, von 0 bis 7 min Gradient nach 70 : 30, von 7 bis 12 min

70 : 30, von 12 bis 20 min Gradient nach 5 : 95, von 20 bis 25 min 5 : 95 und von 25 bis 30 min Gradient zurück nach 100 : 0.

7.5 HPLC-MS-Experimente

Die Massenspektren der Carotinoide aus den markierten Gemüsesorten und aus den Serumproben wurden mit der Ionisierungsmethode APCI im positiven Ionen-Modus aufgenommen. Dabei wurde jeweils ein Massenbereich von m/z 545 bis 570 aufgezeichnet. Die Spannung an der Corona-Nadel betrug ca. 1500 V. Der Nebulizer wurde auf einen Druck von 50 psi eingestellt. Die Menge des Trockengases Stickstoff betrug 4 l/min mit einer Temperatur von 250°C. Die Temperatur der Ionisierungskammer lag bei 300°C.

7.6 NMR-Spektroskopie

7.6.1 Flow-Injektion-NMR-Experimente

Die biosynthetisch deuterierten Carotinoide wurden nach der HPLC-Trennung durch direkte Spritzeninjektion in den NMR-Mikroprobenkopf in Chloroform- d_1 vermessen. Für alle ^1H -Spektren wurden die selben Parameter genutzt. Das verwendete Pulsprogramm dafür war zg30 ohne Lösungsmittelunterdrückung. Es wurden jeweils 1024 Transienten mit 32k Zeitdomäne, 32k komplexen Datenpunkten und einer spektralen Auflösung von 5376 Hz aufsummiert. Die D1 Zeit war auf 1 s und die Temperatur auf 298 K gesetzt. Vor der Fouriertransformation wurde der FID mit einer squared sine bell Funktion ($\text{LB} = 0,3 \text{ Hz}$) multipliziert, um das Signal-zu-Rausch Verhältnis zu verbessern.

7.6.2 Kapillar-HPLC-NMR-Kopplungsexperimente

Die Carotinoide aus der Standardlösung und der Spinatprobe wurden im stopped-flow ^1H -NMR-Modus unter Verwendung des Pulsprogrammes zgcprrsp unter Vorsättigung der Lösungsmittelresonanzen durch Rechteckspulse vermessen (100 ms). Für die Carotinoide aus der Standard-Lösung und aus dem MSPD-Extrakt wurden

zwischen 2k und 16k Transienten mit 32k komplexen Datenpunkten und einer spektralen Auflösung von 6024 Hz aufsummiert. Vor der Fouriertransformation wurden die FIDs mit einer squared sine bell Funktion (LB = 0,5 Hz) multipliziert. Die Referenzierung der Spektren erfolgte auf das Signal des deuterierten Acetons ($\delta = 2,04$ ppm).

7.6.3 Hochauflösungs-NMR-Spektroskopie

Synthetisch deuteriertes β -Carotin

Die ^1H -Spektren von (all-E) β -Carotin und $^2\text{H}_8$ -(all-E) β -Carotin wurden in Chloroform- d_1 mit dem Pulsprogramm zg30 mit 1024 Transienten und 32k komplexen Datenpunkten über einen spektralen Bereich von 7246 Hz aufgenommen. Vor der Fouriertransformation wurden die FIDs mit einer squared sine bell Funktion (LB = 1 Hz) multipliziert.

Staphyloxanthin

Zur Strukturaufklärung von Staphyloxanthin aus *Staphylococcus aureus* wurden verschiedene eindimensionale und zweidimensionale Spektren in Aceton- d_6 bei 303 K aufgenommen.

Für das ^1H -Spektrum wurde das Pulsprogramm zg verwendet. Es wurden 8 Transienten mit 16k Datenpunkten und einer spektralen Auflösung von 11160 Hz aufsummiert. Vor der Fouriertransformation wurde der FID mit einer squared sine bell Funktion (LB = 1 Hz) multipliziert.

Das ^{13}C -NMR-Spektrum wurde mit dem Pulsprogramm zgpg vermessen. 16k Transienten wurden mit 16k Datenpunkten und einer spektralen Auflösung von 37037 Hz aufsummiert, vor der Fouriertransformation wurde der FID mit einer squared sine bell Funktion (LB = 1 Hz) multipliziert.

Das $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY wurde mit dem Pulsprogramm cosygpqf.rak vermessen. In F2 Dimension wurden hierfür 1 Transient mit 2k Datenpunkten und einer spektralen Auflösung von 7576 Hz aufsummiert, in F1 Dimension mit 1k Datenpunkten und einer spektralen Auflösung von 7574 Hz.

Das HSQC-Spektrum wurde mit dem Pulsprogramm `hsqctgpsisp2.2` aufgenommen, in F2 wurden 64 Transienten mit 1k Datenpunkten und einer spektralen Auflösung von 7576 Hz aufsummiert, in F1 mit 256 Datenpunkten und 29067,5 Hz.

Das HSQC-TOCSY-Spektrum wurde mit dem Pulsprogramm `hsqcdietgpsisp` aufgenommen, in F2 wurden 8 Transienten mit 1k Datenpunkten und einer spektralen Auflösung von 7576 Hz aufsummiert, in F1 mit 256 Datenpunkten und 29067,5 Hz.

Das HMBC wurde mit dem Pulsprogramm `hmbcetgp12nd` aufgezeichnet, in F2 wurden 8 Transienten mit 4k Datenpunkten und einer spektralen Auflösung von 7576 Hz aufsummiert, in F1 mit 1k Datenpunkten und 36820 Hz.

Das NOESY-Spektrum wurde mit dem Pulsprogramm `noesygpgh.rak` aufgenommen, in F2 wurden 16 Transienten mit 2k Datenpunkten und einer spektralen Auflösung von 7576 Hz aufsummiert, in F1 mit 512 Datenpunkten und 7574 Hz.

Das ROESY-Spektrum wurde mit dem Pulsprogramm `roesygpgh.rak` aufgenommen, in F2 wurden 16 Transienten mit 2k Datenpunkten und einer spektralen Auflösung von 7576 Hz aufsummiert, in F1 mit 512 Datenpunkten und 7574 Hz.

Das TOCSY-Spektrum wurde mit dem Pulsprogramm `dipsi2gpgh.rak` aufgenommen, in F2 wurden 8 Transienten mit 2k Datenpunkten und einer spektralen Auflösung von 7576 Hz aufsummiert, in F1 mit 512 Datenpunkten und 7574 Hz.

8 Literatur

- [1] K. Albert (Hrsg.), in: *On-line LC-NMR and Related Techniques*, John Wiley and Sons Ltd, Chichester, England, **2002**.
- [2] G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander (Hrsg.), in: *Carotenoids; Volume 1a: Isolation and Analysis*, Birkenhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, **1995**.
- [3] C. Franzke, in: *Allgemeines Lehrbuch der Lebensmittelchemie 3. Aufl.*, B. Behr's Verlag, Hamburg, (**1996**), 155-158, 209-213.
- [4] O. Isler, *Pure Appl. Chem.* **51** (**1979**), 447-461.
- [5] J. Falbe, M. Regitz (Hrsg.), in: *Römpp Chemie Lexikon 9. Aufl.*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, (**1995**), 596-598.
- [6] International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) and International Union of Biochemistry (IUP) Commission on Nomenclature, Nomenclature of Carotenoids: *Pure Appl. Chem.* **41**, (**1995**), 405-431.
- [7] S. Liaaen-Jensen, *Pure Appl. Chem.* **69** (10), (**1997**), 2027-2038.
- [8] A. Rüttimann, K. Schmiedt, M. Vecchi: *J. High Resol. Chromatogr.* **6**, (**1983**), 612-616.
- [9] L. Zechmeister (Hrsg.): *Cis-trans Isomeric Carotenoids, Vitamin A and Arylpolyenes*, Springer Verlag, Wien, **1962**.
- [10] M. G. Ferruzzi, M. L. Nguyen, L. C. Sander, C. L. Rock, S. J. Schwartz: *J. Chromatogr. A* **760** (**2001**), 289-299.
- [11] G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander (Hrsg.), in: *Carotenoids; Volume 1b*, Birkenhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, **1998**.
- [12] USDA-NCC Carotenoid Database for U.S. Foods-1998, <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/car98/car98.html>.
- [13] H. K. Biesalski, J. Schrezenmeir, P. Weber, H. Weiß (Hrsg.), in: *Vitamine; Physiologie, Pathophysiologie, Therapie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1997**.
- [14] G. Sandmann, *Arch. Biochem. Biophys.* **385** (1) (**2001**), 4-12.
- [15] J. W. Porter, S. L. Spurgeon, *Pure Appl. Chem.* **51** (**1979**), 609-622.
- [16] J. Breitenbach, G. Braun, S. Steiger, G. Sandmann, *J. Chromatogr. A* **936** (**2001**), 59-69.
- [17] X. Ye, S. Al-Babili, A. Klöti, J. Zhang, P. Lucca, P. Beyer, I. Potrykus, *Science* **287** (**2000**), 303-305.
- [18] R. F. Taylor, B. H. Davies, *4th Int. Symp. Carotenoids Abstr. Commun.*, (**1975**), 66-67.
- [19] G. Ourisson, M. Rohmer, K. Poralla, *Annu. Rev. Microbiol.* **41** (**1987**), 301-334.
- [20] J. Falbe, M. Regitz (Hrsg.), in: *Römpp Chemie Lexikon 9. Aufl.*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, (**1995**), 4737-4738.
- [21] R. F. Taylor, B. Davies, *Biochem. J.* **153** (**1976**), 233-239.
- [22] J. H. Marshall, G. Wilmoth, *J. Bacteriol.* **147** (**1981**), 900-913.
-

- [23] J. H. Marshall, J. W. Gregory, *J. Bacteriol.* 147 (1981), 914-919.
- [24] H. C. Furr, R. M. Clark, *J. Nutr. Biochem.* 8 (1997), 364-377.
- [25] F. Khachik, G. R. Beecher, J. C. Smith, *J. Cell. Biochem.* 22 (Suppl.) (1995), S236-S246.
- [26] N. I. Krinsky, *Annu. Rev. Nutr.* 13 (1993), 561-587.
- [27] B. A. Bowman, R. M. Russell (Hrsg.), in: *Present Knowledge in Nutrition*, International Life Science Institute Press, Washington, 2001.
- [28] G. Tang, X.-F. Gu, S.-M. Hu, Q.-M. Xu, J. Qin, G. G. Dolnikowski, C. R. Fjeld, X. Gao, R. M. Russell, S.-A. Yin, *Am. J. Clin. Nutr.* 70 (1999), 1069-1076.
- [29] J. A. Olson, *J. Nutr.* 119 (1989), 105-108.
- [30] N. I. Krinsky, X. D. Wang, G. Tang, R. M. Russell, in: *Retinoids: progress in research and clinical applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hongkong, (1999), 1-16.
- [31] G. Tang, N. I. Krinsky, *Methods in Enzymology* 214 (1993), 69-74.
- [32] C. A. Rice-Evans, J. Sampson, P. M. Bramley, D. E. Holloway, *Free Rad. Res.* 26 (1997), 69-74.
- [33] R. Edge, D. J. McGarvey, T. G. Truscott, *J. Photochem. Photobiol. B* 41 (1997), 189-200.
- [34] B. Halliwell, *The Lancet* 344 (1994), 721-724.
- [35] N. I. Krinsky, *J. Nutr.* 132 (Suppl.) (2002), 540-542.
- [36] D. C. Liebler, T. D. McClure, *Chem. Res. Toxicol.* 9 (1996), 8-11.
- [37] A. Mortensen, L. H. Skibsted, T. G. Truscott, *Arch. Biochem. Biophys.* 385 (1) (2001), 13-19.
- [38] D. A. Cooper, A. L. Eldridge, J. C. Peters, *Nutr. Rev.* 57 (7) (1999), 201-214.
- [39] K. Klipstein-Grobusch, L. J. Launer, J. M. Geleijnse, H. Boeing, A. Hofman, J. C. M. Witteman, *Artherosclerosis* 148 (2000), 49-56.
- [40] S. B. Kritchevsky, *J. Nutr.* 129 (1999), 5-8.
- [41] L. Arab, S. Steck, *Am. J. Clin. Nutr.* 71 (Suppl.) (2000), 1691-1695.
- [42] A. R. Ness, J. W. Powles, *Int. J. Epidemiol.* 26 (1) (1997), 1-13.
- [43] V. P. Palace, N. Khaper, Q. Qin, P. K. Singal, *Free Rad. Biol. & Med.* 26 (5/6) (1999), 746-761.
- [44] J. H. Cohen, A. R. Kristal, J. L. Stanford, *J. Nat. Cancer Inst.* 92 (1) (2000), 61-68.
- [45] E. C. Miller, C. W. Hadley, S. J. Schwartz, J. W. Erdman, T. W.-M. Boileau, S. K. Clinton, *Pure & Appl. Chem.* 74 (8) (2002), 1435-1441.
- [46] G. Metz, *PZ* 140 (6) (1995), 9-23.
- [47] M. L. Slattery, J. Benson, K. Curtin, K.-N. Ma, D. Schaeffer, J. D. Potter, *Am. J. Clin. Nutr.* 71 (2000), 575-582.
- [48] B. J. Lyle, J. A. Mares-Perlman, B. E. K. Klein, R. Klein, J. L. Greger, *Am. J. Epidemiol.* 149 (9) (1999), 801-809.
- [49] B. J. Lyle, J. A. Mares-Perlman, B. E. K. Klein, R. Klein, M. Palta, P. E. Bowen, J. L. Greger, *Am. J. Clin. Nutr.* 69 (1999), 272-277.
- [50] L. Chaban-Taber, W. C. Willett, J. M. Seddon, M. J. Stampfer, B. Rosner, G. A. Colditz, F. E.

- Speizer, S. E. Hankinson, *Am. J. Clin. Nutr.* 70 (1999), 509-516.
- [51] L. Brown, E. B. Rimm, J. M. Seddon, E. L. Giovannucci, L. Chaban-Taber, D. Spiegelman, W. C. Willett, S. E. Hankinson, *Am. J. Clin. Nutr.* 70 (1999), 517-524.
- [52] R. M. Russell, in: *Nutraceuticals in health and disease prevention*, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel (2001), Kap. 6, 91-102.
- [53] S. Beatty, M. Boulton, D. B. Henson, H.-H. Koh, I. J. Murray, *Br. J. Ophthalmol.* 83 (1999), 867-877.
- [54] S. Beatty, I. J. Murray, D. B. Henson, D. Carden, H.-H. Koh, M. Boulton, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42 (2001), 439-446.
- [55] B. R. Hammond Jr., B. R. Wooten, J. Curran-Celentano, *Arch. Biochem. Biophys.* 385 (1) (2001), 41-46.
- [56] G. W. Comstock, A. J. Alberg, H.-Y. Huang, K. Wu, A. E. Burke, S. C. Hoffman, E. P. Norkus, M. Gross, R. G. Cutler, J. S. Morris, V. L. Spate, K. J. Helzsoer, *Cancer Epidemiol. Biomark. & Prev.* 6 (1997), 907-916.
- [57] J. F. Dorgan, A. Swoll, C. A. Swanson, N. Potischman, R. Miller, N. Schussler, H. E. Stephenson, *Cancer, Causes and Control* 9 (1998), 89-97.
- [58] L. LeMarchand, J. H. Hankin, L. N. Kolonel, G. R. Beecher, L. R. Wilksen, L. P. Zhao, *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 2 (1993), 183-187.
- [59] R. G. Ziegler, E. A. Colavito, P. Hartge, M. J. McAdams, J. B. Schoenberg, T. J. Mason, J. F. Fraumeni, *J. Natl. Cancer Inst.* 88 (9) (1996), 612-615.
- [60] S. Zhang, D. J. Hunter, M. R. Forman, B. A. Rosner, F. E. Speizer, G. A. Colditz, J. E. Manson, S. E. Hankinson, W. C. Willett, *J. Natl. Cancer Inst.* 91 (6) (1999), 547-556.
- [61] O. P. Heinonen, D. Albanes, *New Engl. J. Med.* 330 (15) (1994), 1029-1035.
- [62] G. S. Omenn, G. E. Goodman, M. D. Thornquist, J. Balmes, M. R. Cullen, A. Glass, J. P. Keogh, F. L. Meyskens, B. Valanis, J. H. Williams, S. Barnhart, S. Hammar, *New Engl. J. Med.* 334 (1996), 1150-1155.
- [63] C. H. Hennekens, J. E. Buring, J. E. Manson, M. J. Stampfer, B. Rosner, N. R. Cook, C. Belanger, F. LaMotte, J. M. Gaziano, P. M. Ridker, W. C. Willett, R. Peto, *New Engl. J. Med.* 334 (18) (1996), 1145-1149.
- [64] R. M. Russell, *Am. J. Clin. Nutr.* 71 (2000), 878-884.
- [65] Food and Nutrition Board, *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids*, National Academy Press, Washington, 2000.
- [66] A. J. Young, G. M. Lowe, *Arch. Biochem. Biophys.* 385 (1) (2001), 20-27.
- [67] J. J. M. Castenmiller, C. West, *Pure & Appl. Chem.* 69 (10) (1997), 2145-2150.
- [68] M. G. Traber, *Am. J. Clin. Nutr.* 71 (2000), 1029-1030.
- [69] J. J. M. Castenmiller, C. West, J. P. H. Linssen, K. H. van het Hof, A. G. J. Voragen, *J. Nutr.* 129 (1999), 349-355.
-

- [70] K. H. van het Hof, C. E. West, J. A. Weststrate, J. G. Hautvast, *J. Nutr.* 130 (2000), 503-506.
- [71] C. L. Rock, J. L. Lovalvo, C. Emenhiser, M. T. Ruffin, S. W. Flatt, S. J. Schwartz, *J. Nutr.* 128 (1998), 913-916.
- [72] K. H. van het Hof, B. C. J. de Boer, L. B. M. Tijburg, B. R. Lucius, I. Zijp, C. E. West, J. G. Hautvast, J. A. Weststrate, *J. Nutr.* 130 (2000), 1189-1196.
- [73] A. C. Boileau, N. R. Merchen, K. Wasson, C. A. Atkinson, J. W. Erdman Jr., *J. Nutr.* 129 (1999), 1176-1181.
- [74] K. H. van het Hof, I. A. Brouwer, C. E. West, E. Haddeman, R. P. M. Steegers-Theunissen, M. van Dusseldorp, J. A. Weststrate, T. K. Eskes, J. G. Hautvast, *Am. J. Clin. Nutr.* 70 (1999), 261-268.
- [75] M. Osterlie, B. Bjerkeng, S. Liaaen-Jensen, *J. Nutr.* 129 (1999), 391-398.
- [76] D. M. Deming, S. R. Teixeira, J. W. Erdman, *J. Nutr.* 132 (2002), 2700-2708.
- [77] A. J. Edwards, C. H. Hguyen, C.-S. You, J. E. Swanson, C. Emenhiser, R. S. Parker, *J. Nutr.* 132 (2002), 159-167.
- [78] K.-J. Yeum, R. M. Russell, *Annu. Rev. Nutr.* 22 (2002), 483-504.
- [79] S. P. Coburn, D. W. Townsend (Hrsg.), *Mathematical Modeling in Experimental Nutrition*, Academic Press, London, (1996), 3-22.
- [80] B. J. Burri, T. R. Neidlinger, A. J. Clifford, *J. Nutr.* 131 (2001), 2096-2100.
- [81] D. J. Greenblatt, H. J. Pfeifer, H. R. Ochs, K. Franke, D. S. MacLaughlin, T. W. Smith, J. Kock-Weser, *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics* 202 (2) (1977), 365-378.
- [82] J. A. Novotny, S. R. Dueker, L. A. Zech, A. J. Clifford, *J. Lipid Res.* 36 (1995), 1825-1838.
- [83] M. E. O'Neill, D. I. Thurnham, *Brit. J. Nutr.* 79 (1998), 149-159.
- [84] L. A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente, *Chromatographia* 40 (1995), 474-483.
- [85] K. C. van Horne, *Handbuch der Festphasenextraktion 1. Aufl.*, ict GmbH, 1993.
- [86] M. Gilar, E. S. P. Bouvier, B. J. Compton, *J. Chromatogr. A* 909 (2001), 111-135.
- [87] P. Hubert, A. Ceccato, P. Chiap, B. Toussaint, J. Crommen, *Stp. Pharma Science* 2 (1999), 160-180.
- [88] M. C. Hennion, *J. Chromatogr. A* 856 (1999), 3-54.
- [89] E. J. Johnson, J. Qin, N. I. Krinsky, R. M. Russell, *J. Nutr.* 127 (1997), 1993-1999.
- [90] M. A. Rostagno, M. Palma, C. G. Barroso, *J. Chromatogr. A* 1012 (2003), 119-128.
- [91] E. Björklund, T. Nilsson, S. Bøwadt, *TRAC-Trends Anal. Chem.* 19 (7) (2000), 434-445.
- [92] S. A. Barker, A. R. Long, C. R. Short, *J. Chromatogr.* 475 (1989), 353-361.
- [93] S. A. Barker, *J. Chromatogr. A* 885 (2000), 115-127.
- [94] S. A. Barker, *J. Chromatogr. A* 880 (2000), 63-68.
- [95] V. R. Meyer, *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie 8. Aufl.*, Salle und Sauerländer Verlag, Frankfurt am Main, 1999.
- [96] M. Tswett, *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 24 (1906), 216-323.

- [97] M. Vecchi, G. Englert, R. Maurer, V. Meduna, *Helv. Chim. Acta* 281 (1981), 2746-2758.
- [98] U. Hengartner, K. Bernhard, K. Meyer, G. Englert, E. Glinz, *Helv. Chim. Acta* 75 (1992), 1848-1865.
- [99] F. Khachik, G. Englert, C. E. Daitch, G. R. Beecher, L. H. Tonucci, W. R. Lusby, *J. Chromatogr.* 582 (1992), 153-166.
- [100] M. Pursch, R. Brindle, A. Ellwanger, L. C. Sander, C. M. Bell, H. Händel, K. Albert, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 9 (1997), 191-201.
- [101] L. C. Sander, K. Epler Sharpless, N. E. Craft, S. A. Wise, *Anal. Chem.* 66 (1994), 1667-1674.
- [102] M. Raitza, J. Wegmann, S. Bachmann, K. Albert, *Angew. Chem.* 112 (2000), 3629-3632.
- [103] M. Raitza, M. Herold, G. Gauglitz, K. Albert, *Macromol. Chem. Phys.* 201 (2000), 825-829.
- [104] K. Albert, T. Lacker, M. Raitza, M. Pursch, H.-J. Egelhaaf, D. Oelkrug, *Angew. Chem.* 110 (1998), 809-812.
- [105] K. Albert, *TRAC - Trends Anal Chem.* 17 (1998), 648-658.
- [106] M. Pursch, L. C. Sander, K. Albert, *Anal. Chem.* 71 (1999), 733-741.
- [107] S. Strohschein, M. Pursch, D. Lubda, K. Albert, *Anal. Chem.* 70 (1998), 13-18.
- [108] C. Emenhiser, N. Simunovic, L. C. Sander, S. J. Schwartz, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996), 3887-3893.
- [109] C. Emenhiser, L. C. Sander, S. J. Schwartz, *J. Chromatogr. A* 707 (1995), 205-216.
- [110] L. C. Sander, M. Pursch, B. Märker, S. A. Wise, *Anal. Chem.* 71 (1999), 3477-3483.
- [111] K. Putzbach, M. Krucker, M. D. Grynbaum, P. Hentschel, A. G. Webb, K. Albert, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, zur Veröffentlichung eingereicht.
- [112] M. Otto (Hrsg.), in: *Analytische Chemie*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, (1995), 413-513.
- [113] G. Fischer, U. Skogsberg, S. Bachmann, H. Yüksel, S. Steinbrecher, E. Plies, K. Albert, *Chem. Mater.* 15 (15) (2003), 4394-4400.
- [114] M. Jochum, H. Engelhardt, *Laborpraxis* 9 (2001).
- [115] G. Rozing, *LC/GC europe* 16 (6a) (2003), 14-19.
- [116] C. G. Horvath, B. A. Preiss, S. R. Lipsky, *Anal. Chem.* 39 (12) (1967), 1422-1428.
- [117] T. Takeuchi, *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003), 26-27.
- [118] T. Takeuchi, *Fresenius J. Anal. Chem.* 337 (1990), 631-637.
- [119] D. Ishii, T. Takeuchi, *Trends Anal. Chem.* 9 (5) (1990), 152-157.
- [120] N. K. Vadukul, C. R. Loscombe, *J. High Resol. Chromatogr. & CC* 5 (1982), 360-363.
- [121] R. P. W. Scott, P. Kucera, *J. Chromatogr.* 169 (1979), 51-57.
- [122] G. Britton, *Carotenoids Vol. 1b, Spectroscopy*, Birkenhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, (1995), 13-62.
- [123] L.-Y. Zang, O. Sommerburg, F. J. Kuijk, *Free Rad. Biol. & Med.* 23 (7) (1997), 1086-1089.
- [124] W. D. Lehmann, in: *Massenspektrometrie in der Biochemie 1. Aufl.*, Spektrum Akademischer
-

- Verlag, Berlin, **1996**.
- [125] H. Budzikiewicz, in: *Massenspektrometrie 3. Aufl.*, VCH Verlag, **1992**.
- [126] R. B. van Breemen, *Pure Appl. Chem.* 69 (10) (**1997**), 2061-2066.
- [127] M. Careri, A Mangia, M. Musci, *J. Chromatogr. A* 794 (**1998**), 263-297.
- [128] R. B. van Breemen, *Anal. Chem.* 67 (**1995**), 2004-2009.
- [129] C. Rentel, S. Strohschein, K. Albert, E. Bayer, *Anal. Chem.* 70 (**1998**), 4394-4440.
- [130] R. B. van Breemen, C.-R. Huang, Y. Tan, L. C. Sander, A. B. Schilling, *J. Mass Spectrom.* 31 (**1996**), 975-981.
- [131] G. Tang, B. A. Andrien, G. G. Dolnikowski, R. M. Russell, *Methods in Enzymology, Vitamines and Coenzymes, Part L* 282 (**1997**), 140-154.
- [132] M. Dachtler, T. Glaser, K. Kohler, K. Albert, *Anal. Chem.* 73 (**2001**), 667-674.
- [133] T. Lacker, S. Strohschein, K. Albert, *J. Chromatogr. A* 854 (**1999**), 37-44.
- [134] M. Takino, K. Yamaguchi, T. Nakahara, *J. Agricul. Food Chem.* 52 (4) (**2004**), 727-735.
- [135] Y. Hsieh, G. Wang, *Am. Pharm. Rev.* 7 (1) (**2004**), 90-93.
- [136] H. Günther (Hrsg.), in: *NMR-Spektroskopie 3. Aufl.*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1992**.
- [137] K. Albert, *J. Chromatogr. A* 856 (**1999**), 199-211.
- [138] J. C. Lindon, J. K. Nicholson, I. D. Wilson, *Adv. Chromatogr.* 36 (**1996**), 315-382.
- [139] S. Strohschein, M. Pursch, K. Albert, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21 (**1999**), 669-677.
- [140] S. Strohschein, M. Pursch, H. Händel, K. Albert, *Fresenius J. Anal. Chem.* 357 (**1997**), 498-502.
- [141] E. M. Purcell, H. C. Torrey, R. V. Pound, *Phys. Rev.* 69 (**1946**), 37.
- [142] F. Bloch, W. W. Hansen, M. Packard, *Phys. Rev.* 69 (**1946**), 127.
- [143] R. R. Ernst, W. A. Anderson, *Rev. Sci. Instr.* 37 (**1966**), 93-102.
- [144] E. Bayer, K. Albert, M. Nieder, E. Grom, T. Keller, *J. Chromatogr. A* 186 (**1979**), 497-507.
- [145] N. Watanabe, E. Niki, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* 54 (**1978**), 194-199.
- [146] J. F. Haw, T. E. Glass, D. W. Hausler, E. Motell, H. C. Dorn, *Anal. Chem.* 52 (**1980**), 1135-1140.
- [147] J.-L. Wolfender, K. Ndjoko, K. Hostettmann, *Phytochem. Anal.* 12 (**2001**), 2-22.
- [148] J. A. de Koning, A. C. Hogenboom, T. Lacker, S. Strohschein, K. Albert, U. A. T. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 813 (**1998**), 55-61.
- [149] K. Albert, G. Schlotterbeck, U. Braumann, H. Händel, M. Spraul, G. Krack, *Angew. Chem. Int. Ed.* 34 (9) (**1995**), 1014-1016.
- [150] J. C. Lindon, J. K. Nicholson, I. D. Wilson, *J. Chromatogr. B* 748 (**2000**), 233-258.
- [151] K. Levsen, A. Preiss, M. Godejohann, *Trends Anal. Chem.* 19 (1) (**2000**), 27-48.
- [152] U. G. Sidelmann, I. Bjornsdottir, J. P. Shockcor, S. H. Hansen, J. C. Lindon, J. K. Nicholson, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (**2001**), 569-579.
- [153] B. Behnke, G. Schlotterbeck, U. Tallarek, S. Strohschein, L.-H. Tseng, T. Keller, K. Albert, E.
-

- Bayer, *Anal. Chem.* 68 (1996), 1110-1115.
- [154] D. L. Olson, T. L. Peck, A. G. Webb, R. L. Magin, J. V. Sweedler, *Science* 270 (1995), 1967-1970.
- [155] D. I. Hoult, E. Richards, *J. Mag. Res.* 24 (1976), 71-85.
- [156] K. Albert, *Habilitation*, Universität Tübingen 1988.
- [157] H. C. Dorn, T. E. Glass, R. Gitti, K. H. Tsai, *Appl. Magn. Reson.* 2 (1991), 9-27.
- [158] H. H. Fischer, M. Seiler, T. S. Ertl, U. Eberhardinger, H. Bertagnolli, H. Schmitt-Willich, K. Albert, *J. Phys. Chem. B* 107 (2003), 4879-4886.
- [159] M. Spraul, A. S. Freund, R. E. Nast, R. S. Withers, W. E. Mass, O. Corcoran, *Anal. Chem.* 75 (2003), 1546-1551.
- [160] D. L. Olson, M. E. Lacey, J. V. Sweedler, *Anal. Chem.* 70 (1998), 257A-264A.
- [161] N. Wu, T. L. Peck, A. G. Webb, R. L. Magin, J. V. Sweedler, *Anal. Chem.* 66 (1994), 3849-3857.
- [162] D. A. Jayawickrama, J. V. Sweedler, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003), 819-840.
- [163] M. Krucker, A. Lineau, K. Putzbach, M. D. Grynbaum, P. Schuler, K. Albert, E. Bayer, *Anal. Chem.* 76 (9) (2004), 2623-2628.
- [164] M. E. Lacey, Z. J. Tan, A. G. Webb, J. V. Sweedler, *J. Chromatogr. A* 922 (2001), 139-149.
- [165] G. Schlotterbeck, L.-H. Tseng, H. Händel, U. Braumann, K. Albert, *Anal. Chem.* 69 (7) (1997), 1421-1425.
- [166] A. M. Wolters, D. A. Jayawickrama, A. G. Webb, J. V. Sweedler, *Anal. Chem.* 74 (2002), 5550-5555.
- [167] J. Schewitz, K. Pusecker, P. Gförer, U. Götz, L.-H. Tseng, K. Albert, E. Bayer, *Chromatographia* 50 (5-6) (1999), 333-337.
- [168] E. Rapp, A. Jakob, A. B. Schefer, E. Bayer, K. Albert, *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003), 1053-1061.
- [169] A. M. Wolters, D. A. Jayawickrama, C. K. Larive, J. V. Sweedler, *Anal. Chem.* 74 (2002), 2306-2313.
- [170] K. Albert, H. Günzler, (Hrsg.), in: *Analytiker Taschenbuch Vol. 20*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, (2003), 107-139.
- [171] W. Vilegas, J. H. Y. Vilegas, M. Dachtler, T. Glaser, K. Albert, *Phytochem. Anal.* 11 (2000), 317-321.
- [172] K. Pusecker, K. Albert, E. Bayer, *J. Chromatogr. A* 836 (1999), 245-252.
- [173] J. W. Jorgenson, K. DeArman Lukacs, *J. Chromatogr. A* 218 (1981), 209-216.
- [174] S. Li, D. K. Lloyd, *Anal. Chem.* 65 (1993), 3684-3690.
- [175] M. Schmid, F. Bäumle, A. P. Köhne, T. Welsch, *J. High Resol. Chromatogr.* 22 (8) (1999), 438-442.
- [176] M. Mayer, E. Rapp, C. Marck, G. J. M. Bruin, *Electrophoresis* 20 (1999), 43-49.
-

-
- [177] E. Rapp, E. Bayer, *J. Chromatogr. A* 887 (2000), 367-378.
- [178] Y. Yamauchi, J. Kumantoni, *J. Chromatogr.* 210 (1981), 521-515.
- [179] E. Cussler, in: *Diffusion: Mass transfer in fluid systems 2nd edition*, Cambridge University Press, England, 1997.
- [180] T. Glaser, A. Lienau, D. Zeeb, M. Krucker, M. Dachtler, K. Albert, *Chromatographia* 57 (Suppl.) (2003), S19-S25.
- [181] T. Glaser, K. Albert (Hrsg.), in: *On-line LC-NMR and Related Techniques*, John Wiley and Sons Ltd, Chichester, England, (2002), 129-140.
- [182] M. A. Grusak, S. Pezeshgi, *J. Soc. Food Agric.* 64 (1994), 223-230.
- [183] M. A. Grusak, *J. Nutr. Biochem.* 8 (1997), 164-171.
- [184] P. E. Hansen, G. A. Webb (Hrsg.), in: *Annual Reports on NMR Spectroscopy* 15 (1983), 106-234.
- [185] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh (Hrsg.), in: *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie 4.Aufl.*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1991, 121-124.
- [186] G. P. Moss, *Pure and Appl. Chem.* 51 (1979), 507-514.
- [187] H.H. Fischer, M. Seiler, T. S. Ertl, U. Eberhardinger, H. Bertagnolli, H. Schmitt-Willich, K. Albert, *J. Phys. Chem. B* 10 (2003), 4879-4886.
-

Meine akademischen Lehrer waren:

K. Albert, A. Beck-Sikinger, S. Berger, H. Bertagnolli, L. Beyer, M. Bogdan, F. Brandstetter, J. A. C. Broekaert, K. Burger, H.-J. Egelhaaf, W. Engewald, U. Hahn, R. Herzsuh, E. Hey-Hawkins, G. Jung, H. Knoll, F. Kremer, K.-D. Kürsten, E. Lindner, H. A. Mayer, U. Messow, H. Morgner, K. Müller, U. Nagel, C. Ochsenfeld, D. Oelkrug, H. Papp, E. Plies, C. Quitzsch, J. Rademann, J. Reinholdt, W. Rosenstiel, V. Schurig, J. Sieler, B. Speiser, R. Szargan, P. Welzel

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Karsten Putzbach
Geburtsort: Riesa
Geburtstag: 18.08.1977
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1984 - 1992 Pestalozzi Oberschule Zeithain.
1992 - 1996 Gymnasium Riesa-Weida.
21. Juni 1996 Allgemeine Hochschulreife.

Studium:

WS 97/98-WS 01/02 Chemiestudium an der Universität Leipzig.
Okt. 2001 - Juni 2002 Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. Werner Engewald am Institut für Analytische Chemie zum Thema „PTV-Large-Volume-Injektion für die GC/MS-Bestätigungsanalyse illegaler Drogen in Blut“.
14. Juni 2002 Erwerb des akademischen Grades „Diplom Chemiker“.
Juli 2002 - Dez. 2004 Promotion im Arbeitskreis von Prof. Dr. Klaus Albert am Institut für Organische Chemie zum Thema „Miniaturisierte direktgekoppelte Analysensysteme zur Strukturaufklärung von Carotinoiden und Bestimmung der Bioverfügbarkeit von markiertem Lutein“.
Okt. 2002 - Dez. 2004 Kollegiat im Graduiertenkolleg „Chemie in Interphasen – Synthese, Dynamik und Anwendung polymerfixierter aktiver Zentren“ an der Universität Tübingen.
März - Mai 2004 Forschungsaufenthalt in der Arbeitsgruppe Dr. Robert M. Russell am Jean Mayer USDA Human Nutrition Research Center on Aging (HNRCA) at Tufts University, Boston, MA, USA.

