

**Direktgekoppelte miniaturisierte Analysensysteme
zum Nachweis pharmakologisch aktiver Substanzen
aus biologischen Proben**

DISSERTATION

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

2004

vorgelegt von
Manfred Krucker

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Februar 2004

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Professor Dr. H. Probst

Professor Dr. K. Albert

Professor Dr. Th. Ziegler

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 August 2001 bis Februar 2004 durchgeführt.

Bei Herrn Professor Dr. Klaus Albert möchte ich mich sehr herzlich für die attraktive Themenstellung, für sein stetiges Interesse an meiner wissenschaftlichen Arbeit und für die Bereitstellung der optimalen Analysengeräte-Ausstattung, ohne welche die Durchführung dieser Arbeit unmöglich gewesen wäre, bedanken. Zudem förderte er die Vertiefung meines fachlichen Wissens durch viele Forschungsaufenthalte sowie durch die Teilnahme an unzähligen nationalen wie internationalen Tagungen und interdisziplinären Workshops.

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

Karsten Putzbach für die 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.

Gerd Fischer, als „gute Seele“ des Arbeitskreises unverzichtbar.

Dr. Tobias Glaser, Dr. Annette Lienau und Dr. Daniel Zeeb für das Einarbeiten in die Analytik bioaktiver Substanzen.

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

Meinen Kollegen Marc-David Grynbaum, Dr. Urban Skogsberg, Christoph Meyer, Siri Schauf, Dr. Heidrun Händel, Dr. Elke Gesele, Norbert Welsch, Dr. Ismail Warad und Sascha Pelz für die Hilfsbereitschaft bei allen Fragen und Problemen, sowohl fachlicher als auch organisatorischer Natur, sowie das freundschaftliche Arbeitsklima.

Prof. Elsa Lundanes, Prof. Tyge Greibrokk und Thomas Bjellas für die freundliche Aufnahme und fachliche wie persönliche Hilfestellungen während meines Aufenthaltes an der Universität Oslo, sowie der Europäischen Union für die Gewährung eines Marie-Curie Stipendiums.

Prof. Rainer Bischoff für die Bereitstellung der phosphorylierten Peptide.

Dr. Vassiliki Exarchou und Prof. Teris van Beek für die gemeinsamen Messungen zum Vergleich der Sensitivität unterschiedlicher LC-NMR Systeme sowie die CapLC-NMR Untersuchungen des Rosmarin-Extraktes.

Dr. Beata Janoszka für die gute Zusammenarbeit und Einladung zu einer Konferenz in Polen.

Prof. Cynthia Larive für die Möglichkeit, meine Ergebnisse bei der SMASH 2003 Konferenz zu präsentieren.

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

Dr. Gregory Dolnikowski und Dr. Guangwen Tang vom Human Nutrition Research Center der Tufts University, Boston, USA, für die Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Bioverfügbarkeit von Carotenoiden.

Der Firma Bischoff Chromatography, insbesondere Dr. Stefan Lamotte, für die Bereitstellung unterschiedlichster stationärer Phasen zur Verwendung in der Kapillar-HPLC.

Dr. Ulrich Braumann von Bruker Biospin für die tatkräftige Unterstützung bei der Installation des Kapillar-HPLC-NMR Systems.

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

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 2 | PROBLEMSTELLUNG | 2 |
| 3 | UNTERSUCHTE BIOMEDIZINISCH AKTIVE SUBSTANZKLASSEN | 3 |
| 3.1 | Natürlich vorkommende Antioxidantien | 3 |
| 3.1.1 | <i>Protektive Wirkungen natürlicher Antioxidantien</i> | 3 |
| 3.1.2 | <i>Tocopherole (Vitamin E)</i> | 4 |
| 3.1.3 | <i>Flavonoide</i> | 7 |
| 3.1.4 | <i>Phenolsäuren</i> | 14 |
| 3.1.5 | <i>Anwendung von Radix Astragali in der traditionellen chinesischen Medizin (TCM)</i> | 15 |
| 3.2 | Peptide | 17 |
| 3.2.1 | <i>Biomedizinisch aktive Peptide</i> | 18 |
| 3.2.2 | <i>Zellregulation durch Peptid-Phosphorylierung</i> | 21 |
| 4 | ANALYTIK VON BIOMEDIZINISCH AKTIVEN SUBSTANZEN | 23 |
| 4.1 | Schonende Extraktion instabiler Analyten | 23 |
| 4.1.1 | <i>Flüssig-Flüssig-Extraktionstechniken</i> | 24 |
| 4.1.2 | <i>Mikro-SPE-HPLC-Kopplung (on-line μSPE)</i> | 24 |
| 4.1.3 | <i>Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD)</i> | 26 |
| 4.2 | Kapillar-Hochleistungsflüssigchromatographie (CapLC) | 27 |
| 4.2.1 | <i>HPLC-Grundlagen</i> | 27 |
| 4.2.2 | <i>Miniaturisierung in der HPLC</i> | 29 |
| 4.3 | Grundlagen moderner miniaturisierter Kopplungsmethoden | 31 |
| 4.3.1 | <i>Kapillar-HPLC-ESI/MS-Kopplung</i> | 31 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 4.3.2 | <i>Kapillar-HPLC-NMR-Kopplung</i> | 33 |
| 4.3.2.1 | Experimenteller Aufbau..... | 33 |
| 4.3.2.2 | Mikroprobenkopf-NMR gekoppelt zur Kapillar-HPLC | 35 |
| 5 | ERGEBNISSE | 39 |
| 5.1 | Herstellung hocheffizienter Kapillartrennsysteme | 39 |
| 5.1.1 | <i>Partikuläre stationäre Phasen</i> | 40 |
| 5.1.2 | <i>Monolithische Phasen</i> | 46 |
| 5.2 | Kapillar-HPLC-NMR-System Sensitivität | 50 |
| 5.3 | Trennung und Identifikation von Tocopherol-Homologen | 53 |
| 5.3.1 | <i>Etablierung der Kapillar-HPLC-Trennung</i> | 53 |
| 5.3.2 | <i>Kapillar-HPLC-ESI/MS-Kopplung</i> | 55 |
| 5.3.3 | <i>Continuous-flow Kapillar-HPLC-NMR-Kopplung</i> | 58 |
| 5.3.4 | <i>Stopped-flow 2D-NMR-Experimente</i> | 61 |
| 5.4 | Identifikation von Isoflavonoiden in <i>Radix Astragali</i> | 64 |
| 5.4.1 | <i>Kapillar-HPLC-NMR-Messungen einer Flavonoid Standardmischung</i> | 65 |
| 5.4.2 | <i>Kapillar-HPLC-ESI/MS-Experimente einer Standardmischung</i> | 71 |
| 5.4.3 | <i>HPLC-ESI/MS-Messungen eines <i>Radix Astragali</i> MSPD-Extraktes</i> | 73 |
| 5.4.4 | <i>Stopped-flow Kapillar-HPLC-NMR-Experimente eines gepoolten <i>Radix Astragali</i> MSPD-Extraktes</i> | 76 |
| 5.5 | μSPE-Kapillar-HPLC-System zum Nachweis bioaktiver Peptide in Gewässerproben | 80 |
| 5.6 | Bestimmung von Phosphorylierungsstellen in synthetischen Peptiden | 90 |
| 5.6.1 | <i>Mikroprobenkopf-NMR-Experimente</i> | 90 |
| 5.6.2 | <i>Kapillar-HPLC-NMR-Kopplung</i> | 98 |

| | | |
|-------|--|------------|
| 5.7 | Stopped-flow Kapillar-HPLC-NMR-Experimente eines kommerziellen Rosmarin-Extraktes | 100 |
| 6 | ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK | 104 |
| 7 | EXPERIMENTELLER TEIL | 107 |
| 7.1 | Geräte | 107 |
| 7.1.1 | <i>HPLC- und Kapillar-HPLC-Anlagen</i> | <i>107</i> |
| 7.1.2 | <i>Herstellung von Kapillartrennsäulen</i> | <i>108</i> |
| 7.1.3 | <i>Massenspektrometer</i> | <i>108</i> |
| 7.1.4 | <i>NMR-Spektrometer</i> | <i>108</i> |
| 7.2 | Chemikalien | 109 |
| 7.3 | Probenvorbereitung und Extraktion | 109 |
| 7.3.1 | <i>Standards</i> | <i>109</i> |
| 7.3.2 | <i>Extraktion von biologischen Proben</i> | <i>110</i> |
| 7.3.3 | <i>On-line μSPE zur Bestimmung von Peptiden aus Wasserproben</i> | <i>111</i> |
| 7.4 | Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)..... | 111 |
| 7.4.1 | <i>Chromatographische Bedingungen</i> | <i>111</i> |
| 7.5 | Kapillar-HPLC-MS-Experimente | 113 |
| 7.6 | NMR-Spektroskopie..... | 113 |
| 7.6.1 | <i>Flow-Injektion-NMR-Experimente</i> | <i>113</i> |
| 7.6.2 | <i>Kapillar-HPLC-NMR-Kopplungsexperimente</i> | <i>115</i> |
| 8 | LITERATUR..... | 117 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|------------------|---|
| α | Trennfaktor |
| δ | Chemische Verschiebung |
| 1D | Eindimensional |
| 2D | Zweidimensional |
| ACE | Angiotensin Converting Enzyme |
| ADP | Adenosin-Diphosphat |
| A-D Wandler | Analog-Digital Wandler |
| APCI | Atmospheric Pressure Chemical Ionization |
| ATP | Adenosin-Triphosphat |
| BET | Brunner-Emmett-Teller-Messungen |
| BHT | Butylated Hydroxytoluene |
| DVB | Divinylbenzen |
| CapLC | Kapillar-HPLC |
| CID | Collision-Induced Dissociation, Kollision-induziert Dissoziation, |
| COSY | Correlated Spectroscopy |
| CP | Cross Polarization, Kreuzpolarisation |
| d | Day, Tag |
| DAD | Dioden-Array UV-Detektor |
| DNS | Desoxyribonucleinsäure |
| D ₂ O | Deuteriumoxid |
| ESI | Electrospray Ionisierung |
| FID | Free Induction Decay, freier Induktionsabfall |
| GABA | γ -Aminobuttersäure |
| h | Hour, Stunde |
| H ₂ O | Wasser |
| HETP | Höhenequivalent eines theoretischen Bodens |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| I.D. | Innendurchmesser |
| k' | Retentionsfaktor |

| | |
|-------------|--|
| K | Kelvin |
| LC | Liquid Chromatography, Flüssigkeitschromatographie |
| LDL | Low Density Lipoprotein |
| LMPTP | Low Molecular Weight Protein-Tyrosin-Phosphatase |
| M | Molar (mol/l) |
| MAS | Magic Angle Spinning, Rotation um den magischen Winkel |
| MeCN | Acetonitril |
| 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 |
| NMR | Nuclear Magnetic Resonance, Kernresonanz-Spektroskopie |
| PEG | Polyethylenglycol |
| ppm | Parts per Million |
| PS | Polystyren |
| PUFA | Poly Unsaturated Fatty Acids |
| ROS | Reactive Oxygen Species, reaktive Sauerstoff-Spezies |
| RP | Reversed Phase, Umkehrphasen |
| RAM | Restricted Access Materialien |
| 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 |
| TEAC | Trolox Equivalent Antioxidant Concentration |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| TMOS | Tetramethoxysilan |
| UV | Ultraviolett |
| VLDL | Very Low Density Lipoprotein |

1 Einleitung

Die analytische Chemie, welche sich mit dem Nachweis, der Identifikation und Strukturaufklärung von Substanzen aus unterschiedlichsten Proben (qualitative Analyse) und der Bestimmung der Menge dieser Substanzen (quantitative Analyse) befasst, hat sich seit ihrer Einführung zu einem Bindeglied vieler interdisziplinärer Forschungszweige weiterentwickelt. Neben der Kontrolle von Syntheseprodukten liefert sie viele wichtige Informationen in der Umweltanalytik, der Forensik, beim Nachweis von sekundären Pflanzenstoffen und nicht zuletzt in humanpharmakologischen Studien, wie z.B. der Bestimmung der Bioverfügbarkeit von Substanzen im menschlichen Körper. Jeder Analysengang untergliedert sich in vier Hauptschritte, beginnend mit der Probenentnahme, der Probenvorbereitung bzw. Extraktion, einer meist chromatographischen Trennung der im Extrakt enthaltenen Komponenten und schließlich deren Detektion mit spektrometrischen (Massenspektrometrie), spektroskopischen (z.B. UV, NMR) oder biochemischen Verfahren. Jeder Teilschritt muss dabei optimiert werden, um eine erfolgreiche Analyse zu gewährleisten. Neben dieser Optimierung sind neue Analysemethoden von bedeutendem Interesse, welche entweder die Nachweisgrenzen verbessern, so dass noch geringste Mengen an Analyt nachweisbar werden, oder die Analyse in einem direktgekoppelten System ermöglichen, d.h. die artefaktfreie Extraktion direkt an eine hocheffiziente chromatographische Trenneinheit und diese wiederum an einen sensitiven und informationsreichen Detektor koppeln. Solche sogenannten hyphenated (hybernated) systems^[1] reduzieren die benötigte Analysenzeit und ermöglichen somit high-throughput screening. Daneben wird auch die Gefahr der Zersetzung bzw. Artefaktbildung und Kontamination deutlich minimiert, was vor allem beim Nachweis von licht- und luftempfindlichen Substanzen, wie natürlicher Antioxidantien, von besonderem Vorteil ist. Als direktgekoppeltes System mit überlegenem Informationsgehalt ist die LC-NMR inzwischen als Routinemethode^[2] etabliert, dennoch sind die mit diesem System erzielbaren Detektionslimits trotz weitreichender Verbesserungen noch relativ hoch. Daher wird weiterhin die sehr empfindliche und selektive Massenspektrometrie in GC-MS^[3] und LC-MS Systemen eingesetzt bzw. eine Kombination mehrerer Detektoren (LC-NMR-MS) genutzt.

2 Problemstellung

Ziel der durchgeführten Arbeiten war es, die miniaturisierte Trenntechnik Kapillar-HPLC weiterzuentwickeln, diese an Detektoren on-line zu koppeln, welche auf die kleinen, aus der Kapillar-HPLC eluierenden Analytmengen angepasst sind, und auf robuste, reproduzierbare Analysen hin zu optimieren. Solch miniaturisierte direktgekoppelte Analysensysteme sind speziell für den Nachweis von Substanzen aus limitierten Probenmatrizes zugeschnitten. Auf Grund der minimalen Analytmengen werden besondere Anforderungen an die Extraktion, die Trenneinheit und vor allem an die Sensitivität des Detektors gestellt. Die Optimierung eines jeden Teilschrittes in Hinblick auf eine Empfindlichkeits-optimierte Analytik ist daher unabdingbar. Im Probenvorbereitungs- und -extraktionsschritt gilt es, eine möglichst hohe Anreicherung der Substanzen zu erzielen, die Analyten also möglichst effizient von etwaigen Verunreinigungen abzutrennen. Der erhaltene Extrakt wird dann auf selbst hergestellten effizienten Kapillarsäulen getrennt, um schmale, gut separierte Elutionspeaks zu erhalten. Dafür ist die Herstellung hocheffizienter Kapillartrennsäulen mit unterschiedlichsten, auf das jeweilige Trennproblem angepassten stationären Phasen und die verwendete Endfitting-Technologie mitentscheidend. Die schmalen Elutionspeaks (maximale Konzentration in einem kurzen Retentionszeitintervall) werden schließlich mit Sensitivitäts-optimierten Detektoren vermessen, wobei die erhaltenen Spektren auch bei den zur Verfügung stehenden geringen Substanzmengen alle wichtigen Informationen in leicht auswertbarer Form enthalten sollten. Im Rahmen dieser Arbeit sollte sowohl ein miniaturisierter Extraktionsschritt an die Kapillar-HPLC zur Bestimmung von Peptiden in Gewässerproben gekoppelt (μ SPE-CapLC), als auch diverse natürliche Antioxidantien (Tocopherole, Polyphenole) und regulatorisch phosphorylierte Peptide mit der Kapillar-HPLC aufgetrennt und mittels Massenspektrometrie (MS) und mit besonderem Interesse Kernresonanz-Spektroskopie (NMR) nachgewiesen werden. Jeder Detektor hat spezifische Vorteile, eine unzweideutige Identifikation der Analyten ist meist erst nach Kombination aller generierten Daten und deren Auswertung möglich. Im folgenden werden alle methodischen Verbesserungen eines jeden Teilschrittes sowie die nach der Optimierung erhaltenen Ergebnisse detailliert besprochen.

3 Untersuchte biomedizinisch aktive Substanzklassen

3.1 Natürlich vorkommende Antioxidantien

3.1.1 Protektive Wirkungen natürlicher Antioxidantien^[4]

Die Oxidation mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor ist ein essentieller Bestandteil des menschlichen Metabolismus, da es die lebensnotwendige Energieversorgung des Körpers durch Bildung von Adenosintriphosphat (ATP) sicherstellt. Probleme hingegen treten dann auf, wenn dieser Elektronenfluss entkoppelt ist, d.h. einzelne ungepaarte Elektronen transferiert werden. Dies führt zu Bildung sehr reaktiver, freier Radikale, den sogenannten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Beispiele dieser ROS sind das Superoxid ($O_2^{\cdot-}$), sowie Peroxyl- (ROO^{\cdot}), Alkoxy- (RO^{\cdot}), äußerst reaktive Hydroxyl- (HO^{\cdot}) und Stickstoffoxid- (NO^{\cdot}) Radikale. Neben den oben genannten ROS-Radikalen treten im Organismus auch nichtradikalische ROS-Spezies wie z.B. Singlet-Sauerstoff (1O_2), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hypochlorsäure (HOCl) auf. All diese freien ROS können sehr schädigend für den menschlichen Körper sein, da sie Lipide der Zellmembran zerstören, Proteine und Enzyme unerwünscht modifizieren sowie die DNS und somit den genetischen Code angreifen. Die genannten oxidativen Schädigungen stehen in engem Zusammenhang mit dem Alterungsprozess im Allgemeinen, sowie einigen degenerativen Erkrankungen wie Herzleiden, Katarakt und Krebs^{[5],[6]}. Hinzuweisen ist jedoch auch auf die biomedizinisch positiven Wirkungen der ROS, z.B. in der Energie-Produktion, Regulation des Zellwachstums, interzelluläre Signalweiterleitung sowie bei der Synthese humanbiologisch wichtiger Substanzen. Ein ausgewogenes Maß an ROS im menschlichen Organismus ist für die Gesundheit daher mitentscheidend.

Der menschliche Körper besitzt Mechanismen zum Schutz vor oxidativer Schädigung. Die endogene antioxidative Abwehr gewährleistet sowohl die Unterdrückung der Bildung eines Übermaßes an ROS, die Zerstörung bereits gebildeter überschüssiger ROS und damit die Prävention potentieller Schädigungen, Eingriffe in die Progression der schädigenden Radikalkettenreaktionen sowie die Reparatur bereits entstandener Defekte. Eingeteilt werden diese Abwehrreaktionen in

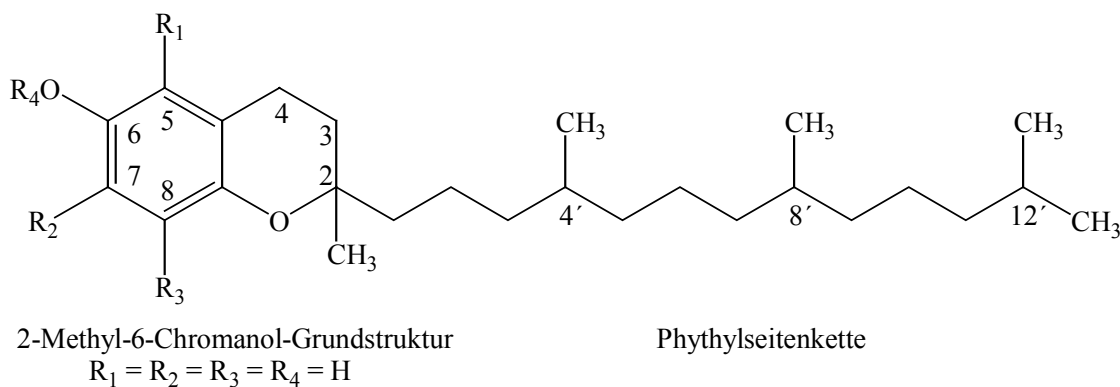
enzymatische Mechanismen, z.B. den Schutz durch die Superoxid-Dismutase, Wasserstoff- oder Lipid-Peroxidase, sowie nicht enzymatische Abwehrfunktionen z.B. von Glutathion, Histidin-Peptiden und andere. All diese Abwehrmechanismen ergänzen sich gegenseitig und nur eine ausgewogene Kombination ermöglicht einen effizienten protektiven Schutz.

Exogene Einflüsse, welche zu einer gesteigerten Freisetzung von ROS führen, wie z.B. Zigarettenrauch, Luftverschmutzung, UV-Strahlung, Stress, Entzündungsprozesse, etc., stellen für das endogene antioxidative Abwehrsystem eine große Herausforderung dar. Oft wird in diesem Zusammenhang von oxidativem Stress^[7] gesprochen. Zur Unterstützung des endogenen Abwehrsystems sollten daher natürliche Antioxidantien dem menschliche Körper durch ausgewogene Ernährung zugeführt werden. Zu den bekanntesten natürlichen Antioxidantien^[8] zählen die Vitamine C, E und A sowie Carotinoide. Neben den Vitaminen gibt es in Gemüse und Obst aber auch zahlreiche andere sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, welche einen positiven Effekt auf die menschliche Gesundheit haben. Die verbreitetste Klasse natürlich vorkommender Antioxidantien sind Polyphenole, beispielhafte Vertreter dieser Substanzklasse wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

3.1.2 Tocopherole (Vitamin E)

Tocopherole, auch als Vitamin E bekannt, wurden 1922 durch Evans und Bishop entdeckt^[9]. Eine erste Isolierung und Strukturbestimmung von α -Tocopherol wurde 1938 von Fernholz durchgeführt^[10]. Tocopherole sind Derivate des 2-Methyl-6-Chromanols mit einer langen gesättigten Phytlyseitenkette (isoprenoide C₁₆-Seitenkette) an C₂ sowie ein, zwei oder drei Methylgruppen am aromatischen Ring (C₅, C₇, C₈)^[11]. In der Natur kommt vor allem RRR- α -Tocopherol (D- α -Tocopherol) vor, welches auch die größte Vitamin E Aktivität zeigt. Dieses wird häufig von den drei Homologen β -Tocopherol, γ -Tocopherol und δ -Tocopherol begleitet^[12]. Die Grundstruktur ohne Methylgruppen am aromatischen Ring wird Tocol genannt und in der HPLC oft als interner Quantifizierungs-Standard eingesetzt. Als Nahrungsmittelzusatz (nutraceutical) wird industriell vor allem DL- α -Tocopherol-Acetat verwendet, bei dem die phenolische Hydroxylgruppe verestert vorliegt, wodurch die

Oxidationsanfälligkeit vermindert und damit die Stabilität stark erhöht ist. Im Körper wird das α -Tocopherol-Acetat dann zum aktiven α -Tocopherol hydrolysiert. Alle oben genannten Tocopherol-Homologe sowie Tocol und α -Tocopherol-Acetat sind zusammenfassend in Abbildung 1 dargestellt.



| <u>Homolog/Derivat</u> | <u>R₁</u> | <u>R₂</u> | <u>R₃</u> | <u>R₄</u> |
|-----------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Tocol | -H | -H | -H | -H |
| δ -Tocopherol | -H | -H | -CH ₃ | -H |
| γ -Tocopherol | -H | -CH ₃ | -CH ₃ | -H |
| β -Tocopherol | -CH ₃ | -H | -CH ₃ | -H |
| α -Tocopherol | -CH ₃ | -CH ₃ | -CH ₃ | -H |
| α -Tocopherol-Acetat | -CH ₃ | -CH ₃ | -CH ₃ | -COCH ₃ |

Abbildung 1: Strukturen der Tocopherole.

Die Tocopherole besitzen drei Chiralitätszentren (stereogene Zentren), C₂ im Chromanolsystem sowie C_{4'}, C_{8'} in der Phytylseitenkette. Daraus ergeben sich für jedes Homolog acht (2³) Stereoisomere. Die natürlich vorkommenden Tocopherole haben alle die Konfiguration 2R, 4'R, 8'R. Bei der Totalsynthese^[13] entsteht hingegen eine äquimolare, racemische Mischung aller acht Diastereomere (all-rac Tocopherole).

Tocopherole kommen in nahezu allen Lebensmitteln vor, wobei pflanzliche Quellen meist den tierischen an Vitamin E Gehalt überlegen sind^{[14],[15]}. Hohe Konzentrationen findet man in Speisefetten und -ölen, z.B. Maiskeimöl, Weizenkeimöl und Erdnussöl. Gute Quellen an Vitamin E sind z.B. Weizenkeimlinge, Erdnüsse, getrocknete Sojabohnen und Hefe. Relativ arm an Tocopherolen hingegen sind Gemüse und Obst, sowie alle tierischen Produkte. Hinzuweisen ist darauf, dass

der Gehalt an Vitamin E von der Herstellung, Lagerung und Zubereitung der Lebensmittel abhängt. Dabei zeigen Tocopherole relativ hohe Hitzebeständigkeit, Licht- und Luftzufuhr führen jedoch durch oxidativen Abbau zu erheblichen Verlusten.

Die biologische Wirksamkeit der Tocopherole ist verschieden stark ausgeprägt. α -Tocopherol zeigt die höchste biologische Wirksamkeit und erhält daher als diätische Referenz den Wert 100%^[12]. Die Aktivitäten einiger Tocopherole sind in Tabelle 1 zusammengestellt. In vitro zeigte α -Tocopherol eine der höchsten Aktivitäten bei der antioxidativen Eindämmung der Lipidautoxidation, ist im übrigen auch synthetischen Antioxidantien wie BHT (butylated hydroxytoluene) weit überlegen^[16]. Gründe für die differierenden Aktivitäten im menschlichen Organismus sind Unterschiede in der Resorptions- und Verteilungs-Kinetik der Tocopherole im menschlichen Körper (Bioverfügbarkeit), sowie der Aufnahme in die Zellmembran, dem Ort der antioxidativen Wirkung, welche durch die lipophile Phytyl-Seitenkette begünstigt wird.

| <u>Homolog/Derivat</u> | <u>Vitamin E Aktivität</u> |
|-------------------------------|-----------------------------------|
| α -Tocopherol | 100% |
| β -Tocopherol | 50% |
| γ -Tocopherol | 10% |
| δ -Tocopherol | 3% |
| α -Tocopherol-Acetat | 91% |
| all-rac α -Tocopherol | 74% |

Tabelle 1: Biologische Aktivität ausgewählter Tocopherole.

Nach der Nahrungsaufnahme wird Vitamin E zu ca. 30% im Dünndarm resorbiert. Der Großteil des resorbierten Tocopherols wird über das Lymphsystem, ein kleiner Teil über die Pfortader zur Leber transportiert. Dort werden sie in VLDL (very low density lipoprotein) inkorporiert, über die Blutbahn zu den Zellen des peripheren Gewebes transportiert und dort gespeichert. Eine Metabolisierung der Tocopherole im engeren Sinn gibt es nicht, ihre Elimination erfolgt durch fäkale Ausscheidung^[17].

Die antioxidative Wirkung von Vitamin E besteht darin, den Abbau von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (poly unsaturated fatty acids, PUFA), z.B. Linol-, Arachidon-

und Docosahexaensäure zu begrenzen und damit die Zerstörung der Membranlipide zu verhindern^{[18],[19],[20],[21]}. Dieser Lipidautoxidationsprozeß ist eine Radikalkettenreaktion (siehe Abbildung 2). Der Kettenstart erfolgt durch ein Initiator-Radikal (X^\bullet), z.B. ROS, welches von ungesättigten Fettsäure der Membranlipide (LH) ein Wasserstoffatom abstrahiert. Das so entstehende hochreaktive allylische Lipid-Radikal (L^\bullet) addiert sofort ein Sauerstoff-Molekül unter Bildung eines Lipidperoxyradikals (LO_2^\bullet). Durch Ketten-Propagation würde ohne Antioxidantien eine erhebliche Schädigung der Membranlipide resultieren. Vitamin E (EOH) ist dazu in der Lage, das Wasserstoffatom der phenolischen Hydroxylgruppe auf das Lipidperoxyradikal (LO_2^\bullet) zu übertragen, dieses so zu deaktivieren und die Kettenreaktion abubrechen. Das entstehende Tocopherylradikal (EO^\bullet) ist durch Resonanzstabilisierung sehr reaktions-träge und wird entweder synergetisch durch Co-Antioxidantien (z.B. β -Carotin, Vitamin C, Glutathion, Coenzym Q)^[22] regeneriert oder reagiert mit einem zweiten Lipidperoxyradikal zu einem stabilen quinoiden Addukt ab.

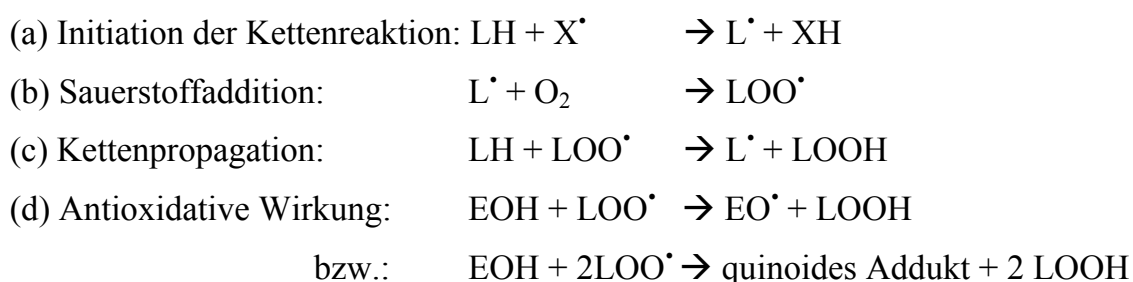


Abbildung 2: Lipidperoxidation und antioxidative Wirkung von Vitamin E.

Neben der Hemmung der Lipid-Oxidation sind Tocopherole auch dazu in der Lage, reaktiven Singlett-Sauerstoff (1O_2 , $^1\Delta_g$), einem nicht-radikalischen ROS, über einen charge-transfer-Mechanismus bzw. durch chemische Reaktion in den Triplett-Grundzustand (O_2 , $^3\Sigma_g^-$) zu deaktivieren^[23]. Nach Deaktivierung von 40 bis 120 Singlett-Sauerstoffmolekülen wird das Tocopherol-Molekül dann irreversibel zerstört.

3.1.3 Flavonoide

Flavonoide sind in höheren Pflanzen die mengenmäßig am häufigsten vorkommenden sekundären Pflanzeninhaltsstoffe. Ihr Name leitet sich vom lateinischen Wort flavus (gelb) ab und berücksichtigt so die Tatsache, dass die meisten Flavonoide in

reiner Form eine gelbliche Farbe aufweisen. Die Flavonoide haben deshalb großen Einfluss auf die Färbung von Blättern, Gemüse und Obst. Sie gehören zur Gruppe der Polyphenole und besitzen alle ein Grundgerüst bestehend aus zwei aromatischen Ringen (A- und B-Ring) sowie einem O-heterozyklischen C-Ring (siehe Abbildung 3)^[24].

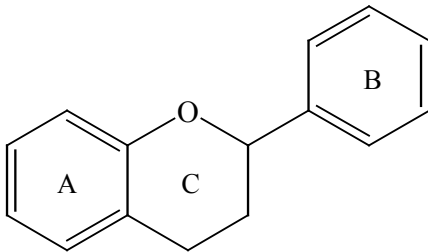


Abbildung 3: Flavonoid-Grundstruktur (2-Phenylchroman).

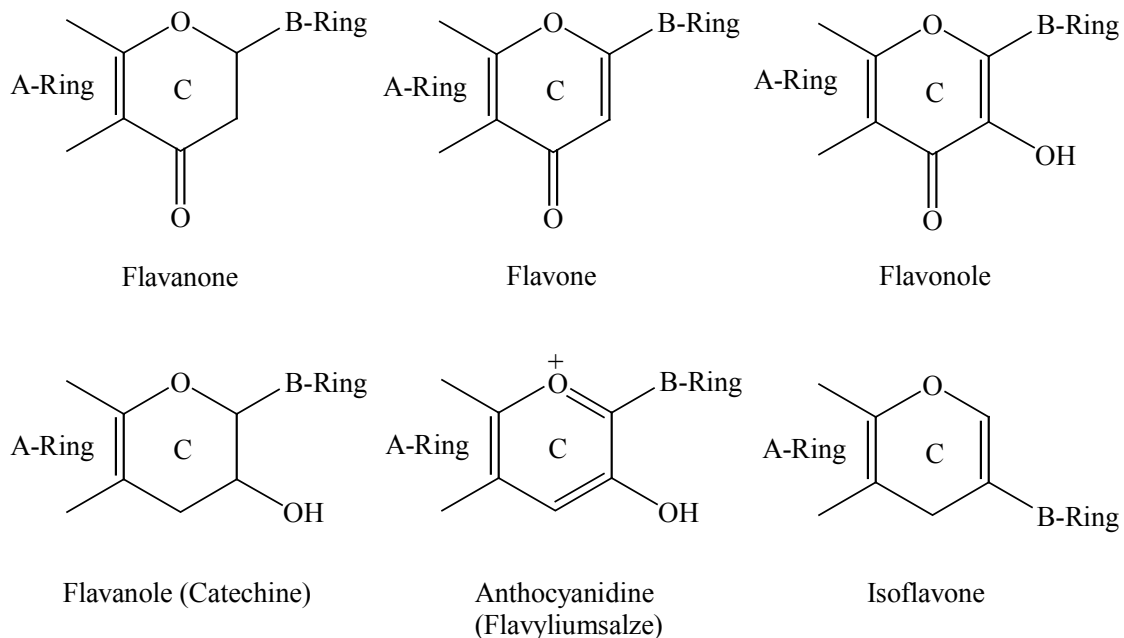


Abbildung 4: Hauptgruppen der Flavonoide.

Nach strukturellen Unterschieden im C-Ring des Grundgerüsts (Oxidationsgrad und Substitutionsmuster) werden sie in sechs Hauptsubkategorien unterteilt (siehe Abbildung 4), die individuellen Verbindungen unterscheiden sich im Substitutionsmuster des A- bzw. B-Ringes. Die meisten Flavonoide kommen in der Natur nicht in freier Form (Aglykon) vor, sondern als Flavonoid-Glykoside. Mehr als 80 verschiedene Zucker sind bisher in Flavonoid-Glykosiden nachgewiesen, nur selten sind dabei die für die antioxidative Wirkung entscheidenden phenolischen Hydroxylgruppen glykosiliert. Isoflavonoide stellen hier die Ausnahme dar. So entsteht eine große

Strukturvielfalt, welche sich in derzeit über 6500 bekannten Verbindungen widerspiegelt^[25].

Die Flavonoide befinden sich primär in den Randschichten der Pflanzen (z.B. der Rinde), in Blüten, sowie in den äußeren Blättern. Die Empfehlung, ungeschältes Obst oder Gemüse^[26] zu essen, hat also durchaus seine Berechtigung. Daneben kommen Flavonoide auch in Samen, Getreide, Nüssen, Gewürzen und Heilpflanzen^[27] (wie *Radix Astragali*), Rotwein, Bier und Tee^[28] vor. Die Rolle der Flavonoide für die Pflanzen ist vielfältig. Durch ihre intensive Färbung wirken Flavone, Flavonole und Anthocyanidine als visuelle Lockstoffe für Insekten, die für die Bestäubung der Fruchtstände unverzichtbar sind, Catechine und andere Flavanole können hingegen auch als Abwehrsystem gegen Schädlinge dienen. Flavonoide wirken ebenso als Katalysatoren in der Photosynthese und antioxidativ durch Neutralisierung von ROS^[29], analog zur gesundheitsfördernden Wirkung beim Menschen. Durch ihre starke UV-Absorption zwischen 200 – 400 nm wirken sie als pflanzeninterne Lichtfilter zum Schutz von Chloroplasten, sowie als gute ¹O₂-Quencher. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass Pflanzen, welche in vollem Sonnenlicht aufgezogen wurden, einen höheren Spiegel an Flavonoiden aufweisen, als solche Kontrollpflanzen, die im Schatten gezüchtet wurden.

Flavonoide spielen auf Grund ihrer potentiellen gesundheitsfördernden Effekte eine bedeutende Rolle in der Ernährung, da sie im Vergleich zu anderen antioxidativ wirkenden Substanzen durchschnittlich in vergleichsweise hohen Mengen (50 - 800 mg/d) aufgenommen werden^[8]. An Vitamin C werden im Vergleich dazu nur ca. 70 mg/d, an Vitamin E nur ca. 10 mg/d^[30] und an Carotinoiden nur ca. 2 mg/d über die Nahrung aufgenommen. Dennoch werden Flavonoide nicht zur Gruppe der Nutraceuticals gezählt. Die Aglykone werden im Dünndarm passiv absorbiert^[31], bestimmte Flavonoid-Glykoside auch aktiv, z.B. Quercetinglukosid im Gegensatz zu anderen Quercetin-Glykoside, über den intestinalen Na⁺/Glukose-Cotransporter. Quercetin wird so sehr effektiv nach oraler Aufnahme zu 36 – 53% absorbiert^[32], ob Flavonoide allerdings in Körpergeweben gespeichert werden können, ist noch unklar. Der Großteil der Metabolisierung^[33] erfolgt in der Leber (Glukuronidierung, Sulfatierung oder Methylierung), im Plasma werden die Metabolite zu 99% an

Albumin gebunden transportiert, was deren sehr langsame Eliminierung erklärt, und schließlich über den Gallensaft und größtenteils den Urin ausgeschieden.

Die positiven Wirkungen der Flavonoide sind vielzählig. So zeigen epidemiologische Studien, dass Personen, welche viel Obst und Gemüse verzehren und damit eine große Menge an Flavonoiden aufnehmen^[34], eine größere Resistenz gegen das Ausbrechen von Krankheiten^[35] wie Krebs^[36], Herzerkrankungen und Schlaganfall haben, dies könnte allerdings auch im Zusammenhang mit einem allgemein gesünderen Lebensstil der Probanden stehen. Daher sind die Ergebnisse epidemiologischer Studien eher kontrovers. Es gibt bisher keine eindeutigen Hinweise, dass die Aufnahme von Flavonoiden einen Krebs-protektiven Effekt hat, nur für Lungenkrebs konnte eine signifikante inverse Korrelation nachgewiesen werden^[37]. Etwas eindeutiger sind die Ergebnisse für die gesundheitsfördernden Wirkungen der Flavonoide beim Schutz vor koronaren Herzleiden und Schlaganfall, allerdings konnte eine signifikante inverse Korrelation nur in Bezug zur Sterblichkeitsrate, nicht zur Erkrankungsrate im Allgemeinen hergestellt werden. Da aber keine toxischen oder kanzerogenen Effekte der Flavonoide selbst bekannt sind, sollte eine Ernährung reich an Flavonoiden durchaus empfohlen werden. Von der Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln hingegen sollte abgesehen werden, da einige Flavonoid-Aglyka in vitro mutagenes und/oder gentoxisches Potential aufzeigten.

Die Aussagen über die antioxidative Wirkung von Flavonoiden in vitro sind eindeutiger. So hemmen Flavonoide Enzyme, welche an der Bildung von ROS beteiligt sind, wie z.B. die Xanthin-Oxidase^[38]. Flavonoide können zudem metallische Spurenelemente wie Eisen oder Kupfer chelatieren (siehe Abbildung 6), die an der Bildung des hoch aggressiven Hydroxylradikals beteiligt sind (siehe Abbildung 5). Besonders ausgeprägt scheint die Bindungstendenz einer Catechol-Gruppe im B-Ring zu sein^[39]. Hinzuweisen ist hier allerdings auch darauf, dass metallische Spurenelemente wichtig für viele essentielle physiologische Funktionen sind, unter anderem auch für die endogene antioxidative Abwehr.



Abbildung 5: Reaktion zur durch Metallionen vermittelten Bildung von Hydroxylradikalen.

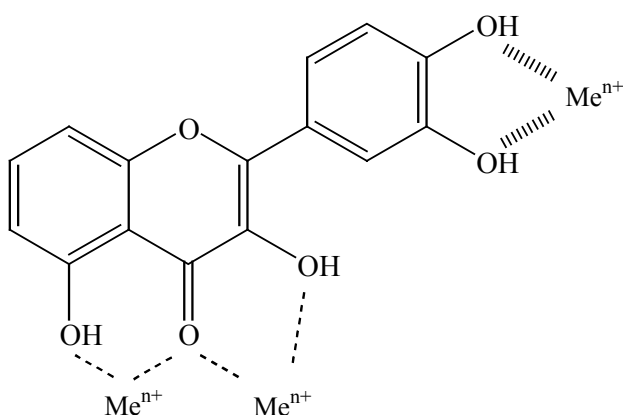


Abbildung 6: Potentielle Bindungsstellen der Flavonoide für Metallionen.

Wichtiger als die oben genannten indirekten Effekte ist wohl die direkte antioxidative Wirkung der Flavonoide. Diese sind dazu in der Lage, aggressive freie Radikale mit einem Redoxpotential zwischen 2,13 – 1,0 V, wie Superoxid-, Peroxyl-, Alkoxy- und Hydroxyl-Radikale, direkt unter Bildung einer stabilen Quinon-Struktur zu reduzieren (siehe Abbildung 7) und damit zu deaktivieren. Das als Zwischenstufe auftretende Aroxy-Radikal kann aber auch eine ungewollte prooxidative Wirkung ausüben. Neben der direkten Deaktivierung können Flavonoide freie Radikale durch Komplexierung stabilisieren.

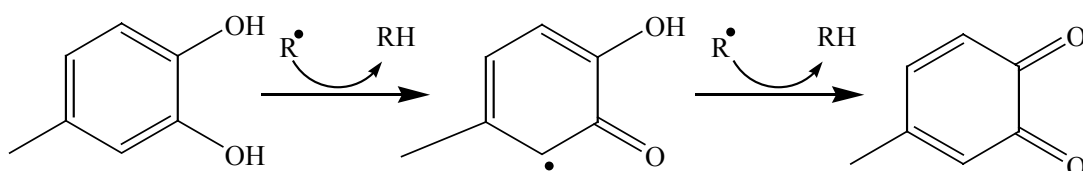


Abbildung 7: Desaktivierungsreaktionen von ROS (R^\bullet) durch Flavonoide.

Zur Korrelation des antioxidativen Potentials der Flavonoide mit deren Struktur wird der sogenannte TEAC-Wert (Trolox equivalent antioxidant concentration) bestimmt^[40], welcher als die Konzentration einer Trolox-Lösung (Trolox ist ein wasserlösliches Vitamin E Derivat, α -Tocopherol mit Carbonsäuregruppe anstelle der Phythylseitenkette) mit der gleichen antioxidativen Aktivität wie eine 1 mM Lösung des untersuchten Antioxidants definiert ist. Für die antioxidative Wirkung der Flavonoiden entscheidende Strukturelemente sind^[41]:

- Die Anzahl der phenolischen Hydroxylgruppen im B-Ring, insbesondere Catechol-Gruppen (Quercetin ist deutlich aktiver als Kaempferol).
- Eine Doppelbindung zwischen C_{2,3} im C-Ring steigert die Aktivität erheblich (so ist Quercetin ca. 2,5 mal so aktiv wie Taxifolin), da ein gebildetes Aroxyradikal über das gesamte Ringsystem delokalisiert werden kann.
- Eine Hydroxylgruppe an C₃ steigert die Aktivität mehr als eine Ketogruppe in C₄ (Catechin ist aktiver als Luteolin), eine Kombination beider Substituenten hingegen senkt die Aktivität (Catechin und Luteolin sind aktiver als Taxifolin).

Die TEAC-Werte der hier genannten Verbindungen sind in Tabelle 2 aufgelistet.

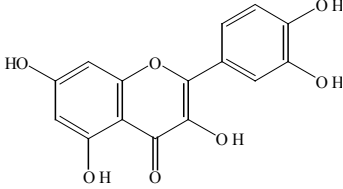
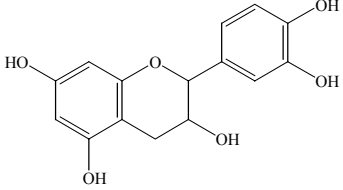
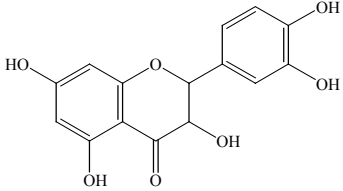
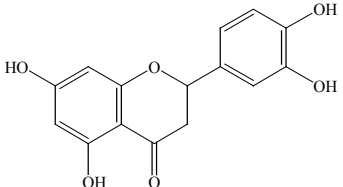
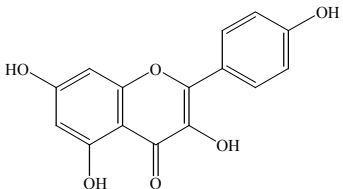
| | <u>TEAC [mM]</u> | | <u>TEAC [mM]</u> |
|---|------------------|--|------------------|
| Quercetin | | | |
|  | $4,7 \pm 0,1$ | | |
| Catechin | | Taxifolin | |
|  | $2,4 \pm 0,1$ |  | $1,9 \pm 0,1$ |
| Luteolin | | Kaempferol | |
|  | $2,1 \pm 0,1$ |  | $1,3 \pm 0,1$ |

Tabelle 2: Antioxidative Aktivität ausgesuchter Flavonoide.

Neben den oben angeführten antioxidativen Effekten konnten in vitro auch immunmodulatorische, meist immunsuppressive, sowie entzündungshemmende Wirkungen der Flavonoide nachgewiesen^[42] werden. Der pathophysiologische Gang von

Entzündungen mit den fünf Kardinalsymptomen und einigen daran beteiligten Mediatoren ist in Abbildung 8 schematisch gezeigt.

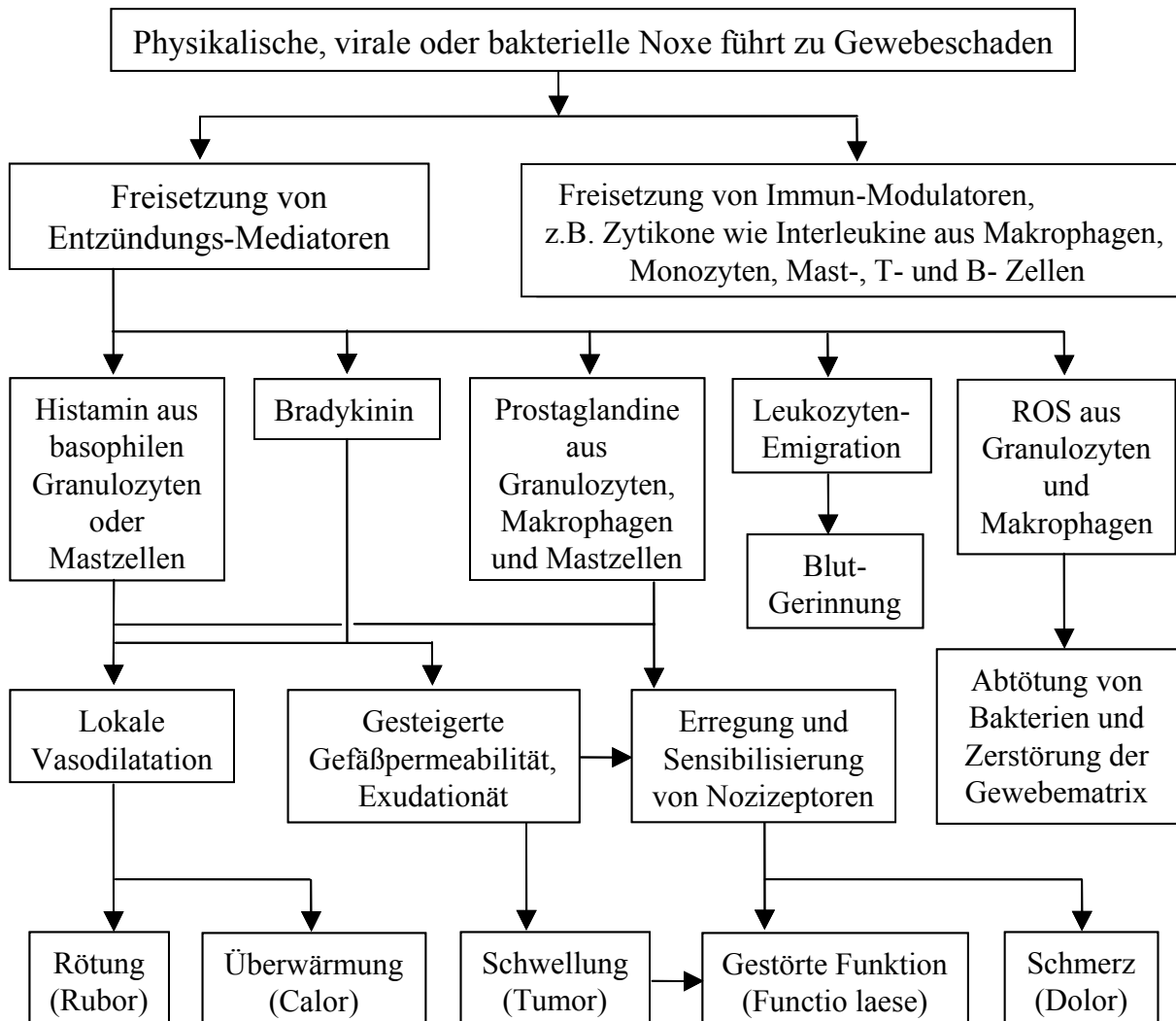


Abbildung 8: Vereinfachte Pathogenese und Symptome einer Entzündung.

Für das intensiv untersuchte Quercetin werden unter anderem folgende Wirkungsmechanismen diskutiert:

- Hemmung unspezifischer Entzündungszellen, wie Leukozyten (Granulozyten, Monocyten und Makrophagen), sowie des spezifischen Abwehrsystems der Lymphozyten durch
- Minimierung der Zytokin-Sekretion, z.B. Interleukin-1 und -2, damit
 - Hemmung von T-Lymphozyten, wie T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen.

- Hemmung von B-Lymphozyten und damit der Bildung von Immunglobulinen (Antikörpern).
- Hemmung der Histaminfreisetzung aus Mastzellen.

Als zentraler Angriffspunkt der Flavonoide im Immunsystem und im speziellen bei Entzündungsreaktionen gilt die Hemmung von Protein- und Protein-Tyrosin-Kinasen, welche für die Zellaktivierung wichtige Enzymsysteme sind und z.B. die Zytokin-synthese steuern (vgl. Kapitel 3.2.2). In vitro konnte die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine blockiert werden. Des weiteren vermindern bestimmte Flavonoide die Aktivität der Phospholipase A₂ und damit die Produktion von Prostaglandinen, welche mitverantwortlich für die Schmerzempfindung sind. Ebenso wird die Freisetzung weiterer Entzündungs-, Schmerz- und Immun-Mediatoren wie Histamin (Ödembildung, Schwellung) aus Mastzellen, basophile Granulozyten und Leukotrienen gehemmt. Neben diesen entzündungshemmenden Effekten zeigen einige Flavonoide auch antivirale Eigenschaften. Diese beruht wohl auf der Fähigkeit der Flavonoide, virale Proteine zu binden und die virale Nukleinsäuresynthese zu beeinträchtigen. Procyanidine zeigen zudem antimikrobielle Wirkung.

3.1.4 Phenolsäuren

Neben den reinen Polyphenolen kommen in Pflanzen, vor allem in aromatischen Gewürzen wie Oregano, Salbei und Bohnenkraut^[43], auch zahlreiche Phenolsäuren mit ausgeprägter antioxidativer^[44] und entzündungshemmender^[45] Wirkung vor. Monohydroxybenzoesäuren^[46] zeigen im allgemeinen kaum antioxidative Aktivität, deren Potential kann aber durch weitere phenolische Gruppen deutlich erhöht werden. Hydroxyphenyllessigsäuren sind meist aktiver, ebenso Derivate der Hydroxyzimtsäure. So zeigte z.B. die Kaffesäure einen dem Kaempferol vergleichbaren TEAC von 1,3 mM, die nur para-monophenolische Coumarinsäure mit einem TEAC von 2,2 mM eine antioxidative Aktivität zwischen Luteolin und Catechin^[41]. Andere Studien ermittelten sogar eine dem Quercetin vergleichbare antioxidative Aktivität. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein kommerzieller Extrakt von *Rosmarinus officinalis* (Rosmarin) untersucht, welcher einen Ester der Kaffesäure, die sogenannte

Rosmarinsäure^[47] enthält. Daneben konnten zwei weitere Phenolsäurederivate mit einer catechol-ähnlichen diphenolischen Benzeneinheit detektiert werden, das Carnosol und die Carnosolsäure. Die Strukturen der untersuchten natürlichen Phenolsäuren sind in Abbildung 9 gezeigt.

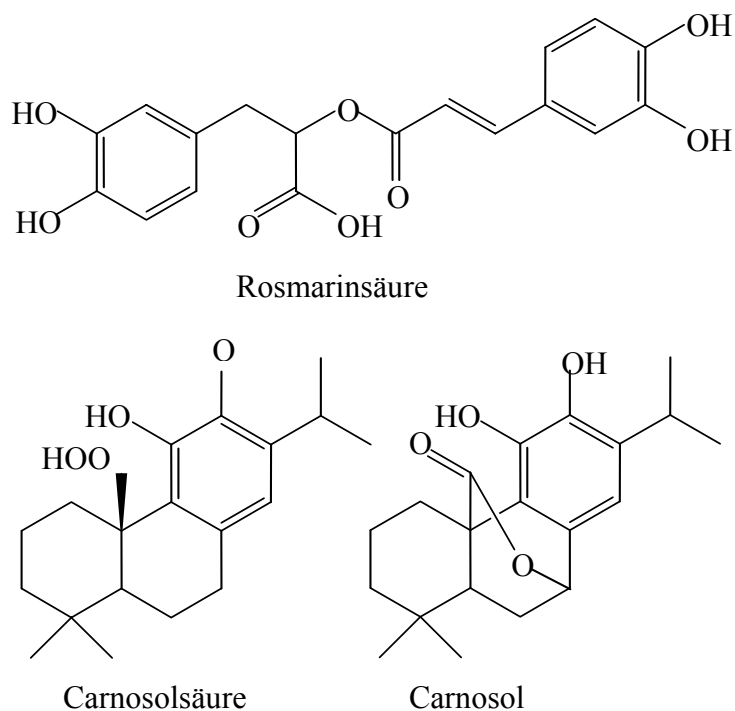


Abbildung 9: Beispiele natürlicher Phenolsäuren.

3.1.5 Anwendung von *Radix Astragali* in der traditionellen chinesischen Medizin (TCM)^[48]

Heilpflanzen der traditionellen Medizin, wie *Radix Astragali* in der chinesischen Heilkunde, haben oft als Kombinationspräparate eine lange Geschichte in der erfolgreichen Behandlung vieler Krankheiten. Die Analyse einzelner Substanzen aus diesen Heilpflanzen und die Bestimmung deren physiologischer und therapeutischer Aktivität ist daher zunehmend von bedeutendem Interesse in der pharmazeutischen Forschung zur Gewinnung von Leitstrukturen und damit der Entwicklung neuer Medikamente.

Radix Astragali^[49] ist die getrocknete Wurzel von Pflanzen der botanischen Familie Leguminosae mit über 1750 Vertretern dieser Art. Hauptspezies sind *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge und *Astragalus mongholicus* Bunge (Fabacea), deren pulverisierte Wurzeln als medizinische Präparate unter viele Namen



bekannt sind, z.B. Huang Qi. Die Pflanze selbst (siehe Abbildung 10) ist ein ca. 1 m hoher, stacheliger Busch mit 8 - 12 Blättern je Ast. Die unverzweigten, 30 - 90 cm langen Wurzeln, geerntet von 4 - 5 Jahre alten Pflanzen, werden überwiegend zu medizinischen Präparaten weiterverarbeitet.

Abbildung 10: *Astragalus membranaceus* und dessen Wurzeln.

Radix Astragali wird seit Jahrhunderten verschrieben, um Debilität und Senilität (speziell bei älteren Personen) zu mindern, chronische Krankheiten, wie Diabetes mellitus und Krebs, zu bekämpfen und allgemein die Vitalität („Qi“) zu verbessern. So wird es zur Behandlung von Diarrhö, Ermüdungszuständen, spontanem Schwitzen und Appetitlosigkeit angewendet, ebenso wird von positiven Effekten bei Erkältungen, Kurzatmigkeit, entzündlichen Prozessen wie Halsschmerzen, Fieber, Geschwürbildung, Ödemen und Allergien, sowie AIDS und Hepatitis berichtet. Seit Mitte der neunziger Jahre gehört es daher zu den meist gekauften Heilpflanzenpräparaten in den USA.

Einige der oben genannten positiven Effekte konnten auch *in vitro* und *in vivo* wissenschaftlich belegt werden. So wurden eine immunstimulierende Wirkung^[50], Behandlungserfolge bei kardiovaskulären Herzleiden und *in vitro* antibakterielle Wirkung^[51] nachgewiesen. Auch wird von positiven Entwicklungen bei der Behandlung von Nephritis und in Tierversuchen bei Senilität^[52] berichtet. Diese positiven Wirkungen werden in Zusammenhang gestellt mit den biomedizinisch aktiven Substanzen, welche in *Radix Astragali* vorkommen. Dazu gehören Triterpen Saponine (Astragaloside) und Polysaccharide (z.B. Astragalan)^[53], biogene Amine (wie GABA, γ -Aminobuttersäure)^[54], Alkaloide, metallische Spurenelemente (z.B. Selen) und Isoflavonoide, welche im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden^[55]. Die

Isoflavonoide tragen einen erheblichen Teil zur antiviralen Wirkung, sowie zu den für die Flavonoide bereits beschriebenen antioxidativen Effekten bei.

3.2 Peptide^{[56][57]}

Peptide sind Polymere bestehend aus α -Aminosäuren, welche durch Kopplung der Carbonsäuregruppe der einen und der Aminogruppe der anderen Aminosäure eine Amidbrücke, auch Peptid-Bindung genannt, bilden (siehe Abbildung 11). Die daraus entstehenden Oligomere nennt man Peptide, lange natürliche Polypeptide heißen Proteine bestehend aus zum Teil über 8000 Aminosäure-Monomeren unter zusätzlicher Verknüpfung mehrerer Polypeptidketten über Disulfid- oder Wasserstoffbrückenbindungen. Obwohl mehr als fünfhundert natürliche Aminosäuren bekannt sind, bestehen Proteine zum größten Teil nur aus zwanzig unterschiedlichen Aminosäuren, acht davon essentielle Aminosäuren muss der Mensch über die Nahrung aufnehmen. 19 dieser Aminosäuren haben am C_α -Chiralitätszentrum S-Konfiguration, die Ausnahme Glycin besitzt kein asymmetrisches C_α . Aufgrund ihrer amphoteren Eigenschaften liegen sie meist als zwitterionisches Ammoniumcarboxylat vor, bei stark saurem pH-Wert als Kation (protonierte Aminogruppe) bzw. in stark alkalischer Lösung als deprotoniertes 2-Aminocarboxylat-Anion.

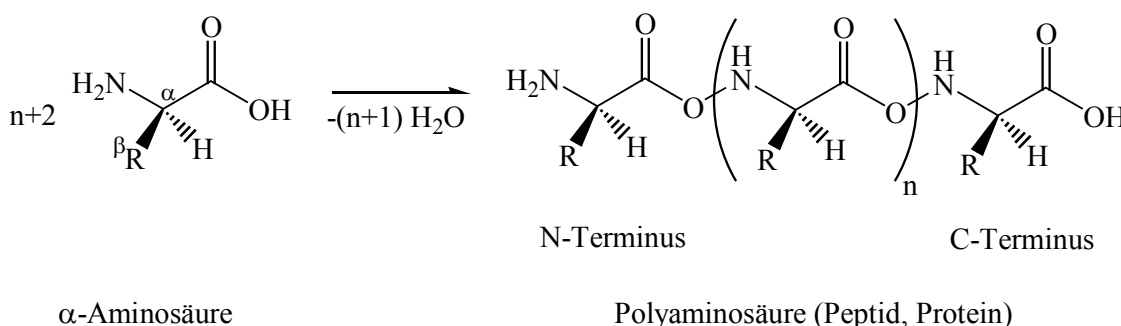


Abbildung 11: Polymerisation von α -Aminosäuren zu Peptiden.

Proteine erfüllen in biologischen Systemen die unterschiedlichsten Aufgaben, so biokatalysieren sie viele chemische Reaktionen (Enzyme), dienen als Transport- (Sauerstoff wird z.B. durch die Proteine Myoglobin und Hämoglobin transportiert) und Speichersysteme (z.B. Lipoproteine wie VLDL, LDL), spielen eine entscheidende Bedeutung in der koordinativen Bewegung wie der Muskelkontraktion, dienen als

Antikörper der Immunabwehr (Immunglobuline) oder wirken antibakteriell bzw. antimikrobiell, übertragen Nervenreize, sind Hormone (z.B. Insulin, Glucagon, adrenocorticotrope Hormone, Endorphine, Oxytocin, Vassopresin) oder kontrollieren den genetischen Code. So gelten sie als Bindeglieder vieler moderner „Omics“-Forschungszweige wie Proteomics (Untersuchungen von Proteinen und ihrer Aufgaben), Genomics (DNA-Aufbau, Informationsspeicherung und Nutzung), Metabolomics (Untersuchungen zur Resorption, Verteilung, Metabolisierung, Speicherung und Elimination von Substanzen im menschlichen Körper) und durch den Verkauf von Medikamenten spielen sie sicher auch eine wichtige Rolle in den „Economics“.

3.2.1 Biomedizinisch aktive Peptide

Die im Rahmen meines Forschungsaufenthaltes an der Universität Oslo, Norwegen, untersuchten Peptide zeigen alle bioaktive Wirkungen im menschlichen Körper. Ihr Nachweis in Gewässerproben, gerade auch in geringsten Konzentrationen (ppm oder niedriger) ist somit von entscheidendem Interesse für die Gesellschaft, da eine ungewollte oder auch gewollte, z.B. in Form von Biowaffen, Kontamination von Trinkwasser erheblichen Einfluss auf den Menschen haben kann. Die wichtigsten biologischen Funktionen der untersuchten Peptide (Corazonin, Bradykinin, Angiotensin II, Neurotensin, Bombesin und Substanz P, deren Aminosäuresequenzen in Tabelle 3 zusammengefasst sind) sollen im folgenden kurz beschrieben werden.

| <u>Peptid</u> | <u>Aminosäuresequenz</u> | <u>MW [g/mol]</u> |
|----------------------|--|--------------------------|
| Corazonin | Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe | 1046,2 |
| Bradykinin | pGlu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH ₂ | 1672,9 |
| Angiotensin II | Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg | 1060,2 |
| Neurotensin | pGlu-Thr-Phe-Gln-Tyr-Ser-Arg-Gly-Trp-Thr-Asn-NH ₂ | 1369,5 |
| Bombesin | pGlu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu | 1672,9 |
| Substanz P | Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂ | 1347,6 |

Tabelle 3: Untersuchte bioaktive Peptide.

Das Octapeptid Angiotensin II ist das biologisch aktivste Produkt des Renin-Angiotensin-Systems^[58] (siehe Abbildung 12). Es wirkt stark vasokonstriktorisch

(gefäßverengend) und damit blutdrucksteigernd^[59]. Sogenannte ACE (angiotensin converting enzyme) Inhibitoren werden deshalb seit geraumer Zeit als moderne Antihypertensiva eingesetzt, sie zeigen aber auch zahlreiche Nebenwirkungen. Angiotensin II Rezeptor Blocker werden seit kurzem als den ACE Inhibitoren überlegene Antihypertensiva diskutiert^[60]. Daneben stellt es den größten Stimulus für die Biosynthese aus Progesteron und die Sekretion des Mineralocorticoids Aldosteron durch die Nebenniere dar und beeinflusst somit die Reabsorption von Natrium- und Chloridionen in der Niere bzw. steigert die Ausscheidung von Kalium- und Ammoniumionen aus dieser. Aldosteron wiederum verlangsamt die Natriumauscheidung über die Schweißdrüsen, die Speicheldrüsen und die Intestinalflüssigkeit. Bei Übersekretion besteht die Gefahr der Ödembildung.

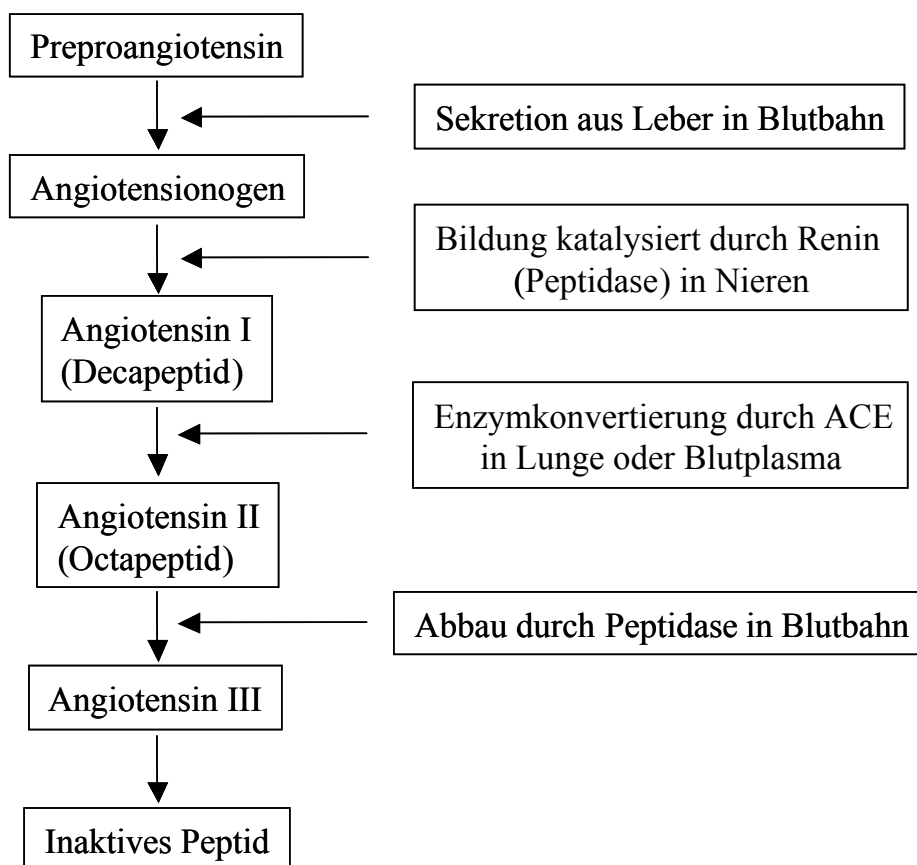


Abbildung 12: Renin-Angiotensin-System.

Eine dem Angiotensin entgegengesetzte, vasodilatatorische Wirkung^[61] zeigen eine Unterklasse der Gewebshormone mit Peptidcharakter, die sogenannten Kinine. Bekanntester Vertreter ist das Nonapeptid Bradykinin, was als ACE Inhibitor und

Angiotensin proteolytisch (abbauend) wirkt. Es wird im Blutplasma durch proteolytische Abspaltung (Kallikrein-Proteasen) aus Kininogenen gebildet (Kallikrein-Kininogen-Kinin-System) und führt neben der Vasodilatation auch zur Erregung der glatten Muskulatur (Bronchien, Magen-Darm-Trakt, daher der Name griech.: kinein = bewegen), zur Erhöhung der Gefäßpermeabilität, was zu Ödemen führen kann. Daneben zeigt es chemotaktische Wirkungen durch Stimulation der Leukozytenemigration, typische Teilfaktoren von Entzündungsprozessen (vgl. Abbildung 8, Seite 13). Zur Gruppe der peptidartigen Gewebshormone zählen im Übrigen auch die Prostaglandine, ebenfalls wichtige Entzündungsmediatoren, deren Ausschüttung durch Kinine mitbeeinflusst wird. Somit sind Kinine an der Schmerzempfindung und an der Blutgerinnung beteiligt und stimulieren außerdem die Glucoseaufnahme in Muskelzellen.

Eine weiteres Peptid mit Kinin-artiger Wirkung ist die Substanz P, benannt 1934 von Guddan und Schild^[62]. Es wird in Darm und Hypothalamus aus verschiedenen Polyproteinen gebildet und gehört zur Gruppe der Tachykinine. Die Substanz P wirkt anregend auf die Darmperistaltik und andere Muskelzellen, z.B. Herzmuskelzellen^[63], gefäßerweiternd (vasodilatatorisch) und damit blutdrucksenkend, sowie den Speichelfluss aktivierend. Als Neurotransmitter ist es an der Schmerzleitung beteiligt, steht in Wechselwirkung mit Hormonen (z.B. Serotonin)^[64] und dem Neurotransmitter Acetylcholin. Ausserdem ist es an Entzündungsprozessen durch Aktivierung von Immunzellen mitbeteiligt^[65]. Zu den im Hypothalamus gebildeten Neuropeptiden zählt auch das Neurotensin, ein Oligopeptid bestehend aus 13 Aminosäuren. Als Neurotransmitter aktiviert es z.B. Dopamin-D₁ Rezeptoren durch Hemmung der Phosphorylierung einer Tyrosin-Einheit beteiligter Enzyme^[66], als Neurohormon senkt es den Blutdruck, erhöht die Gefäßpermeabilität, löst Dünndarmkontraktionen aus, erschlafft aber im Gegensatz dazu die Muskulatur des Zwölffingerdarms, hemmt die Magensäuresekretion^[67], beeinflusst den Plasmaspiegel von Glucagon und Glucose und wirkt stark analgetisch (schmerzlindernd).

Zwei weitere bioaktive Peptide wurden mit in die Studie aufgenommen, deren Hauptvorkommen allerdings im Tierreich liegt. Dies waren das pharmakologisch wirksame Peptid Bombesin (aus der Haut von Amphibien), welches die Magensaft-

und Bauchspeicheldrüsensekretion erheblich stimuliert, daneben aber auch hypertensive, antidiuretische und antihyperglykämische Eigenschaften aufweist sowie in hohen Konzentrationen in menschlichen Lungenkarzinom-Zellen gefunden wird. Ebenso wurde das Peptid Corazonin untersucht, das als Neuropeptid in der Drosophila-Fliege an der Apoptosis^[68] (programmierter Zelltod) beteiligt ist oder dessen [His⁷]-Derivat auch für die Färbung (siehe Abbildung 13) von *Schistocerca gregaria* Heuschrecken ausschlaggebend ist^[69]. Die dunkle Färbung tritt bei Überpopulation auf und dient als Trigger für massenhafte Wanderung.



Abbildung 13: *Schistocerca gregaria*.

3.2.2 Zellregulation durch Peptid-Phosphorylierung

Peptid- und Proteinphosphorylierung zählt zu den wichtigen biochemischen Reaktionen im menschlichen Körper. Die wohl bedeutendste oxidative Phosphorylierungsreaktion in tierischen Organismen ist die Bildung von Adenosin-Triphosphat (ATP, Gruppe der Pyrophosphate). Die Energiegewinnung und -konservierung erfolgt dabei durch Kopplung einer exergonen Redoxreaktion mit einer endergonen Reaktion über ein gemeinsames Zwischenprodukt, dem ATP. So speichert es in Form von ATP die freiwerdende Energie exergoner Reaktionen (meist Redoxreaktionen) und gibt diesen fixierten Energiebetrag bei energieverbrauchenden Reaktionen (Biosynthesen, Muskelkontraktion, Nervenerregung, etc.) durch Spaltung in Adenosin-Diphosphat (ADP) und anorganisches Phosphat wieder frei. Die Bildung von ATP verläuft nach den folgenden drei Reaktionswegen:

- Transphosphorylierung, die Übertragung einer Phosphatgruppe von einer energiereichen Verbindung zur Nächsten. Von Bedeutung sind hier vor allem die Adenylat-Kinase und die Kreatin-Kinase (Muskel- und Nervenzellen).
- Substratkettenphosphorylierung, z.B. bei der Glykolyse oder im Citratzyklus.

- Atmungskettenphosphorylierung, die Hauptenergiequelle aerob lebender tierischer Organismen.

Die Phosphorylierung von Proteinen spielt jedoch auch bei der direkten Regulation von Zellen eine wichtige Rolle. Dort wird durch Protein-Kinasen, substratspezifischen Phospho-Transferase-Enzymen, die terminale Phosphat-Einheit von ATP (oder GTP) auf nukleophile alkoholische Hydroxylgruppen der Aminosäuren Serin (S) und Threonin (T) oder auf die phenolische Hydroxylgruppe des Tyrosins (Y) übertragen. Durch diese kovalente Protein-Modifikationen wird dessen Funktion modifiziert. Hinzuweisen ist darauf, dass Protein-Kinasen zu den selten vorkommenden Enzymen zählen und die Phosphorylierungsreaktionen meist nicht stöchiometrisch sind. Neben der oben genannten Phosphorylierung anderer Proteine tritt auch Autophosphorylierung der Protein-Kinasen selbst auf. Im Rahmen dieser Arbeit wurde solch eine regulatorische Phosphorylierung der menschlichen Protein-Tyrosin-Kinase ZAP-70 am tryptischen Fragment der Aminosäuren 485-496 (Sequenz: ALGADDS YYTAR) untersucht, welches spezifisch an den Tyrosineinheiten Y-492 und Y-493 als nicht, zwei mono- und ein di-phosphoryliertes Peptid synthetisiert wurden. ZAP-70 ist ein kritischer Parameter bei der Signalweiterleitung zu T-Zellen, wobei es nach spezifischer Phosphorylierung der Tyrosineinheit Y-493 durch katalytisch wirkende Protein-Tyrosin-Kinasen der Familie src bzw. Autophosphorylierung aktiviert wird, dann an die phosphorylierten Immunorezeptoren von T-Lymphozyten-Zellen bindet und diese stimuliert, was in der Freisetzung von Interleukin-2 (Zytokine) und damit Antigen-Ausschüttung mündet (Immunabwehr)^[70]. Neben diesen positiv regulierenden, gibt es auch negativ regulierende Phosphorylierungsstellen. So wird ZAP-70 durch spezifische Dephosphorylierung der Tyrosineinheit Y-292 durch die low molecular weight Protein-Tyrosin-Phosphatase (LMPTP) ebenfalls aktiviert^[71]. Hauptgrund dieser Effekte sind wohl konformelle Strukturänderungen der phosphorylierten Proteine^[72], nachgewiesen z.B. am aktivierten Insulin Rezeptor Tyrosin-Kinase^[73].

4 Analytik von biomedizinisch aktiven Substanzen

Die Analyse von bioaktiven Substanzen aus komplexen Matrizes beinhaltet die Teilschritte der Extraktion der Analyten aus ihrer biologischen Matrix, die chromatographische Trennung der Komponenten des Extraktes, sowie die spektroskopische oder spektrometrische Detektion der eluierenden Substanzen. Die kombinierte Auswertung der unterschiedlichen Daten ermöglicht schließlich eine eindeutige Identifikation, Quantifikation und Strukturaufklärung des betreffenden Analyten. Die Grundlagen der angewandten Techniken, vor allem in Hinblick auf deren Miniaturisierung, sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

4.1 Schonende Extraktion instabiler Analyten

Die Bestimmung von Analyten, welche in komplexen Matrizes, wie z.B. in Lebensmitteln, Pflanzen, sowie menschlichem und tierischem Blutserum, Urin oder Gewebe, gebunden sind, benötigt eine genau auf den Analyten und die jeweilige biologische Matrix zugeschnittene Probenvorbereitung. Diese umfasst die Teilschritte der Probenvorbehandlung und Extraktion, welche zu einer Aufreinigung sowie Aufkonzentrierung des Analyten führen sollten. Nur eine vollständige, reproduzierbare und artefaktfreie Extraktion der Substanzen garantiert eine gelungene Analyse und damit verbunden die Möglichkeit der quantitativen Bestimmung. Gerade die schonende Extraktion von instabilen Analyten, wie beispielsweise natürlicher Antioxidantien, stellt eine fortwährende Herausforderung für den Analytiker dar. Auf Grund der Komplexität der Analyteigenschaften und biologischen Probenmatrizes gibt es keine universelle Extraktionsmethode. Die Entwicklung einer zugeschnittenen Probenaufbereitung ist somit oft ein zeitaufwendiger und arbeitsintensiver Analysenschritt, sowie die Hauptursache für Ungenauigkeiten und Fehler, wird aber dennoch häufig unterschätzt.

Auf dem Gebiet moderner Extraktionsmethoden wurden in den letzten zwei Jahrzehnten große Fortschritte erzielt. Neben verbesserten Flüssig-Flüssig-Extraktionsmethoden werden zunehmend schonende Festphasenextraktionen (Solid Phase Extraction, SPE) für die Isolierung von biomedizinisch aktiven Substanzen

eingesetzt. Diese können direktgekoppelt an eine chromatographische Trenntechnik und diverse Detektoren eine simultane Isolierung, Aufkonzentrierung, Trennung sowie eindeutige Identifizierung von instabilen Verbindungen gewährleisten und das bei drastischer Reduktion der Analysenzeit, was ein effizienteres Screening von pharmakologischen Proben ermöglicht (High-Throughput Analysen).

4.1.1 Flüssig-Flüssig-Extraktionstechniken

Das Prinzip der Flüssig-Flüssig-Extraktion beruht auf einer Gleichgewichts-Verteilung (Nernstscher Verteilungssatz) der Analytmoleküle zwischen einer flüssigen Phase und einem damit nicht mischbaren Extraktions-Lösungsmittel. Gravierender Nachteil dieser Extraktionsart ist der hohe Verbrauch an organischen Lösungsmitteln, um die Gleichgewichtseinstellung positiv zu beeinflussen. Zur Einengung und damit Aufkonzentrierung der Analyten muss dieses Lösungsmittel oder –gemisch aber oft bei erhöhter Temperatur wieder entfernt werden. Die Extraktionsart ist daher meist sehr zeitaufwendig und führt oftmals neben schlechter Aufkonzentrierungsraten auch zu Isomerisierung, Artefaktbildung oder gar vollständigen Zerstörung der Analytmoleküle.

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion ist so nicht die Methode der Wahl zur schonenden Anreicherung von instabilen Substanzen. Da sie aber einfach durchführbar ist, wird sie weiterhin vielfach angewendet. Ebenso wurden optimiertere Varianten oder auf dem Grundprinzip basierende modernere Extraktionstechniken wie die ultrasound^[74]- oder accelerated- solvent extraction^[75] entwickelt.

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

Die Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) hat sich im Verlauf der letzten 20 Jahre zur leistungsstärksten Methode der selektiven Anreicherung von Analyten mit beinahe unbegrenzter Anwendungsbreite entwickelt^[76]. Ihr Prinzip beruht, wie bei der Flüssigkeitschromatographie, auf der Extraktion eines Analyten oder meist einer Substanzgruppe mit ähnlicher Polarität aus einer flüssigen oder gelösten Probe durch selektive Wechselwirkungen mit einer festen Phase (Sorbentmaterial) und einer flüssigen Phase. Es gibt eine Vielzahl an Sorbentien, die auf den

ganzen möglichen Polaritätsbereich von Analyten angewendet werden können, meist sind dies oberflächenmodifizierte Kieselgele für den mittleren und niedrigen Polaritätsbereich, (u.a. mit Alkyl-, Hydroxyl-, Amino- oder Phenylresten), sehr lipophile nichtquellbare Polymere oder mit zunehmendem Interesse Ionenaustauscher für kationische oder anionische Analyten. Daneben gibt es auch Sorbentien, die Größenunterschiede der zu untersuchenden Substanzen ausnutzen (size exclusion), oder beide oben genannten Prinzipien kombinieren wie die RAM-Sorbentien (restricted access materials)^[77].

Einer der größten Vorteile dieser Extraktionsmethode ist die einfache Automatisierbarkeit. Als Vorsäule kann die SPE-Kartusche unter Verwendung einer Säulenschaltung bestehend aus zwei Ventilen direkt in das konventionelle HPLC-System integriert werden. Die SPE-HPLC-Kopplung stellt somit eine selektive Extraktionsmethode zur hohen artefaktfreien Anreicherung von licht- und sauerstoffempfindlichen Substanzen^[78] dar, welche bei minimiertem Probenhandling und Lösungsmittelverbrauch gute Reproduzierbarkeit ermöglicht. Zudem ist sie in on-line gekoppelten Systemen auch einfach miniaturisierbar. Solch ein miniaturisiertes on-line Mikro-SPE-CapLC-System ist in Abbildung 14 gezeigt.

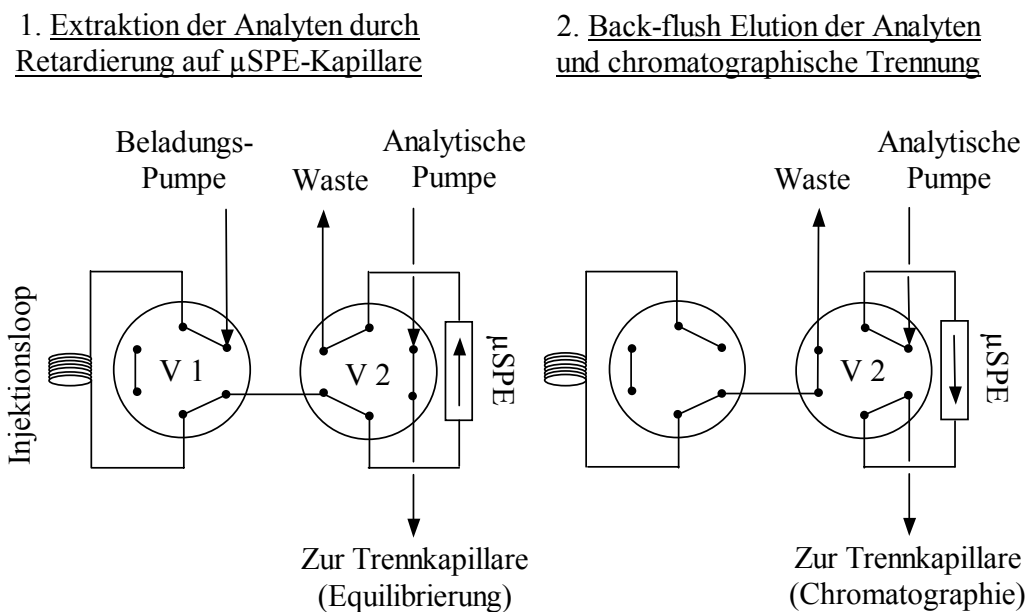


Abbildung 14: Schematische Durchführung der Mikro-SPE-CapLC-Kopplung.

Das System baut auf zwei voneinander unabhängigen Kreisläufen auf, die μ SPE-Extraktionskapillare ist Bestandteil beider Kreisläufe. In einem ersten Schritt werden die gelösten oder flüssigen Analyten mit einer nicht eluierenden Phase (bei RP-Sorbentien meist wässrigen Phase) auf die Mikro-SPE-Kapillare geladen. Die Analytmoleküle werden auf der SPE-Kartusche retardiert, während etwaige Interferenzen in diesem Schritt eluiert werden. Dies führt zu einer Aufkonzentrierung der zu untersuchenden Komponenten im Extraktionskreislauf. Gleichzeitig dazu wird im Trenn-Kreislauf die analytische Trennkapillare mit einer geeigneten mobilen Phase für die Chromatographie äquilibriert. Nach der Beladung der μ SPE-Kartusche wird Ventil 2 umgeschaltet, die Analyten werden meist im back-flush Modus (Rückwärtsfluss) mit der mobilen Phase vom Sorbensmaterial eluiert (und dabei refokussiert), zur analytischen Kapillare transferiert und dort chromatographisch aufgetrennt. Ein Trocknungsschritt der SPE-Kartusche mit Helium nach der Beladung wie in der klassischen SPE-HPLC üblich ist nicht nötig, da die geringen Mengen an polarer Beladungsphase in den Transferwegen meist die Kapillar-HPLC-Trennung nicht stören.

4.1.3 Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD)

Voraussetzung für die SPE ist eine flüssige oder gelöste Probe, die direkte Anwendung auf feste oder viskose Proben ist also nur schwer verwirklichtbar. Deshalb wurde 1989 von Barker^[79] eine Extraktionsmethode speziell für tierisches und pflanzliches Gewebe entwickelt, die sogenannte Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD)^[80]. Auf Grund ihrer einfachen Handhabung und des geringen Zeitaufwands hat sich die MSPD seit ihrer Entwicklung auf dem Gebiet der Lebensmittel-, Naturstoff- und klinischen Analytik etabliert und findet dort vermehrt Anwendung^[81]. Leider ist diese gelungene Extraktionsmethode nur schwer automatisierbar.

Bei der MSPD wird zuerst die zu analysierende Probenmatrix mit einem abrasiven Sorbensmaterial, z.B. einem alkylierten Kieselgel, mechanisch zu einem rieselfähigen Pulver zerrieben. Dadurch wird die Struktur der Probenmatrix zerstört und die Analyten homogen auf der Oberfläche des Sorbensmaterials verteilt. Das rieselfähige Pulver wird so für eine Festphasenextraktion (SPE) zugänglich, der gesuchte Analyt

kann durch die Wahl eines geeigneten Lösungsmittels selektiv extrahiert und angereichert werden. Selbst extrem instabile Analyten aus schwer zugänglichen Probenmatrizes werden so schnell, reproduzierbar, artefaktfrei und quantifizierbar extrahiert. Die Extrakte können meist ohne weitere Aufarbeitung in die HPLC injiziert werden. Die Teilschritte der MSPD sind nochmals schematisch in Abbildung 15 skizziert.

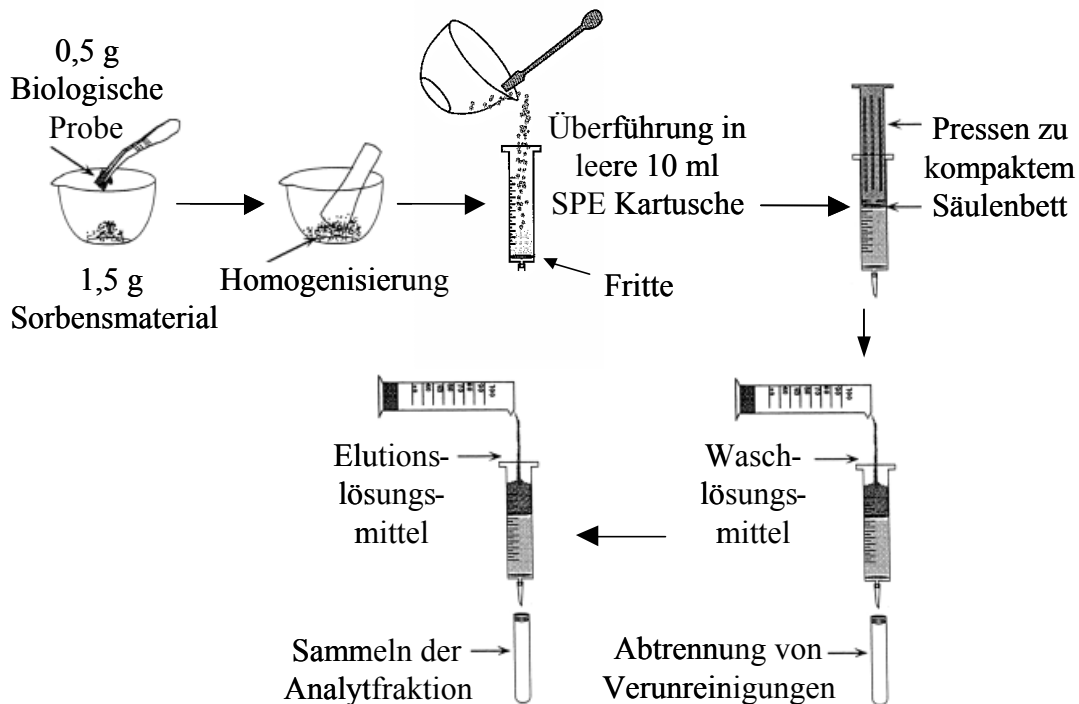


Abbildung 15: Schematischer Ablauf der MSPD.

4.2 Kapillar-Hochleistungsflüssigchromatographie (CapLC)

4.2.1 HPLC-Grundlagen^[82]

Die HPLC beruht auf einem physikalisch-chemischen Trennprozess, erstmals beschrieben 1906 von Tswett^[83], wobei ein zu trennendes Probengemisch in einer mobilen Phase gelöst und unter hohem Druck durch eine mit einer stationären Phase gefüllte Trennsäule gepumpt wird. Durch unterschiedlich starke Wechselwirkungen der Analyten mit der stationären Phase ergeben sich verschieden lange Verweilzeiten in der stationären Phase, welche die Auftrennung der Komponenten ermöglicht. Neben der Verweilzeit, ausgedrückt in der Retentionszeit t_r (oder dem Retentionsfaktor k'),

gelten die Trenneffizienz (z.B. die Anzahl an theoretischen Böden N in einem Peak) und die Trennselektivität (meist als Trennfaktor α angegeben) als wichtige Kerngrößen. Diese Parameter können durch die Wahl der mobilen Phase (z.B. Art und Zusammensetzung der Lösungsmittel, pH-Wert, Temperatur, Flussrate, bzw. Gradienten dieser Parameter), wie auch der stationären Phase variiert und optimiert werden.

Es gibt eine Vielzahl unterschiedlicher stationärer Phasen, welche sich in der Oberflächenmodifikation oder den Eigenschaften des Trägermaterials unterscheiden. Als Trägermaterial dienen meist organische (z.B. Polystyren/Divinylbenzen) oder anorganische (meist Kieselgel) Polymere, entweder als Partikel oder monolithische, quervernetzte Phasen, zu deren Eigenschaften die Partikelgröße und/oder Porengröße zählen. Wichtiger hingegen ist die Wahl der Oberflächenmodifikation. Man unterscheidet die sogenannte Normal Phase (NP)-Chromatographie und die Reversed Phase (RP)-Chromatographie. Bei der NP-Chromatographie ist die stationäre Phase (z.B. reines Kieselgel) im Vergleich zur mobilen Phase polarer, während bei der RP-Chromatographie die stationäre Phase aus mit organischen Molekülen oberflächenmodifiziertem Kieselgel besteht und somit unpolarer ist als die mobile Phase. Diese Oberflächenmodifikationen unterscheiden sich wiederum in ihrer Hydrophobie (durch die Länge, Polarität und Dichte der Alkanketten, sowie Abschirmung ungewollter, polar silanophiler Wechselwirkungen durch Endcapping), dem Vorhandensein spezifischer Wechselwirkungszentren (z.B. Benzen- π/π -Wechselwirkungen, chirale Selektoren, Ionenaustauschfunktionalitäten, Wasserstoffbrücken, etc.) oder räumlich-geometrische Selektoren (molecular imprinted polymers (MIP), shape selectivity, etc.). Einige dieser Eigenschaften werden durch die Lösungsmittelzusammensetzung und Temperatur mitbeeinflusst.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche stationäre RP-Phasen in 100 – 250 μm Innendurchmesser fused-silica Trennkapillaren gepackt und anschließend erfolgreich zur chromatographischen Trennung in miniaturisierten direktgekoppelten Analysesystemen eingesetzt. Dies waren vor allem klassische C_{18} -ODS-Phasen und die für die Trennung von Z/E-Isomeren besonders geeignete C_{30} -Phasen mit ausgeprägter Formerkennung (shape selectivity), welche speziell für die Trennung von

Carotinoid-Stereoisomeren und Tocopherol-Homologen von Sander und Albert entwickelt und optimiert wurden^{[84]-[90]}. Diese besondere Formerkennung beruht auf dem Auftreten von geordneten starren n-Alkylkettenbereichen mit *trans*-Anordnung neben anderen ungeordneten mobilen Domänen mit *gauche*-Konformation^{[85],[86]}. Die Temperatur-abhängigkeit dieser Formerkennung konnte mittels Festkörper- und Suspensions-NMR-Messungen untersucht^{[87],[88]} und mit den chromatographischen Ergebnissen korreliert werden^{[89],[90]}.

4.2.2 Miniaturisierung in der HPLC

Seit der Einführung der Chromatographie haben sich viele Trenntechniken entwickelt. Dazu zählen die Flüssigkeits-chromatographischen Techniken wie die HPLC und Dünnschichtchromatographie (Thin Layer Chromatography, TLC), die Supercritical Fluid Chromatography (SFC), und nicht zu vergessen die Gaschromatographie (GC). Alle dieser Techniken wiederum setzen eine Vielzahl an stationären Trennphasen mit charakteristischer Morphologie (partikuläre Teilchen, Monolithisch Strukturen, oder open-tubular Säulen, Porengröße, Oberfläche, etc.) ein, um durch geeignete Oberflächenmodifikationen unterschiedliche Analyt-Phasen-Wechselwirkungen zur Auftrennung von Substanzen auszunützen. In der Flüssigkeitschromatographie wurde zudem die Triebkraft des Trennprozesse variiert, entweder wird Druck beschrieben durch das Hagen-Poiseuillesche Gesetz oder die Elektrosmose angewendet, wie bei der Kapillarelektrophorese (Capillary Electrophoresis, CE) und Kapillarelektrochromatographie (Capillary Electrochromatography, CEC), bzw. eine Kombination beider.

Mit Ausnahme der TLC verwenden alle Chromatographietechniken meist langgestreckte zylindrische Säulen (andere Formate sind vor allem bei on-chip basierten Trenntechniken zu beobachten), deren Dimension primär anhand ihres Innendurchmessers eingeteilt wird, eine Verkürzung der Säulenlänge bis herunter zu 3 cm in Verbindung mit kleinen Teilchen wird aber ebenfalls immer gebräuchlicher^{[91],[92]}. Auch wenn es noch keine geregelte Definition dieser HPLC-Säulen-Formate gibt, soll die heute gebräuchliche Einteilung^[93] anhand der Säuleninnendurchmesser in

Verbindung mit den üblicher Weise verwendeten Flussraten in Tabelle 4 gezeigt werden.

Die ersten wissenschaftlichen Versuche zur Miniaturisierung von HPLC-Säulen reichen zurück bis zu Arbeiten von Horvath et al. im Jahre 1967^[94], seitdem haben miniaturisierte chromatographische Trenntechniken aufgrund vielfältiger Vorteile stetig an Interesse gewonnen. Seit kurzem sind erste Kapillartrennsäulen^[95] kommerziell erhältlich, wie auch für die kleinen Flussraten optimierte Pumpen, Ventile, und Detektoren, die Massenspektrometrie (MS) und Kernresonanz-Spektroskopie (NMR) als beispielhafte moderne Detektoren in direktgekoppelten miniaturisierten Analysensystemen werden im Kapitel der Kopplungsmethoden besprochen.

| <u>Art</u> | <u>Innendurchmesser</u> | <u>Typische Flussrate</u> |
|-------------------------|---------------------------------------|--|
| Nano-bore HPLC | 25 μm – 100 μm | 25 nl/min – 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ |
| Capillary HPLC | 100 μm – 500 μm | 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ – 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ |
| Micro-bore HPLC | 500 μm – 2,1 mm | 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ – 1 ml/min |
| Narrow-bore HPLC | 2,1 mm – 4,0 mm | 300 $\mu\text{l}/\text{min}$ – 2 ml/min |
| Normal-bore HPLC | 4,0 mm – 5,0 mm | 1 ml/min – 10 ml/min |
| Preparative HPLC | > 5,0 mm | > 5 ml/min |

Tabelle 4: Einteilung von HPLC-Säulen.

Die attraktiven Vorteile miniaturisierter Trenntechniken^{[96],[97]} sollen im folgenden zusammengefasst werden. Der Gebrauch von Mikrosäulen senkt deutlich die Menge an nötiger stationärer Phase, ist somit besonders vorteilhaft bei der Evaluation von neusynthetisierten oder dem Einsatz teurer stationärer Phasen. So wurden im Rahmen dieser Arbeit insgesamt nur ca. 5 g unterschiedlicher stationärer Phasen verwendet, eine Menge, die üblicherweise in zwei klassische HPLC Säulen gepackt wird. Auch der Verbrauch an mobiler Phase wird erheblich minimiert, dies ist ins besonders für die CapLC-NMR-Kopplung entscheidend, da sehr teure volldeuterierte Lösungsmittel ökonomisch sinnvoll eingesetzt werden können. Aus Kostengründen wurde bisher in der klassischen HPLC-NMR-Kopplung nur Wasser durch D₂O ersetzt, der organische Modifier allerdings weiter in protonierter Form verwendet. Wichtiger für den

analytischen Chemiker hingegen ist die gesteigerte Sensitivität durch Reduktion der eluierenden Peakbreite und damit Konzentrationserhöhung, vorausgesetzt die Analyten sind in solch erhöhten Konzentrationen weiterhin in der mobilen Phase löslich und die stationäre Phase wird dadurch nicht überladen. So wird die Trenneffizienz (ausgedrückt durch die Anzahl an theoretischen Böden N) durch Minimierung von Diffusionsparametern beschrieben durch die van Deemter-Gleichung (speziell des B-Terms) erhöht. Als weitere Vorteile sind die geringe Wärmekapazität zu nennen, wodurch auch Temperatur-programmierte Gradientenelutionen möglich werden, sowie der relativ einfache Transfer bereits bestehender klassischer HPLC-Methoden, da außer des verminderten Säulendurchmessers alle anderen Trennparameter unverändert bleiben.

Trotz der oben genannten Vorteile sind auch auf die durch die kleinen Flussraten bedingten Herausforderungen hinzuweisen^{[98],[99]}. So werden erheblich Ansprüche an die Pumpentechnologie gestellt, vor allem an die konstante Flussrate und gute Mischung der Lösungsmittel der mobilen Phase, des weiteren an die Sensitivität der verwendeten Detektoren sowie an den praktischen Aufbau des Systems in Hinblick auf Totvolumen, um Bandenverbreiterung außerhalb der Trennsäule zu minimieren, und Undichtigkeiten, welche auf Grund der geringen Lösungsmittelvolumina häufig nur schwer zu erkennen sind. In diesem Zusammenhang wird manchmal fälschlicher Weise auf die fehlende Robustheit der Kapillartechniken hingewiesen, Fakt ist hingegen, dass bei Nutzung von miniaturisierten Trennsystemen auf oben genannte Anforderungen besonders geachtet werden muss. Auf die Herausforderungen bei der Herstellung hocheffizienter Kapillartrennsäulen wird in Kapitel 5.1 dieser Arbeit eingegangen.

4.3 Grundlagen moderner miniaturisierter Kopplungsmethoden

4.3.1 Kapillar-HPLC-ESI/MS-Kopplung

Die Massenspektrometrie als informationsreicher, selektiver und sensitiver Detektor wird seit den 60iger Jahren an die leistungsstarke Trenntechnik der HPLC gekoppelt und ermöglicht selbst die Strukturermittlung von komplizierten

Naturstoffen^[100]. Es ist darauf hinzuweisen, dass diese Kopplung mit prinzipiellen Herausforderungen verbunden ist.

Die Ionisationsquelle als Interface zwischen HPLC-Trennung und MS-Detektion muss die Analytmoleküle aus dem flüssigen Eluat in gasförmige Ionen überführen und diese von den Lösungsmittelmolekülen der mobilen Phase bzw. Additiven dieser abtrennen. So sind in der HPLC gebräuchliche Additive wie anorganische Salze (z.B. Phosphatpuffer) oder ion pairing agents (z.B. TFA) oft inkompatibel mit der MS-Detektion. Um diesen Herausforderungen gewachsen zu sein, wurden spezielle sanfte Ionisationsquellen^[101] entwickelt, welche die Überführung der Analytmoleküle in die Gasphase, als auch deren Ionisierung bei Atmosphärendruck ermöglichen. Die am häufigsten eingesetzte Ionenquelle ist die Electrospray Ionization (ESI)^[102]. Bei dieser strömt das Eluat der HPLC durch eine geladene Kapillare (positiver oder negativer Ionisations-Modus) unter Bildung eines Aerosols aus geladenen Tropfen (Spray). Aus diesen Tropfen verdampfen sukzessive Lösungsmittelmoleküle bei erhöhter Temperatur, zu dem Zeitpunkt, an dem die abstoßenden Coulombkräfte der geladenen Analytmoleküle größer als die Oberflächenspannung werden, explodiert der Tropfen unter Bildung neuer Mikrotropfen. Sobald die Coulombkräfte die Größenordnung der Solvatationsenergie erreichen, werden die geladenen Analytmoleküle in die Gasphase überführt. Die geladenen Moleküle werden dann in eine Hochvakuum-Zone beschleunigt und mittels magnetischer und/oder elektrischer Felder nach ihrem Masse-zu-Ladungs Verhältnis (m/z) getrennt und anschließend detektiert. Bevorzugt werden einfach geladene Analytmoleküle gefunden, z.B. protonierte $[M+H]^+$ -Ionen, aber auch aus durch Kollision-induzierte Dissoziation (CID) gebildete Fragmentionen tragen erheblich zur Identifikation und Strukturermittlung von Analytmolekülen bei. So werden mehrdimensionale $MS^{(n)}$ -Spektren häufig zur Lösung solcher analytischer Aufgaben, meist in Ionenfallensystemen (ion trap), aufgezeichnet. Die Elektrospray Ionisation ist auf viele Analytmoleküle sowie alle gebräuchlichen mobilen Phasen anwendbar, nur bei sehr lipophilen Analyten wie Carotinoiden sind andere Ionisationstechniken wie die Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI) vorzuziehen. Ein großer Nachteil der ESI ist allerdings, dass es nicht mit der für die klassische HPLC üblichen Flussrate von 1 ml/min kompatibel ist, sondern niedrigerer

Flussraten bedarf. Daher wird häufig der Eluentenstrom vor Eintritt in das ESI-Ionisationsinterface gesplittet, was mit einer erheblichen Reduktion der Nachweismempfindlichkeit einhergeht. Dieser vermeintliche Nachteil wurde in den letzten Jahren durch Kopplung miniaturisierter chromatographischer Trenntechniken und den damit verbundenen geringeren Flussraten beseitigt, da nun der gesamte Eluentenstrom ionisiert werden kann. Vor allem in Analysen mit nur limitierter Probenmenge, wie z.B. im Gebiet der Proteomics^{[103],[104]}, werden daher vermehrt Kapillar-HPLC^[105] oder sogar chip-basierte Trenntechniken^[106] an die ESI/MS gekoppelt.

4.3.2 Kapillar-HPLC-NMR-Kopplung

Trotz der oben genannten vielfältigen Vorteile der HPLC-ESI/MS-Kopplung sind die aus den generierten experimentellen Daten erhaltenen Informationen für eine eindeutige Analytidentifikation und Strukturermittlung meist nicht ausreichend. So sind die Ermittlung des Molekulargewichtes anhand des m/z -Verhältnisses sowie Strukturinformationen aus Fragmentierungsmustern zwar sehr hilfreiche Ergebnisse, welche wichtige Hinweise auf den Analyten liefern, Isomere wie z.B. durch das Substitutionsmuster aromatischer Ringe bedingt (vgl. β - und γ -Tocopherol) oder geometrische Isomere wie Carotinoid-Stereoisomere sind allerdings nicht zu unterscheiden. Der Detektor der Wahl für solche Anwendungen ist die Kernresonanz-Spektroskopie (NMR). Mehr als 30 Jahre nach Veröffentlichung der ersten NMR-Experimente^{[107],[108]}, und zwölf Jahre nach der Entwicklung der Puls-Fourier-Transform-(PFT)-Methode^[109] wurde die NMR-Spektroskopie erstmals mit der HPLC gekoppelt^{[110],[111]}. Stetige Weiterentwicklungen im experimentellen Aufbau sowie den NMR-Probenköpfen (Mikroprobenköpfe, kryogene Probenköpfe) führten dazu, dass die on-line HPLC-NMR-Kopplung heute eine der wichtigsten Routinemethoden in der Naturstoff^{[112],[113],[114]}-, Wirkstoff^[115]-, und Umweltanalytik^[116] sowie in der Metabolismusforschung^[117] geworden ist.

4.3.2.1 Experimenteller Aufbau

In der HPLC-NMR-Kopplung bleibt die chromatographische Trenneinheit nahezu unverändert, muss aber außerhalb der 5 Gausslinie des NMR-Spektrometers

positioniert werden, um einerseits fehlerfrei zu funktionieren und andererseits um die Magnetfeldhomogenität des NMR-Magneten nicht zu beeinträchtigen. In unserem System war dafür eine 3 m lange Transferkapillare nötig. Die NMR-spektroskopische Detektion hingegen bedarf spezieller Durchflussprobenköpfe. Diese Durchflussprobenköpfe sind entweder analog zu den klassischen 5 mm NMR-Röhrchen in einer Doppelsattel-Helmholtz-Anordnung^[118] konfiguriert, oder haben ein senkrecht zum B_0 -Feld stehendes solenoides Design^[119], welches auf Grund höherer Sensitivität vor allem in Mikroprobenköpfen verwendet wird. Allen Durchflusszellen gemeinsam ist, dass die Rotation zur Minimierung von Magnetfeldinhomogenitäten nicht mehr möglich ist, dafür können die Sende- und Empfangsspulen aber direkt auf der Detektionszelle positioniert werden, woraus deutlich erhöhte Füllfaktoren und daraus höhere Empfindlichkeiten resultierten. Die unterschiedlichen Probenkopftypen sind in Abbildung 16 schematisch wiedergegeben. Die üblichen Zellvolumen sind in 5 mm Röhrchen 500 μl , in klassischen HPLC-NMR Durchflusszellen 120 μl und in solenoiden Mikrozellen 5 μl .

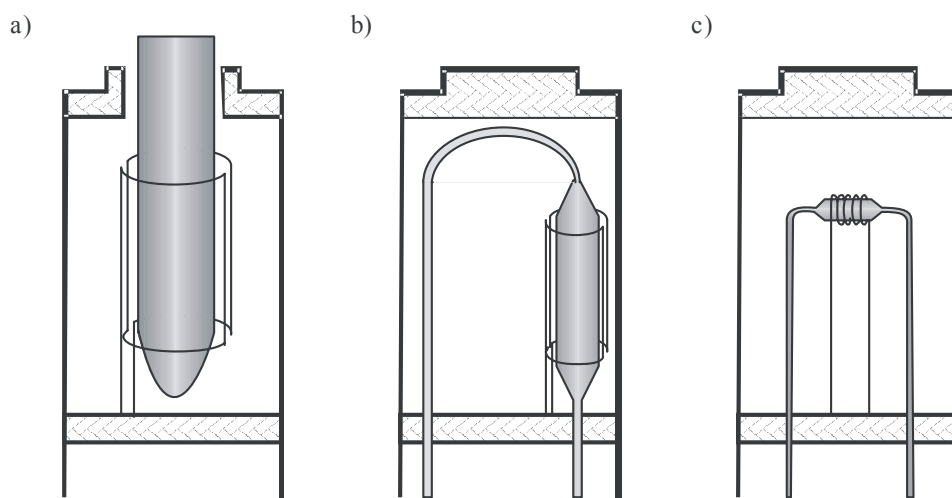


Abbildung 16: NMR-Probenköpfe, a) 5 mm Röhrchenprobenkopf, b) Durchflussprobenkopf im Doppelsattel-Helmholtz-Design, c) solenoider Mikro-Durchflussprobenkopf.

Die HPLC-Anlage wird entweder direkt an die NMR-Detektion gekoppelt, die daraus resultierende für hohen Probendurchsatz gewünschte Echtzeitdetektion wird continuous-flow NMR genannt, oder die durch einen UV-Detektor überwachte

Trennung wird, sobald das Peakmaximum die NMR-Durchflusszelle erreicht, angehalten und stopped-flow NMR-Spektren aufgenommen. Dazu werden zusätzliche, spezielle Interface-Einheiten benötigt, im einfachsten Fall ein Schaltventil-Modul, loop storage Einheiten wie die sogenannte Bruker Peak Sampling Unit (BPSU), oder post column concentration Einheiten wie in der SPE-NMR.

Die simultane Trennung und Detektion der Probenkomponenten kann mit dem continuous-flow Verfahren erzielt werden. Dabei erfolgt die Datenprozessierung der on-line Messung mittels eines Pseudo-2D-Experimentes, bei dem in F2-Dimension die chemische Verschiebung und in F1-Richtung die Retentionszeit dargestellt werden. Bei diesen NMR-Messungen ist die Aufenthaltsdauer τ der Kerne in der NMR-Zelle, abhängig von Zellvolumen und der Flussrate, reduziert. Diese durch die Fließgeschwindigkeit bedingte verkürzte Aufenthaltsdauer hat Auswirkungen auf die effektive Lebensdauer der Spinzustände in der Zelle und kann so als Relaxationsphänomen beschrieben werden. Dies führt nach Heisenberg zu einer Linienverbreiterung und damit verbunden einem Verlust an Auflösung, auf der anderen Seite werden die angeregten Kernmagnetonen kontinuierlich durch frische Kerne ersetzt, wodurch die Pulswiederholrate und damit die Sensitivität erhöht wird. Im Allgemeinen benötigt dieser NMR-Detektionsmodus höhere Analytkonzentrationen, da die Anzahl an messbaren NMR-Transienten durch die Halbwertsbreite der eluierenden Peaks bestimmt wird. Eine größere Zahl an Transienten und damit verbunden längere NMR-Experimente können im stopped-flow NMR-Modus angewendet werden. Dies erhöht erheblich die Empfindlichkeit der NMR-Detektion. So ist es möglich, geringste Analytmengen zu detektieren, sowie die gesamte Bandbreite an NMR-Experimenten, auch ^{13}C - und 2D-Messungen, zur Strukturaufklärung des Analyten durchzuführen.

4.3.2.2 Mikroprobenkopf-NMR gekoppelt zur Kapillar-HPLC

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein CapLC-NMR System eingesetzt, welches in Abbildung 17 schematisch wiedergegeben ist. Die Teilkomponenten, deren individuelle Vorteile und Anforderungen, sollen im Folgenden kurz besprochen werden. Das System kann in die miniaturisierte chromatographische Trenneinheit, die Transferkapillare und die Mikroprobenkopf-NMR-Detektion unterteilt werden.

Die miniaturisierte chromatographische Trenneinheit besteht aus einer splittlosen Kapillar-HPLC-Pumpe, einem Injektionsventil mit 100 – 500 nl Probenschleife (loop), einer selbst-gepackten Kapillartrennsäule mit 100 – 250 μm Innendurchmesser und einem on-capillary (100 μm Weglänge) UV-Detektor. Die splittlose Kapillar-HPLC-Pumpe ermöglicht die Generierung konstanter Flussraten im Bereich zwischen 1 – 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ bei einem sehr niedrigen Lösungsmittelverbrauch. So ist der Einsatz volldeuterierter Lösungsmittel ökonomisch sinnvoll durchführbar, die Unterdrückung von Lösungsmittelsignalen ist oft nicht mehr nötig.

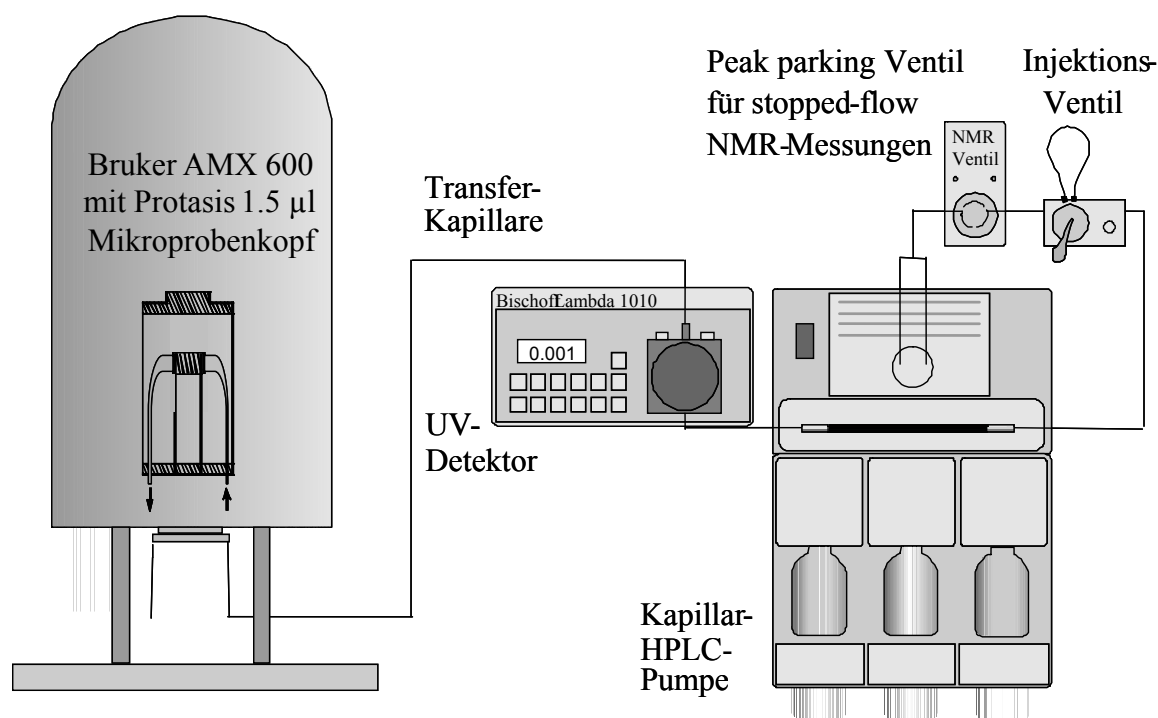


Abbildung 17: Kapillar-HPLC-NMR-System.

Häufig treten aber Resonanzsignale von protonierten Rest-Lösungsmitteln im NMR-Spektrum auf, die einen gewissen Resonanzbereich überdecken und für eine Detektion der Analytmoleküle somit unbrauchbar machen. Diese störenden Resonanzsignale führen zu Dynamikproblemen im A-D Wandler des NMR-Spektrometers, sie sollten daher mittels Lösungsmittelunterdrückung auf etwa die Höhe der ^{13}C -Satelliten verringert werden^[120]. Nur wenn der dynamische Bereich des Empfängers an die Intensität des Analytsignals angepasst wird, kann eine Digitalisierung der Signale erfolgen und somit die Detektion. Die Lösungsmittelunterdrückung kann auf mehrere Arten erfolgen. Wegen ihrer einfachen Handhabung, ihrer leichten Implementierung in

verschiedenste Pulsprogramme, sowie ihrer großen Effizienz selbst zur Unterdrückung mehrerer NMR-Signale, wird meist eine Vorsättigungsmethode mit Shaped-Pulsen eingesetzt. Dabei wird während des Relaxationsdelays etwa 1 s mit einem selektiven low-power Shaped-Puls, meist in Rechtecksform, auf die Resonanzfrequenzen der Lösungsmittel eingestrahlt und diese somit gesättigt. Bei der Wahl der mobilen Phase sollte dennoch der Resonanzbereich der zu analysierenden Analytmoleküle berücksichtigt werden. Als mobile Phase eignen sich vor allem binäre Gemische, mit möglichst nur ein bis zwei nicht aufgespaltenen Resonanzsignalen im NMR-Spektrum. Beispiele dafür sind Mischungen von Deuteriumoxid mit deuteriertem Aceton-d₆, MeCN-d₃ oder MeOH-d₄. Isokratische Trennungen sind Lösungsmittel-Gradientenelutionen vorzuziehen, da die chemische Verschiebung δ der Analyten zum Teil erheblich von der Zusammensetzung des Lösungsmittelgemisches abhängt. Für die Kapillartrennsäule ist ebenso eine hohe Beladbarkeit der stationären Phase wünschenswert, so dass selbst bei einer extremen Überladung der Säule, vorteilhaft für die relativ unsensitive NMR-Detektion, noch eine gute Trennleistung gegeben ist. C₃₀-Trennsäulen zeichnen sich durch eine solch hohe Beladbarkeit und Selektivität aus und werden deshalb vermehrt auch bei der HPLC-NMR Analytik von Naturstoffen^{[121],[122]} eingesetzt.

Um das Kapillartrennsystem an das NMR-Spektrometer zu koppeln, wird der Ausgang des UV-Detektors über eine 3 m lange (50 μ m I.D.) Transferkapillare, an deren Ende zum Schutz des NMR-Mikroprobenkopfes ein kleiner Filter eingefügt wird, mit dem Eingang des NMR-Mikroprobenkopfes verbunden. Für stopped-flow NMR-Experimente wird zusätzlich ein Parkventil zur Vermeidung von ungewünschten Totvolumen vor dem Injektionsventil eingefügt.

Um die aus der Kapillar-HPLC eluierenden geringen Analytmengen mittels NMR zu detektieren, musste die Empfindlichkeit der NMR-Detektion deutlich erhöht werden. Empfindlichkeitssteigerungen im Gebiet der NMR-Detektion sind durch Verbesserung der Homogenität des Magnetfeldes sowie durch Erhöhung der Feldstärke möglich, eine Optimierung dieser Parameter wird aber zunehmend schwieriger. Daneben werden Methoden des Polarisationstransfers^[123], Techniken zur Reduktion von Relaxationszeiten^[124], sowie kryogene Plattformen^[125] eingesetzt. Ein

anderer Ansatz ist die Verkleinerung der Sende- und Empfangsspule und damit verbunden dem aktiven Detektionsvolumen^[126]. Solche auf die eluierenden Peakvolumen von Kapillartrenntechniken (ca. 2 μ l) optimierte Mikroprobenköpfe wurden im Doppelsattel-Helmholtz- und im solenoiden Design hergestellt, auf Grund erhöhter Sensitivität werden allerdings primär solenoide Mikroprobenköpfe verwendet. In diesen wird die Kupfer-Spule direkt um eine fused-silica Kapillare gewunden^[127], was einen höchst möglichen Füllfaktor gewährleistet, zur Vermeidung von Suszeptibilitäts-Inhomogenitäten wird diese Spule von einem Container, gefüllt mit einer die Suszeptibilität des Kupfer ausgleichende Flüssigkeit, dem FC-43 (Perfluorotributylamin), umgeben und transversal zum Spektrometer-Magnetfeld positioniert. Beide Mikroprobenkopf-Designs wurden erfolgreich, on-line gekoppelt an miniaturisierte Trenntechniken^[128], eingesetzt und ermöglichen Detektionslimits im niedrigen Nanogramm-Bereich. Neben der Kapillar-HPLC (CapLC-NMR)^{[129],[130]} wurde die miniaturisierte NMR-Detektion auch erfolgreich mit der Kapillarelektrophorese (CE-NMR)^{[131],[132]}, Kapillarelektrochromatographie (CEC-NMR)^[133] und Kapillarisotachophorese (cITP-NMR)^[134] gekoppelt. Als weiteren Vorteil bieten diese Mikrospulen auf Grund ihrer geringen Abmessungen auch die Positionierung mehrerer Detektionsspulen in nur einem NMR-Probenkopf und damit zukünftig die Möglichkeit der parallelen Detektion mit verdoppeltem, vervierfachtem oder sogar versechzehnfachtem Durchsatz, abhängig von der Anzahl der Detektionsspulen^{[135],[136]}. So wird auch die NMR-Spektroskopie für high-throughput screening Analysen anwendbar.

5 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, biologisch aktive Substanzklassen aus unterschiedlichen Matrices (z.B. Pflanzen oder Wasserproben) mittels miniaturisierter on-line direktgekoppelter Analysensysteme nachzuweisen. Diese verbanden sowohl Extraktionsschritte (μ SPE) als auch Detektionssysteme (ESI/MS, NMR, UV) mit der Kapillar-HPLC (CapLC). In solchen Analysensystemen ist die Evaluierung und Optimierung verschiedenster Einzelparameter, sowohl methodischer als auch geräte-technischer Natur, unabdingbar. Zu den technischen Herausforderungen zählen die Herstellung effizienter Kapillartrennsäulen und die Umsetzung der generierten Trennleistung im Gesamtsystem, sowie die Optimierung der Detektionseinheit selbst. Methodische Anpassungen sind teilweise beim Transfer der chromatographischen Bedingungen aus der klassischen HPLC nötig, werden aber häufig auch durch den Detektor mit vorgegeben. Die Miniaturisierung stellt besonders hohe Anforderungen an die Probenvorbereitung und Extraktion, ermöglicht dann aber als großen Vorteil die Detektion geringster Analytmengen aus limitierten Probenmengen. Zudem sind in miniaturisierten Systemen einzigartige Optimierungsparameter, wie die Nutzung von Temperaturgradienten zur Verbesserung der chromatographischen Trennung, anwendbar. Diese Einzelparameter, häufig aber eine Kombination ihrer, entsprechend dem jeweilig eingesetzten System, werden im Folgenden detailliert besprochen.

5.1 Herstellung hocheffizienter Kapillartrennsysteme

Miniaturisierte direktgekoppelte Analysensysteme ermöglichen die schnelle und artefaktfreie Identifikation und Strukturermittlung geringster Analytmengen aus limitierten biologischen Probenmatrices. Voraussetzungen dafür sind ein sowohl hochempfindliches, die Detektion der kleinen Analytmengen gerecht werdendes, wie auch hocheffizientes System. Die Effizienz des Systems beinhaltet dabei eine gute chromatographische Auftrennung der Substanzen, d.h. sowohl die Abtrennung von anderen Komponenten, als auch die Elution eines möglichst scharfen Analytpeaks, beeinflusst durch die Effizienz der stationären Phase und deren Packung. Die Trennstärke wird durch den Trennfaktor α , die Effizienz durch die Anzahl der

theoretischen Böden N im jeweiligen Peak beschrieben. Wichtig ist ebenso die „Konservierung“ der Trennleistung auf dem Weg zum Detektor, d.h. die Vermeidung von Totvolumen, welche zu Bandenverbreiterung außerhalb der Trennkapillare führen. Nur hohe Effizienzen ermöglichen die optimale Detektion der Analyten, welche isoliert von anderen Komponenten in höchstmöglicher Konzentration (sprich schmalen Peaks) aus der Trenneinheit zum Detektor eluieren. Für die als relativ unsensitiv geltende NMR ist meist neben Sensitivitäts-optimierten Probenköpfen auch die Erhaltung der Trennleistung unter hoher Massen- und/oder Volumen-Beladung der stationären Phase nötig.

5.1.1 Partikuläre stationäre Phasen

Partikuläre stationäre Phasen sind weiterhin die am häufigsten eingesetzten chromatographischen Trennphasen. Es gibt sie in einer großen Bandbreite unterschiedlicher Morphologien (z.B. Partikelgröße und -porosität) und Oberflächenmodifikationen (Normalphasen sowie verschiedenste Umkehr- (RP-) Phasen). Sie erlauben durch spezifische Wechselwirkungen der Analytmoleküle in der Interphase zwischen Lösungsmittel und stationärer Phase die Auftrennung der Komponenten, wobei es meist eine speziell-angepasste stationäre Phase für das jeweilige Trennproblem gibt. So ist die große Auswahl an unterschiedlichen Säulen in der klassischen HPLC zu erklären, Kapillar-HPLC Säulen sind allerdings nur in sehr begrenztem Umfang (meist C_{18} -Phasen) kommerziell erhältlich. Bei der Analytik von Naturstoffen sind aber andere RP-Phasen oft überlegen, z.B. C_{30} -Phasen mit hoher Formerkennung bei der Trennung von Tocopherol-Homologen. Ein entscheidender Schritt dieser Arbeit war daher die Herstellung hocheffizienter Kapillartrennsäulen, gefüllt mit für die jeweilige Analyse angepassten stationären Phasen.

Bei der Herstellung von effizienten Kapillartrennsäulen müssen $1 - 5 \mu\text{m}$ sphärische Partikel möglichst dicht (entsprechend einer dichtesten Kugelpackung) in eine fused-silica Kapillare mit einem Innendurchmesser von $100 - 250 \mu\text{m}$ gepackt werden und ebenso entscheidend, in dieser Kapillare fixiert werden. Zunächst möchte ich auf das Design dieser Endfixierung, sogenannte Fritten, näher eingehen. Das Endfitting muss folgende Bedingungen erfüllen:

- Geringste Totvolumen, um die Trenn-Effizienz nicht zu beeinträchtigen,
- gute Fixierung und Langzeit-Stabilität der Fritte, ohne Beeinflussung der Porosität oder Eigenschaften der stationären Phase,
- sowie eine hohe Reproduzierbarkeit und mechanische Stabilität, da das Endfitting gleichzeitig als Verbindung zu den anderen Komponenten des Systems genutzt wird.

Unterschiedliche Methoden zur Herstellung von Endfittings sind publiziert worden. So wird die Fritte entweder durch Quervernetzung der stationären Phase mittels Sintern^{[137],[138]} (sogenanntes Brennen) oder partielle Polymerisation (sogenanntes Dippen)^[139] hergestellt, oder die Glaskapillare wird am Ende auf ca. 10 µm verjüngt und die stationäre Phase durch den sogenannten Keystone-Effekt zurückgehalten^{[140],[141]}. Neben diesen klassischen Techniken zur Herstellung von Endfittings, die schematisch in Abbildung 18 gezeigt sind, werden dort auch die von uns verwendeten Filterscheiben in zero-dead-volume unions gezeigt.

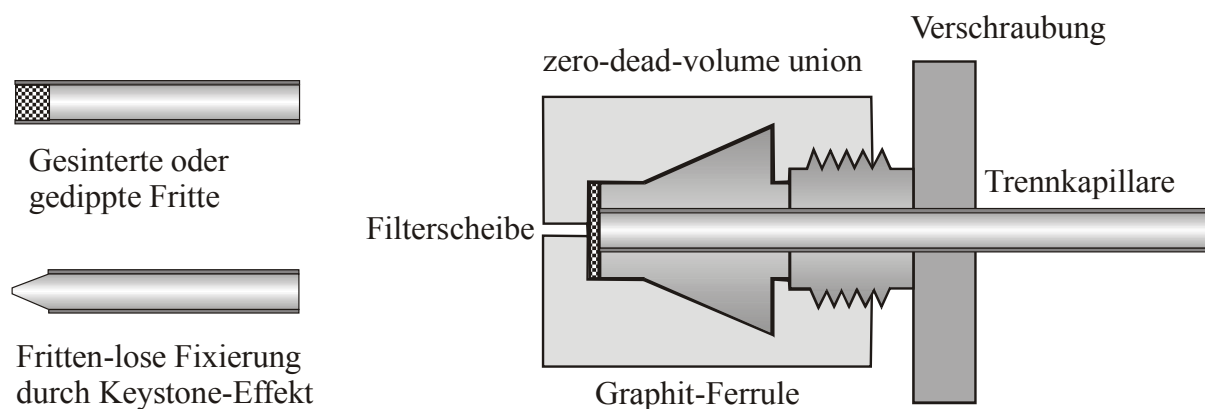
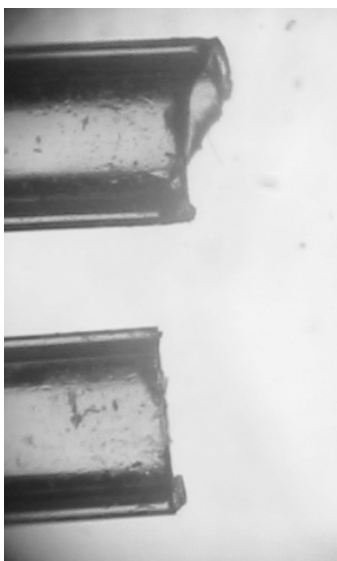


Abbildung 18: Schematische Darstellung unterschiedlicher Endfitting-Techniken.

Das Sintern ist immer noch die am weitesten verbreitetste Methode, leider aber kaum reproduzierbar und vor allem bei C₃₀-Phasen schwer anwendbar, da der Sinterprozess die Umstellung auf eine NaCl-haltige wässrige Phase voraussetzt, was die C₃₀-Oberflächenmodifikation durch Kollabierung und/oder Ablösung der Alkylketten vom Trägermaterial zerstören kann. Das Sintern in organischen Lösungsmitteln ergab nur sehr instabile Fritten. Auch beim Dippen war die Reproduzierbarkeit gering, ein guter Kompromiss zwischen Haltbarkeit bzw. Stabilität der Fritte und

deren Permeabilität nur schwer erzielbar. Die Fritten-lose Technik verjüngter Kapillarenden hingegen ist in ihrer Herstellung sehr zeitaufwendig, da die mittels eines H₂-Brenners zugeschmolzene Glaskapillare zuerst plan aufgeschliffen werden muss, was einer erheblichen Fingerfertigkeit bedarf (viele Glaskapillare splintern während dieses Schleifprozesses). Zudem wird während des Schmelzens auch die stabilisierende Polyimid-Polymerschicht mit abgebrannt, es wird also eine Soll-Bruchstelle eingeführt, was den praktischen Umgang mit dieser Art von Endfittings erheblich erschwert und oft in der Zerstörung der ganzen Trennkapillare durch Bruch an der Verjüngung endet.

Augrund der Nachteile oben genannter Methoden wurde von uns eine Endfitting Technologie entwickelt, welche 75 µm dünne Stahlsiebchen mit 2 µm Poren in zero-dead-volume unions als Fixierung der stationären Phase verwendet, analog zu der Fritten-Technik in klassischen HPLC Säulen. Diese verbinden den Vorteil der hohen Reproduzierbarkeit (die Morphologie der Fritte, z.B. deren Porosität, sind durch das Siebchen vorgegeben) und Stabilität, mit der einfachen Verknüpfung der Trennkapillare über das Union zu den anderen Komponenten des Systems. Beim Zusammenbau des Endfittings ist darauf zu achten, dass die Filterscheibe plan im Union liegt und die Glaskapillare wiederum mit einem glatten Schnitt (Cut, siehe Abbildung 19) auf dieser Filterscheibe liegt, wodurch das Totvolumen minimal gehalten werden kann. Diese Anordnung wird dann mit einem Graphit-Ferrule in das



zero-dead-volume union stabil verschraubt. Hinzuweisen ist darauf, dass der Außendurchmesser der Siebchen größer ist als der Innendurchmesser der Trennkapillare, im Gegensatz zu in-capillary fittings also ein Totvolumen eingeführt wird. Die Auswirkungen auf die Trenneffizienz der von uns primär verwendeten 250 µm I.D. Glaskapillaren war allerdings vernachlässigbar und auf Grund der einfachen Handhabung und Anwendbarkeit auf alle verwendeten partikulären stationären Phasen wurde diese Endfitting Technik zur Herstellung von Kapillartrennsäulen verwendet.

Abbildung 19: Guter Schnitt (Cut) einer Glasskapillare (unten) bzw. schlechter (oben).

Neben dieser besonders geeigneten Endfittings musste auch der Packprozess ausgearbeitet, sowie die dafür benötigten Geräte modifiziert werden. Die Packtechnik an sich ist eher Kunst denn Wissenschaft, daher sind wohl auch nur wenige Parameter zum optimierten Herstellen von hocheffizienten Säulen publiziert. Als meist angewandte Methode hat sich der Slurry-Packprozess herausgestellt. 3 μm C₁₈-Phasen wurden bereits 1981 in einem Slurry-Medium aus 1-Hexanol und Methylenchlorid (1:1, v/v) in klassische HPLC Säulen gepackt^[142], eingehendere Untersuchung des verwendeten Systems^{[143],[144]}, möglicher Frittentechniken, sowie Evaluierung der Packparameter, wie Druck^[145], Slurry-Medium und -Konzentration^[146], Packrichtung (upward oder downward) und Innendurchmesser der zu packenden Kapillarsäulen^[147] wurden in den folgenden Jahren veröffentlicht. Zusammenfassend werden folgende Packbedingungen postuliert:

- Abwärtsgerichtetes Packen bei konstantem Druck von ca. 600 bar,
- Slurry-Konzentration ca. 65 mg/ml,
- Slurry-Medium: Isopropanol oder Tetrachlorkohlenstoff,
- Packmedium: Methanol.

Neben dem Packvorgang bei konstantem Druck wird auch das Packen bei konstanter Fliessgeschwindigkeit diskutiert. Dies ist allerdings nur schwer experimentell verwirklichtbar, da während des Packprozesses der durch das Packungsbett generierte Rückdruck stetig zunimmt, der Fluss also abnimmt. Es gibt aber Hinweise, dass sich diese Packart positiv auf die Trenneffizienz der hergestellten Trennkapillaren auswirkt.

In der praktischen Umsetzung wurden diese Parameter auf die jeweilige stationäre Phase angepasst, letztendlich konnte eine universell einsetzbare Methodik etabliert werden. Zu Herstellung der Kapillartrennsäulen wurde das in Abbildung 20 gezeigte System verwendet.

400 bar initialer Druck wird durch eine pneumatische Pumpe generiert und über ein Ventilsystem ruckartig zum gefüllten Slurry-Reservoir geleitet. An dieses Slurrygefäß, eine 12,5 cm lange, 1 mm Innendurchmesser HPLC-Leersäule, wird die zu füllende fused-silica Kapillare durch ein speziell angepasstes, konisches Ferrule befestigt, die

Kapillare ihrerseits wiederum ist durch oben besprochene Endfitting Technologie am Ausgang versiegelt.

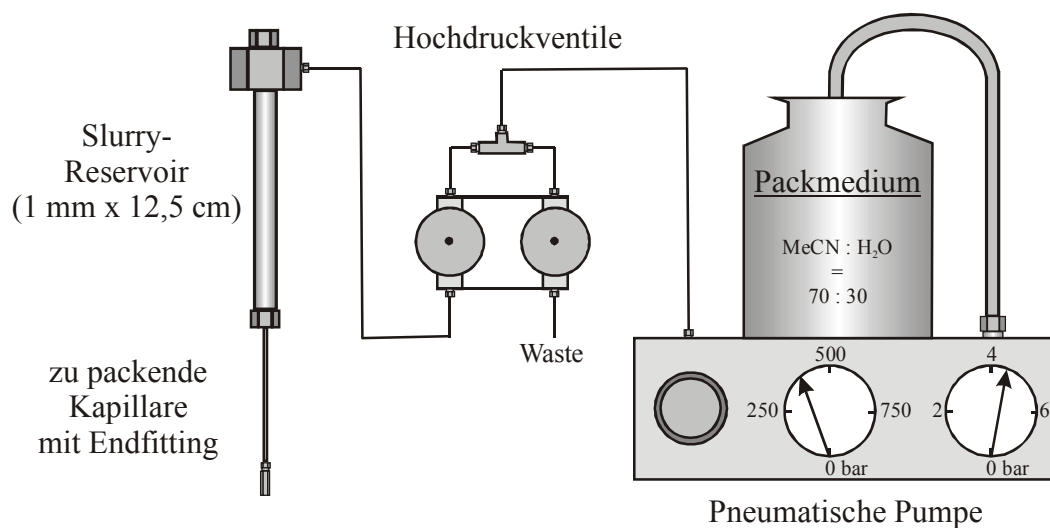


Abbildung 20: Schematische Darstellung der verwendeten Packanlage.

In das Slurry-Reservoir (120 μ l Volumen) wurde ein Slurry aus 20 mg stationärer Phase suspendiert in 300 μ l Tetrachlorkohlenstoff (entspricht 66,7 mg/ml) nach Behandlung im Ultraschallbad für 10 min gefüllt. Dafür wurde eine Spritze mit einer fused-silica Kapillar-Nadel des selben Innendurchmesser wie die zu packende Kapillare verwendet, wodurch etwaige Partikelagglomerate, welche zur Verstopfung des Systems führen könnten, im vornherein eliminiert werden können. Das Packmedium, eine Mischung aus MeCN : H₂O = 70 : 30 wird durch das Packsystem gepresst, innerhalb der ersten 5 min wird der Druck stufenweise auf 650 bar (der maximalen Druckbelastung, welche Glasskapillaren tolerieren) erhöht. Dieser Enddruck wird dann für ca. 30 min gehalten.

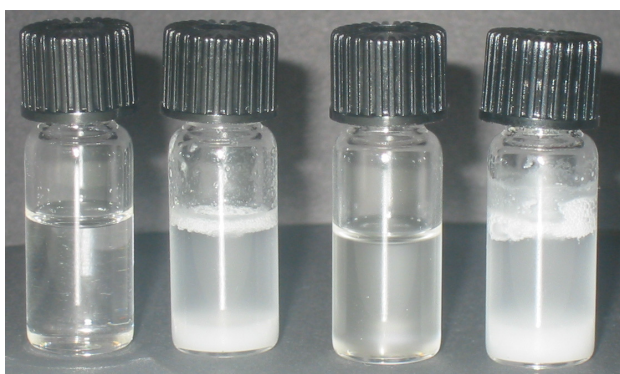


Abbildung 21: Suspension einer C₁₈-Phase (links) in CCl₄ (Vial 1) bzw. im Packmedium (Vial 2), analog dazu die C₃₀-Phase (rechts).

Nach ca. 10 min, genau dann, wenn das Tetrachlorkohlenstoff vollständig durch die Packphase ersetzt wurde, ist meist ein Farbwechsel zu weiß klar erkennbar. Der Effekt der Slurry- bzw. Packphase auf die Suspension von Partikeln der stationären Phase soll in Abbildung 21 veranschaulicht werden. Die Suspension einer C_{18} -Phasen ist dort in Tetrachlorkohlenstoff und $\text{MeCN} : \text{H}_2\text{O} = 70 : 30$ (Packmedium) gezeigt, im Packmedium sinken die Partikel schon nach kurzer Zeit zum Boden des Gefäßes, sie werden also schlecht suspendiert. Nach dem Entspannen der Kapillare wird sie aus dem System entnommen, auf die gewünschte Länge gekürzt und mit den Endfittings auch am späteren Einlass versehen.

Nach dem Packprozess werden die Kapillaren auf ihre Effizienz in der Kapillar-HPLC getestet. Dazu werden die Anzahl an theoretischen Böden N mittels einer einfachen chromatographischen Testmischung (Propyl-, Butyl- und Pentylbenzen, je 1 mg/ml) bestimmt. Als mobile Phase dient $\text{MeCN} : \text{H}_2\text{O} = 70 : 30$ bei 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Das Beispiel einer selbstgepackten 3 μm C_{18} -Kapillare (10 cm x 250 μm) ist in Abbildung 22 gezeigt. Deutlich ersichtlich sind die scharfen, symmetrischen Peaks, welche für eine gute Packqualität sprechen. Die Trenneffizienz wird gemittelt aus den drei Alkylbenzenen bestimmt und erreicht pro Meter knapp 100.000 theoretische Böden:

- Propylbenzen ($t_R = 8,256$ min, $t_{w(0.5)} = 0,234$): $N = 6869$.
- Butylbenzen ($t_R = 11,636$ min, $t_{w(0.5)} = 0,286$): $N = 9170$.
- Propylbenzen ($t_R = 16,884$ min, $t_{w(0.5)} = 0,365$): $N = 11854$.

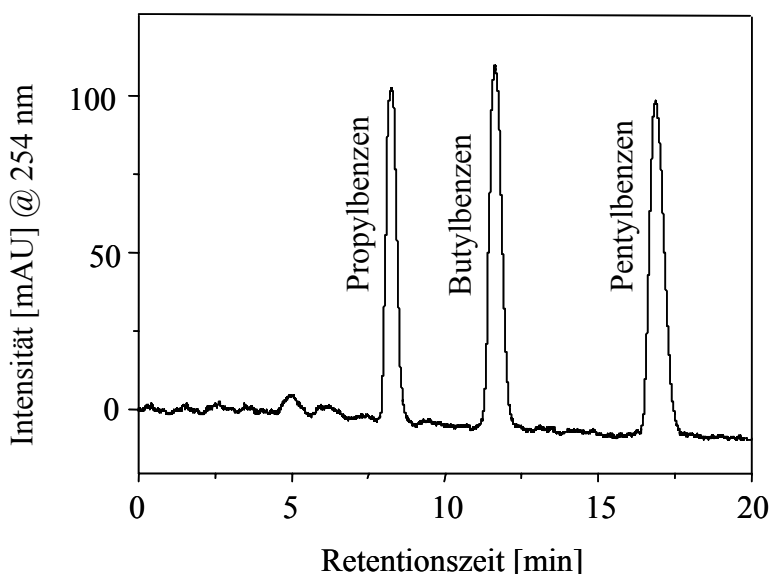


Abbildung 22: Test-Trennung zur Ermittlung der Trennleistung der Kapillaren.

5.1.2 Monolithische Phasen

Neben neu entwickelten, auf spezifische Trennprobleme hin angepassten Oberflächenmodifikationen unterliegt auch das Trägermaterial selbst einer stetigen Weiterentwicklung. Für das am häufigsten eingesetzte Trägermaterial Kieselgel wurde in den letzten Jahrzehnten neben seiner Geometrie von irregulären zu sphärischen Partikeln, auch die Morphologie (Porosität) und Reinheit durch Minimierung von störenden Metallverunreinigungen verbessert. Zudem wurde seit Mitte der 90iger Jahre^{[148],[149]} eine neue Art von Trägermaterial, sogenannte monolithische Phasen eingeführt. Diese unterschiedlichen Trägermaterialien sind in Abbildung 23 zusammengefasst.

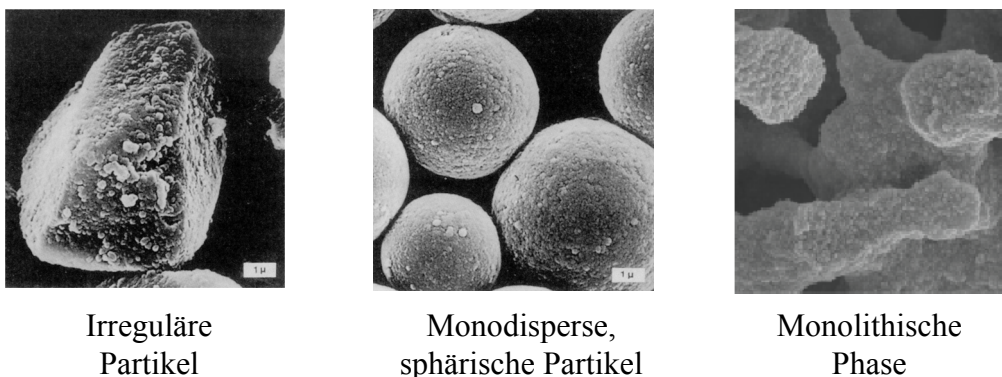


Abbildung 23: Unterschiedliche Kieselgel-basierte Trägermaterialien für die HPLC.

Zur Herstellung von monolithischen Kieselgel-Phasen werden in einem ersten Schritt die Silanolgruppen der Glaskapillar-Innenwand aktiviert, da diese mit in die Polymerisation einbezogen werden sollen, um Schrumpfungsphänomene zu vermeiden und den Monolithen stabil in der Kapillare zu fixieren. Endfittings sind so nicht mehr nötig. Dazu wird die Kapillare für jeweils 10 min mit 1 M Natronlauge, dann mit 1 M Salzsäure, mit bidestilliertem Wasser und schließlich mit Aceton gespült und über Nacht im Stickstoffstrom bei 100°C getrocknet. Als Polymerlösung für den Sol-Gel-Prozess dient eine Mischung aus Tetramethoxysilan (TMOS)/Methyltrimethoxysilane^[150] (zur weiteren Minimierung von Schrumpfungsphänomene durch Herabsetzung der Quervernetzungsrate), welcher der wasserlösliche Porenbildner Polyethylenglycol (PEG) in 0,01 M Essigsäure zugegeben wurde. Bei 0°C wird diese Polymerisationslösung 30 min innig vermischt und anschließend in die Kapillare überführt. Parallel dazu wurde die überschüssige Polymerlösung in ein Reagenzglas

überführt und den gleichen Reaktionsschritten und -bedingungen unterzogen. Diese Probe diente später für die Festkörper-NMR-Untersuchungen und BET-Oberflächen- und Poren-Messungen. Über Nacht bildet sich bei 40°C ein Silika-PEG-Polymerstab aus. Der primär gebildete Polymerstab wird schließlich in 0,01 M Ammoniumhydroxidlösungen gealtert (ageing). Während dieses hydrothermalen Ageing-Prozesses bilden sich durch partielles Lösen und Wiederanlagern des amorphen Silika-Netzwerkes Mesoporen aus, in denen später die Erkennungszentren für die chromatographische Trennung liegen. Durch Variation von Temperatur und Dauer des Ageing-Prozesses kann die Größe der Mesoporen im Bereich zwischen 8 und 400 nm justiert werden^[151]. Anschließend werden die Makroporen durch Entfernung des PEG mittels Ethanol freigelegt, der Silika-Monolith vorsichtig getrocknet und einem abschließenden Sinterschritt (bis 330°C, oberhalb dieser Temperatur ist das Polyimid-Coating der Kapillaren nicht mehr beständig) unterzogen. Man erhält einen Basis-kieselgel-Monolithen mit festgelegter bimodaler (doppelporiger) Morphologie^[152], bestehend aus Makroporen^[153] (through-pores, üblicherweise 1 – 3 µm), die für den niedrigen Rückdruck der Monolithen verantwortlich sind, und den die große Wechselwirkungsfläche generierenden Mesoporen. Im Vergleich zu partikulären Trennsäulen (totale Porosität ca. 75%) konnte so die totale Porosität auf bis zu 90% erhöht werden. Zur Bildung von Makroporen tragen während der Polymerisationsreaktion unterschiedliche konkurrierende Prozesse bei, am wichtigsten sind wohl Phasentrennungsprozesse wie der "nucleation and growth"- (thermisch aktivierter Diffusionsprozess) und "spinodal decomposition"-Mechanismus^[154]. Des weiteren spielt der "chemical freezing"-Mechanismus eine bedeutende Rolle. Die durch die Makroporen erhöhte Permeabilität ermöglicht höhere Flussraten, verbunden mit reduzierten Analysezeiten^[155], der Möglichkeit der Kopplung mehrerer Säulen zur Erhöhung der Trennleistung^[156] oder 2D-HPLC-Anwendungen, und Flussrategradienten. Neben Kieselgel-Monolithen können Monolithen auch aus organischen Polymeren aufgebaut^[157] werden.

Zur Synthesekontrolle und Charakterisierung des Silika-Monolithen wurde eine Parallelreaktion in größerem Maßstab (Reagenzglasansatz) den gleichen Reaktionsschritten und -bedingungen unterworfen. Es ist natürlich fraglich, ob die Ergebnisse

dieses Ansatzes direkt auf den Kapillar-Maßstab übertragbar sind, eine NMR-spektroskopische Untersuchung des Monolithen sowie BET-Messungen in der Kapillare sind allerdings auf Grund der geringen Substanzmenge nicht möglich. Als Reaktionskontrolle wurden ^{13}C -CP/MAS-Festkörper-NMR-Messungen nach den wichtigsten Reaktionsschritten durchgeführt, diese sind in Abbildung 24 gezeigt.

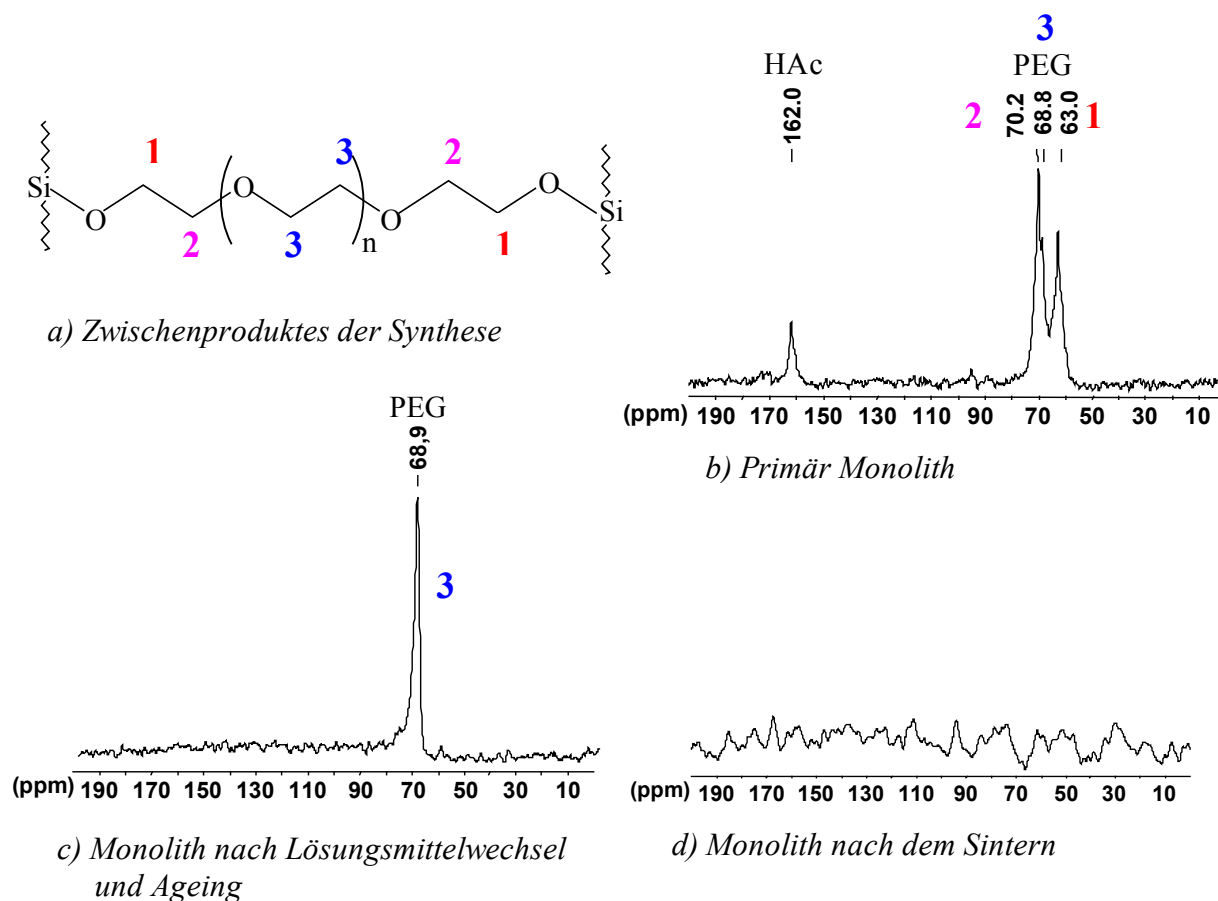


Abbildung 24: ^{13}C -CP/MAS-NMR-Untersuchungen zur Kontrolle der Monolith-Synthese.

Aus diesen Spektren ist ersichtlich, dass das Porogen PEG kovalent während des ersten Reaktionsschrittes an Silanolgruppen des entstehenden Monolithen bindet, was an den unterschiedlichen chemischen Verschiebungen für die PEG-Methylengruppen erkennbar ist. Durch die gute Vermischung der Polymerisationslösung ist davon auszugehen, dass sich eine Art statistisches Co-Polymer bildet. Nach dem Lösungsmittelwechsel und Ageing liegt das PEG wieder in freier Form vor, das als Zwischenstufe gebildete Co-Polymer wurde zerstört. So wird das Herauslösen des Porogens möglich und die gesamte Oberfläche ist für das Ageing in leicht alkalischem

Medium zugänglich. Nach dem Herauswaschen des PEGs mit Ethanol und anschließendem Sintern sind keine Resonanzsignale mehr im ^{13}C -Festkörper-NMR-Spektrum zu erkennen, das Porogen wurde also vollständig unter Freilegung der Makroporen entfernt.

Zur Charakterisierung der Oberfläche wurden BET-Messungen (N_2 -Intrusion) durchgeführt, um die Gesamtoberfläche sowie die durchschnittliche Mesoporen-Größenverteilung zu bestimmen. Diese Messergebnisse sind in Abbildung 25 dargestellt. Es wurden relativ gleichmäßige Mesoporen mit einem durchschnittlichen Radius von 10,8 nm (108 Å) erhalten, dies entspricht den üblichen Porengrößen partikulärer Phasen. Auch die daraus resultierende Gesamtoberfläche von über 400 m^2/g ist mit partikulären Phasen vergleichbar. Leider waren diese Ergebnisse in keinster Weise reproduzierbar, jeder Sol-Gel-Prozeß scheint seine eigene Geschichte zu haben. Schwerwiegenderes Problem hingegen war, das keine C_{30} -Oberflächenmodifikation gelang, da die während der Synthese üblicher Weise eingesetzte hohe Rührgeschwindigkeit durch eine hohe Fliesgeschwindigkeit anscheinend nur unzureichend simuliert werden konnte. Zudem konnten nach Entwicklung unserer Endfittings hocheffiziente Trennkapillaren deutlich einfacher und reproduzierbarer mit partikulären Phasen hergestellt werden, kurz gesagt wurden die Bemühungen zur Herstellung von monolithischen Trennphasen an diesem Punkt aufgegeben.

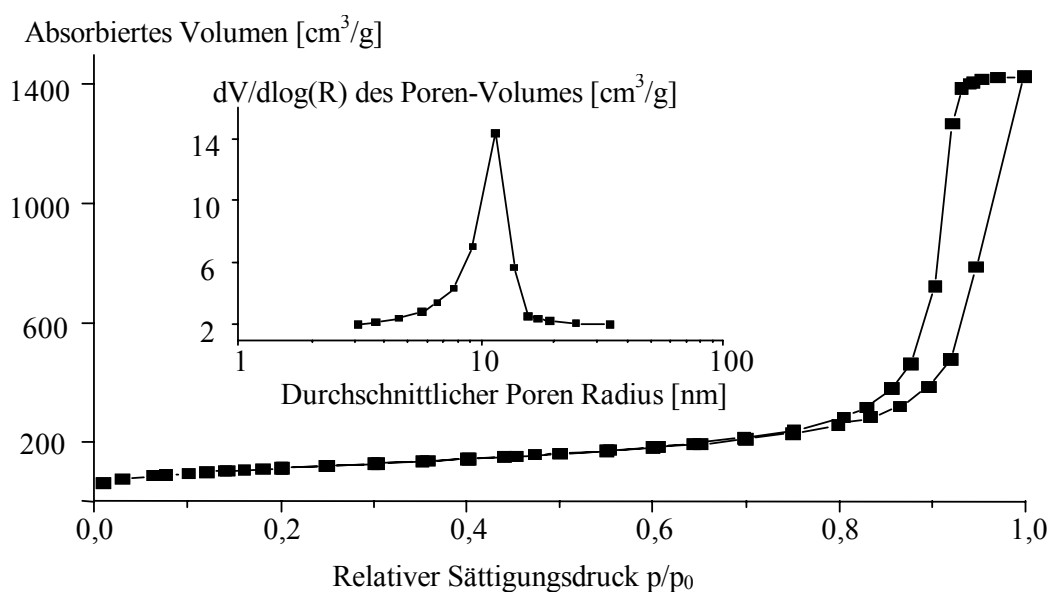


Abbildung 25: BET-Untersuchung eines synthetisierten Silika-Monolithen.

5.2 Kapillar-HPLC-NMR-System Sensitivität

Die selbst hergestellten, hocheffizienten partikulären Trennkapillaren wurden zur Auftrennung von Analyten mit on-line direktgekoppelter Detektion, mit besonderem Schwerpunkt auf der CapLC-NMR, eingesetzt. Neben der hohen Trennleistung der gefertigten Trennkapillaren ist für eine erfolgreiche Analyse auch die Sensitivität des Detektors entscheidend, sowie die Umsetzung der jeweiligen Sensitivitäts-optimierten Teilparameter im gekoppelten System. Zunächst soll nun die Qualität der im solenoiden Mikroprobenkopf erhaltenen NMR-Spektren dargestellt und erläutert werden. Dafür werden, wie bei der Evaluierung von Trennsäulen, Standardsubstanzen verwendet, zur Bestimmung der Signalbreite, und damit verbunden des Auflösungsvermögens des NMR-Spektrometers wird der sogenannte Hump-Test (5% Chloroform in Aceton- d_6) eingesetzt. Die Sensitivität wird meist mittels einer 1 mM Sucroslösung am Signal der anomeren Protonen bestimmt. Die in einem $^1\text{H}/^{13}\text{C}_{\text{inverse}}$ solenoiden Mikroprobenkopf mit 1,5 μl aktivem Detektionsvolumen erhaltenen Spektren sind zusammenfassend in Abbildung 26 dargestellt.

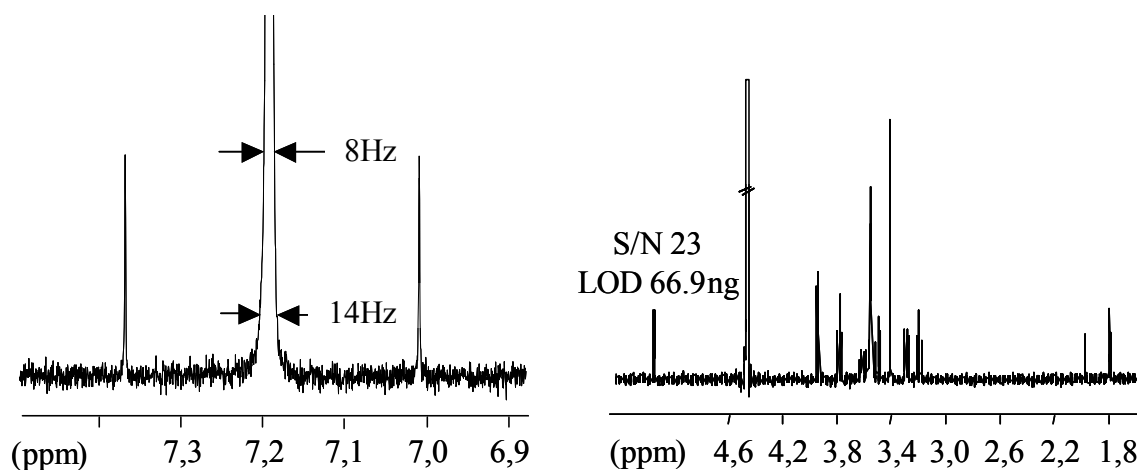


Abbildung 26: Hump-Test (links) und NMR-Sensitivitätstest mit 1 mM Sucrose (rechts).

Der Hump-Test zeigt, dass das ^1H -Chloroformsignal auf Höhe seiner ^{13}C -Sateliten nur eine Linienbreite von 8 Hz aufweist, selbst auf dieser geringen Signalhöhe wären also Signalaufspaltungen, hervorgerufen durch $^3\text{J}_{\text{H,H}}$ -Kopplungen (0 – 20 Hz, in Alkanketten üblicher Weise um 7 Hz), noch detektierbar. Diese für die Struktur-

aufklärung wichtigen Kopplungsmuster sind also, neben der chemischen Verschiebung der Resonanzsignale und deren Integrationswerte, auch in den miniaturisierten Probenköpfen gut zugänglich. Die Empfindlichkeit (Sensitivität) des Probenkopfes wurde mittels 1 mM Sucrose in einem Gemisch aus D₂O und MeCN-d₃ (90:10, v/v) bestimmt. Nach Vermessung nur eines einzigen Transienten hat das Resonanzsignal der anomeren Protonen ein Signal-zu-Rausch Verhältnis von 23, dies entspricht einem Detektionslimit von 66,9 ng (mLOD, S/N = 3). NMR-Detektionslimits im niedrigen Nanogramm-Bereich sind bei direkter Spritzeninjektion also einfach möglich.

Die Mikroprobenkopf-NMR-Detektion ist im Spritzeninjektions-Modus gut zur Vermessung von hochaufgelösten NMR-Spektren im Analyt-Konzentrationsbereich der aus der Kapillartrenneinheit eluierenden Komponenten einsetzbar. Zu Überprüfen gilt aber, ob diese Sensitivität auch in der Kopplung umsetzbar ist. Grundvoraussetzung dafür ist, dass die gesamte eluierende Analytmenge zur NMR-spektrometrischen Detektion im aktiven Messvolumen (1,5 µl) des NMR-Probenkopfes vorliegt und während der Messung auch dort verbleibt. Dies bedeutet, dass der Analyt bei einer Flussrate der Kapillar-HPLC Trennung von 5 µl/min mit einer Halbwertsbreite von unter 0,3 min eluiert, dieser scharfe Peak während des Transfers zum NMR-Probenkopf nicht durch Diffusionseffekte verbreitert wird und exakt nach Verstreichen der sogenannten Totzeit im Probenkopf getrappt werden kann. In wie weit das direktgekoppelte System diese Bedingungen erfüllt, sollte mit einer einfachen Testlösung bestimmt werden. Dazu wurden 5 mg/ml Trimethoxybenzen in MeCN-d₃ : D₂O = 60 : 40 (v,v) gelöst und anschließend das Signal-zu-Rausch Verhältnis der drei magnetisch äquivalenten aromatischen Protonen nach acht aufsummierten Transienten bestimmt. Danach wurden 100, 200, und 500 nl dieser Testmischung in die Kapillar-HPLC injiziert und auf einer selbst hergestellten C₁₈-Kapillare mit der mobilen Phase MeCN-d₃ : D₂O = 60 : 40 „getrennt“. Die eluierten Peaks wurden mittels stopped-flow NMR vermessen. In Tabelle 5 sind die erhaltenen Daten zusammengefasst, die Werte sind jeweils aus drei unabhängigen Messungen gemittelt. Bei direkter Spritzeninjektion, also vollständig gefülltem NMR-Detektionsvolumen, wird ein Detektionslimit von 54 ng erzielt, wiederum also im niedrigen Nanogramm-Bereich. Bei den in Kapillartrenntechniken üblicher Weise injizierten 100 nl hingegen sinkt das

Detektionslimit auf ca. 400 ng. Dieses Detektionslimit kann durch Injektion einer größeren Probenmenge verbessert werden, hier verdeutlicht im Detektionslimit von ca. 160 ng bei Injektion von 500 nl. Vereinfacht gesprochen wird bei Injektion eines Drittels des aktiven Probenkopfvolumens in die Kapillar-HPLC ein im Gegensatz zur direkten Spritzeninjektion um den Faktor drei minimiertes Detektionslimit erzielt. Die UV-Spur aber zeigt bei einer Injektion von 500 nl bereits deutliche Bandenverbreiterung, ist dementsprechend also die obere Beladbarkeitsgrenze der stationären Phase. Eine Injektion noch größerer Injektionsvolumen ist nicht sinnvoll, da durch die Überladung bedingten, verbreiterten Elutionspeaks nicht mehr vollständig im aktiven Volumen des NMR-Probenkopfes getrappt werden können.

| <u>Trimethoxybenzen (5 mg/ml)</u> | <u>S/N</u> | <u>mLOD [ng]</u> | <u>UV-Halbwertsbreite [min]</u> |
|--|-------------------|-------------------------|--|
| Spritzeninjektion | 417 ± 32 | 54 | - |
| 500 nl | 143 ± 2 | 158 | 0,24 |
| 200 nl | 70 ± 4 | 321 | 0,21 |
| 100 nl | 55 ± 2 | 412 | 0,21 |

Tabelle 5: Detektionslimits im direktgekoppelten CapLC-NMR-System.

Neben der Peakverbreiterung in der Trennkapillare wirken sich auch Bandenverbreiterungsphänomene in der Transferkapillare negativ auf die Erzielung optimaler Detektionslimits aus. Messungen zeigten allerdings, dass diese Effekte annähernd vernachlässigbar sind, bei Verwendung einer 75 µm Innendurchmesser Transferkapillare tritt nur eine Peak-Verbreiterung von ca. 3% pro Meter auf, in unserem System wurden Transferkapillaren mit nur 50 µm I.D. verwendet, die Bandenverbreiterung in der Transferkapillare ist also noch geringer. Beispielhaft sei dies in Abbildung 27 gezeigt, zur Verdeutlichung der Bandenverbreiterung in der Transferkapillare ist hier die UV-Spur (gepunktet), gemessen direkt nach der Trennkapillare, neben dem erhaltenen NMR-Peakprofil nach Transfer zum NMR-Probenkopf aufgetragen. Hierfür wurden die Signalintensitäten der aromatischen Protonen von Trimethoxybenzen aus einem continuous-flow Experiment bestimmt, welches jede Sekunde ein Protonenspektrum aufzeichnet. Hinzuweisen ist darauf, dass die jeweiligen Peakprofile auf

gleiche Höhe normiert wurden, die Sensitivität der NMR-Detektion ist aber natürlich deutlich geringer als die der UV-Detektion.

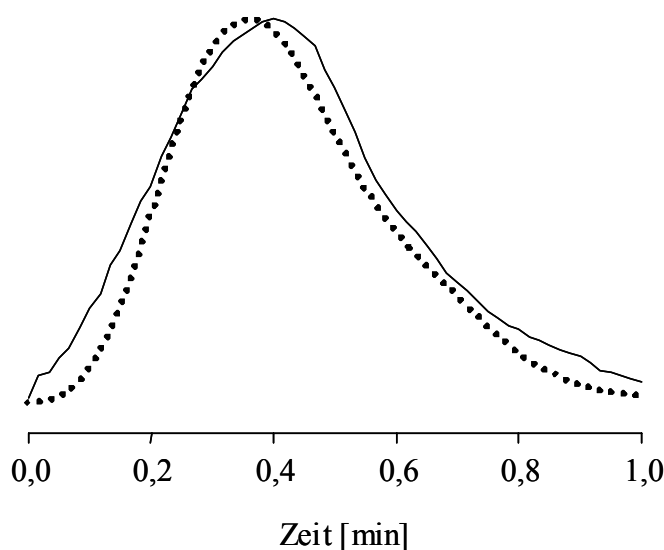


Abbildung 27: Vergleich von UV- (gepunktet) und NMR-Peakform zur Visualisierung der Bandenverbreiterung auf dem Transferweg.

5.3 Trennung und Identifikation von Tocopherol-Homologen

Nach oben geschilderten Vorarbeiten wie der Herstellung effizienter Trennkapillaren, sowie Ermittlung des Detektionslimits der Mikroprobenkopf-NMR im Spritzeninjektions- und direktgekoppelten Modus, sollten die erhaltenen Ergebnisse auf biologisch aktive Substanzen transferiert werden. Dazu diente als erste Messung ein artifizierlicher Standard von Tocopherol-Homologen^[158], da diese Analyse schon in meiner Diplomarbeit mittels klassischer HPLC eingehend untersucht wurde und somit ein großer Erfahrungsschatz bei der Analytik dieser Substanzklasse vorlag.

5.3.1 Etablierung der Kapillar-HPLC-Trennung

Erster Schritt der Analyse war die Umsetzung der chromatographischen Trennung der Tocopherol-Homologen in Kapillarsäulen, als auf dieses Trennproblem massgeschneiderte stationäre Phase wurde eine C₃₀-Phasen mit erhöhter Formerkennung (shape selectivity) verwendet. Die erzielte, optimierte Trennung mit einer selbstgepackten C₃₀-Kapillare (15 cm x 250 µm) ist in Abbildung 28 im Vergleich zu einer mit derselben stationären Phase gefüllten klassischen HPLC-Säule (25 cm x 4,6 mm)

gezeigt. Als artifizieller Standard diente eine 1,67 mg/ml Lösung jeweils aller Tocopherol-Homologen, sowie Tocol und α -Tocopherol-Acetat. Die zur Trennung verwendete mobile Phase war MeOH : H₂O = 96 : 4 (v/v) bei einer Flussrate von 1 ml/min in der klassischen HPLC (a) und MeOH-d₄ : D₂O = 96 : 4 (v/v) bei 5 μ l/min in der Kapillar-HPLC (b). Die UV-Detektion erfolgte jeweils bei 285 nm. Die Kapillar-HPLC-Trennung zeigt schmale, symmetrische Peaks, was für eine gute Säulenpackung sowie vernachlässigbares Totvolumen im Analysensystem spricht. Zudem konnten in beiden chromatographischen Trennungen alle Homologen voneinander getrennt werden, sogar die schwierig zu separierenden Konfigurationsisomere β - und γ -Tocopherol können angetrennt werden. Dies ist nicht auf den häufig eingesetzten C₁₈-Phasen möglich^{[159],[160]}. Zudem konnte bei Erhalt der chromatographische Kenngrößen, wie dem Trennfaktor α und der für die Sensitivitäts-optimierte NMR-Detektion besonders wichtigen Trenneffizienz, beschrieben durch die HETP-Werte, die Analysenzeit durch Minimierung der jeweiligen Retentionsfaktoren k' deutlich von 25 min auf unter 11 min mehr als halbiert werden. Diese chromatographischen Kenngrößen sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Die Ergebnisse zeigen deutlich die Vorteile der Kapillar-HPLC-Trennung, neben der drastischen Reduktion der benötigten mobilen Phase (5 μ l/min im Vergleich zu 1 ml/min) vor allem die minimierte Probenmenge (100 nl im Vergleich zu 25 μ l Injektionsvolumen, dies entspricht ca. 0,2 μ g im Vergleich zu ca. 42 μ g Absolutmenge an injizierten Tocopherolen).

| | k' | | α | | HETP [10^{-5} m] | |
|-----------------------------|------|-------|----------|-------|---------------------|----------------|
| | HPLC | CapLC | HPLC | CapLC | HPLC | CapLC |
| Tocol | 2,35 | 1,76 | | | 3,57 | 2,46 |
| δ -Tocopherol | 3,11 | 2,36 | 1,32 | 1,34 | 3,95 | 3,52 |
| γ -Tocopherol | 3,94 | 3,09 | 1,27 | 1,31 | * ¹ | * ¹ |
| β -Tocopherol | 4,16 | 3,24 | 1,06 | 1,05 | * ¹ | * ¹ |
| α -Tocopherol | 5,08 | 3,86 | 1,22 | 1,19 | 9,19 | 2,92 |
| α -Tocopherol-Acetat | 8,25 | 6,21 | 1,62 | 1,61 | 9,98 | * ² |

Tabelle 6: Vergleich zwischen HPLC und Kapillar-HPLC, *¹ nicht Basisliniengetrennt, *² unter dem Detektionslimit.

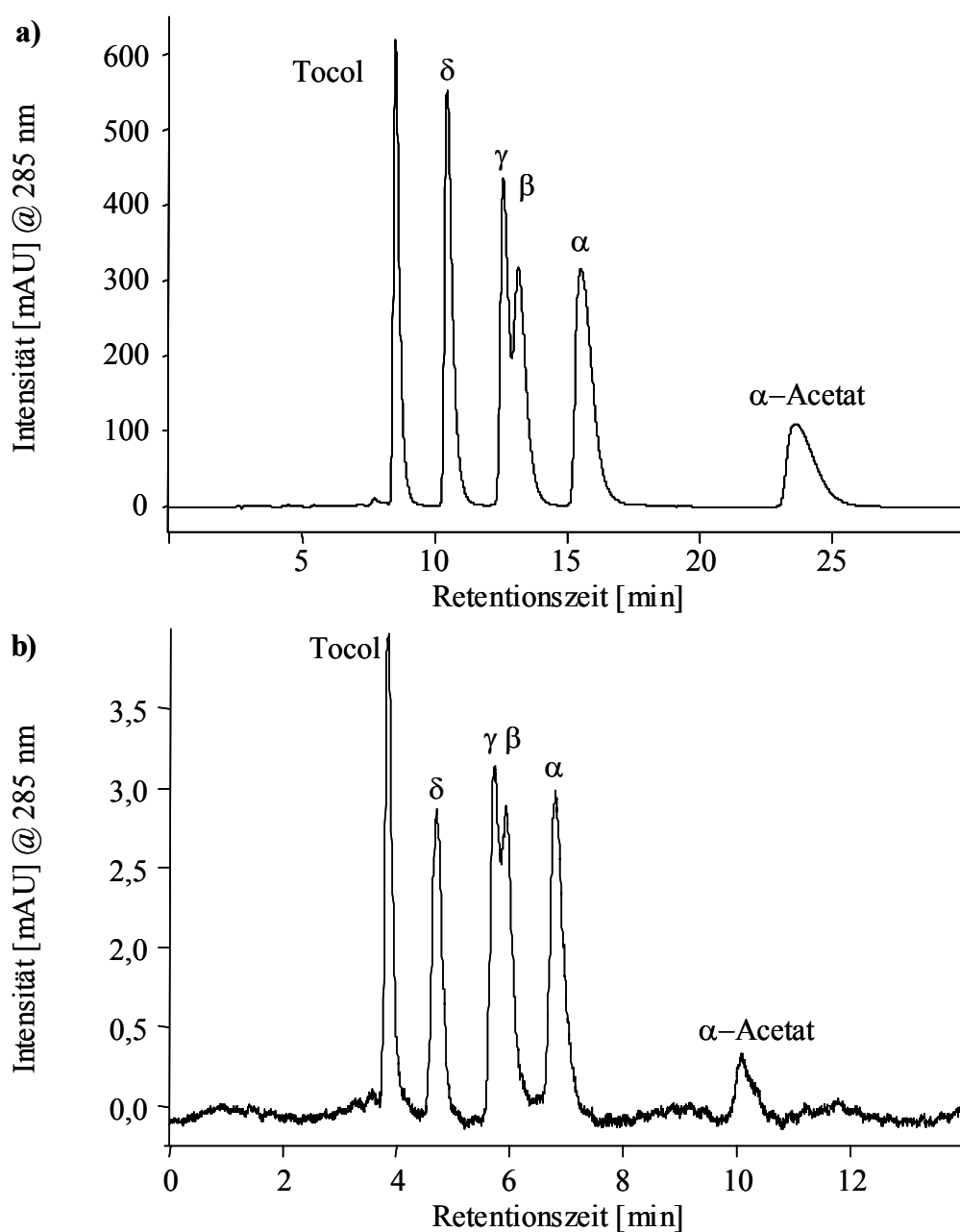


Abbildung 28: Chromatographische Trennung der Tocopherole in der klassischen HPLC (a) und Kapillar-HPLC (b) bei vergleichbaren Bedingungen.

5.3.2 Kapillar-HPLC-ESI/MS-Kopplung

Nachdem die Tocopherol-Trennung erfolgreich in den Kapillarmaßstab transferiert wurde, sollte diese chromatographische Trennung auch in miniaturisierten direktgekoppelten Analysensystemen angewandt werden. Zunächst wurde sie an die ESI-Massenspektrometrie (positiver Ionisationsmodus) gekoppelt, da die Massenspektrometrie als sehr empfindlicher Detektor bevorzugt in miniaturisierten Trenn-

techniken verwendet wird. Die sanfte ESI-Ionisation ermöglicht die Detektion von meist protonierten Molekülonen $[M+H]^+$, häufig treten auch Natriumaddukte $[M+Na]^+$ auf. Durch die Molekülonenpeaks ist eine einfache Identifikation der eluierten Analyten möglich. Neben der hohen Sensitivität zeichnet sich die Massenspektrometrie also auch durch eine hohe Selektivität aus. Diese (Massen-) Selektivität beruht auf dem Vermögen der Massenspektrometrie, Molekülonen gemäss ihres Masse-zu-Ladungs Verhältnisses zu trennen, nach der chromatographischen Trennung erfolgt somit eine Trennung der eluierenden Peaks in einer zweiten Dimension. Neben der reinen Detektion der Molekülonenpeaks ist es auch möglich, charakteristische Fragmentationen durch Kollisiondissoziation in z.B. einer Ionenfalle zu erzeugen, welche eine genauere Auswertung und Strukturaufklärung der Analyten ermöglichen. Solche, durch Retro-Diels-Alder- (RDA-) Reaktion gebildete charakteristische sekundäre Molekülonen sind auch für Tocopherole bekannt^[161]. Die genannten Vorteile machen die LC-MS daher zum am häufigsten eingesetzten direktgekoppelten Analysensystem. In Abbildung 29 ist ein Sensitivitäts-optimiertes extracted ion chromatogram (EIC) der Kapillar-HPLC-Trennung der Tocopherole gezeigt.

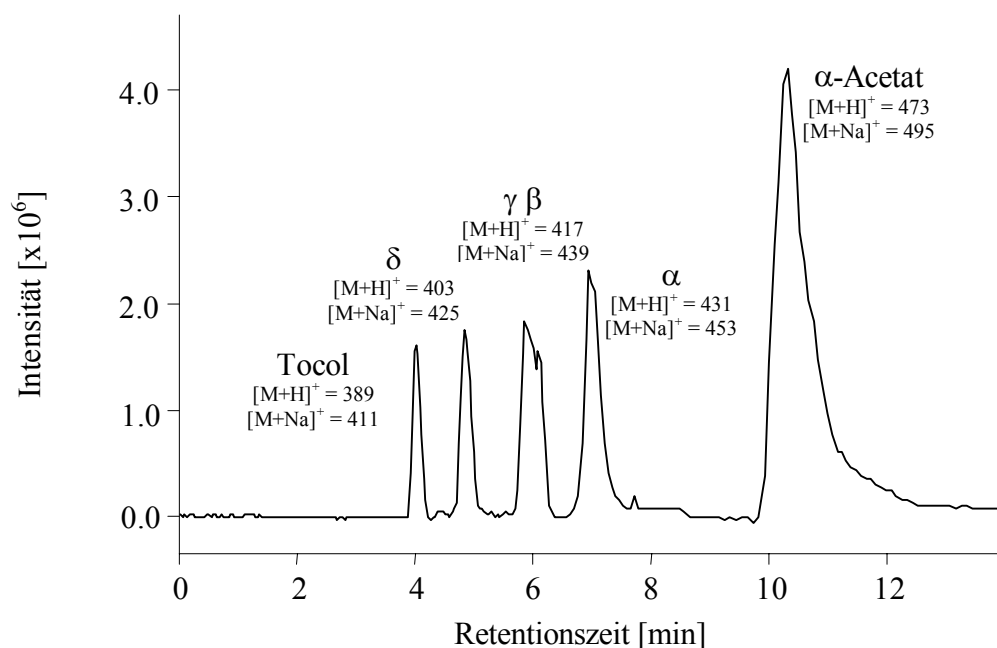


Abbildung 29: EIC der optimierten Kapillar-HPLC-ESI/MS-Messungen.

In diesem wurden zum einen die Masse-zu-Ladungs Verhältnisse der jeweiligen Tocopherole und deren Natriumaddukte aufsummiert, wodurch ein (virtuell) gesteigertes Signal-zu-Rausch Verhältnis unter bestmöglicher Nutzung der Selektivität der massenspektrometrischen Detektion und damit gesteigerte Empfindlichkeit resultiert, zum anderen für jedes Homolog ein Zeitfenster definiert, welche optimale Ionisation der jeweiligen Homologen garantiert. Dazu wurde der Massenbereich um die zu detektierenden Ionen ($[M+H]^+$ bzw. $[M+Na]^+$) eingeeengt, zudem die Parameter der Ionenfalle auf höchste Empfindlichkeit bei gleichbleibender Trennstärke hin optimiert. Diese methodisch optimierten MS-Detektionsparameter sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Zur Vermeidung von Peakverbreiterung wurde als UV-Detektionszelle wie Transferkapillare zum ESI-Ionisationsinterface mit auf diese geringen Flussraten angepasster Geometrie eine 75 μm Innendurchmesser Glaskapillare verwendet. Die chromatographischen Bedingungen einschließlich der Konzentration der Standardlösung sind mit in Kapitel 5.3.1 angegebenen Kapillar-HPLC-Trennung identisch.

| <u>Segment (Analyt)</u> | <u>t_R [min]</u> | <u>Massenbereich [m/z]</u> | <u>Averages</u> | <u>Target</u> |
|--------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------|----------------------|
| 1 (Tocol) | 0,0 – 4,2 | 380 - 420 | 25 | 15000 |
| 2 (δ -Tocopherol) | 4,3 – 5,2 | 395 - 435 | 25 | 15000 |
| 3 (γ -, β -Tocopherol) | 5,3 – 6,2 | 400 - 450 | 30 | 15000 |
| 4 (α -Tocopherol) | 6,3 – 8,5 | 425 - 460 | 45 | 15000 |
| 5 (α -Tocopherol-Acetat) | 8,6 – 14,0 | 460 - 500 | 60 | 12000 |

Tabelle 7: Optimierte ESI/MS-Parameter.

Alle Tocopherole können anhand ihrer Molekülionenpeaks eindeutig identifiziert werden, im Vergleich zur UV-Detektion mit deutlich gesteigerter Empfindlichkeit, speziell für das als letztes eluierende α -Tocopherol-Acetat. Acetat- oder Methoxygruppen lassen sich sehr gut in der ESI ionisieren, ähnliche außergewöhnlich hohe Nachweisempfindlichkeiten zeigte auch das Formononetin (vgl. Kapitel 5.4.2). So konnte in den ESI/MS-Messungen für α -Tocopherol das Signal-zu-Rausch Verhältnis im Vergleich zur UV-Detektion verdreifacht, für α -Tocopherol-Acetat sogar um den Faktor 25 erhöht werden. Die massenspektrometrische Detektion liefert also genauere

Hinweise auf die zu analysierende Verbindung (nämlich das Molekulargewicht), und dies bei erhöhter Sensitivität, ist also der UV-Detektion deutlich überlegen. Hinzuweisen ist aber auf eine Schwierigkeit. Die Konfigurationsisomere β - und γ -Tocopherol haben das gleiche Molekulargewicht, dies gilt im Übrigen auch für die durch RDA-Fragmentierung entstehenden sekundären Ionen. Konfigurations-, geometrische und optische Isomere sind also nicht oder nur sehr schwer mittels Massenspektrometrie zu unterscheiden. β - und γ -Tocopherol zeigten in diesen Experimenten nur einen qualitativen Unterschied, nämlich in der Bildung von Natriumaddukten. β -Tocopherol scheint dabei eine höhere Tendenz zur Bildung dieser Addukte zu haben. Da Natriumaddukte allerdings nicht generell gebildet werden, sondern unter anderem von der Lagerung der Substanzen in Glasgefäßen und/oder der Sauberkeit der Glastransferkapillare (zwischen Ionisationsinterface und Hochvakuumzone) im Massenspektrometer abhängen, ist dies sicher kein universelles Unterscheidungskriterium. Eine eindeutige Unterscheidung dieser beiden Tocopherol-Isomere kann hingegen leicht mittels der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie erfolgen.

5.3.3 Continuous-flow Kapillar-HPLC-NMR-Kopplung

Die NMR-Spektroskopie ist die Detektionsart mit dem größten Informationsgehalt über die zu untersuchende Verbindung. Die gemessenen NMR-Spektren ermöglichen eine eindeutige Identifikation und Strukturaufklärung von Substanzen, im speziellen ist auch die Unterscheidung von Konfigurations- und Stereo-Isomeren (Z/E-Isomere) möglich. Allerdings sind üblicher Weise im Vergleich zu anderen Detektoren, wie z.B. der Massenspektrometrie, deutlich höhere Konzentrationen zur Vermessung von NMR-Spektren nötig. Diese Empfindlichkeitsbarriere konnte mit Mikroprobenköpfen deutlich gesenkt werden, so dass nun auch Kapillartrenntechniken an die NMR-spektroskopische Detektion gekoppelt werden können. Die Detektion sollte in Echtzeit erfolgen, d.h. die Registrierung der NMR-Spektren erfolgt im fließenden System der eluierenden, chromatographisch getrennten Analyten - dem sogenannten continuous-flow NMT-Modus. Dazu sind einige methodische Anpassungen sowohl der chromatographischen Trennung, als auch der NMR-spektroskopischen Detektion nötig. Die chromatographische Trennung betreffend sind folgende Parameter zu

bedenken und die Trennung darauf anzupassen. Wichtig ist es, eine möglichst lange Aufenthaltsdauer der Analyten in der NMR-Detektionszelle zu gewährleisten, oft wird daher die Flussrate der HPLC-Trennung herabgesetzt. Entscheidender aber ist eine gute Auftrennung der zu detektierenden Analyten, so dass innerhalb einer NMR-Messreihe (in diesem Fall 16 Transienten, entsprechend 36 Sekunden) jeweils nur eine Substanz detektiert wird. Dies war eine besondere Herausforderung für das schwer zu trennende Konfigurationsisomerenpaar β - und γ -Tocopherol. Ebenso muss die Konzentration erhöht werden, um die Empfindlichkeitslimits der NMR-Spektroskopie zu erreichen. So wurde die Konzentration der Standardlösung auf 6,67 mg/ml (je Homolog) erhöht und zudem 200 nl dieser Standardlösung in die Kapillar-HPLC Trennung injiziert, dadurch wurde die Gesamtmenge auf 1,33 μ g je Analyt verachtfacht. Dies entspricht allerdings nur ca. 0,5% der bisher benötigten Gesamtmenge bei vergleichbaren Ergebnissen^[162]T. Die hohe Konzentration hatte allerdings eine Überladung (Konzentrations- evtl. auch Volumenüberladung) der Trennphase zur Folge, die daraus resultierenden deutlich verbreiterten Peaks erschweren die Kapillar-HPLC-Trennung erheblich. Dennoch konnte mit einer mobilen Phase bestehend aus MeOH-d₄ : D₂O = 90 : 10 bei einer Flussrate von 5 μ l/min eine geeignete Trennung ausgearbeitet werden, durch den hohen Anteil an D₂O in der mobilen Phase wurde die Analysenzeit aber deutlich verlängert, α -Tocopherol-Acetat eluiert bei diesen Bedingungen erst nach ca. 80 min. Dem hingegen konnte der Trennfaktor α für das Paar β - und γ -Tocopherol auf 1,08 erhöht werden, die Peakmaxima sind also um über 2 min getrennt, so dass die Detektion eines jeweils einzelnen Isomers annähernd möglich ist. Das erhaltene Pseudo 2D-continuous-flow CapLC-NMR-Spektrum ist in Abbildung 30 gezeigt. In diesem Konturplot sind auf der x-Achse (F1 Dimension) die chemische Verschiebung, in F2 (y-Achse) die Retentionszeit angegeben.

Alle Homologen sind in diesem continuous-flow CapLC-NMR-Konturplot eindeutig zu unterscheiden, dies ist vor allem an den aromatischen Signalen (hellgraue Box) sowie den Methylgruppen am aromatischen Ring (graue Box, 2,0 – 2,2 ppm) möglich. So zeigt δ -Tocopherol zwei aromatische Protonensignale und nur ein Methylgruppensignal, β - und γ -Tocopherol jeweils ein aromatisches Protonensignal und jeweils zwei Methylgruppenresonanzen während α -Tocopherol und dessen Acetat

kein aromatisches Proton besitzt, dafür aber drei aromatische Methylresonanzen zeigt. Das α -Tocopherol-Acetat zeigt zudem das Resonanzsignal der acetalischen Methylgruppe bei 2,3 ppm (dunkelgraue Box). Die eindeutige Unterscheidung aller Homologen ist also bereits aus diesem continuous-flow ^1H -NMR-Spektrum möglich.

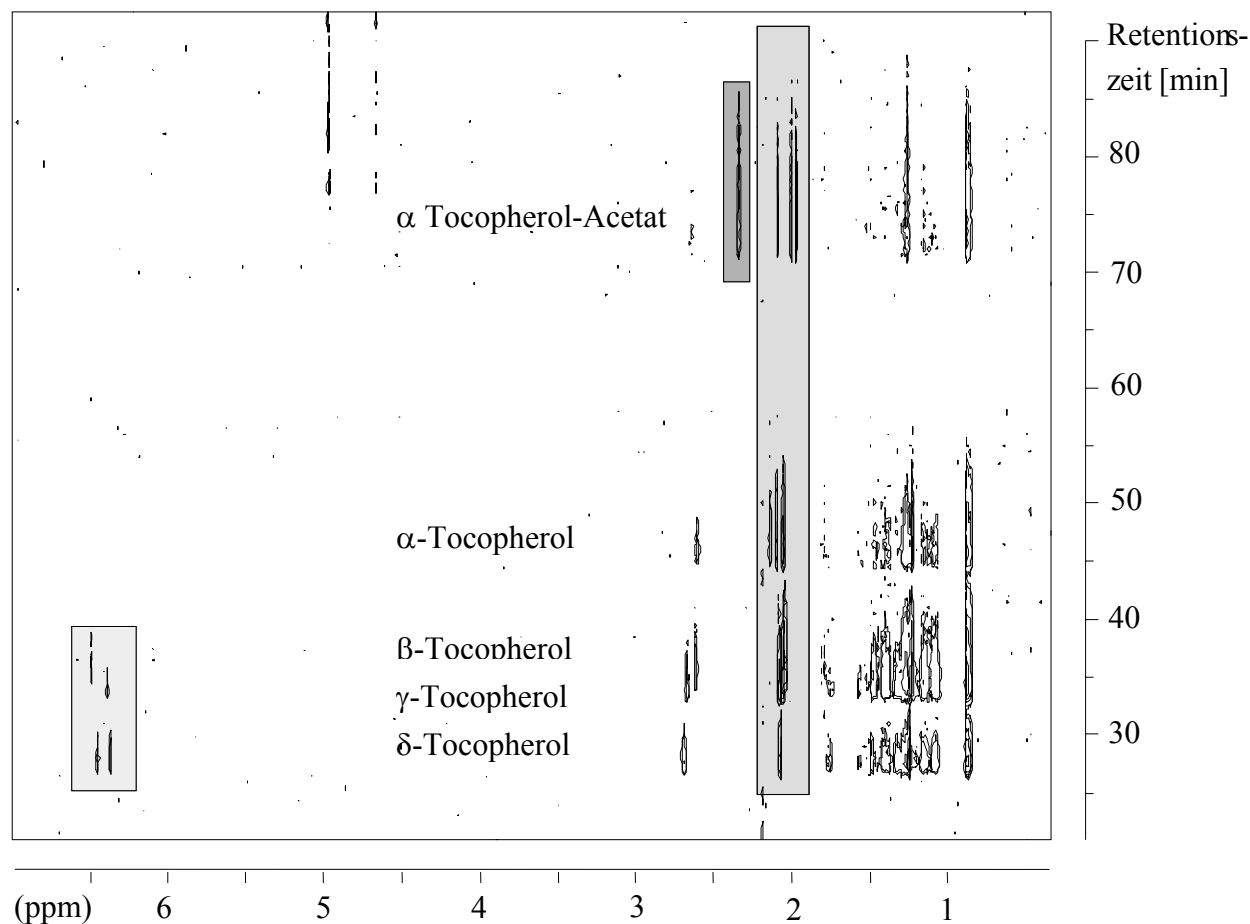


Abbildung 30: Continuous-flow ^1H -NMR-Konturplot der Tocopherol Kapillar-HPLC-Trennung.

Für eine genaue Peakzuordnung ist der Konturplot allerdings schlecht geeignet. Dafür werden Protonenspektren an den jeweiligen Peakmaxima der LC-NMR-Trennung extrahiert. Diese sind in Abbildung 31 gezeigt. Trotz des durch die geringe Analytmenge und kurze NMR-Messzeit (16 Transienten) bedingte relativ schlechte Signal-zu-Rausch Verhältnis, sind alle Resonanzsignale eindeutig zuzuordnen. Zudem sind Restlösungsmittelsignale zu sehen, welche nicht vollständig durch die angewandte Lösungsmittelunterdrückung eliminiert werden konnten. Diese befinden sich aber in einem Verschiebungsbereich, in dem keine Resonanzsignale der

Tocopherol-Homologen liegen, sind also nicht störend. Die bereits aus dem continuous-flow NMR-Spektrum erhaltenen charakteristischen Unterschiede sollen hier nochmals detailliert besprochen werden. Für δ -Tocopherol sind zwei aromatische Signale sichtbar, Proton Nummer 7 bei 6,5 ppm und Proton Nummer 5 bei 6,4 ppm, während für γ -Tocopherol nur das Proton Nummer 5 sichtbar ist. Für β -Tocopherol ist Signal des Protons 7 erkennbar, daneben aber auch Proton 5 noch erahnbar, hier zeigt sich die nicht vollständige Abtrennung des zuvor eluierenden γ -Isomers. Diese unvollständige Trennung ist noch deutlicher am Signal des Protons 4 erkennbar. Eine Methylgruppe in Position 5 im aromatischen Ring führt zu einer kleinen Hochfeldverschiebung dieses Signals, sowohl für γ - wie auch β -Tocopherol sind aber jeweils beide chemischen Verschiebungen sichtbar. Eine weitere, die Unterscheidung der Homologen ermöglichende Signalgruppe sind die Resonanzen der Methylgruppen, die am aromatischen Ring gebunden sind. So treten entweder ein, zwei oder drei Signale im Bereich zwischen 2,0 und 2,2 ppm auf. Hinweisen möchte ich hier auf die kleine Hochfeldverschiebung dieser Signale im α -Tocopherol-Acetat, die durch den Einfluss der Acetatgruppe im Vergleich zum α -Tocopherol verursacht wird. Weiter wichtige Signale sind im Bereich zwischen 0,8 und 1,7 ppm (Signale der gesättigten Phytlyseitenkette), bei 1,9 ppm das Signal der Protonen 3, sowie die bereits angesprochene Acetatgruppe des α -Tocopherol-Acetats bei 2,3 ppm.

5.3.4 Stopped-flow 2D-NMR-Experimente

Zur Strukturaufklärung von Verbindungen sind ^1H -NMR-Spektren oft nicht ausreichend. Für solche Aufgaben ist die Vermessung von ^{13}C -NMR-Spektren sowie 2D-NMR-Experimenten unverzichtbar, eine kombinierte Auswertung aller erhaltenen Daten ermöglicht dann die Zuordnung eines jeden Resonanzsignals und damit die eindeutige Ermittlung der Struktur des untersuchten Analyten. Zur Vermessung von 2D-NMR-Spektren, aber auch von 1D ^{13}C -NMR-Experimenten, müssen deutlich mehr Transienten vermessen werden, als im continuous-flow Modus zur Verfügung stehen.

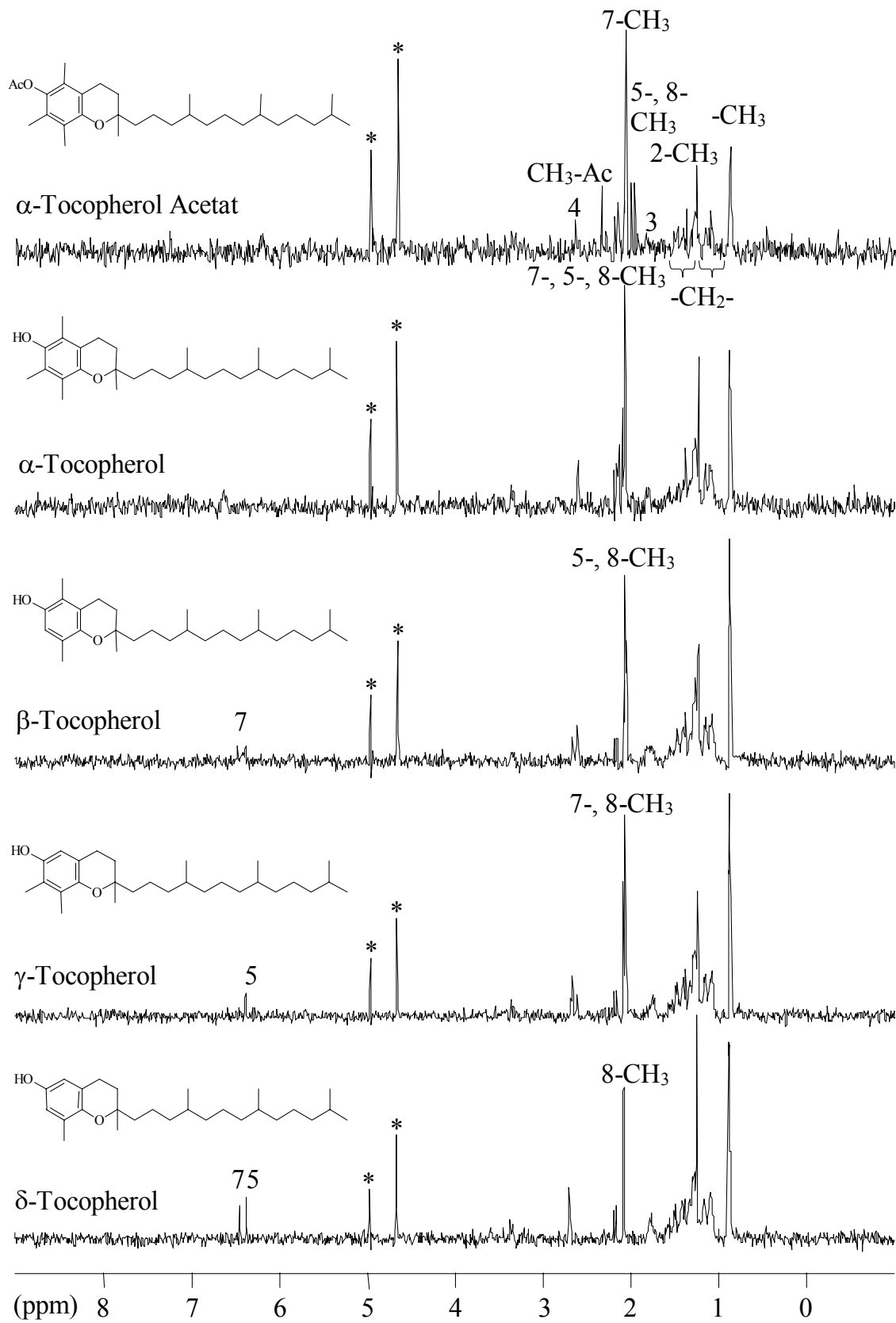


Abbildung 31: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Tocopherole extrahiert aus den jeweiligen Peakmaxima der continuous-flow Messung, * Lösungsmittelsignale.

Daher wird die chromatographische Trennung genau dann angehalten, wenn das Analytpeakmaximum das aktive Detektionsvolumen des NMR-Probenkopfes erreicht und dann in diesem statischen Zustand das NMR-Experiment durchführen (stopped-flow Modus). Nach der Messung wird die chromatographische Trennung fortgeführt, weitere Analyten können NMR-spektroskopisch vermessen werden. Zu bedenken sind Diffusionseffekte, welche während der NMR-Messungen zu Peakverbreiterung führen, nach sehr langen NMR-Messungen ist daher eine neue Injektion ins Trennsystem und trappen eines jeweils einzelnen Peaks sinnvoll.

Ein Beispiel, das $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY 45 stopped-flow NMR-Spektrum von α -Tocopherol, ist in Abbildung 32 gezeigt. Die chromatographischen Trennbedingungen entsprachen denen der CapLC-UV- bzw. CapLC-ESI/MS-Messungen, die Konzentration des α -Tocopherols entsprach allerdings den continuous-flow Bedingungen, also 6,65 mg/ml. Alle Außerdiagonal-Peaks, sogenannte cross peaks, stellen homonukleare Spin-gekoppelte Protonen dar (also die Information, welche aus der Multiplizität der jeweiligen Signale im 1D ^1H -NMR-Spektrum ersichtlich ist). Die wichtigsten cross peaks sind zwischen den Protonen 4 und 3 sichtbar, sowie im Resonanzsignalbereich der gesättigten Phytlyseitenkette zwischen 0,8 und 1,6 ppm. In diesem Bereich sind die Kopplungen zwischen den Methyl-, Methylen- und Methinprotonen detektierbar. Die endständigen Methylgruppen ($12'$ -CH₃) sind im Gegensatz zu den Methylgruppen in der Seitenkette ($4'$ -CH₃, $8'$ -CH₃) leicht hochfeldverschoben, alle Methylprotonen zeigen die Kopplung zu den Methinprotonen in tieferem Feld. Dazwischen liegen die Resonanzsignale der Methylengruppen in der Seitenkette und deren Kopplungsdiagonalpeaks sowie das Signal der 2-Methylgruppe im Chromanol-Grundkörper. Die beiden 1D ^1H -Spektren entlang den Achsen wurden mit direkter Spritzeninjektion einer 10 mg/ml α -Tocopherol-Lösung unter Aufsummierung von 32k Transienten vermessen.

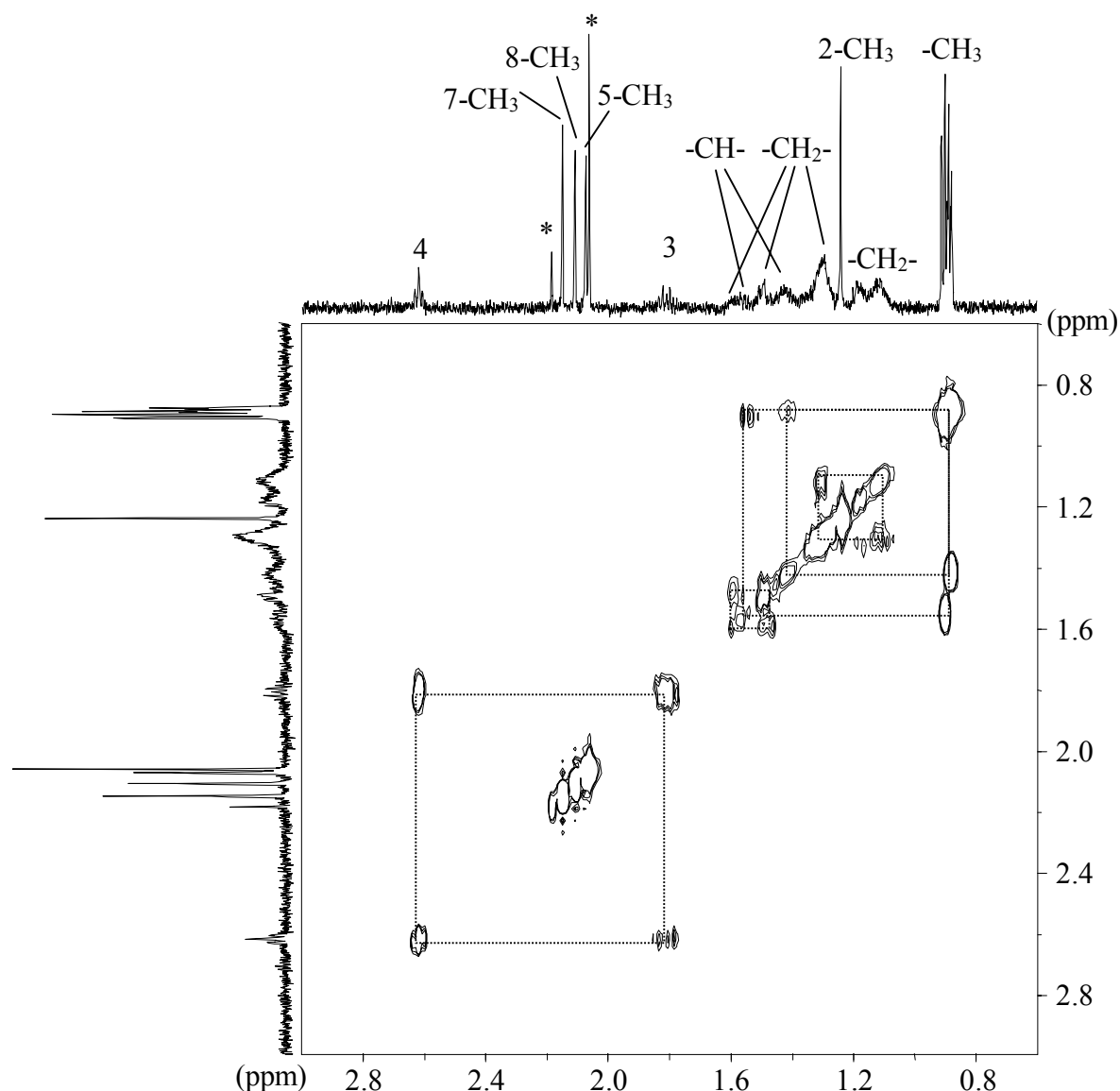


Abbildung 32: $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY 45 stopped-flow NMR-Spektrum von α -Tocopherol.

5.4 Identifikation von Isoflavonoiden in *Radix Astragali*

Zur Vorbereitung der CapLC-NMR-Experimente der Realprobe *Radix Astragali* sollte zuerst das Themengebiet anhand artifizierlicher Flavonoidstandards unter Anwendung miniaturisierter direktgekoppelter Systeme ausgearbeitet werden. Dazu dienen zwei Standardlösungen, eine hochkonzentrierte Lösung aus Quercetin, Kaempferol und Formononetin für continuous-flow NMR-, sowie eine verdünntere Lösung dieses Standards für CapLC-ESI/MS-Messungen, und eine Standardlösung niedriger Konzentration dieser zwei Flavonoide und deren 3-O- β -D-Glykosiden und dem Isoflavonoid Formononetin mit dessen 7-O- β -D-Glykosid für stopped-flow

NMR-Messungen, welche dann auf den *Radix Astragali* Extrakt transferiert wurden. Diese Experimente werden im Folgenden besprochen und schließlich die Anwendung auf die Realprobe *Radix Astragali* abgehandelt.

5.4.1 Kapillar-HPLC-NMR-Messungen einer Flavonoid Standardmischung

Zuerst sollte ein hochkonzentrierter Flavonoid-Standard mittels continuous-flow NMR vermessen werden. Hier bietet sich die Gelegenheit, neben den erhaltenen NMR-Daten auch die Optimierung der chromatographischen Trennung detailliert zu besprechen. Es sind hier vor allem die Herstellung der hochkonzentrierten Standardlösung zu nennen und deren anschließende Trennung. Üblicherweise werden Standardlösungen von Flavonoiden in MeOH hergestellt, es zeigte sich allerdings schnell, dass die Löslichkeitsgrenze der Substanzen in MeOH bei ca. 2 mg/ml lag. Diese Konzentration ist für continuous-flow NMR-Experimente aber nicht ausreichend. Eine deutlich höhere Löslichkeit der Substanzen wurde in Aceton erhalten, hier konnten bis zu 15 mg/ml problemlos gelöst werden. Da die Injektionslösung aber möglichst der initialen Lösungsmittelzusammensetzung der chromatographischen Trennung entsprechen sollte (hier ursprünglich isokratisch MeCN-d₃ : D₂O = 60 : 40 bei 5 µl/min), wurde mit der Standardlösung aus reinem Aceton-d₆ eine sehr schlechte Trennung mit gesplitteten Peaks auf einer 15 cm x 250 µm C₁₈-Kapillartrennsäule erhalten (vgl. Abbildung 33). Allerdings waren die unter diesen chromatographischen Bedingungen generierten Trennfaktoren α für alle Komponenten sehr groß. Um die genannten Probleme zu beseitigen wurden folgende Parameter verändert: Zuerst wurde die isokratische mobile Phase in ihrem Gehalt an MeCN-d₃ auf 70% erhöht, die Retentionszeiten verkürzten sich dadurch, so dass schmalere Peaks, vorteilhaft für die NMR-Detektion, eluieren. Ebenso wurde der Standardlösung D₂O neben Aceton-d₆ zugegeben, um diese Lösung näher an die Mischung der mobilen Phase heranzuführen. Mit 20% D₂O in der Standardlösung konnten noch 10 mg/ml der Flavonoide gelöst werden, da dann aber scharfe Elutionspeaks ohne splitting und damit erhöhter Konzentration in einem kürzeren Retentionszeitfenster erhalten wurden, sollte eine continuous-flow NMR-Detektion möglich sein. Die erhaltenen

Chromatogramme der Kapillar-HPLC-Trennungen sind in Abbildung 33 nochmals zusammengefasst.

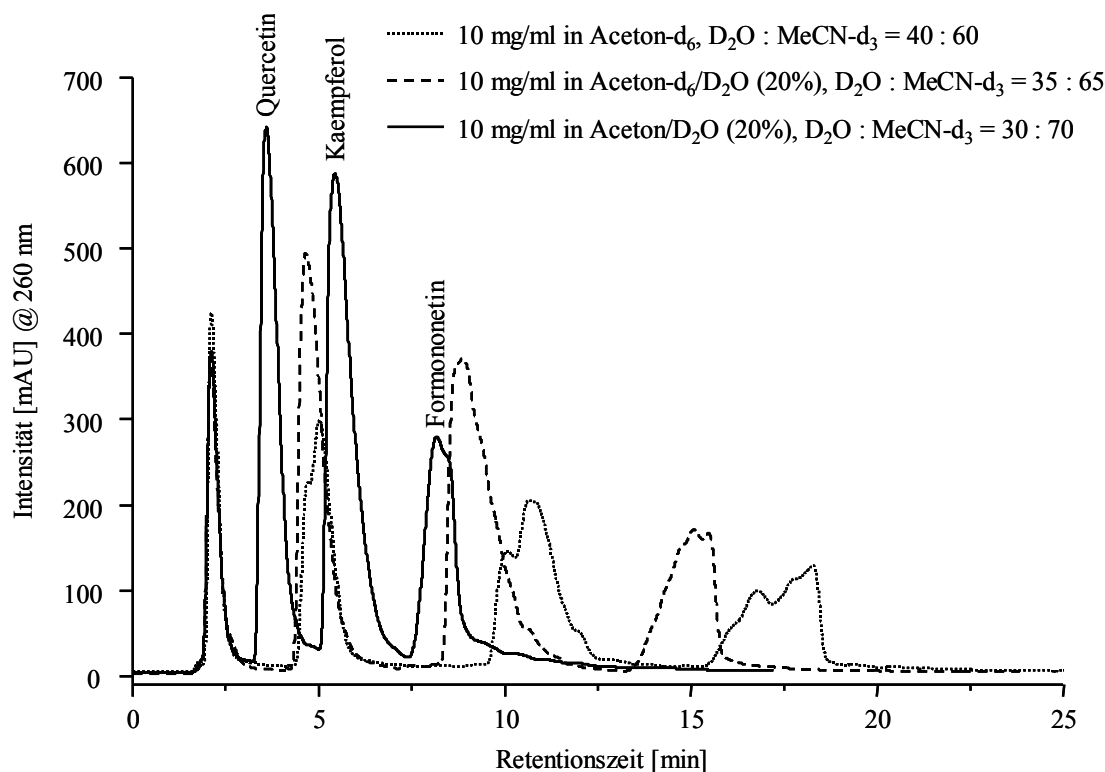


Abbildung 33: Optimierung der Kapillar-HPLC-Trennung dreier Flavonoide für die continuous-flow ¹H-NMR-Detektion.

Diese optimierte Kapillar-HPLC-Trennung wurde on-line gekoppelt mittels continuous-flow ¹H-NMR detektiert, der erhaltene Kontourplot ist in Abbildung 34 gezeigt. Die Verbindungen können leicht an ihren aromatischen Protonen im Verschiebungsbereich zwischen 6,5 und 8,5 ppm unterschieden werden, für Formononetin ist zudem die Methoxygruppe bei ca. 4,1 ppm erkennbar, dessen NMR-Spektrum wird eingehender bei den stopped-flow NMR-Messungen behandelt. Quercetin, welches sich vom Kaempferol durch eine zusätzlich phenolische Hydroxylgruppe im B-Ring unterscheidet, zeigt fünf Resonanzsignale. Die Signale der aromatischen Protonen des A-Rings (6 und 8) sind mit denen des Kaempferols identisch, die Resonanz bei 7,2 ppm entspricht dem Proton 5' im B-Ring, beim Kaempferol fallen hier die Signale der Protonen 3' und 5' (meta Stellung zur phenolischen OH-Gruppe) zusammen. Die eindeutige Unterscheidung der beiden Flavonoide kann an der Signalgruppe bei 8,0 ppm des Quercetinspektrums erfolgen,

hier sind zwei Resonanzen für die durch die zusätzlich phenolische Gruppe nicht mehr äquivalenten Protonen 2' und 6' zu erkennen. Beim Kaempferol hingegen nur ein Signal bei tieferem Feld (8,2 ppm) für die äquivalenten Protonen 2'/6'.

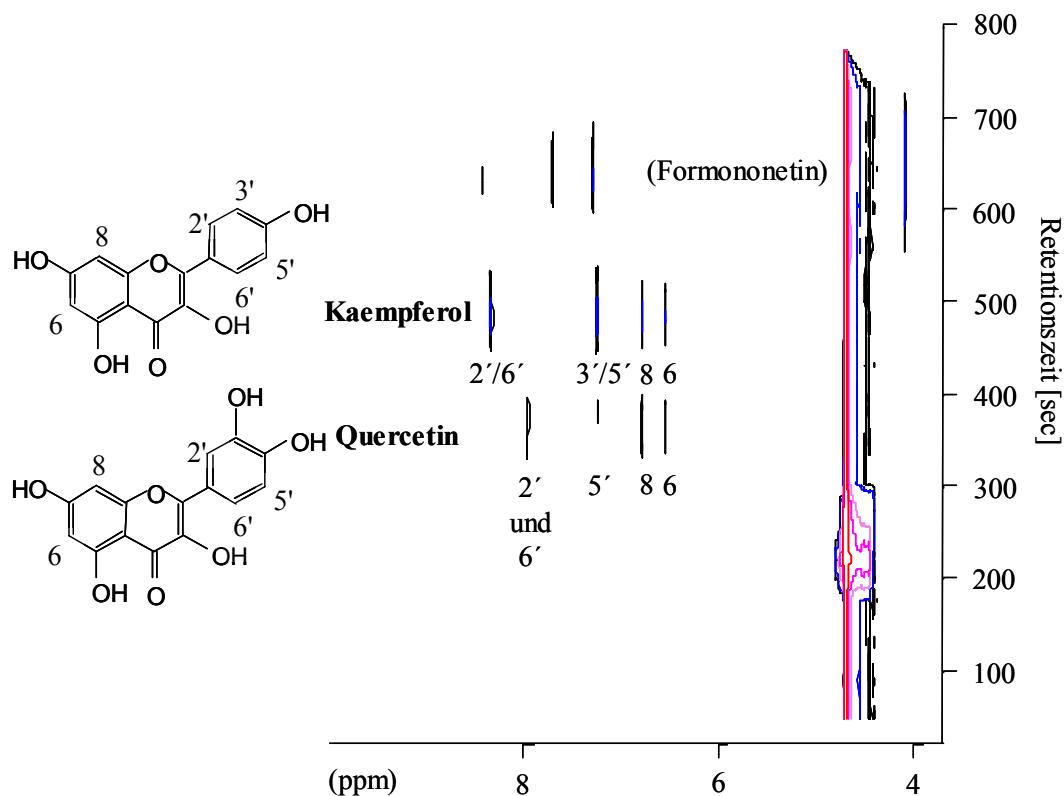


Abbildung 34: Konturplot der continuous-flow CapLC- ^1H -NMR-Messung eines Flavonoidstandards.

Neben dieser continuous-flow CapLC-NMR-Messung sollten auch geeignete Bedingungen für stopped-flow CapLC-NMR-Experimente anhand einer Standardlösung dieser zwei Flavonoide und deren entsprechenden 3-O- β -D-Glykosiden, sowie dem Isoflavonoid Formononetin und seinem 7-O- β -D-Glykosid ausgearbeitet werden, da dieser NMR-Messmodus deutlich mehr Transienten und damit höhere Empfindlichkeiten erlaubt, was für die Detektion und Identifikation von Substanzen aus Realproben meist dringend nötig ist. Die chromatographische Trennung wurde auf der selben Kapillartrennsäule wie die continuous-flow NMR-Experimente durchgeführt (ProtoSil Eurobond C₁₈ 5 μm), die Konzentration der Standardlösung gelöst in MeOH-d₄ aber auf 1 mg/ml reduziert und 200 nl dieser Lösung injiziert. Zur Verbesserung dieser Trennung wurde ein Lösungsmittelgradient aus MeCN-d₃ und D₂O verwendet, welcher den Anteil von D₂O innerhalb von 25 min von 90% auf 10%

minimierte. Als Flussrate wurden 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ gewählt, die UV-Detektion erfolgte on-capillary bei 260 nm. Diese chromatographischen Bedingungen wurden später auch auf den *Radix Astragali* Extrakt angewendet. Das erhaltene Chromatogramm ist in Abbildung 35 gezeigt.

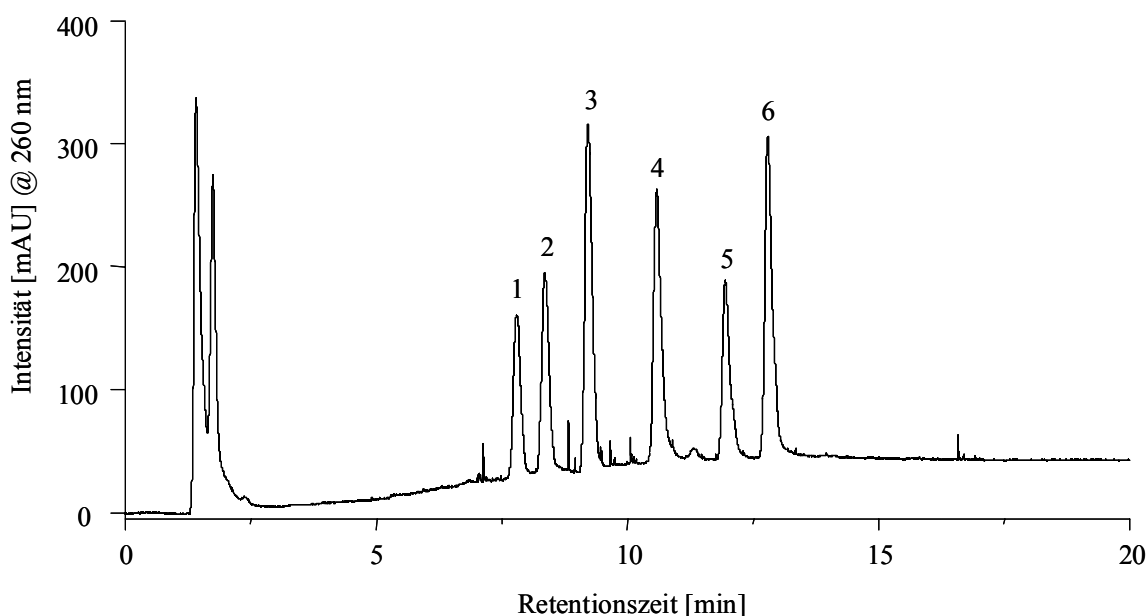


Abbildung 35: Kapillar-HPLC-Gradiententrennung eines Flavonoidstandards, 1 *Quercetin-3-O- β -D-Glykoside*, 2 *Kaempferol-3-O- β -D-Glykoside*, 3 *Formononetin-7-O- β -D-Glykoside (Ononin)*, 4 *Quercetin*, 5 *Kaempferol*, 6 *Formononetin*.

Aus dieser Kapillar-HPLC-Trennung wurden alle sechs Verbindungen mittels stopped-flow $^1\text{H-NMR}$ vermessen und konnten anhand ihrer charakteristischen Protonenspektren eindeutig differenziert und damit identifiziert werden. Als Charakterisierungsbereich können die aromatischen Protonen mit einer chemischen Verschiebung zwischen 7,0 und 8,5 ppm (A- und B-Ringprotonen) dienen, in diesem Bereich werden auch etwaige olefinische Protonen des C-Rings detektiert. Die charakteristischen Unterschiede unter den Aglykonen war bereits aus dem continuous-flow Experiment (Abbildung 34) ersichtlich, hier soll nun der Einfluss des Zuckers auf die chemischen Verschiebungen der Protonen des (Iso)-Flavonoid-Grundgerüsts betrachtet werden. Dies wird exemplarisch am Beispiel des Formononetins und dessen 7-O- β -D-Glykosids (Ononin) besprochen werden. Der Bereich der ^1H chemischen Verschiebung der beiden Verbindungen ist in Abbildung 36 gezeigt.

Formononetin

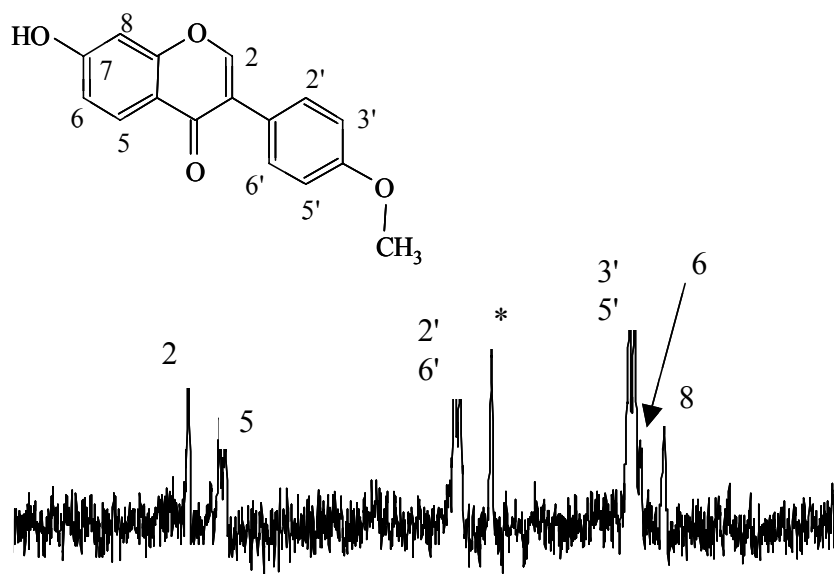
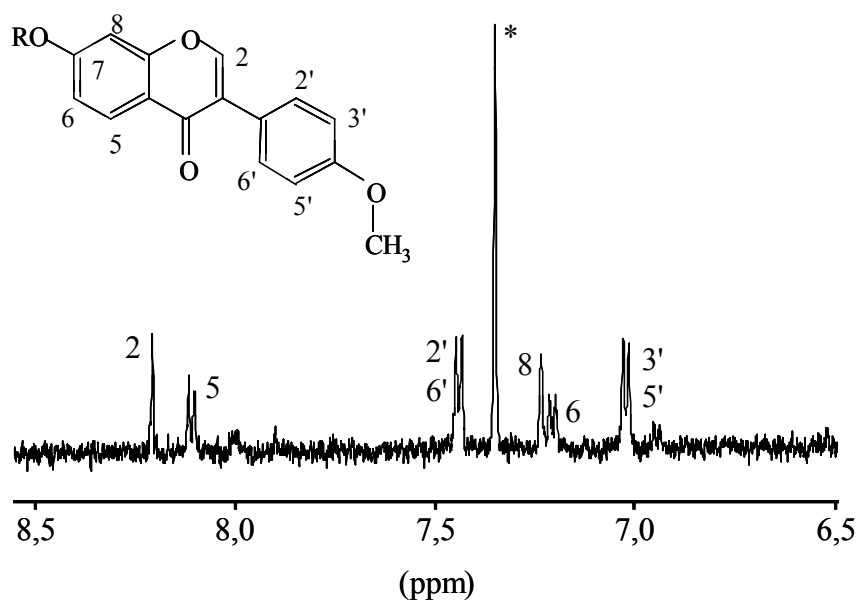
Ononin (Formononetin-7-O- β -D Glykosid)

Abbildung 36: Vergleich der stopped-flow ^1H -NMR-Spektren (aromatischer Bereich) von Formononetin und Ononin.

Die Resonanzen des B-Ringes sind annähernd unbeeinflusst von der Zuckereinheit und zeigen jeweils zwei Dubletts für die Protonen 2'/6' bei ca. 7,45 ppm und die Protonen 3'/5' bei ca. 7,05 ppm. Im Formononetin ist das Signal für die Protonen 3'/5' überlagert mit dem Dublett des Protons 6 (A-Ring). Der Glykosidrest hat einen signifikanten Einfluss auf die Protonen des A-Rings sowie das olefinische Proton 2. Dieses wird im Ononin im Vergleich zum Aglykon um ca. 0,1 ppm tieffeld-

verschoben, eine ähnlich ausgeprägte Tieffeldverschiebung ist auch für das Dublett der Protonen 5 sichtbar. Ebenso werden die Protonen 8 und 6 ins tiefere Feld verschoben, der Einfluss auf Proton 8 ist etwas ausgeprägter, sodass diese Resonanzsignale ihre Reihenfolge tauschen. Durch diese Tieffeldverschiebung wird die Signalüberlappung des Protons 6 mit denjenigen an 3'/5' aufgehoben, nun ist dessen Dublett bei ca. 7,2 ppm deutlich erkennbar.

Ebenso wie der aromatische Bereich mit dem olefinischen Proton 2 konnte für das Ononin auch die Resonanzsignale des Zuckerrestes eindeutig zugeordnet werden. Dies ist in Abbildung 37 gezeigt. Wichtig ist hier vor allem die Kopplungskonstante im Signal des anomeren Protons 1. Diese Kopplungskonstante wurde mit ca. 7 Hz bestimmt, ein für β -glykosidisch verknüpft Zucker charakteristischer Wert.

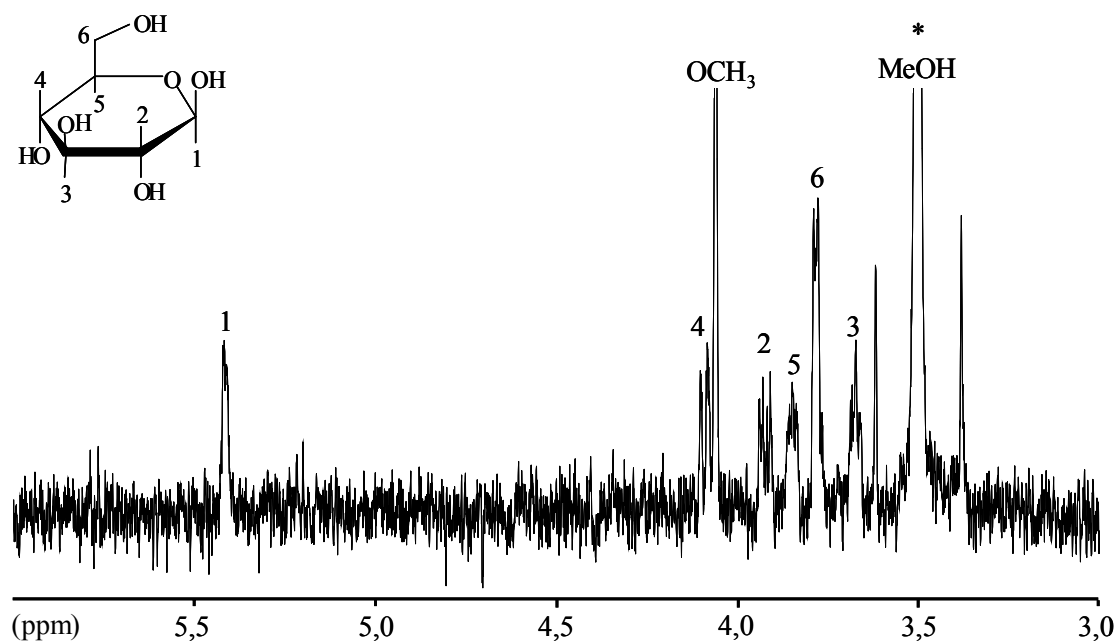


Abbildung 37: Stopped-flow $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Ononin (Zuckerbereich).

Im Gegensatz zum Isoflavonoid Formononetin war der Zuckerrest in den Flavonoiden Quercetin und Kaempferol nicht an Position 7 (phenolische OH-Gruppe im A-Ring), sondern an Position 3 (enolische OH-Gruppe im C-Ring) β -glykosidisch gebunden. Es befinden sich keine Protonen des Flavonoid-Grundgerüsts mehr in direkter Nachbarschaft zum Zuckerrest, was die Differenzierung zwischen Glykon und Aglykon erschwert. Einzig eine Hochfeldverschiebung (ca. 0,1 ppm) der

Resonanzsignale der Protonen 2'/6' im B-Ring ist detektierbar, dies ist am Beispiel des Quercetins und dessen 3-O- β -D-Glykosids in Abbildung 38 gezeigt.

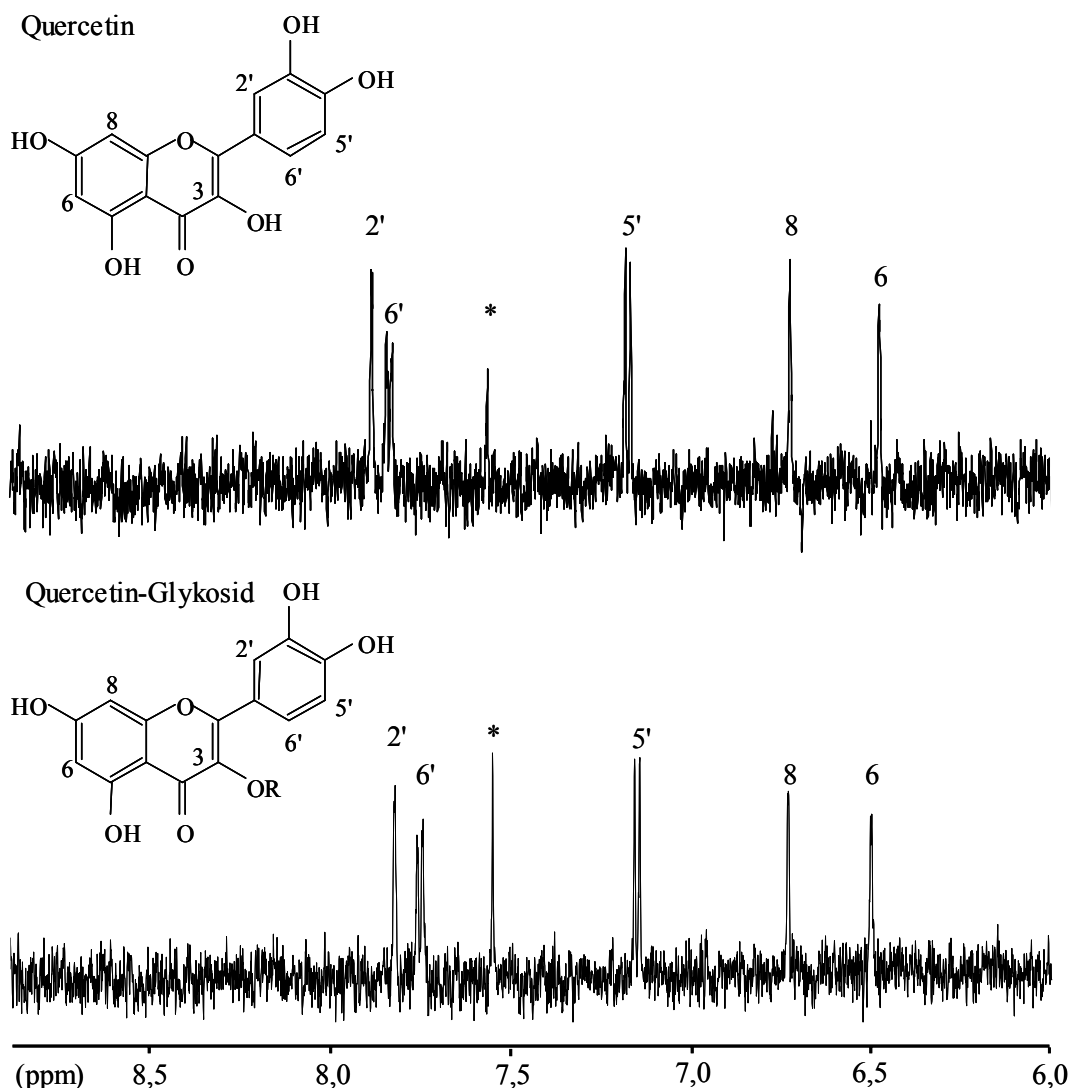


Abbildung 38: Vergleich der stopped-flow $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (aromatischer Bereich) von Quercetin und dessen 3-O- β -D-Glykosids.

5.4.2 Kapillar-HPLC-ESI/MS-Experimente einer Standardmischung

Neben den oben gezeigten continuous- und stopped-flow CapLC-NMR-Experimenten wurde der Flavonoid Standard auch mittels CapLC-ESI/MS vermessen. Nach der Optimierung der der Ionisations- (positiver Ionisationsmodus) und Detektionsparameter der massenspektrometrischen Detektion wurde das in Abbildung 39 dargestellte TIC-Chromatogramm erhalten. Als Säurezusatz für die Chromatographie wurde im Gegensatz zu den NMR-Messungen TFA durch 0,1% Essigsäure ersetzt, da

TFA eine stark Ionen-suppressive Wirkung hat. Die drei Substanzen sind eindeutig anhand ihres Molekulargewichtes (Quercetin $[M + H]^+ = 303$, Kaempferol $[M + H]^+ = 287$, Formononetin $[M + H]^+ = 269$) zu unterscheiden.

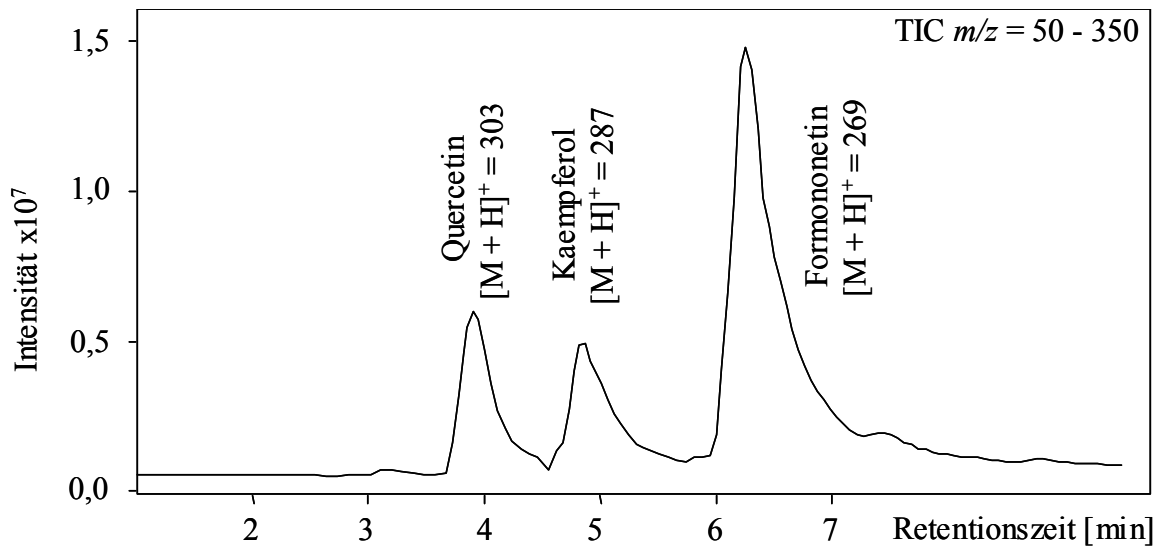


Abbildung 39: TIC-Chromatogramm der CapLC-ESI/MS-Messungen eines Flavonoid-Standards (1 mg/ml).

Zur genaueren Identifikation der eluierenden Komponenten ist das Molekulargewicht allein nicht ausreichend, durch charakteristische Fragmentationen können erheblich mehr Informationen über die betreffende Substanz erhalten werden. Daher wurden auch MS^2 -Spektren in der CapLC-ESI/ $MS^{(n)}$ -Messungen aufgezeichnet. Das erhaltene MS^2 -Spektrum von Formononetin ist in in Abbildung 40 gezeigt.

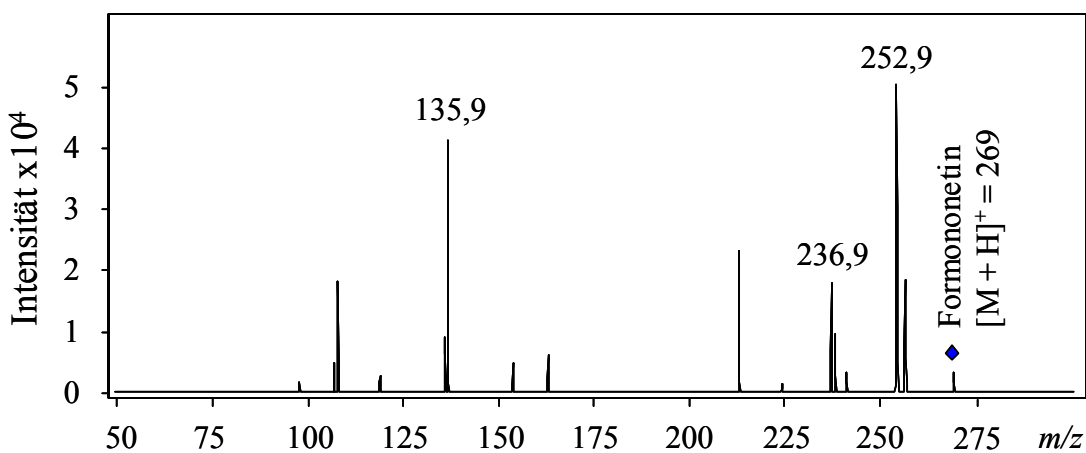
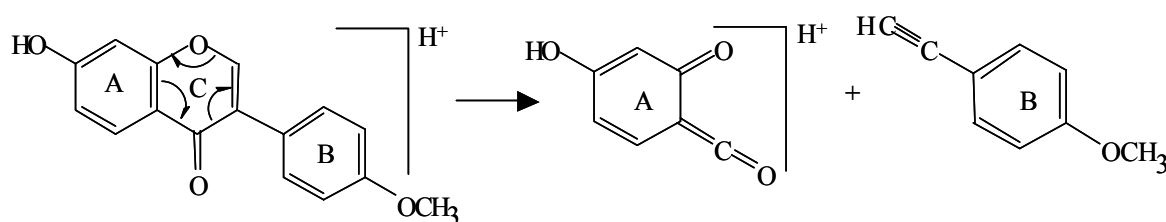


Abbildung 40: MS^2 -Spektrum von Formononetin aus dem CapLC-ESI/ $MS^{(n)}$ -Experiment.

Dieses Spektrum zeigt die m/z -Verhältnisse der Fragmentationen bei 253, was der Abspaltung der Methoxymethylgruppe im B-Ring entspricht. Dieses Fragment spaltet dann eine phenolische Hydroxylgruppe unter Bildung des m/z -Verhältnisses 237 ab. Schließlich ist auch das durch Retro-Diels-Alder-Fragmentierung entstandene m/z -Verhältnis 137 detektierbar, welches den A-Ring ($[A + H]^+$) repräsentiert. Diese RDA-Fragmentierung ist in Abbildung 41 gezeigt.



Formononetin $[M + H]^+ = 269$

$[A + H]^+ = 137$

Abbildung 41: Retro-Diels-Alder-Fragmentierung von Formononetin.

5.4.3 HPLC-ESI/MS-Messungen eines *Radix Astragali* MSPD-Extraktes

Hauptaugenmerk in diesem Flavonoid-Abschnitt war die Detektion und Identifikation von Substanzen in einem Extrakt der in der chinesischen Medizin verwendeten Heilpflanze *Radix Astragali* mittels CapLC-NMR. Eine eindeutige Identifikation und Strukturbestimmung gelang aus den Daten unterschiedlichster Messungen, welche im Folgenden beschrieben werden.

Zunächst wurden drei Extraktionstechniken (Soxhlet, ultrasonic assisted liquid extraction und die MSPD) untersucht, als überlegen in Bezug auf die erzielten Anreicherungsraten zeigte sich die MSPD. Zur MSPD-Extraktion wurden 0,5 g des Wurzelpulvers mit 1,0 g C_{18} Sorbensphase im Mörser homogenisiert und dann auf eine 1,0 g Bodenlage dieses Sorbensmaterials in eine leere SPE-Kartusche gefüllt. Die Kartusche wurde mit 10 ml Wasser gewaschen, anschließend die zu untersuchenden Analyten mit 10 ml $MeOH : H_2O = 90 : 10$ (v,v) eluiert und im N_2 -Strom zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 1 ml $MeOH$ wiederaufgenommen und direkt in die HPLC injiziert und mittels DAD-UV und ESI/MS⁽ⁿ⁾ detektiert. Ein erhaltenes TIC- und UV-Chromatogramm ist in Abbildung 42 gezeigt.

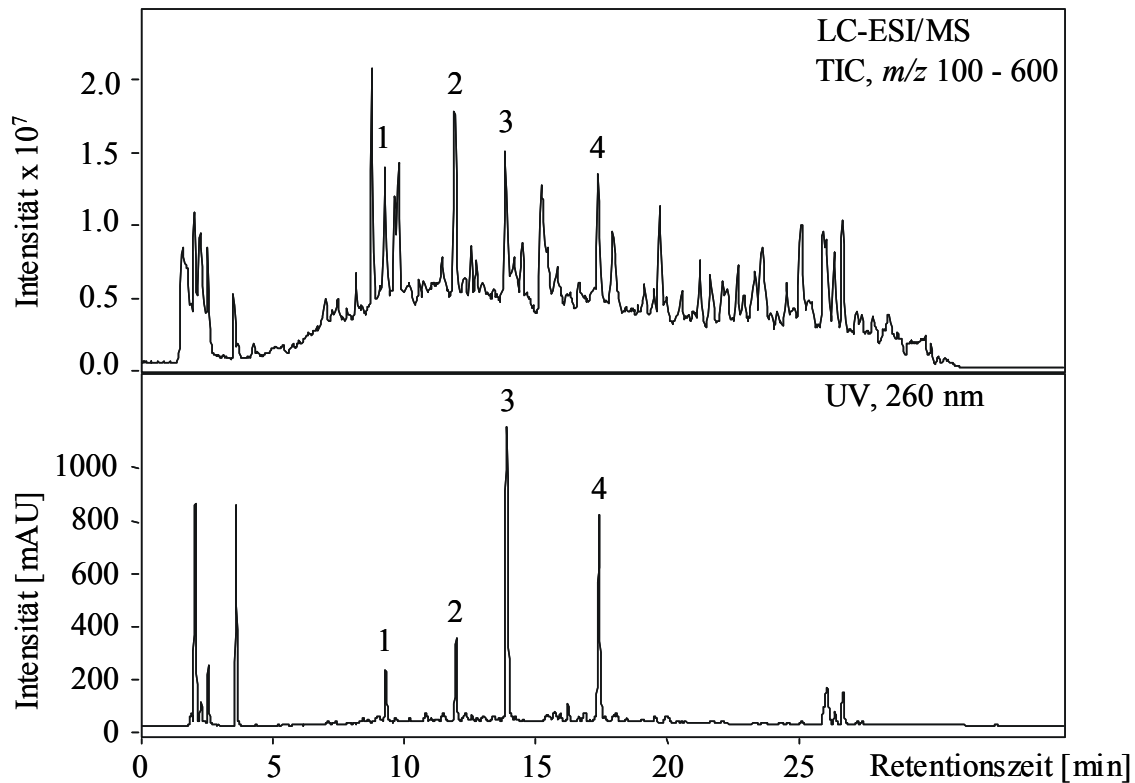


Abbildung 42: LC-ESI⁺/MS TIC- und LC-UV-Chromatogramm des MSPD Extraktes von *Radix Astragali* mit identifizierten Hauptkomponenten, 1 Calycosin-Glykosid, 2 Ononin, 3 Calycosin, 4 Formononetin.

Die TIC-Spur (total ion chromatogram) zeigt die enorme Anzahl an unterschiedlichen Verbindungen, welche in dem Extrakt enthalten sind. Nur wenige davon zeigen auch eine ausgeprägte UV-Aktivität (260 nm). Diese vier Substanzen werden deshalb als Hauptkomponenten klassifiziert und sollten eindeutig identifiziert werden. Zuerst wurden dazu die UV-Spektren der genannten Verbindungen aus den DAD/UV-Chromatogramm extrahiert (vgl. Abbildung 43), welche die typischen Banden für Isoflavonoide aufzeigen ($\lambda_{\max} = 258$ nm für die Glykoside, 248 nm für nicht-glykosilierte Isoflavonoide).

Die Vermutung, dass es sich bei den detektierten Substanzen um die Isoflavonoide Formononetin und Calycosin bzw. jeweils deren Glykoside handelt, wurde auch durch die extrahierten Massen bestätigt, welche für Peak 1 ein m/z -Verhältnis von 447 (entspricht $[M+H]^+$ von Calycosin-Glykosid), für Peak 2 von 431 (entspricht $[M+H]^+$ von Ononin), für Peak 3 von 285 (entspricht $[M+H]^+$ von Calycosin) und für Peak 4 von 269 (entspricht $[M+H]^+$ von Formononetin) ergaben.

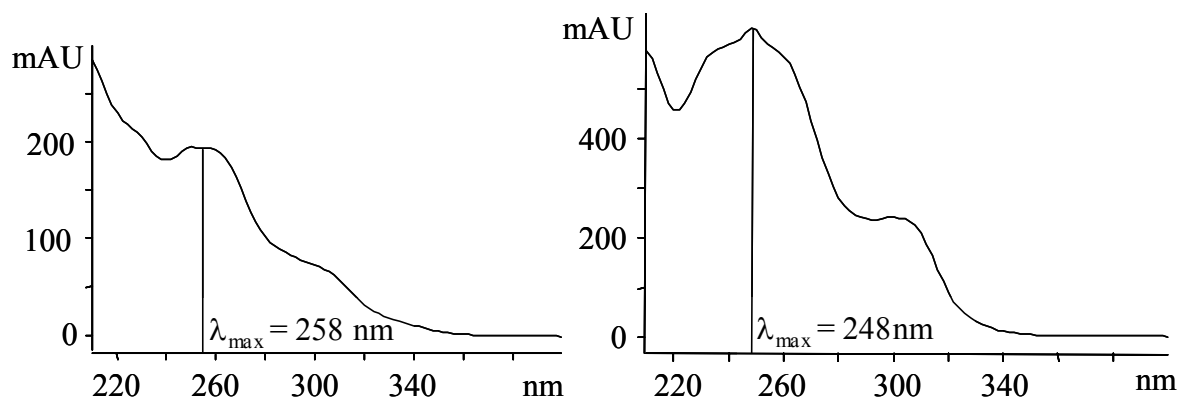


Abbildung 43: DAD-UV-Spektren von Peak 2 (Ononin, links) und Peak 4 (Formononetin, rechts).

Zur Erhärtung dieser Vermutungen sollten nun Fragmentierungsspektren im auto MS⁽ⁿ⁾-Modus dienen. Dies ist am Beispiel des Peaks 1 (Calycosin-Glykosid) und Peak 3 (Calycosin) exemplarisch in Abbildung 44 gezeigt. Diese Spektren zeigen typische Fragmente durch Kollisions-induzierte Fragmentierung in der Ionenfalle. Im MS-Spektrum ist jeweils ein einzelnes m/z -Verhältnis detektierbar, dies spiegelt das Molekularion $[M + H]^+$ wider. Das Calycosin-Glykosid zeigt nach einer ersten Fragmentierung unter Abspaltung einer Masse von 162 (Hexose) wiederum ein einzelnes m/z Verhältnis, welches dem MS-Spektrum von Calycosin entspricht. Diese strukturelle Ähnlichkeit wird ebenso im MS³-Spektrum des Calycosin-Glykosids sichtbar, welches im Fragmentierungsschema dem des MS² von Calycosin entspricht. In diesen beiden Spektren wird von Calycosin-Grundgerüst zuerst die Methoxy-Methylgruppe (- 15, $m/z = 270$), dann die nun freiliegende Hydroxylgruppe (- 17, $m/z = 253$) abgespalten. Durch den Verlust einer C=O Gruppe (- 28) aus dem C-Ring des Isoflavonoids ist das Fragment bei $m/z = 225$ erklärbar. Schliesslich ist in beiden Spektren auch das durch RDA-Fragmentierung gebildete $m/z = 137$ $[A + H]^+$ sichtbar, aus diesem können Strukturinformationen des A-Ringes abgeleitet werden. Die detektierte Masse des RDA-Fragmentes deutet auf nur eine phenolische OH-Gruppe am A-Ring hin, diese dient auch als Glykosilierungsstelle.

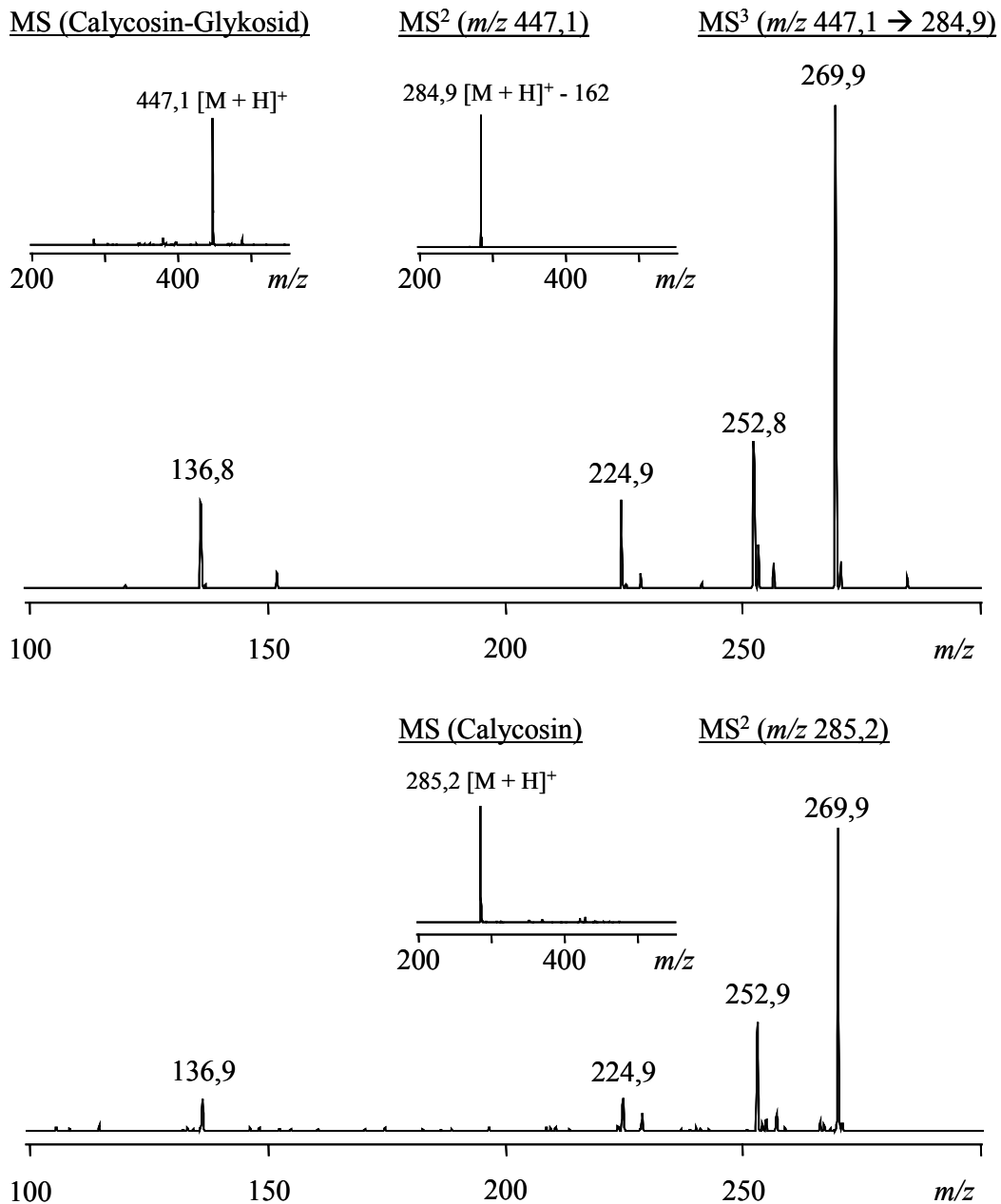


Abbildung 44: HPLC-ESI/MS⁽ⁿ⁾ von Peak 1 (Calycosin-Glykosid, oben) und Peak 3 (Calycosin, unten).

5.4.4 Stopped-flow Kapillar-HPLC-NMR-Experimente eines gepoolten *Radix Astragali* MSPD-Extraktes

Aus den im vorigen Kapitel genannten Daten können folgende Informationen zusammengefasst werden: Es gibt eine Vielzahl an Komponenten im MSPD-Extrakt des *Radix Astragali*, nur vier Hauptkomponenten zeigen aber eine gute UV-Absorption bei 260 nm. Diese vier Komponenten wiederum zeigen anhand ihrer UV-

Spektren, dass es sich um Isoflavonoide bzw. deren Glykoside handeln könnte. Diese These wird auch durch vergleichbare charakteristische Fragmentierungsmuster in den jeweiligen MS⁽ⁿ⁾-Spektren gestützt. Anhand des Molekulargewichtes kann es sich um die Substanzen Calycosin (Peak 3), Formononetin (Peak 4), Calycosin-Glykosid (Peak 1) und Formononetin-Glykosid (Peak 2) handeln. Im Falle des Formononetin und dessen Glykosids konnte dies auch durch Ko-Chromatographie mit authentischen Standards belegt werden. Diese Zuordnung kann also als gesichert gelten, sollte aber noch durch Vermessung von ¹H-NMR-Spektren und Vergleich dieser zu den CapLC-NMR-Messungen der Standards verglichen werden. Beim Calycosin hingegen standen keine authentischen Standards zur Verfügung, die Vermessung der ¹H-NMR-Spektren sollte also in Kombination der bereits erhaltenen Daten die eindeutige Identifikation der Substanz ermöglichen.

Die für diese CapLC-NMR-Messungen verwendete Kapillar-HPLC-Trennung eines zehnfach gepoolten MSPD-Extraktes ist in Abbildung 45 gezeigt, die chromatographischen Bedingungen sind analog zu denen der Standardtrennung (vgl. Abbildung 35).

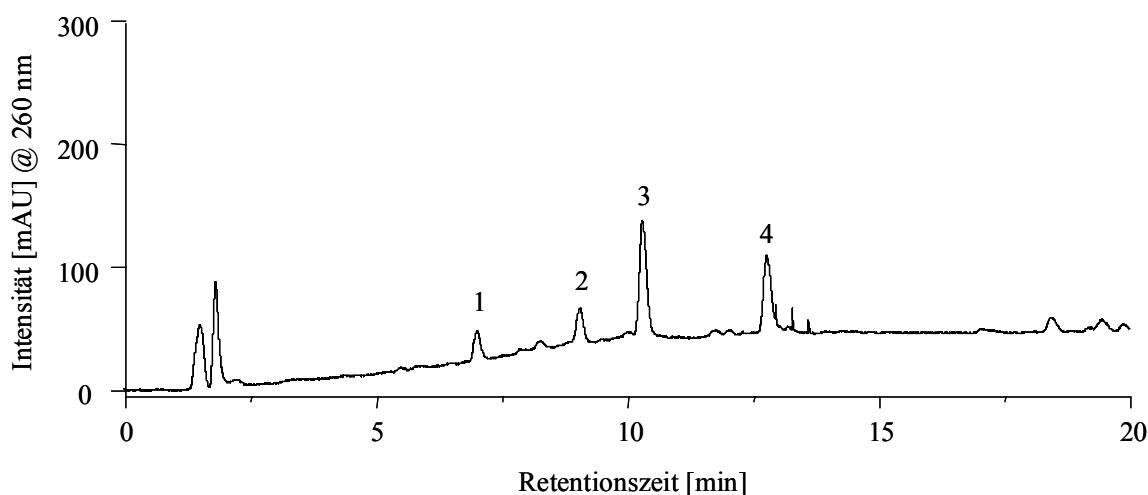


Abbildung 45: CapLC-Trennung des gepoolten *Radix Astragali* MSPD-Extraktes, 1 *Calycosin-7-O-β-D-Glykoside*, 2 *Formononetin-7-O-β-D-Glykoside* (*Ononin*), 3 *Calycosin*, 4 *Formononetin*.

In diesem Chromatogramm sind alle vier Substanzen gut voneinander abgetrennt, können also jeweils ohne koeluiierende Komponenten im NMR-Spektrometer vermessen werden. Die Peaks 2 und 4 können mit den Retentionszeiten des Ononins

und Formononetins korreliert, für Peak 1 und 3 aber so keine Substanzen zugeordnet werden. Zudem kann durch Vergleich der Peakflächen auch abgeschätzt werden, dass die zur Verfügung stehende Analytmenge in etwa um den Faktor 3 bis 4 geringer ist als in den Standardmessungen, dies ist nachteilig für die NMR-Detektion. Dennoch konnten in akzeptabler NMR-Messzeit hochaufgelöste ^1H -NMR-Spektren aufgezeichnet werden, für das in Abbildung 46 gezeigte ^1H -Spektrum von Calycosin-Glykosid wurden 30k Transienten in einer Übernachtmessung aufsummiert.

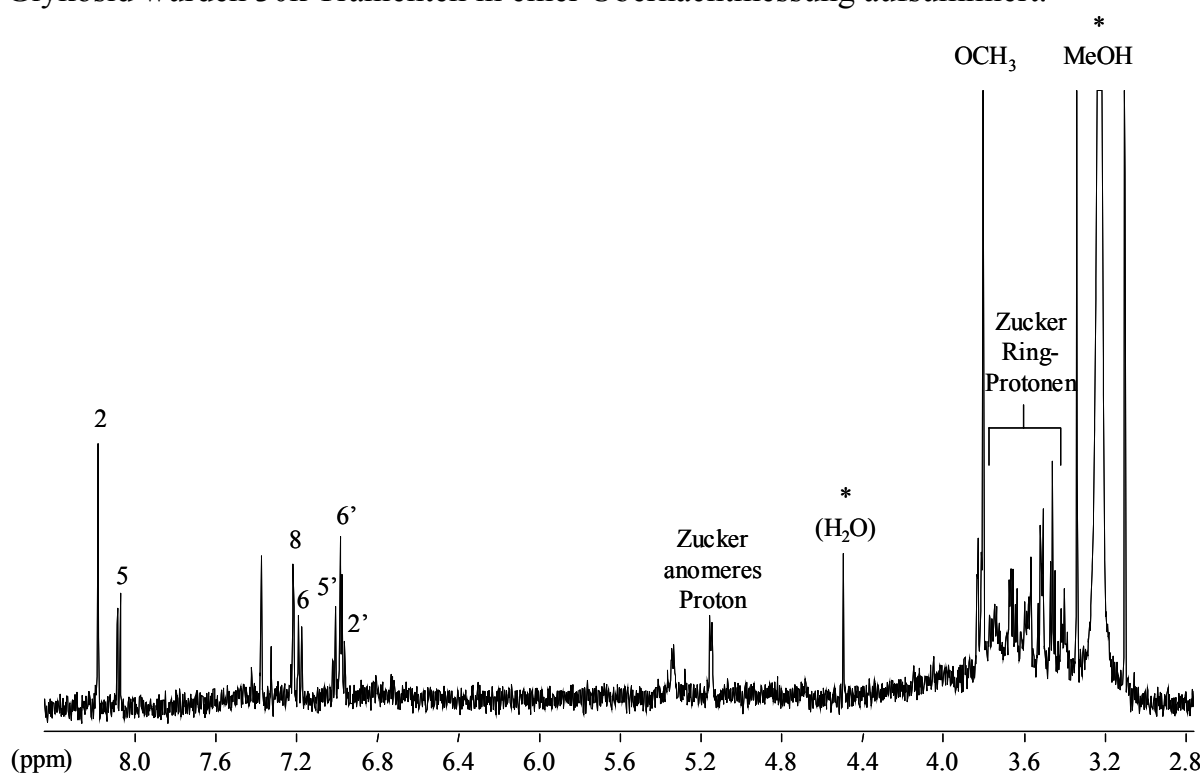


Abbildung 46: Stopped-flow CapLC- ^1H -NMR-Spektrum von Calycosin-Glykosid (Peak 1) des Radix Astragali MSPD-Extraktes.

Alle Resonanzsignale sind deutlich zu erkennen, sogar im Zuckerbereich sind gut aufgelöste Signale detektierbar. In diesem Spektrum ist weiterhin das Signal einer OCH_3 -Gruppe bei ca. 3,8 ppm sichtbar, was dem OCH_3 -Gruppen-Signal des Formononetin entspricht allerdings um ca. 0,3 ppm hochfeldverschoben, sowie das olefinische Proton 2 bei ca. 8,2 ppm, was ein Isoflavonoid als Grundstruktur bestätigt. Zudem kann aus dem Signal des anomeren Zuckerprotons eine Kopplungskonstante von 5,9 Hz bestimmt werden, dies spricht eher für eine β -glykosidische Verknüpfung des Zuckerrestes (7,7 Hz) als für einen α -glykosidische (3,5 Hz). Für die Identifikation

der vier Substanzen ist hingegen der aromatische Bereich aussagekräftiger. Dieser ist für die vier Substanzen in Abbildung 47 gezeigt.

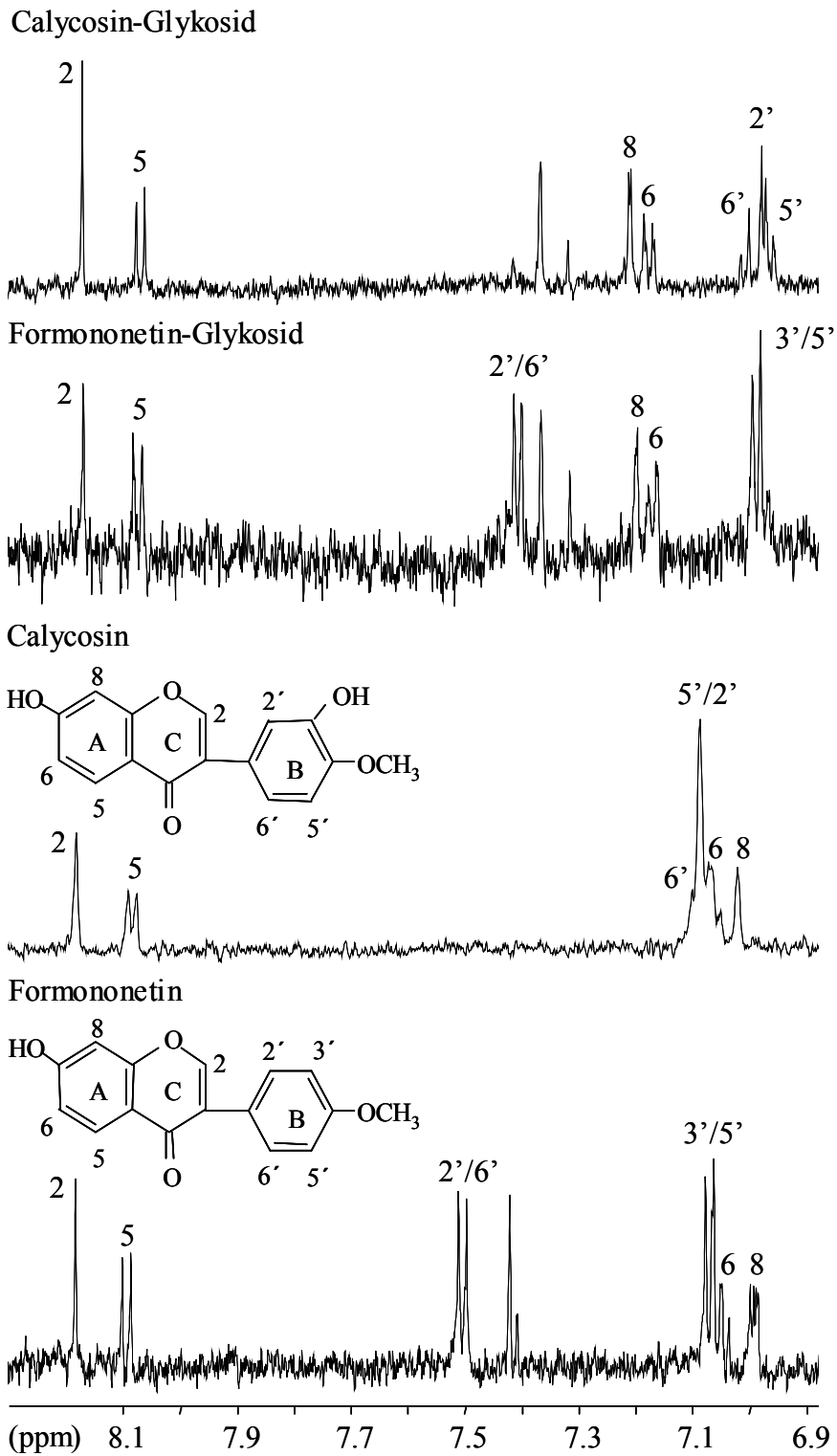


Abbildung 46: Stopped-flow CapLC- ^1H -NMR-Spektren (aromatischer Bereich) der vier Hauptkomponenten des Radix Astragali MSPD-Extraktes.

Wie bereits die RDA-Fragmente der massenspektrometrischen Untersuchung zeigten, muss die zusätzliche Hydroxylgruppe im B-Ring des Isoflavonoids sein. Dies wird auch durch die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren bestätigt, da die Resonanzsignale und Kopplungsmuster des A-Ringes (Protonen 5, 6, 8) in sowohl in den beiden Aglykonen als auch den Glykosiden jeweils vergleichbar sind. Der Einfluss einer Zuckergruppe auf diese Signale wurde am Beispiel des Formononetins bereits besprochen. Mit Hilfe der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie sollte nun die genaue Struktur, insbesondere das Substitutionsmuster des B-Ringes, bestimmt werden. Für diese Aufgabe sind die Resonanzsignale und deren Kopplungsmuster der am B-Ring sich befindenden Protonen entscheidend. Diese Signale befinden sich in einem sehr kleinen Bereich der chemischen Verschiebung zwischen 6,9 und 7,1 ppm, überlagern sich zudem untereinander und im Falle des Aglykons auch mit Resonanzen des A-Ringes. Eine genaue Strukturermittlung ist daher schwierig zugänglich. Eindeutig zu erkennen sind allerdings zwei Dubletts mit Kopplungskonstanten von ca. 6 Hz, zwei Protonen müssen also direkt benachbart liegen. Die chemische Verschiebung der OCH_3 -Gruppe von 3,8 ppm deutet darauf hin, dass sie entweder in 4' (para zum Grundgerüst), in 2' (ortho) oder 3' (meta) die phenolische OH-Gruppe, oder in 3' (meta) mit der phenolischen OH-Gruppe in 4' (para). Die 4'- OCH_3 /2'-OH wiederum lässt sich ausschliessen, da Proton 6' dann stärker tieffeldverschoben wäre. Aufgrund der Ähnlichkeiten der vermessenen Substanz mit den ESI/MS-Spektren des artifiziellen Standards von Formononetin wurde als Struktur somit Calycosin (4'- OCH_3 /3'-OH) postuliert, eine Substitution gemäss 3'- OCH_3 /4'-OH ist allerdings nicht vollständig auszuschliessen.

5.5 μSPE -Kapillar-HPLC-System zum Nachweis bioaktiver Peptide in Gewässerproben

Neben natürlichen Antioxidantien wie den Tocopherolen (Vitamin E) und Polyphenolen (Flavonoide und Phenolsäuren) wurde im Rahmen dieser Arbeit eine weitere Substanzklasse, die Peptide, mittels direktgekoppelter Systeme nachgewiesen. Als direktgekoppelte Analysensysteme sind vor allem Systeme bekannt, welche die chromatographische Trennung mittels der modernen, informationsreichen Massen-

spektrometrie und/oder Kernresonanzspektroskopie detektieren. Biologische Probenmatrizes sind aber nur in den seltensten Fällen direkt in die chromatographische Trenneinheit zu injizieren, fast immer ist ein Extraktions- oder zumindest Probenaufarbeitungsschritt für eine erfolgreiche Analyse unabdingbar. Für flüssige biologische Proben wurden Extraktionstechniken entwickelt, welche sich, vorgeschaltet an die chromatographische Trennung, koppeln lassen. Vornehmlich wird hierfür die Festphasenextraktion (SPE) angewendet, welche mittels einer Art stark vereinfachten Chromatographie einzelne Analyten, meist aber Substanzgruppen von Verunreinigungen abtrennt und so eine Anreicherung und Aufkonzentrierung der zu untersuchenden Komponenten erlaubt. Die on-line SPE-HPLC wird erfolgreich in der Analytik von Blut-, Serum- und Urinproben, sowie in der Umweltanalytik zur Untersuchung von Gewässerproben eingesetzt. Während meines Forschungsaufenthaltes an der Universität Oslo, Norwegen, durfte ich solch ein miniaturisiertes Analysensystem (MikroSPE-CapLC) entwickeln und zur Detektion von bioaktiven Peptiden in Gewässerproben etablieren. Es galt, eine geeignete Sorbensphase für die μ SPE zu finden, sowie optimierte Parameter für den Extraktionsschritt zu evaluieren. Als chromatographische stationäre Phase in der Kapillar-HPLC sollte eine C_{30} -Phase mit hoher Formerkennung eingesetzt werden und diese chromatographische Trennung unter Verwendung eines Temperaturgradienten verbessert werden.

Zuerst wurden unterschiedliche stationäre RP-Phasen zur Trennung von 50 nl einer 0,1 mg/ml Standardlösung eines jeden Peptides (Coranzonin, Bradykinin, Angiotensin II, Neurotensin, Bombesin und Substanz P) eingesetzt, um daraus Informationen über das Retentionsverhalten (anhand der Retentionsfaktoren k') und Trenneffizienz (anhand der theoretischen Böden N) bei isokratischer mobiler Phase zu erhalten. Vier C_{30} -Phasen, wovon eine als Trennphase eingesetzt werden sollte, wurden mit einer eher traditionell verwendeten C_{18} -Phase, gepackt jeweils in eine 15 cm x 250 μ m Kapillartrennsäule, verglichen. Oftmals werden zur chromatographischen Trennung von Peptiden kurzkettige Alkylketten-Oberflächenmodifikationen (C_4 - C_{18})^{[163],[164]} eingesetzt, aber auch C_{30} -Phasen^[165] wurden schon erfolgreich in der Peptidanalytik verwendet. Als isokratische, optimierte mobile Phase diente eine Mischung aus MeCN : H₂O = 22,5 : 77,5 unter Zusatz von 0,1% Trifluoroessigsäure (TFA) bei einer

Flussrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Peptidtrennungen werden meist bei erniedrigtem pH-Wert (unter pH 3)^[166] durchgeführt, da durch diese sauren Bedingungen sowohl Restsilanolgruppen auf dem Trägermaterial Kieselgel, als auch saure Aminosäuren protoniert vorliegen und somit unerwünschte elektrostatische Wechselwirkungen, die zu Verbreiterung der chromatographischen Peaks führen, unterdrückt werden. TFA dient ebenso als Ionenpaarungs-Agens und erhöht somit die Löslichkeit der Peptide und verlängert deren Retentionszeit auf RP-Phasen. Die Detektion erfolgt on-capillary (100 μm) bei 210 nm. Die erhaltenen chromatographischen Kenngrößen, bestimmt aus jeweils vier unabhängigen Injektionen, sind mit deren Standardabweichung S in Tabelle 7 zusammengestellt:

| | | Corazonin | Bradykinin | Angiotensin II | Bombesin | Neurotensin | Substanz P |
|---|----|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Kromasil 100 Å - 3,5 μm - C₁₈ | k' | 1,7 | 2,6 | 5,1 | 10,7* | 10,7* | 23,3 |
| | S | $\pm 0,1$ (5,8%) | $\pm 0,1$ (4,9%) | $\pm 0,3$ (5,0%) | $\pm 0,6$ (5,7%) | $\pm 0,6$ (5,7%) | $\pm 1,2$ (5,4%) |
| | N | 3615 | 1821 | 5390 | 5697* | 5697* | 14788 |
| | S | ± 251 (7,0%) | ± 265 (14,6%) | ± 704 (13,1%) | ± 527 (9,3%) | ± 527 (9,3%) | ± 1996 (13,5%) |
| YMC 200 Å - 3 μm - C₃₀ | k' | 1,7 | 2,6 | 4,8 | 8,5 | 10,1 | 20,7 |
| | S | $\pm 0,1$ (3,7%) | $\pm 0,0$ (1,9%) | $\pm 0,1$ (1,6%) | $\pm 0,1$ (1,5%) | $\pm 0,2$ (1,7%) | $\pm 0,4$ (1,9%) |
| | N | 1907 | 1322 | 3797 | 2565 | 6084 | 8120 |
| | S | ± 146 (7,7%) | ± 144 (10,9%) | ± 251 (6,6%) | ± 250 (9,8%) | ± 699 (11,5%) | ± 1170 (14,4%) |
| ProntoSil 200 Å - 3 μm - C₃₀ | k' | 1,8 | 2,6 | 4,9 | 8,6 | 10,6 | 21,8 |
| | S | $\pm 0,1$ (3,2%) | $\pm 0,1$ (3,2%) | $\pm 0,1$ (2,9%) | $\pm 0,3$ (3,5%) | $\pm 0,4$ (3,6%) | $\pm 0,7$ (3,0%) |
| | N | 3419 | 1694 | 5972 | 3233 | 9505 | 10485 |
| | S | ± 301 (8,8%) | ± 261 (15,4%) | ± 601 (10,1%) | ± 425 (13,1%) | ± 1459 (15,3%) | ± 1833 (17,5%) |
| ProntoSil 300 Å - 5 μm - C₃₀ (EC) | k' | 0,9 | 1,3 | 2,4 | 3,9 | 5,2 | 10,9 |
| | S | $\pm 0,0$ (2,9%) | $\pm 0,0$ (2,7%) | $\pm 0,1$ (3,0%) | $\pm 0,1$ (3,7%) | $\pm 0,2$ (3,8%) | $\pm 0,4$ (3,4%) |
| | N | 1693 | 1077 | 1895 | 1153 | 2352 | 2838 |
| | S | ± 234 (13,8%) | ± 131 (12,1%) | ± 308 (16,3%) | ± 173 (15,0%) | ± 290 (12,3%) | ± 476 (16,8%) |
| Develosil 140 Å - 20 μm - C₃₀ | k' | 2,0 | 2,5 | 4,8 | 8,5 | 11,6 | 23,2 |

Tabelle 7: Vergleich unterschiedlicher stationärer Trennphasen, * nicht getrennt.

Die Trennphase sollte gute Retention und hohe Trenneffizienz zeigen, die best mögliche C₃₀-Phase war also ProntoSil 3 μm C₃₀ mit den größten k'- und N-Werten. Sie wurde daher als stationäre Phase für die Kapillar-HPLC-Trennung der Peptide

eingesetzt. Die Kromasil C₁₈-Phase zeigte zwar ähnliches Retentionsverhalten bei deutlich schärferen Peaks (also höherer Effizienz, größeren N-Werten), war allerdings nicht dazu in der Lage, Neurotensin und Bombesin voneinander zu trennen, diese beiden Substanzen koeluierten. Dem hingegen soll die SPE-Phase wenig Retention zeigen, natürlich aber genug Retention, um die zu analysierenden Substanzen mit einer nicht eluierenden mobilen Phase vollständig zurückzuhalten. Die gesamte SPE-Kartusche sollte zudem möglichst wenig Rückdruck generieren, um eine schnelle Beladung bei hohen Flussraten zu ermöglichen. Vorteilhaft sind daher große Partikeldurchmesser und kurze Kartuschen. Die Develosil C₃₀-Phase würde dieser Bedingung auf Grund der Partikelgröße von 20 µm am besten entsprechen, zeigt allerdings sehr hohe Retention. Deshalb wurde ProntoSil 300 Å – 5 µm C₃₀ (EC, mit Endcapping der Restsilanol-Gruppen) in eine 3 cm x 250 µm fused-silica Kapillare gepackt und diese als µSPE-Kartusche verwendet, da sie den besten Kompromiss der erwünschten Parameter zeigt.

Nach der Wahl der geeignetsten RP-Phasen für die MikroSPE-Extraktion sowie der stationären Phase für die chromatographische Trennung sollte die Kapillar-HPLC-Trennung unter Verwendung eines Temperaturgradienten optimiert werden. Gradientenelutionen werden häufig zur Verbesserung von chromatographischen Trennungen eingesetzt, meist wird dafür die Lösungsmittelzusammensetzung der mobilen Phase variiert. Um die Triebkraft der chromatographischen Trennung zu modifizieren wird in der Gaschromatographie (GC) und super-critical fluid chromatography (SFC) die Temperatur variiert, in der Flüssigkeitschromatographie wurde dieser Optimierungsparameter aber lange Zeit vernachlässigt^[167], obwohl die Temperatur alle wichtigen Trennparameter beeinflusst. So wird das Retentionsverhalten im allgemeinen, daneben aber auch die Trenneffizienz und Selektivität, die mobile Phase (z.B. deren Viskosität und damit der generierte Rückdruck, aber auch pH-Wert) und schließlich die Eigenschaften der Oberflächenmodifikation durch Temperaturänderungen verändert. Die theoretischen Hintergründe der wichtigsten Parameter sollen hier kurz diskutiert werden. Bei Silica-basierten RP-Phasen wird durch erhöhte Temperatur meist die Trenneffizienz^[168] erhöht, es eluieren also schmalere Peaks. Dies kann über die Knox-Gleichung beschrieben werden, in welcher

ein Zusammenhang zwischen der Höhe eines theoretischen Bodens H und unterschiedlichen Diffusionstermen (A , B , C) analog zur van Deemter-Gleichung bei gegebenem linearem Fluss v hergestellt wird:

$$H = A v^{1/3} + \frac{B}{v} + C v.$$

Die Abhängigkeit des A -Terms von der Temperatur ist ungewiss, etwaige Änderungen aber vernachlässigbar gering. Der Längsdiffusionsterm (B -Term) steigt bei erhöhter Temperatur, den bedeutendsten Effekt hat die Temperatur allerdings auf den C -Term. Dieser beschreibt die Kinetik der Absorption und Desorption der Analytmoleküle und somit den Massentransfer zwischen mobiler und stationärer Phase. Die Trenneffizienz von Makromolekülen wie Peptiden profitiert so am meisten von einer erhöhten Temperatur.

Neben der Trenneffizienz wird auch das Retentionsverhalten im speziellen die Selektivität durch die Temperatur beeinflusst. Dies wird durch die van't Hoff-Gleichung^{[169],[170]} beschrieben:

$$\ln k = \frac{-\delta H}{RT} + \frac{-\delta S}{R} + \ln \Theta.$$

In dieser wird der Retentionsfaktor k mit temperatur-abhängigen Änderungen der Enthalpie H und der Entropie S , sowie dem temperatur-unabhängigen Phasenverhältnis Θ korreliert. Enthalpieänderungen resultieren aus Änderungen der Absorptions- und Desorptions-Kinetik oder temperatur-abhängigen Modifikationen der mobilen Phase. Entropieänderungen hingegen stehen in Zusammenhang mit Änderungen der Formerkennung der stationären Phase^[171], diese wurden ausgiebig mittels Festkörper-NMR für C_{30} -Phasen untersucht^[172]. So konnten eindeutige Änderungen im *trans-gauche* Verhältnis der Alkylkettenmorphologie abhängig von der Temperatur nach-gewiesen werden.

Trotz der genannten Vorteile werden Temperaturgradienten nur selten zur Optimierung von chromatographischen Trennungen eingesetzt. Gründe hierfür sind vor allem, dass in klassischen HPLC-Applikationen Temperaturgradienten auf Grund radialer Temperaturverteilung innerhalb des Packungsmateriales nur schwer implementiert und sowohl Analyten als auch die stationäre Phase selbst durch die

erhöhte Temperatur potentiell irreversibel zerstört werden können. Das erste Problem ist bei Verwendung von Kapillartrennsäulen vernachlässigbar^[173], die Zerstörung von Analyten auf Grund der kurzen Aufenthaltsdauer ist ebenso nicht signifikant. Auch die Zerstörung der stationären Phase wurde durch verbesserte Synthesemethoden minimiert, für neue, temperaturstabile stationäre Phasen^[174] sind so Temperaturgradienten problemlos einsetzbar.

Dies konnte auch in dieser Studie nachgewiesen werden. So wurde die für die Kapillar-HPLC-Trennung ausgewählte C₃₀-Phase mit der Kromasil C₁₈-Phase verglichen. Die erhaltenen chromatographischen Kenngrößen mit Standardabweichung bei isothermischen (30°C) Bedingungen und Anwendung eines linearen Temperaturgradienten von 30°C bis 70°C (Erhöhung der Temperatur um 3°C pro Minute) sind, bestimmt aus vier unabhängigen Messungen, vergleichend in Tabelle 8 zusammengefasst. Als Marker für die Trenneffizienz ist hierbei ein vereinfachter Ausdruck der theoretischen Bodenzahl N gewählt, welcher den Quotienten E aus der Retentionszeit t_R und der Peakhalbwertsbreite $t_{w(0,5)}$ bildet, da die Anzahl an theoretischen Böden N definitionsgemäss nur bei isokratischen/isothermischen Bedingungen verwendet werden darf.

| | | Corazonin | Bradykinin | Angiotensin II | Bombesin | Neurotensin | Substanz P |
|--|-----------|-------------|-------------|----------------|--------------|--------------|-------------|
| Kromasil 100Å-3,5µm- C18; 30°C | k' | 1,7 | 2,6 | 5,1 | 10,7* | 10,7* | 23,3 |
| | S | 0,1 (5,8%) | 0,1 (4,9%) | 0,3 (5,0%) | 0,6 (5,7%) | 0,6 (5,7%) | 1,2 (5,4%) |
| | E | 25,5 | 18,1 | 31,1 | 32,0* | 32,0* | 51,6 |
| | S | 0,9 (3,5%) | 1,3 (7,2%) | 2,1 (6,7%) | 1,5 (4,7%) | 1,5 (4,7%) | 3,5 (6,8%) |
| Kromasil 100Å-3,5µm- C18; 30°C-70°C | k' | 1,4 | 2,2 | 3,8 | 6,8* | 6,8* | 10,4 |
| | S | 0,1 (4,0%) | 0,1 (3,7%) | 0,0 (1,1%) | 0,0 (0,0%) | 0,0 (0,0%) | 0,1 (0,8%) |
| | E | 27,0 | 22,4 | 37,9 | 38,0* | 38,0* | 67,0 |
| | S | 2,1 (7,8%) | 1,5 (6,6%) | 2,2 (5,9%) | 2,1 (5,6%) | 2,1 (5,6%) | 4,0 (6,0%) |
| Prontosil 200Å-3µm- C30; 30°C | k' | 1,8 | 2,6 | 4,9 | 8,6 | 10,6 | 21,8 |
| | S | 0,1 (3,2%) | 0,1 (3,2%) | 0,1 (2,9%) | 0,3 (3,5%) | 0,4 (3,6%) | 0,7 (3,0%) |
| | E | 24,8 | 17,4 | 32,8 | 24,1 | 41,3 | 43,4 |
| | S | 1,1 (4,4%) | 1,4 (7,8%) | 1,7 (5,0%) | 1,6 (6,6%) | 3,3 (7,9%) | 3,8 (8,8%) |
| Prontosil 200Å-3µm- C30; 30°C-70°C | k' | 1,5 | 2,2 | 3,5 | 5,5 | 6,3 | 10,4 |
| | S | 0,1 (4,9%) | 0,1 (5,1%) | 0,2 (5,1%) | 0,3 (5,6%) | 0,4 (6,8%) | 1,0 (9,4%) |
| | E | 27,2 | 23,2 | 39,4 | 44,2 | 53,0 | 52,1 |
| | S | 0,9 (3,4%) | 1,2 (5,3%) | 3,1 (7,7%) | 3,6 (8,1%) | 3,0 (5,6%) | 4,3 (8,3%) |

Tabelle 8: Vergleich zwischen isothermischen Bedingungen und der Anwendung eines Temperaturgradienten, * nicht getrennt.

Klar ersichtlich ist, dass sich die Retentionszeiten vor allem für die später eluierenden Komponenten deutlich verkürzen, hingegen steigen die Trenneffizienzen zum Teil erheblich. Beispielhaft sei dies hier an der als letztes eluierenden Substanz P gezeigt. Deren k' -Wert (und somit annähernd auch die Analysenzeit) wird bei Anwendung des Temperatur-Programms auf der ProntoSil C₃₀-Phase mehr als halbiert, die Effizienz steigt immerhin um ca. 20%. Während der Messungen zeigte sich allerdings, dass die stationäre Phase durch dieses harsche Temperatur-Programm reversibel durch Kollabieren der Alkylketten (zusätzlich unerwünscht durch den hohen Anteil an Wasser in der mobilen Phase gefördert) zerstört wird, die im Gegensatz zur C₁₈-Phase erzielte Trennung von Neurotensin und Bombesin war nach einigen Trennungen nicht mehr möglich. Durch Reäquilibration mit 100% MeCN über 2 h konnte die C₃₀-Phase allerdings wieder regeneriert werden. Um die Belastung der stationären Phase zu minimieren und Äquilibrationszeiten einzusparen, wurde entschieden, ein sanfteres Temperatur-Programm mit einer Maximaltemperatur von 50°C zu verwenden (2°C Temperaturanstieg pro Minute), da unter diesen Bedingungen kein Verlust an Selektivität der stationären Phase feststellbar war. Der Vergleich dieses Temperaturgradienten mit isothermischen Bedingungen ist in Abbildung 48 gezeigt.

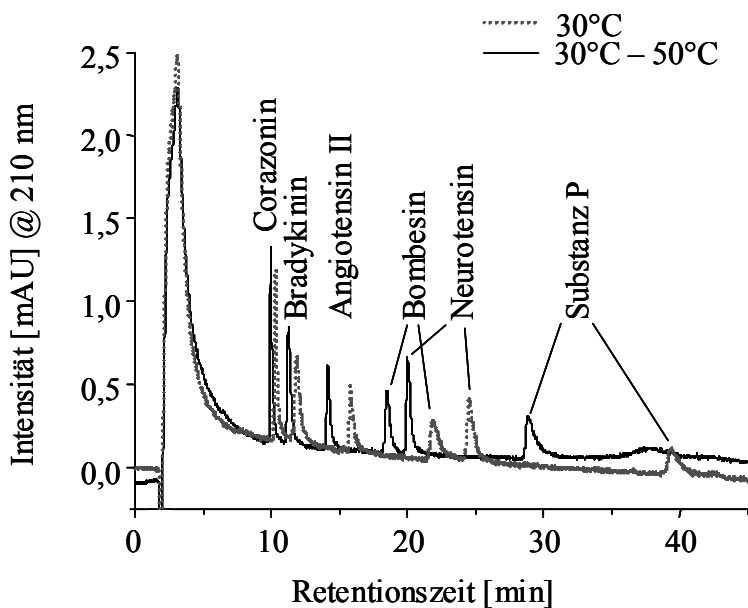


Abbildung 48: Kapillar-HPLC-Trennung der Peptide bei isothermischen Bedingungen und Verwendung eines Temperaturgradienten.

Nach oben beschriebenen Vorversuchen galt es nun, das MikroSPE-CapLC System zu optimieren und evaluieren. Dabei stehen zwei Fragestellungen im Vordergrund:

- Wie schnell können die Analyten extrahiert werden, ohne sie dabei durch die μ SPE-Kartusche zu spülen und damit die Quantifizierbarkeit der Ergebnisse zu verlieren?
- Wieviel Analyt kann reproduzierbar auf der μ SPE-Kartusche getrappt werden und welche maximalen Detektionslimits sind damit erzielbar?

Zur Klärung der ersten Frage wurde eine Standardlösung bei unterschiedlichen Flussraten (10 – 60 μ l/min, wobei 60 μ l/min der maximalen Druckbelastbarkeit des Systems entsprach) auf die μ SPE-Kartusche geladen, nach der chromatographischen Trennung die erhaltenen Peaks integriert und daraus bestimmt, ob die Wiederfindungsrate bei höheren Flussraten negativ beeinflusst wird. Als mobile, nicht eluierende Beladungs-Phase diente MeCN : H₂O = 3 : 97, wiederum mit 0,1% TFA, die Beladungszeit wurde so gewählt, dass der Injektionsloop (100 μ l) bei der gewählten Flussrate zweifach gespült wurde. Die Flächenintegrale für die jeweiligen Peptide bei unterschiedlichen Beladungsflussraten sind in Abbildung 49 gezeigt.

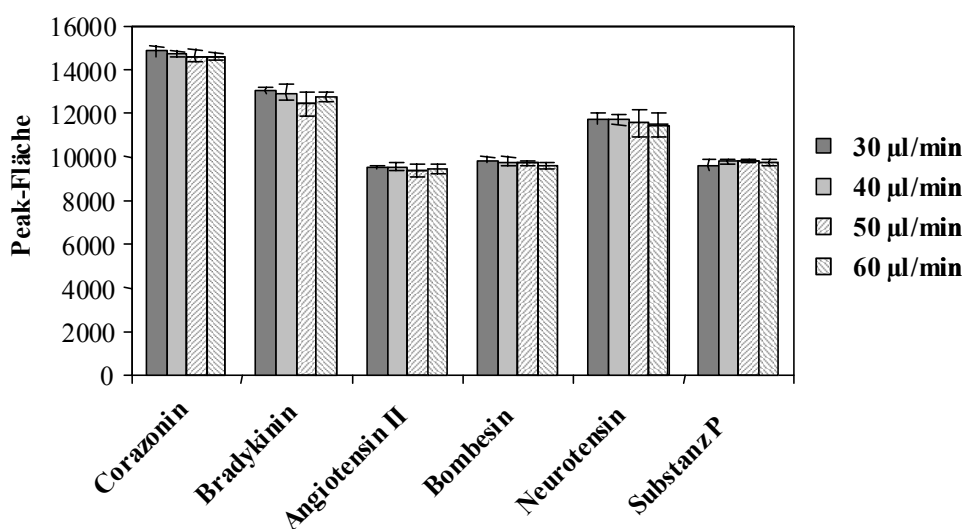


Abbildung 49: Wiederfindung der Analyten nach der MikroSPE-Extraktion in Abhängigkeit von der Beladungsflussrate.

Die erhaltenen Peakflächen sind annähernd unabhängig von der Beladungsflussrate, eine hohe Wiederfindung der Analyten ist also auch bei der maximal applizierbaren Flussrate von 60 $\mu\text{l}/\text{min}$ zu erzielen. Um die Systemkomponenten allerdings nicht all zu sehr zu belasten, wurde eine Beladungsflussrate von 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ für die folgenden Experimente gewählt, der Beladungsschritt mit einem 100 μl Injektionsloop dauert dann 4 min. Neben den Peakflächen und damit verbunden der Wiederfindung der Analyten wurden auch die Effizienzen E überprüft, welche ebenfalls annähernd unabhängig von der gewählten Flussrate waren. Dies zeigt, dass die Peptide durch die mobile Trennphase schnell von der μSPE -Kartusche gespült werden und so, gut refokussiert in einer schmalen Bande, den Eingang der Trennkapillare erreichen. Diese Bedingungen sind dann mit der direkten Injektion vergleichbar. Hier wird die bereits theoretisch besprochene Wahl einer wenig Retention zeigenden μSPE -Phase mit einer viel Retention generierenden Trennphase experimentell bestätigt, die Kombination der beiden ausgewählten C_{30} -Phasen ist also gut für diese Analyse anwendbar.

Wichtiger als die Beladungsflussrate sind für den analytischen Chemiker die mit dem System erreichbaren Detektionslimits. Es gilt also die Frage zu klären, wieviel Analyt reproduzierbar auf der μSPE -Kartusche ohne Verluste durch Herauswaschen während des Beladungsschrittes getrappt werden können. Hierfür wurde der Injektionsloop von 100 μl stufenweise auf 500 μl vergrößert. Nach Integration der Peakflächen wurde dann für jedes Peptid eine lineare Regression der erhaltenen Datenpunkte durchgeführt, die Ergebnisse sind in Abbildung 50 gezeigt.

Für alle Peptide konnten hohe Koeffizienten der linearen Regression ($R^2 > 98\%$) bestimmt werden, die Kapazität der μSPE -Kartusche ermöglicht also eine quantifizierbare Extraktion dieser Peptide im Bereich zwischen 8 ng und 40 ng. Abschließend sei hier in Abbildung 51 noch die erhaltene Temperatur-programmierte (30 – 50°C) Trennung nach der on-line MikroSPE-Extraktion des 500 μl Injektionsloops gezeigt.

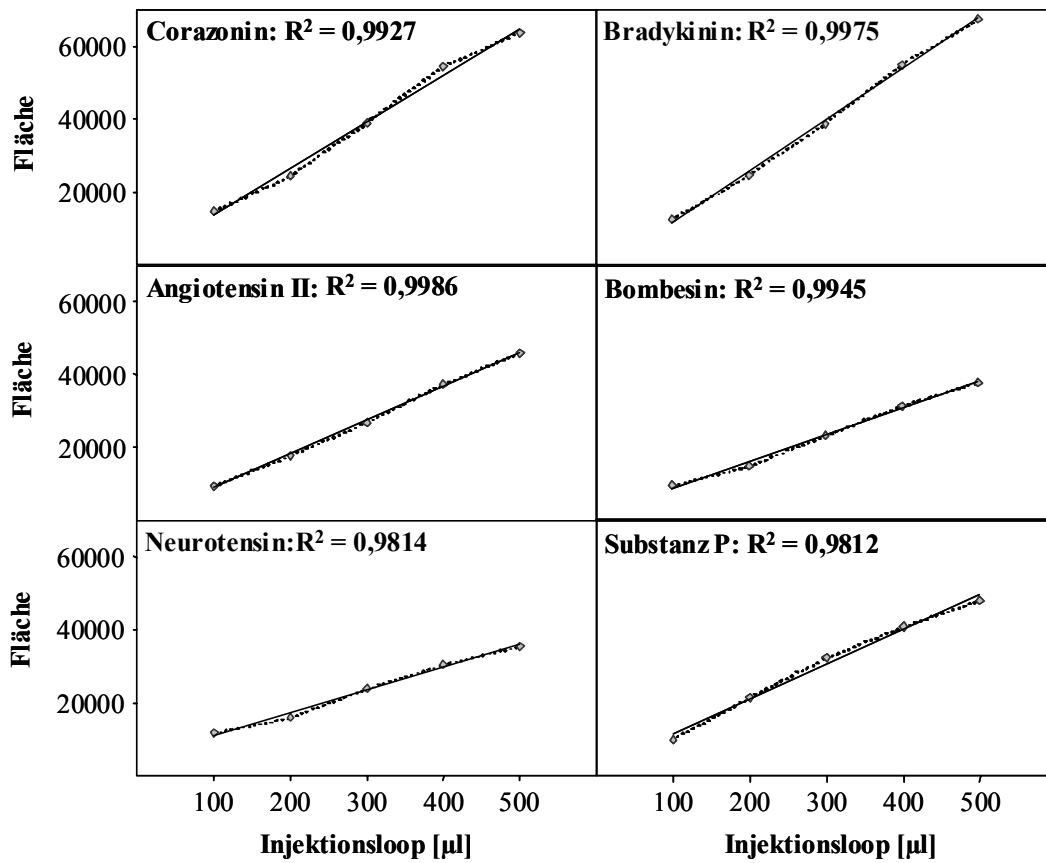


Abbildung 50: Kapazität der μ SPE-Kartusche.

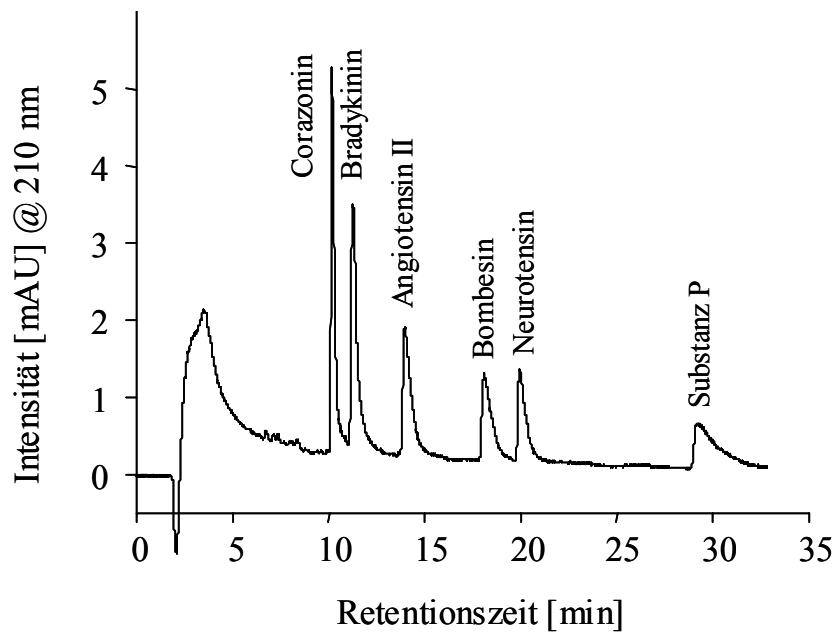


Abbildung 51: On-line MikroSPE-CapLC-Trennung bioaktiver Peptide.

5.6 Bestimmung von Phosphorylierungsstellen in synthetischen Peptiden

Neben der Bestimmung von Peptiden mittels des oben beschriebenen MikroSPE-CapLC-Systems wollte ich auch die Anwendung der an eine Kapillar-HPLC-Trennung direktgekoppelten Mikroprobenkopf-NMR für die Analyse von Peptiden testen. Makromoleküle wie Peptide haben sehr komplexe ^1H -Spektren, es galt also eine Applikation zu finden, welche relativ einfach zugängliche Ergebnisse liefert. In der Zusammenarbeit mit Prof. Rainer Bischoff wurde solch ein Thema bearbeitet. Dies war der Nachweis von regulatorischen Phosphorylierungsstellen in synthetischen Peptiden, welche dem tryptischen Fragment der menschlichen Protein-Tyrosin-Kinase ZAP-70 entsprachen. Dieses Peptide besitzt zwei Tyrosineinheiten, welche entweder nicht- (YY), mono- (pYY und YpY) oder di-phosphoryliert (pYpY) vorliegen können. Anhand der chemischen Verschiebung der aromatischen Tyrosinprotonen sollte eine Unterscheidung möglich sein, dies galt es im Verlauf der Experimente zu belegen.

5.6.1 Mikroprobenkopf-NMR-Experimente

Zuerst sollte mit direkter Spritzeninjektion in den NMR-Mikroprobenkopf anhand der ^1H -NMR-Spektren der Peptide überprüft werden, ob die oben aufgestellte Hypothese experimentell belegt werden kann. Dazu wurden jeweils 0,5 mg eines jeden der vier Peptide in 50 μl D_2O gelöst, der aromatische Bereich der chemischen Verschiebung ist in Abbildung 52 gezeigt. Wie zu sehen ist, lassen sich alle vier Varianten voneinander unterscheiden. Im nicht-phosphorylierten Peptid (YY) sind eindeutig vier Dubletts zu erkennen, eine Signalgruppe in tieferem Feld für die Protonen in Position a und eine Signalgruppe in höherem Feld für diejenigen Protonen an b. Die Zuordnung der Signale zu den entsprechenden Tyrosineinheiten erfolgt aus dem Vergleich mit den mono-phosphorylierten Spezies (pYY, YpY). Eine Modifikation der phenolischen Hydroxylgruppe durch Bindung einer Phosphateinheit sollte nur die Resonanzen der Protonen dieser Tyrosineinheit verändern. Dies ist näherungsweise auch der Fall, sodass eine eindeutige Zuordnung der Resonanzsignale möglich ist. Hinzuweisen ist allerdings darauf, dass sich auch die Signale der Protonen

am benachbarten Tyrosin leicht ins tiefere Feld verschoben werden. Beim diphosphorylierten Peptid (pYpY) kann nur noch eine Zuordnung der Signale an Position a bzw. b erfolgen, eine Unterscheidung der jeweiligen Tyrosineinheiten ist nicht mehr möglich.

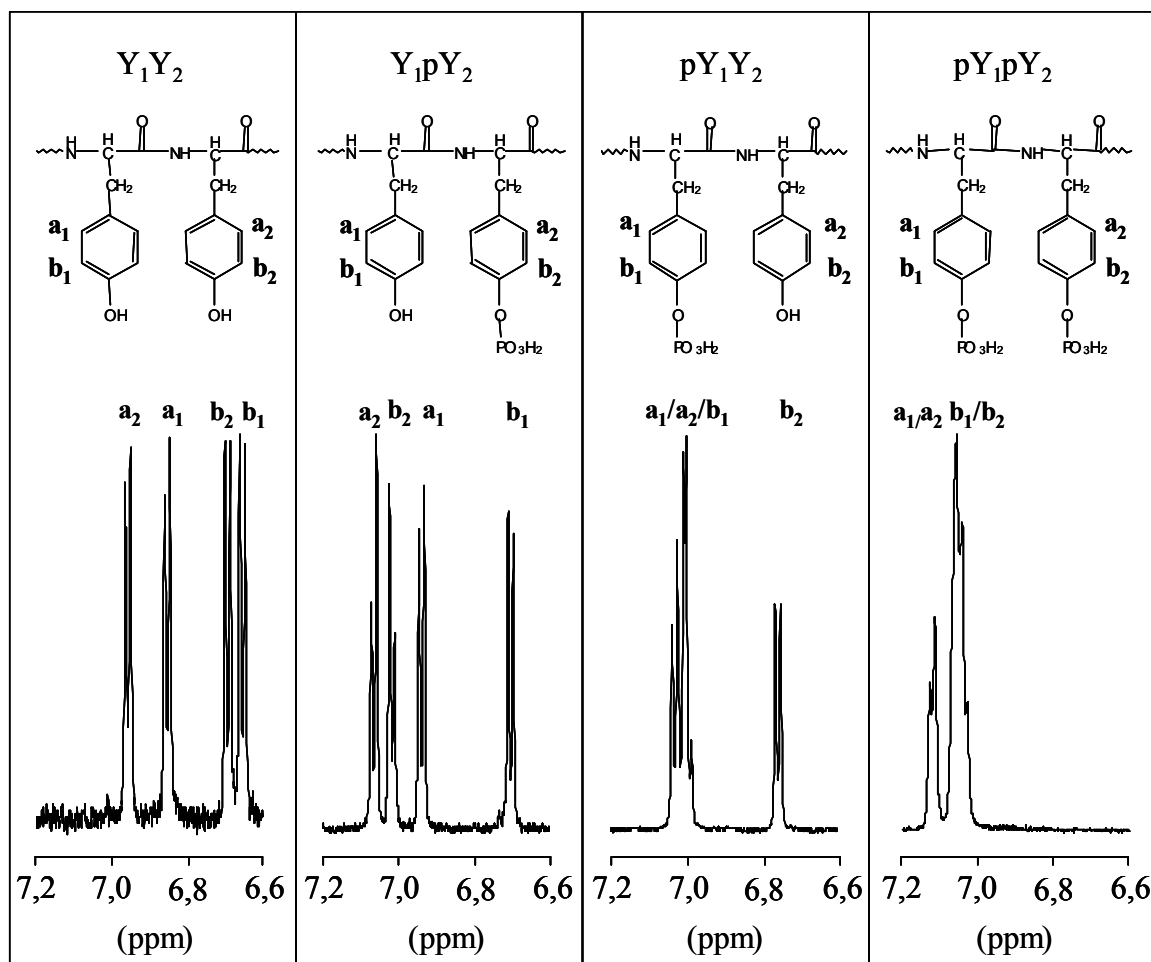


Abbildung 52: Vergleich des ^1H aromatischen Bereiches der phosphorylierten Peptide.

Während der oben angegebenen Messungen zeigte sich, dass in akzeptabler Messzeit (^1H : 4 Transienten, $^{13}\text{C}_{\text{inv}}$: 64k Transienten) sehr gute NMR-Spektren erhalten werden können. Mein Interesse, nicht nur den als „Sonde“ benutzten aromatischen Bereich, sondern alle Resonanzsignale im Spektrum zuzuordnen, wurde daher geweckt. Die NMR-Spektroskopie erlangte in den letzten Jahren einen sehr großen Stellenwert in der Strukturaufklärung von Proteinen und Peptiden, dies wird nicht zuletzt durch den Chemie Nobelpreis des Jahres 2002 an Prof. K. Wüthrich belegt. Die NMR-Spektroskopie ermöglicht neben der reinen Identifikation auch die Bestimmung der räumlichen Struktur der Verbindungen. Um solche Struktur-

informationen zu erhalten, sind zumeist aufwendige NMR-Messmethoden nötig, vor allem die Auswertung der erhaltenen Daten ist äußerst komplex. Mikroprobenköpfe wurden meines Wissens noch nie für solche Analyseaufgaben eingesetzt, obwohl Peptide und Proteine meist in nur sehr geringen Mengen vorliegen. Üblicherweise werden in der klassischen 5 mm Röhren NMR etwa 2 mg Substanz benötigt, in diesen Mikroprobenkopf-NMR Experimenten konnte dies auf 0,5 mg reduziert werden, ohne dabei die für die Signalzuordnung wichtigen Informationen zu verlieren.

Unterschiedliche NMR-Messtechniken wurden dafür eingesetzt, dies waren eindimensionale ^1H - und ^{13}C -Experimente, daneben auch mehrere zweidimensionale Verfahren wie $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY 45, HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence). Im HSQC-Spektrum werden $^1\text{J}_{\text{CH}}$ koppelnde Kerne miteinander korreliert, Protonen können also dem direkt gebundenen Kohlenstoffatom zugewiesen werden, quartäre Kohlenstoffatome werden hier nicht detektiert. Diese wichtigen Kohlenstoffatome des Peptidrückgrades werden in HMBC-Spektren auswertbar, da hier $^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$ gekoppelte Kerne miteinander korreliert und durch charakteristische cross peaks im Spektrum sichtbar werden.

Eine vollständige schriftliche Beschreibung der Auswertung aller gemessenen NMR-Spektren würde wohl den Rahmen der Arbeit sprengen, daher möchte ich den Auswertungsgang im folgenden exemplarisch an schwer zuzuordnenden Peaks beschreiben. In Abbildung 53 sei nochmals die Struktur des nicht-phosphorylierten Peptides (YY) gezeigt, die in den NMR-Spektren angegebene Nomenklatur beinhaltet jeweils den Kurznamen der entsprechenden Aminosäure, sowie die Position in der Seitenkette, α sind dabei die Atome im Peptid Rückgrad (backbone), diejenigen in der Seitenkette werden dann beginnend mit β im griechischen Alphabet absteigend benannt.

Ausgangspunkt der Auswertung war das $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY 45 Spektrum, in dem anhand charakteristischer Kreuzpeaks viele Signale den entsprechenden Protonen zugeordnet werden konnten, hier sei aber zuerst das Endergebnis im ^1H -Spektrum gezeigt (Abbildung 54), welches die vollständige Peakzuordnung nach Auswertung aller NMR-Spektren beinhaltet. Zudem konnte aus diesem Spektrum durch Integration der Signale wichtige Informationen über die Anzahl der in jedem Peak vermessenen

Einige der gezeigten Peakzuordnungen waren bereits nach Auswertung des ^1H , ^1H -COSY 45 (Abbildung 55) zugänglich, dies soll nun beispielhaft an bestimmten Diagonalpeaks in diesem Spektrum gezeigt werden. Zuerst will ich auf die Resonanzen des Arginins eingehen, da dessen lange Seitenkette viele Kreuzpeaks zeigt und die Signale zudem teilweise mit denen des Leucins zusammenfallen. $\text{R}(\delta)$ ist durch den Einfluss der benachbarten Aminogruppe tieffeldverschoben bei ca. 3,2 ppm. Diese Protonen koppeln zu $\text{R}(\gamma)$ bei ca. 1,5 ppm, wobei dieser Peak mit den Protonenresonanzen an $\text{L}(\beta, \gamma)$ zusammenfällt. Die $\text{R}(\gamma)$ -Protonen wiederum koppeln weiter zu zwei Resonanzsignalen der $\text{R}(\beta)$ -Protonen, welche auf Grund ihrer Prochiralität zwei unterschiedliche chemische Verschiebungen (1,7 und 1,85 ppm) zeigen. Letztendlich zeigen die $\text{R}(\beta)$ -Protonen einen Kreuzpeak zu dem $\text{R}(\alpha)$ -Proton des Rückgrades bei ca. 4,25 ppm, dieses Signal überlappt mit $\text{S}(\alpha)$ und $\text{L}(\alpha)$. Weitere Besonderheiten im ^1H -Spektrum sind zwei Resonanzen für die Leucin Methylgruppen ($\text{L}(\delta)$ bei ca. 0,8 und 0,9 ppm) sowie die zu erwartenden zwei Signale für $\text{Y}_{1,2}(\alpha)$ und $\text{D}_{1,2}(\alpha)$ im Bereich 4,3 - 4,7 ppm, welche allerdings nicht eindeutig den jeweiligen Aminosäuren zugeordnet werden können.

Weitere Hinweise, dass obige Signalzuordnung richtig ist, lassen sich aus dem HSQC-Spektrum (Abbildung 56) gewinnen. Durch den deutlich größeren Bereich der ^{13}C chemischen Verschiebungen (0 – 200 ppm) können so im ^1H -Spektrum überlappende Signale in der ^{13}C -Dimension häufig aufgelöst werden. Hinzuweisen ist auf ein durch die Bauweise des Mikroprobenkopfes bedingtes Problem beim Vermessen von ^{13}C -NMR-Spektren. Die Kupfer-Detektionsspule ist zu Verminderung von Feld-inhomogenitäten mit einer an die Suszeptibilität des Kupfers angepasste Flüssigkeit umgeben. Diese Flüssigkeit, FC-43 (Perfluorotributylamin), hat aber im Bereich zwischen 80 und 115 ppm Resonanzsignale, dieser Bereich der ^{13}C chemischen Verschiebung ist also für die Auswertung nicht nutzbar. Da die untersuchten Peptide in diesem Verschiebungsbereich aber keine Resonanzsignale besitzen, war dies für diese NMR-Messungen nicht von Bedeutung. Auch hier sollen wiederum nur die Kopplungen im Spektrum eingehender besprochen werden, welche neue Informationen für die Signalzuordnung lieferten. So zeigen die beiden Leucin-Methylgruppensignale auch zwei sehr nahe beeinanderliegende ^{13}C Verschiebungen,

dies belegt deren Zuordnung. Ebenso ist es möglich, die Methylgruppensignale der drei Alaninaminosäuren von der des Threonins zu unterscheiden, da sich die ^{13}C -Verschiebungen aller Alaningruppen nur unwesentlich unterscheiden, die des Threonins allerdings zu tieferem Feld verschoben ist.

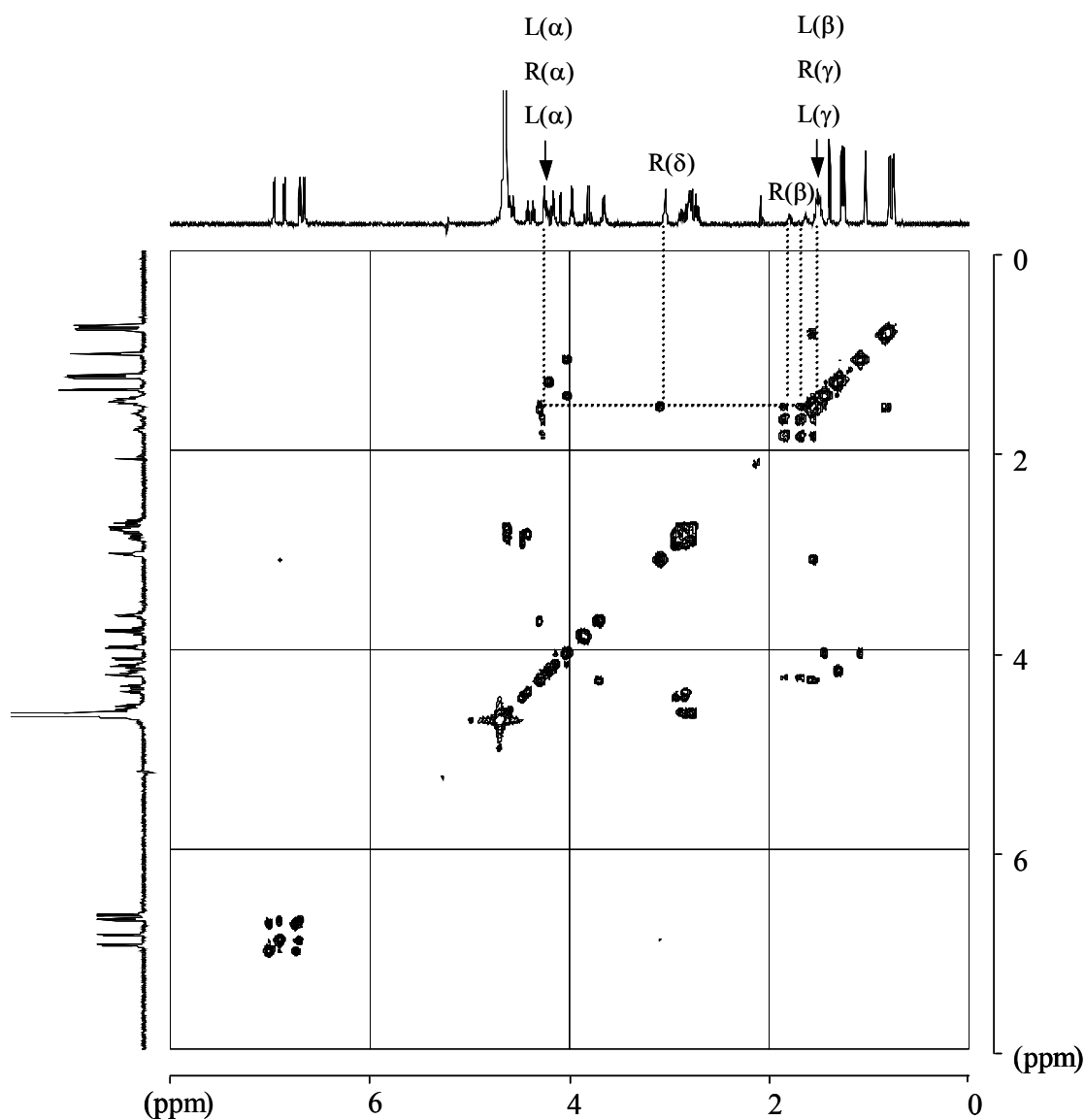


Abbildung 55: $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY 45 des nicht-phosphorylierten Peptides YY.

Auch bei der im ^1H -Spektrum überlappenden Signalgruppe für L(β,γ) und R(γ) sind zwei Korrelationspeaks zu sehen. Im ^{13}C -Spektrum überlappen zwar weiterhin L(γ) und R(β), L(β) hingegen zeigt eine Resonanz in tieferem Feld. Ähnliche Ergebnisse werden für die im ^1H -Spektrum überlappende Signalgruppen Y $_{1,2}$ (β) und D $_{1,2}$ (β), A $_1$ (α) und T(β) sowie R(α), L(α) und S(α) erhalten. Weitere wichtige Korrelationen betreffen das Tyrosin. So zeigen die im ^1H -Spektrum jeweils separierten

Signale für $Y_{1,2}(\alpha)$, und die aromatischen Signale $Y_{1,2}(a$ bzw. $b)$ jeweils nur eine chemische Verschiebung im ^{13}C -NMR-Spektrum. Hinweisen möchte ich hier noch auf einen wichtigen Bereich der ^{13}C chemischen Verschiebung, welcher im HSQC-Spektrum nicht gezeigt ist, nämlich der backbone Verschiebungsbereich der Carbonyl-Kohlenstoffatome um 175 ppm. Dieser ist im folgenden HMBC-Spektrum mit gezeigt.

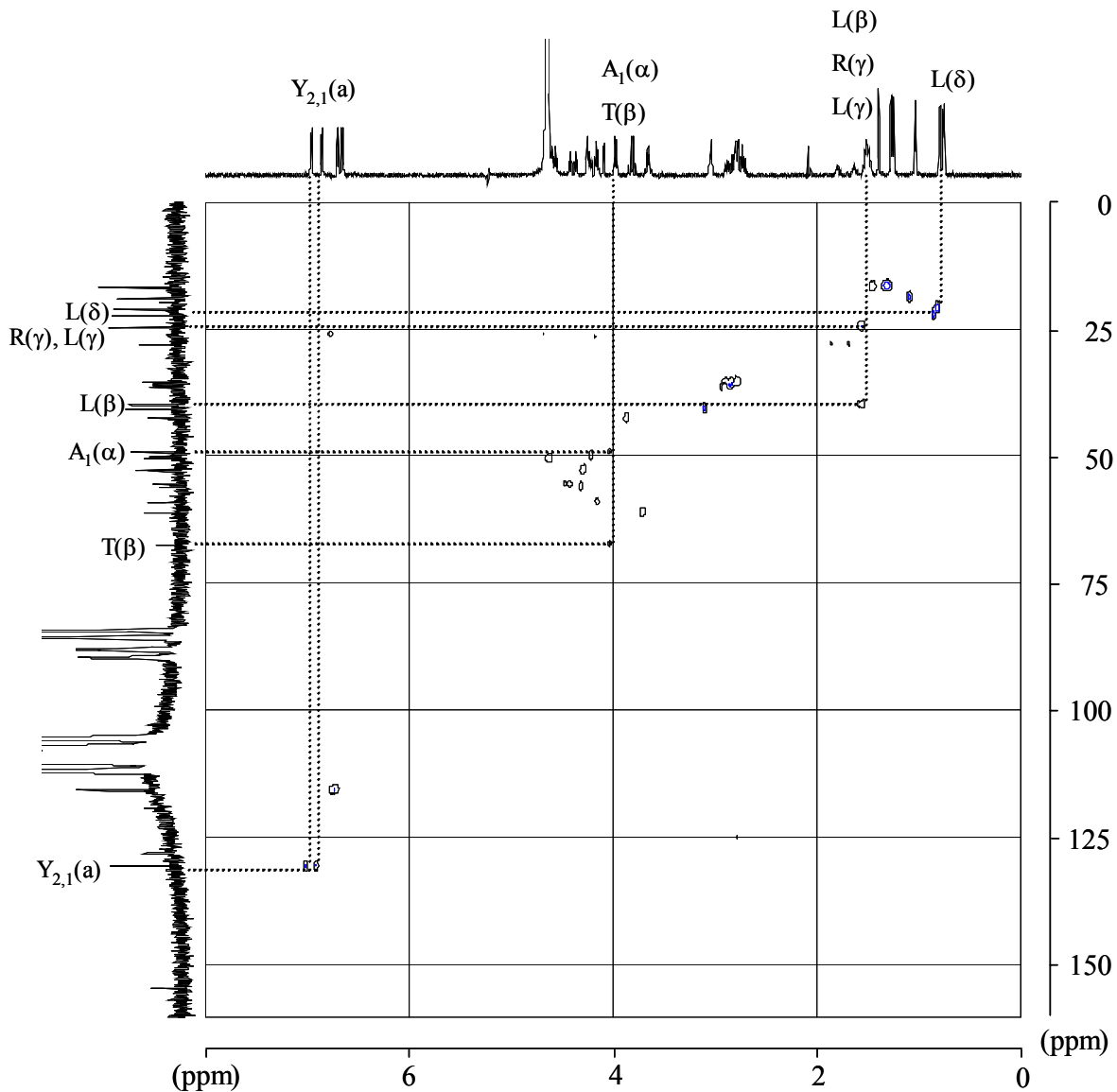


Abbildung 56: HSQC-Spektrum des nicht-phosphorylierten Peptides YY.

Im HMBC-Spektrum (Abbildung 57) ist die Zuordnung von Kohlenstoffatomen im ^{13}C -Spektrum möglich, welche kein Proton tragen und somit im HSQC-Spektrum nicht detektierbar sind. Dies soll am Beispiel des Tyrosins gezeigt werden. So sind im aromatischen Bereich neben den Kopplungen der aromatischen Protonen zu dessen

$^1J_{CH}$ aromatischen Kohlenstoffatomen, sondern auch das aromatische Kohlenstoffatom der phenolischen (para -OH) sowie Aminosäurenketten-Substitutionsposition (subst.) zu sehen. Des Weiteren sind die Kopplungen der aromatischen Protonen zu den Kohlenstoffatomen der Seitenkette ($Y_{2,1}(\alpha,\beta)$) zu erkennen, für das bisher nicht eindeutig der jeweiligen Tyrosineinheit zuzuordnende Signalpaar $Y_{2,1}(\alpha)$ sogar die Zuordnung des im tieferen Feld liegenden Signals zu $Y_2(\alpha)$ möglich. Diese Resonanz erlaubt zudem die Zuordnung des entsprechenden Carbonyl-Kohlenstoffatoms und damit die eindeutige Aufklärung des Peptid Rückgrades. Alle diese Kohlenstoffatome haben ihre ^{13}C chemische Verschiebung in einem engen Bereich um 175 ppm. Das Amidine-Kohlenstoffatom des Arginins ist im ^{13}C -NMR-Spektrum bei 159 ppm nur schlecht zu erkennen, zeigt aber einen deutlichen cross peak mit den Protonen $R(\delta)$.

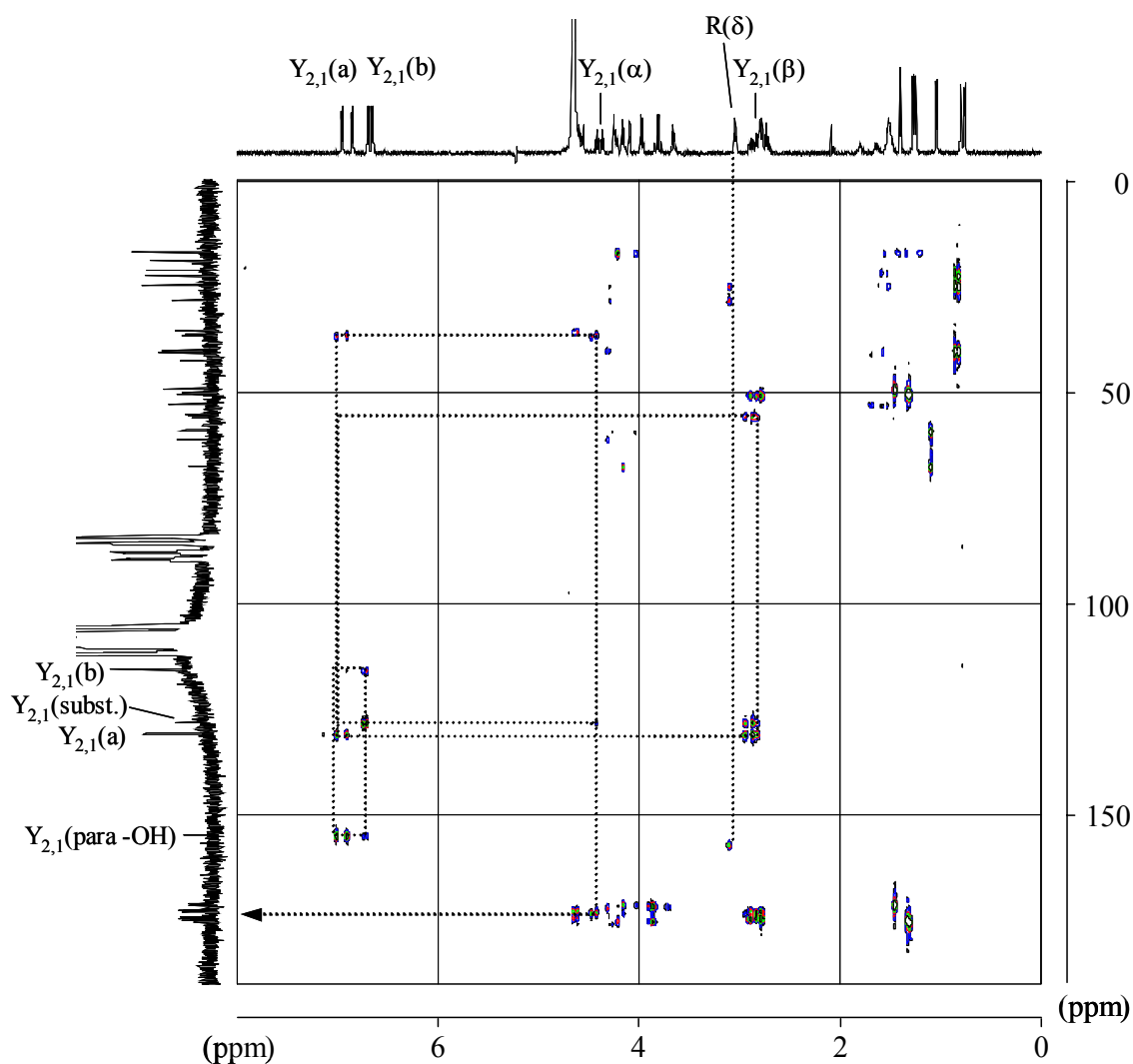


Abbildung 57: HMBC-Spektrum des nicht-phosphorylierten Peptides YY.

5.6.2 Kapillar-HPLC-NMR-Kopplung

Nach obigem Exkurs, der Signalzuordnung aller Resonanzpeaks des nicht-phosphorylierten Peptides YY, soll nun das eigentliche Thema dieses Projektes wieder aufgenommen werden. Ziel der Experimente war es, mittels CapLC-NMR vier Varianten eines regulatorisch nicht-, zweier mono- und eines di-phosphorylierten Peptides nach der Kapillar-HPLC-Trennung unter stopped-flow NMR-Bedingungen zu identifizieren. Untersuchungen mittels Kapillar-HPLC-ESI⁺/MS und MALDI-TOF/MS zeigten, dass dies bis in den Femtomol (fmol) Detektionslimitbereich möglich ist, die Unterscheidung der beiden mono-phosphorylierten Peptid (YpY und pYY) war aber weder anhand der Molekülmassen noch anhand von Fragmentierungsmustern eindeutig möglich^[175]. Eine ähnliche Einschränkung wurde ja bereits bei den Tocopherolisomeren (β - und γ - Tocopherol) besprochen. Die Zuordnung erfolgt durch Ko-Chromatographie von authentischen Standards. In wässriger hochkonzentrierter Lösung war dies allerdings einfach anhand des aromatischen Bereichs der Protonenresonanzen des Tyrosins im ¹H-NMR-Spektrum möglich, in welchem sich auch die beiden mono-phosphorylierten Spezies deutlich differenzieren ließen. In wie weit dies auch im direktgekoppelten Analysensystem zu bewerkstelligen ist, sollte mit folgenden Experimenten bestimmt werden. Dazu wurden 200 nl einer Lösung mit der Konzentration 2 mg/ml eines jeden Peptids (entsprechend einer Gesamtmenge von 400 ng je Peptid) auf einer C₁₈-Kapillare unter Verwendung eines Gradienten aus MeCN-d₃ und D₂O (jeweils unter Zusatz von 0,1% TFA) bei 5 μ l/min aufgetrennt und die eluierenden Peaks dann im stopped-flow NMR-Modus detektiert. Das erhaltene Chromatogramm ist in Abbildung 58 gezeigt, die gemessenen ¹H-NMR-Spektren der eluierenden Peptide in Abbildung 59. Die Kapillar-HPLC-Trennung zeigt gut voneinander getrennte Peaks, welche durch Optimierung des Lösungsmittel-Gradienten erzielt wurden. Die Effizienz ist zwar, wie bei Peptidtrennungen durchaus üblich, nicht sehr hoch, dennoch können selbst die beiden mono-phosphorylierten Spezies noch bei dieser relativ hohen Konzentration aufgetrennt werden. Ebenso ist die Signalintensität in der UV-Spur niedrig, da Peptide nur die Carbonylfunktionen als UV-Chromophor besitzen. Ziel war aber die Unterscheidung der Peptidspezies mittels NMR-Spektroskopie. Die Protonenspektren ermöglichen wie bei der Spritzeninjektion der

wässrigen Lösung genau diese eindeutige Unterscheidung der unterschiedlich phosphorylierten Peptide. Diese NMR-Spektren haben auf Grund der für die NMR-Detektion geringen Analytmenge zwar ein deutlich reduziertes Signal-zu-Rausch Verhältnis, dennoch ist eine klare Identifikation selbst der beiden mono-phosphorylierten Varianten zugänglich. Alle für diese Unterscheidung wichtigen Parameter sind ablesbar, so sind die Dubletts eindeutig erkennbar und die chemischen Verschiebungen der aromatischen Protonen abhängig von der Phosphorylierung detektierbar. Diese chemischen Verschiebungen sind auch von der Lösungsmittelzusammensetzung während der NMR-Messung abhängig, welche auf Grund der Gradientenelution nicht konstant ist. Zwar treten Änderungen der chemischen Verschiebung im Vergleich zur Messung in rein wässriger Lösung auf, der Einfluss ist aber so gering, dass die Unterscheidung vor allem der mono-phosphorylierten Peptide weiter möglich ist.

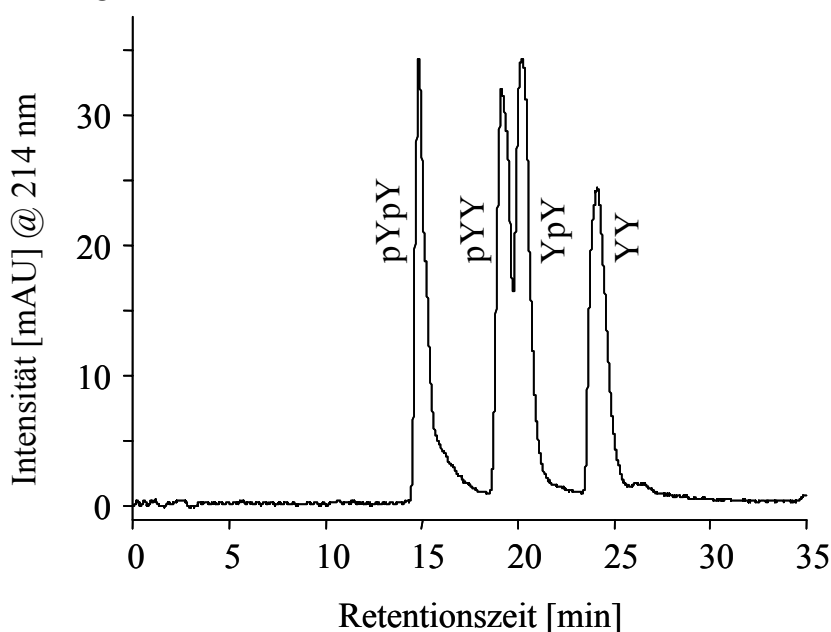


Abbildung 58: Kapillar-HPLC-Trennung der vier unterschiedlich phosphorylierten Peptide (pYpY, pYY, YpY und YY).

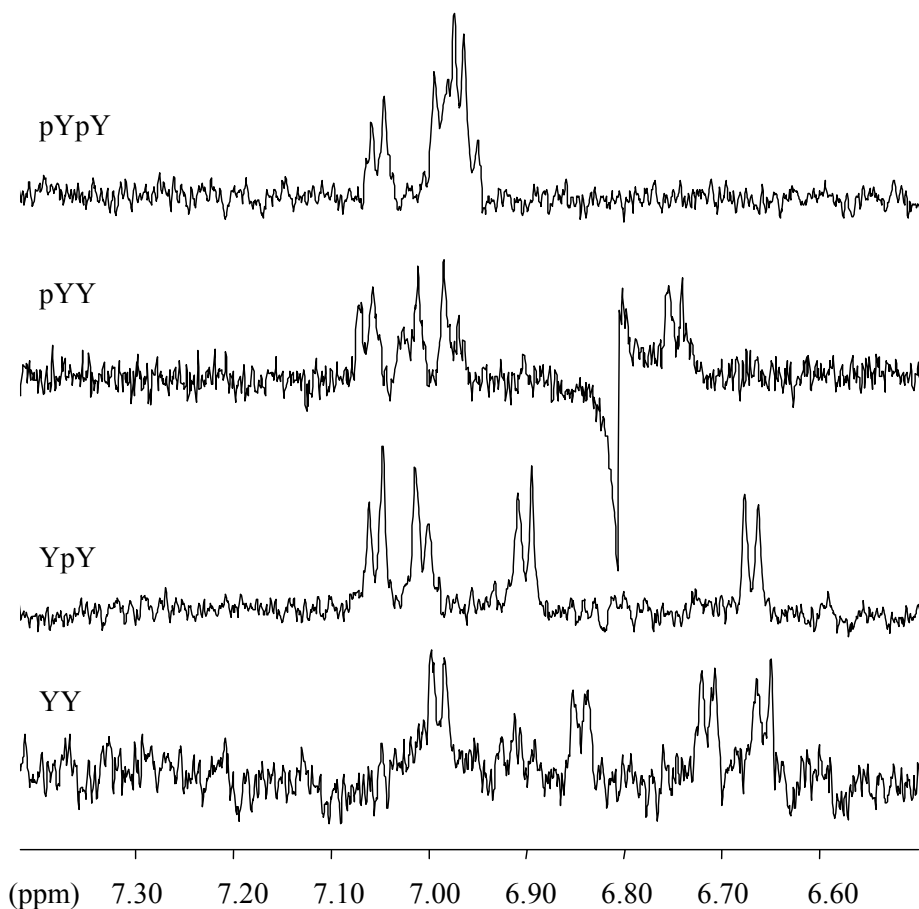


Abbildung 59: Stopped-flow ^1H -NMR-Spektren (aromatischer Bereich) zur Unterscheidung der Peptidspezies.

5.7 Stopped-flow Kapillar-HPLC-NMR-Experimente eines kommerziellen Rosmarin-Extraktes

Im Rahmen der Zusammenarbeit mit Dr. V. Exarchou und Prof. T. van Beek wurde neben dem Sensitivitätsvergleich unterschiedlicher LC-NMR-Systeme (die für unser System erhaltenen Daten sind in Kapitel 5.2 gezeigt) auch die Anwendbarkeit auf eine Realprobe überprüft. Hierfür diente ein kommerzieller Rosmarin-Extrakt, welcher als drei Hauptkomponenten Rosmarinsäure, Carnosolsäure und Carnosol enthält^{[176],[177]}. Diese Substanzen sollten mittels Kapillar-HPLC von anderen Komponenten des Extraktes abgetrennt werden und dann im direkten stopped-flow ^1H -NMR-Modus detektiert und identifiziert werden.

Zuerst galt es wieder, eine Kapillar-HPLC-Trennung zu etablieren. Hierfür wurden 20 mg des gelblichen Rosmarin-Extrakt Pulvers in 1 ml MeCN-d_3 : D_2O = 50 : 50

gelöst, abfiltriert und die erhaltene Lösung direkt in die Kapillar-HPLC injiziert. Die Trennung wurde auf einer 15 cm x 250 μm C₁₈-Kapillare (ProntoSil Eurobond 120 Å – 5 μm) mit einem Gradienten aus MeCN-d₃ und D₂O (jeweils unter Zusatz von 0,1% TFA) durchgeführt (0 min: 90% D₂O, linear auf 50% D₂O in 20 min, linear auf 30% D₂O bis 24 min, Plateau bis 28 min dann linear auf 1% D₂O bis 32 min, gehalten bis zu Ende der Trennung) und bei 254 nm mittels UV detektiert. Ein erhaltenes Chromatogramm ist in Abbildung 60 gezeigt.

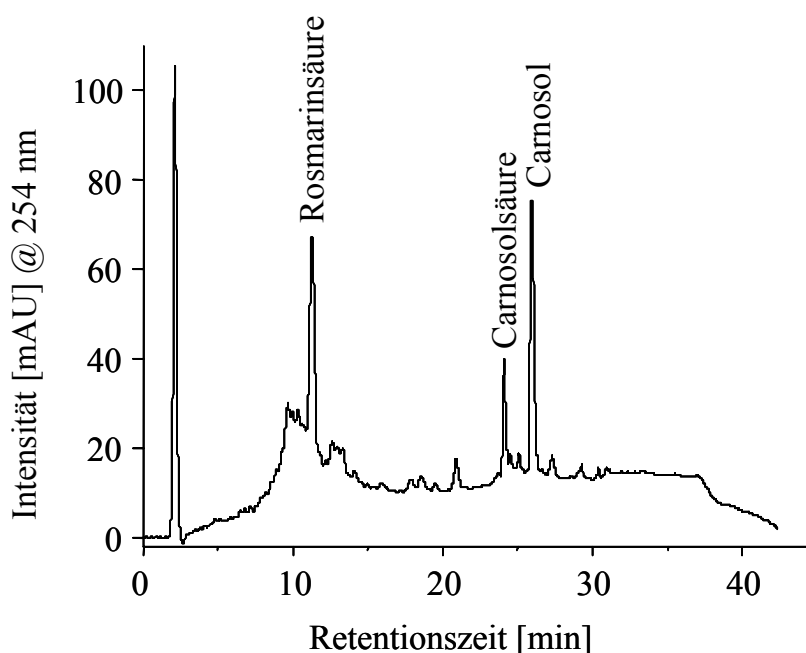


Abbildung 60: Kapillar-HPLC-Trennung des kommerziellen Rosmarin-Extraktes.

Die drei Hauptkomponenten sind gut von allen anderen Substanzen des Extraktes getrennt, eine Vermessung der ¹H-NMR-Spektren ist also annähernd ohne ko-eluierende Verunreinigungen im direkten stopped-flow Modus möglich. Beispielhaft sind die erhaltenen ¹H-NMR-Spektren von Rosmarinsäure und Carnosolsäure in Abbildung 61 mit ihrer Signalzuordnung gezeigt. Restwassersignale wurden mittels shaped Pulsen unterdrückt, die Resonanzsignale von nicht vollständig deuteriertem MeCN, nicht perfluorierter TFA und dem Extraktionslösungsmittel MeOH sind aber dominierend in den NMR-Spektren sichtbar. Da allerdings Resonanzsignale der Analyten direkt neben diesen Lösungsmittelsignalen liegen, würde eine Unterdrückung dieser Lösungsmittelresonanzen ebenfalls die Analytsignale potentiell mit unterdrücken, dies ist also nicht sinnvoll. Dennoch kann eine eindeutige Signalzuordnung und damit Identifikation der Analyten erfolgen.

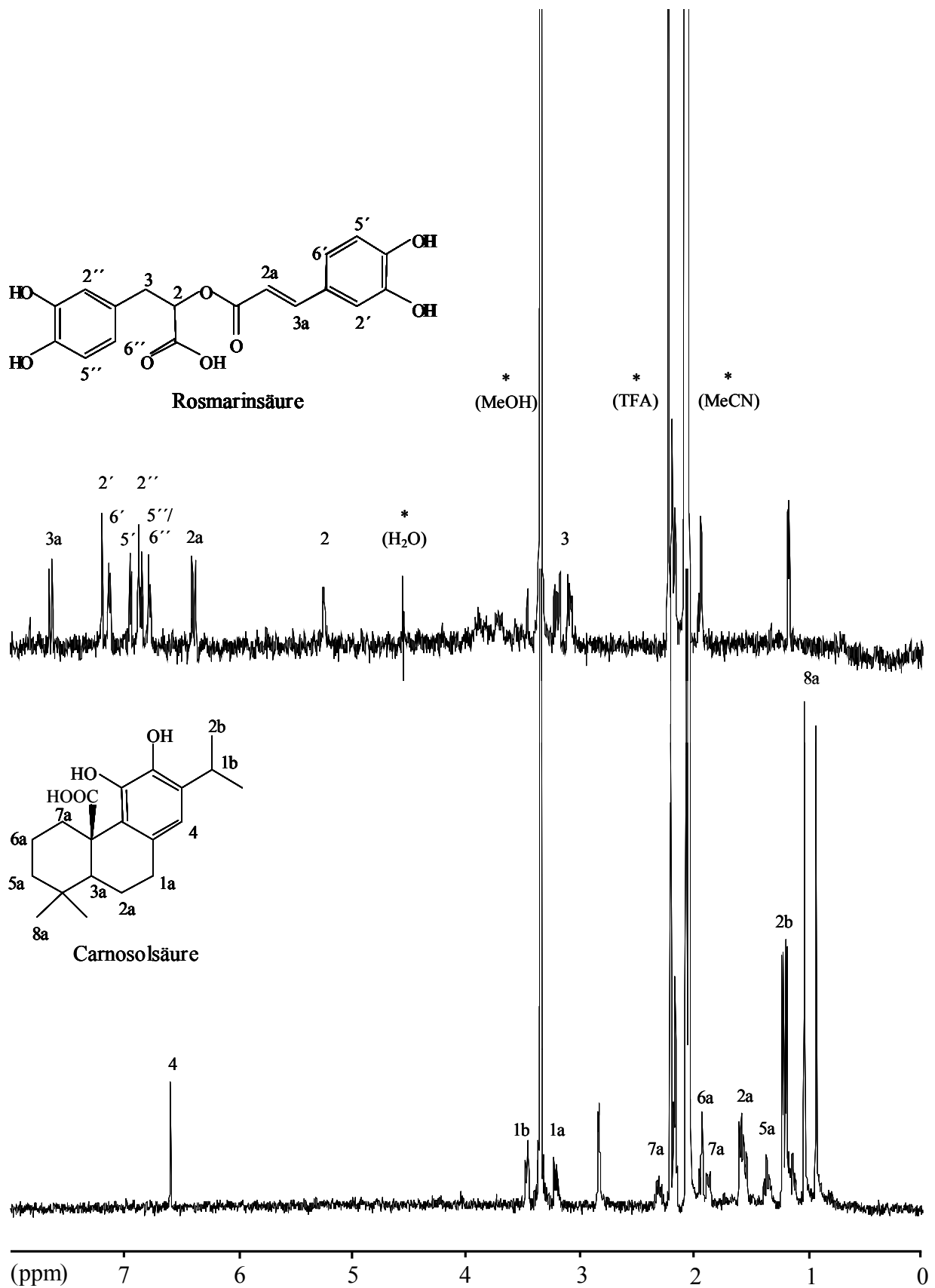


Abbildung 61: Stopped-flow ^1H -NMR-Spektren von Rosmarinsäure (oben) und Carnosolsäure (unten).

Carnosol und Carnosolsäure als sehr strukturverwandte Verbindungen können am einfachsten im chemischen Verschiebungsbereich zwischen 6 und 7 ppm unterschieden werden. Carnosolsäure zeigt hier nur die Resonanz eines einzigen aromatischen Protons (4), Carnosol hingegen diese Resonanz, sowie die Resonanz des Protons 1a, welches durch den Einfluss der intramolekularen Essigsäureesterbrücke in diesen Tieffeld-Bereich verschoben ist. Ebenso wird auch die Resonanz des aromatischen Protons im Carnosol (4) tieffeldverschoben. Dies ist in Abbildung 62 gezeigt. Dieser Bereich kann somit als einfache Sonde zur Unterscheidung der beiden Substanzen dienen. Eine andere Signalgruppe, deren Resonanz stark durch die Essigsäureesterbrücke im Carnosol verändert wird sind die Protonen 2a. Neben einer signifikanten Tieffeldverschiebung (Carnosolsäure zeigt das Signal dieser Protonen 2a bei ca. 1,5 ppm) ist hier auf Grund der nun vorliegenden Prochiralität auch eine Aufspaltung in zwei differenzierbare Signalgruppen (2,8 und 2,6 ppm) zu beobachten.

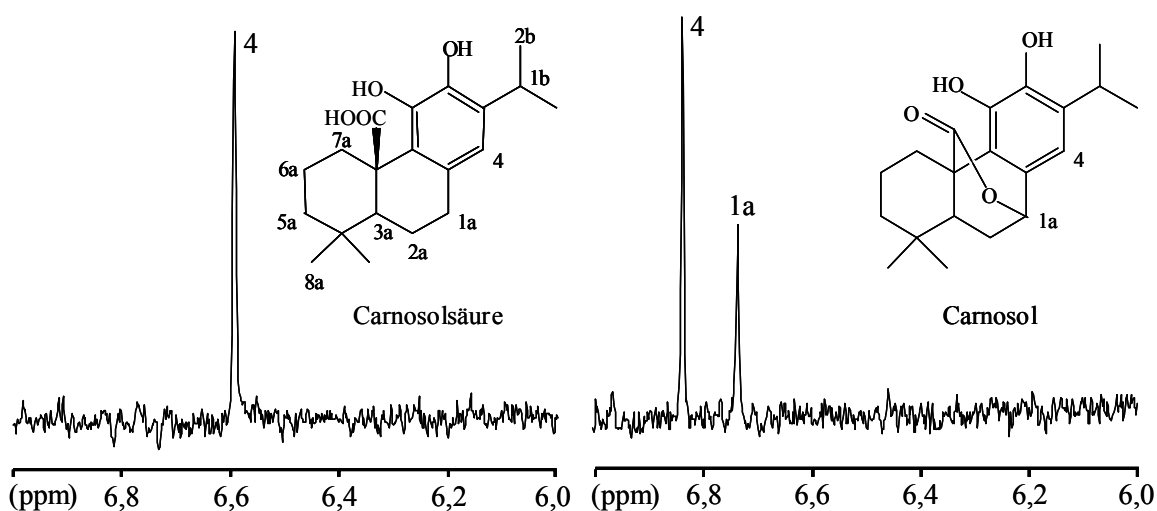


Abbildung 62: Differenzierung zwischen Carnosolsäure und Carnosol.

6 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass miniaturisierte direktgekoppelte Systeme gut für die Analytik von biomedizinisch aktiven Substanzklassen eingesetzt werden können. Die Detektion, Quantifizierung, Identifikation und Strukturaufklärung dieser Verbindungen aus limitierten biologischen Probenmatrizes stellt allerdings hohe Anforderungen an alle Teilschritte eines solchen Analysegangs, die Optimierung eines jeden Parameters ist daher unumgänglich. Die oftmals bemängelte Robustheit solcher Systeme ist also nur bedingt richtig, im Umgang mit miniaturisierten Analysesystemen ist jedoch, bedingt durch die limitierte Probenmenge, besondere Sorgfalt nötig.

Ausgangspunkt der Arbeit war die Herstellung von später für die chromatographische Trennung verwendeten, hocheffizienten Kapillartrennsäulen (250 μm I.D.), welche mit auf die für die jeweilig zu analysierenden Substanzen angepassten stationären Phasen gepackt wurden. Hiefür wurde ein universell anwendbarer Slurry-Packprozeß entwickelt, neben dieser Packsystematik aber auch stabile und reproduzierbare Endfittings zur dauerhaften Fixierung der stationären Phase in der Kapillartrennsäule entwickelt. Diese Kapillarsäulen zeigten im Vergleich zu klassischen HPLC-Säulen mit 4,6 mm I.D. überlegene oder zumindest vergleichbare Trenneigenschaften. Dies betrifft sowohl die Trennstärke als auch die generierte Effizienz.

Die Kapillartrennsäulen wurden in on-line direktgekoppelten Systemen zum Nachweis von bioaktiven Substanzklassen (Tocopherole, Flavonoide, Phenolsäuren sowie Peptide) eingesetzt. Neben der Detektion mit auf die minimierten Elutionsvolumina angepassten spektrometrischen (ESI/MS) und spektroskopischen Detektoren (UV, Mikroprobenkopf-NMR) wurde auch die MikroSPE als Extraktions- und Anreicherungsschritt on-line gekoppelt. Der Extraktion, einem häufig unterschätzten Teilschritt, sollte bei der Analyse von limitierten Probenmengen besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden. Neben der artefaktfreien Extraktion muss dieser Schritt auch eine hohe Anreicherung der zu untersuchenden Substanzen gewährleisten, denn nur so können oftmals die Empfindlichkeitsgrenzen der Detektoren erreicht werden. Dies ist vor allem für die NMR wichtig. Neben der SPE für flüssige Proben

garantiert die MSPD eine schonende und schnelle Extraktion und hohe Anreicherung bei der Analyse von Substanzen aus festen oder hochviskosen Probenmatrizes.

Für die Detektion der kleinen Analytmengen wiederum ist die Sensitivität des Detektors mitentscheidend. Die Empfindlichkeit hängt neben der Messmethode von geräte-technischen und methodischen Faktoren ab, sollte daher für jeden Detektor einzeln optimiert werden. Die UV-Spektroskopie wird on-capillary durchgeführt, als zur Verfügung stehende Weglänge (I.D. der Detektionskapillare) wurden meist 100 μm gewählt. Dies stellte einen guten Kompromis zwischen der Empfindlichkeit (Lambert-Beer'sches-Gesetz) und minimaler Bandenverbreiterung der Elutionspeaks dar. Für die Massenspektrometrie als sehr sensitive und auch selektive Detektionsart waren neben der Verwendung einer miniaturisierten Spray-Nadel vor allem methodische Entwicklungen betreffend einer optimierten Ionisation und Detektion nötig. Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag aber in der Kopplung der Kapillar-HPLC zur NMR-Detektion. Die als relativ unsensitiv geltende NMR hat in den letzten Jahren unter anderem durch die Entwicklung neuartiger Durchfluss-Mikroprobenköpfe weitreichende Verbesserung in den erzielbaren Detektionslimits erreicht, dies gilt besonders für soleniodische Mikroprobenköpfe mit einer horizontalen Anordnung der Mikrospule zum B_0 -Feld. So können nun im stopped-flow Modus Substanzen bis in den niedrigen Nanogram-Bereich vermessen werden. Dies konnte im Rahmen dieser Dissertation anhand zahlreicher Versuche mittels artifizieller Standards wie auch Realproben nachgewiesen werden. Somit ist die bereits etablierte HPLC-NMR Kopplung nun auch in einer miniaturisierten Variante für robuste Routinemessungen anwendbar.

Die CapLC-NMR-Kopplung wird auch zukünftig eine Weiterentwicklung erfahren. So sollten die erzielten Empfindlichkeiten weiter verbessert werden, so dass neben ^1H -Spektern auch Heteroatome, insbesondere ^{13}C -Kerne, besser detektiert werden können. Höhere Empfindlichkeiten werden dann auch die optimierte Detektion von limitierten Probenmengen im continuous-flow NMR-Modus erlauben. Diese Echtzeit-NMR-Detektionsart ist besonders wünschenswert, da ihr Durchsatz deutlich erhöht ist, die benötigten Analysenzeiten erheblich sinken, eine für industrielle Anwendungen und Screening-Aufgaben besonders wichtige Voraussetzung. Auf Grund der in diesem

Modus nur begrenzt möglich Anzahl an Transienten sind die erzielbaren Detektionslimits für die Protonendetektion bei ca. 1 μg festzulegen. Für die quantitative continuous-flow ^{13}C -NMR-Detektion ist ein entsprechender Mikroprobenkopf in unserem Arbeitskreis in der Entwicklung. So werden in diesem die hohen Empfindlichkeiten der solenoiden Konfiguration mit der Empfindlichkeitssteigerung durch Relaxationszeit-verkürzende immobilisierte Gadoliniumchelate^[178] kombiniert. Somit sollte eine Echtzeitdetektion von ^{13}C -Kernen im Durchfluss möglich werden. Eine weitere Möglichkeit, den Durchsatz in CapLC-NMR-Systemen zu erhöhen ist die parallele Detektion. Solenoidale Mikrospulen ermöglichen auf Grund ihrer geringen Größe die Platzierung mehrerer Detektionsspulen in nur einem Probenkopf, es ist natürlich darauf zu achten, dass diese Spulen nicht miteinander kommunizieren. Zwei, vier oder sogar sechzehn Detektionsspulen sind so denkbar.

Zuletzt möchte ich auch auf Weiterentwicklungen im Gebiet stationärer Phasen hinweisen, welche Vorteile für die NMR-Detektion haben. HPLC-Säulenmaterialien sollten folgende zum Teil konkurrierende Kriterien erfüllen: Trenneffizienz (welche sowohl die Auftrennung von Komponenten, als auch die erzielbaren theoretischen Böden beinhaltet), Analysenzeit und Beladbarkeit. Die ersten beiden Kriterien konnten mit speziell auf die zu analysierenden Komponenten angepassten stationären Phasen in Kapillar-HPLC-Trennung erfüllt werden, eine hohe Beladbarkeit ist allerdings nur bedingt vorhanden, vor allem für die NMR-Detektion aber wünschenswert. In einem gewissen Mass wurde eine solch erhöhte Kapazität bereits für C_{30} -Phasen^[179] belegt. Neu synthetisierte polymerbelegte Phasen zeigten allerdings in ersten Versuchen deutlich erhöhte Beladbarkeit. Diese Phasen können somit zukünftig potentiell verbesserte Empfindlichkeiten in CapLC-NMR-Systemen gewährleisten, was es in Experimenten noch zu belegen gilt. Weiterer Vorteil dieser Phasen war eine überlegene Auftrennung von Carotenoiden auch bei isokratischer mobiler Phase (100% MeCN), in NMR-Spektren häufig störende Lösungsmittelsignale können somit auf ein Minimum reduziert werden.

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.

Die Peptidtrennungen im MikroSPE-CapLC-System wurden mittels einer Merck Hitachi LC-7110 Pumpe (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) durchgeführt, für die Temperaturgradienten ein Mistral Säulenofen Model 880 (Spark Holland, Emmen, Netherlands) verwendet und die Detektion mit einem thermo separation products Spectra 100 variablen UV/VIS-CE-Detektor (tsp GmbH, Egelsbach) durchgeführt. Für CapLC-Trennungen ohne on-line μ SPE-Extraktion wurde ein 50 nl ChemInert CBW 0160 Ventil (Vici AG Valco Int., Schenk, Schweiz) verwendet, als Software zur

Datenaufzeichnung und -auswertung diente EZChrom Chromatography Data System 6.8 (Scientific Software Inc., Pleasanton, USA).

7.1.2 Herstellung von Kapillartrennsäulen

Zum Slurry-Packen wurde eine pneumatische HPLC-Pumpe (Knauer GmbH, Berlin-Zehlendorf) oder eine ISCO Model 100DM Spritzenpumpe gesteuert durch ein ISCO Series D Pumpenkontroller (Isco Inc., Lincoln, USA) 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 Ferrule FS1.4-5 (Vici AG Valco Int., Schenkon, 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 Druckers 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 Mikro-ESI-Ionisationsnadel 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 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 Mikroprobenköpfe dienten ein selektiver ¹H- und ein inverser ¹H/¹³C-Mikrodurchflusssprobenkopf mit 1,5 μl aktivem Detektionsvolumen in solenoider Konfiguration

(Protasis Corp., Marlboro, MA, USA). Für die CapLC-NMR-Kopplung wurde dieser NMR-Probenkopf über eine 3 m lange, 50 μm I.D. Transferkapillare mit dem Auslaß des UV-Detektors verbunden. Für stopped-flow NMR-Experimente ist zudem ein NMR Peak Parking Ventil vor dem Injektionsventil einzufügen. 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).

7.2 Chemikalien

Es wurden ausschließlich HPLC-reine Lösungsmittel verwendet, entweder LiChrosolv (Merck, Darmstadt) oder von Fischer Scientific (Loughborough, UK). Für die CapLC-NMR-Kopplung nur volldeuterierte Lösungsmittel (Deutero, Kastellaun). Wasser wurde über ein Milli-Q Reinigungssystem (Millipore, Billerica, MA, USA) im Hause aufbereitet.

7.3 Probenvorbereitung und Extraktion

7.3.1 Standards

Die Tocopherol-Standards, α -, β -, γ - und δ - Tocopherol sowie α -Tocopherol-Acetat wurden bei CalBiochem (San Diego, USA) bestellt, Tocol von Eisai Inc. (Teaneck, NJ, USA) zur Verfügung gestellt. Die Konzentration wurde durch Lösen in MeOH auf 1,67 mg/ml (100 nl Injektion) für CapLC-UV- und -ESI/MS-Experimente bzw. 6,67 mg/ml (200 nl Injektion) für die CapLC-NMR-Messungen eingestellt.

Die Peptidstandards, Corazonin, Angiotensin II, Bradykinin, Neurotensin, Bombesin und Substanz P bei Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) mit einer Reinheit von min. 96% bestellt. Die Konzentration wurde durch Lösen in Wasser auf 0,1 mg/ml für direkte Injektion (50 nl) bzw. 80 ng/ml für die MikroSPE-CapLC-Messungen justiert. Die synthetischen phosphorylierten Peptide wurden von Prof. R. Bischoff (Universität Groningen, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Für Spritzeninjektions-NMR-Experimente wurden jeweils 0,5 g in 50 μl D₂O gelöst, für stopped-flow NMR wurde eine Konzentration von 2 mg/ml (200 nl Injektion) verwendet.

Die Flavonoid-Standards wurden bei Extrasynthese (Genay, Frankreich) bestellt. Die Standardlösung für die stopped-flow NMR-Experimente betrug dabei 2 mg/ml in MeOH-d₄, für die continuous-flow NMR-Experimente ein dreier Standard (Quercetin, Kaempferol und Formononetin) mit jeweils 10 mg/ml in Aceton-d₆ : D₂O = 80 : 20. Für die CapLC-ESI/MS-Messungen wurde dieser Standard in einer Konzentration von 1 mg/ml verwendet.

7.3.2 Extraktion von biologischen Proben

Extraktion von *Radix Astragali*:

MSPD: 0,5 g *Radix Astragali* Pulver (~60 mesh ASTM) wurden mit 1,0 g 40 - 70 µm C₁₈-Sorbensmaterial (IST Ltd., Hengoed Mid Glam, UK) im Mörser homogenisiert und dann auf ebenso 1,0 g dieser Phase in eine SPE-Spritze gepackt. Aus dieser Kartusche wurden mit 10 ml Wasser polare Verunreinigungen entfernt und schließlich die Iso-Flavonoide mit 10 ml MeOH - H₂O (90 : 10, v/v) eluiert. Dieses Eluat wurde im N₂-Strom zur Trockne eingedampft und in 1 ml Methanol wieder aufgenommen. Diese Lösung diente für die HPLC-ESI/MS⁽ⁿ⁾-Untersuchungen, für die CapLC-NMR wurden zehn Extrakte gepoolt.

Zum Vergleich der Extraktionseffizienz unterschiedlicher Techniken wurden zudem 5 g Pulver mit 100 ml MeOH - H₂O (80 : 20, v/v) über 8 h im Soxhlet extrahiert, gefiltert, im N₂-Strom zur Trockne eingedampft und in 25 ml MeOH wieder aufgenommen. Alternativ dazu wurden 1 g Pulver in 10 ml MeOH - H₂O (90 : 10, v/v) suspendiert und bei 50°C für 60 min im Ultraschallbad extrahiert. Der Extrakt wurde dann bei 3000 rpm für 3 min zentrifugiert, das überstehende Volumen abpipettiert, im N₂-Strom zur Trockne eingedampft und in 10 ml MeOH wieder aufgenommen.

Rosmarin-Extrakt:

20 mg des kommerziellen Rosmarin-Extraktes wurden in MeCN-d₃ : D₂O (50 : 50, v/v) gelöst, gefiltert und direkt in das CapLC-System injiziert.

7.3.3 On-line μ SPE zur Bestimmung von Peptiden aus Wasserproben

Das MikroSPE-CapLC-System wurde in einer Ventilschaltung aus zwei Rheodyne 7125 und 7000 Ventilen (Rheodyne, Cotati, USA) verwirklicht. Als μ SPE-Kartusche diente eine selbst-gepackte 3 cm x 250 μ m I.D. Kapillarsäule mit ProntoSil 300 Å – 5 μ m – C₃₀ (EC) als Sorbensmaterial. Der Beladungsschritt erfolgt bei einer Flussrate von 50 μ l/min mit einer mobilen Beladungsphase aus MeCN : H₂O : TFA = 3 : 96,9 : 0,1 (v/v/v) gefördert durch eine Merck Hitachi LC-7100 Pumpe (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan).

7.4 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

7.4.1 Chromatographische Bedingungen

Tocopherole:

Die Tocopherol-Homologen wurden auf einer 15 cm x 250 μ m C₃₀-Kapillare (ProntoSil 200 Å – 3 μ m – C₃₀) unter Verwendung einer isokratischen mobilen Phase aus MeOH : H₂O = 96 : 4 für die CapLC-UV und -ESI/MS bzw. MeOH-d₄ : D₂O = 90 : 10 für die continuous-flow NMR-Experimente bei einer Flussrate von jeweils 5 μ l/min aufgetrennt. UV-Detektion erfolgte on-capillary (75 μ m) bei 285 nm.

Flavonoide:

Der Flavonoidstandard bestehend aus den Flavonoiden (Quercetin, Kaempferol und Fromononetin) und deren 3- (Flavonoide) bzw. 7 (Isoflavonoid)- β -O-Glykosiden, sowie der Radix Astragali Extrakt wurden mittels Kapillar-HPLC auf einer 15 cm x 250 μ m C₁₈-Kapillarsäule (ProntoSil Eurobond 120 Å – 5 μ m) bei einer Flussrate von 5 μ l/min aufgetrennt und on-capillary bei 260 nm mittels UV detektiert. Als Lösungsmittelgradient diente eine Mischung aus MeCN-d₃ : D₂O = 10 : 90 auf 99 : 1 linear in 25 min (unter Zusatz von 0,1% TFA für die CapLC-NMR- und 0,1% Essigsäure für die CapLC-ESI/MS-Messungen). Die korrespondierenden HPLC-DAD und -ESI/MS⁽ⁿ⁾ wurden auf einer 25 cm x 4.6 mm C₁₈-HPLC-Säule (ProntoSil

Eurobond 120 Å – 5 µm) bei einer Flussrate von 1 ml/min aufgetrennt. Als mobile Phase diente ein Gradient aus MeCN und H₂O jeweils unter Zusatz von 0,1% Essigsäure, startend von 10 : 90, linear auf 90 : 10 bis 25 min, linear auf 100 : 0 bis 28 min, diese Zusammensetzung wurde dann bis zu Beendigung der Trennung gehalten. UV-Detektion erfolgte bei 260 nm.

Die continuous-flow Experimente des dreier Standards sowie dessen CapLC-ESI/MS-Untersuchungen wurden auf einer 10 cm x 250 µm C₁₈-Kapillare (ProntoSil 200 Å – 3 µm – C₁₈ SH) mit einer Flussrate von 5 µl/min bei isokratischer mobiler Phase von MeCN-d₃ : D₂O = 70 : 30 (jeweils unter Zusatz von 0,1% TFA) getrennt.

Peptide:

Die bioaktiven Peptide wurden nach Extraktion mittels on-line µSPE auf einer 15 cm x 250 µm C₃₀-Kapillare (ProntoSil 200 Å – 3 µm – C₃₀) mit einer mobilen Phase aus MeCN : H₂O : TFA = 22,5 : 77,4 : 0,1 (v/v/v) bei einem Fluss von 5 µl/min getrennt. Zur Verbesserung der Trennung wurde folgender Temperaturgradient eingesetzt: 30°C initiale Temperatur für 5 min, linearer Temperaturanstieg von 2°C/min bis 50°C, diese Temperatur wurde bis zur Beendigung der Trennung gehalten. UV-Detektion erfolgte on-capillary (100 µm) bei 210 nm.

Die phosphorylierten Peptide wurden auf einer 15 cm x 250 µm C₁₈-Kapillare (ProntoSil 200 Å – 3 µm – C₁₈ SH) unter Verwendung eines Lösungsmittelgradienten von MeCN-d₃ : D₂O (jeweils mit 0,1% TFA) = 6 : 94 auf 30 : 70 in 45 min getrennt, UV-Detektion erfolgte on-capillary (100 µm) bei 214 nm.

Rosmarin-Extrakt:

Der Rosmarin Extrakt wurden auf einer 15 cm x 250 µm C₁₈-Kapillare (ProntoSil Eurobond 5 µm – 120 Å) mit folgendem Gradienten (MeCN-d₄ : D₂O jeweils unter Zusatz von 0,1% TFA) aufgetrennt: 0 min: 10 : 90, linear auf 50 : 50 bis 20 min, linear auf 70 : 30 bis 24 min, linear auf 99 : 1 bis 32 min, gehalten bis zum Ende des Chromatogramms. UV-Detektion erfolgte on-capillary (100 µm) bei 254 nm.

7.5 Kapillar-HPLC-MS-Experimente

HPLC-ESI/MS⁽ⁿ⁾-Messungen von *Radix Astragali*:

Das HPLC-Eluat wurde durch ein Split-Ventil im Verhältnis 1 : 3,84 auf 207 $\mu\text{l}/\text{min}$ minimiert. Die Ionisationsparameter waren wie folgt: Positiver Ionisationsmodus, Kapillarspannung 4000 V, Endplattenspannung -500 V; Nebulizer (N_2) 35,0 psi; Trockengas (N_2) 10,0 l/min bei 365°C. Der Massenanalysator scannte von 100 bis 600 amu. Die MS⁽ⁿ⁾-Spektren wurden im auto-MS/MS-Modus mit einer Fragmentierungsspannung von 2,0 V aufgezeichnet.

CapLC-ESI/MS⁽ⁿ⁾-Experimente:

Für diese Messungen wurde eine auf die geringen Elutionsvolumen angepasste ESI-Spraynadel verwendet. Die Detektion erfolgt im positiven Ionisationsmodus mit N_2 als Nebulizer (11 psi) und Trockengas (5 l/min) bei 325°C. Die Kapillarspannung wurde auf 3,5 kV eingestellt, compound stability und trap drive level 75%. Für die Sensitivität und Trennstärke sind vor allem die Ionenfallenparameter abhängig von der untersuchten Probe zu optimieren, diese Parameter sind beispielhaft für die Tocopherol Identifikation in Tabelle 7 (Seite 57) gezeigt. Zur Bestimmung der Fragmentierungsmuster wurde eine Fragmentierungsspannung von 2,0 V im auto-MS/MS Modes verwendet.

7.6 NMR-Spektroskopie

7.6.1 Flow-Injektion-NMR-Experimente

Tocopherole:

Die ^1H -NMR-Spektren entlang der Achsen des 2D-NMR-Spektrums wurden mittels Spritzeninjektion einer 10 mg/ml α -Tocopherollösung in MeOH-d_4 mit dem Pulsprogramm zgcprsp unter Vorsättigung der Lösungsmittelresonanzen durch Rechteckspulse aufgezeichnet. Hierfür wurden 128 Transienten mit 32k time domain,

32k komplexen Datenpunkten und einer spektralen Auflösung von 9091 Hz aufsummiert, vor der Fouriertransformation wurde der FID mit einer squared sine bell Funktion (LB = 1 Hz) multipliziert, um das Signal-zu-Rausch Verhältnis zu verbessern.

Phosphorylierte Peptide:

Alle phosphorylierten Spezies wurden zuerst in wässriger Lösung durch direkte Spritzeninjektion in den NMR-Mikroprobenkopf vermessen. Für diese ^1H -Spektren wurde das Pulsprogramm `zgcppr` mit Unterdrückung des Wassersignals durch Vorsättigung mit Rechteckspulsen verwendet. Es wurden jeweils 512 Transienten mit 32k time domain, 32k komplexen Datenpunkten und einer spektralen Auflösung von 6024 Hz aufsummiert. Vor der Fouriertransformation wurden die FIDs mit einer squared sine bell Funktion (LB = 0,3 Hz) multipliziert. Zur vollständigen Signalzuordnung wurden vom nichtphosphorylierten Peptid YY zudem ein ^{13}C -NMR-Spektrum sowie diverse 2D-NMR-Experimente aufgezeichnet. Das ^{13}C -NMR-Spektrum wurde mit dem Pulsprogramm `zpgg30` vermessen, die Anregung der ^{13}C -Kerne erfolgte hierbei durch Magnetisierungstransfer von angeregten Protonen (invers). 64k Transienten wurden mit 32k komplexen Datenpunkten und einer spektralen Auflösung von 38461 Hz aufsummiert, vor der Fouriertransformation wurde der FID mit einer squared sine bell Funktion (LB = 3 Hz) multipliziert. Das ^1H , ^1H -COSY wurde mit dem Pulsprogramm `cosygs` vermessen. In F2 Dimension wurden hierfür 16 Transienten mit 2k time domain, 1k komplexen Datenpunkten und einer spektralen Auflösung von 6329 Hz aufsummiert, in F1 Dimension mit 256 time domain und 512 komplexen Datenpunkten. Das HSQC-Spektrum wurde mit dem Pulsprogramm `hsqcZ` aufgenommen, in F2 wurden 196 Transienten mit 2k time domain, 2k komplexen Datenpunkten und einer spektralen Auflösung von 6329 Hz aufsummiert, in F1 mit 256 time domain und 512 komplexen Datenpunkten. Das HMBC wurde mit dem Pulsprogramm `hmbcZ` aufgezeichnet, 512 Transienten wurden aufsummiert, alle anderen Parameter sind gleich wie im HSQC.

7.6.2 Kapillar-HPLC-NMR-Kopplungsexperimente

Tocopherole:

Die continuous-flow NMR-Experimente wurden mit dem Pulsprogramm lc2pnps bei Unterdrückung der Lösungsmittelsignale durch Rechteckspulse aufgenommen. Während der Trennung wurden 256 Reihen mit jeweils 36 s Messzeit aufgezeichnet, in jeder dieser Reihen wurden 16k Transienten mit 4k komplexen Datenpunkten und einer spektralen Auflösung von 9615 Hz bei einer Relaxationswartezeit von 1 s aufsummiert. Der Pulswinkel betrug 30°. Vor der Fouriertransformation wurde der FID mit einer squared sine bell Funktion multipliziert.

Das 2D stopped-flow NMR-Spektrum von α -Tocopherol wurde mit dem Pulsprogramm cosyppns mit Lösungsmittelvorsättigung durch Rechteckspulse aufgezeichnet. In F2 Dimension wurden 2k Transienten mit 1k komplexen Datenpunkten und einer spektralen Auflösung von 6024 Hz, in F1 Dimension 243 Transienten mit 512 komplexen Datenpunkten aufsummiert. Der Pulswinkel betrug 30°. Vor der Fouriertransformation wurden die FIDs mit einer squared sine bell Funktion (LB = 1 Hz) multipliziert.

Flavonoide:

Die Flavonoide aus der Standardlösung und die Isoflavonoide aus dem *Radix Astragali* wurden im stopped-flow ^1H -NMR-Modus unter Verwendung des Pulsprogrammes zgcpprsp unter Vorsättigung der Lösungsmittelresonanzen durch Rechteckspulse vermessen. Für die Isoflavonoide aus dem *Radix Astragali* wurden 30k, 12k, 1k and 1,4k Transienten mit 64k komplexen Datenpunkten und einer spektralen Auflösung von 12195 Hz aufsummiert (Peak 1-4). Vor der Fouriertransformation wurden die FIDs mit einer squared sine bell Funktion (LB = 0,5 Hz) multipliziert. Die Standards wurden mit jeweils 32k komplexen Datenpunkten und einer spektralen Auflösung von 12195 Hz vermessen. Für Kaempferol-Glykosid, Quercetin und Formononetin wurden 1k Transienten, für Quercetin-Glykosid und Ononin 2k Transienten und für Kaempferol 8k Transienten aufsummiert. Vor der Fouriertransformation wurden die

FIDs mit einer squared sine bell Funktion ($LB = 1$ Hz) multipliziert. Die continuous-flow Experimente wurden mit dem Pulsprogramm lc2pnps bei Unterdrückung der Lösungsmittelsignale durch Rechteckspulse aufgezeichnet. Während der Messung wurden in 63 Reihen jeweils 32 Transienten mit 16k komplexen Datenpunkten und einer spektralen Auflösung von 8474 Hz aufgezeichnet, die Messzeit einer Reihe war unter diesen Bedingungen somit 48 s. Vor der Fouriertransformation wurden die FIDs mit einer squared sine bell Funktion ($LB = 1$ Hz) multipliziert.

Phosphorylierte Peptide:

Die phosphorylierten Peptide wurden nach der Kapillar-HPLC Trennung im stopped-flow ^1H -NMR-Modus vermessen. Als Pulsprogramm diente zgcprsp ohne Vorsättigung der Lösungsmittelresonanzen. Es wurden jeweils 8k 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 ($LB = 1$ Hz) multipliziert.

Rosmarin-Extrakt:

Rosmarinsäure, Carnosolsäure und Carnosol wurden nach der Kapillar-HPLC-Trennung im stopped-flow ^1H -NMR-Modus vermessen. Hierzu wurde das Pulsprogramm zgcprsp unter Vorsättigung der Lösungsmittelresonanzen mit Rechteckspulsen verwendet. Hierzu wurden 3003 (Rosmarinsäure), 2350 (Carnosolsäure) bzw. 24k (Carnosol) Transienten mit 16k komplexen Datenpunkten und einer spektralen Auflösung von 15151 Hz aufsummiert. Vor der Fouriertransformation wurden die FIDs mit einer squared sine bell Funktion ($LB = 1$ Hz) multipliziert.

8 Literatur

- [1] K. Albert, M. Krucker, T. Glaser, A. Schefer, A. Lienau, D. Zeeb, *Anal. Bioanal. Chem.* **372** (2002), 25-26.
- [2] K. Albert (Ed.), *On-line LC-NMR and Related Techniques*, John Wiley and Sons Ltd, Chichester, England, **2002**.
- [3] L. Rivera, M. J. C. Curto, P. Pais, M. T. Galceran, L. Puignou, *J. Chromatogr. A* **731** (1996), 85-94.
- [4] B. Halliwell, *The Lancet* **344** (1994), 721-724.
- [5] C. S. Yang, J. M. Landau, M. T. Huang, H. L. Newmark, *Annu. Rev. Nutr.* **21** (2001), 381-406.
- [6] V. L. W. Go, R. R. Butrum, D. A. Wong, *J. Nutr.* **133** (2003), 3830S-3836S.
- [7] B. Halliwell, *Nutr. Rev.* **55/1** (1997), S44-S55.
- [8] R. A. Larson, *Phytochem.* **27/4** (1988), 969-978.
- [9] H. M. Evans, K. S. Bishop, *Science* **56/1458** (1922), 650-651.
- [10] E. J. Fernholz, *J. Am. Chem. Soc.* **60** (1938), 700-705.
- [11] IUPAC-Kommission (JCBN), *Eur. J. Biochem* **123** (1982), 473-475.
- [12] H. K. Biesalski, J. Schrezenmeier, P. Weber, H. E. Weiß, *Vitamin: Physiologie, Pathophysiologie, Therapie*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, **1997**.
- [13] N. Cohan, C. G. Scott, C. Neukom, R. J. Lopresti, G. Weber, G. Saucy, *Helvetica Chimica Acta* **64/4** (1981), 1158-1173.
- [14] J. G. Biere, L. Corash, V. S. Hubbard, *New Engl. J. Med.* **308/18** (1983), 1063-1071.
- [15] R. J. Hamilton, C. Kalu, G. P. McNeill, F. B. Padley, J. H. Pierce, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **75/7** (1998), 813.
- [12] H. K. Biesalski, J. Schrezenmeier, P. Weber, H. E. Weiß, *Vitamin: Physiologie, Pathophysiologie, Therapie*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, **1997**.
- [16] G. W. Burton, K. U. Ingold, *J. Am. Chem. Soc.* **103** (1981), 6472.
- [17] I. Elmadfa, W. Bosse, *Vitamin E: Eigenschaften, Wirkungsweise und therapeutische Bedeutung*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, **1985**.
- [18] L. Mikkelsen, H. S. Hansen, N. Grunnet, J. Dich, *Lipids* **29/5** (1994), 369-372.
- [19] G. R. Buettner, *Arch. Biochem. Biophys.* **300/2** (1993), 535-543.
- [20] A. Kamal-Eldin, L. Å. Appelqvist, *Lipids* **31/7** (1996), 671-701.
-

- [21] R. Wolf, D. Wolf, V. Ruocco, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 10 (1998), 103-117.
- [22] P. Palozza, N. I. Krinsky, *Arch. Biochem. Biophys.* 297/1 (1992), 184-187.
- [23] E. E. J. Valk, G. Hornstra, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 70/2 (2000), 31-42.
- [24] P.-G. Pietta, *J. Nat. Prod.* 63 (2000), 1035-1042.
- [25] B. Watzl, G. Rechkemmer, *Ernährungs-Umschau* 48/12 (2001), 498-502.
- [26] U. Justesen, P. Knuthsen, T. Leth, *J. Chromatogr. A* 799 (1998), 101-110.
- [27] W. Zheng, S. Y. Wang, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001), 5162-5170.
- [28] D. J. Zeeb, B. C. Nelson, K. Albert, J. J. Dalluge, *Anal. Chem.* 72 (2000), 5020-5026.
- [29] H. Yamasaki, Y. Sakihama, N. Ikehara, *Plant Physiol.* 115 (1997), 1405-1412.
- [30] Deutsche Gesellschaft für Ernährung, *Ernährungsbericht 1991*, GDE e.V. Frankfurt, 1991.
- [31] A. Scalbert, G. Williamson, *J. Nutr.* 130 (2000), 2073S-2085S.
- [32] C. Morand, C. Manach, V. Crespy, C. Remesy, *Free Rad. Res.* 33 (2000), 667-676.
- [33] R. A. King, D. B. Bursill, *Am. J. Clin. Nutr.* 67 (1998), 867-872.
- [34] P. G. Pietta, P. L. Mauri, P. Simonetti, G. Testolin, *Fresenius J. Anal. Chem.* 352 (1995), 788-792.
- [35] P. Knekt, J. Kumpulainen, R. Järvinen, H. Rissanen, M. Heliövaara, A. Reunanen, T. Hakulinen, A. Aromaa, *Am. J. Clin. Nutr.* 76 (2002), 560-568.
- [36] D. Ingram, K. Sanders, M. Kolybaba, D. Lopez, *The Lancet* 350 (1997), 990-994.
- [37] P. Knekt, R. Järvinen, R. Seppänen, M. Heliövaara, L. Teppo, E. Pukkala, A. Aromaa, *Am. J. Epidemiol.* 146/3 (1997), 223-230.
- [38] Y. Hanasaki, S. Ogawa, S. Fukui, *Free Rad. Biol. Med.* 16/6 (1994), 845-850.
- [39] S. A. B. E. van Acker, D. J. van den Berg, M. N. J. L. Tromp, D. H. Griffioen, W. P. van Bennekorn, W. J. F. van der Vijgh, A. Bast, *Free Rad. Biol. Med.* 20/3 (1996), 331-342.
- [40] C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, *Methods Enzymol.* 234 (1994), 279-293.
- [41] C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, G. Paganga, *Free Rad. Biol. Med.* 20 (1996), 933-956.
- [42] E. Mutschler, G. Geisslinger, H. K. Kroemer, M. Schäfer-Korting, *Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2001.
- [43] V. Exarchou, N. Nenadis, M. Simidou, I. P. Gerothanassis, A. Troganis, D. Boskou, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002), 5294-5299.
- [44] I. I. Koleva, H. A. G. Niederländer, T. A. van Beek, *Anal. Chem.* 72 (2000), 2323-2328.
-

-
- [45] M.-A. Kang, S.-Y. Yun, J. Won, *Blood* 101/9 (2003), 3534-3542.
- [46] A.-H. Lo, Y.-C. Liang, S.-Y. Lin-Shiau, C.-T. Ho, J.-K. Lin, *Carcinogenesis* 23/6 (2002), 983-991.
- [47] M. Petersen, M. S. J. Simmonds, *Phytochemistry* 62 (2003), 121-125.
- [48] WHO monographs on selected medical plants Vol I, *Radix Astragali*, <http://Hwww.who.int/H>, 50-57.
- [49] S. Sinclair, *Altern. Med. Rev.* 3/5 (1998), 338-344.
- [50] M. Tomoda, N. Shimizu, N. Ohara, R. Gonda, S. Ishii, H. Otsuki, *Phytochem.* 31/1 (1992), 63-66.
- [51] N. A. El-Sebakhy, A. M. Saad, R. M. Absallah, S. M. Toaima, M. S. Abdel-Kader, F. R. Stermitz, *Phytochem.* 36/6 (1994), 1387-1389.
- [52] S. Ruiru, H. Luming, H. Year, Y. Ningyu, W. Shiai, C. Yonhshu, *J. Trad. Chin. Med.* 21/3 (2001), 232-235.
- [53] Y. Ma, Z. Tian, H. Kuang, C. Yuan, C. Shao, K. Ohtani, R. Kasai, O. Tanaka, Y. Okada, T. Okuyama, *Chem. Pharm. Bull.* 45/2 (1997), 359-361.
- [54] H. Hikino, S. Funayama, K. Endo, *Planta Medica* 30 (1976), 297-301.
- [55] H. B. Xiao, M. Krucker, K. Albert, X. M. Liang, *J. Chromatogr. A*, im Druck.
- [56] K. P. C. Vollhard, *Organische Chemie*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1988.
- [57] G. Löffler, *Grundzüge der physiologischen Chemie*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1983.
- [58] S. Oparil, E. Haber, *New Engl. J. Med.* 291 (1974), 389-401.
- [59] T. Mitsui, S. Nomura, M. Okada, Y. Ohno, H. Kobayashi, Y. Nakashima, Y. Murata, M. Takeuchi, N. Kuno, T. Nagasaka, J. O-Wang, M. D. Cooper, S. Mizutani, *Molecular Medicine* (2003), 57-61.
- [60] A. Barreras, C. Gurk-Turner, *BUMC Proceedings* 16 (2003), 123-126.
- [61] M. Perez, G. Molinaro, A. Adam, *J. Clin. Basic Cardiol.* 4 (2001), 39-46.
- [62] J. H. Gaddun, H. Schild, *J. Physiol.* 83 (1934), 1-14.
- [63] J. T. Potts, I. E. Fuchs, J. Li, B. Leshnower, J. H. Mitchell, *J. Physiol.* 514/3 (1999), 829-841.
- [64] O. S. Pedersen, Y. Liu, K. L. Reichelt, *J. Peptide Res.* 53 (1999), 641-646.
- [65] D. G. Payan, *Ann. Rev. Med.* 40 (1989), 341-352.
- [66] S. Matsuyama, R. Fukui, H. Higashi, A. Nishi, *Eur. J. Neurosci.* 18/5 (2003), 1247.
-

- [67] T. F. Degolier, G. E. Duke, R. E. Carraway, *Poultry Science* 76 (1997), 1435-1439.
- [68] M. J. Lundell, H.-K. Lee, E. Pérez, L. Chadwell, *Development* 130 (2003), 4109-4121.
- [69] J. Whitfield, *Nature* 400 (1999), 218.
- [70] A. C. Chan, M. Dalton, R. Johnson, G.-H. Kong, T. Wang, R. Thoma, T. Kurosaki, *EMBO Journal* 14/11 (1995), 2499-2508.
- [71] N. Bottini, L. Stefanini, S. Williams, A. Alonso, T. Jascur, R. T. Abraham, C. Couture, T. Mustelin, *J. Biol. Chem.* 277/27 (2002), 24220-24224.
- [72] C. Visco, G. Magistrelli, R. Bosotti, R. Perego, L. Rusconi, S. Toma, M. Zamani, O. Acuto, A. Isacchi, *Biochemistry* 39 (2000), 2784-2791.
- [73] S. R. Hubbard, *EMBO J.* 16/18 (1997), 5573-5581.
- [74] M. A. Rostagno, M. Palma, C. G. Barroso, *J. Chromatogr. A* 1012 (2003), 119-128.
- [75] E. Björklund, T. Nilsson, S. Bøwadt, *TRAC –Trends Anal. Chem.* 19/7 (2000), 434-445.
- [76] M. Gilar, E. S. P. Bouvier, B. J. Compton, *J. Chromatogr. A* 909 (2001), 111-135.
- [77] K.-S. Boos, C.-H. Grimm, *TRAC - Trends Anal. Chem.* 18/3 (1999), 175-180.
- [78] P. Hubert, A. Ceccato, P. Chiap, B. Toussaint, J. Crommen, *Stp. Pharma Sciences* 2 (1999), 160-180.
- [79] S. A. Barker, A. R. Long, C. R. Short, *J. Chromatogr.* 475 (1989), 353-361.
- [80] S. A. Barker, *J. Chromatogr. A* 885 (2000), 115-127.
- [81] S. A. Barker, *J. Chromatogr. A* 880 (2000), 63-68.
- [82] V. R. Meyer, *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie* 8. Aufl., Salle und Sauerländer Verlag, Frankfurt am Main, 1999.
- [83] M. Tswett, *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 24 (1906), 216-323.
- [84] L. C. Sander, K. Epler Sharpless, N. E. Craft, S. A. Wise, *Anal. Chem.* 66 (1994), 1667-1674.
- [85] M. Raitza, J. Wegmann, S. Bachmann, K. Albert, *Angew. Chem.* 112/19 (2000), 3629-3632.
- [86] M. Raitza, M. Herold, A. Ellwanger, G. Gauglitz, K. Albert, *Macromol. Chem. Phys.* 201 (2000), 825-829.
- [87] K. Albert, T. Lacker, M. Raitza, M. Pursch, H.-J. Egelhaaf, D. Oelkrug, *Angew. Chem.* 110 (1998), 809-812.
- [88] K. Albert, *TRAC - Trends Anal. Chem.* 17/10 (1998), 648-658.
- [89] M. Pursch, L. C. Sander, K. Albert, *Anal. Chem. news and features* 4/11 (1999), 733A-741A.
- [90] S. Strohschein, M. Pursch, D. Lubda, K. Albert, *Anal. Chem.* 70/1 (1998), 13-18.
-

- [91] G. Fischer, U. Skogsberg, S. Bachmann, H. Yüksel, S. Steinbrecher, E. Plies, K. Albert, *Chem. Mater.* 15/15 (2003), 4394-4400.
- [92] M. Jochum, H. Engelhardt, *Laborpraxis* 9 (2001).
- [93] G. Rozing, *LC/GC europe 16/6a* (2003), 14-19.
- [94] C. G. Horvath, B. A. Preiss, S. R. Lipsky, *Anal. Chem.* 39/12 (1967) 1422-1428.
- [95] T. Takeuchi, *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003), 26-27.
- [96] T. Takeuchi, *Fresenius J. Anal. Chem.* 337 (1990), 631-637.
- [97] D. Ishii, T. Takeuchi, *Trends Anal. Chem.* 9/5 (1990), 152-157.
- [98] N. K. Vadukul, C. R. Loscombe, *J. High Resol. Chromatogr. & CC* 5 (1982), 360-363.
- [99] R. P. W. Scott, P. Kucera, *J. Chromatogr.* 169 (1979), 51-57
- [100] M. Careri, A. Mangia, M. Musci, *J. Chromatogr. A* 794 (1998), 263-297.
- [101] F. Lemièrè, *LC/GC europe – Guide to LC-MS* (2001), 2-8.
- [102] E. Gelpi, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003), 567-581.
- [103] Y. Shen, R. Zhao, S. J. Berger, G. A. Anderson, N. Rodriguez, R. D. Smith, *Anal. Chem.* 74 (2002), 4235-4249.
- [104] R. Bischoff, B. Barroso, *LC/GC europe – Recent Applications in LC-MS* (2002), 26-32.
- [105] W. M. A. Niessen, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003), 413-436.
- [106] P. Myers, K. Bartle, *LC/GC europe – Recent Applications in LC-MS* (2002), 44-47.
- [107] E. M. Purcell, H. C. Torrey, R. V. Pound; *Phys. Rev.* 69 (1946), 37-38.
- [108] F. Bloch, W. W. Hansen, M. Packard; *Phys. Rev.* 69 (1946), 127.
- [109] R. R. Ernst, W. A. Anderson, *Rev. Sci. Instr.* 37/1 (1966), 93-102.
- [110] E. Bayer, K. Albert, M. Nieder, E. Grom, T. Keller, *J. Chromatogr.* 186 (1979), 497-507.
- [111] N. Watanabe, E. Niki, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* 54 (1978), 194-199.
- [112] J.-L. Wolfender, K. Ndjoko, K. Hostettmann, *Phytochem. Anal.* 12 (2001), 2-22.
- [113] J. A. de Koning, A. C. Hogenboom, T. Lacker, S. Strohschein, K. Albert, U. A. T. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 813 (1998), 55-61.
- [114] K. Albert, G. Schlotterbeck, U. Braumann, H. Händel, M. Spraul, G. Krack, *Angew. Chem. Int. Ed.* 34/9 (1995), 1014-1016.
- [115] J. C. Lindon, J. K. Nicholson, I. D. Wilson, *J. Chromatogr. B* 748 (2000), 233-258.
- [116] K. Levsen, A. Preiss, M. Godejohann, *Trends Anal. Chem.* 19/1 (2000), 27-48.
- [117] 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.
- [118] B. Behnke, G. Schlotterbeck, U. Tallarek, S. Strohschein, L.-H. Tseng, T. Keller, K. Albert, E. Bayer, *Anal. Chem.* 68 (1996), 1110-1115.
- [119] D. L. Olson, T. L. Peck, A. G. Webb, R. L. Magin, J. V. Sweedler, *Science* 270 (1995), 1967-1970.
- [120] K. Albert, H. Günzler, Ed., *Analytiker-Taschenbuch Vol. 20*, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1998, 107-139.
- [121] W. Vilegas, J. H. Y. Vilegas, M. Dachtler, T. Glaser, K. Albert, *Phytochem. Anal.* 11 (2000), 317-321.
- [122] K. Pusecker, K. Albert, E. Bayer, *J. Chromatogr. A* 836 (1999), 245-252.
- [123] H. C Dorn, T. E. Glass, R. Gitti, K. H. Tsai, *Appl. Magn. Reson.* 2 (1991), 9-27.
- [124] 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.
- [125] M. Spraul, A. S. Freund, R. E. Nast, R. S. Withers, W. E. Mass, O. Corcoran, *Anal. Chem.* 75 (2003), 1546-1551.
- [126] D. L. Olson, M. E. Lacey, J. V. Sweedler, *Anal. Chem.* 1998, 70, 257A-264A.
- [127] N. Wu, T. L. Peck, A. G. Webb, R. L. Magin, J. V. Sweedler, *Anal. Chem.* 66 (1994), 3849-3857.
- [128] D. A. Jayawickrama, J. V. Sweedler, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003), 819-840.
- [129] M. E. Lacey, Z. J. Tan, A. G. Webb, J. V. Sweedler, *J. Chromatogr. A* 922 (2001), 139-149.
- [130] G. Schlotterbeck, L.-H. Tseng, H. Händel, U. Braumann, K. Albert, *Anal. Chem.* 69/7 (1997), 1421-1425.
- [131] J. Schewitz, K. Pusecker, P. Gförer, U. Götz, L.-H. Tseng, K. Albert, E. Bayer, *Chromatographia* 50/5-6 (1999), 333-337.
- [132] A. M. Wolters, D. A. Jayawickrama, A. G. Webb, J. V. Sweedler, *Anal. Chem.* 74 (2002), 5550-5555.
- [133] E. Rapp, A. Jakob, A. B. Schefer, E. Bayer, K. Albert, *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003), 1053-1061.
- [134] A. M. Wolters, D. A. Jayawickrama, C. K. Larive, J. V. Sweedler, *Anal. Chem.* 74 (2002), 2306-2313.
- [135] Y. Li, A. M. Wolters, P. V. Malawey, J. V. Sweedler, A. G. Webb, *Anal. Chem.* 71 (1999),
-

- 4815-4820.
- [136] H. Lee, T. J. Griffin, S. P. Gygi, B. Rist, R. Aebersold, *Anal. Chem.* **74** (2002), 4353-4360.
- [137] J. W. Jorgenson,; K. DeArman Lukacs, *J. Chromatogr. A* **218** (1981), 209-216.
- [138] S. Li, D. K. Lloyd, *Anal. Chem.* **65** (1993), 3684-3690.
- [139] M. Schmid, F. Bäuml, A. P. Köhne, T. Welsch, *J. High Resol. Chromatogr.* **22/8** (1999), 438-442.
- [140] M. Mayer, E. Rapp, C; Marck, G. J. M. Bruin, *Electrophoresis* **20** (1999), 43-49.
- [141] E. Rapp, E. Bayer, *J. Chromatogr. A* **887** (2000), 367-378.
- [142] Y. Yamauchi, J. Kumantoni, *J. Chromatogr.* **210** (1981), 521-515.
- [143] R. J. Boughtflower, T. Underwood, C.J. Paterson, *Chromatographia* **40/5-6** (1995), 329-335.
- [144] G. E. Berendsen, R. Regouw, L. de Galan, *Anal. Chem.* **51/7** (1979), 1091-1093.
- [145] F. F. Meyer, R. A. Hartwick, *Anal. Chem.* **56** (1984), 2211-2214.
- [146] T. M. Zimina, R. M. Smith, P. Myers, B. W. King, *Chromatographia* **40/11-12** (1995), 662-668.
- [147] K.-E. Karlsson, M. Novotny, *Anal. Chem.* **60** (1988), 1662-1665.
- [148] S. M. Fields, *Anal. Chem.* **68** (1996), 2709-2712.
- [149] H. Minakuchi, K. Nakaishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, *Anal. Chem.* **68** (1996), 3498-3501.
- [150] M. Motokawa, H. Kobayashi, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, H. Jinnai, K. Hosoya, T. Ikegami, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A* **961** (2002), 53-63.
- [151] H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A* **797** (1998), 121-131.
- [152] F. C. Leinweber, D. Lubda, K. Cabrera, U. Tallarek, *Anal. Chem.* **74** (2002), 2470-2477.
- [153] H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A* **762** (1997), 135-146.
- [154] J. W. Cahn, *J. Chem. Phys.* **42/1** (1965), 93-99.
- [155] K. Cabrera, D. Lubda, H.-M. Eggenweiler, H. Minakuchi, K. Nakanishi, *J. High Resol. Chromatogr.* **23/1** (2000), 93-99.
- [156] N. Tanaka, H. Kobayakuchi, K. Nakanishi, H. Minakuchi, N. Ishizuka, *Anal. Chem. news & features* **6/8** (2001), 421A-429A.
- [157] F. Svec, E. C. Peters, D. Sýkora, J. M. J. Fréchet, *J. Chromatogr. A* **887** (2000), 2-29.
- [158] M. Krucker, A. Lienau, K. Putzbach, M. D. Grynbaum, P. Schuler, K. Albert, *Anal. Chem.*, zur
-

Veröffentlichung akzeptiert.

- [159] S. L. Abidi, T. L. Mounts, *J. Chromatogr. A* 782 (1997), 25-32.
- [160] S. L. Abidi, *J. Chromatogr. A* 881 (2000), 197-216.
- [161] E. Perri, F. Mazzotti, A. Raffaelli, G. Sindona, *J. Mass Spectr.* 35 (2000), 1360-1361.
- [162] A. Lienau, T. Glaser, M. Krucker, D. Zeeb, F. Ley, F. Curro, K. Albert, *Anal. Chem.* 74/20 (2002), 5192-5198.
- [163] K. Štulík, V. Pacáková, J. Suchánková, H. A. Claessens, *Analytica Chimica Acta* 352 (1997), 1-19.
- [164] X. Huang, S. Zhang, G. A. Schlutz, J. Henion, *Anal. Chem.* 74 (2002), 2336-2344.
- [165] J. J. Pesek, M. T. Matyska, S. Takhar, *Chromatographia* 48/9-10 (1998), 631-636.
- [166] H. P. J. Bennett, C. A. Brown, S. Solomon, *J. Liquid Chromatogr.* 3/9 (1980), 1353-1365.
- [167] T. Greibrokk, T. Anderson, *J. Sep. Sci.* 24 (2001), 899-909.
- [168] P. Molander, T. E. Gundersen, C. Haas, T. Greibrokk, R. Blomhoff, E. Lundanes, *J. Chromatogr. A* 847 (1999), 59-68.
- [169] F. Houdiere, P. W. J. Fowler, N. M. Djordjevic, *Anal. Chem.* 69 (1997), 2589-2593.
- [170] A. W. Purcell, G. L. Zhao, M. I. Aguilar, M. T. W. Hearn, *J. Chromatogr. A* 852 (1999), 43-57.
- [171] L. C. Sander, S. A. Wise, *J. Sep. Sci.* 24 (2001), 910-920.
- [172] M. Pursch, S. Strohschein, H. Händel, K. Albert, *Anal. Chem.* 68 (1996), 386-393.
- [173] R. Trones, A. Iveland, T. Greibrokk, *J. Micro. Sep.* 7 (1995), 505-512.
- [174] U. D. Neue, J. R. Mazzeo, *J. Sep. Sci.* 24 (2001), 921-929.
- [175] T. Miliotis, P.-O. Ericsson, G. Marko-Varga, R. Svensson, J. Nilsson, T. Laurell, R. Bischoff, *J. Chromatogr. B* 752 (2001), 323-334.
- [176] V. Exarchou, A. Troganis, I. P. Gerothanassis, M. Tsimidou, D. Boskou, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001), 2-8.
- [177] S. Munné-Bosch, L. Alegre, K. Schwarz, *Eur. Food Res. Technol.* 210 (2000), 263-267.
- [178] 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.
- [179] M. Dachtler, T. Glaser, H. Händel, T. Lackner, L.-H. Tseng, K. Albert, K. in: *Encyclopedia of Separation Science, Level II*, 747-760; I. D. Wilson, E. R. Adlard, M. Cooke, C. F. Poole (Eds.), Academic Press London, 2000.

Meine akademischen Lehrer waren:

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

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Manfred Krucker
Geburtsort: Memmingen
Geburtstag: 28.07.1975
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1982 - 1986 Grundschule Weißensberg.
1986 - 1995 Bodenseegymnasium Lindau (B).
30. Juni 1995 Allgemeine Hochschulreife.

Studium:

WS 95/96-WS 97/98 Chemiestudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
Jan. - Juli 2001 Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. Klaus Albert am Institut für Organische Chemie zum Thema „Miniaturisierung chromatographischer Trennmethoden und kernresonanz-spektroskopische Strukturaufklärung zur Analyse von Tocopherol-Homologen (Vitamin E)“.
23. Juli 2001 Erwerb des akademischen Grades „Diplom Chemiker“.
Aug. 2001 - Feb. 2004 Promotion im Arbeitskreis von Prof. Dr. Klaus Albert am Institut für Organische Chemie zum Thema „Direktgekoppelte miniaturisierte Analysensysteme zum Nachweis von pharmakologisch aktiven Substanzen aus biologischen Proben“.
Okt. 2001 - Feb. 2004 Kollegiat im Graduiertenkolleg „Chemie in Interphasen – Synthese, Dynamik und Anwendung polymerfixierter aktiver Zentren“ an der Universität Tübingen.
Juli - Okt. 2002 Marie Curie Stipendiat an der „Oslo Analytical Miniaturization Doctoral Training Site“ in der Arbeitsgruppe von Prof. T. Greibrokk an der Universität Oslo, Norwegen.